Het thermoregulatiegedrag bij vissen

J. D. Kuiper

HET THERMOREGULATIEGEDRAG BIJ VISSEN

THERMOREGULATORY BEHAVIOUR IN FISH

RIJKSUNIVERSITEIT GRONINGEN

HET THERMOREGULATIEGEDRAG BIJ VISSEN

PROEFSCHRIFT

ter verkrijging van het doctoraat in de Wiskunde en Natuurwetenschappen
aan de Rijksuniversiteit Groningen
op gezag van de Rector Magnificus Dr. S. K. Kuipers
in het openbaar te verdedigen op maandag 13 juni 1988
des namiddags te 4.00 uur
door

JOHAN DIRK KUIPER

geboren te Groningen

1988
DRUKKERIJ VAN DENDEREN B.V.
GRONINGEN

Promotores: Prof. dr B. Bohus
Prof. dr E. Schönbaum
Referent: Dr J. Frens

voor Margriet

voor mijn ouders

Inhoudsopgave

Hoofdstuk 1		INLEIDING EN VRAAGSTELLING	1
	1.1	Inleiding	1
	1.2	De lichaamstemperatuur van de vis en de omgevingstemperatuur	3
	1.3	Temperatuurperceptie	6
	1.4	Biochemie	6
	1.5	Neurofysiologie	7
	1.6	Het gedrag en de watertemperatuur	10
	1.6.1	Gradiëntopstellingen	10
	1.6.2	Shuttlebox	11
	1.6.3	Resultaten van het temperatuurselectiegedragonderzoek	11
	1.7	Conclusies	14
	1.8	Vraagstelling	19
		Literatuurreferenties	21
Hoofdstuk 2		MATERIAAL EN METHODE	25
	2.1	Inleiding	25
	2.2	Proefdieren	26
	2.3	De experimentele opstelling	27
	2.4	Het globale verloop van de experimentele cyclus	30
	2.5	Opslag van gegevens	31
	2.6	De temperatuurkarakteristiek van de opstelling en een evaluatie van de gebruikte methoden	31
	2.7	Statistische methoden en dataverwerking	39
		Literatuurreferenties	40
		Addendum	40
Hoofdstuk 3		DE INVLOED VAN EEN DALING VAN DE TEMPERATUUR OP HET GEDRAG VAN VISSEN	43
	3.1	Inleiding	43
	3.2	Het leergedrag van de vis	44
	3.3	De temperatuurdrempel	45
	3.4	De wachttijd en de temperatuurdrempel	48
	3.5	De bovengrenstemperatuur en de temperatuurdrempel	50
	3.6	Het effect van het temperatuursverschil tussen beide compartimenten op het moment van overzwemmen en de daarop volgende temperatuurdrempel	55
	3.7	De tijd en de temperatuurdrempel	59
	3.8	De invloed van de vorige temperatuurdrempel op de momentane drempel	63
	3.9	Het lopend gemiddelde van de temperatuurdrempel	65

	3.10	De relatie tussen de temperatuurdrempel en de reactietijd.	68
	3.11	Het spontaan gedrag	71
	3.12	Het gedrag van de vis tijdens het continu koelen van beide compartimenten	78
	3.13	Algemene discussie	80
		Literatuurreferenties	83
Hoofdstuk	4	HET THERMOREGULATIESYSTEEM	85
	4.1	Inleiding	85
	4.2	Materiaal en methode	87
	4.3	Resultaten	88
	4.4	Discussie	95
		Literatuurreferenties	97
Hoofdstuk	5	DE FARMACOLOGISCHE BEINVLOEDING VAN HET THERMOGEDRAG DOOR ONTKOPPELAARS VAN DE OXIDATIEVE FOSFORYLERING	101
	5.1	Inleiding	101
	5.2	Materiaal en methode	103
	5.3	Resultaten	104
	5.4	Discussie	110
Hoofdstuk	6	HET THERMOREGULATIEGEDRAG EN HET CENTRAAL ZENUWSTELSEL	115
	6.1	Inleiding en probleemstelling	115
	6.2	Methodiek	118
	6.2.1	Introductie	118
	6.2.2	Het bepalen van de intervallengtes en de Monte Carlo simulatie	119
	6.2.3	Een nummeriek voorbeeld	120
	6.2.4	Het bepalen van de 'turning points'	121
	6.3	De lengte van de intervallen	121
	6.4	Turning points	124
	6.5	Het effect van diazepam op het thermoregulatie-gedrag	130
	6.5.1	Methode	130
	6.5.2	Resultaten	130
	6.5.3	Discussie	131
	6.6	Hebben vissen een referentie'temperatuur'?	138
		Literatuurreferenties	140
		Addendum	142
Hoofdstuk	7	EVALUATIE EN PERSPECTIEVEN VOOR VERDER ONDERZOEK	145
	7.1	Evaluatie	145
	7.2	Andere vissoorten	154

7.2.1	Zilverkarpers	154
7.2.2	Schubkarper	154
7.2.3	Goudvissen	158
7.2.4	Forel	161
7.2.5	Concluderende opmerkingen	162
7.3	Perspectieven voor verder onderzoek	163
7.4	Slotconclusies	163
	Literatuurreferenties	164
	Addendum	165

SAMENVATTING 167
SUMMARY 171
NAWOORD 173

INLEIDING EN VRAAGSTELLING

§1.1 Inleiding
§1.2 De lichaamstemperatuur van de vis en de omgevingstemperatuur
§1.3 Temperatuurperceptie
§1.4 Biochemie
§1.5 Neurofysiologie
§1.6 Het gedrag en de watertemperatuur
1.6.1 Gradiëntopstellingen
1.6.2 Shuttleboxopstelling
1.6.3 Resultaten van het temperatuurselectiegedragonderzoek
§1.7 Conclusies
§1.8 Vraagstelling
Literatuurreferenties

§1.1 Inleiding

Levensverschijnselen spelen zich af binnen nauwe temperatuurgrenzen. De bovengrens is bij eukaryoten 45°C. en de ondergrens ligt rond het vriespunt (0° C.) (Cossins en Bowler 1987). In dit opzicht is er een groot verschil met fysische en chemische natuurverschijnselen, die zich af kunnen spelen in een temperatuurtraject van nabij het absolute nulpunt tot de temperaturen van de zon. Het beperkte temperatuurbereik van de eukaryoten heeft te maken met de biochemische processen in deze organismen. Bij de bovengrens zijn de bindingskrachten die de complexe structuur van macromoleculen bepalen niet meer stabiel, terwijl rond het vriespunt de celstructuren door ijskristalvorming beschadigd worden (Cossins en Bowler 1987). In beide gevallen worden de biochemische processen in de cellen verstoord. Temperatuur is dus van fundamentele betekenis voor levensverschijnselen en levende organismen reageren dan ook op veranderingen in de omgevingstemperatuur (Precht et al. 1973).
In sensorisch opzicht zijn er verschillen tussen temperatuur en licht of geluid. Anders dan bij licht of geluid het geval is, heeft het organisme zelf een temperatuur. Dit maakt dat er bij het waarnemen van temperatuur enkele specifieke problemen zijn.

Bij zoogdieren vinden wij één van de meest complexe mechanismen om de gevolgen van fluctuaties in de omgevingstemperatuur voor hun lichaamstemperatuur te elimineren; deze dieren houden met behulp van een nog steeds niet volledig begrepen regelmechanisme hun lichaamstemperatuur op een vaste waarde. De zoogdieren en de vogels worden gerangschikt bij de ***endotherme*** dieren. Bij de endothermen varieert de lichaamstemperatuur in een traject van 4° C. ondanks veel grotere variatie in de omgevingstemperatuur (Hensel 1973). Dit wordt bereikt doordat er bij deze dieren een dynamisch evenwicht is tussen de warmteproductie en -

afgifte aan de omgeving. Hierbij spelen verschillende mechanismen een rol (Hensel et al. 1973, Prosser 1973). Enkele voorbeelden zijn:

- celmetabolisme: verhoging c.q. verlaging warmteproductie.
- bloedcirculatie: door het vergroten c.q. verminderen van de perifere doorbloeding kan de warmte-afgifte geregeld worden.
- vergroten c.q. verkleinen uitwisselingsoppervlak.
- verdamping van water: zweten, 'panting' bij de hond.
- isolatie: vacht, speklaag.
- gedrag: het verplaatsen naar een koelere c.q. warme omgeving.

Bij de endothermen is een zeer groot deel van het lichaam op de een of andere wijze bij de thermoregulatie betrokken en het centraal zenuwstelsel heeft hierbij een regulerende functie.
Voor het onderzoek over de thermoregulatie zijn lange tijd voornamelijk zoogdieren als proefdier gebruikt. Uit dit onderzoek is duidelijk geworden, dat het om een complex regelsysteem gaat, dat in voortdurende interactie staat met ander fysiologische systemen. Tijdens het ontrafelen van het thermoregulatiesysteem groeide een behoefte aan proefdieren met een 'éénvoudiger' thermoregulatiesysteem. De lagere vertebraten (reptielen, amphibien en vissen) zijn niet in staat om onafhankelijk van de omgevingstemperatuur hun lichaamstemperatuur te reguleren en worden daarom ***ectothermen*** genoemd. Deze dieren kunnen hun lichaamstemperatuur alleen controleren door naar een warmere of koudere plek te trekken: **thermoregulatiegedrag**.
Het thermoregulatiegedrag is niet beperkt tot de gewervelde dieren. Enkele voorbeelden zijn: Bijen regelen de temperatuur in de korf met specifiek gedrag (Jankowsky, 1973). Paramecium, een ééncellig organisme, is in staat om een thermisch niet aantrekkelijke plaats te vermijden (Frens 1983, Crawshaw et al. 1985).
Uit de voorafgaande opmerkingen zal duidelijk zijn geworden dat het probleem van aanpassing aan en regeling van de lichaamstemperatuur een algemeen biologisch probleem is met fysiologische, ethologische, oecologische facetten. Tijdens het hier beschreven onderzoek kwamen er farmacologische en systeemtheoretische aspecten bij.

De aanvankelijke opzet van het hier beschreven onderzoek was na te gaan of vissen geschikte proefdieren zijn voor thermoregulatieonderzoek. Thermoregulatie bij vissen lijkt op het eerste gezicht een vrij academisch probleem. Deze dieren hebben door de uitgebreide vascularisatie van de kieuwen een uitstekende warmtewisseling met hun omgeving. Daarom verwachten we, dat de lichaams- en de watertemperatuur vrijwel gelijk zijn. Vissen zijn voor hun lichaamstemperatuur geheel afhankelijk van de omgevingstemperatuur. Enkele grotere vissoorten vormen hierop een uitzondering. Zo is aangetoond dat, sommige tonijn- en haaisoorten een hogere lichaamstemperatuur hebben dan het omringende water (Carey et al. 1971, Dizon en Brill 1979). De meeste

vissoorten beïnvloeden, controleren, regelen (de hiervoor te gebruiken term is afhankelijk van de persoonlijke keuze van de onderzoeker) de temperatuur door hun gedrag: de dieren zoeken een warmere c.q. koudere omgeving op.
Het is bekend, dat vissen zich concentreren in bepaalde gebieden met een specifieke watertemperatuur. Vissers weten uit ervaring, dat vissen dikwijls voorkomen op plaatsen met een bepaalde watertemperatuur. Een voorbeeld is het 'zonnebaden' van snoeken op ondiepe plaatsen langs de waterkant. Het probleem van de temperatuurregulatie bij vissen is door verschillende onderzoekers aangepakt. In de volgende paragrafen volgt een beknopt overzicht van de literatuur. Belangrijke aspecten zijn:

- de lichaamstemperatuur van de vis ten opzichte van de watertemperatuur (§1.2).
- temperatuurperceptie. Kunnen vissen geconditioneerd worden op temperatuursveranderingen van het water? Welke temperatuursverschillen worden nog door vissen waargenomen?(§1.3)
- biochemie. Wanneer de temperatuur stijgt, neemt de warmtebeweging van de moleculen toe. Veel biochemische processen verlopen sneller bij een hogere temperatuur. Het gevolg hiervan is, dat allerlei processen sneller kunnen gaan verlopen, zoals het metabolisme, de zenuwgeleiding, de groei, en het genezen van verwondingen. Maar ook ingewikkelde functies als de algemene lichaamscoördinatie zijn temperatuurafhankelijk. Welke consequenties hebben deze temperatuureffecten voor het thermoregulatiegedrag van vissen en dus voor het onderzoek naar dit gedrag? (§1.4)
- neurofysiologie. Bij zoogdieren speelt een deel van de hypothalamus een centrale rol in de temperatuurregeling. Er is bij vissen onderzoek uitgevoerd aan neuronen uit een overeenkomstig gebied (§1.5).
- temperatuurselectiegedrag. Er zijn experimenten verricht waarbij vissen uit een groot scala van omgevingstemperaturen konden kiezen. Wat zijn de resultaten dit onderzoek (§1.6).

Onder thermogedrag wordt elke gedragsreactie verstaan die het gevolg is van een verandering van de omgevingstemperatuur. Het temperatuurselectiegedrag en het thermoregulatiegedrag zijn vormen van thermogedrag. Uiteraard is elk thermogedrag nog geen thermoregulatiegedrag, d.w.z. gedrag waarmee het dier zijn lichaamstemperatuur constant houdt.

§1.2 De lichaamstemperatuur van de vis en de omgevingstemperatuur
Brett (1924) heeft als eerste temperatuurmetingen bij grote vissen uitgevoerd. Dit onderzoek werd aan boord van een oceanografisch onderzoekschip verricht. De vissen werden met een net gevangen en het is

heel waarschijnlijk dat zijn proefdieren veel spierbewegingen hadden uitgevoerd voordat de lichaamstemperatuur via de cloaca gemeten kon worden. Ik heb deze metingen opnieuw statistisch bewerkt. Uit dit onderzoek blijkt, dat de lichaamstemperatuur van deze vissen hoger was dan van het zeewater:

		gemiddeld temp.verschil	s.d.
schelvis	36	+0.63°	0.09
kabeljouw	50	+0.61°	0.14

De zeewatertemperatuur was 8° - 10° Celsius.

Direct na het vangen is er dus een duidelijke verhoging te meten. Recentere metingen van Stevens en Sutterlin (1976) bij de Amerikaanse rode poon (Hemitripterus americanus), een vis die ook in een experimentele opstelling weinig beweegt en de implantatie van sensoren goed doorstaat, maken duidelijk, dat het temperatuursverschil vis - water kleiner is dan +0.001°.
De snelheid waarmee de vis na een stapvormige verhoging/verlaging van de temperatuur warmte opneemt/verliest, is verschillende malen onderzocht. Kubb et al. (1980) hebben de invloed van verschillende parameters zoals de lichaamsdiameter, het aanwezig zijn van een isolatielaag en de warmte-eigenschappen van de verschillende organen en weefsels op het temperatuursverloop van de vis na een stapvormige verhoging van de watertemperatuur geanalyseerd. Uit dit onderzoek blijkt, dat bij kleine vissen (<100 gram) het effect van deze parameters op de lichaamstemperatuur verwaarloosbaar is. Dit betekent dat bij kleine vissen het temperatuurverloop goed beschreven kan worden met de volgende vergelijking:

$$Y(t)=Y(0) \times e^{-k \times t}$$ (zie ook Stevens en Fry 1974, Müller 1976) [1]

Y(t) : het temperatuurverschil tussen vis en water in het verloop van de tijd.
t : de tijd in minuten gerekend vanaf het moment waarop de vis aan een andere temperatuur wordt onderworpen.
Y(0) : het temperatuursverschil op tijdstip 0.
k : een coëfficient, die afhankelijk is van het gewicht van de vis

De coëfficient k is gerelateerd aan het lichaamsgewicht. Voor Tilapia geldt:

$$k=2.167 \times W^{-0.329}$$ (Stevens en Sutterlin 1976) [2]

W : het lichaamsgewicht (g).

Met vergelijking [1] kan berekend worden, hoe een vis van ca 100 gram in een periode van minuten de temperatuursverandering van zijn omgeving zal volgen. Na 12 minuten zal het verschil kleiner zijn dan 1% van het aanvangsverschil.
In figuur 1.2.1 zijn de resultaten van verschillende onderzoekers samengevat. Het onderzoek van Müller (1976) is uitgevoerd bij vrij zwemmende vissen, waarbij een aan een radiozender gekoppelde thermosensor is ingebracht. Uit deze experimenten blijkt, dat de lichaamstemperatuur van een levende vis sneller afneemt dan bij een dood dier. Hieruit blijkt, dat de bloedsomloop in de warmte-uitwisseling een belangrijke rol speelt. Zo zullen organen, die relatief weinig doorbloedt worden langzamer koelen dan goed gevasculariseerde organen. De hersenen en rugspieren gedragen zich in dit opzicht mogelijk op een overeenkomstige wijze. Uit het onderzoek van Sorenson en Fromm (1977) met geisoleerde kieuwpreparaten van forellen blijkt, dat 60% van het warmteverlies via de kieuwen plaats heeft. Bij kleine vissen (<50 g. lich.gew.) speelt de huid waarschijnlijk ook een belangrijke rol in de warmte-uitwisseling, omdat deze dieren naar verhouding een groter lichaamsoppervlak hebben. Stevens en Sutterlin (1976) vinden bij de Amerikaanse rode poon (Hemitripterus americanus) dat 80-90% van de warmte-uitwisseling via de lichaamswand plaats vindt.
Geconcludeerd kan worden, dat een vis van 50 - 100 g bij een stapvormige verandering van de temperatuur van de omgeving binnen 15 minuten de nieuwe temperatuur heeft aangenomen.

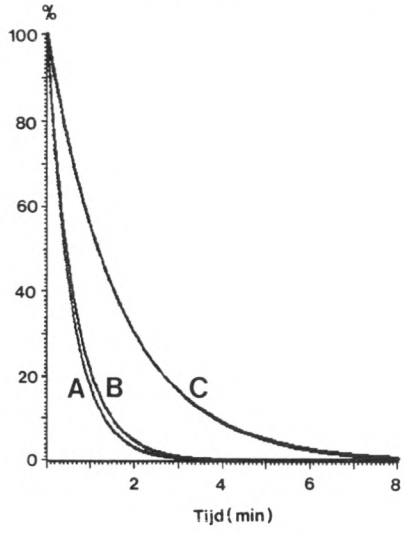


Fig. 1.2.1 Het verloop van het temperatuursverschil vis - water na een temperatuurstap. Tijd (X-as) in minuten. Beginwaarde van het temperatuursverschil (Y-as) is op 100% gesteld. De kurven A en B zijn gebaseerd op metingen in de 'maag' van levende graskarpers (lich. gew. 66 resp. 32 gram). De coëfficient k uit [1] is voor deze vissen 1.76 resp, 1.55 (°C/min./°C gradiënt) (Kuiper, Bretschneider en Kuiper ongepubliceerde gegevens). De kurve C voor een Tilapia van 50 gram is berekend uit de gegevens van Stevens en Fry (1974). Bij de graskarpers is na 1 minuut minder 50% van het oorspronkelijke temperatuurverschil over. Bij de Tilapia is dit na 2 minuten het geval.

§1.3 Temperatuurperceptie

Een elegant onderzoek naar de temperatuurgevoeligheid van vissen is voor het eerst door Bull (1936) uitgevoerd. De vissen bevonden zich in een reservoir aan het begin van een hellende trog waardoor continue water stroomde, dat door de experimentator korte tijd verwarmd kon worden. Hiermee was het mogelijk om de vis aan een temperatuurpuls bloot te stellen. Ter hoogte van de vis bevond zich een thermosensor. De vis werd geleerd om, als de watertemperatuur steeg, tegen de stroom in te zwemmen naar een hoger gelegen voerplek. Deze experimenten zijn uitgevoerd met zeevissen (o.a. kabeljouw, wijting, koolvis en schelvis). De kleinste temperatuurverandering, die door deze vissen werd waargenomen lag in de orde van 0.03° - 0.07°. Niet alle vissoorten waren even gevoelig.

Bardach en Bjorklund (1957) vonden tijdens experimenten met zoetwatervissen (o.a. een forel en een goudvis), waarbij ook gebruik gemaakt werd van een geconditioneerde reflex, een vergelijkbare detectiegrens: 0.05° Celsius.

Wij kunnen stellen, dat vissen met hun thermozintuigen een temperatuurverandering van 0.03° - 0.05° C. waar kunnen nemen. Het lijkt waarschijnlijk, dat perifeer gelegen thermozintuigen hierbij een belangrijke rol spelen, maar thermozintuigen in de mondholte en nabij de kieuwen en in de hersenen zouden eveneens van belang kunnen zijn (Crawshaw, 1977).

§1.4 Biochemie

Er is uiteraard een invloed van de temperatuur op metabolisme. Veel enzymatische reacties verlopen ca tweemaal sneller als de temperatuur met 10° C. toeneemt ($Q_{10} \approx 2.0$) (Lehninger 1978). De resultaten van in vitro onderzoek met hepatocyten van een meerval (Ictalurus punctatus) bevestigen dit (Koban 1986). Tijdens het aanpassen aan een nieuwe omgevingstemperatuur verschuift het 'temperatuuroptimum' van bepaalde enzymen en treden er veranderingen op in het isozymenpatroon (Prosser 1973, Smit et al. 1974).

De gevolgen van een verhoging of verlaging van de temperatuur voor de membranen zijn naar verhouding belangrijker. Deze membranen bestaan dankzij zwakke bindingskrachten. Een verlaging van de omgevingstemperatuur bevordert de 'clustering' van lipiden en tenslotte treedt er een locale kristallisatie op. Veel biochemische processen zijn membraangebonden. Veranderingen in de fysische eigenschappen van deze membranen hebben consequenties voor deze processen. Dit is bijvoorbeeld het geval voor de snelheid, waarmee de ATP productie verloopt.

Vissen reageren op veranderingen in de omgevingstemperatuur door de lipidesamenstelling van membranen te wijzigen (Cossins et al. 1977, Cossins en Prosser 1982, Hazel 1979) en adapteren zo hun membranen aan de nieuwe watertemperatuur. Het herstellen van de functionele eigenschappen vergt echter tijd en duurt dagen en soms weken. Dit betekent

dat vissen na een temperatuursverandering een bepaalde tijd, de acclimatisatieperiode, nodig hebben om weer stabiel op veranderingen in de omgeving te kunnen reageren.

§1.5 Neurofysiologie

Alle gewervelde dieren, ook vissen, trachten met behulp van het centraal zenuwstelsel de nadelige effecten van temperatuursfluctuaties te verminderen (Crawshaw 1980, Crawshaw et al. 1985, Prosser en Nelson 1981). In de huidige modelvoorstellingen gaat men ervan uit, dat de huid- en inwendige lichaamstemperatuur worden vergeleken met een neurale referentie'temperatuur'. Heeft het verschil tussen de omgevings- c.q. oppervlaktetemperatuur en de interne referentie een bepaalde waarde bereikt dan verplaatst het dier zich (vissen, amfibien en reptielen) of wijzigt de warmteproductie (vogels en zoogdieren). Het uiteindelijke effect is in beide gevallen temperatuurregulatie. Bij vissen gebeurt dit in de vorm van thermogedrag: een gecoordineerde activiteit, die leidt tot de selectie van een gunstiger en eventueel zelfs een optimale temperatuur. Een relevante vraag hierbij is: In welk deel van de hersenen van de vis vindt deze regulatie plaats. Greer en Gardner (1970) veranderden de temperatuur in de hersenen door de kieuwen van een Noord-Amerikaanse bronforel (Salvelinus fontinalis, Mitchell) met warm of koud water (8° - 20° Celsius) te doorstromen. Tegelijkertijd werd m.b.v. micro-electroden de veranderingen in de activiteit van neuronen in het diencephalon gemeten. Deze onderzoekers vonden twaalf neuronen, die op een verhoging en zes neuronen, die op een verlaging van de temperatuur reageerden met de productie van meer actiepotentialen per tijdseenheid.
Nelson en Prosser (1981) hebben dit onderzoek vervolgd met de groene zonnebaars (Lepomis cyanellus). Deze onderzoekers bevestigden de resultaten van Greer en Gardner (1970), maar vonden ook enkele warmtegevoelige cellen in het preoptisch gebied van het diencephalon met een rithmische activiteit. Mogelijk functioneren deze cellen als thermodetectoren.
In fig. 1.5.1 (ontleend aan Nelson en Prosser 1981) is de relatie tussen hersentemperatuur en de frequentie van de actiepotentialen weergegeven. In het traject 20° - 25° Celsius neemt deze frequentie met 1 actiepotentiaal per seconde toe als de temperatuur 0.5 graad afneemt. Als de temperatuur in de hersenen met 0.05° C. verandert, dit is de minimale drempel bepaald bij zintuigexperimenten (§1.3), zou zeker 10 seconden en mogelijk zelfs een veelvoud hiervan nodig zijn om deze verandering in de hersenen waar te nemen. De gevoeligheid van deze thermodetectoren lijkt minder groot dan van de zintuigen uit het temperatuurperceptie-onderzoek.
In een overzichtsartikel bespreken Nelson et al. (1984) de neurofysiologische aspecten van de thermoregulatie bij vissen.
De afleidingen van de preoptische thermogevoelige neuronen worden

samengevat in fig. 1.5.2. In fig. 1.5.2A worden de vier basis reacties op veranderingen in de hersentemperatuur weergegeven. Bij sommige neuronen is de 'firing rate' evenredig met de temperatuur maar in andere cellen heeft deze relatie een meer exponentieel karakter. De warmte-gevoelige neuronen in de hypothalamus reageren op een overeenkomstige wijze op veranderingen in de huidtemperatuur (fig. 1.5.2B). Een model, waarin deze neurofysiologische resultaten worden samengevat, is weergegeven in fig. 1.5.2C.

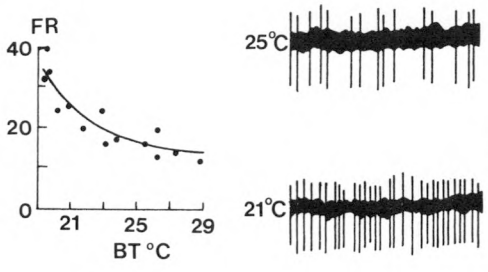


Fig. 1.5.1 De vuurfrequentie van een koude gevoelige neuron. A: de relatie temperatuur-vuurfrequentie (FR: aantal actiepotentialen per sec.). Er is een afname in het aantal pulsen per seconde met het toenemen van de plaatselijke temperatuur in de hersenen (BT). B: een oscilloscoop registratie bij twee verschillende temperaturen. Het interval tussen de actiepotentialen is niet constant maar aan fluctuaties onderhevig. Calibratie: 100 ms, 250 µV. (Nelson en Prosser 1981)

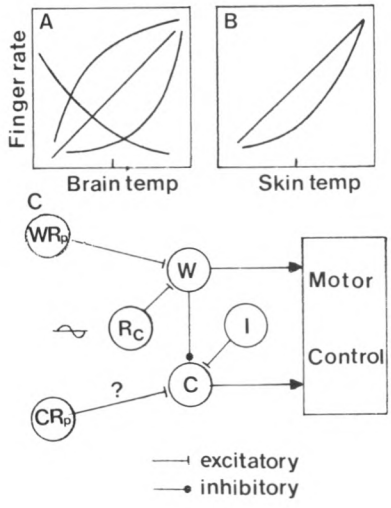


Fig. 1.5.2 Enkele diagrammen en een schema, ontleend aan Nelson, Heath en Prosser (1984), betreffende de reacties van neuronen uit het preoptische gebied van de hypothalamus zijn weergegeven die mogelijk betrokken zijn bij de thermoregulatie. De gegevens zijn gebaseerd op resultaten van experimenten met de groene zonnebaars (Lepomis cyanellus).
A: de vuurfrequentie van 4 neuronen tijdens het veranderen van de plaatselijke temperatuur in het preoptische gebied van de hypothalamus zelf. De reacties van 3 warmtegevoelige neuronen en 1 koudegevoelige neuron zijn weergegeven.
B: de waargenomen reacties van warmtegevoelige neuronen in het preoptische gebied op veranderingen in de huidtemperatuur.
C: een schematische samenvatting van de resultaten van intracellulair afleidingen van dé preoptische neuronen. De warmtegevoelige en endogeen actieve neuronen (R_C) sturen andere neuronen (W) door middel van exciterende synapsen; de W cellen krijgen 'input' van perifeer gelegen warmtezintuigen (WR_P) en van warmtezintuigen in de hersenen (R). Waarschijnlijk sturen deze W cellen hun 'output' naar de motorische centra. De 'koudegevoelige' interneuronen (C) vertonen zowel inhiberende als exciterende synaptische potentialen en zijn niet endogeen actief. Deze C cellen krijgen hun 'input' via exiciterende synapsen van neuronen, die ongevoelig zijn voor temperatuursveranderingen (I) en van inhiberende synapsen met W cellen. De exciterende synapsen met perifeer gelegen koudezintuigen (CR_P) zijn niet aangetoond, maar worden gepostuleerd. De C cells sturen waarschijnlijk hun 'output' naar de motorische centra.

In het preoptisch gebied sturen warmte-gevoelige receptorcellen (R_C), die een endogene activiteit vertonen, andere neuronen (W) met exciterende synapsen. Deze W-cellen zijn gevoelig voor een temperatuurstijging. In deze cellen heeft convergentie en integratie van informatie uit de perifere warmte-receptoren met centrale warmte-receptoren plaats. De C-cellen zijn gevoelig voor een temperatuurdaling en hebben geen endogene activiteit, maar produceren exciterende en inhiberende actiepotentialen. Waarschijnlijk ontlenen deze C-cellen hun activiteit

aan I-cellen, die ongevoelig zijn voor temperatuursveranderingen en aan inhiberende synaptische potentialen van de W-cellen. Hoewel de convergentie van de informatie uit de perifere koude receptoren in het schema is opgenomen, zijn hiervoor nog geen experimentele aanwijzingen gevonden.
Samenvattend: in het preoptische gebied van vissen zijn neuronen aanwezig, die op een specifieke wijze door temperatuursveranderingen beïnvloed worden. Een deel van deze neuronen hebben eigenschappen, die overeenkomen met de neuronen, die bij zoogdieren betrokken zijn bij de thermoregulatie.

§1.6 Het gedrag en de watertemperatuur

Waterdieren kunnen door gedrag het optimale microklimaat selecteren. Er is veel onderzoek verricht naar dit temperatuurselectiegedrag van vissen. De resultaten worden hieronder besproken. De technieken, die in de literatuur beschreven worden, zijn:

- gradiëntopstellingen
- shuttlebox experimenten.

1.6.1 Gradiëntopstellingen

Globaal kunnen de opstellingen in de volgende catagoriën ingedeeld worden (McCauley 1977):

- horizontale gradiënten (Barila en Stauffer 1980, Hesthagen 1979, Johansen en Cross 1980, Kuhmann en Jahnke 1981, Miller en Ogilvie 1975, Ogilvie en Fryer 1971, Williams en Brauer 1987, Wollmuth et al. 1987).
- verticale gradiënten (Pitt et al. 1956, McCauley en Pond 1971, McCauley en Read 1973, Nilsen en Roed 1978).

De vis of soms vissen kiezen een bepaalde positie in de opstelling. Tijdens de experimenten wordt telkens met een vast tijdsinterval bepaald waar de vis zich in de opstelling bevindt en wordt vervolgens de temperatuur op deze locatie gemeten. Bij dit type onderzoek zijn er dus twee parameters: temperatuur en positie. Een nadeel van deze experimenten is, dat niet goed onderzocht kan worden of de vis een bepaalde positie in de gradiënt kiest omdat de temperatuur daar 'aangenaam' is of vanwege andere omgevingsfactoren (b.v. licht of geluid). Deze opstellingen lenen zich niet voor het automatisch vergaren van gegevens.
Deze experimentele benadering verschaft informatie over de voorkeurtemperatuur van vissen en over veranderingen van deze temperatuur in de tijd.

1.6.2 Shuttleboxopstelling

De vis bevindt zich in een aquarium, dat met een schot in twee compartimenten is ingedeeld. In het schot is een opening, het poortje, waardoor de vis van het ene naar het andere compartiment kan zwemmen. Door middel van fotocellen, die aan weerszijden van deze opening zijn geplaatst, is het mogelijk om de passage van een vis door het poortje te detecteren. Elk compartiment bevat een koel- en een verwarmingselement. Tussen de compartimenten is continu een temperatuurverschil van 2 graden Celsius. De watertemperatuur wordt electronisch geregeld. Verblijft de vis in het ene compartiment dan stijgt de temperatuur in beide compartimenten. Indien de vis zich in het andere compartiment bevindt, daalt de watertemperatuur in beide compartimenten. Door telkens van het ene naar het andere compartiment te zwemmen kan de vis de watertemperatuur regelen (Neill et al. 1972 Beitinger en Magnuson 1975, Beitinger et al. 1975, Reynolds 1977A, Gregory en Anderson 1983). Bij experimenten met deze opstelling zijn er drie parameters mogelijk: temperatuur, positie en verblijftijd in een compartiment.

1.6.3 Resultaten van het temperatuurselectiegedragonderzoek

Vastgesteld is, dat vissen een voorkeurtemperatuur hebben. Deze temperatuur blijkt afhankelijk te zijn van de acclimatisatietemperatuur. Deze voorkeur temperatuur is vaak hoger dan de acclimatisatietemperatuur. In figuur 1.6.1 is in de vorm van freqentiehistogrammen dit fenomeen weergegeven. De gegevens voor deze figuur zijn afkomstig van Pitt et al. (1956).

Wanneer de vis langere tijd in een opstelling verblijft, verschuift de preferentietemperatuur, totdat de "final preference temperature" bereikt wordt (Fry 1947). Men vermoedt, dat het fenomeen preferentietemperatuur ontstaat, doordat vissen watertemperaturen kiezen waarbij allerlei fysiologische processen het meest efficient verlopen. Deze temperatuur is over het algemeen soortspecifiek, hangt samen het de geografische verspreiding van de vissoort en wordt niet beinvloed door de gebruikte experimentele methode (Coutant 1977). Cherry en Cairns (1982) geven een overzicht van de preferentietemperatuur van diverse vissoorten.

In dit verband is een passage uit de publicatie van Müller (1976) interessant. Deze auteur vermeldt, dat Neill in een in door een kerncentrale verwarmde kuststrook van Lake Montana (Wisconsin, U.S.A.) een met de voorkeurstemperatuur goed correlerende ruimtelijke, maar tijdsafhankelijke verdeling van de daar voorkomende vissoorten vond. Voedsel zou zelfs minder belangrijk zijn dan de watertemperatuur.

Het meest geavanceerde onderzoek met een shuttlebox is uitgevoerd door Neill et al. (1972) en Beitinger et al. (1975). In feite is de door mij gebruikte opstelling geinspireerd op die van deze onderzoekers. Het principe van hun methode wordt in 1.6.2 beschreven. Gedurende 3

dagen werd om de 10 minuten gekeken bij welke temperatuur de vis zich bevond. Figuur 1.6.2 is een histogram van het aantal malen, dat de vis bij een bepaalde op de x-as aangegeven temperatuur verbleef. De verdeling is redelijk normaal, N=705, de mediaan 28.26° Celsius, en is de preferentietemperatuur. De standaarddeviatie is 1.83 en tweemaal deze waarde, 3.7° komt goed overeen met wat in de gradiëntexperimenten als de "preferred zone" wordt aangegeven. De temperatuur waarbij de vis verblijft, schommelt dus wel.

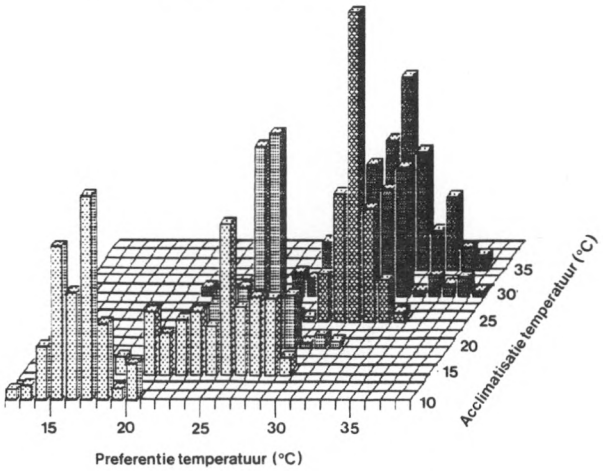


Fig. 1.6.1 De relatie tussen de preferentie- en de acclimatisatietemperatuur bij de karper (Cyprinus carpio, Linnaeus). De frequentiehistogrammen geven aan hoe vaak de vis tijdens de observatieperiode in een verticale gradiëntopstelling bij een bepaalde temperatuur werd aangetroffen. Bij het eerste (links voor) histogram was de acclimatisatietemperatuur van de vis 10° Celsius. Voor de volgende histogrammen was deze temperatuur: 15°, 20°, 25°, 30° en 35° Celsius. In de figuur is te zien, dat de preferentietemperatuur altijd hoger is dan de acclimatisatietemperatuur, totdat de acclimatisatietemperatuur in het gebied komt van het 'final preference temperature' (bij de karper 32° C.). Deze figuur is gebaseerd op gegevens uit Pitt et al. (1956).

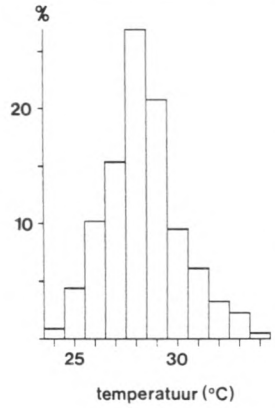


Fig. 1.6.2 Frequentiehistogram van het aantal malen dat de groene zonnebaars (Lepomis cyanellus) bij een bepaalde temperatuur (interval 1° C.) werd aangetroffen. Dit experiment is uitgevoerd met een shuttlebox. De waarnemingsperiode was 3 dagen. Elke 10 minuten werd de temperatuur bepaald van het compartiment, waarin de vis zich bevond. De mediaan van deze verdeling: 28.26° C.; de standaarddeviatie: 1.83; het aantal waarnemingen is 705 (Beitinger et al. 1975).

Wanneer we deze resultaten en ook de resultaten van andere experimenten, zoals die samengevat zijn in fig. 1.6.3, interpreteren als het gevolg van thermoregulatiegedrag dan is de regeling van de temperatuur niet zo erg precies. In de discussie merken Beitinger et al. (1975) op, dat het activiteitspatroon, waarmee bedoeld wordt het zwemmen van het ene naar het andere compartiment, "***appears to be spontaneous rather than a temperature induced response***". Met andere woorden volgens deze onderzoekers is het de vraag of deze resultaten geinterpreteerd kunnen worden als het gevolg van een thermoregulatiegedrag.

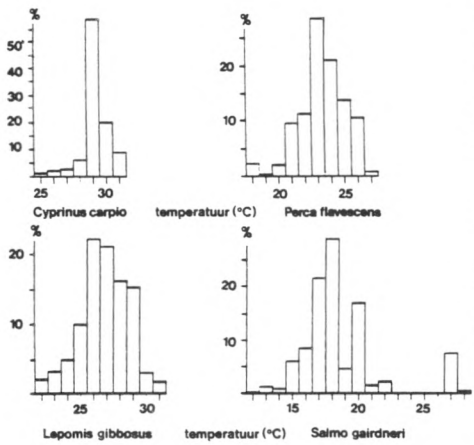


Fig. 1.6.3 Frequentiehistogrammen van de preferentietemperatuur van enkele vissoorten: A, karper, Cyprinus carpio, Linnaeus (Reynolds en Casterlin, 1977); B, zonnebaars, Lepomis gibbosus, Linnaeus (Reynolds en Casterlin, 1977); C, Noord-Amerikaanse baarssoort, Perca flavescens (McCauley en Read, 1973); D, regenboogforel, Salmo gairdneri, Richardson (McCauley en Pond, 1971). Reynolds en Casterlin (1977) hebben bij hun onderzoek een shuttlebox gebruikt, terwijl de andere onderzoekers hiervoor een gradiëntopstelling gebruikt hebben.

Een belangrijke vraag bij het onderzoek naar het thermoregulatiegedrag van vissen is: hoe komt dit gedrag tot stand?
Het is bekend dat vissen, reptielen, vogels of zoogdieren extreem hoge

of een extreem lage omgevingstemperatuur, proberen te vermijden. Deze vermijdingsreacties treden op voordat de temperatuur in het centraal zenuwstelsel t.g.v. de nieuwe omgevingstemperatuur is veranderd. Volgens Crawshaw et al. (1985) zijn hierbij de perifeer gelegen thermosensoren van groot belang en is voor dit vermijdingsgedrag de betekenis van centrale thermodetectoren minder groot. Dit betekent echter niet dat de temperatuur in het centraal zenuwstelsel geen rol zou kunnen spelen bij het tot stand komen van het gedrag. Bij experimenten, waarbij het voorste deel van de hersenen gekoeld (c.q. verwamd) werd, zwemmen vissen naar een warme (c.q. koude) locatie (Hammel et al. 1969, Crawshaw and Hammel 1974).
Voor het inzicht in een mogelijk neuraal regelmechanisme zijn de experimenten van Nelson en Prosser (1979) van belang. Deze onderzoekers hebben in het preoptisch gebied van het diencephalon van vissen kleine leasies aangebracht. De vissen bleken na deze ingreep niet in staat te zijn om in een horizontale gradiëntopstelling temperatuurselectiegedrag uit te voeren. Hieruit kan geconcludeerd worden, dat dit deel van de hersenen, waarin mogelijk het neuraal regelsysteem gelocaliseerd is (zie §1.5), van groot belang is voor het thermoregulatiegedrag.

Er zijn verschillende hypotheses geponeerd met betrekking tot de aard van het thermogedrag. Twee hypothesen zijn hierbij relevant:

1. Het thermogedrag moet geinterpreteerd worden als klinokinesis. Hierbij zou de vis ten gevolge van het verslechteren van temperatuursomstandigheden telkens en volkomen ongericht een andere kant uit zwemmen "in order to escape a stress temperature change" (Roberts 1979). Met verslechterende omstandigheden wordt hier bedoeld, dat de temperatuur afwijkt van de preferentietemperatuur. Volgens dit concept zou het thermogedrag gebaseerd zijn op een ***vlucht***– of 'escape'reactie.
2. Volgens de tweede opvatting is bij ectotherme en endotherme dieren in principe hetzelfde neurale systeem aanwezig om de lichaamstemperatuur te reguleren (Crawshaw et al. 1985, Hammel 1972, Reynolds en Casterlin 1982). In dit concept ***regelt*** de vis de lichaamstemperatuur door een bepaalde omgevingstemperatuur te kiezen met behulp van een neuraal thermoregulatiemechanisme, dat overeenkomsten heeft met het mechanisme van de mammalia.

§1.7 Conclusies

Hoewel de voorafgaande literatuurbespreking niet volledig is en waarschijnlijk ook enigszins selectief ten behoeve van mijn onderzoek, meen ik wel met dit overzicht representatief beeld van de stand van

zaken te geven. Samengevat:

1. Uit het onderzoek met geconditioneerde vissen is duidelijk, dat deze dieren temperatuursverschillen van 0.05° kunnen waarnemen.
2. Wanneer een vis van 100 g. onderworpen wordt aan een temperatuurstap binnen de fysiologische 'range' heeft het dier na 15 minuten dezelfde temperatuur als de omgeving.
3. Na een acclimatisatieperiode, die afhankelijk van de grootte van de temperatuurstap soms weken duurt, heeft de vis zich in biochemisch/celbiologisch opzicht aangepast aan de nieuwe temperatuur.
4. Het thermoregulatiegedrag zou gebaseerd kunnen zijn op een 'escape'reactie, waarbij de vis als het ware vlucht voor extreme temperatuursveranderingen (zie Roberts 1979).
   Anderszijds is het ook mogelijk, dat bij vissen een overeenkomstig neuraal mechanisme voor de thermoregulatie aanwezig is als bij de hogere vertebraten is gevonden. Dit mechanisme wordt gebruikt voor de sturing van het gedrag en ligt ten grondslag aan een "behavioural thermoregulation" van de vis (zie Nelson et al. 1984 en Crawshaw 1980).
5. De experimenten over een dergelijk gedrag bij vissen geven tot nu toe niet de indruk, dat de temperatuurregeling erg nauwkeurig is in vergelijking met die b.v. van zoogdieren.

Het gedrag van een dier is het eindresultaat van processen in het centraal zenuwstelselen en daarbij is de integratie van sensorische en motorische aspecten essentieel. De functionele mogelijkheden van het centrale zenuwstelsel kunnen door middel van gedragsexperimenten onderzocht worden, maar de resultaten zullen dan gerelateerd moeten worden aan fysiologische mechanismen. Wanneer dit laatste als uitgangspunt genomen wordt, kan geprobeerd worden een verband te leggen tussen de resultaten van het gedragsonderzoek (§1.6) en van het zintuigonderzoek (§1.3). De gemiddelde preferentietemperatuur heeft een standaarddeviatie in de orde van 1.5° C., terwijl de vis met behulp van zijn thermozintuigen temperatuursveranderingen van 0.05° C. en minder kan waarnemen (zie §1.3). Ook wanneer andere zintuigen dan deze echte thermozintuigen betrokken zijn bij het gedrag, is het nog onwaarschijnlijk, dat de gevoeligheid van zintuigen de beperkende factor zou zijn. Ter illustratie het volgende voorbeeld. Uit onderzoek naar de temperatuurgevoeligheid van de electroreceptoren van een Amerikaanse dwergmeervalsoort (Ictalurus nebulosus, Le Sueur) blijkt, dat een toename (c.q. afname) van de huidtemperatuur met 0.4° C. de zenuwpuls'rate' met 1 puls per seconde verhoogd (c.q. verlaagd) (Brown en Govardovskii 1981). Mogelijk reageren andere zintuigen op een overeenkomstige wijze. Het is onwaarschijnlijk, dat de 'temperatuurzintuigen' in de huid, maar ook temperatuur gevoelige zintuigen elders in het lichaam, gezien hun gevoeligheid, verantwoor-

delijk zijn voor de grote spreiding in de resultaten van het temperatuurselectiegedrag

We realiseren ons dat bij het tot stand komen van het thermoregulatiegedrag allerlei processen in het centraal zenuwstelsel betrokken zijn zoals bijvoorbeeld correlatieprocessen. Bij vissen is de feitelijke wetenschappelijke kennis en het inzicht in deze processen nog beperkt. In de bij zoogdieren gangbare thermoregulatiemodellen vormt de 'setpoint'functie een essentieel onderdeel. De setpointfunctie komt tot stand via een neurale activiteit in de hersenen. Een dergelijk setpointfunctie is een vast vergelijkingspunt. Het kan functioneel opgevat worden als de insteltemperatuur van de lichaamsthermostaat.
De vraag komt op of het mogelijk is om uitgaande van een setpointfunctie het brede temperatuurstraject tijdens het temperatuurselectiegedrag (figuren 1.6.2 en 1.6.3) te verklaren. Dergelijke grote temperatuursfluctuaties zullen het metabolisme van de vis beinvloeden (zie §1.4). Dit zou betekenen dat de biochemische processen in de zenuwcellen, die betrokken zijn bij het setpoint, niet meer constant zijn. Onder deze omstandigheden zullen de uitkomsten van de neurale verwerking voorafgaande aan het uitvoeren van het gedrag eveneens variabel zijn. Dit leidt tot wisselende reacties op temperatuurveranderingen. Deze redenering houdt in dat als vissen een setpointfunctie hebben dit alleen tot uitdrukking komt wanneer de lange termijn fluctuaties van de temperatuur beperkt zijn. Immers als deze fluctuaties groot zijn, is te verwachten, dat het celmetabolisme van de neuronen, die betrokken zijn bij deze setpointfunctie, beinvloed wordt. Het gevolg zal een verloop in de setpointfunctie zijn. Om dit te vermijden is besloten om bij de hieronder beschreven experimentele opstelling, zo ingesteld dat de temperatuur niet boven een van tevoren ingestelde waarde kan komen.
De resultaten van de experimenten van Pitt et al. (1956), zoals weergegeven in figuur 1.6.1, kunnen geinterpreteerd worden vanuit de setpointfunctie en vanuit een aan de psychonomie ontleend concept van kriteriumverschuiving (Eijkman 1976). Met behulp van figuur 1.7.1 wil ik het principe van een kriteriumverschuiving duidelijk maken. In deze figuur is op de horizontale as de stimulussterkte weergegeven en in verticale richting de kans dat een bepaalde stimulus wordt waargenomen. Aangenomen wordt, dat kurve 1 een cumulatieve normaalverdeling is en is gebaseerd op de resultaten bij één proefpersoon onder constante experimentele omstandigheden. Het kriterium (X_1) is in dit geval de drempelwaarde waarop in 50% van de gevallen wordt gereageerd. Onder ander omstandigheden kan de proefpersoon meer dan wel minder gevoelig zijn voor de stimulus. Dit komt tot uiting in de kurves 2 resp. 3. Ook deze kurves zijn gebaseerd op metingen maar geven een kleiner (X_2) resp. groter kriterium (X_3). Met andere woorden het kriterium is door bijvoorbeeld een wijziging van de experimentele omstandigheden naar links resp. naar rechts verschoven. Bij het onderzoek naar het

thermogedrag zou ook sprake kunnen zijn van verschuivingen in een kriterium. Als bijvoorbeeld de vis alert is voor temperatuurdaling dan zal een klein verschil tussen de omgevingstemperatuur en het setpoint-functie voldoende zijn om over te zwemmen. Wanneer de vis minder belangstelling heeft voor de omgevingstemperatuur zal een grotere temperatuurdaling nodig zijn. Voor een onderzoek naar deze aspecten is een groot bestand van experimentele gegevens nodig, die betrekking hebben op de reacties van de vis op een daling van de temperatuur.

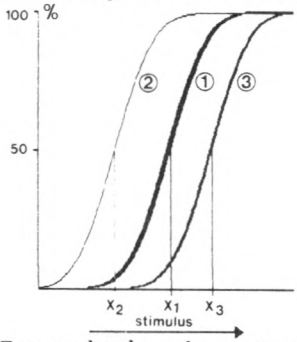


Fig. 1.7.1 Kriterium verschuiving. Op de horizontale as is de stimulussterkte uitgezet. In de figuur zijn de resultaten van drie experimenten met dezelfde proefpersoon cumulatief uitgezet. De drempelwaarde X_1 is de stimulussterkte waarbij de proefpersoon in 50% van de gevallen de stimulus waarneemt. De proefpersoon heeft bij het tweede en derde experiment, die onder andere omstandigheden zijn uitgevoerd, een kleinere (X_2) resp. grotere drempel (X_3).

Een geheel andere opvatting over het thermoregulatiegedrag van vissen komt tot uiting in het overzichtsartikel van Roberts (1979): Voortbouwend op de hypothese van klinokinesis stelt deze auteur dat het thermoregulatiegedrag waarschijnlijk het gevolg is van 'integration of other, non-thermal modalities for with some exceptions (e.q. thermal plumes, thermoclines) directional thermal orientation is limited due to the thermal properties of water.' Het gedrag van vissen in een preferentietemperatuuropstelling zou gebaseerd zijn op een 'operant conditioning of the test fish to non-thermal cues (visual, lateral-line current detection etc.).' Met andere woorden deze auteur betwijfelt of vissen een echt thermoregulatiesysteem bezitten. Voor het temperatuurselectiegedrag zouden voornamelijk andere dan thermische stimuli verantwoordelijk zijn. Hiermee is tegelijkertijd een verklaring gegeven voor het brede temperatuurstraject tijdens het temperatuurselectiegedrag. Deze gedachtegang is nog steeds actueel. Cossins en Bowler (1987) referen in hun recent verschenen boek aan deze publicatie van Roberts (1979). Dit concept staat diametraal tegenover de gedachte dat vissen over een setpointfunctie beschikken.

In dit kader zijn de experimentele resultaten van Müller (1977) van belang. Als de kop en het starteinde van dezelfde vis bij verschillende temperaturen is geacclimatiseerd bleek, dat de acclimatisatietemperatuur van de kop bepalend is voor de temperatuur die deze vis in een verticale gradiënt kiest. Dit betekent, dat de acclimatisatietemperatuur van de hersenen van groot belang is voor het temperatuurselectiedrag van vissen. Uit de experimentele resultaten van Nelson en

Prosser (1979), waarbij kleine leasies in het preoptische gebied van het diencephalon waren aangebracht, blijkt dat dez vissen niet meer in staat te zijn om in een horizontale gradiënt temperatuurselectiegedrag uit te voeren. Hieruit kan afgeleid worden, dat dit gebied (met als bij zoogdieren) van groot belang is voor het tot stand komen van dit gedrag. Uit het electrofysiologisch onderzoek, zoals beschreven in §1.5, komen eveneens aanwijzingen voor het bestaan van een neuraal netwerk voor thermoregulatie bij vissen. Hiermee is het minder waarschijnlijk geworden dat het thermogedrag gebaseerd is op klinokinesis.
Niet tegenstaande de geringe waarschijnlijkheid van dit tweede concept moet bij de opzet en analyse van de experimenten met deze twee verschillende visies rekening gehouden worden.

Uit de opmerkingen van Roberts (1979), die hiervoor besproken zijn, blijkt dat het onduidelijk is of er een oorzakelijk verband is tussen de temperatuur en het gedrag van de vis in een preferentietemperatuuropstelling. In dit kader zijn de resulaten van experimenten, waarbij men het temperatuurselectiegedrag heeft willen beïnvloeden met stoffen, die bij zoogdieren een effect hebben op het thermoregulatiesysteem discutabel. Reynolds (1977B) heeft vastgesteld, dat het toedienen van pyrogenen aan vissen een verhoging van de voorkeurtemperatuur tot gevolg heeft en noemt dit verschijnsel koorts. Marx et al. (1984) is het niet gelukt om dit effect te reproduceren. Bij beide experimenten is a priori aangenomen, dat er een relatie is tussen het gedrag van de vis en de temperatuursveranderingen in de opstelling.
Uit experimenten van Wollmuth et al. (1987), waarbij aan goudvissen intracraniaal noradrenaline is toegediend, blijkt het effect op het temperatuurselectiegedrag afhankelijk te zijn van de injectieplaats. Injecties in het gebied anterior van de nucleus preopticus periventricularis (hypothalamus) veroorzaken een daling in van de preferentietemperatuur. Dit effect is dosis afhankelijk. Bij injecties op andere plaatsen in de hypothalamus is de beinvloeding van de preferentietemperatuur minder duidelijk of zelfs geheel afwezig. Er is een opmerkelijke overeenkomst met de resultaten van experimenten met zoogdieren. Na het injiceren van noradrenaline in de derde hersenventrikel treedt een verlaging van de lichaamstemperatuur op (Roij et al. 1977). De bevindingen van Wollmuth et al. (1987) dienen echter met de nodige voorzichtigheid geinterpreteerd worden. Deze onderzoekers hebben niet aangetoond, dat het gedrag van vissen tijdens de experimenten verband houdt het de temperatuur.

Er zijn tot nu toe geen publicaties verschenen, waarin onderzocht is of vissen een thermoregulatiegedrag kunnen uitvoeren. Bij de gepubliceerde experimenten wordt uitsluitend en met vaste tijdsintervallen naar de positie van de vis bepaald en de temperatuur op die plaats en dat tijdstip gemeten.

Een belangrijk uitgangspunt bij de in dit proefschrift beschreven experimenten is het onderzoek naar de relatie tussen het gedrag en de temperatuursverandering van het water.

§1.8 Vraagstelling

Zoals in §1.1 is uiteengezet is de centrale vraag bij het thermoregulatie-onderzoek of vissen bij het tot stand komen van het thermogedrag gebruik maken van een thermoregulatiesysteem overeenkomstig met dat van zoogdieren. Bij dit onderzoek is gebruik gemaakt van een shuttlebox bestaande uit een aquarium dat door een schot in twee compartimenten verdeeld is. De compartimenten staan door een opening in het schot met elkaar in verbinding.

Uit de voorafgaande paragrafen is af te leiden op welke wijze de experimenten uitgevoerd moeten worden. Om te voorkomen dat de resultaten (mede)bepaald worden door fluctuaties in de biochemische processen van de vis is het belangrijk om het temperatuurgebied in de opstelling te beperken. Bovendien is de preferentietemperatuur doorgaans hoger dan de acclimatisatietemperatuur. Bij een temperatuurtraject onder de preferentietemperatuur mogen we verwachten dat de vis een grote drang heeft om op temperatuursveranderingen te reageren.
Als vis geacclimatiseerd is aan een bepaalde temperatuur en de maximale temperatuur in de experimentele opstelling heeft dezelfde waarde, is op basis van het temperatuurselectiegedrag te verwachten, dat de vis de voorkeur geeft aan deze temperatuur boven een lagere. Met andere woorden wanneer het compartiment, waarin de vis zich bevindt gekoeld wordt en het andere verwarmd tot de vaste bovengrenstemperatuur (Tu) zal de vis overzwemmen naar het warme compartiment. Op deze wijze moet het mogelijk zijn om een drempelwaarde (Td) te bepalen. De Td is het verschil tussen de bovengrenstemperatuur en de temperatuur waarbij de vis vertrekt. Deze procedure kan telkens voor elk compartiment herhaald worden. In hoofdstuk 2 wordt deze procedure nader uiteengezet.

Als het concept van klinokinesis, zoals uiteengezet in §1.6, juist is, zal de vis frequent overzwemmen van het ene naar het andere compartiment. Indien het temperatuursverschil tussen de compartimenten beperkt is, d.w.z. in de orde van enkele graden, zal aan het overzwemmen even vaak wel als geen temperatuurdaling zijn voorafgegaan. In hoofdstuk 3 zult u zien, dat niet het geval is en dat het concept klinokinesis als verklaring voor dit thermogedrag van vissen niet juist is.

Indien de vis tijdens deze experimenten op temperatuurdaling reageert, dienen de resultaten aan enkele voorwaarden te voldoen voordat dit gedrag als een thermoregulatiegedrag mag worden geinterpreteerd. De condities, die hieronder worden geformuleerd, zijn voortgekomen uit de

analyse van literatuurgegevens, zoals weergegeven in de voorafgaande paragrafen. Van groot belang waren de opmerkingen van Roberts (1979) zoals besproken in §1.6 en §1.7.

1. Het gedrag van de vis moet gecorreleerd zijn aan de daling van de temperatuur in de opstelling. Dit betekent, dat er een verband moet zijn tussen het overzwemmen van de vis naar het andere compartiment en de daling van de temperatuur.
2. De spreiding van de gemiddelde drempelwaarde moet gelet op de minimale detectiegrens van 0.05° C. (§1.3) kleiner zijn dan de fluctuaties van de gemiddelde preferentietemperatuur.
3. Bij het tot stand komen van het gedrag mogen andere dan thermische stimuli geen grote rol spelen. Dit betekent, dat geluidseffecten, die bij het starten van het koelen van een compartiment zouden kunnen optreden, moeten zoveel mogelijk vermeden worden.
4. Het thermoregulatiegedrag mag niet geinterpreteerd kunnen worden als een 'escape'reactie, waarbij het dier als het ware vlucht voor een lage temperatuur.
5. Wanneer vissen een thermoregulatiegedrag uitvoeren moet de mogelijke aanwezigheid van een setpointfunctie onderzocht worden. Na een stapvormige verhoging van de temperatuur met enkele graden zullen de biochemische processen in de referentiecellen fluctueren met als gevolg een instabiele referentie'temperatuur'. Deze experimenten worden in hoofdstuk 4 besproken.
6. Na het toedienen van stoffen, die inwerken op de energiehuishouding zal deze interne referentie niet meer stabiel zijn. Verwacht mag worden dat instabiliteit tot uitdrukking zal komen in het gedrag door een grote spreiding in de temperatuurdrempel. Deze farmacologische benadering wordt behandeld in hoofdstuk 5.
7. Het zal echter duidelijk zijn, dat bij het tot stand komen van het gedrag van de vis in een shuttlebox behalve thermische stimuli ook andere stimuli het gedrag kunnen moduleren. Het is voorstelbaar dat de decisie om na het dalen van de temperatuur over te zwemmen mede bepaald kan worden door andere factoren, bijvoorbeeld of het dag of nacht is. In hoofdstuk 3 komt dit ter sprake. De decisies voor het overzwemmen kunnen wel gebaseerd zijn op de temperatuursveranderingen, maar de drang (of motivatie) om te reageren is aan fluctuaties onderhevig. Dit aspect wordt in hoofdstuk 6 onderzocht.

De punten 1 tot en met 4 komen aan de orde in hoofdstuk 3.

Ook al kan het thermoregulatiegedrag van vissen als een eenvoudig gedrag worden opgevat zeker in vergelijking met het balsgedrag van vissen, toch is dit gedrag gebaseerd op een complex proces. Naast specifieke gedragsaspecten, die aan de orde komen in hoofdstuk 6 spelen fysiologische mechanismen een belangrijke rol, hierbij zijn

zowel de zintuig- als de neurofysiologie van belang. Ik heb hiervoor gebruik gemaakt van het werk van D.O. Nelson en C.L. Prosser. Helaas was het niet mogelijk om op dit gebied eigen onderzoek uit te voeren. Het zintuigaspect heeft aanvankelijk een grotere rol gespeeld dan nu tot uitdrukking komt. Voor de analyse van het gedrag zijn psychofysische methoden gebruikt, zoals die ook beschreven staan in het 'Handboek der Psyschonomie' (Michon et al. 1976).
De farmacologische benadering van specifieke vraagstukken, zoals in hoofdstuk 5 en 6, heeft niet alleen te maken met het feit dat dit onderzoek is uitgevoerd op een veterinair farmacologisch laboratorium. Dit onderzoek met vissen leent zich mijns inziens zeer goed voor een deze invalshoek.

Literatuurreferenties

Bardach, J.E., Bjorklund, R.G. The temperature sensitivity of some American freshwater fishes. Am. Naturalist, 91, 233-, 1957.
Barila, T.Y., Stauffer, J.R. Temperature behavioral responses of the American eel, Anguilla rostrata (Lesueur), from Maryland. Hydrobiologica, 74, 49-51, 1980.
Beitinger, T.L., Magnuson, J.J. Influence of social rank and size on the thermoselection behavior of bluegill (Lepomis macrochirus). J. Fish. Res. Board Can., 32, 2133-2136, 1975.
Beitinger, T.L., Magnuson, J.J., Neill, W.H., Shaffer, W.R. Behavioral thermoregulation and activty patterns in the green sunfish, Lepomis cyanellus. Anim. Beh., 23, 222-, 1975.
Brett, J.R. Temperture tolerance in the young Pacific salmon, genus Oncorhynchus. J. Fish. Res. Bd Can., 9, 265-323, 1952.
Brown, G.R., Govardovskii, V.I. Thermal sensitivity of brown bullhead Ictalurus-Nebulosus electro-receptors. Fiziol. Zh SSSR Im I.M. Sechenova, 67, 1100-, 1981. (samenvatting Biosis no 74043257)
Bull, H.O. Studies on the conditioned responses in fishes. Part VII. Temperature perception in teleosts. J. Marine Biol. Assoc. United Kingdom., 21, 1-, 1936.
Carey, F.G., Teal, J.M., Kanwischer, J.W., Lawson, K.D. Beckett, J.S. Warmed-bodied fish. Am. Zool., 11, 135-, 1971.
Cherry, D.S., Cairns, J. Biological monitoring. Part V - Preference and avoidance studies. Water Res., 16, 263-, 1982.
Cossins, A.R., Bowler, K. Temperature biology of animals. Chapman and Hall, London 1987.
Cossins, A.P., Prosser, C.L. Variable homeoviscous responses of different brain membranes of thermally acclimated goldfish. Biochim. Biophys. Acta, 687, 303-, 1982.
Cossins, A.R., Friedlander, M.J., Prosser, C.L. Correlations between behavioral temperature adaptations of goldfish and the viscosity and fatty acid composition of their synaptic membranes. J. Comp. Physiol., 120, 109-, 1977.
Coutant, C.C. Compilation of temperature preference data. J. Fish.

Res. Bd Can., 34, 739-, 1977.
Crawshaw, L.I. Physiological and behavioral reactions of fishes to temperature change. J. Fish. Res. Board Can., 34, 730-, 1977.
Crawshaw, L.I. Temperature regulation in vertebrates. Ann. Rev., 42, 473-, 1980.
Crawshaw, L.I., Hammel, H.T. Behavioral regulation of internal temperature in the brown bullhead, Ictalurus nebulosus. Comp. Biochem. Physiol., 42A, 51-, 1974.
Crawshaw, L.I., Grahn, D.A., Wollmuth L., Simpson, L. Central nervous regulation of body temperature in vertebrates: comparative aspects. Pharmac. Ther., 30, 19-, 1985.
Dizon, A.E., Brill, R.W. Thermoregulation in tunas. Amer. Zool., 19, 249-, 1979.
Eijkman, E.G.J. Psychofysica. In: Handboek der Psychonomie. J.A. Michon, E.G.J. Eijkman,L.F.W. de Klerk, (eds). Van Loghum Slaterus. Deventer, 1976. p. 159-.
Frens, J. Is the temperature effect of capsaicin really a thermoregulatory effect? In: Environment, drugs and thermoregulation. 5th Int. Symp. Pharmacol. Thermoregulation. Saint Paul de Vence, 1982, Karger, Basel, 1983, p.180-.
Fry, F.E.J. Effects of the environment activity. Univ. Toronto Stud. Biol. Ser. 55, Publ. Ontario Fish. Res. Lab., 68, 1-62, 1947.
Greer, G.L., Gardner, D.R. Temperature-sensitive neurons in the brain of brook trout. Science, 169, 1220-, 1970
Gregory, M.A., Anderson, P.D. A modified electronic shuttlebox for joint thermoregulatory and toxicological studies. Can. J. Zool., 2, 1950-, 1983.
Hammel, H.T. The set-point in temperature regulation: analogy or reality. In: Essays on temperature regulation. J. Bligh and R, Moore (eds). North-Holland Publishing Company. Amsterdam 1972, p. 121-.
Hammel, H.T., Stromme, S.B., Myhre, K. Forebrain temperature activates behavioral thermoregulatory responses in artic sculpins. Science, 165, 83-, 1969.
Hazel, J.R. Influence of thermal acclimation on the membrane composition of rainbow trout liver. Am. J. Physiol., 5, R91-, 1979.
Hensel, H. Neural processes in thermoregulation. Physiol. Rev., 53, 948-, 1973.
Hensel, H., Brück, K., Raths, P. Homeothermic organisms. In: Temperature and life. Precht, H., Christopherson, J., Hensel, H., Larcher, W. (eds). Springer-Verlag, New York 1973, p. 505-.
Hesthagen, I.H. Temperature selection and avoidance in the sand goby, Pomatoschistus minutus (Pallas), collected at different seasons. Env. Biol. Fish., 4, 369-, 1979.
Jankowsky, H.-D. Body temperature and external temperature. In: Temperature and life. Precht, H., Christopherson, J., Hensel, H., Larcher, W. (eds). Springer-Verlag, New York 1973, p. 293-.
Johansen, P.H., Cross, J.A. Effects of sexual maturation and steroid

hormone treatment on the temperature preference of guppy, Poecilia reticulata (Peters). Can. J. Zool., 58, 586-, 1980.
Koban, M. Can cultured teleost hepatocytes show temperature acclimation? Am. J. Physiol., 250, (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 19), R211-R220, 1986.
Kubb, R.N. Spotila, J.R., Pendergast, D.R. Mechanisms of heat transfer and time-dependent modeling of body temperatures in the largemouth bass (Micropterus salmoides). Physiol. Zool. 53, 222-,1980.
Kuhmann, W., Jahnke, E. Eine Versuchseinrichtung zur Bestimmung der Vorzugtemperatur bei Jungfischen. Fischerei-Forsch., 19, 41-, 1981.
Lehninger, A.L. Biochemistry. 2nd ed., Worth, New York, 1978.
Marx, J., Hilbig, R., Rahmann, H. Endotoxin and prostaglandin E_1 fail to induce fever in a teleost fish. Comp. Biochem. Physiol., 77A, 483-, 1984.
McCauley, R.W. Laboratory methods for determining temperature preference. J. Fish. Res. Bd. Can., 34, 749-, 1977.
McCauley, R.W., Pond, W.L. Temperature selection of rainbow trout fingerlings in vertical and horizontal gradients. J. Fish. Res. Bd Can., 28, 1801-, 1971.
McCauley, R.W., Read, L.A.A. Temperature selection by juvenile and adult yellow perch (Perca flavescens) acclimated to 24° Celsius. J. Fish. Res.Bd Can., 30, 1253-, 1973.
Michon, J.A., Eijkman, E.G.J., Klerk, L.F.W., de Handboek der Psychonomie. Van Loghum Slaterus. Deventer, 1976.
Miller, D.L., Ogilvie, D.M. Temperature selection in brook trout (Salvelinus fontalis) following exposure to DDT, PCB, or Phenol. Bull. Environ. Cont. & Tox., 14, 545-, 1975.
Müller, R. Investigations on the body temperature of freshwater fishes. Arch. Fischwiss., 27, 1-, 1976.
Müller, R. Temperature selection of goldfish, Carassius auratus, and brook trout, Salvelinus fontinalis after heterogeneous temperature acclimation. J. Term. Biol. 2, 5-, 1977.
Neill, W.H., Magnuson, J.J., Chipman, G.P. Behavioral thermoregulation by fishes: a new experimental approach. Science, 176, 1443-, 1972.
Nelson, D.O., Heath, J.E., Prosser, C.L. Evolution of temperature regulatory mechanisms. Amer. Zool., 24, 791-, 1984.
Nelson, D.O., Prosser, C.L. Effects of preoptic lesions on the behavioral thermoregulation of green sunfish, Lepomis cyanellus, and of goldfish, Carassius auratus. J. Comp. Physiol., 129, 193-, 1979.
Nelson, D.O., Prosser, C.L. Intracellular recordings from thermosensitive preoptic neurons. Science, 213, 787-, 1981.
Nilsen, G.L., Roed, K.H. A new aquarium for the study of temperature behaviour of fish. Sarsia, 63, 199-, 1978.
Ogilvie, D.M., Fryer, J.N. Effect of sodium pentobarbital on the temperature selection response of guppies (Poecilia reticulata). Can. J. Zool., 49, 949-, 1971.

Pitt, T.K., Garside, E.T., Hepburn, R.L. Temperature selection of the carp (Cyprinus Carpio Linn.). Can. J. Zool., 34, 555-, 1956.
Prosser, L.C. Comparative animal physiology. Third ed. Philadelphia, 1973.
Prosser, C.L. ,Nelson, D.O. The role of nervous systems in temperature adaptation of poikilotherms. Ann. Rev. Physiol., 43, 281-, 1981.
Reynolds, W.W. Fish orientation behavior: an electronic device for studying simultaneous responses to two variabels. J. Fish. Res. Bd Can., 34, 300-, 1977A.
Reynolds, W.W. Fever and antipyresis in the bluegill sunfish, Lepomis macrochirus. Comp. Biochem. Physiol., 57C, 165-167, 1977B.
Reynolds, W.W., Casterlin, M.E. Temperature preferences of four fish species in an electronic thermoregulatory shuttlebox. Progressive Fish-Cult., 39, 123-, 1977.
Reynolds, W.W., Casterlin, M.E. The pyrogenic responses of non-mammalian vertebrates. In: Pyretics and antipyretics. A.S. Milton (ed.). Springer-Verlag. Berlin 1982, p. 649-.
Roberts, J.L. Seasonal modulation of thermal acclimation and behavioral thermoregulation in aquatic animals. In: Marine Pollution: Functional responses. W.B. Vernberg, A. Calabrese, F.P. Thurnberg and F.J. Vernberg (eds). Academic Press, New York 1979, p. 365-.
Roij, Th.A.J.M. de, Frens, J., Bakker, J., Németh, F. Thermoregulatory responses to intracerebroventricularly injected dopamine in the goat. Eur. J. Pharmacol., 43, 1-, 1977.
Smit, H., Van den Berg, R.J., Kijne-Den Hartog, I. Some experiments on the thermal acclimation in the goldfish (Carassius auratus L.). Neth. J. Zool., 24, 32-, 1974.
Sorenson, P.R., Fromm, P.O. Heat transfer characteristics of isolated-perfused gills of rainbow trout. J. Comp. Physiol., 112, 345-, 1976.
Stevens, E.D., Fry, F. E. J. The rate of thermal exchange in a teleost, Tilapia mossambica. Can. J. Zool., 48, 221-, 1969.
Stevens, E.D., Sutterlin, A.M. Heat transfer between fish and ambient water. J. exp. Biol., 65, 131-, 1976.
Williams, E.E., Brauer, R.W. Thermoregulatory behavior and temperature gradient perception in a juvenile fish (Poecilia reticulata). Can. J. Physiol. Pharmcol., 65, 1389-, 1987.
Wollmuth, L.P., Crawshaw, L.I., Panayiotides-Djaferis, H. Thermoregulatory effects of intracranial norepinephrine injections in goldfish. Am. J. Physiol., 253, (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 20), R821-, 1987.

Materiaal en Methode

Inhoudsopgave van hoofdstuk 2

§2.1 Inleiding
§2.2 Proedieren
§2.3 De experimentele opstelling
§2.4 Het globale verloop van de experimentele cyclus
§2.5 Opslag van de gegevens
§2.6 De temperatuurkarakteristiek van de opstelling en een evaluatie van de gebruikte methode.
§2.7 Statistische methoden en dataverwerking
Literatuurreferenties
Addendum

§2.1 Inleiding

Het principe van de bij de experimenten gebruikte apparatuur was als volgt: Een aquarium, waarin een vis rondzwom, was door een tussenschot in twee compartimenten verdeeld. In het tussenschot bevond zich een opening, waardoor de vis van de ene naar de andere helft van het aquarium kon zwemmen. In elk compartiment werd de temperatuur onafhankelijk van het andere geregeld. De temperatuur in de twee compartimenten was steeds verschillend.
De opzet van een experiment was als volgt: de temperatuur van één compartiment was 20° C. en van het andere compartiment was 15° C. Na enige tijd, 2 - 10 minuten, werd het 'koude' compartiment verwarmd tot 20° C. en het andere compartiment gekoeld (§ 2.3). Onder deze omstandigheden verlieten alle onderzochte vissen steeds het compartiment, dat gekoeld werd. Van dit spontane en natuurlijke thermogedrag werd bij dit onderzoek gebruik gemaakt.
De belangrijkste vraag was: hoeveel moet de temperatuur van een compartiment dalen, voordat de vis zich verplaatst (de temperatuurdrempel). Tweede vraag was: kan dit gedrag beinvloed worden? Hierbij kan gedacht worden aan farmaca, maar ook aan veranderingen van de uitgangstemperatuur (d.w.z. de temperatuur waarbij vis geacclimatiseerd was).
De verschillende technische aspecten van de gebruikte meetapparatuur, details van de experimentele procedure en de proefdieren worden in de volgende paragrafen besproken.
In tabel 2.1.1. en fig. 2.1.1 staan de gebruikte afkortingen en omschrijvingen.

Tabel 2.1.1. Enkele veel gebruikte afkortingen en omschrijvingen

T	:	temperatuur
Tu	:	bovengrenstemperatuur, meestal 20° Celsius.
Ts	:	de temperatuur waarbij de vis uit het compartiment vertrekt.
Td	:	temperatuurdrempel. Dit is de temperatuurdaling (graden) nodig om de vis naar het andere compartiment te doen overzwemmen. Td=Tu-Ts
t	:	tijd
tw	:	wachttijd in het 'warme' compartiment
tr	:	reactietijd: tijdsperiode gerekend vanaf het moment waarom het koelen van het compartiment begint tot het overzwemmen naar het andere compartiment.
α	:	koelsnelheid berekend met: (Tu-Ts)/tr (°C/min.)

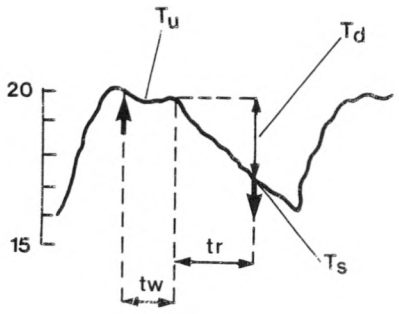


Fig. 2.1.1 Een schematische weergave van de betekenis van de gebruikte afkortingen en termen. In verticale richting is de temperatuur uitgezet en in horizontale richting de tijd. Tu: bovengrenstemperatuur; Td: temperatuurdrempel; Ts: temperatuur waarbij de vis uit het compartiment vertrekt; tw: wachttijd; tr: reactietijd. Met de pijlen wordt de aankomst resp. het vertrek van de vis uit het compartiment aangegeven.

§2.2 Proefdieren

Er werd gebruik gemaakt van diverse vissoorten: graskarpers (Ctenopharyngodon idella, Valenciennes), deze waren afkomstig van de Organisatie voor de Binnenvisserij (O.V.B., Nieuwegein, Utrecht); goudvissen (Carassius auratus, Linnaeus), deze werden betrokken van een importeur van aquariumvissen (Ruinemans B.V., Montfoort); regenboogforellen (Salmo gairdneri, Richardson); een schubkarper (Cyprinus carpio, Linnaeus); zilverkarpers (Hypophthalmichthys molitrix, Valenciennes). De laatste drie vissoorten waren afkomstig van de afdeling Visziekten (Vakgroep Pathologie, Fac. Diergeneeskunde). Het gewicht van de graskarpers was 20-80 gram.
Alle vissen werden gedurende minimaal 3 weken geacclimatiseerd bij 20° Celsius. De acclimatisatie vond plaats in voorraadaquaria (125 l.), die continu doorstroomd werden met leidingwater en constant op temperatuur gehouden werden. In elk aquarium bevonden zich, afhan-

kelijk van het lichaamsgewicht, 5 tot 20 vissen. Opgemerkt moet worden, dat alle dieren, vooral de graskarpers, tijdens hun verblijf in het laboratorium in gewicht toenamen.
Het merendeel van de in dit proefschrift beschreven experimenten is uitgevoerd met graskarpers. Dit is een bewust gedaan. Bij de goudvis, een in temperatuurselectiegedragsexperimenten veel gebruikte vis, zijn doordat deze vissoort alle vele eeuwen als siervis gehouden wordt, een groot aantal (soms bizarre) variëteiten ontstaan. De in de handel verkrijgbare vissen zijn meestal kruisingen van verschillende variëteiten. Het is niet bekend of deze kunstmatige selectie gevolgen heeft gehad voor het uitvoeren van het natuurlijke thermogedrag van de goudvis.
Bij de graskarper heeft deze kunstmatige selectie op uiterlijk niet plaats gehad. Een bijkomend voordeel voor dit gedragsonderzoek is dat deze vissen in hun natuurlijk biotoop (de rivieren die door het Chinese laagland stromen en de midden- en beneden loop van de Amur rivier in Rusland) een grote variatie in temperatuur ondervinden: 's zomers 25° C. en 's winters in de koude bovenstromen van de rivieren 0-4° C. (Nijssen en de Groot 1987, van Zon en Zonderwijk 1976). Onder experimentele omstandigheden blijken graskarpers huisvesting bij uiteenlopende temperaturen (12.8-29.4° C.) goed te doorstaan (Kilambi en Robison 1979).
Het sterftepercentage bij deze proefdieren was 6%. De sterfte trad vooral in de beginperiode op. Beschadigingen opgelopen tijdens het transport van de kwekerij naar het laboratorium waren belangrijke sterfte-oorzaken. Bij enkele vissen kon de doodsoorzaak niet vastgesteld worden.
In de ruimte, waarin deze voorraadaquaria stonden opgesteld en waar ook de experimenten werden uitgevoerd, heerste een licht-donkercyclus van 12/12 uur.
De graskarpers waren individueel gemerkt met een kleine plastic label, waarin een nummer was aangebracht. Bij de vissen werd onder narcose (Tricaine, MS 222, Sandoz) een nylon draad met een hechtnaald door de rugmusculatuur rostraal van de rugvin getrokken. De label werd met deze draad aan de vis bevestigd.
Enkele vissen zijn verschillende malen in het onderzoek gebruikt.

§2.3 De experimentele opstelling

Het principe van de experimentele opstelling was ontleend aan de preferentietemperatuuropstelling van Neill et al (1972).
Een persplex aquarium (LxBxH uitwendig: 42.2x22.2x21 cm; wanddikte: 1.1 cm) werd door een 1 cm dik ondoorzichtig PVC schot (**a**)[1] in twee compartimenten (**L** en **R**) verdeeld (fig. 2.3.1). (De vet gedrukte letters verwijzen de betreffende gedeeltes van figuur 2.3.1.) Beide compartimenten zijn door een opening (**o**) (2x4 cm) in het schot met elkaar verbonden. In elk compartiment bevond zich op de bodem en een

zijwand een stelsel van parallel geschakelde roestvrij stalen buizen (**E**) (uitwendinge diameter: 1 cm; wanddikte: 0.1 cm). Door warm dan wel koud water door het buizenstelsel te pompen fungeerden deze als koel- of verwarmingselementen. Het uitwisselingsoppervlak per element: 1183 cm^2. Het warm water was afkomstig van een waterresevoir (30 l.) (**H**), dat electrisch verwarmd werd (tot 45° Celsius). Om energie te besparen werd dit water na gebruik teruggevoerd in het reservoir. Het warme water werd rondgepomt met behulp van een electrisch aangedreven pomp (Eheim, type 1042) (**P**).
Het koelwater (**K**) was afkomstig van het drinkwaterleidingnet. De temperatuur van dit water varieerde afhankelijk van de seizoenen tussen 8° en 14° Celsius. Het koelwater werd na gebruik niet gerecirculeerd maar afgevoerd naar het riool. Er stond voldoende druk op het waterleidingnet om het koelwater zonder pomp rond te kunnen voeren. In het koel- en warm waterciruit bevonden zich electromagnetische ventielen (**MV**), zoals ook in sommige wasmachines gebruikt worden (Fabrikant Miele).
De watertemperatuur in de compartimenten werd gemeten met een thermistor (Analog Devices, type AD 590) (**e**), die boven een bruiser bevestigd waren. Het uitgangssignaal van deze thermistors vormde het ingangssignaal voor een electronische interface (eigenbouw vakgroep Veterinaire Farmacologie, Farmacie en Toxiciologie) (**E.I.**), waarmee o.a. de electromagnetische ventielen gestuurd werden. Met deze electronische interface kon tevens de bovengrenstemperatuur (Tu) en minimale ondergrenstemperatuur van het water in de compartimenten op bepaalde waarden ingesteld worden. Aan rand van de opening in het tussenschot waren aan weerszijden vier infraroodemittors en -sensoren (d_1 en d_2) aangebracht (emittor: Monsanto, type 7124, 940 nm). Dit fotodetectiesysteem, dat ondergebracht was in een waterdichte behuizing, was gekoppeld aan de electronische interface. Bij het overzwemmen van het ene compartiment naar het andere werden eerst de lichtbundels van het eerste fotodectectiesysteem verbroken en vervolgens die van het tweede systeem.
Sommige vissen staken alleen hun kop door opening en zwommen daarna achteruit terug. Door gebruik te maken van twee fotodetectiesystemen was het mogelijk om dit gedrag ('proeven' van de temperatuur in het andere compartiment) te onderscheiden van een echte passage en ontregeling van het systeem te voorkomen. Om een onderbreking als een passage te registreren werd als voorwaarde gesteld dat de lichtbundels, die het eerst verbroken waren, ook het weer eerst hersteld werden. Als de vis door opening was gezwommen, werd een nieuwe experimentele cyclus gestart (zie §2.4). Niettemin waren enkele vissen soms in staat om door snel heen en weer te zwemmen het systeem te ontregelen. Een regelmatige controle door de experimentator bleef derhalve noodzakelijk.
Beide compartimenten werden afzonderlijk met een bruiser (**b**) belucht. Door de stroom luchtbellen ontstond een zwakke stroming, waardoor de

ruimtelijke temperatuursverschillen in het compartiment beperkt werden. Deze temperatuursverschillen waren het gevolg van het warmtelek via de opening in het schot en van onvolkomenheden in het temperatuurregelsysteem. Deze fluctuaties vormen de 'temperatuurruis' in de experimenten (fig. 2.3.2) en zijn een constante zorg geweest bij het hele onderzoek. In §2.6 wordt hierop nader ingegaan.
De compartiment werden continu met schoon leidingwater doorstoomd. De doorstroomsnelheid zo afgesteld dat het water in een compartiment tenminste drie keer per dag vervest werd.
De kwaliteit van het aquariumwater (pH, nitraat, nitriet, ammoniak) werd regelmatig gecontroleerd (Afdeling Visziekten, Vakgroep Pathologie, Fac. Diergeneeskunde). Er werden nimmer afwijkingen gevonden.
Om te voorkomen, dat de vis reageerde op bewegingen in de experimentele ruimte was het aquarium aan drie kanten met een aluminium scherm omgeven.

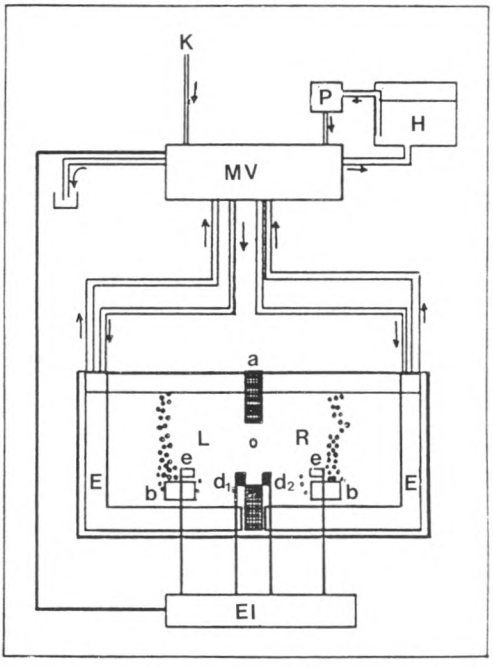


Fig. 2.3.1 Schematische voorstelling van de gebruikte opstelling. Het aquarium is in twee compartimenten (**L** en **R**) verdeeld. Tussen beide compartimenten is een schot (**a**) met een opening (**o**). Aan weerszijden van de opening bevinden zich infraroodemittors en -sensoren (d_1 **en** d_2). In elk compartiment bevindt zich een stelsel metalen buizen (**E**), waardoor warm (**H**) dan wel koud (**K**) water stroomt. Het warme water is afkomstig van een reservoir en wordt via een pomp (P) rondgepompt. Na gebruik wordt het warme water teruggevoerd naar dit reservoir en verdwijnt het koude water in het riool. In ieder compartiment is een bruiser (**b**) om het water te beluchten. Boven deze bruiser is een thermistor (**e**) aangebracht om de water temperatuur te meten. Zowel de thermistor als de infraroodemittors en -sensoren waren gekoppeld aan een electronische interface (**E.I.**), waarmee de watertemperatuur geregeld werd. Vanuit deze interface werden de electromagnetische ventielen (**MV**) geopend en gesloten. Deze interface was eveneens verbonden met een twee-kanaals schrijver en een microcomputer (niet in het schema getekend).

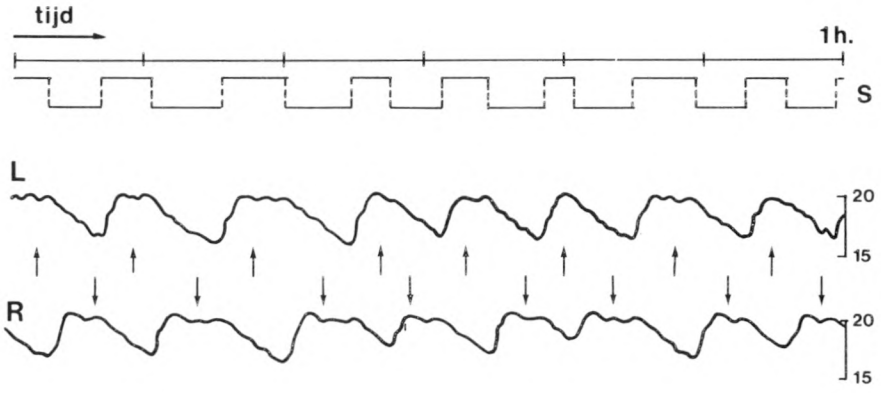


Fig. 2.3.2 Een voorbeeld van het temperatuurverloop in de tijd van beide compartimenten tijdens een experiment. In het bovenste deel (S) van de figuur is de schakelcyclus van het temperatuurregelsysteem weergegeven: hoog, linker compartiment warm; laag, rechter compartiment warm. In het onderste deel is de watertemperatuur in de twee compartimenten uitgezet tegen de tijd. De pijlen in de figuur geven de passages van de vis door de opening aan.

§2.4 Het globale verloop van de experimentele cyclus

Wanneer de vis na enkel uren een rustig gedrag in de opstelling vertoonde, d.w.z. niet constant van het ene naar het andere compartiment zwom, werd het compartiment waarin de vis zich bevond langzaam gekoeld tot 15° Celsius en het andere compartiment verwarmd tot 20° Celsius. In figuur 2.3.2 is dit met S aangegeven. Op een gegeven moment zwom de vis door de opening naar het andere compartiment (pijlen in fig. 2.3.2). In de oorspronkelijke opname werden deze passages door de opening en de positie van de vis in de opstelling met een 'event-marker' in de marge van het registratiepapier aangegeven. De passage door de opening duurde 2 - 5 sec. en deze tijd is bij de berekeningen buiten beschouwing gelaten. Iedere passage door de opening, waaraan een koelcyclus voorafgegaan was, werd gevolgd door een 'random-delay' tijd. Tijdens deze wachtperiode verblijft de vis bij een constante Tu en na het verstrijken van deze periode werd opnieuw een koelcyclus gestart. Met de 'random'-wachttijd werd voorkomen, dat vissen op een periodiciteit gingen reageren. Bij het merendeel van de experimenten werd de wachtijd gekozen uit het interval 30-120 seconden. Er zijn ook experimenten gedaan met andere

intervallen: 30-240, 60-360 en 120-600 seconden. Bij het generen van de wachttijd werd gebruik gemaakt van de microcomputer.

§2.5 Opslag van gegevens

De electronische interface was gekoppeld aan een twee kanaals schrijver (Servogor) en aan een 48 K ram microcomputer (Apple][+, Apple Computer Inc.). De microcomputer bevatte een klokkaart (Mountain Hardware Inc.) en een vier kanaals A/D converter (Magazijn van Experimentele Fysica, R.U. Utrecht). Aan de microcomputer was een dotmatrix printer gekoppeld (Oki, type µ80). Voor de data-opslag werd aanvankelijk gebruik gemaakt van een cassetterecorder (Philips) en later van een diskdrive (Apple Computer Inc.). Na elke passage en bij de aanvang van het koelen van een compartiment worden de momentane tijd, de momentane temperaturen van beide compartimenten en de positie van de vis vastgesteld en opgeslagen in het geheugen van de microcomputer. Na 400 passages werden deze gegevens op een cassetteband resp. naar een diskette weggeschreven.
De verwerking en analyse van de experimentele gegevens, zoals hier gepresenteerd, werd gestart nadat alle experimenten uitgevoerd waren. Aanvankelijk werd hiervoor alleen een microcomputer met 128 K ram geheugen gebruikt (Basis 108, Basis Microcomputer GmbH) waaraan een printer, twee diskdrives en een cassetterecorder gekoppeld waren. Deze computer is later door middel van een RS 232 interface gekoppeld aan een andere computer (Atari 520ST+, Atari Corp.). Door de hogere kloksnelheid en de uitgebreidere mogelijkheden van deze computer werden de statische berekeningen sneller uitgevoerd. Het werd nu mogelijk om de gegevens in een hiervoor ontwikkelde database op te slaan, waardoor de toegankelijkheid van de data verbeterde.

§2.6 De temperatuurkarakteristiek van de opstelling en een evaluatie van de gebruikte methoden

Onderstaande analyse is bedoeld de beperkingen van de experimentele opstelling te beschrijven. In deze paragraaf wordt tevens getracht inzicht te geven in de betrouwbaarheid van de gebruikte apparatuur, met name van het regelsysteem voor de watertemperatuur.
Een voorbeeld van het verloop van de temperatuur van beide compartimenten in de tijd is in figuur 2.6.1 weergegeven. De bovengrenstemperatuur (Tu) blijkt aan fluctuaties onderhevig te zijn. Er is zowel sprake van een 'overshoot'-fenomeen als van oscillaties. Deze verschijnselen zijn inherent aan het gebruikte temperatuurregelsysteem. Het warmteverlies door de opening speelt hierin ook een rol. De consequentie hiervan is, dat de momentane waarde van Tu tijdens de experimenten bepaald moet worden en dat bij de verwerking van de gegevens rekening gehouden moet worden met de fluctuaties in deze temperatuur. In figuur 2.6.2 worden enkele frequentiehistogrammen van Tu weergegeven. De Tu is gemeten op moment van omschakelen dus vlak

voor het moment waarop de koelfase begint. De Tu blijkt redelijk normaal verdeeld te zijn en heeft een standaarddeviatie van ca. 0.2°. Er is soms een verschil tussen de gemiddelde Tu van beide compartimenten. Dit wordt geillustreerd in tabel 2.6.2. Het is dus van belang om na te gaan of deze verschillen van invloed zijn op het gedrag van de vis tijdens de experimenten, zoals uit §3.5 en §6.6 blijkt.
De koeling van een compartiment blijkt, zoals in figuur 2.6.1 te zien is, gemiddeld met een constante snelheid te verlopen. De lijnen A en B in deze figuur zijn de grafische benaderingen van de koelsnelheid. De gemiddelde koelsnelheid (α) heeft eenzelfde spreiding als de gemiddelde Tu (tabel 2.6.1). Dit is een aanwijzing, dat er geen andere belangrijke 'temperatuurruiseffecten' in het spel zijn. De fluctuaties in de Tu zijn dus de beperkende factor voor de meetnauwkeurigheid. De standaarddeviaties van de gemiddelde Tu van verschiilende experimenten hebben dezelfde grootte orde. Dit betekent dat de seizoensfluctuaties van de leidingwatertemperatuur (ongeveer 6 graden) geen merkbare invloed hebben gehad op het temperatuursverloop (tabel 2.6.1).
Bij lange koeltijden (> 5 - 6 minuten) kan de koelsnelheid niet meer op de aangegeven wijze bepaald worden, omdat de temperatuur dan asymptotisch naar een limietwaarde loopt. Deze bleken in de praktijk zelden voor te komen en zijn verder buiten beschouwing gebleven. De koelsnelheid wordt als afzonderlijke parameter wel in het onderzoek betrokken.
De watertemperaturen werden vlak boven een bruiser gemeten, zoals vermeld in § 2.3. Het voordeel hiervan was dat door de continu waterstroom langs de bruiser een indruk verkregen werd van de temperatuurfluctuaties in een compartiment. Met de onderstaande analyse wordt getracht om aan te tonen, dat de gemeten temperatuur inderdaad een goede maat is voor de omgevingstemperatuur van de vis door te onderzoeken of uit de verschillende tijdstippen (t) gemeten temperatuur (T) tijdens een reeks van succesievelijke koelcycli de koelsnelheid berekend kan worden. Het resultaat van dit onderzoek wordt weergegeven in de figuren 2.6.3 en 2.6.4. De tijd, gerekend vanaf start koelen is in klassen ingedeeld (klassebreedte 20 seconden). In deze figuren is de tijd van voren naar achteren en de momentane temperatuur van links naar rechts uitgezet. In verticale richting is het aantal malen dat een bepaalde combinatie van t en T voorkomt, weergegeven. In deze figuren is te zien, dat er een verband is tussen t en T. Tegelijk wordt duidelijk, dat de waarnemingen een spreiding hebben. Uit de waarnemingen, zoals weergegeven in de figuren 2.6.3 en 2.6.4, zijn met behulp van de kleinste kwadraten methode regressielijnen berekend (tabel 2.6.4). Uit de kleine P-waarde van de regressiecoëfficiënt blijkt, dat er een goede relatie is tussen de tijd en de momentane temperatuur. In de figuur 2.6.5 zijn deze lijnen met de bijbehorende punten weergegeven. De koelsnelheid blijkt gedurende de eerste zes minuten linear te verlopen. De uit deze regressielijnen geëxtrapoleerde temperatuur op t=0 komt bij beide compartimen-

ten goed overeen met de gemeten gemiddelde Tu. Hiermee is aannemelijk gemaakt, dat gemeten temperatuur een goede indicatie is voor de momentane omgevingstemperatuur van de vis. Tussen de beide compartimenten zijn er geringe verschillen in koelsnelheid en verdeling van Tu. De verschillen tussen het linker en rechter compartiment zijn doorgaans niet significant, maar bieden wel mogelijkheden bij de analyse van het gedrag van de vis.
Met bovenstaande analyse zijn de statistische beperkingen van de meetmethode aangegeven. De uitkomsten van de gedragsexperimenten met vissen kunnen statistisch gezien niet beter zijn dan deze resultaten. Afhankelijk van de experimentele resultaten, kon nu onderzocht worden of de spreiding van de gemiddelde temperatuurdrempel (Td) van de vis kleiner werd als uit gegaan wordt van een bepaalde waarde van Tu.
De snelheid waarmee een compartiment wordt opgewarmd, is een niet onbelangrijk aspect van dit gedragsonderzoek. De opwarmsnelheid was in absolute zin bijna driemaal groter dan de koelsnelheid (zie fig. 2.3.2). Hiermee werd bereikt, dat de vis bij het overzwemmen na het koelen een grote kans had om in een warmer compartiment terecht te komen (zie figuren 2.3.2 en 2.6.6). Vooral in de trainingsfase was deze 'beloning' van belang. Echter men dient zich ervan bewust te zijn dat wanneer de vis op een geringe temperatuurdaling reageerde de kans, dat vis in een kouder compartiment terecht kwam, groter was. Of dit aspect consequenties heeft voor het gedrag van de vis, wordt in §3.6 geanalyseerd.
Het verloop van de temperatuur in de periode van ca. één uur is weergegeven in figuur 2.6.6. In dit tijdsbestek waren er 18 reacties van de vis (pijlen). Tevens is in deze figuur te zien, dat de lengte van de schakelperioden onder invloed van de random wachttijd varieerde. Vissen zwommen soms ook over voordat het compartiment werd gekoeld. Deze 'spontane' activiteit betreft 5 - 15% van de passages. Het is mogelijk, dat deze 'spontane passages' het gevolg waren van toevallige temperatuursfluctuaties. Spontaan betekent dus niet dat de passage geen 'temperatuuroorzaak' heeft, maar met spontaan wordt bedoeld dat de experimentator er geen rechtstreekse invloed op uit heeft kunnen oefenen. In figuur 2.6.4 zijn enkele spontane passages zichtbaar. Het dier komt na het overzwemmen in een kouder compartiment terecht en zwemt na korte tijd terug. De omstandigheden waaronder deze spontane passages optraden, moeten onderzocht worden. Dit aspect wordt in §3.11 besproken.

Een fundamentele vraag bij dit onderzoek is: Reageert de vis op de temperatuursveranderingen of is er sprake van een 'escape'reactie, waarbij een oncomfortabele locatie vermeden wordt? In het laatste geval zou er dus meer sprake zijn van een algemene reactie, die niets met het thermogedrag uitstaande heeft. In §3.6 en §3.12 wordt uiteengezet waarom het aannemelijk is dat de vis een thermoregulatiegedrag vertoont en geen 'escape'reacties.

Nadat de verschillende gedragsfysiologische aspecten voldoende onderzocht waren, konden experimenten uitgevoerd worden, waarbij langs farmacologische weg het gedrag beinvloed werd. Deze resulaten worden in hoofdstuk 5 en 6 besproken.

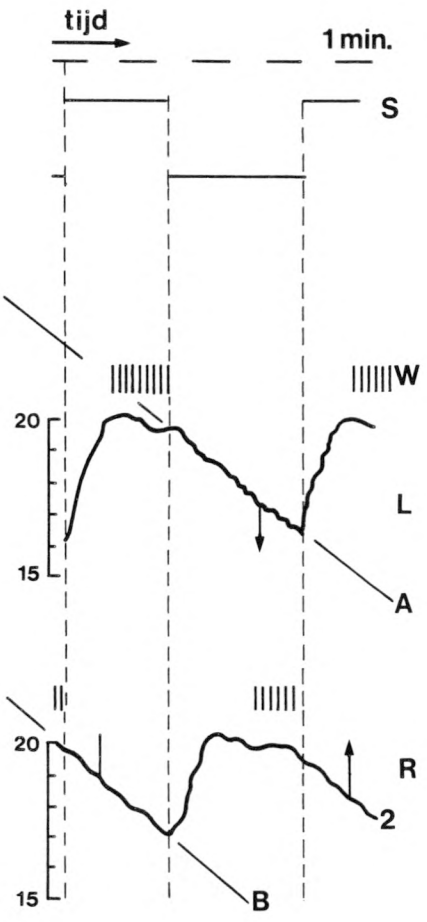


Fig. 2.6.1 Twee 'koelcycli' uit fig. 2.3.2. De lijnen A en B zijn grafische benaderingen van de koelsnelheid. Met pijltjes is het overzwemmen van de vis aangegeven.

S: schakelcyclus van het temperatuurregelsysteem. Hoog: linker compartiment wordt verwarmd dan wel tijdelijk gefixeerd op de bovengrenstemperatuur en rechter compartiment wordt gekoeld.

W: wachttijd. Elke verticale lijn representeert 10 seconden.

Tabel 2.6.1. Gemiddelde Tu en koelsnelheid (α) tijdens verschillende experimenten in 1983.

visno	datum	C[1]	Tu	s.d.	gemidd.α[2]	s.d.	N
478	16/02/83	L	20.05	0.16	0.98	0.16	474
478	16/02/83	R	20.36	0.19	0.70	0.14	473
454	22/03/83	L	20.29	0.32	0.31	0.17	342
454	22/03/83	R	20.06	0.23	0.26	0.18	344
478	24/04/83	L	20.32	0.19	0.53	0.19	430
478	24/04/83	R	20.18	0.12	0.49	0.17	443
500	01/05/83	L	20.14	0.19	0.69	0.14	640
500	01/05/83	R	20.42	0.24	0.79	0.20	639
497	16/06/83	L	22.73	0.08	0.69	0.12	546
497	16/06/83	R	22.77	0.14	0.60	0.16	527

[1] Compartiment: (L)inks of (R)echts
[2] koelsnelheid (°C/min)

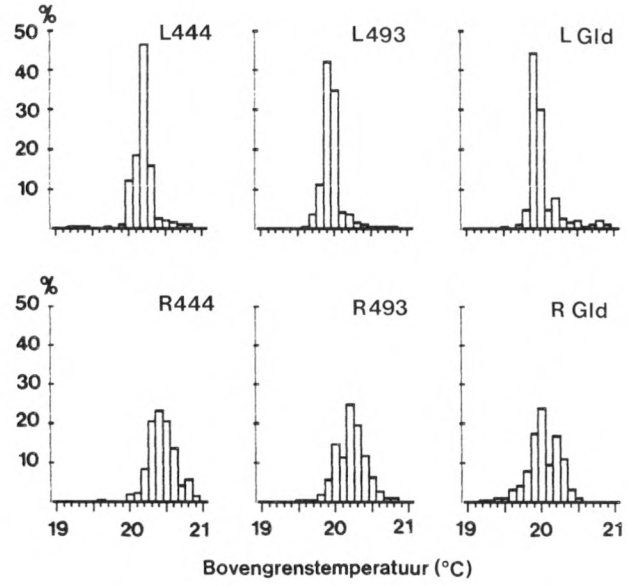


Fig. 2.6.2 Genormaliseerde frequentiehistogrammen van de gemeten Tu (°C.). In de figuren is het visnummer en het compartiment (L/R) aangegeven. 444: graskarper d.d. 25-27/04/1983 L: gemiddelde 20.19° C., s.d. 0.16, N=491; R: gemiddelde 20.43° C., s.d. 0.18, N: 491. 493: graskarper d.d. 10-13/11/82 L: gemiddelde 19.95° C., sd 0.12, N: 779; R: gemiddelde 20.21° C., s.d. 0.20, N: 781. Gld: goudvis d.d. 28-29/10/82: L: gemiddelde 20.01, s.d. 0.21, N: 323; R: gemiddelde 20.02° C., s.d. 0.22, N: 319.

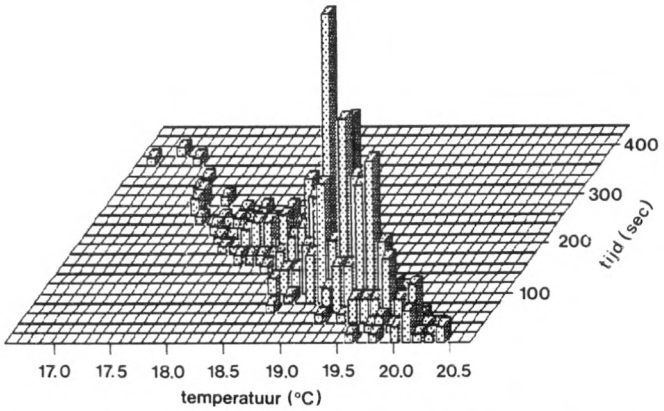


Fig. 2.6.3 Een driedimensionaal frequentiehistogram van de tijd en de temperatuur. Graskarper 478, linker compartiment d.d. 24-26/04/83. N=491. De tijd gerekend vanaf het moment van start koelen is in klassen ingedeeld: klassebreedte: 20 sec. De temperatuur, die bereikt is na het verstrijken van deze tijd, is van links naar rechts uitgezet. In verticale richting is het aantal malen, dat een bepaalde combinatie voorkomt weergegeven.

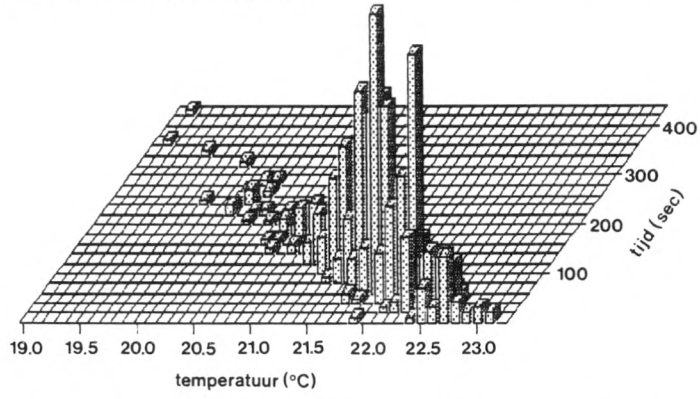


Fig. 2.6.4 Een driedimensionaal frequentiehistogram van de tijd en de temperatuur. Graskarper 497, rechter compartiment d.d. 16-19/06/83. N=722. De tijd gerekend vanaf het moment van start koelen is in klassen ingedeeld: klassebreedte: 20 sec. De temperatuur, die bereikt is na het verstrijken van deze tijd, is van links naar rechts uitgezet. In verticale richting is het aantal malen, dat een bepaalde combinatie voorkomt weergegeven.

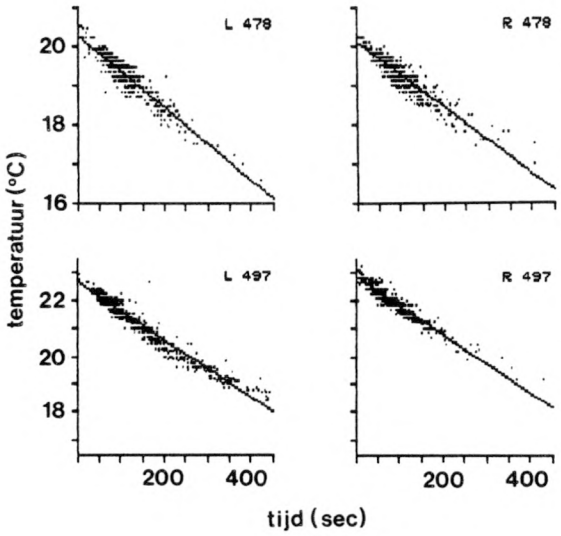


Fig. 2.6.5 Regressielijnen van de momentane temperatuur (graden Celsius) en de tijd (seconden), waarover gekoeld is bij graskarper 478 dd 24-26/04/83 en graskarper 497 dd 16-19/06/83 in zowel het linker (L) als het rechter compartiment (R). In tabel 2.6.4 staan de nummerieke gegevens van deze regressielijnen.

Tabel 2.6.4. Regressielijnen tijd (t) en temperatuur (T) van het linker (L) en rechter (R) compartiment bij vis 478 24/04/83 en vis 497 16-19/06/83. In de tabel is eveneens de uit de regressielijn geëxtrapoleerde Tu (A) en de gemeten gemiddelde Tu met bijbehorende standaarddeviatie (B) weergegeven.

vis	C[1]	regressielijn	P*	A	B	sd	N
478	L	T=20.27-0.0093xt	>0.001	20.27	20.31	0.21	491
478	R	T=20.09-0.0085xt	>0.001	20.09	20.18	0.13	489
497	L	T=22.63-0.0103xt	>0.001	22.63	22.77	0.16	689
497	R	T=22.83-0.0103xt	>0.001	22.83	22.81	0.16	722

[1] Compartiment: (L)inks of (R)echts
* P-waarde regressiecoëfficiënt

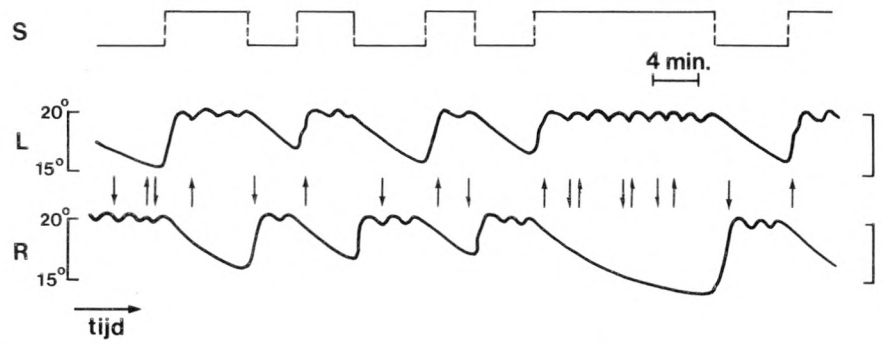


Fig. 2.6.6 Registratie van de watertemperatuur tijdens een experiment. In het bovenste deel van de figuur (S) worden de schakelcycli van het temperatuurregelsysteem van de compartimenten (L/R) weergegeven. Het overzwemmen van de vis van het ene naar het andere compartiment is met pijlen aangegeven. In het rechter deel van de figuur zijn enkele spontane passages te zien.

§2.7 Statistische methoden en dataverwerking

De scheefheid en de welving (g1 resp. g2) van frequentieverdelingen zijn op de gebruikelijke wijze berekend. Op de door Sokal en Rohlf (1981) aangegeven wijze is met de T-test onderzocht of deze statistische parameters significant van nul verschillen.

De standaarddeviaties, die gebaseerd zijn op een gering aantal waarnemingen ($N<20$) zijn voor bias gecorrigeerd (Gurland en Tripathi 1971).

Met de Kolmogorov-Smirnovtest is onderzocht of de frequentieverdelingen significant (d.w.z. $P<0.05$) verschillend waren van een normale verdeling. De parameters (gemiddelde en standaarddeviatie) van de normale verdeling zijn berekend met de experimentele data. Omdat hierdoor de test met de standaard tabellen zeer conservatief wordt, zijn de significantiegrenzen met de asymptotische benadering van Lillifors (1967) berekend.

De relatie tussen de Td en de andere parameters is door middel van lineaire regressie geanalyseerd (Sokal en Rohlf 1981). Bij het vergelijken van twee gemiddelde temperatuurdrempels is een T-test gebruikt. Om te onderzoeken in hoeverre het verschil tussen twee varianties significant is, is een test van Sokal en Rohlf (1981) gebruikt.

Voor het onderzoek naar een verschil in de frequentie van het spontaan gedrag overdag en 's nachts (§3.11) is gebruik gemaakt van de 'test of independence' (Sokal en Rohlf 1981).

Literatuurreferenties
Lillifors, H.W. The Kolmogorov-Smirnov test for normality with mean and variance unkown. J. Amer. Stat. Assoc., 62, 399-402, 1967.
Kilambi, R.V., Robinson, W.R. Effects of temperature and stocking density on food consumption and growth of grass carp *Ctenopharyngodon idella*, Val. J. Fish Biol. 15, 337-, 1979.
Neill, W.H., Magnuson, J.J., Chipman, G.P. Behavioral thermoregulation by fishes: a new experimental approach. Science, 176, 1443-1445, 1972.
Nijssen, H., Groot, S.J. de, De vissen in Nederland. Stichting Uitgeverij Koninklijke Nederlandse Natuurhistorische Vereniging, Hoogwoud, 1987.
Sokal, R.R., Rohlf, F.J. Biometry, blz. 719-720, New York 1981.
Zon, C.J. van, Zonderwijk, P. Profiel van de grakarper in Nederland. Vakbl. Biol., 56, 282-, 1976.

Addendum

Suggesties voor verfijningen van de experimentele opstelling

Zoals in §2.6 wordt uiteengezet fluctueert de bovengrenstemperatuur binnen grenzen. Deze ruis ontstaat doordat de temperatuur in een compartiment continu geregeld werd door naar behoefte koud of warm water door de verwarmings- c.q. koelelemeten te pompen (§2.3). Het gevolg was een ruis in de bovengrenstemperatuur. Bij toekomstige experimenten kan het ter verkrijging van een grotere nauwkeurigheid nodig zijn om deze ruis in de bovengrenstemperatuur te verminderen.
De ruis in de bovengrenstemperatuur kan gereduceerd worden door gedurende de periode, dat een compartiment op de Tu gefixeerd moet worden, water van dezelfde temperatuur door het element te laten stromen. Bij het verwarmen van het water in een compartiment moet echter wel warm water (b.v. 40° C.) gebruikt worden.
Een belangrijke bron van locale temperatuursverschillen in de experimentele opstelling was de opening in het tussenschot. Hoewel in hoofdstuk 6 aannemelijk gemaakt is, dat de vis niet gereageerd heeft op deze kleine locale temperatuursverschillen, is het beter om deze verschillen te voorkomen. Dit kan bereikt worden door in de opening een transparante schuifdeur aan te brengen. Deze schuifdeur zou open moeten gaan wanneer de vis de lichtbundels van het fotodetectiesysteem verbreekt.
Bij dit onderzoek is aangetoond, dat de temperatuurdaling bepalend is geweest voor het gedrag van de vis in de opstelling. Bij het verbeteren van de opstelling zal aan de rol van andere dan thermische signalen nog meer aandacht besteed moeten worden. Een voorbeeld: Het openen en sluiten van de electromagnetische ventielen gaat ongetwijfeld met geluid en trillingen gepaard. Het is aan te bevelen om in de periode waarin het water de bovengrenstemperatuur heeft 'dummy' kleppen met een random interval te openen en te sluiten. Hiermee kan

een dressuur op het openen en sluiten van de ventielen voorkomen worden.
Tijdens deze experimenten worden voor het verwarmen en koelen van de compartimenten grote hoeveelheden warm en koud water gebruikt en zijn daardoor energieverslindend. Het is daarom aan te bevelen om dit onderzoek uit te voeren op plaatsen, waar men de beschikking heeft over grote hoeveelheden warm water (krachtcentrales e.d.).

De invloed van een daling van de temperatuur op het gedrag van vissen.

§3.1 Inleiding
§3.2 Het leergedrag van de vis
§3.3 De temperatuurdrempel
§3.4 De wachttijd en de temperatuurdrempel
§3.5 De bovengrenstemperatuur en de temperatuurdrempel
§3.6 Het effect van het temperatuursverschil tussen beide compartimenten op het moment van overzwemmen en de daarop volgende temperatuurdrempel
§3.7 De tijd en de temperatuurdrempel
§3.8 De invloed van de vorige temperatuurdrempel op de momentane drempel
§3.9 Het lopend gemiddelde van de temperatuurdrempel
§3.10 De relatie tussen de temperatuurdrempel en de reactietijd.
§3.11 Het spontaan gedrag
§3.12 Het gedrag van de vis tijdens het continu koelen van beide compartimenten
§3.13 Algemene discussie
Literatuurreferenties

§3.1 Inleiding

De primaire opzet van dit hoofdstuk is te onderzoeken of, het gedrag dat de vis in de opstelling uitvoert, het gevolg is van de verlaging van de omgevingstemperatuur. Als deze veronderstelling juist is, dan zal er een bepaalde temperatuursdaling nodig zijn om de vis te laten overzwemmen naar het andere compartiment; de numerieke waarde van deze daling is de temperatuurdrempel en wordt aangegeven met Td.
Vissen beschikken over gevoelige perifeer gelegen thermozintuigen (§1.3). De eigenschappen van de frequentieverdeling van de Td en de relatie van de Td met verschillende andere parameters zoals de wachttijd, de bovengrenstemperatuur en de tijd van de dag werden onderzocht. Omdat het verloop van de temperatuursdaling in beide compartimenten soms verschilde (§2.6), is nagegaan of dit gevolgen had voor de Td (§3.5).
Bij het overzwemmen van het ene naar het andere compartiment ondergaat de vis een 'temperatuurstap'. Nagegaan is of de grootte en het teken van deze 'stap' gevolgen heeft voor de daarop volgende Td. In §3.6 wordt dit onderzocht.
Aan enkele analyses ligt een meer speculatieve benadering ten grondslag. Bij zoogdieren is de thermoregulatie een automatisch verlopend proces. De mens wordt zich pas bewust van de aanwezigheid van dit regelsysteem als er iets misgaat en we het te warm of te koud krijgen.

Onder normale fysiologische omstandigheden verloopt de thermoregulatie geheel buiten ons bewustzijn om. Het leek nu van belang om na te gaan of het thermoregulatiegedrag van de vis (thermogedrag) ook een automatisch verlopend proces is. In dit verband is het gedrag van de vis interessant als deze overzwemt zonder dat daaraan een koeling voorafgegaan is (spontaan gedrag) en terecht komt in een compartiment dat kouder is en niet opgewarmd wordt. Wanneer het thermogedrag eveneens automatisch verloopt, is te verwachten dat dit geen consequenties heeft voor de daaropvolgende temperatuurdrempel. Anders gezegd: leert het dier van een dergelijke negatieve ervaring?
Een belangrijke vraag bij dit onderzoek is of het gedrag van de vis in de opstelling wel tot doel had om een bepaalde omgevingstemperatuur te handhaven. Het thermogedrag kan ook geinterpreteerd worden, als een 'escape'reactie: het dier 'vlucht' voor een lage temperatuur door over te zwemmen naar het andere (warmere) compartiment (vergelijk §1.6). Het voor en het tegen van beide standpunten ('escape'- dan wel thermogedrag) worden besproken aan de hand van een kwantitatieve analyse van de resultaten. Hierbij is het temperatuursverschil tussen de compartimenten op het moment van overzwemmen van groot belang.
De resultaten van de verschillende analyses worden direct gevolgd door de voorlopige conclusies. Het hoofdstuk wordt afgesloten met een algemene discussie.

§3.2 Het leergedrag van de vis

Alle onderzochte graskarpers zwommen tijdens het koelen over naar het andere compartiment. Aanvankelijk zwemt de vis min of meer toevallig (d.w.z. zonder te letten op een temperatuursdaling) over van het ene naar het andere compartiment. In figuur 3.2.1 is het aantal correcte passages uitgezet tegen de tijd. Duidelijk is te zien, dat de vis op de tweede dag in minder dan 10% van de gevallen overzwemt zonder dat hieraan een koeling is voorafgegaan. In deze figuur is ook zichtbaar, dat er perioden zijn waarin de vis vaak overzwemt voordat er het koelen is begonnen en er perioden zijn waarin dit minder gebeurt.
Opvallend was, dat alle vissen, die na enige tijd, soms maanden, opnieuw in de opstelling werden gebracht ogenblikkelijk overzwommen wanneer het compartiment gekoeld werd.

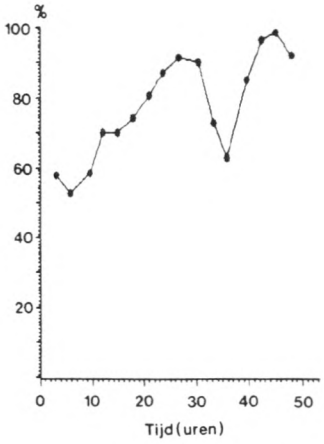


Fig. 3.2.1 Leerkurve bij vis 497. Langs de X-as is de tijd (uren) vanaf het moment dat de vis voor het eerst in de shuttlebox is uitgezet. Langs de Y-as is het aantal passages uitgezet (als percentage van het totaal aantal passages), waaraan het koelen van het compartiment is voorafgegaan.

§3.3 De temperatuurdrempel

De frequentieverdelingen van Td bij enkele vissen worden weergegeven in fig. 3.3.1. In tabel 3.3.1 wordt voor vijf vissen per compartiment de gemiddelde Td en de standaarddeviatie (s.d.) van minimaal 100 opeenvolgende experimentele cycli tijdens een periode, waarin het gedrag weinig fluctuaties vertoonde (§3.9 lopend gemiddelde) weergegeven. Met vis 480 werden experimenten bij verschillende bovengrenstemperaturen uitgevoerd. De temperatuurdrempels verschillen bij deze experimenten echter niet significant.
Zes van de zestien frequentieverdelingen bleken significant van de normale verdeling te verschillen. Steeds is er een neiging tot een rechtszijdig scheefheid: er zijn naar verhouding meer grote dan kleine Td-waarden. Deze scheefheid blijkt uit het positieve teken van g1 uit tabel 3.3.1. Bij acht verdelingen is deze scheefheid significant. Bij elf van de zestien verdelingen is de g2 groter dan 3 (tabel 3.3.1). Dit betekent dat er bij deze verdelingen meer waarnemingen in het centrum dan bij een normale verdeling verwacht zou mogen worden. Het aanwezig zijn van leptokurtosis en scheefheid leidt ertoe dat zes frequentieverdelingen significant afwijken van de normale verdeling.
De verschillen tussen de temperatuurdrempels van beide compartimenten zijn soms beduidend, terwijl er geen opvallende verschillen zijn in de Tu. Dit betekent, dat de grootte van de Td ook van andere factoren afhangt (§3.5 t/m §3.7).

In de hierna volgende analyse wordt onderzocht of de spreiding in Tu gevolgen heeft gehad voor Td. Hierbij is aangenomen dat zowel de frequentieverdeling van Td als die van Tu overeenkomen met de normale

verdeling. Nu kan de 'sigmaregel' toegepast worden:

$$\sigma^2_{Td} = \sigma^2_{Tu} + \sigma^2_{vis} \qquad [1]$$

Hierbij is σ^2_{vis} de variantie van het temperatuurdetectiesysteem van de vis. Uit [1] kan de standaarddeviatie van de vis berekend worden:

$$sd_{vis} = \sqrt{(sd^2_{Td} - sd^2_{Tu})} \qquad [2]$$

De sd_{vis} van vijf vissen is weergegeven in tabel 3.3.1. Met uitzondering van één experiment (480 07-13/10/82, rechter compartiment) is de sd_{vis} maximaal 15% kleiner dan sd_{Td}. Dit betekent, dat de fluctuaties in de Tu weinig bijdragen aan de spreiding in Td. Het dier zwom uitsluitend over omdat de temperatuur gedaald was.

Concluderend kan het volgende gesteld worden. De verdeling van de Td heeft het karakter van een normale verdeling. Veel verdelingen zijn gepiekt en neigen naar een rechtszijdige scheefheid. De rechtszijdige scheefheid van de gevonden verdeling is mogelijk ontstaan doordat de vis tijdelijk minder aandacht had voor temperatuursveranderingen. De standaarddeviatie van de Td is veel groter dan die van de Tu over dezelfde periode (tabel 3.3.1). De fluctuaties, die ontstaan door onvolkomenheden in de regeling van de bovengrens van de watertemperatuur zijn geen beperkende factor geweest voor deze gedragexperimenten. In §3.5 worden de effecten van de bovengrenstemperatuur op Td nader besproken.

Tabel 3.3.1 Enkele statistische eigenschappen van de frequentieverdeling van Td tijdens een stabiele fase in het thermogedrag. Tevens wordt de gemiddelde Tu van deze periode vermeld.

Vis	datum	exp.	C[1]	N	Tu[2]	sd_{Tu}[3]	Td[4]	sd_{Td}[5]	P[6]	g1	g2	sd_{VIS}[7]
451	28-31/10/82	L		132	20.02	0.11	0.71	0.30	<0.01	1.073[C]	6.039[E]	0.28
451	28-31/10/82	R		132	20.44	0.19	1.44	0.41	>0.05	0.365	3.172	0.36
478	16-18/02/83	L		142	20.02	0.19	1.30	0.52	<0.01	0.662[B]	3.875[D]	0.48
478	16-18/02/83	R		142	20.37	0.19	1.15	0.46	>0.05	0.294	3.084	0.42
478	24-26/04/83	L		122	20.30	0.21	0.99	0.40	>0.05	0.481[A]	3.255	0.34
478	24-26/04/83	R		122	20.24	0.11	0.77	0.33	>0.05	0.174	2.774	0.31
480	22-29/09/82	L		112	19.88	0.33	1.42	0.73	>0.05	0.078	2.261	0.65
480	22-29/09/82	R		112	19.13	0.18	0.94	0.63	<0.01	0.581	2.588	0.60
480	07-13/10/82	L		252	19.81	0.11	1.26	0.52	>0.05	0.740[C]	4.285[E]	0.51
480	07-13/10/82	R		252	18.79	0.32	0.81	0.41	<0.01	0.575[C]	3.072	0.26
480	17-18/03/83	L		301	25.21	0.22	1.69	0.77	<0.01	1.118[C]	5.615[E]	0.74
480	17-18/03/83	R		301	25.18	0.24	1.62	0.70	>0.05	0.369[C]	3.428	0.66
489	14-19/11/82	L		122	20.07	0.19	1.32	0.40	>0.05	0.258	2.959	0.35
489	14-19/11/82	R		122	19.90	0.19	1.68	0.39	>0.05	0.349	3.235	0.34
500	01-04/05/83	L		132	20.20	0.19	2.02	1.34	<0.01	0.494[A]	2.084[A]	1.33
500	01-04/05/83	R		132	20.31	0.20	0.85	0.42	>0.05	0.288	3.171	0.37

[1] Compartiment: L(inks) en R(echts)
[2] Gemiddelde Tu
[3] Standaarddeviatie gemiddelde Tu
[4] Gemiddelde Td
[5] Standaarddeviatie gemiddelde Td
[6] P-waarde van de Kolmogorov-Smirnov test (§2.7). P<0.05 betekent, dat de verdeling significant verschilt van de normale verdeling.
[7] Berekend met [2]
[A] significant verschillend van 0, P<0.05
[B] significant verschillend van 0, P<0.01
[C] significant verschillend van 0, P<0.001
[D] significant verschillend van 3, P<0.05
[E] significant verschillend van 3, P<0.001

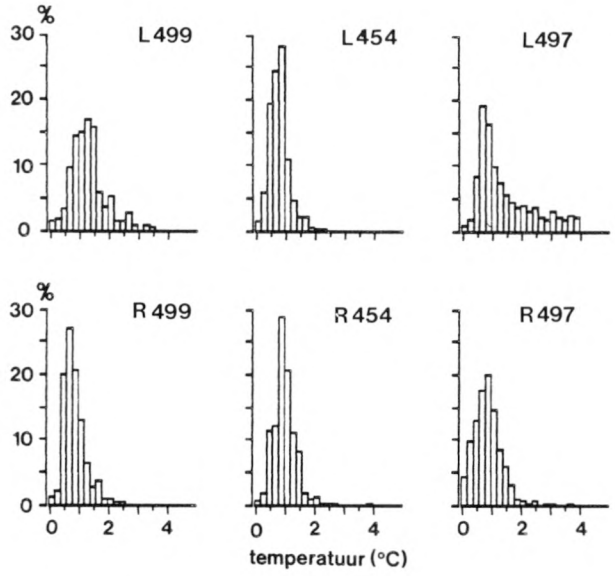


Fig. 3.3.1 Frequentiehistogrammen van de Td van enkele vissen. klassebreedte is 0.2° Celsius. De verdeling heeft een Gaussisch karakter. Bij elk histogram wordt het nummer van de vis en het compartiment (L resp. R) vermeld. 499 graskarper dd 10-11/10/83, L: gemiddelde 1.27° C., s.d. 0.59, N=223 (Tu: 20.28° C., s.d. 0.75); R: gemiddelde 0.82° C., s.d. 0.39, N=215 (Tu: 19.77° C., s.d. 0.39). 454 graskarper dd 10-11/06/83, L: gemiddelde 0.75° C., s.d. 0.32, N=397 (Tu: 22.85° C., s.d. 0.10); R: gemiddelde 0.95° C., s.d. 0.40, N=402 (Tu: 22.85° C., s.d. 0.11). 497 graskarper dd 17-19/06/83, L: gemiddelde 1.40° C., s.d. 0.93, N=591 (Tu: 22.77° C., s.d. 0.13); R: gemiddelde 0.84° C., s.d. 0.46, N=591 (Tu 22.80° C., s.d. 0.16).

§3.4 De wachttijd en de temperatuurdrempel

Om te vermijden, dat de vis op een bepaald tijdsinterval en niet op de koeling zou gaan reageren, is de random wachttijd ingevoerd (§2.4). Het is echter denkbaar dat een dier na een lang verblijf bij de bovengrenstemperatuur alerter op het koelen van het water zou reageren dan na een korte wachttijd.

In de figuuren 3.4.1 zijn van enkele karakteristieke experimenten de wachttijd tegen de temperatuurdrempel uitgezet. In tabel 3.4.1 zijn de resultaten van de statistische analyse samengevat. Uit deze tabel

blijkt, dat de regressiecoëfficiënt niet significant van nul verschilt met uitzondering van drie metingen. Bij deze metingen kan nog juist van significantie gesproken worden. De regressiecoëfficiënt is echter zeer klein. Dit betekent, dat bij deze vissen invloed van t_w op de Td geen praktische betekenis heeft.

Concluderend kan het volgende gesteld worden. De invoering van de wachttijd voorkwam dat er tijdens de experimenten een 'tijddressuur' is opgetreden. De lengte wachttijd heeft binnen statistische grenzen geen invloed op de Td. Dit is een ondersteuning van de gedachte, dat de vis tijdens de experimenten overzwemt, omdat het water gekoeld wordt. Het koelen van het compartiment en niet de verblijftijd in dit comaprtiment conditioneert het gedrag.

Tabel 3.4.1 De invloed van de lengte van t_w (X) en op Td (Y)

vis	datum exp.	C[1]	regressielijn	P[2]	N
451	28-31/10/82	L	Y= 1.24 - 0.001 x X	0.300	664
451	28-31/10/82	R	Y= 1.67 + 0.003 x X	0.049*	698
478	16-18/02/83	L	Y= 1.45 - 0.001 x X	0.735	405
478	16-18/02/83	R	Y= 1.18 - 0.001 x X	0.507	402
478	24-26/04/83	L	Y= 1.15 - 0.003 x X	0.741	334
478	24-26/04/83	R	Y= 1.00 + 0.001 x X	0.954	338
480	22-29/09/82	L	Y= 0.98 + 0.003 x X	0.040*	423
480	22-29/09/82	R	Y= 0.97 + 0.001 x X	0.333	452
480	07-13/10/82	L	Y= 1.33 + 0.001 x X	0.897	214
480	07-13/10/82	R	Y= 0.64 + 0.002 x X	0.059	221
480	17-18/03/83	L	Y= 1.77 - 0.001 x X	0.498	672
480	17-18/03/83	R	Y= 1.43 + 0.002 x X	0.047*	676
489	14-19/11/82	L	Y= 1.87 + 0.001 x X	0.304	813
489	14-19/11/82	R	Y= 1.98 + 0.001 x X	0.463	810
500	01-04/05/83	L	Y= 1.91 + 0.001 x X	0.703	350
500	01-04/05/83	R	Y= 1.28 - 0.001 x X	0.689	331

[1] Compartiment: L(inks) en R(echts)

[2] P-waarde regressiecoëfficiënt. Met een asterisk (*) is aangegeven, dat de regressiecoëfficiënt significant ($P<0.05$) van nul verschilt.

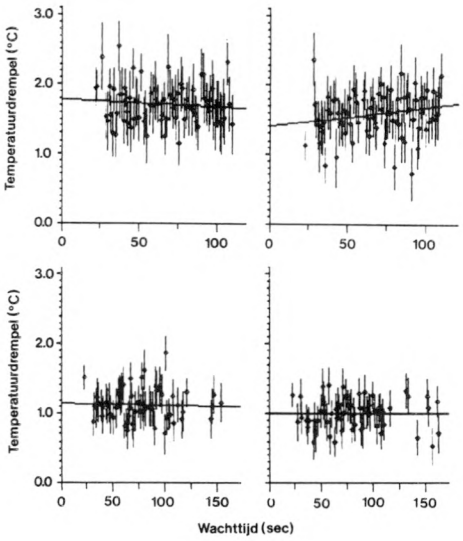


Fig. 3.4.1 Relatie wachttijd en temperatuurdrempel bij twee graskarpers: 480 (dd 17-18/03/83) en 478 (dd 24-26/04/83). L: linker compartiment; R: rechter compartiment. In de figuur is de gemiddelde Td met bijbehorende standaarddeviatie uitgezet en zijn de regressielijnen getekend.
De numerieke gegevens van de regressielijnen staan in tabel 3.4.1

§3.5 De bovengrenstemperatuur en de temperatuurdrempel

In §2.6 is uiteengezet, dat de bovengrenstemperatuur aan fluctuaties onderhevig was. In §3.2 is aannemelijk gemaakt, dat het effect van deze fluctuaties op de Td gering is.
Om de relatie tussen Tu en Td nader te onderzoeken zijn in fig 3.5.1 t/m 3.5.3 worden enkele karakteristieke frequentieverdelingen van Tu weergegeven. De Tu werd een fractie van een seconde voor het starten van de koeling gemeten. De klassebreedte van deze histogrammmen komt overeen met het meetnauwkeurigheid van de apparatuur, i.e. 0.1 °C. Uit deze histogrammen blijkt, dat Tu binnen een traject van ca 0.5 °C. fluctueerde en de frequentieverdeling het karakter heeft van een Gaussverdeling. Deze fluctuaties werden veroorzaakt door het regelsysteem waarmee de Tu constant gehouden werd. Wanneer het koelproces ingezet wordt op het moment dat het regelmechanisme voor de stabilisatie van de Tu in een fase was dat Tu daalde zal de koeling anders verlopen dan wanneer het stabilisatiemechanisme in een fase is wanneer Tu stijgt. Het is de vraag of deze effecten invloed gehad hebben op het gedrag van de vis, d.w.z. op de temperatuurdrempel. Verwacht mag worden, dat Td toeneemt het het hoger worden van de bovengrenstemperatuur.
Om dit te onderzoeken werd de Tu in kwartielen ingedeeld. Hiertoe werd deze meetwaarde op grootte gesorteerd en vervolgens ingedeeld in vier trajecten (kwartielen) met een gelijk aantal waarnemingen. Voor het eerste en het vierde kwartiel werden de bijbehorende gemiddelde

temperatuurdrempels berekend. Deze gemiddelde Td's zijn met elkaar vergeleken. De resultaten van dit onderzoek worden vermeld in tabel 3.5.1. Uit deze tabel blijkt, dat de twee gemiddelde temperatuurdrempels dertienmaal significant verschillen en in slechts drie gevallen er geen significant verschil is. Dit is een aanwijzing, dat er mogelijk een relatie is tussen Tu en Td. Met een regressie-analyse is dit aspect nader onderzocht. De resultaten worden vermeld in tabel 3.5.2 en in de figuur 3.5.1.

Uit deze resultaten blijkt, dat er een effect is van de Tu op de Td. In tien gevallen is er sprake van een significante regressie. Hierbij is de regressiecoëfficiënt achtmaal positief, d.w.z. een lage Tu gaat gepaard met een lage Td en een hoge Tu met een grootte Td. Tweemaal is de regressiecoëfficiënt negatief. In de figuur 3.5.2 is een karakteristiek voorbeeld gegeven.

Samenvattend: Er zijn duidelijke aanwijzingen, dat het gedrag van de vis beinvloed wordt door de momentane waarde van de omgevingstemperatuur op het moment waarop de koeling gestart wordt. De onvolkomenheden in de apparatuur waardoor Tu niet stabiel was, hebben duidelijk invloed gehad op het gedrag van de vis.

Tabel 3.5.1 De gemiddelde Td uit het eerste (1) en het vierde kwartiel (2) van Tu.

vis	datum exp.	C[1]	(1) Td	(1) s.d.	(1) N	(2) Td	(2) s.d.	(2) N	dT[2]	P[3]
451	28-31/10/82	L	1.26	0.73	179	1.16	0.65	180	-0.10	0.030*
451	28-31/10/82	R	2.13	0.92	183	1.80	0.75	184	-0.33	<0.001*
478	16-18/02/83	L	1.32	0.73	116	1.70	0.79	117	+0.38	<0.001*
478	16-18/02/83	R	0.87	0.63	115	1.33	0.56	116	-0.46	<0.001*
478	24-26/04/83	L	0.98	0.54	120	1.22	0.46	120	-0.24	<0.001*
478	24-26/04/83	R	1.07	0.54	120	1.07	0.50	121	0.00	0.865
480	22-29/09/82	L	1.29	0.77	136	1.26	0.88	136	+0.03	0.601
480	22-29/09/82	R	0.83	0.54	136	1.21	0.72	136	-0.38	<0.001*
480	07-13/10/82	L	1.30	0.61	134	1.41	0.56	134	-0.11	0.012*
480	07-13/10/82	R	0.63	0.36	135	1.09	0.64	135	-0.46	<0.001*
480	17-18/03/83	L	1.48	0.82	177	1.97	0.94	177	-0.39	<0.001*
480	17-18/03/83	R	1.52	0.75	174	1.75	0.97	174	-0.23	<0.001*
489	14-19/11/82	L	2.14	1.22	211	1.85	0.82	212	+0.29	<0.001*
489	14-19/11/82	R	2.05	0.86	212	2.12	0.81	213	-0.07	<0.001*
500	01-04/05/83	L	2.29	1.23	122	2.29	0.28	122	0.00	0.936
500	01-04/05/83	R	0.81	0.47	118	1.60	0.79	119	-0.79	<0.001*

[1] Compartiment: L(inks) of R(echts).

[2] Het verschil tussen de gemiddelde Td uit het eerste en tweede kwartiel.

[3] P-waarde verschil tussen de twee gemiddelden. Met een asterisk (*) is aangegeven of dit verschil significant (P<0.05) is.

Tabel 3.5.2 De invloed van de Tu (X) en op de Td (Y)

vis	datum exp.	C[1]	regressielijn	P[2]	N
451	28-31/10/82	L	Y= 10.35 - 0.461 x X	<0.001*	709
451	28-31/10/82	R	Y= 11.06 - 0.451 x X	0.001*	716
478	16-18/02/83	L	Y=-14.23 +0.782 x X	0.002*	457
478	16-18/02/83	R	Y=-18.50 +0.962 x X	0.001*	459
478	24-26/04/83	L	Y=- 5.12 +0.309 x X	0.031*	471
478	24-26/04/83	R	Y= 4.46 - 0.171 x X	0.670	474
480	22-29/09/82	L	Y= 12.99 - 0.587 x X	0.253	529
480	22-29/09/82	R	Y=- 8.87 +0.515 x X	0.025*	525
480	07-13/10/82	L	Y= 0.13 + 0.066 x X	0.626	527
480	07-13/10/82	R	Y=- 6.94 +0.412 x X	<0.001*	532
480	17-18/03/83	L	Y=-23.40 +0.995 x X	0.012*	700
480	17-18/03/83	R	Y=- 4.76 +0.251 x X	0.207	684
489	14-19/11/82	L	Y= 11.84 - 0.496 x X	0.019*	811
489	14-19/11/82	R	Y= 0.33 + 0.086 x X	0.190	827
500	01-04/05/83	L	Y= 11.60 - 0.479 x X	0.701	474
500	01-04/05/83	R	Y=-24.95 +1.282 x X	<0.001*	470

[1] Compartiment: L(inks) en R(echts)

[2] P-waarde regressiecoëfficiënt. De asterisk (*) betekent, dat de regressiecoëfficiënt significant van nul verschilt.

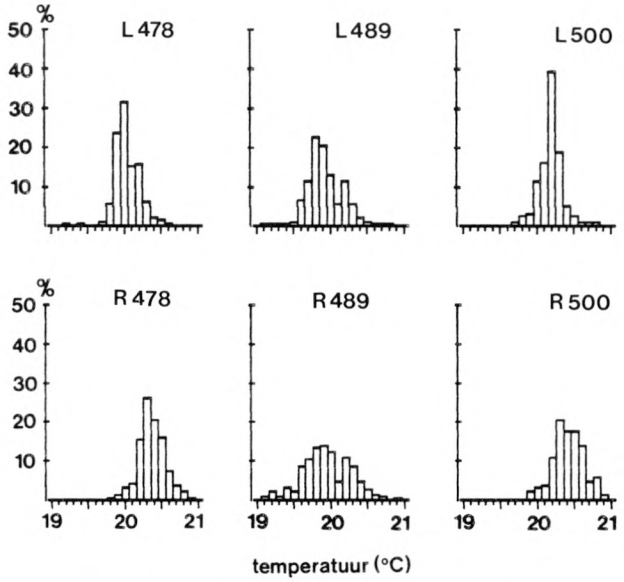


Fig. 3.5.1 Frequentiehistogrammen van de Tu (°C.) in het linker (L) en rechter compartiment (R) tijdens verschillende experimenten. De klassebreedte is 0.1° Celsius. De verdeling heeft een Gaussisch karakter. Bij elk histogram is het nummer van de vis weergegeven. 478: dd 16-18/02/83, L: gemiddelde 20.04° C., s.d. 0.16, N=473; R: gemiddelde 20.36° C., s.d. 0.18, N=468. 489 dd 14-19/11/82, L: gemiddelde 19.92° C., s.d. 0.23, N=830; R: gemiddelde 19.93° C., s.d. 0.32, N=847. 500 dd 01-04/05/83, L: gemiddelde 20.18° C., s.d. 0.16, N=490; R: gemiddelde 20.41° C., s.d. 0.21, N=486.

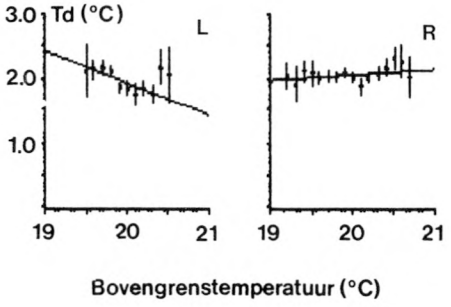


Fig. 3.5.2 De relatie tussen Tu en Td in het linker (L) en rechter (R) compartiment bij vis 489 d.d. 14-19/11/82. In beide grafieken zijn de regressielijnen getekend. L: Y=11.81 - 0.496 x X, N=811, de regressiecoëfficiënt verschilt significant van nul (P=0.019). R: Y=0.33 + 0.086 x X, N=827, deze regressiecoëfficiënt verschilt niet significant van nul (P=0.190).

§3.6 Het effect van het temperatuursverschil tussen beide compartimenten op het moment van overzwemmen en de daarop volgende temperatuurdrempel.

Naast de temperatuur in het compartiment is ook het temperatuursverschil tussen de compartimenten op het moment van overzwemmen van belang. Hoewel het opwarmen van een compartiment snel verliep, kon het voorkomen, dat de aankomsttemperatuur in het 'nieuwe' compartiment lager was dan Tu. In de figuur 3.6.1 worden de frequentieverdelingen van het temperatuursverschil op het moment van overzwemmen gegeven. Meestal is er een positief verschil, d.w.z. de aankomsttemperatuur is hoger dan de vertrektemperatuur.
Komt de vis tijdens het uitvoeren van thermogedrag in een kouder compartiment terecht, dan kan het dier terugzwemmen of blijven. Als het thermogedrag gebaseerd is op een 'escape'reactie (zie §1.6 en §3.1) zal het dier na een kort verblijf terugkeren naar het andere relatief nog warmere compartiment. Wanneer het dier onder deze omstandigheden ***niet*** terugzwemt, betekent dit, dat de vis 'weet' dat de temperatuur in het nu te koude compartiment aan het stijgen is. Als de vis binnen 15 seconden terugzwom, werd dit als een 'escape'reactie beschouwd. In tabel 3.6.1 wordt een overzicht van de resultaten van deze analyse gegeven. Het blijkt dat de vis vrijwel niet terugzwemt naar het andere compartiment. Gesommeerd over alle experimenten uit tabel 3.6.1 komt deze situatie 1081 maal voor, waarbij er 65 'escape'reacties zijn (dit is 6%). Dit resultaat maakt het minder waarschijnlijk, dat het thermogedrag gebaseerd is op een eenvoudige 'escape'reactie.

Heeft een voorafgaand negatief temperatuursverschil invloed op de temperatuurdrempel? Bij een kleine Td is de kans op een 'koud bad' groter. Volgens de 'escape' opvatting, zal de vis om herhaling te vermijden bij een hogere temperatuurdrempel overzwemmen. Om dit te onderzoeken is de gemiddelde Td bij een negatief en een positief temperatuursverschil berekend. In tabel 3.6.2 zijn de resulaten weergegeven. Het blijkt, dat er negenmaal een significant verschil is. Zevenmaal is de gemiddelde Td volgend op een negatief verschil groter. Tweemaal is dit gemiddelde kleiner dan als er een positief verschil was. Dit is een aanwijzing, dat het voorafgaand temperatuursverschil invloed kan hebben op de temperatuurdrempel. Met regressie-analyse is de relatie voorafgaand temperatuursverschil en de temperatuurdrempel nader onderzocht (tabel 3.6.3). In tien gevallen is er een significante regressie. Dit betekent dat er een effect van het temperatuursverschil op de Td is. Dit effect is echter niet éénduidig: de regressiecoëfficiënt is viermaal positief en zesmaal negatief. Opmerkelijk is, dat bij vis 500 de regressiecoëfficiënt in het ene compartiment positief en in het andere negatief is.

Concluderend kan gesteld worden, dat het gedrag van de vis waarschijnlijk niet gebasserd is op een 'escape'reactie. Uit de analyse blijkt dat er te weinig reacties zijn, die op een echt 'escape'gedrag wijzen (tabel 3.6.1). We kunnen echter niet uitsluiten 'escape'reactie een rol speelt. Om hierover meer uitsluitsel te verkrijgen zijn in §3.12 andere experimenten uitgevoerd.
Het teken van het voorafgaand temperatuursverschil heeft invloed op de temperatuurdrempel. Als dit verschil negatief is, is er een tendens dat de volgende temperatuurdrempel groter is.

Tabel 3.6.1 De 'escape'reacties en het thermogedrag, nadat de vis na het uitvoeren van thermogedrag in een te koud compartiment terecht gekomen is.

vis	datum exp.	C[1]	terug[2]	tg[3]	C[1]	terug[2]	tg[3]
451	28-31/10/82	L	2	19	R	1	111
478	16-18/02/83	L	2	69	R	2	14
478	24-26/04/83	L	2	45	R	3	35
480	22-29/09/82	L	3	24	R	10	128
480	07-13/10/82	L	5	33	R	4	109
480	17-18/03/83	L	5	85	R	6	72
489	14-19/11/82	L	0	83	R	13	65
500	01-04/05/83	L	2	104	R	5	20

[1] Compartiment: L(inks) en R(echts)
[2] Aantal malen dat de vis binnen 15 seconden terug zwemt ('escape' reactie).
[3] Aantal malen dat de vis in het compartiment blijft en voert na het starten van het koelen een thermogedrag (tg) uit.

Tabel 3.6.2 De gemiddelde Td als vorig temp.verschil <0 en als vorig temp.verschil >0.

vis	datum exp.	C[1]	Tv<0 gemiddelde	s.d.	N	Tv>0 gemiddelde	s.d.	N	P[2]
451	28-31/10/82	L	1.42	0.74	19	1.14	0.69	694	0.082
451	28-31/10/82	R	2.18	0.97	125	1.85	0.83	599	>0.001*
478	16-18/02/83	L	1.59	0.92	75	1.46	0.71	383	0.169
478	16-18/02/83	R	0.80	0.41	21	1.11	0.59	438	0.018*
478	24-26/04/83	L	0.99	0.61	52	1.18	0.55	408	0.021*
478	24-26/04/83	R	1.14	0.56	46	0.99	0.50	429	0.057
480	22-29/09/82	L	1.71	0.90	46	1.20	0.76	495	<0.001*
480	22-29/09/82	R	1.16	0.68	160	0.96	0.61	365	0.001*
480	07-13/10/82	L	1.68	0.60	39	1.41	0.63	495	0.010*
480	07-13/10/82	R	1.11	0.61	126	0.79	0.49	410	<0.001*
480	17-18/03/83	L	1.86	0.87	99	1.68	0.91	601	0.067
480	17-18/03/83	R	1.56	0.80	80	1.57	0.84	600	0.920
489	14-19/11/82	L	2.51	1.26	97	1.89	1.02	738	<0.001*
489	14-19/11/82	R	2.10	0.81	72	2.05	0.80	762	0.613
500	01-04/05/83	L	2.73	1.15	122	1.74	1.12	362	<0.001*
500	01-04/05/83	R	1.07	0.55	21	1.24	0.73	443	0.293

[1] Compartiment: L(inks) en R(echts)

[2] P-waarde verschil tussen de twee gemiddelden. Met een asterisk (*) is aangegeven, of dit verschil significant (P<0.05) is.

Tabel 3.6.3 De relatie tussen het voorafgaand temperatuursverschil (X) en de temperatuurdrempel (Y).

vis	datum exp.	C[1]	regressielijn	P[2]	N
451	28-31/10/82	L	Y= 0.71 + 0.213 x X	<0.001*	657
451	28-31/10/82	R	Y= 1.82 - 0.006 x X	0.924	633
478	16-18/02/83	L	Y= 1.22 + 0.182 x X	0.010*	406
478	16-18/02/83	R	Y= 0.77 + 0.190 x X	0.001*	401
478	24-26/04/83	L	Y= 1.01 + 0.165 x X	0.002*	426
478	24-26/04/83	R	Y= 0.89 + 0.102 x X	0.106	430
480	22-29/09/82	L	Y= 1.29 - 0.050 x X	0.364	464
480	22-29/09/82	R	Y= 1.04 - 0.056 x X	0.043*	489
480	07-13/10/82	L	Y= 1.70 - 0.147 x X	<0.001*	487
480	07-13/10/82	R	Y= 0.91 - 0.143 x X	0.015*	435
480	17-18/03/83	L	Y= 1.61 + 0.039 x X	0.332	651
480	17-18/03/83	R	Y= 1.50 + 0.046 x X	0.203	620
489	14-19/11/82	L	Y= 1.74 + 0.069 x X	0.170	763
489	14-19/11/82	R	Y= 1.81 + 0.127 x X	<0.001*	805
500	01-04/05/83	L	Y= 2.03 - 0.217 x X	<0.001*	382
500	01-04/05/83	R	Y= 1.10 + 0.065 x X	0.012*	435

[1] Compartiment: L(inks) en R(echts)

[2] P-waarde regressiecoëfficiënt. Met een asterisk (*) is aangegeven, of de regressiecoëfficiënt significant (P<0.05) van nul verschilt.

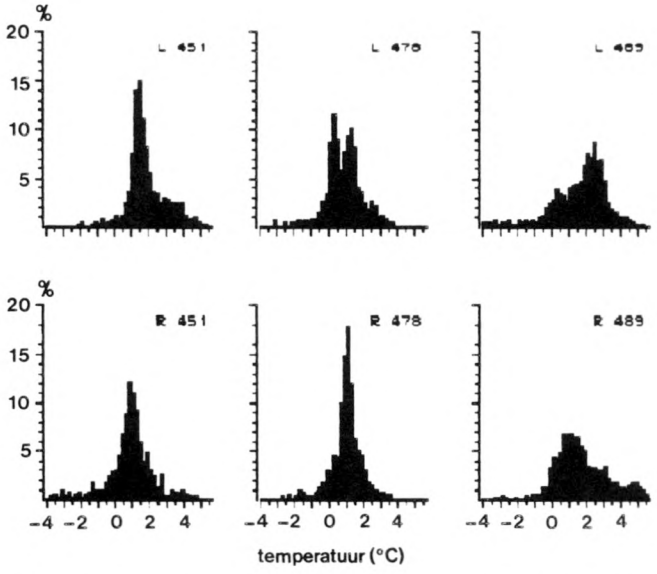


Fig. 3.6.1 Frequentiehistogrammen van het temperatuursverschil tussen de beide compartimenten op het moment van overzwemmen tijdens verschillende experimenten. De klassebreedte is 0.2° Celsius. In deze histogrammen is te zien dat de het temperatuursverschil overwegend positief maar soms negatief is. Dit laatste betekent, dat de vis na het overzwemmen in een kouder compartiment terecht gekomen is.
Als de vis na het overzwemmen in het linker resp. rechter compartiment terecht komt is dit aangegeven met de letter L resp. R. Bij elk histogram is het nummer van de vis weergegeven. 451: dd 28-31/10/82, L: gemiddelde 1.82° C., s.d. 1.06, N=717; R: gemiddelde 0.83° C., s.d. 1.27, N=727. 478 dd 24-26/04/83, L: gemiddelde 0.86° C., s.d. 0.95, N=479; R: gemiddelde 0.95° C., s.d. 0.84, N=481. 489 dd 14-19/11/82, L: gemiddelde 1.66° C., s.d. 1.44, N=840; R: gemiddelde 1.67° C., s.d. 1.50, N=842.

§3.7 De tijd en de temperatuurdrempel

De opstelling is oorspronkelijk niet bedoeld voor het onderzoek naar circadiane ritmen bij vissen. Omdat de omstandigheden overdag anders waren dan 's nachts (geen verlichting, geen geluiden uit omringende vertrekken etc.), is nagegaan of het thermogedrag van de vis overdag anders is dan 's nachts. Voor deze analyse zijn gegevens van experimenten, die zich over meerdere dagen uitstrekten, samengevoegd en is de gemiddelde temperatuurdrempel voor elk uur van het etmaal

berekend. In figuur 3.7.1 is deze gemiddelde temperatuurdrempel met bijbehorende standaarddeviatie van twee karakteristieke experimenten uitgezet tegen de actuele tijd. Er is een verschil in het verloop van de gemiddelde temperatuurdrempel tussen beide compartimenten. Uit deze figuur blijkt tevens, dat de standaarddeviatie in de periode van 10 uur 's morgens tot 4 uur 's middags groot is en deze in de periode van 9 uur 's avonds tot 4 uur 's morgens klein is. Dit is een aanwijzing, dat het tijdstip van de dag inderdaad een rol speelt bij het thermogedrag. Over beide perioden is de gemiddelde Td met bijbehorende standaarddeviatie berekend en is getest of deze significant van elkaar te verschillen (tabel 3.7.1). De gemiddelde Td blijkt bij zeven compartimenten significant te verschillen: driemaal is de drempel overdag groter en viermaal is de drempel kleiner dan 's nachts. Een meer éénduidig beeld levert de vergelijking met de varianties op. In alle gevallen is deze statistische parameter 's nachts significant kleiner dan overdag.
Op dezelfde wijze is nagegaan of het thermogedrag tussen 5 en 9 uur 's morgens significant verschillend is van het gedrag tussen 5 en 9 uur 's avonds. De resultaten zijn in tabel 3.7.2 vermeld. In drie gevallen is er een significant verschil tussen de temperatuurdrempels. De varianties zijn echter niet significant verschillend.

Samenvattend: Er is een relatie tussen het moment van de dag en het thermogedrag. 's Nachts blijkt de variantie van de gemiddelde Td kleiner te zijn dan overdag. Dit is een aanwijzing, dat externe faktoren het thermogedrag beinvloeden.

Tabel 3.7.1 Het moment van de dag en de Td

	C[1]	9 t/m 10 uur Td	s.d.	N	22 t/m 4 uur Td	s.d.	N	P_{Td}[2]	P_{var}[3]
451 28-31/10/82	L	1.27	1.64	133	1.09	0.79	253	0.144	<0.001*
451 28-31/10/82	R	2.17	2.07	141	1.89	1.01	255	0.068	<0.001*
478 16-18/02/83	L	1.45	1.39	127	1.33	0.45	153	0.314	<0.001*
478 16-18/02/83	R	0.85	1.23	127	1.25	0.45	152	<0.001*	<0.001*
478 24-26/04/83	L	1.17	1.33	84	1.21	0.82	175	0.723	<0.001*
478 24-26/04/83	R	1.23	1.35	82	0.93	0.39	176	0.017*	<0.001*
480 22-29/09/82	L	0.95	2.04	93	1.43	1.20	191	0.013*	<0.001*
480 22-29/09/82	R	0.86	1.60	94	1.10	0.94	190	0.117	<0.001*
480 07-13/10/82	L	1.25	1.98	62	1.49	1.17	219	0.254	<0.001*
480 07-13/10/82	R	1.03	1.62	65	0.79	0.80	228	0.106	<0.001*
480 17-18/03/83	L	1.47	1.97	163	1.81	0.97	209	0.031*	<0.001*
480 17-18/03/83	R	1.29	1.87	159	1.81	0.93	205	<0.001*	<0.001*
489 14-19/11/82	L	2.61	3.05	144	1.58	1.09	317	<0.001*	<0.001*
489 14-19/11/82	R	2.01	1.95	145	2.05	0.95	322	0.734	<0.001*
500 01-04/05/83	L	2.61	3.71	67	1.70	1.99	203	0.011*	<0.001*
500 01-04/05/83	R	1.25	1.99	63	1.10	1.02	197	0.437	<0.001*

[1] Compartiment: (L)inks en (R)echts.
[2] P-waarde verschil tussen de twee gemiddelde temperatuurdrempels.
[3] P-waarde verschil in variantie tussen de twee populaties.

Tabel 3.7.2 Het moment van de dag en de Td

		5 t/m 10 uur			17 t/m 21 uur				
	C[1]	Td	s.d.	N	Td	s.d.	N	P_{Td}[2]	P_{var}[3]
451 28-31/10/82	L	1.08	1.41	176	1.19	1.40	156	0.504	0.492
451 28-31/10/82	R	1.69	1.83	176	1.95	1.77	163	0.174	0.345
478 16-18/02/83	L	1.86	2.05	77	1.35	1.81	108	0.081	0.123
478 16-18/02/83	R	1.45	1.69	77	0.95	1.51	107	0.038*	0.139
478 24-26/04/83	L	1.14	1.25	96	1.08	1.26	125	0.712	0.532
478 24-26/04/83	R	1.05	1.15	95	0.91	1.15	128	0.404	0.540
480 22-29/09/82	L	1.09	1.63	131	1.31	1.61	129	0.279	0.448
480 22-29/09/82	R	1.05	1.28	138	0.99	1.28	122	0.715	0.504
480 07-13/10/82	L	1.33	1.25	147	1.57	1.26	108	0.132	0.553
480 07-13/10/82	R	0.85	1.03	145	0.95	1.05	102	0.499	0.557
480 17-18/03/83	L	1.76	2.02	146	1.75	2.02	191	0.957	0.494
480 17-18/03/83	R	1.83	1.91	146	1.37	1.89	186	0.032*	0.434
489 14-19/11/82	L	2.01	2.17	208	2.06	2.17	177	0.834	0.518
489 14-19/11/82	R	1.97	1.63	208	2.12	1.63	175	0.375	0.514
500 01-04/05/83	L	2.51	2.68	119	1.54	2.63	101	0.007*	0.420
500 01-04/05/83	R	1.26	1.49	101	1.43	1.55	101	0.389	0.657

[1] Compartiment: (L)inks en (R)echts.
[2] P-waarde verschil tussen de twee gemiddelde temperatuurdrempels.
[3] P-waarde verschil in variantie tussen de twee populaties.

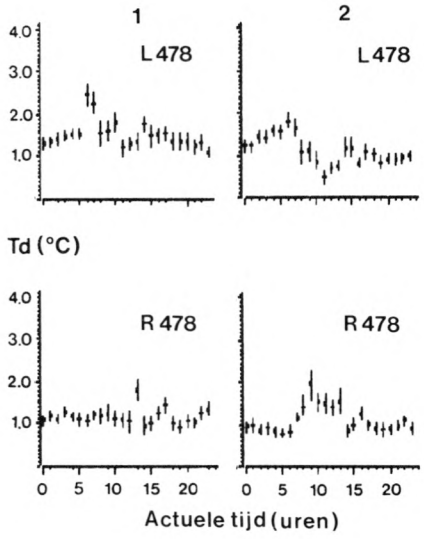


Fig. 3.7.1 De relatie tussen de actuele tijd en de Td. In de grafiek is de gemiddeld Td met bijbehorende s.d. van de per uur 'gepoolde' temperatuurdrempels weergegeven tijdens twee experimenten (1 en 2) met vis 478 (dd 16-18/02/1983 resp. 24-26/04/1983). L: linker compartiment. R: rechter compartiment.

§3.8 De invloed van de vorige temperatuurdrempel op de momentane drempel.

Bij een lage temperatuurdrempel zal het andere compartiment niet of nauwelijks zijn opgewarmd. Dit heeft tot gevolg, dat de vis in geringe mate 'beloond' wordt en in een uiterst geval zelfs 'gestraft' als de vertrektemperatuur hoger is dan de aankomsttemperatuur. In de omgekeerde situatie (grote Td) zal vrijwel altijd leiden tot een grote 'beloning'. (Een overeenkomstige benadering is gebruikt in §3.6 bij de analyse van de invloed van het voorafgaande temperatuursverschil op de Td.) Als de vis gebruik maakt van deze kennis, wordt de Td beinvloed door de voorafgaande Td. In figuur 3.8.1 wordt voor twee vissen de relatie tussen de voorafgaande Td en de Td weergegeven. De resultaten van de regressie-analyse worden samengevat in tabel 3.8.1. Bij 10 van de 16 compartimenten blijkt, dat met het toenemen van de voorafgaande Td de Td ook toeneemt. Bij 3 compartimenten wordt de Td kleiner dan de voorafgaande. De overige regressiecoëfficiënten verschillen niet significant van nul.

Concluderend kan gesteld worden dat er een relatie is tussen Td en de voorafgaande Td. Het teken van de regressiecoëfficiënt is overwegend positief. Dit betekent, dat als de vorige temperatuurdrempel groot er een duidelijke kans is dat ook de erop volgende drempel groot is, maar ook het omgekeerde (negatieve coëfficiënt) komt voor. Mogelijk is het thermogedrag afgestemd op de mate van beloning c.q. straf (te koud compartiment). Een andere verklaring voor deze resultaten is dat het

gedrag wordt het beinvloed door stemmingsfluctuaties van de vis. De positieve regressiecoëfficiënt geeft aan, dat de vis gedurende een deel van de experimentele periode minder aandacht schenkt aan temperatuursveranderingen. De negatieve regressiecoëfficiënt kan verklaard worden met een toenemende belangstelling voor de omgevingstemperatuur. In §3.9 (lopend gemiddelde) wordt op deze resultaten teruggekomen.

Tabel 3.8.1 De invloed van de vorige Td (X) op de momentane Td (Y)

vis	datum exp.	C[1]	regressielijn	P[2]	N
451	28-31/10/82	L	Y= 0.76 +0.195 x X	<0.001*	587
451	28-31/10/82	R	Y= 1.54 +0.285 x X	<0.001*	664
478	16-18/02/83	L	Y= 1.09 +0.285 x X	<0.001*	404
478	16-18/02/83	R	Y= 0.62 +0.345 x X	<0.001*	398
478	24-26/04/83	L	Y= 0.94 +0.189 x X	0.025*	387
478	24-26/04/83	R	Y= 0.81 +0.156 x X	0.029*	405
480	22-29/09/82	L	Y= 1.28 +0.006 x X	0.953	344
480	22-29/09/82	R	Y= 1.06 +0.005 x X	0.925	364
480	07-13/10/82	L	Y= 1.69 -0.244 x X	0.011*	403
480	07-13/10/82	R	Y= 1.12 -0.191 x X	0.002*	409
480	17-18/03/83	L	Y= 1.34 +0.217 x X	0.001*	584
480	17-18/03/83	R	Y= 1.37 +0.125 x X	0.012*	607
489	14-19/11/82	L	Y= 1.40 +0.271 x X	0.005*	761
489	14-19/11/82	R	Y= 1.70 +0.164 x X	<0.001*	735
500	01-04/05/83	L	Y= 2.35 -0.296 x X	0.020*	393
500	01-04/05/83	R	Y= 1.09 +0.068 x X	0.102	360

[1] Compartiment: L(inks) en R(echts)

[2] P-waarde van de regressiecoëfficiënt. Met een asterisk (*) is aangegeven, dat de regressiecoëfficiënt significant van nul verschilt.

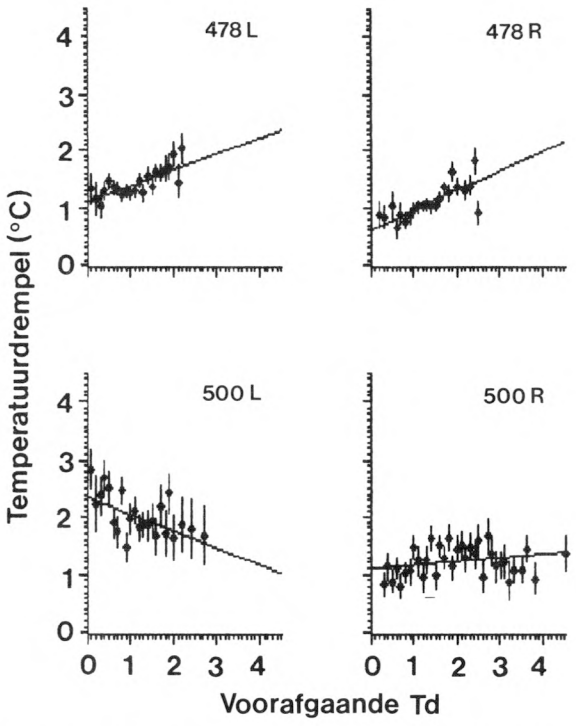


Fig. 3.8.1 De relatie tussen de voorafgaande en momentane Td in het linker (L) en rechter (R) compartiment bij vis 478 en 500 (dd 16-18/02/83. resp. 01-04/05/83). In de grafieken zijn de regressielijnen getekend. 478 L: Y=1.09 + 0.285 x X, N=404, de regressiecoëfficiënt verschilt significant van nul (P<0.001). 478 R: Y=0.62 + 0.345 x X, N=398, deze regressiecoëfficiënt verschilt significant van nul (P<0.001). 500 L: Y=2.35 - 0.296 x X, N=393, de regressiecoëfficiënt verschilt significant van nul (P=0.020). 500 R: Y=1.09 + 0.068 x X, N=360, deze regressiecoëfficiënt verschilt niet significant van nul (P=0.102).

§3.9 Het lopend gemiddelde van de temperatuurdrempel

Om éénmalige uitschieters in de numerieke waarde van Td af te vlakken is het lopend gemiddelde over tien opeenvolgende Td's berekend. Met deze analyse-methode kunnen langdurige fluctuaties in de gevoeligheid van de vis onderzocht worden. Drie karakteristieke voorbeelden zijn

weergegeven in fig. 3.9.1 t/m 3.9.3. Elk punt in de grafiek representeert een gemiddelde waarde van Td over een periode van ca 1 uur. In de figuren is een tijdschaal getekend. In fig. 3.9.1 is het verloop in de gemiddelde Td van het rechter en linker compartiment overeenkomstig. De Td neemt in beide compartimenten toe en daalt vervolgens weer, zoals in fig. 3.9.2 te zien is (tijdvakken I en II). Dit is een indicatie, dat de stemming van de vis over een langer tijdsbestek bezien kan varieren. Wanneer de vis in korte tijd tot een hogere temperatuurdrempel overgaat en vervolgens de Td langzaam laat dalen resulteert dit in een negatieve regressiecoefficient tussen Td en de volgende Td. Een geleidelijke stijging en een snelle daling van de Td zal leiden tot een positieve regressiecoefficient (§3.8). In fig. 3.9.2 (tijdvak II) is te zien, dat de overeenkomst tussen het linker en rechter compartiment behouden blijft ook als de standaarddeviaties betrekkelijk groot zijn. In fig. 3.9.2 (tijdvak II) en 3.9.3 is er nauwelijks overeenkomst tussen de Td's van beide compartimenten. De grotere fluctuatie in het linker compartiment heeft een andere oorzaak en zou b.v. het gevolg kunnen zijn van de brede verdeling van het temperatuursverschil op het moment van overzwemmen (§3.6). In deze figuren is uit het verloop van de standaarddeviaties af te leiden, dat in de nachtelijke uren het gedrag stabieler is dan overdag.
Bij gecondiontioneerd gedrag treedt habituatie op. Dit is een langzaam verminderende belangstelling voor de experimentele prikkel. Tijdens de experimentele periode is over het geheel beschouwd geen stijgende tendens in het verloop van de temperatuurdrempel. Met andere woorden er is geen habituatie opgetreden. Ook dit is een aanwijzing, dat het thermogedrag niet gebaseerd is een aangeleerd gedrag, maar onderdeel is van het natuurlijke gedrag van de vis.

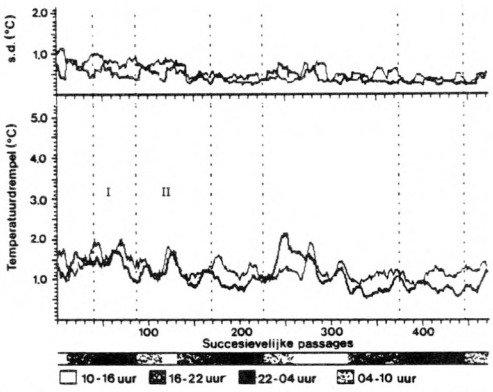


Fig. 3.9.1 Het lopend gemiddelde over 10 opeenvolgende temperatuurdrempels. Vis 478 d.d. 24-26/04/1983. In het bovenste deel van de grafiek is de standaarddeviatie weergegeven. De vette lijn geeft het verloop in het rechter en de magere lijn het verloop in het linker compartiment. De verticale lijnen markeren het begin en het einde van de nachtperiode. In twee tijdvakken, aangegeven met I en II, is het verloop van de Td in beide compartimenten vrijwel identiek.

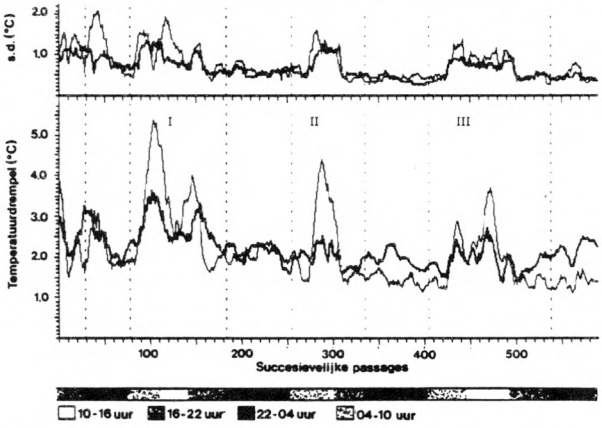


Fig. 3.9.2 Het lopend gemiddelde over 10 opeenvolgende temperatuurdrempels. Vis 489 d.d. 14-19/11/1982. In het bovenste deel van de grafiek is de standaarddeviatie weergegeven. De vette lijn geeft het verloop in het rechter en de magere lijn het verloop in het linker compartiment. De verticale lijnen markeren het begin dan wel het einde van de nacht periode. In tijdvakken I en III neemt de gemiddelde Td eerst in beide compartimenten toe en daalt vervolgens. Het verloop van de gemiddelde Td in tijdvak II is in het linker compartiment anders dan in het rechter.

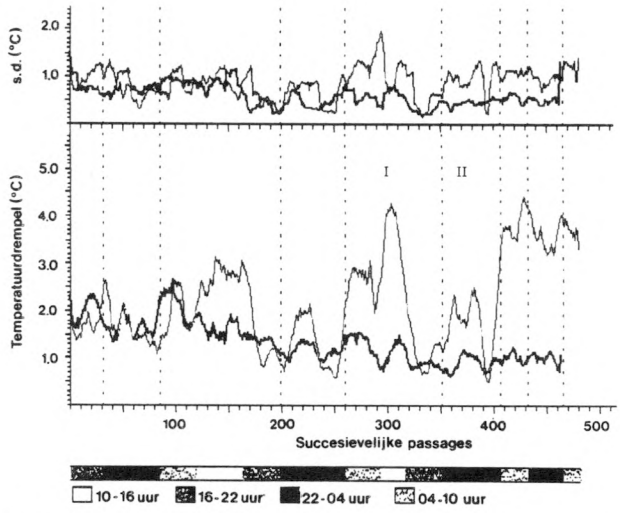


Fig. 3.9.3 Het lopend gemiddelde over 10 opeenvolgende temperatuurdrempels. Vis 500 d.d. 01-04/05/1983. In het bovenste deel van de grafiek is de standaarddeviatie weergegeven. De vette lijn geeft het verloop in het rechter en de magere lijn het verloop in het linker compartiment. De verticale lijnen markeren het begin dan wel het einde van de nacht periode. Het verloop van de gemiddelde Td in de tijdvakken I en II is in het linker compartiment anders dan in het rechter.

§3.10 De relatie tussen de temperatuurdrempel en de reactietijd

De tijd, die verloopt tussen het starten van de koeling en het vertrek van de vis uit het compartiment, wordt aangeduid met de reactietijd. In figuur 3.10.1 zijn de histogrammen van reactietijden bij enkele vissen weergegeven. Deze verdelingen vertonen, zoals te verwachten overeenkomsten met die van de Td.

Het verschil in het thermogedrag in beide compartimenten is aanleiding geweest om de relatie tussen de reactietijd en de bijbehorende temperatuurdrempel nader te analyseren. In figuur 3.10.2 zijn alle beschikbare waarnemingen uit een compartiment in een grafiek weergegeven worden: er is geen linear verband tussen de temperatuurdrempel en de reactietijd. Dit is in overeenstemming met de bevindingen uit §2.6, waarbij de relatie onderzocht is tussen de momentane temperatuur en de tijd waarover het compartiment gekoeld wordt.

De eerste 1.5 tot 2° C. van het koelproces verlopen echter wel linear (figuur 3.10.3). Opmerkelijk is dat de regressielijn niet door de oorsprong gaat. Er is dus een minimale tijd (integratietijd, t_I)

nodig, voordat de vis overzwemt (tabel 3.10.1). Bij alle onderzochte vissen is de regressiecoëfficiënt significant. De gemiddelde t_I over alle vissen uit tabel 3.10.1 is 17.2 seconden met een s.d. van 5.0. Bij het experiment met vis 480 dd 17-18/03/83 was de Tu 25° C. en niet zoals bij alle overige experimenten 20° C. Laten we de experimenten met deze vis weg dan wordt de gemiddelde t_I kleiner: 15.9 seconden met een s.d. van 3.6. Dit is een aanwijzing dat een hogere Tu de t_I mogelijk verlengd.

Concluderend kan gesteld worden, dat vissen een minimale reactietijd nodig hebben om over te zwemmen. Deze reactietijd kan niet verklaard worden met de ruis in de Tu. Verschillen tussen de compartimenten konden niet worden aangetoond.

Tabel 3.10.1 Samenvatting regressie-analyse Td - t_I

vis	datum exp.	C[1]	Regressielijn	P[2]	N	t_I[3]
451	28-31/10/82	L	Y=12.5 +78.91 x X	<0.001*	227	12.5
451	28-31/10/82	R	Y=17.2 +57.82 x X	<0.001*	284	17.2
478	16-18/02/83	L	Y=17.9 +48.29 x X	<0.001*	297	17.9
478	16-18/02/83	R	Y=23.8 +66.90 x X	<0.001*	239	23.8
478	24-26/04/83	L	Y=19.5 +84.73 x X	<0.001*	463	19.5
478	24-26/04/83	R	Y=13.1 +91.70 x X	<0.001*	418	13.1
480	22-29/09/82	L	Y=21.9 +148.52 x X	<0.001*	179	21.9
480	22-29/09/82	R	Y=20.6 +153.33 x X	<0.001*	218	20.6
480	07-13/10/82	L	Y=14.7 +69.01 x X	<0.001*	188	14.7
480	07-13/10/82	R	Y=15.1 +135.40 x X	<0.001*	390	15.1
480	17-18/03/83	L	Y=23.3 +36.47 x X	<0.001*	101	23.3
480	17-18/03/83	R	Y=29.1 +48.16 x X	<0.001*	141	29.1
489	14-19/11/82	L	Y=18.8 +63.15 x X	<0.001*	133	15.8
489	14-19/11/82	R	Y=15.7 +39.70 x X	<0.001*	179	15.7
500	01-04/05/83	L	Y= 9.1 +79.64 x X	<0.001*	107	9.1
500	01-04/05/83	R	Y=14.2 +67.49 x X	<0.001*	124	14.2

[1] Compartiment: L(inks) of R(echts)
[2] P-waarde regressiecoëfficiënt. Met een asterisk (*) is aangegeven, dat de regressiecoëfficiënt significant van nul verschilt.
[3] Integratietijd (seconden)

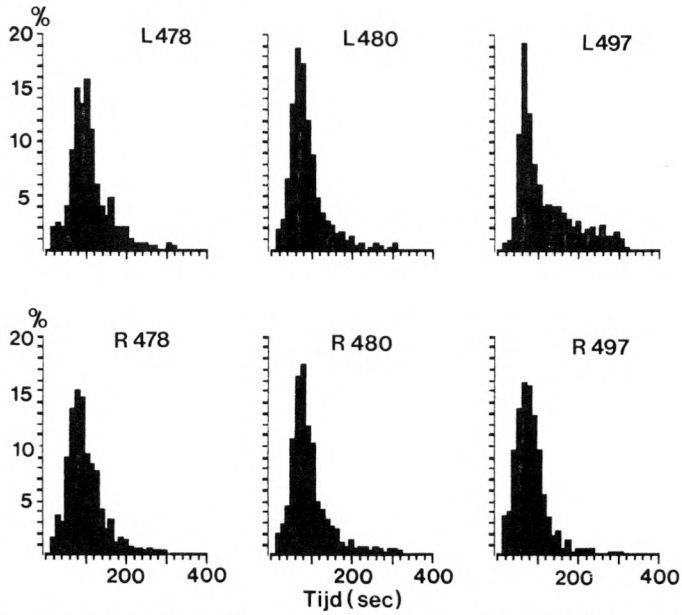


Fig. 3.10.1 Frequentiehistogrammen van de reactietijden. De klassebreedte is 15 sec.. De verdeling heeft een Gaussisch karakter. Bij elk histogram wordt het nummer van de vis en het compartiment (L resp. R) vermeld. 478 graskarper dd 24-26/04/83, L: gemiddelde 115.7 sec., s.d. 56.4, N=490; R: gemiddelde 104.7, s.d. 54.6, N=487. 480 graskarper 17-18/03/83, L: gemiddelde 91.9 sec., s.d. 53.5, N=717; R: gemiddelde 102.7 sec., s.d. 63.7, N=708. 497 graskarper dd 17-19/06/83, L: gemiddelde 130.7 sec., s.d. 85.7, N=675; R: gemiddelde 84.9 sec., s.d. 48.7, N=721.

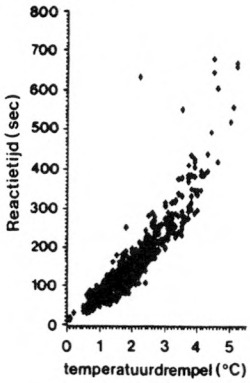


Fig. 3.10.2 De relatie tussen de Td en de koeltijd bij vis 451, dd 28-31/10/82, rechter compartiment. In deze figuur is goed te zien dat deze relatie niet linear is. Bij Td>2° C. neemt de reactietijd sneller toe dan Td.

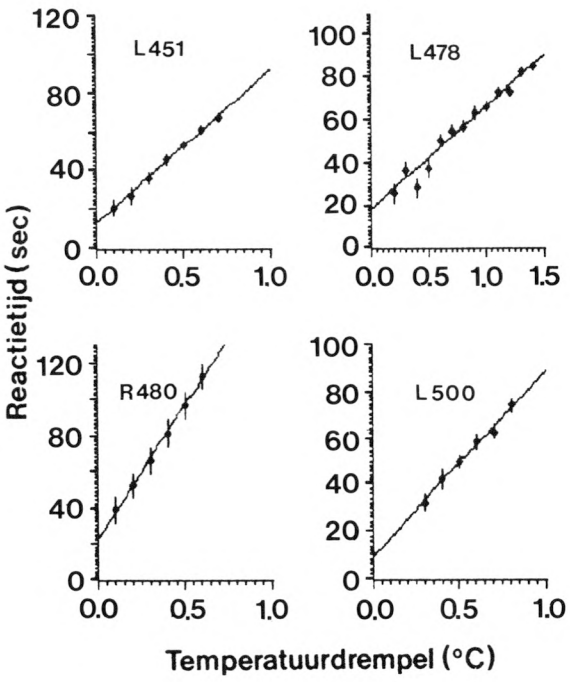


Fig. 3.10.3 De relatie tussen Td en de reactietijd bij verschillende vissen. L: linker compartiment, R: rechter compartiment. In de grafieken zijn de regressielijnen getekend. De numerieke gegevens van deze regressielijnen staan in tabel 3.10.1.

§3.11 Het spontaan gedrag

Bij de voorafgaande analyses is het spontaan gedrag buiten beschouwing gebleven. Het spontaan gedrag is gedefinieerd als het overzwemmen van de vis zonder dat hieraan het koelen van het compartiment voorafgegaan is. Uiteraard komt het dier na een spontane passage in in een koudere omgeving terecht. Dit spontane gedrag kan ontstaan doordat de vis tijdelijk een verminderde belangstelling heeft voor de omgevingstemperatuur. Een andere mogelijke oorzaak is, dat de vis naar aanleiding van toevallige fluctuaties in Tu in de veronderstelling verkeerde dat de temperatuur aan het dalen was. In het laatste geval is er sprake van een 'vergissing' en mag verwacht worden, dat de vis anders zal reageren dan tijdens thermogedrag.

Om de invloed van fluctuaties in Tu op het ontstaan van spontaan gedrag te onderzoeken is de temperatuur, waarbij het dier tijdens spontaan gedrag uit het warme compartiment vertrekt (Tsp), vergeleken

met Tu. De gemiddelde Tsp is weergegeven in tabel 3.11.1. In alle gevallen is de Tsp lager dan de gemiddelde bovengrenstemperatuur. Bij nadere analyse blijkt dat bij gemiddeld 20% (range: 3 - 23%) van de spontane passages het verschil tussen Tu en Tsp groter is dan drie standaarddeviaties van Tu. Deze situatie zal voor de vis overeenkomsten hebben gehad met de temperatuursdaling tijdens de experimentele cyclus. Met andere woorden bij de lage Tu-waarden, die ontstaan zijn door een toevallige storingen in de temperatuurregeling van de apparatuur, reageert de vis op een identieke wijze als tijdens thermogedrag.
Wanneer de Tsp weinig verschilt van de gemiddelde waarde van Tu, heeft de vis gereageerd met een 'echte' spontane reactie. In tabel 3.11.1 is aangegeven hoe vaak de vis overgezwommen is, als de Tsp een waarde had in het traject van de gemiddelde Tu ± 0.5 x s.d. Uit deze tabel blijkt, dat een groot deel van de waarnemingen (gemiddeld 40%) tot de echte spontane reacties gerekend moeten worden.
Om na te gaan of de vis een verminderde belangstelling voor de omgevingstemperatuur heeft, is de verblijftijd (tsp) en de ondergane temperatuursdaling (Tdsp, in feite de temperatuurdrempel tijdens spontaan gedrag) in het koude compartiment geanalyseerd (tabel 3.11.2). De verblijftijd is in de orde van 1 minuut (40 -106 seconden). In deze periode is de temperatuur gemiddeld 0.3 °C. gedaald. Deze temperatuurdrempel (spTd) is 2 tot 3 maal zo klein als tijdens thermogedrag. Dit betekent, dat de vis tijdens het verblijf in het koude compartiment wel 'belangstelling' heeft voor de omgevingstemperatuur. Vermoedelijk reageert de vis zelfs alerter op temperatuursveranderingen. Deze verscherpte aandacht zal ingegeven zijn door de lage omgevingstemperatuur (de vertrektemperatuur is 0.5 tot 1 °C. lager dan tijdens thermogedrag) en door het feit dat het compartiment kouder i.p.v. warmer wordt.
In §3.7 is de invloed van de actuele tijd op het thermogedrag beschreven. Nagegaan is of het optreden van spontane reacties samenhing met de periode van de dag. Bij deze analyse is dezelfde tijdsindeling gebruikt als in §3.7 (tabel 3.11.3). Bij 4 compartimenten is er een significant verschil tussen dag en nacht. Telkens is er gedurende de nachtperiode minder spontane activiteit dan overdag. Zesmaal is er een significant verschil tussen de ochtend en de avonduren, waarbij de spontane activiteit in de avonduren groter is dan tijdens de ochtend.
In vier gevallen was het mogelijk om analoog aan §3.10 een tijd-temperatuuranalyse uit te voeren. In figuur 3.11.1 wordt hiervan een voorbeeld gegeven. Het aantal waarnemingen is echter beperkt en de spreiding is groot. Het is opmerkelijk, dat ook nu de regressielijn niet door de oorsprong gaat en een overeenkomstige integratietijd gevonden wordt als in §3.10.
Onderzocht is of het verblijf bij een lage temperatuur tengevolge van spontaan gedrag, consequenties heeft voor de daarop volgende thermo-

passage. Uit tabel 3.11.4 blijkt, dat het thermogedrag niet wezenlijk beinvloed wordt door een voorafgaande spontane reactie. In 7 van de 16 gevallen is er wel een significant verschil, maar de Td na een spontane reactie is in drie gevallen groter en vier kleiner dan na thermogedrag.

Samenvattend kan gesteld worden, dat een groot deel van de spontane passages het karakter heeft van een vergissing. In gemiddeld 40% van de gevallen wijkt de temperatuur, waarbij de vis uit 'warme' compartiment vertrekt minder dan een halve standaarddeviatie af van de gemiddelde Tu. Van deze overige spontane passages is niet na te gaan waarom de vis naar het koude compartiment overgezwommen is. Dit waren daarmee spontane passages in de zin des woords. Twintig procent van de spontane passages vindt plaats bij een extreem lage temperatuur, d.w.z. buiten het 99% gebied (gemiddelde Tu - 3 x s.d.) van Tu. De passages waren waarschijnlijk het gevolg van een reactie op een koeling en behoren dan in feite tot het thermogedrag.
De periode van de dag heeft een geringe invloed op het ontstaan van spontaan gedrag (tabel 3.11.3). Uit §3.6 blijkt, dat de vis tijdens de 'normale' experimentele cyclus in een te koud compartiment terecht kan komen. In tegenstelling tot de situatie bij spontaan gedrag wordt dit compartiment ***wel*** verwarmd. Het arriveren in een te koude omgeving is dus niet vreemd voor de vis. Nieuw is, dat het compartiment niet verwarmd maar gekoeld wordt. De vis heeft een minimale tijd nodig om uit te maken welk teken de temperatuursverandering van de omgevingstemperatuur heeft. Deze tijd zal afhankelijk zijn van de koel- c.q. opwarmsnelheid van het compartiment. Zoals in §2.6 is uiteengezet, neemt de koelsnelheid bij langere koeltijden langzaam af en wordt nul bij de ondergrenstemperatuur. Een deel van de spontane passages vindt plaats als de koelsnelheid van het koude compartiment in het langzamere traject is. Ervan uitgaande, dat de vis alleen reageert op temperatuursveranderingen, zou nu verwacht mogen worden, de vis een vergelijkbaar of langer tijdsbestek nodig heeft dan tijdens thermogedrag om een verschil waar te kunnen nemen. Het tegendeel is het geval: de vis reageert veel alerter. Bovendien is de drempel veel lager dan tijdens thermogedrag. De vis reageert dus niet alleen op veranderingen in de omgevingstemperatuur, maar het gedrag wordt ook beinvloed door de actuele temperatuur. Met andere woorden anders dan bij geconditioneerd gedrag, waarbij er soms na enige tijd vermoeidheid of een zekere mate van onverschilligheid voor de stimulus optreedt, blijft het dier tijdens het spontaan gedrag geinteresseerd in de omgevingstemperatuur.

Tabel 3.11.1 De gemiddelde vertrektemperatuur (Tsp °C.) uit het warme compartiment tijdens spontaangedrag en de gemiddelde bovengrenstemperatuur (Tu °C.).

vis	datum exp.	C[1]	spont.gedrag Tsp	s.d.	sp[4]	thermogedrag Tu	s.d.	N	Asp[2]	Bsp[3]
451	28-31/10/82	L	19.84	0.47	75 (9)	19.98	0.12	717	10 (1)	44 (6)
451	28-31/10/82	R	19.43	0.86	23 (3)	20.24	0.13	735	9 (1)	7 (1)
478	16-18/02/83	L	19.57	0.77	33 (7)	20.04	0.18	465	9 (1)	14 (3)
478	16-18/02/83	R	19.98	0.56	25 (5)	20.37	0.18	462	5 (3)	15 (3)
478	24-26/04/83	L	19.97	0.42	62 (11)	20.32	0.20	479	15 (3)	34 (6)
478	24-26/04/83	R	19.70	0.68	45 (9)	20.18	0.13	481	12 (2)	14 (3)
480	22-29/09/82	L	19.69	0.68	140 (20)	20.01	0.21	543	26 (4)	95 (14)
480	22-29/09/82	R	18.84	0.60	163 (23)	19.19	0.26	543	32 (5)	82 (12)
480	07-13/10/82	L	19.65	0.68	116 (18)	19.96	0.30	536	13 (2)	51 (8)
480	07-13/10/82	R	18.60	0.48	92 (15)	18.93	0.41	539	7 (1)	30 (5)
480	17-18/03/83	L	24.46	0.81	74 (9)	25.23	0.21	709	33 (4)	30 (4)
480	17-18/03/83	R	24.62	0.75	48 (6)	25.26	0.25	694	12 (2)	17 (2)
489	14-19/11/82	L	19.46	0.73	39 (4)	19.89	0.35	846	7 (1)	24 (3)
489	14-19/11/82	R	19.27	0.74	77 (8)	19.92	0.36	848	18 (2)	16 (2)
500	01-04/05/83	L	20.08	0.36	49 (9)	20.19	0.18	489	5 (1)	33 (6)
500	01-04/05/83	R	20.16	0.58	84 (15)	20.42	0.22	472	11 (2)	40 (7)

[1] Compartiment: L(inks) en R(echts)

[2] Asp: aantal passages waarbij devertrektemperatuur uit het warme compartiment< gemiddelde Tu - 3 x s.d. Tussen haakjes is het percentage van het totaal aantal passages aangegeven dat tot deze catagorie behoort.

[3] Bsp: aantal passages waarbij devertrektemperatuur uit het warme compartiment< gemiddelde Tu ± 3 x s.d. Tussen haakjes is het percentage van het totaal aantal passages aangegeven dat tot deze catagorie behoort.

[4] sp: aantal spontane passages. Tussen haakjes is het percentage van het totaal aantal passages aangegeven dat tot deze catagorie behoort.

Tabel 3.11.2 De verblijftijd (tsp sec.) en de temperatuurdaling (Tdsp) in het koude comp. tijdens spontaan gedrag.

vis	datum exp.	C[1]	tsp	s.d.	Tdsp	s.d.	N
451	28-31/10/82	L	41.8	19.5	0.51	0.24	75
451	28-31/10/82	R	106.9	52.3	0.75	0.39	23
478	16-18/02/83	L	41.8	18.5	0.60	0.26	33
478	16-18/02/83	R	53.0	25.1	0.73	0.35	25
478	24-26/04/83	L	65.2	23.5	0.31	0.17	62
478	24-26/04/83	R	41.7	18.8	0.39	0.57	45
480	07-13/09/82	L	93.1	47.9	0.33	0.20	140
480	07-13/09/82	R	82.8	47.8	0.41	0.21	163
480	22-29/10/82	L	62.3	30.3	0.38	0.23	116
480	22-29/10/82	R	95.5	53.9	0.32	0.24	92
480	17-18/03/83	L	46.3	17.7	0.66	0.32	74
480	17-18/03/83	R	57.5	25.5	0.91	0.36	48
489	14-19/11/82	L	89.1	47.9	0.57	0.37	39
489	14-19/11/82	R	50.9	26.3	0.74	0.32	77
500	01-04/05/83	L	92.0	51.5	0.37	0.19	49
500	01-04/05/83	R	36.3	17.0	0.66	0.31	84

[1] Compartiment: L(inks) en R(echts)

Tabel 3.11.3 De frequentie van spontaan gedrag tijdens verschillende perioden van het etmaal

vis	datum exp.	C[1]	periode van de etmaal 22 - 4 sp[2]	22 - 4 th[3]	10 - 16 sp	10 - 16 th	P[4]	4 - 10 sp	4 - 10 th	16 - 22 sp	16 - 22 th	P[5]
451	28-31/10/82	L	19	253	25	134	0.005*	9	176	21	154	0.014*
451	28-31/10/82	R	7	255	5	142	0.685	5	176	6	162	0.673
478	16-18/02/83	L	2	153	16	125	<0.001*	3	78	12	108	0.087
478	16-18/02/83	R	4	152	81	24	0.146	17	81	2	107	0.008*
478	24-26/04/83	L	17	173	10	83	0.634	10	96	25	127	0.108
478	24-26/04/83	R	15	174	6	81	0.763	2	97	22	128	<0.001*
480	22-29/09/82	L	39	186	27	89	0.195	30	137	45	130	0.083
480	22-29/09/82	R	53	189	27	95	0.960	20	137	63	121	<0.001*
480	07-13/10/82	L	37	219	27	61	0.001*	27	149	25	106	0.391
480	07-13/10/82	R	25	227	15	62	0.034	22	152	30	98	0.015*
480	17-18/03/83	L	11	208	18	162	0.059	17	147	28	191	0.467
480	17-18/03/83	R	3	204	15	157	0.001*	9	146	21	187	0.139
489	14-19/11/82	L	17	316	3	145	0.101	6	207	13	177	0.059
489	14-19/11/82	R	27	323	15	142	0.495	17	207	18	175	0.495
500	01-04/05/83	L	12	203	4	67	0.987	8	117	25	101	0.001*
500	01-04/05/83	R	4	195	9	66	0.399	20	110	18	100	0.977

[1] Compartiment: (L)inks en (R)echts
[2] Aantal spontane passages
[3] Aantal thermopassages
[4] P-waarde verschil frequentie spontaan gedrag overdag en tijdens de nacht. Met een asterisk (*) is aangegeven, wanneer dit verschil significant is.
[5] P-waarde verschil frequentie spontaan gedrag in de ochtend- en de avonduren. Met een asterisk (*) is aangegeven, wanneer dit verschil significant is.

Tabel 3.11.4 Gemiddelde temperatuurdrempel na spontaan en tijdens thermogedrag

vis	datum exp.	C[1]	na spont.gedrag Td	s.d.	N	thermogedrag Td	s.d.	N	P[2]	P_{var}[3]
451	28-31/10/82	L	1.16	0.80	76	1.14	0.67	594	0.808	0.986
451	28-31/10/82	R	2.38	1.15	21	1.86	0.84	607	0.007*	0.017*
478	16-18/02/83	L	1.46	0.79	34	1.44	0.71	394	0.899	0.200
478	16-18/02/83	R	0.94	0.48	23	1.16	0.62	393	0.121	0.075
478	24-26/04/83	L	1.39	0.76	61	1.10	0.48	371	<0.001*	<0.001*
478	24-26/04/83	R	1.06	0.57	36	0.96	0.46	367	0.247	0.029*
480	22-29/09/82	L	1.08	0.73	142	1.24	0.82	298	0.045*	0.062
480	22-29/09/82	R	0.89	0.61	128	1.01	0.61	288	0.061	0.470
480	07-13/10/82	L	1.18	0.59	110	1.48	0.64	348	<0.001*	0.168
480	07-13/10/82	R	0.83	0.57	80	0.79	0.20	344	0.534	0.997
480	17-18/03/83	L	1.73	0.98	71	1.68	0.88	583	0.643	0.891
480	17-18/03/83	R	1.27	0.63	45	1.61	0.85	562	0.009*	0.277
489	14-19/11/82	L	1.99	0.99	38	1.97	1.09	739	0.880	0.244
489	14-19/11/82	R	2.20	0.97	76	2.02	0.79	724	0.061	0.992
500	01-04/05/83	L	1.53	0.93	49	1.99	1.22	361	0.011*	0.014*
500	01-04/05/83	R	1.37	0.70	80	1.17	0.70	348	0.021*	0.521

[1] Compartiment: L(inks) en R(echts)

[2] P-waarde verschil tussen de twee gemiddelde temperatuurdrempels. Met een asterisk (*) is aangegeven, dat dit verschil significant is.

[3] P-waarde verschil in variantie. Met een asterisk (*) is aangegeven, dat er een significant verschil is.

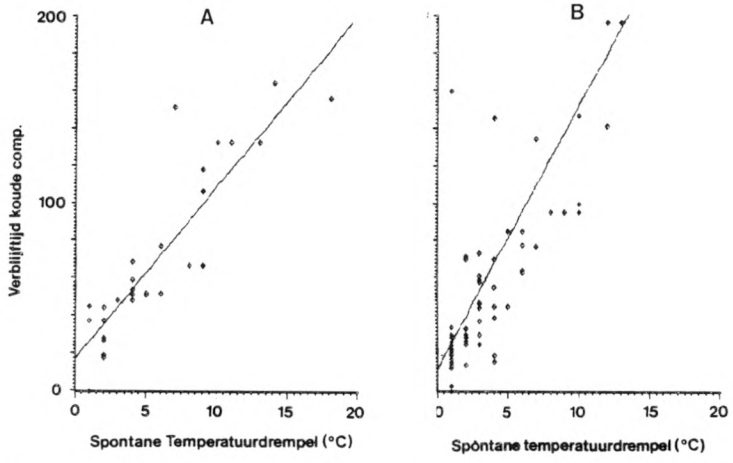


Fig. 3.11.1 De relatie tussen de temperatuurdaling, die de vis in het 'koude' compartiment ondergaat voordat deze terug zwemt en de verblijftijd in dit compartiment. A: vis 478 dd 24-26/04/83, rechter compartiment. In de grafiek is de berekende regressielijn getekend: Y=16.7 + 91.72 x X. Integratietijd: 16.7 seconden. N=40. B: vis 480 dd 07-13/82, rechter compartiment. In de grafiek is een regressielijn getekend: Y=11.3 + 139.98 x X. Integratietijd: 11.3 seconden. N=74.

§3.12 Het gedrag van de vis tijdens het continu koelen van beide compartimenten

De resultaten uit de vorige paragrafen maken aannemelijk, dat de vis gereageerd heeft op de (experimenteel teweeg gebrachte) veranderingen in de omgevingstemperatuur. Om uit te sluiten, dat de vis op andere prikkels reageerde, is de proefopzet enigszins gewijzigd. De hier beschreven experimenten werden uitgevoerd met getrainde vissen. Bij het begin van de proef werden beide compartimenten verwarmd, totdat de bovengrens bereikt werd en vervolgens beide tegelijkerijd langzaam met een constante snelheid gekoeld. Voor de vis betekent dit, dat bij het overzwemmen de aankomsttemperatuur in een compartiment identiek is aan de vertrektemperatuur van het voorafgaande compartiment. De temperatuursdaling, die de vis in een compartiment ondergaat, is in feite een temperatuurdrempel. Dergelijke proeven kunnen slechts een beperkt aantal malen met getrainde vissen gedaan worden, omdat door het ontbreken van de 'beloning' (een 'warm' compartiment) afgeleerd wordt om over te zwemmen. In het totaal zijn negen experimenten met zes verschillende vissen uitgevoerd. De resultaten van twee karakteristieke experimenten worden weergegeven in figuur 3.12.1. In deze figuren wordt het verloop van de watertemperatuur en de tempera-

tuurdrempels in de tijd weergegeven. De eerste drempel (0.9 en 1.0° C. in figuur 3.12.1) heeft dezelfde grootte orde als de temperatuurdrempel tijdens thermogedrag. De volgende drempels zijn klein (0 - 0.7°C.) , waaruit blijkt dat de vis zeer alert reageert op de koeling. Uitzondering zijn de hoge drempels bij vis 480 halverwege het experiment en bij vis 489 aan het einde van het experiment. Deze hoge drempels treden op als de temperatuur meer dan 5° C. onder de acclimatisatietemperatuur (26° C.) komt. Onder deze voor de vis extreme temperatuur kan het dier het tijdelijk opgeven om naar een 'warmer' compartiment te gaan zoeken.

Conclusies

Uit de resultaten van deze experimenten blijkt, dat de vis reageert op het dalen van de temperatuur. Dit betekent tevens dat de vis tijdens het thermogedrag primair gereageerd heeft op het koelen en dat alle andere prikkels van ondergeschikt belang waren.

Het is zeer goed mogelijk, dat de lage temperatuurdrempel bij deze experimenten en de temperatuurdrempel in het koude compartiment tijdens spontaan gedrag (spTd) een uiting zijn van een ander gedrag. De lage omgevingstemperatuur, 5° C. of meer beneden de acclimatisatietemperatuur, alarmeert de vis dusdanig dat er sprake is van een soort 'escape'reactie.

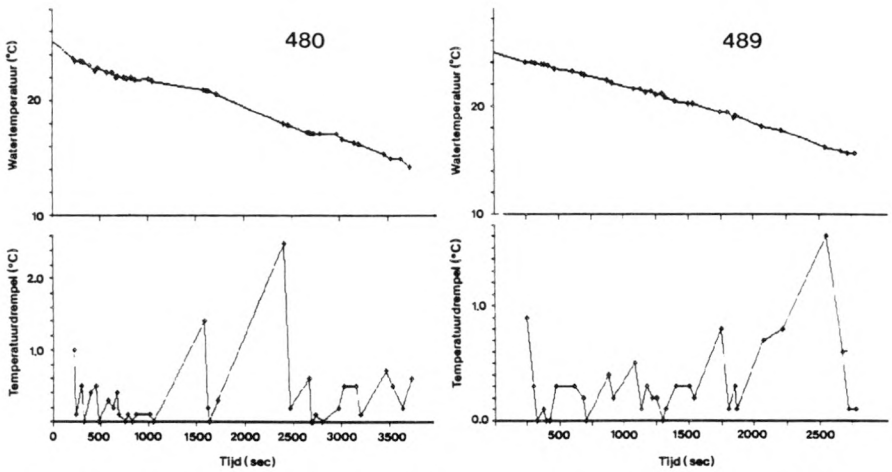


Fig. 3.12.1 Het verloop van de watertemperatuur (bovenste deel van de grafiek) en de temperatuurdrempel (onderste deel van de grafiek) tijdens het continu koelen van beide compartimenten bij twee graskarpers: 480 dd 17.03.1983 en 489 dd 04.03.1983.

§3.13 Algemene discussie

De hier beschreven proeven hebben het plausibel gemaakt, dat vissen in een 'thermo-shuttlebox' een thermoregulatiegedrag uitvoeren.
Het fysiologisch mechanisme, d.i het geheel van zintuigen, centraal zenuwstelsel en het motorisch apparaat, waarmee het gedrag tot stand komt is waarschijnlijk zeer complex. Niet alleen is het aantal betrokken parameters heel groot, maar ook zijn deze onderling afhankelijk. Bij het hier bestudeerde thermoregulatiegedrag zijn de volgende parameters betrokken:

1. temperatuurparameters: de bovengrenstemperatuur, de temperatuurdrempel, het temperatuursverschil tussen de compartimenten op het moment van overzwemmen en de ruimtelijke verdeling van de temperatuur in een compartiment, de koelsnelheid.
2. tijdsparameters: de tijdsperiode tussen start koeling en het overzwemmen van de vis, het moment van het etmaal (dag/nacht), de verblijftijd in het koude compartiment tijdens spontaan gedrag.
3. Externe parameters, zoals licht aan/uit, ingrijpen van de mens, geluiden.
4. fysiologische parameters: verschillen tussen individuele vissen, verschillen tussen vissoorten.

Het is niet realistisch en onmogelijk om binnen het kader van dit onderzoek alle parameters afzonderlijk en uitputtend te onderzoeken. Het was bijvoorbeeld niet mogelijk om de invloed van de koelsnelheid op het thermogedrag te onderzoeken. Aanvankelijk hadden de experimenten ook het karakter van een 'pilot study'. Pas bij de analyse van de metingen werd inzicht verkregen in de betekenis van de verschillende parameters.
Voordat er conclusies getrokken worden over de rol van verschillende parameters, wordt een meer ethologische beschouwing van het thermogedrag gegeven. Zoals in §3.1 wordt opgemerkt, zou het gedrag van de vis in de opstelling geïnterpreteerd kunnen worden als een 'escape'reactie. De resultaten van de statistische analyses wijzen er echter op, dat de vis ***niet*** voor lagere temperaturen vlucht:

a. In slechts 6% de gevallen zwemt de vis terug, wanneer het dier tijdens de experimentele cycli in een kouder compartiment terecht gekomen is (zie §3.6).
b. Bij de spontane reacties blijft de vis gemiddeld één minuut in het koude compartiment (§3.11).

Deze uitkomsten pleiten tegen de 'escape'gedachte. Bij het 'escape'concept zou men een tegengesteld resultaat verwachten: in 6% van de gevallen was de vis in het compartiment gebleven en in de andere situatie was de vis altijd binnen 15 seconden teruggegaan.
Het 'escape'concept is hiermee onwaarschijnlijk gemaakt en wij concentreren ons nu op het concept van de thermoregulatie.

De vis kan alleen reageren op een temperatuurstimulus als deze stimulus voldoende verschilt van de achtergrond waarop deze gepresenteerd wordt. Met andere woorden een stimulus wordt alleen herkend als deze voldoende contrast heeft met zijn omgeving. Wanneer de achtergrondruis belangrijk is, zal dit tot uiting komen in de spreiding van de meetresultaten. Uit de analyse in §3.2 (tabel 3.2.1) blijkt, dat de bijdrage van de fluctuaties in de Tu aan de spreiding in Td gering is. Dit betekent, dat er tijdens de experimenten een gunstige signaal/ruisverhouding was. Uit de analyse van de spontane reacties blijkt, dat de vis soms toch moeilijkheden had om het '(koel)signaal' van de '(temperatuur)ruis' te onderscheiden. Hij zwemt immers spontaan over bij een temperatuur, die slechts weinig verschilt van de vertrektemperatuur tijdens thermogedrag (§3.11). Deze reactie kan ook nog het gevolg zijn van de onvolkomenheden van de gebruikte apparatuur. Er is ongetwijfeld een ruimtelijke temperatuurruis in de compartimenten ten gevolge van het 'temperatuurlek' door het poortje. Over de grootte van deze ruis is onvoldoende bekend, maar het lijkt waarschijnlijk dat deze in de orde van tienden van graden was.
Uit de analyse van de resultaten blijkt, dat sommige factoren een rol gespeeld hebben bij het thermogedrag. De invloeden van deze parameters worden teniet gedaan door de temperatuurdrempels hierop te selecteren. Bij deze selectie zijn de volgende maatstaven gebruikt:

1. de Tu bij het starten van de koeling groter of gelijk is aan de gemiddelde Tu en kleiner of gelijk is aan 0.1 °C. + gemiddelde Tu;
2. het voorafgaand temperatuursverschil op het moment van overzwemmen niet kleiner was dan 1.5 en niet groter dan 1.6 °C. (§3.6);
3. alleen de periode vanaf 22 uur tot en met 4 uur 's morgens (§3.7);

In tabel 3.13.1 worden de resultaten van deze selectie weergegeven. De standaarddeviaties van de geselecteerde gemiddelde temperatuurdrempels blijken beduidend kleiner te zijn dan de standaarddeviaties berekend over alle waarnemingen terwijl, de verschillen tussen gemiddelde Td's zijn gering.

Tabel 3.13.1 Geselecteerde gemiddelde temperatuurdrempels

			geselecteerd[1]			totaal[2]		
vis	datum	C[3]	Td	s.d.	N	Td	s.d.	N
451	28-31/10/82	L	1.01	0.21	38	1.15	0.69	717
451	28-31/10/82	R	1.82	0.44	12	1.91	0.86	734
478	16-18/02/83	L	1.47	0.01	12	1.46	0.73	464
478	16-18/02/83	R	1.09	0.24	19	1.10	0.59	461
478	24-26/04/83	L	1.13	0.37	17	1.16	0.56	478
478	24-26/04/83	R	1.23	0.11	12	1.00	0.50	481
480	22-29/09/82	L	1.20	0.34	19	1.24	0.79	542
480	22-29/09/82	R	0.80	0.50	7	1.02	0.64	543
480	07-13/10/82[A]	L	1.73	0.16	6	1.44	0.64	535
480	07-13/10/82[B]	R	0.44	0.25	11	0.86	0.53	538
480	17-18/03/83	L	1.71	0.57	28	1.71	0.91	707
480	17-18/03/83	R	1.82	0.72	13	1.58	0.84	693
489	14-19/11/82	L	1.45	0.51	18	1.97	1.07	844
489	14-19/11/82	R	2.11	0.16	13	2.04	0.80	847
500	01-04/05/83	L	1.43	0.61	31	1.98	1.21	488
500	01-04/05/83	R	1.44	0.12	7	1.23	0.70	471

[1] Geselecteerd volgens de in de tekst vermelde kriteria.
[2] Berekend over alle waarnemingen.
[3] Compartiment: L(inks) en R(echts).
[A] traject voorafgaand temperatuursverschil tussen de compartimenten : 1.8 - 2.0 °C.
[B] traject voorafgaand temperatuursverschil tussen de compartimenten : 0.4 - 0.5 °C.

De gemiddelde Td uit tabel 3.13.1 beduidend is hoger dan de drempelwaarde uit de geconditioneerde experimenten (0.05° C.) van Bull (1936) en Bardach en Bjorklund (1957). Hoewel de vis in staat is om kleine temperatuursverschillen waar te nemen, reageert het dier in gedragsexperimenten op een drempel die vele malen hoger is. Ook dit kan opgevat worden als een ondersteuning voor het thermoregulatieconcept.
Opmerkelijk is, dat er bij het thermogedrag geen habituatie optreedt, zoals dikwijls voorkomt bij veelvuldig herhaald aangeleerd gedrag: de gemiddelde temperatuurdrempel blijft gedurende de meerdaags experimenten constant (zie §3.9). Dit is een aanwijzing, dat de vis in de

opstelling een natuurlijk gedrag uitvoert en dit past in het thermoregulatieconcept.

Samenvattend kunnen wij stellen, dat er geen aanwijzingen zijn dat de vis in de opstelling een 'escape'reactie uitvoert. De in dit hoofdstuk beschreven resultaten ondersteunen de gedachte, dat de vis bezig is met een thermoregulatiegedrag.
Als deze hypothese juist is, zal een specifieke ingrijpen op het nu nog denkbeeldige thermoregulatiesysteem consequenties hebben voor dit gedrag. Er zijn twee manieren om dit te bewerkstelligen:

1. Een verhoging van de bovengrenstemperatuur met 5° C. De interne referentie'temperatuur' - men spreekt ook wel van 'setpoint' - die zich ergens in het centraal zenuwstelsel bevindt, zal hierdoor beinvloed worden. Immers uit biochemisch onderzoek (hoofdstuk 1, §1.4) is bekend, dat een dergelijke verhoging van de omgevingstemperatuur allerlei veranderingen teweeg brengt. Experimenten waarbij de bovengrenstemperatuur verhoogd wordt, worden beschreven in hoofdstuk 4.
2. Het toedienen van stoffen, waarvan bij zoogdieren bekend is, dat deze een effect hebben op de lichaamstemperatuur (ontkoppelaars van de oxidatieve fosforylering) of op de informatieverwerking in het centraal zenuwstelsel (tranquillizers). De experimenten met ontkoppelaars van de oxidatieve fosforylering komen aan de orde in hoofdstuk 5. Het effect van een stof die inwerkt op de informatieverwerking wordt geanalyseerd in hoofdstuk 6.

Literatuurreferenties

Bardach, J.E., Bjorklund, R.G. The temperature sensitivity of some American freshwater fishes. Am. Naturalist, 91, 233-251, 1957.

Bull, H.O. Studies on conditioned responses in fishes. Part VII. Temperature perception in teleosts. J. Marine Biol. Assoc. United Kingdom. 21, 1-27, 1936.

Het thermoregulatiesysteem

§4.1 Inleiding
§4.2 Materiaal en methode
§4.3 Resultaten
§4.4 Discussie
Literatuurreferenties

§4.1 Inleiding

In hoofdstuk 3 is aannemelijk gemaakt, dat de vis door middel van gedrag, d.w.z. door tijdens het dalen van de temperatuur naar de andere helft van de shuttlebox te zwemmen, de omgevingstemperatuur en daarmee zijn lichaamstemperatuur regelt.
Bij de homeotherme zoogdieren is er een evenwicht tussen de warmte die vrij komt bij het celmetabolisme en warmteafgifte naar de omgeving waardoor de lichaamstemperatuur vrijwel constant is. Bij de thermoregulatie zijn een groot aantal orgaanstelsels betrokken en dit bemoeilijkt een diepgaand experimenteel onderzoek. In feite is het werkingsprincipe van dit regelsysteem nog steeds niet opgehelderd (Cossins en Bowler 1987). Er zijn diverse concepten, men spreekt ook wel van modellen, ontwikkeld waarmee men getracht heeft om de experimenteel verkregen resultaten te verklaren. Bij deze modelmatige benadering speelt het begrip 'setpoint' een belangrijke rol. In het thermoregulatie-onderzoek wordt met een setpoint de referentie van het regelsysteem bedoeld en is vergelijkbaar met de positie van de thermostaatknop van een centrale verwarmingsysteem. De temperatuurregeling bij zoogdieren is volgens deze benadering gebaseerd op een continue vergelijking van de actuele lichaamstemperatuur ('core temperature') met het setpoint (Bligh, 1972). In één van de eerste modellen komt het setpoint tot stand via een referentietemperatuur (Hardy 1972). Vermoedelijk ontstaat deze referentietemperatuur door de neuronale activiteit van een groep cellen in de hypothalamus (Hensel et al. 1973). Dit model is ook wel bekend als 'control with reference signal' model (CRS model) (Werner 1986).
Mitchell et al. (1972) hebben een model ontwikkeld zonder een interne referentietemperatuur. In dit model wordt de informatie van koude en warmte thermosensoren van het lichaam in het centraal zenuwstelsel tot een setpoint verwerkt. Het setpoint is de temperatuur waarbij de activiteit afkomstig van de warmte en de koude sensoren in evenwicht is.
In automatiseringstermen kunnen we het onderscheid tussen deze visies als volgt formuleren. In het CRS model is het setpoint als 'hardware' gerealiseerd. In het concept van Mitchell komt het setpoint via 'software' (informatieverwerking) tot stand.

Het is in dit kader interessant om te onderzoeken of het thermoregulatiegedrag van vissen met één van deze modellen verklaard kan worden. Dikwijls wordt er onderscheid gemaakt tussen gedragsthermoregulatie en autonome thermoregulatie. Volgens Cabanac (1972) is deze tweedeling arbitrair. Bligh (1972) postuleert, dat de combinatie van de gedragsthermoregulatie en de autonome thermoregulatie geintegreerd bestuurd moeten worden. Hammel (1972) en Reynolds en Casterlin (1982) veronderstellen, dat bij endotherme en ectotherme dieren in principe hetzelfde neurale systeem aanwezig is om de lichaamstemperatuur te reguleren. Aangenomen wordt, dat bij de ectothermen de thermoregulatiecentra eveneens in de hypothalamus gezeteld zijn (Bligh 1976). Deze veronderstelling is inmiddels experimenteel onderbouwd (Nelson en Prosser 1979). Het is gebleken, dat vissen na het aanbrengen van leasies in het preoptische gebied van de hersenen in een temperatuurgradient geen voorkeur meer hebben voor een bepaalde temperatuur (de preferentietemperatuur).

Uitgaande van het CRS model voor het werkingsprincipe van het thermoregulatiesysteem zal de referentietemperatuur bij vissen berusten op een neurale activiteit van 'referentie-cellen' in het preoptische gebied van de hypothalamus. Deze activiteit van deze cellen zal uiteraard gebaseerd zijn op biochemische en celbiologische processen.

Wanneer het principe van thermoregulatiesysteem bij vissen overeenkomt met het Mitchell model is de aanwezigheid van zowel koude als warmte sensoren vereist. Er zijn electrofysiologische aanwijzingen, dat vissen beschikken over perifere gelegen warmtevoelige zintuigen en in het preoptische gebied van de hypothalamus koude- en warmtegevoelige neuronen (Nelson et al. 1984). Het aantal en de relatieve gevoeligheid van deze zintuigen ligt in dezelfde grote orde als bij endotherme dieren (Prosser en Nelson 1981). Perifeer gelegen koude zintuigen zijn door Nelson et al. (1984) niet aangetoond, maar worden door deze onderzoekers wel gepostuleerd. Hiermee is voldaan aan de basiseisen van het model van Mitchell. Dit model kan alleen functioneren als het meetbereik van de zintuigen overeenkomt met de temperatuurfluctuaties, die vissen onder natuurlijke condities kunnen ondervinden: 5° - 8° Celsius. Tijdens het acclimatisatieproces wordt het metabolisme en de celbiologie van de temperatuurzintuigen aangepast aan een nieuwe temperatuur, maar blijft het (relatieve) meetbereik ongewijzigd.

De vraag komt op: is het mogelijk om uit te maken of met één van deze theoretische modellen het thermoregulatiegedrag begrepen kan worden? Bij een ontregeling van het thermoregulatiesysteem zal het gedrag van de vis verstoord zijn. Onderzocht is of het effect van deze ontregeling op het gedrag met één van de modellen geïnterpreteerd kan worden. Een methode om het systeem te ontregelen is een snelle verandering van de bovengrenstemperatuur (Tu). Bekend is dat dit

gevolgen heeft voor het celmetabolisme en de samenstelling van membranen (Prosser 1973, Cossins et al. 1977, zie ook §1.3). Na verloop van enkele dagen zijn de celbiologische processen aangepast aan de nieuwe temperatuur. Dat een verandering van de temperatuur gevolgen kan hebben voor het gedrag blijkt uit hoofdstuk 3. Wanneer de vis door één of andere oorzaak zich bij een lage temperatuur bevindt dan zwemt het dier bij een lagere temperatuurdrempel naar het andere compartiment terug. Deze drempel is tenminste tweemaal lager dan tijdens het 'normale' thermoregulatiegedrag (§3.11, tabel 3.11.2). Deze waarneming kan verklaard worden met het CRS model. Er is een groot verschil tussen de referentietemperatuur en de waargenomen temperatuur ontstaan, waardoor de vis snel, d.w.z. na een geringe daling, reageert. Het waargenomen effect kan ook verklaard worden met het model van Mitchell. De balans tussen informatie uit de thermosensoren is in korte tijd naar de koude temperatuurzintuigen doorgeslagen. De vis kan hierdoor net als bij het CRS model snel reageren. De effecten van een kortdurende verandering van de omgevingstemperatuur kunnen dus met beide modellen verklaard worden.
Bij een snelle blijvende verhoging van de Tu is dit niet het geval. Dit zal bij het CRS model ook gevolgen hebben voor het functioneren van de 'referentie-cellen'. Als deze veronderstelling juist is, komt dit tot uitdrukking in een verstoring van het thermoregulatiegedrag. Na een stapvormige verhoging van de Tu binnen het meetbereik van de temperatuurzintuigen is te verwachten dat dit bij het Mitchell model geen consequenties heeft voor het regulatiesysteem en er dus geen effecten zijn op het thermoregulatiegedrag.

Deze twee hypotheses kunnen experimenteel geverifieerd worden door te onderzoeken welk effect een stapvormige verhoging c.q. verlaging van de bovengrenstemperatuur op het thermoregulatiegedrag van de vis heeft.

§4.2 Materiaal en methode

Tijdens deze experimenten werden de grenzen van de mogelijkheden met de apparatuur bereikt. De verhoging van de bovengrenstemperatuur met 5 tot 8° C. van het 'warme' compartiment vond in enkele minuten plaats. Gedurende deze korte periode werden de compartimenten niet alternerend gekoeld, zoals tijdens de experimentele cycli. Na deze verhoging werden de experimenten op de in hoofdstuk 2 beschreven wijze uitgevoerd. Voor een goed verloop van de proeven was het noodzakelijk, dat een compartiment maximaal 8° C. gekoeld kon worden. Deze verandering van de instelling van de apparatuur had tot gevolg, dat de koelsnelheid meer varieerde dan tijdens experimenten waarbij Tu 20° C. was.
Bij deze proeven werden getrainde graskarpers gebruikt: vis 454 (6 sept. 1982, 20°->25°C.), 491 (17 april 1983, 20°->27°C.), 499 (13 okt.

1982 20°->25°C.) 500 (29 mei 1983, 20°->28°C.) en vis 497 (8 februari 1983, 20°->15° C.).

§4.3 Resultaten

Bij de vissen is in de periode na de temperatuurstap geen abnormaal gedrag, zoals een verhoogde activiteit, waargenomen.
Na de temperatuurverhoging is er bij alle vissen een periode, waarin de temperatuurdrempel duidelijk groter is dan voor de stap. In het verloop van het lopende gemiddelde van de Td, zoals weergeven in fig. 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3 komt dit tot uiting. Ook de standaarddeviaties van deze gemiddelde Td's zijn bij alle vissen direct na de stap beduidend groter dan voorheen.
In tabel 4.3.1 is de gemiddelde Td, de gemiddelde Tu, de gemiddelde vertrektemperatuur en het aantal spontane passages voor en na de verhoging van de temperatuur weergegeven. De Td neemt na de stap met een factor 2-3 toe. Na enkele dagen daalt de Td echter weer (vis 454 en 491). De standaarddeviatie in Tu wordt vrijwel niet door de stap beinvloed, terwijl de s.d. van gemiddelde Td duidelijk is toegenomen. In de eerste periode na de stap is het totaal aantal spontane passages groter geworden. Aan het einde van de experimentele periode neemt het aantal spontane passages af (vis 454 en vis 491). Bij een groot deel van de spontane passages is de vertrektemperatuur uit het warme compartiment lager dan de gemiddelde Tu-3x s.d.. Met uitzondering van vis 454 (linker comp.) en vis 500 (rechter comp.) is het aantal spontane passages, waarbij de vertrektemperatuur groter is dan het eerder genoemde kriterium na de stap niet of in geringe mate toegenomen.
De effecten van de temperatuurstap op de intergratietijd konden niet bepaald worden. Er waren te weinig waarnemingen met een kleine Td om de in §3.10 beschreven analyse uit te voeren. Vis 500 vormde hierop echter een uitzondering. In fig. 4.3.4 zijn alle waarnemingen na de stap uitgezet, waarbij er rekening gehouden is met het tijdstip van de dag (overdag: 10 uur 's morgens tot 16 uur cirkels; de overige temperatuurdrempels zijn met vierkante symbolen aangegeven). Opvallend is, dat de regressielijn overdag steiler verloopt dan 's nachts. Ik heb geen verklaring voor dit verschijnsel gevonden.
Bij vis 491 keert de Td na een dag terug naar de waarde voor de stap (tabel 4.3.1). De twee andere vissen zijn in de observatieperiode nog niet teruggekeerd naar hun uitgangswaarde. Het experiment met vis 480 (dd 17-18/03/83), waarvan de resultaten in hoofdstuk 3 besproken worden, vertoonde na 2 dagen na de stap een normale Td.
Vis 497 vertoont voor het verlaging van de Tu een grote spreiding in de gemiddelde Td. Na het verlagen van de Tu (20° -> 15° C.) wordt de gemiddelde Td kleiner en neemt ook de standaarddeviatie af. De resultaten van dit experiment zijn weergegeven in tabel 4.3.1 en fig. 4.3.5. De verlaging van Tu heeft geen noemenswaardige gevolgen voor

het optreden van spontaan gedrag.

Tabel 4.3.1 De gemiddelde Td en Tu met bijbehorende standaarddeviaties en de frequentie van het optreden van spontaan gedrag voor en na een stapvormige verandering van de temperatuur.

vis	tijd[1]	C[2]	Tu	s.d.	Td	s.d.	N	Sp[3]	Bsp[4]	Tsp[5]
454		L	20.14	0.11	1.07	0.59	175	11 (6)	5 (3)	6 (3)
	0 - 42		25.07	0.19	3.19	1.36	310	47 (13)	30 (8)	17 (5)**
	43 - 90		24.94	0.26	2.27	0.83	367	10 (3)	4 (1)	6 (2)
		R	19.56	0.25	1.09	0.59	173	6 (3)	2 (1)	4 (2)
	0 - 42		24.02	0.38	2.54	1.28	312	23 (7)	11 (3)	12 (4)
	43 - 90		23.99	0.33	1.92	0.90	371	10 (3)	5 (1)	5 (1)
491		L	20.05	0.30	1.45	0.71	850	51 (6)	14 (2)	37 (4)
	0 - 22		27.08	0.33	3.13	1.33	131	31 (19)	26 (16)	5 (3)
	26 - 46		27.19	0.26	1.73	0.87	165	13 (7)	6 (3)	7 (4)
		R	19.81	0.26	1.55	0.81	878	93 (10)	62 (6)	31 (3)
	0 - 22		26.86	0.19	2.14	1.30	131	19 (13)	6 (4)	13 (9)
	26 - 46		26.96	0.15	1.58	0.63	164	9 (5)	6 (3)	3 (2)
500		L	19.89	0.18	1.45	0.69	445	37 (8)	30 (6)	7 (1)
	0 - 23		27.83	0.40	2.49	1.48	131	21 (14)	15 (10)	6 (4)
	23 - 44		28.07	0.33	3.67	1.28	84	9 (10)	7 (8)	2 (2)
	44 - 60		27.93	0.53	3.73	1.74	84	13 (13)	9 (9)	4 (4)
		R	19.65	0.11	0.85	0.48	426	10 (2)	6 (1)	4 (1)
	0 - 23		27.75	0.20	1.65	1.35	124	16 (11)	7 (5)	9 (6)**
	23 - 44		28.09	0.22	1.55	1.40	60	4 (6)	1 (1)	3 (5)
	44 - 60		28.10	0.43	2.89	2.09	60	9 (13)	6 (9)	3 (4)
497		L	20.16	0.27	1.52	0.80	101	12 (11)	1 (1)	11 (10)
	0 - 9		15.31	0.18	0.96	0.35	101	12 (11)	0 (0)	12 (11)
		R	19.89	0.39	2.73	1.39	101	6 (6)	3 (3)	3 (3)
	0 - 9		15.06	0.24	1.70	0.49	101	3 (3)	2 (2)	1 (1)

[1] Compartiment: (L)inks en (R)echts

[2] Tijd na stapvormige temperatuursverandering (uren)

[3] Totaal aantal spontane passages. Tussen haakjes is het percentage vermeld.

[4] Het aantal spontane passages, waarbij de vertrektemperatuur uit het warme compartiment kleiner is dan de gemiddelde Tu- 3 x s.d.. Tussen haakjes is het percentage vermeld.

[5] Het aantal spontane passages, waarbij de vertrektemperatuur uit het warme compartiment groter is dan gemiddelde Tu - 3 x s.d. Tussen haakjes is het percentage vermeld. Met een asterisk is aan gegeven of de frequentie van het spontane gedrag significant hoger was dan tijdens de periode met Tu is 20° Celsius: (**) betekent P<0.01.

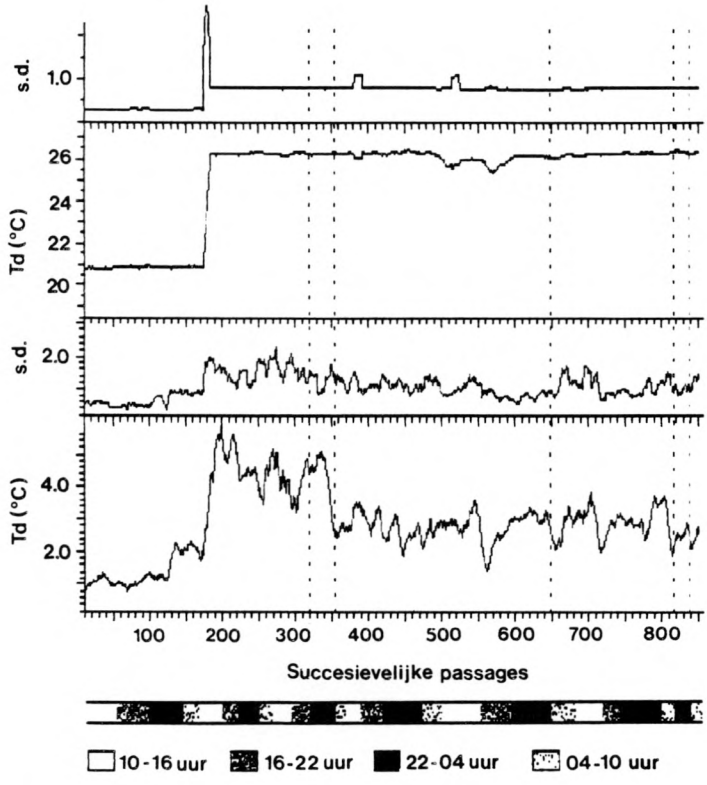


Fig. 4.3.1 Het lopende gemiddelde van de Td en de Tu met bijbehorende standaarddeviaties van vis 454 (linker compartiment; index lopende gemiddelde: 10). Na het verhogen van de temperatuur is het gedrag van de vis enige mate ontregeld. Dit komt tot uiting in het onregelmatige verloop van de gemiddelde Td (fluctuaties) en de grotere standaarddeviatie.

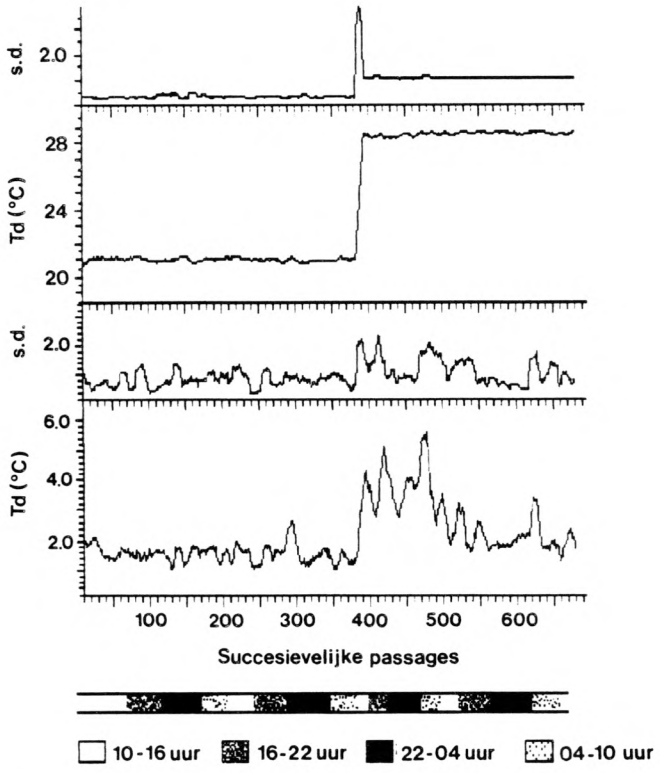


Fig. 4.3.2 Het lopende gemiddelde van de Td en de Tu met bijbehorende standaarddeviaties van vis 491 (linker compartiment; index lopende gemiddelde: 10). Na het verhogen van de temperatuur is het gedrag van de vis enige mate ontregeld. Dit komt tot uiting in het onregelmatige verloop van de gemiddelde Td (fluctuaties) en de grotere standaarddeviatie. Aan het einde van de observatieperiode (vanaf passagenummer 550) treedt er een stabilisatie op.

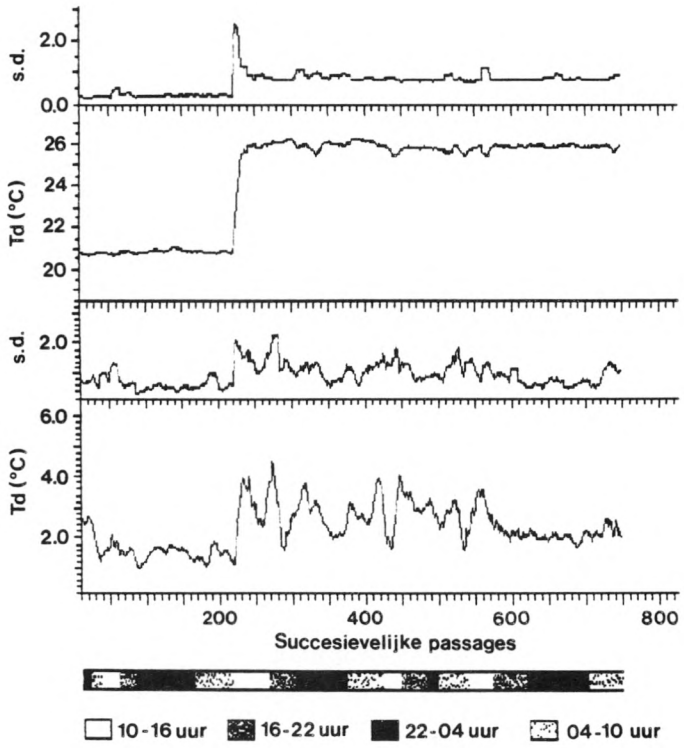


Fig. 4.3.3 Het lopende gemiddelde van de Td en de Tu met bijbehorende standaarddeviaties van vis 499 (rechter compartiment; index lopende gemiddelde: 10). Na het verhogen van de temperatuur is het gedrag van de vis enige mate ontregeld. Dit komt tot uiting in het onregelmatige verloop van de gemiddelde Td (fluctuaties) en de grotere standaarddeviatie. Aan het einde van de observatieperiode (vanaf passagenummer 600) treedt er een stabilisatie op.

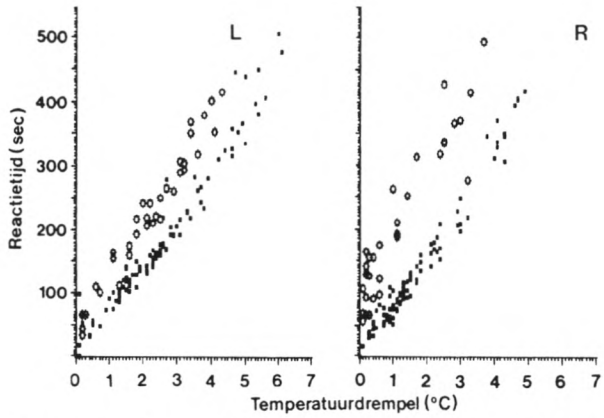


Fig. 4.3.4 De relatie tussen Td en de reactietijd bij vis 500 in het linker (L) en het het rechter (R) compartiment. Met de open cirkels zijn de temperatuurdrempel tussen 10 uur 's morgens en 4 uur 's middags weergegeven. Met vierkante symbolen zijn de overige temperatuurdrempels aangegeven.

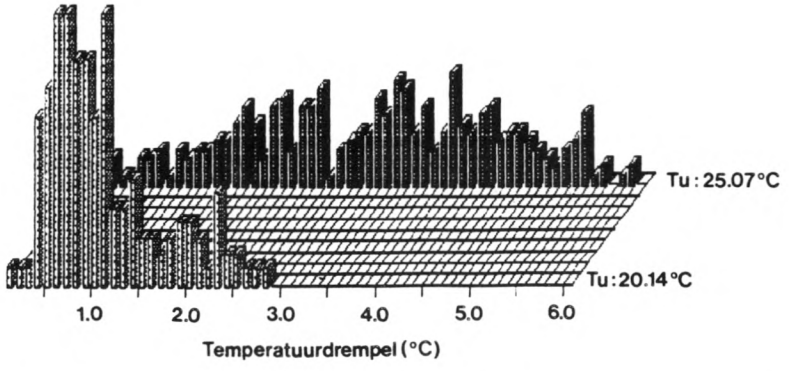


Fig. 4.3.5 Frequentiehistogrammen van de Td direct voor en na de stapvormige verhoging van Tu (vis 454, linker compartiment). Elk histogram is gebaseerd op 175 resp. 310 waarnemingen. De verdeling van Td is voor de stap breder dan na de stap. In tabel 4.3.1 worden de statistische gegevens van deze histogrammen vermeld.

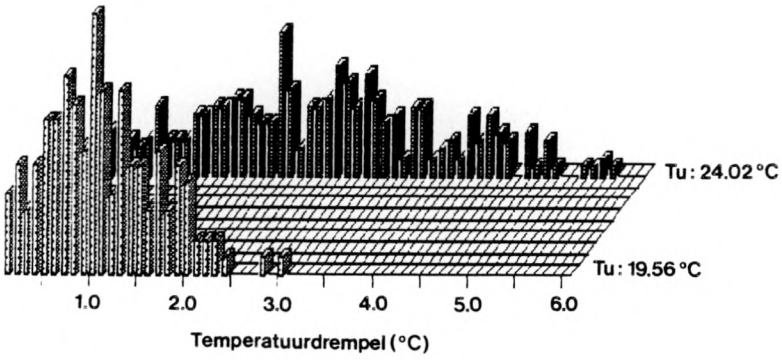


Fig. 4.3.6 Frequentiehistogrammen van de Td direct voor en na de stapvormige verhoging van Tu (vis 454, rechter compartiment). Elk histogram is gebaseerd op 173 resp. 312 waarnemingen. De verdeling van Td is voor de stap breder dan na de stap. In tabel 4.3.1 worden de statistische gegevens van deze histogrammen vermeld.

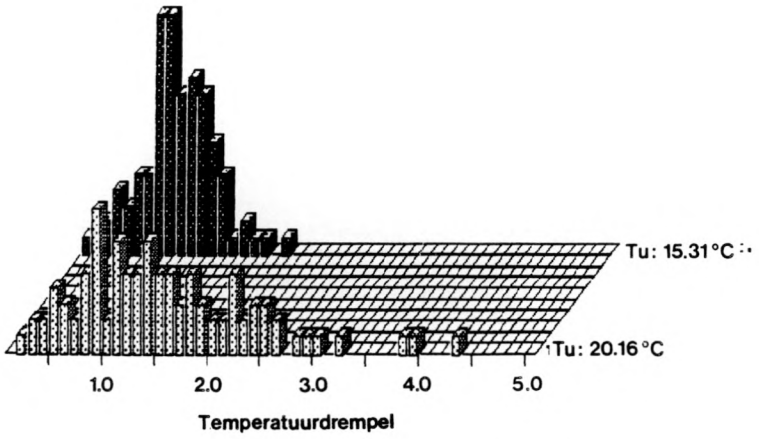


Fig. 4.3.7 Frequentiehistogrammen van de Td direct voor en na de stapvormige verlaging van Tu (vis 497, linker compartiment). Elk histogram is gebaseerd op 101 waarnemingen. De verdeling van Td is voor de stap breder dan na de stap. In tabel 4.3.1 worden de statistische gegevens van deze histogrammen vermeld.

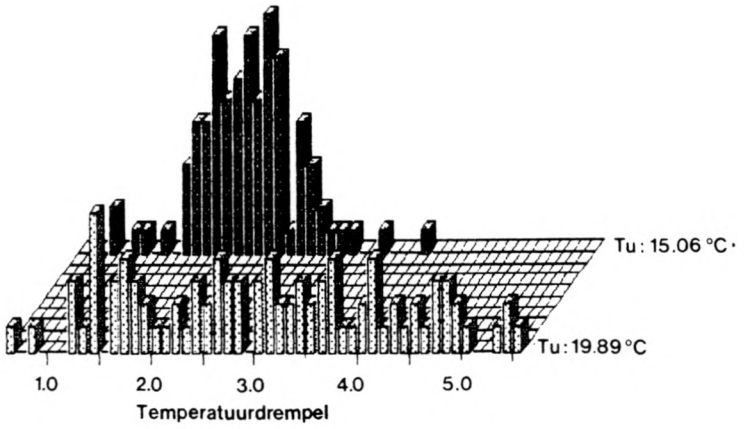


Fig. 4.3.8 Frequentiehistogrammen van de Td direct voor en na de stapvormige verlaging van Tu (vis 497, rechter compartiment). Elk histogram is gebaseerd op 101 waarnemingen. De verdeling van Td is voor de stap breder dan na de stap. In tabel 4.3.1 worden de statistische gegevens van deze histogrammen vermeld.

§4.4 Discussie

De aanwezigheid van een setpoint bij ectothermen is ook door andere onderzoekers verondersteld. Zoogdieren krijgen na het toedienen van pathogene bacterien of bacteriële toxines koorts. Volgens de gangbare opvatting is koorts het gevolg van een verhoging van het setpoint (Cooper 1972). Tijdens gedragexperimenten, waarbij de reptielen en amfibien met pathogene bacterien worden besmet, blijken deze dieren na inoculatie een hogere omgevingstemperatuur te kiezen. In analogie met experimenten bij zoogdieren, is dit verschijnsel geinterpreteerd als koorts (Kluger 1979, 1986). De resultaten van vergelijkbare experimenten met vissen zijn op een overeenkomstige wijze verklaard (Reynolds 1977, Reynolds et al 1976, 1978). Deze interpretatie impliceert, dat er bij reptielen, amfibien en vissen een setpoint aanwezig is. Helaas heeft men bij latere experimenten met reptielen en vissen deze verhoging van de preferentietemperatuur niet kunnen reproduceren (Layburn et al. 1981, Marx et al 1984). Hiermee is de opvatting, dat deze dieren koorts kunnen krijgen en dus een setpoint hebben controversieel geworden.

Na een stapvormige verhoging van de bovengrenstemperatuur vertonen vissen langere tijd een verstoring in het thermoregulatiegedrag. Dit

komt tot uiting in de hoge gemiddelde Td en de grote standaarddeviatie. Dit experimentele resultaat is niet in overeenstemming met hetgeen op basis van het Mitchell model verwacht zou worden: geen verstoring van het thermoregulatiegedrag (§4.1). Het Mitchell model is hiermee ongeschikt geworden om het thermoregulatiegedrag van vissen te verklaren.

Bij vissen heeft een kleine verandering in de temperatuur grote gevolgen voor het metabolisme, de water-zouthuishouding en de zuur-basebalans (Heinicke en Houstin 1965, Nelson et al. 1984). Een temperatuursverandering heeft niet op alle orgaanstelsels een effect. Bekend is dat bij een temperatuursstijging van 5°C. binnen 15 minuten de frequentie van de kieuwademhaling ongewijzigd blijft (Burton 1979). De grootte van de stap 5 - 8° Celsius is echter niet extreem en komt overeen met het temperatuursverschil, dat de vis onder natuurlijke omstandigheden ondervindt bij het zwemmen door een spronglaag (Jordan 1939). Dit betekent, dat grootte van de temperatuurstap van deze experimenten binnen het biologische bereik van de vis valt. Het is dan ook onwaarschijnlijk dat de gevonden effecten veroorzaakt worden door een ingrijpende ontregeling van de fysiologie, waardoor de vis geen thermoregulatiegedrag kan uitvoeren. Ook in preferentietemperatuuropstellingen (zie hoofdstuk 1, §1.6) waren vissen aan dergelijke temperatuursverschillen van deze grootte orde blootgesteld (Beitinger 1977, Kuhmann en Jahnke 1981, Neill et al. 1972, Wollmuth et al. 1987). Wanneer we desalniettemin uitgaan van de veronderstelling dat de fysiologie ontregeld is, is te verwachten dat de frequentie van het spontane gedrag na de stap significant zal toenemen. Uit tabel 4.3.1 blijkt echter dat dit niet het geval is. Bij een belangrijk deel van de spontane passages is de vertrektemperatuur uit het warme compartiment lager dan het verschil tussen gemiddelde Tu en driemaal de standaardeviatie van Tu. Dit is een aanwijzing, dat deze passages teweeg gebracht zijn door fluctuaties in Tu en in feite gerekend moeten worden tot het thermoregulatie gedrag (zie ook §3.11).

De hier beschreven experimentele resultaten kunnen wèl met het setpointconcept geïnterpreteerd worden. De verstoring in het thermoregulatiegedrag na een verhoging van Tu veroorzaakt een ontregeling van biochemische processen in de 'referentie-cellen'. Hierdoor is de referentietemperatuur (en dus het setpoint) niet meer betrouwbaar. Dit komt tot uitdrukking in het gedrag. De aanpassing van deze cellen aan de nieuwe temperatuur (acclimatisatie) vergt tijd. Bij vis 491 en vis 499 is na 1 à 2 resp. 3 dagen het regelmechanisme herstelt. De andere vissen hebben blijkbaar meer tijd nodig. In dit verband zijn de resultaten van Duthie en Houlihan (1982) van belang. Deze onderzoekers hebben vastgesteld dat de herstelperiode van de zuurstofopname van platvissen na een stapvormige verhoging van de temperatuur twee dagen duurt.

Anders dan bij een verhoging van de temperatuur wordt de standaarddeviatie van de gemiddelde Td na een verlaging van de temperatuur kleiner (tabel 4.3.1). In dit kader zijn de bevindingen van Duthie en Houlihan (1982) van belang. Bij hun onderzoek naar de invloed van een stapvormige verandering van de temperatuur op de zuurstofopname van een platvis vonden deze onderzoekers alleen bij de temperatuursverhoging een 'overshoot' in de zuurstofopname. Duthie en Houlihan schrijven dit fenomeen toe aan het optreden van stress. Bij een temperatuursverlaging zou deze stress niet optreden, omdat 'fish are less sensitive to colder temperatures'. Deze interpretatie is echter niet in overeenstemming met de in dit hoofdstuk experimentele resultaten en de bevindingen tijdens spontaan gedrag (§3.11): de temperatuurdrempel wordt kleiner als de omgevingstemperatuur plotseling lager wordt. Een andere verklaring voor deze fenomenen is, dat de adaptatie van de vis aan hoge temperatuur volgens een andere mechanisme verloopt dan de adaptatie aan een lage temperatuur.

Van belang is nu de vraag of het preferentietemperatuurfenomeen verklaard kan worden met het CRS model. Tijdens experimenten in een preferentietemperatuuropstelling blijkt, dat de vis een voorkeur heeft voor een temperatuur die enkele graden hoger ligt dan de acclimatisatietemperatuur. De tijdelijke preferentietemperatuur is dus afhankelijk van de acclimatisatietemperatuur. Na acclimatisatie kiest het dier opnieuw een preferentietemperatuur, totdat de eindpreferentietemperatuur ('final preference temperature') bereikt is (McCauley en Huggins, 1979). Volgens het setpointconcept vindt er tijdens dit proces een continue en geleidelijke aanpassing plaats in de neuronen, die betrokken zijn bij het setpoint. Deze cellen zullen bij een hogere temperatuur biochemisch gezien beter gaan functioneren. Hiermee is een verklaring gegeven voor het preferentietemperatuurfenomeen. In het stadium van de 'final preference temperature' verlopen de celbiologische processen in deze cellen optimaal. Dit optimum is kennelijk soortspecifiek. Bij een nog hogere temperatuur functioneren de 'referentie-cellen' en mogelijk ook andere cellen minder goed.

Conclusies
Het is aannemelijk, dat vissen een thermoregulatiesysteem met een referentiesignaal beschikken. Er zijn aanwijzingen, dat de aanpassing van dit systeem aan een hogere temperatuur volgens een ander mechanisme verloopt dan de aanpassing aan een lagere temperatuur.

Literatuurreferenties
Beitinger, T.L. Thermopreference behavior of Bluegill (Lepomis macrochirus) subjected to restrictions in available temperature range. Copeia, 536-, 1977.
Bligh, J. Introduction. In: Essays on temperature regulation. J. Bligh and R. Moore (eds). North-Holland Publishing Company,

Amsterdam 1972, p. IX-.
Bligh, J. Neuronal models of mammalian temperature regulation. In: Essays on temperature regulation. J. Bligh and R. Moore (eds). North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1972, 105-.
Bligh, J. Temperature regulation. In: Environmental physiology of animals. J. Bligh, J.L. Cloudsley-Thompson, A.G. Macdonald (eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford 1976, p. 413-.
Burton, D.T. Ventilation frequency compensation responses of three eurythermal estuarine fish exposed to moderate temperature increases. J. Fish Biol., 15, 589-, 1979.
Cabanac, M. Thermoregulatory behavior. In: Essays on temperature regulation. J. Bligh and R. Moore (eds). North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1972, p. 19-.
Cherry, D.S., Cairns, J. Biological monitoring. Part V. Preference and avoidance studies. Water Res. 16, 263-, 1982.
Cooper, K.E. The body temperature "set-point" in fever. In: Environmental physiology of animals. J. Bligh, J.L. Cloudsley-Thompson, A.G. Macdonald (eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford 1976, p. 149-.
Cossins, A.R., Bowler,K. Temperature biology of animals. Chapman and Hall, London, 1987.
Cossins, A.R., Friedlander, M.J., Prosser, C.L. Correlations between behavioral temperature adaptations of goldfish and the viscosity and fatty acid composition of their synaptic membranes. J. Comp.Physiol. 120, 109-, 1977.
Duthie, G.G., Houlihan, D.F. The effect of single step and fluctuating temperature changes on the oxygen consumption of flounders, Patichthys flesus (L.): Lack of temperature adaptation. J. Fish Biol. 21, 215-, 1982.
Hammel, H.T. The set-point in temperature regulation: analogy or reality. In: Essays on temperature regulation. J. Bligh and R. Moore (eds). North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1972, p. 121-.
Hardy, J. Models of temperature regulation. A review. In: Essays on temperature regulation. J. Bligh and R. Moore (eds). North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1972, p. 163-.
Heinicke, E.A., Houston, A.H. Effect of thermal acclimation and sublethal heat shock upon ionic regulation in the goldfish, Carassius auratus L. J. Fish Res. Bd Canada, 22, 1455-, 1965.
Hensel, H., BrÜck, K., Rath, P. Homeothermic organisms. In: Temperature and life. H. Precht, J. Christophersen, H. Hensel and W. Larcher. Springer-Verlag, New York, 1973, p. 503-.
Jordan, H.J. Het leven der dieren in het water. N.V.A. Oosthoek's Uitgeversmaatschappij, Utrecht, 1939.
Kluger, M.J. Fever in ectotherms: evolutionary implications. Am. Zool., 19, 295-, 1979.
Kluger, M.J. Is fever beneficial? Yale J. Biol. Med., 59, 89-, 1986.
Kuhmann, W., Jahnke, E. Eine versuchseinrichtung zur Bestimmung der

Voorzugstemperatur bei Jungfischen. Fischerei-Forschung. Wissenschaftliche Schriftenreihe, 19, 41-, 1981.
Layburn, H.P., Mitchell, D., Kenedi, E., Louw, G.N. Pyrogens fail to produce fever in a cordylid lizard. Am. J. Physiol. 242, R198-, 1981.
Marx, J., Hilbig, R., Rahmann, H. Endotoxin and prostaglandin E_1 fail to induce fever in a teleost fish. Comp. Biochem. Physiol. 77A, 483-, 1984.
McCauley, R.W., Huggins, N.W. Ontogenetic and non-thermal seasonal effects on thermal preferenda of fish. Amer. Zool. 19, 267-, 1979.
Mitchell, D., Atkins, A.R., Wyndham, C.H. Mathematical and physiological models of thermoregulation. In: Essays on temperature regulation. J. Bligh and R. Moore (eds). North-Holland Publishing Company, Amsterdam 1972, p. 37-.
Mitchell, D., Snellen, J.W., Atkins, A.R. Thermoregulation during fever: change of setpoint or change of gain. PflÜgers Arch., 321, 293-, 1970.
Neill, W.H., Magnuson, J.J., Chipman, G.G. Behavioral thermoregulation by fishes: A new experimental approach. Science, 176, 1443-, 1972.
Nelson, D.O, Heath, J.E., Prosser,L.C. Evolution of temperature regulatory mechanismes. Amer. Zool. 24, 791-, 1984.
Nelson. D.O., Prosser, C.L. Effect of preoptic leasions on behavioral thermoregulation of green sunfish, Lepomis cyanellus, and of goldfish, Carassius auratus. J. Comp. Physiol., 129A, 193-, 1979.
Prosser, C.L. Temperature. In: Comparative animal physiology. Prosser, C.L. (ed.). W.B. Saunders Co., New York, 3rd edition, 362-, 1973.
Prossser, C.L., Nelson, D.A. The role of nervous systems in temperature adaptation of poikilotherms. Ann. Rev. Physiol., 43, 281-, 1981.
Reynolds, W.W. Fever and antipyresis in bluegill sunfish, Lepomis macrochirus. Comp. Biochem. Physiol. 57C, 165-, 1977.
Reynolds, W.W., Casterlin, M.E,, Covert, J.B. Behavioral fever in teleost fishes. Nature 259, 41-, 1976.
Reynolds, W.W., Cover, J.B., Casterlin, M.E. Febrile responses of goldfish Carassius auratus to Aeromonas hydrophila and to Escherichia coli endotoxin. J. Fish Diseases 1, 271-, 1978.
Reynolds, W.W., Casterlin, M.E. The pyrogenic responses of non-mammalian vertebrates. In: Pyretics and antipyretics. Springer-Verlag. A.S. Milton (ed.). Berlin 1982, p. 649-.
Shaklee, J.B., Christiansen, J.A., Sidell, B.D., Prosser, C.L., Whitt, G.S. Molecular aspects of temperature acclimation in fish: contributions of changes in enzyme activities and isozyme patterns to metabolic reorganization in the green sunfish. J. Exp. Zool., 201, 1-, 1977.
Wollmuth, L.P., Crawshaw, L.I., Panayiotides-Djaferis, H., Thermoregulatory effects of intracranial norepinerphrine injections in Goldfish. Am. J. Physiol., 253, (Regulatory Integrative Comp.

Physiol. 22), R821-, 1987.
Werner, J. Do black-box models of thermoregulation still have any value? Contribution of system-theoretical models to the analysis of thermoregulation. Yale J. Biology and Medicine 59, 335-348, 1986.

De farmacologische beinvloeding van het thermogedrag door ontkoppelaars van de oxidatieve fosforylering.

§5.1 Inleiding
§5.2 Methode
§5.3 Resultaten
§5.4 Discussie
Literatuurreferenties

§5.1 Inleiding

Aannemelijk is gemaakt dat vissen in staat zijn om een shuttleboxopstelling de omgevingstemperatuur en daarmee hun lichaamstemperatuur te regelen (hoofdstuk 3). Er zijn aanwijzingen dat deze dieren bij het tot stand komen van dit gedrag gebruik maken van een 'setpoint' (hoofdstuk 4). Dit betekent, dat één van de 'laagste' vertebraten zou beschikken over een nerveus apparaat, dat vergelijkbaar is met het regulatie-apparaat, waarmee zoogdieren hun lichaamstemperatuur constant houden.
Uitgaande van bovengenoemde hypothese komt de vraag op: Is het mogelijk om het thermogedrag van vissen langs farmacologische weg te beïnvloeden op een overeenkomstige wijze als dat bij de thermoregulatie van zoogdieren kan.
Bij farmacologisch onderzoek wordt de toedieningswijze bepaald door het aangrijpingspunt van de stof in het lichaam maar door ook de fysische en chemische eigenschappen van het farmacon. In het thermoregulatiesysteem zijn er drie niveaus (locaties) waarop een farmacon een effect kan hebben:

1. Het centrale regelmechanisme, waar de thermische informatie geïntegreerd wordt en de activiteit van de organen gestuurd wordt. Een deel van dit mechanisme bevindt zich in de hypothalamus.
2. De orgaanstelsels die betrokken zijn bij de warmte-uitwisselingen en de warmteproductie. Deze zijn perifeer gelegen.
3. Het perifere nerveuze appaaraat.

Het is bij zoogdieren mogelijk om het centrale regelmechanisme farmacologisch te beïnvloeden zonder een perifeer effect. Een moeilijkheid bij deze experimenten is, dat er geen farmaca bekend zijn die in een kleine hoeveelheden perifeer kunnen worden toegediend worden en specifiek op dit centrale regelmechanisme inwerken zonder tegelijkertijd het functioneren van andere orgaanstelsels te bïnvloeden. De te onderzoeken stoffen worden daarom in lage doseringen door middel van een canule intracraniaal toegediend in de thermoregulatiecentra in de

hypothalamus of in de derde hersenventrikel (Brauer et al. 1986, de Roij et al. 1977).
Het effector deel van de thermoregulatie is experimenteel gezien eenvoudiger te onderzoeken. Alle stoffen, die de energiehuishouding van de lichaamscellen beïnvloeden hebben een effect. Bij een voldoende dosering veroorzaken deze farmaca een verandering van de lichaamstemperatuur.
In dit hoofdstuk worden de resultaten van experimenten beschreven, waarbij getracht is om het thermogedrag van vissen met farmaca te beïnvloeden. Deze experimenten hebben een verkennend karakter. Daarom is gekozen is voor farmaca, die bij zoogdieren voornamelijk op het perifere deel van het thermoregulatiesysteem aangrijpen. De ontkoppelaars van de oxidatieve fosforylering hebben deze eigenschap. De stoffen niet intracraniaal toegediend vanwege de complexiteit van het aanbrengen van een canule in de hersenen van vissen. Enkele karakteristieke effecten van deze stoffen zijn (de Bruyn 1976, Kessler et al., 1976):

1. de celademhaling wordt neemt toe.
2. gekoppelde cellulaire processen (zoals b.v de ATP synthese en het actieve transport van kationen) worden ontkoppelt.
3. het verdwijnen van gradiënten van protonen en cationen aan weerszijden van de mitochondriale membranen.
4. Bij sommige ontkoppelaars (dinitrofenolen) worden katabole processen gestimuleerd zoals de glycolysis, proteolysis, glycogenolysis en de afbraak van vetzuren.

Deze farmaca belasten het thermoregulatiesysteem, doordat onder invloed van deze stoffen de warmteproductie toeneemt (Murphy 1975). Als er meer warmte geproduceerd wordt dan aan de omgeving afgegeven wordt, zal de lichaamstemperatuur stijgen.
Een subcutane injectie met dinitrophenol (76 µmol DNP/kg) bij kamertemperatuur veroorzaakt bij muizen een verhoging van de lichaamstemperatuur met 3° C. (Brauer et al. 1986). Deze toediening van DNP heeft ook gevolgen voor het gedrag van muizen in een temperatuurgradiëntopstelling. De dieren blijken een omgevingstemperatuur te kiezen, die gemiddeld 6.5 °C. lager is. Het effect van DNP komt tot stand via het perifere deel van het thermoregulatiesysteem. Bij experimenten waarbij DNP in een hersenventrikel wordt geinjiceerd blijkt, dat geen effect op de voorkeurtemperatuur heeft of een geringe daling van deze temperatuur teweeg brengt (Brauer et al. 1986). Pertwee en Tavendale (1979) constateerden, dat de met DNP behandelde muizen (subcutane injectie), die een lagere omgevingstemperatuur kozen geen hyperthermie vertoonden. Dit betekent, dat het effect van DNP op de lichaamstemperatuur afhankelijk is van de omgevingstemperatuur.
Omdat vissen op een efficiente wijze hun warmte aan de omgeving kunnen afstaan (§1.2), is het effect van deze stoffen op het thermogedrag van

vissen niet voorspelbaar.

§5.2 Materiaal en Methode

Bij dit onderzoek is dezelfde experimentele methodiek gebruikt als hoofdstuk 2 beschreven wordt.
Bij deze experimenten zijn twee verschillende ontkoppelaars van de oxidatieve fosforylering gebruikt: 2,4 dinitrophenol (DNP) en carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP). Bij de experimenten met DNP is de stof opgelost in een voor vissen geschikte fysiologisch zoutoplossing (0.45% NaCl). Bij CCCP is gebruik gemaakt van een BSA (bovine serum albumin) oplossing (0.1%).
De experimenten zijn uitgevoerd met graskarpers. De farmaca zijn intraperitoneaal geïnjiceerd (i.p.). De injectie werd ter hoogte van de buikvin toegediend onder een van de schubben uit de tweede of derde rij (grote) schubben (gerekend van de abdominale zijde). In figuur 5.2 wordt de injectieplaats aangegeven. Het injectievolume per vis was 0.1-0.2 ml. De bovengrenstemperatuur in de beide compartimenten van de shuttlebox was tijdens de DNP-experimenten 20° C. en tijdens de CCCP-experimenten 23° C.
In tabel 5.2.1 staan de hoeveelheden DNP en CCCP, die aan de verschillende vissen zijn toegediend. Het lichaamsgewicht van de vissen was 30 tot 70 gram.

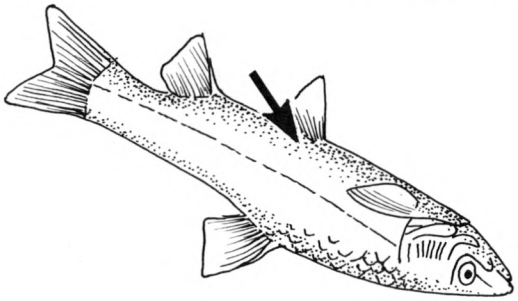
Tabel 5.2.1 Dosering van de DNP en CCCP

vis	ontkoppelaar	hoeveelheid	datum injectie
444	DNP	0.87 µmol	30/04/1983
478	DNP	1.74 µmol	15/02/1983
493	DNP	0.44 µnol	08/11/1983
492	DNP	1.74 µmol	02/03/1983
442	DNP	1.74 µmol	16/02/1983
454	CCCP	1 nanomol	14/06/1983
491	CCCP	1 nanomol	14/06/1983
497	CCCP	5 nanomol	21/06/1983

Het effect van de behandeling duurde meestal kort en dit beperkte het aantal waarnemingen. Daarom zijn in tegenstelling tot hoofdstuk 3 en 4 de resultaten niet per compartiment van de shuttlebox ingedeeld, maar samengevoegd. Het effect van de ontkoppelaars op het thermogedrag is onderzocht door de Td na het toedienen te vergelijken met de Td uit een controle periode. Omdat uit het voorafgaande onderzoek gebleken was, dat het moment van de dag van invloed is op de grootte van de Td (§3.7), werd de controle periode zo gekozen, dat de aanvangs- en slottijden in dezelfde fase van het etmaal vallen als de experimentele periode lag.

Onderzocht is of de gemiddelde Td in de controle en experimentele periode verschillend waren. Met de Scheffé-Box test (Sokal en Rohlf 1980) is onderzocht of de varianties van de metingen uit de controle en de experimentele perioden homogeen zijn. Uit het onderzoek van het normale thermogedrag van de vis is reeds gebleken, dat de verdeling van de Td soms afwijkt van de normale verdeling (zie §3.3). De Scheffé-Box test is volgens Martin en Games (1977) minder gevoelig voor dergelijke afwijkingen en daarom voor deze situatie erg geschikt. Onderzocht is of de gemiddelde Td tijdens de experimentele periode significant verschilde van die tijdens de controle periode. Afhankelijk of de varianties van de twee metingen al dan niet homogeen zijn, is met de T-toets of een door Sokal en Rohlf (1980) beschreven test gebruikt. Deze laatste test is eveneens gebaseerd op de T-distributie.

Fig. 5.2.1 De injectieplaats.



§5.3 Resultaten

Het effect van het hanteren van vis 444 en het geven een intraperitoneale injectie met fysiologisch zout is in fig. 5.3.1 weergegeven. Binnen een halfuur na deze behandeling is het thermogedrag wat de Td-waarde betreft weer op het oude niveau. Bij andere vissen (niet weergegeven), die met fysiologisch zout i.p. geinjiceerd zijn, was er geen effect waarneembaar.

Twee vissen (442 en 492) stierven kort na de injectie met de 1.74 µmol DNP. Vis 478 overleefde deze dosering echter wel.

Het effect van DNP op het thermogedrag komt tot uiting in de figuren 5.3.1, 5.3.2 en 5.3.3. Er zijn twee fasen te onderkennen. Een periode kort na de injectie en een periode die bij de vissen 444 en 493 4 - 5 uur en bij vis 478 11 uur later begint. Kort na de injectie stijgt bij vis 444 en 493 de temperatuurdrempel om vervolgens 2 tot 3 uur later op het oude niveau terug te keren. Bij vis 478 duurde deze periode met een grote Td bijna tweemaal zo lang. Een uur na het toedienen van DNP ontstonden luchtbelletjes op het lichaam van deze vis. Het dier was op

dat moment vrijwel niet meer in staat om te zwemmen en lag met de buikzijde omhoog in het water. Na enkele uren waren de luchtbelletjes verdwenen en zwom de vis rond als voor het toedienen van DNP. Toch is de Td in het einde van de eerste periode nog hoog (fig. 5.3.2).
In de tweede periode is er eveneens een toename van de Td. De gemiddelde Td uit deze periode blijkt significant te verschillen van het gemiddelde tijdens een controle periode (tabel 5.3.1). Bij vis 444 beslaat de tweede periode 4 uur, bij vis 478 7 uur en bij vis 493 5 uur.
Het effect van CCCP op het thermogedrag komt tot uiting in de figuren 5.3.4 en 5.3.5. In vergelijking met DNP is het effect van korte duur.

Tabel 5.3.1 De gemiddelde Td (M) tijdens de controle en de experimentele periode. In de tabel wordt tevens de P-waarde van de statistische test vermeld, waarbij onderzocht is of de twee gemiddelde Td's verschillend zijn.

	Controle periode				Experimentele periode			
vis	M	sd	N	farmacon	M	sd	N	P
444	1.08	0.36	116	DNP	1.53	0.47	97	<0.01
454	0.61	0.22	42	CCCP	0.87	0.48	38	<0.01
478	1.34	0.59	118	DNP	2.17	1.14	74	<0.01
491	1.72	0.48	25	CCCP	1.83	0.89	25	0.45
493	1.22	0.41	109	DNP	1.41	0.66	100	<0.01
497	1.07	0.69	39	CCCP	1.47	0.65	37	<0.02

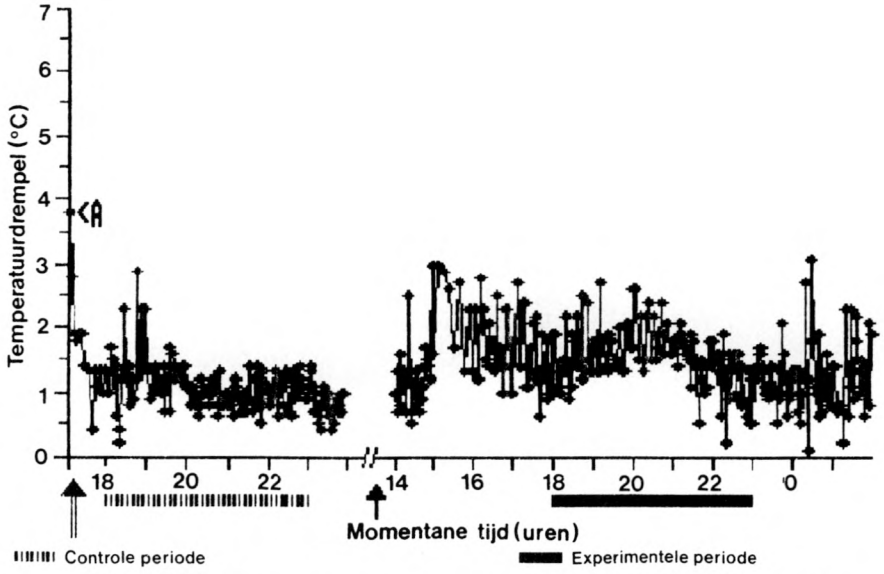


Fig. 5.3.1 De gevolgen van een intraperitoneale injectie met DNP voor het thermogedrag bij vis 444, dosis 0.87 µmol (i.p.). Onder de x-as is zowel de controle als de experimentele periode aangegeven, waarvan de gemiddelde en standaardeviaties worden vermeld in tabel 5.3.1. In de grafiek zijn de succesievelijke Td's tegen de tijd uitgezet. Aan het begin van de grafiek (<A) is om 17 uur (dubbele pijl) de vis met fysiologisch zout geinjiceerd (i.p.). Het tijdstip van de injectie is in de grafiek gemarkeerd met een pijl.

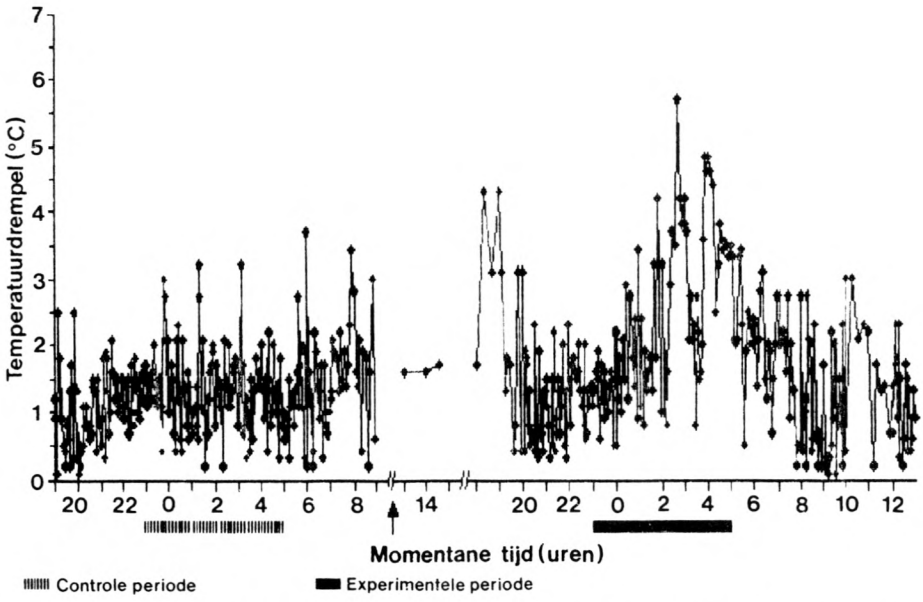


Fig. 5.3.2 De gevolgen van een intraperitoneale injectie met DNP voor het thermogedrag bij vis 478, dosis 1.74 µmol (i.p.). Onder de x-as is zowel de controle als de experimentele periode aangegeven, waarvan de gemiddelde en standaardeviaties worden vermeld in tabel 5.3.1. In de grafiek zijn de succesievelijke Td's tegen de tijd uitgezet. Het tijdstip van de injectie is in de grafiek gemarkeerd met een pijl.

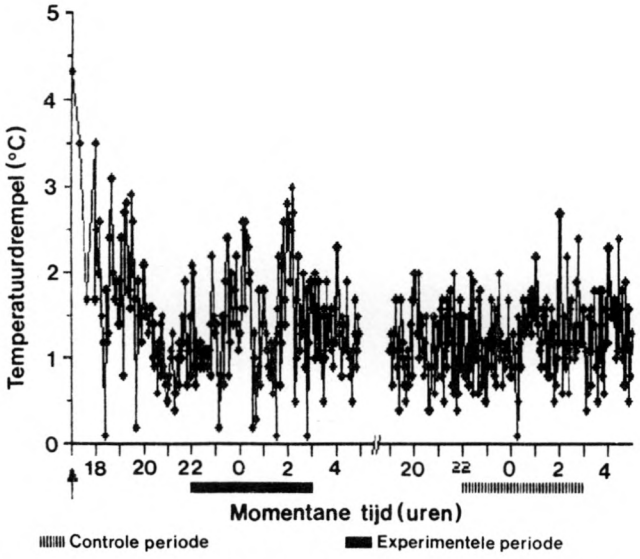


Fig. 5.3.3 De gevolgen van een intraperitoneale injectie met DNP voor het thermogedrag bij vis 493, dosis 0.44 µmol (i.p.). Onder de x-as is zowel de controle als de experimentele periode aangegeven, waarvan de gemiddelde en standaardeviaties worden vermeld in tabel 5.3.1. In de grafiek zijn de succesievelijke Td's tegen de tijd uitgezet. Het tijdstip van de injectie is in de grafiek gemarkeerd met een pijl.

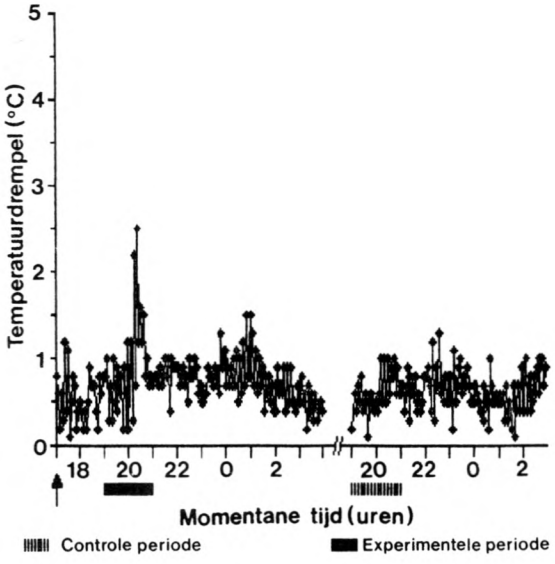


Fig. 5.3.4 De gevolgen van een intraperitoneale injectie met CCCP voor het thermogedrag bij vis 454, dosis 5 nanomol (i.p.). Onder de x-as is zowel de controle als de experimentele periode aangegeven, waarvan de gemiddelde en standaardeviaties worden vermeld in tabel 5.3.1. In de grafiek zijn de succesievelijke Td's tegen de tijd uitgezet. Het tijdstip van de injectie is in de grafiek gemarkeerd met een pijl.

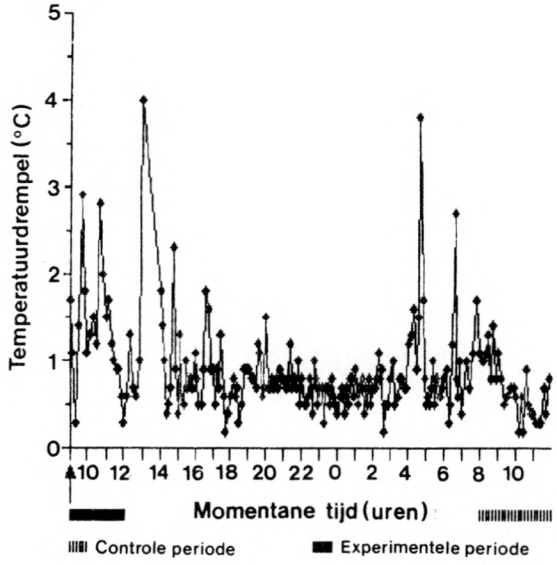


Fig. 5.3.5 De gevolgen van een intraperitoneale injectie met CCCP voor het thermogedrag bij vis 497, dosis 1 nanomol (i.p.). Onder de x-as is zowel de controle als de experimentele periode aangegeven, waarvan de gemiddelde en standaardeviaties worden vermeld in tabel 5.3.1. In de grafiek zijn de succesievelijke Td's tegen de tijd uitgezet. Het tijdstip van de injectie is in de grafiek gemarkeerd met een pijl.

§5.4 Discussie

Beide ontkoppelaars hebben een effect op het thermogedrag. Bij de experimenten met DNP zijn er twee perioden waarin een effect van dit farmacon op het thermogedrag is waar te nemen. Kort na de injectie zijn de Td-waarden groot (fig. 5.3.1, 5.3.2, 5.3.3). Er is dus een grote temperatuurdaling nodig om de vis over te laten zwemmen. De tweede periode waarin een effect van DNP zichtbaar is, begint 4 to 7 uur na afloop van de eerste periode. De oorzaak hiervan zijn niet duidelijk. Het is mogelijk, dat er een (niet geïdentificeerde) metaboliet ontstaan is die het tweede effect veroorzaakt heeft. Een andere hypothese is dat DNP na opgenomen te zijn in (vet)depots opnieuw vrijkomt (recirculatie van DNP). Tot slot is er nog de mogelijkheid dat er, zoals bij vitamine K het geval is, uit een metaboliet van DNP via een enzymatische reactie opnieuw DNP gevormd wordt (Pugh 1980, Shearer et al. 1977). Er zijn andere (b.v. biochemische) experimenten nodig om meer inzicht te verkrijgen in dit fenomeen.

CCCP heeft bij twee vissen een effect op het thermogedrag (tabel 5.3.1), dat tot uiting komt in een verhoging van de Td. Het effect van dit farmacon is kortdurend en daarom zijn er in de experimentele fase

weinig Td's beschikbaar (fig. 5.3.4 en 5.3.5). Hierdoor is het niet mogelijk om onderscheid te maken tussen verstoringen in het thermogedrag, die veroorzaakt zijn door CCCP of een andere oorzaak hebben. De resultaten met CCCP dienen dan ook met de nodige voorzichtigheid geinterpreteerd te worden.
In vergelijking met DNP is er 500 maal minder CCCP nodig om een effect op het thermogedrag te bewerkstelligen. Dit is in overeenstemming met de resultaten van in vitro experimenten met CCCP en DNP (persoonlijke mededeling Addink, Leiden 1983).

Vis 478, die de hoogste dosering DNP overleefde, was in deze periode niet meer in staat om zijn positie in het water te handhaven. en dreef met de buikzijde omhoog in het water. Tegelijkertijd werden er bij deze vis luchtbelletjes op het lichaam waargenomen. De achtergronden hiervan zijn onduidelijk.
Op het eerste gezicht lijkt het onwaarschijnlijk, dat bij vissen hyperthermie optreedt. Echter onder fysiologische omstandigheden kan de temperatuur in de spieren hoger worden dan van het water. Er zijn experimenten gedaan, waarbij de temperatuur in de spiermassa van verschillende vissen telemetrisch gemeten is, terwijl men de dieren in het water in een klein visnetje liet spartelen (Müller 1976). Gebleken is dat tengevolge van deze spieractiviteit de locale temperatuur met 0.05 tot 0.70°C. kan stijgen. Eenzelfde resultaat werd verkregen nadat de vissen gedurende een uur met matige snelheid liet zwemmen. Na het zwemmen is er eveneens een periode waarin de temperatuur in de spiermassa met enkele tienden van graden kan toenemen. Tijdens het zwemmen is de temperatuurstijging gering. Müller (1976) geeft hiervoor als verklaring, dat er door het langs stomend water een efficiënte warmte-uitwisseling mogelijk is tussen de oppervlakkig gelegen spieren het het water.
Het is niet uitgesloten, dat tijdens na het toedienen van de ontkoppelaars er in de vis een periode is waarin er locaal bij een hyperthermie optreedt. Door bij toekomstige experimenten met ontkoppelaars telemetrisch de inwendige (of 'core')temperatuur te meten kan onderzocht worden of deze hypothese juist is.

Het effect van de ontkoppelaars kan op het thermogedrag kan op verschillende manieren tot standkomen. Hieronder worden vier mogelijke hypotheses besproken:

1. Het effect van de ontkoppelaars is het gevolg van een verhoogde warmteproductie zonder een verhoogde warmteafgifte. Dit betekent, dat het temperatuursverschil tussen vis en het water groter geworden is. De vis zal onder deze omstandigheden eerder dan anders vaststellen, dat het compartiment van de shuttlebox gekoeld wordt en dus eerder overzwemmen naar het andere compartiment. Als deze hypothese juist is zal de temperatuurdrempel kleiner moeten worden.

Dit is niet in overeenstemming met de in dit hoofdstuk beschreven experimentele resultaten. Met andere woorden het effect van de ontkoppelaars kan niet verklaard worden met ontstaan van een 'hyperthermie'.

2. De ontkoppelaars werken in op de perifere temperatuurzintuigen, waardoor de gegevens, die deze zintuigen naar de thermoregulatiecentra doorgeven minder betrouwbaar worden. De vis zal hierdoor later merken dat de temperatuur gedaald is. Een grote temperatuurdrempel is het gevolg, hetgeen in overeenstemming is met de in dit hoofdstuk beschreven resultaten.
3. De beide ontkoppelaars zijn goed vetoplosbaar. Het is dus mogelijk dat deze stoffen de 'blood-brain' barriere passeren en een effect hebben op de 'setpoint'functie. De werking van de referentietemperatuurcellen zou door deze stoffen verstoord kunnen zijn doordat actieve (d.w.z. energiekostende) cellulaire transportprocessen in deze cellen geremd worden. Het gevolg is, dat de referentietemperatuur lager wordt en de vis na een grotere temperatuurdaling overzwemt naar het andere compartiment.
4. Het is ook mogelijk, dat deze stoffen door het remmen van actieve cellulaire transportprocessen een effect hebben op de informatieverwerking in het centraal zenuwstelsel. Als deze informatieverwerking trager verloopt zal de Td toenemen.

Bij de onder 3. en 4. beschreven hypothese komt het effect van deze farmaca op het thermogedrag tot stand door een beïnvloeding van het centraal zenuwstelsel. Deze twee hypotheses zijn niet in overeenstemming met de resultaten bij muizen, waarbij een intracerebroventriculaire injectie met DNP geen gevolgen heeft voor het temperatuurselectiegedrag (Brauer et al. 1986). Als één van deze twee hypotheses juist blijkt te zijn komt de werking van DNP bij vissen op een andere wijze tot stand als bij muizen.

Concluderend kan gesteld worden, dat ontkoppelaars van de oxidatieve fosforylering het thermogedrag van vissen verstoren. Waarmee aangetoond is, dat dit gedrag zich leent voor farmacologisch onderzoek.
Het effect van de ontkoppelaars kan op verschillende manieren verklaard worden. Uit de beschikbare gegevens kan niet afgeleid worden welke hypothese het meest waarschijnlijk is. Dit is mede het gevolg van het feit dat dergelijke farmaca in principe op alle lichaamscellen een effect kunnen hebben. De experimentele resultaten zijn niet strijdig met de bevindingen uit de voorafgaande hoofdstukken, maar leiden echter niet tot nieuwe inzichten in de achtergronden van het thermogedrag bij vissen. In hoofdstuk 6 is daarom gekozen voor een farmacon, diazepam, waarvan bij zoogdieren bekend is, dat het een specifiek aangrijpingspunt in de hersenen heeft.

Literatuurreferenties

Brauer, R.W., Johnson, E.D., Miller, C.G., Sanchez-Grinan, M.I., Shelton, M.G., Williams, E.E. Modification of temperature preference behavior by hypoxia and metabolic inhibitors. In: Homeostasis and thermal stress. 6th Int. Symp. Pharmacol. Thermoregulation, Jasper, Alta. 1985. Cooper, K. et al. (eds). Karger, Basel 1986. p. 27-.

Bruyn, A. de, Biochemical toxicology of environmental agents. Elsevier, Amsterdam 1976. p. 536-.

Kessler, R.J., Tyson, C.A., Green, D.E. Mechanism of uncoupling in mitochondria: Uncouplers as ionophores for cycling cations and protons. Proc. Natl Acad. Sci. 73, 3141-, 1976.

Martin, C.G., Games, P.A. Anova test for homogeneity of variance: nonnormality and unequal samples. J. Educational Statistics, 2, 187-, 1977.

Müller, R. Untersuchungen über die Körpertemperatur von Süßwasserfischen. Arch. Fisch Wiss., 27, 1-, 1976.

Murphy, S.D. Pesticides. In: Toxicology. L.J. Casarett en J. Doull (eds). Macmillan Publishing Co. New York, 1975. p. 408-.

Pertwee, R.G., Tavendale, R. Effects of delta^9-tetrahydrocannabinol, 2,4-dinitrophenol and pentolinium tartrate on behavioral thermoregulation in mice. Br. J. Pharmac., 66, 39-, 1979.

Pugh, D.M. Vitamin K, the coumarin-derivative antagonists and the coagulation of blood: recent advances. Vet. Sci. Commun., 4, 15-, 1980.

Roij, Th.A.J.M. de, Frens, J., Bakker,J., Németh, F. Thermoregulatory responses to intracerebroventricularly injected dopamine in the goat. Eur. J. Pharmacol., 43, 1-7, 1977.

Shearer, M.J., McBurney, A., Breckenridge, A.M., Barkhan, P. Effect of warfarin on the metabolism of phylloquinone (vitamin K_1): dose-response relationships in man. Clin. Sci. Mol. Med., 52, 621-, 1977.

Sokal, R.R., Rohlf, F.J. Biometry. 2nd ed., W.H. Freeman and Co. New York, 1980.

Het thermoregulatiegedrag en het centraal zenuwstelsel

§6.1 Inleiding en probleemstelling
§6.2 Methodiek
6.2.1 Introductie
6.2.2 Het bepalen van de intervallengtes en de Monte Carlo simulatie
6.2.3 Een nummeriek voorbeeld
6.2.4 Het bepalen van de 'turning points'
§6.3 De lengte van de intervallen
§6.4 Turning points
§6.5 Het effect van diazepam op het thermoregulatiegedrag
6.5.1 Methode
6.5.2 Resultaten
6.5.3 Discussie
§6.6 Hebben vissen een referentie'temperatuur'?
Literatuurreferenties
Addendum

§6.1 Inleiding en probleemstelling

Het temperatuur-aspect van het thermoregulatiegedrag van de vis staat centraal in de voorafgaande hoofdstukken. Aannemelijk is gemaakt, dat vissen in staat zijn om in een shuttlebox-opstelling de omgevingstemperatuur en daarmee hun lichaamstemperatuur te regelen.
In dit hoofdstuk wordt het accent vooral gelegd op het gedragsaspect. In een overzichtsartikel gaat Roberts (1979) in op enkele achtergronden van het thermoregulatiegedrag van vissen. Deze auteur spreekt het vermoeden uit dat dit gedrag gebaseerd is op een eenvoudig mechanisme: vissen zouden door middel van het gedrag vluchten voor een 'stress temperature'. Deze opvatting is niet in overeenstemming met de conclusies uit §3.6 waarbij vastgesteld is dat dit gedrag ***niet*** geïnterpreteerd kan worden als een vluchtreactie.
Aan het gedrag van de vis in de 'shuttlebox' liggen meerdere neurale processen ten grondslag, waarbij verschillende soorten neuronen betrokken zijn: sensibele, motorische en hogere orde neuronen, neuronen in de hypothalamus en decisie-eenheden.
Bij onze experimenten speelt de temperatuurdrempel (Td) een belangrijke rol. De Td is de temperatuurdaling, die voorafgaat aan het overzwemmen van de vis. Er moet onderscheid gemaakt worden tussen deze Td en de minimale drempelwaarde, die tijdens het zintuig-onderzoek bepaald is. Bij de perceptie-experimenten is getracht om met behulp van een geconditioneerde reflex te bepalen welke (minimale) tempera-

tuursveranderingen vissen nog waar kunnen nemen (Bull 1936, Bardach en Bjorklund 1957). In §1.2 wordt de temperatuurperceptie nader besproken. De Td is een factor 10 à 20 hoger dan de minimale drempelwaarde. Het verschil betekent, dat de gevonden waarde afhankelijk is van de gebruikte experimentele methode. Vermoedelijk berust de minimale drempelwaarde op de eigenschappen van de perifeer gelegen thermozintuigen. De Td komt waarschijnlijk op een andere wijze tot stand dan deze minimale drempelwaarde. De grootte van de Td kan verklaard worden door aan te nemen dat de vis bij de reactie op een temperatuurdaling een gedragsnorm of kriterium hanteert. Dit kriterium wordt gebruikt bij de decisie om over te zwemmen naar het andere compartiment. Het kriterium is waarschijnlijk niet gefixeerd op een vaste waarde maar variabel. Dit kan bijvoorbeeld afgeleid worden uit de reactie van de vis tijdens spontaan gedrag. Als de vis tijdens een spontane passage in het 'koude' compartiment terecht komt, zwemt het dier bij een geringere temperatuurdaling terug naar het 'warme' compartiment dan tijdens de experimentele cycli (§3.11). Deze werkhypothese dient uiteraard met experimenteel onderzoek onderbouwd te worden. Hiermee is het centrale thema van dit hoofdstuk omschreven. De termen kriterium en decisie zijn ontleend aan de psychonomie (Eijkman 1976).
Bij het tot stand komen van de decisie speelt naast het kriterium ook de ontvankelijkheid voor een bepaalde stimulus een belangrijke rol. Deze ontvankelijkheid of motivatie is afhankelijk van de toestand waarin het centraal zenuwstelsel zich bevindt. De etholoog Hinde (1970) spreekt in dit verband van de 'central motive state'. Een grote ontvankelijkheid zal tot uitdrukking komen in het alert reageren op een temperatuurdaling, d.w.z. een kleine Td. Een verminderde motivatie heeft een grote Td tot gevolg. Vanuit deze gedachte is de grootte van de Td een weerspiegeling van de motivatietoestand van het dier. In het dier vindt dus een verwerking plaats van de informatie uit temperatuurgevoelige zintuigen. Soms wordt aan deze informatie een grote prioriteit toegekend en in andere omstandigheden is andere informatie belangrijker. Dit verschijnsel kan worden uitgedrukt met termen als een verschillende gevoeligheid van het verwerkingssysteem, maar ook met het woord 'ontvankelijkheid'. Ik prefereer hiervoor de uit de ethologie stammende term 'motivatie' (Eibl-Eibesfeldt 1970, Halliday 1983, Hinde 1970). In dit hoofdstuk zal deze gedachtengang experimenteel geverifieerd worden.
De motivatie kan door externe omstandigheden worden beinvloed (Halliday 1983). Tijdens het spontaan gedrag (§3.11) en tijdens de experimenten, waarbij beide compartimenten gelijktijdig gekoeld werden (§3.12) komt de vis bij een lage omgevingstemperatuur terecht. Het blijkt dat de vis onder deze (externe) conditie een geringe temperatuursdaling nodig heeft om weg te zwemmen. Deze reactie kan geinterpreteerd worden als zijnde een gevolg van een wijziging van de motivatietoestand van de vis door externe omstandigheden. Naast externe zijn er ook interne factoren, die het motivatieniveau bepalen.

Een voorbeeld is dat mensen tijdens koorts proberen hun lichaamswarmte vast te houden door zich warmer te kleden of naar bed te gaan. De in hoofdstuk 4 beschreven experimenten, waarbij de Tu verhoogd is, zijn eveneens een voorbeeld van een interne beinvloeding van het gedrag. Bij deze experimenten verandert het gedrag door het niet meer stabiel zijn van de interne referentie'temperatuur'.

Het mechanisme, dat ten grondslag ligt aan het gedrag is zeer gecompliceerd. Wanneer de experimenten zich over meerdere dagen uitstrekken zal de reactie van de vis op een temperatuurdaling niet constant zijn. Met andere woorden de motivatie voor het thermoregulatiegedrag zal niet onveranderlijk zijn. Bij de tot nu toe uitgevoerde analyses is rekening gehouden met het compartiment van de shuttlebox waarin de Td gemeten is. Voor elk compartiment is een afzonderlijke analyse uitgevoerd. Het is gevolg dat alleen de fluctuaties, die over langere perioden spelen, bestudeerd konden worden. Een voorbeeld hiervan is het verschil in het gedrag tijdens de dag en de nacht, zoals dat tot uitdrukking komt in de fluctuaties in het lopende gemiddelde (§3.7). In hoofdstuk 3 wordt dit dag/nacht effect toegeschreven aan de experimentele omstandigheden, die 's nachts anders zijn dan overdag.
Om informatie te verkrijgen over de korte termijn fluctuaties in de motivatie van de vis is de relatie tussen de opeenvolgende Td's van belang. Ter verduidelijking het volgende voorbeeld. Als de motivatie verschillend is voor de beide compartimenten, betekent dit, dat de succesievelijke Td's in statistisch opzicht afhankelijk van elkaar zijn: een grote Td wordt dan dikwijls gevolgd door een kleine en een kleine vaak door een grote Td. Met andere woorden de opéénvolgende Td's kunnen dan niet opgevat worden als een reeks 'random' getallen, want er is een relatie tussen de getallen. Een overeenkomstige situatie ontstaat als de Td in een kort tijdsbestek varieert, omdat de motivatie verandert. Door de Td te vergelijken met de volgende Td (uit het andere compartiment) kan onderzocht worden of er een relatie is en wordt de relevantie van het 'motivatie-concept' duidelijk. Behalve de paarsgewijze vergelijking kunnen ook drie opeenvolgende Td's (tripletten), die een dalende of stijgende reeks vormen met elkaar vergeleken worden. De tripletten waarbij middelste Td groter zijn (c.q. kleiner) dan de voorafgaande en de volgende, worden apart behandeld. Ook kwartetten en vijftallen d.w.z. een stijgende of dalende reeks van 4 resp. 5 Td's, zouden voor kunnen komen.
Aanvankelijk is getracht om het onderzoek naar de afhankelijkheid van de Td's uit te voeren met de statistische methoden, waarbij onderzocht wordt of een getallenreeks een 'random' volgorde heeft (Kendall et al., 1983). Het frequent voorkomen van opeenvolgende gelijke Td's en het niet aanéengesloten zijn van de reeks waarnemingen door het optreden van spontane passages had tot gevolg dat deze benadering uiteindelijk onbruikbaar bleek te zijn. Er is daarom een alternatieve

analysemethode gebruikt, die in §6.2 uiteengezet wordt. Een deel van de in volgende paragrafen gebruikte terminologie is geïnspireerd op de door Kendall et al. (1983) beschreven methodes.

Al eerder is vastgesteld, dat de grootte van de Td beïnvloed wordt door de omstandigheden in het compartiment (Hoofdstuk 3). In dit hoofdstuk wordt speciale aandacht besteed aan de interne beinvloeding van het gedrag. Voor dergelijk onderzoek is het vereist, dat beide compartimenten in thermisch opzicht gelijkwaardig zijn. Dikwijls is de spreiding in bovengrenstemperatuur in het ene compartiment groter dan in het andere (zie §3.3, tabel 3.3.1). Om een eventueel effect van verschil in de regeling van Tu op de grootte van de Td zo gering mogelijk te houden, is de analyse uitgevoerd bij experimenten, waarbij er geen aantoonbaar verschil was tussen de gemiddelde Tu in beide compartimenten.
Daarentegen is in paragraaf 6.6 van dit hoofdstuk, waarbij het interne referentie'temperatuur' opnieuw aan de orde komt, juist gebruik gemaakt van een verschil in de Tu-waarden tussen de twee compartimenten.

§6.2 Methodiek

6.2.1 Introductie

Wanneer de omstandigheden in beide compartimenten in fysisch opzicht gelijk zijn, zal het verschil in de Tu-waarde tussen de compartimenten nul zijn. De Tu-waarde voor het linker en rechter compartiment kunnen gezien de experimentele cyclus nooit op hetzelfde tijdstip gemeten worden (§2.4). De compartimenten worden geacht in thermisch opzicht gelijkwaardig te zijn als de gemiddelde Tu's met bijbehorende standaarddeviaties niet van elkaar verschillen. De Tu is gemeten vlak voor het begin van het koelen. Het voldoen aan deze eis is overigens nog geen bewijs voor het in thermisch opzicht identiek zijn beide compartimenten.
Het is uiteraard mogelijk, dat er tussen de compartimenten verschillen zijn geweest in de ruimtelijke verdeling van de temperatuur. Hierover zijn echter geen meetgegevens beschikbaar. Als uit de analyse van de data blijkt, dat de vis in het ene compartiment op een andere wijze reageert dan in het andere, is daarmee aangetoond, dat de omstandigheden in beide compartimenten toch verschillend zijn geweest.

In tegenstelling tot de vorige hoofdstukken, waarbij de temperatuurdrempels van beide compartimenten telkens afzonderlijk zijn geanalyseerd, staan nu de onderlinge relaties van opeenvolgende Td's centraal. Bij het vergelijken van Td-waarden speelt de definitie van

de temperatuurdrempel een belangrijke rol. In symbolische notatie kan de Td geschreven worden als:

$$Tu - Tv = Td.$$

Bij het vergelijken van twee succesievelijke Td's wordt dit:

$$_{L}Tu - {}_{L}Tv = {}_{L}Td \quad \text{voor het linker}$$
en
$$_{R}Tu - {}_{R}Tv = {}_{R}Td \quad \text{voor het rechter compartiment.}$$

Wanneer de Tu's gelijk zijn, betekent dit dat bij het berekenen van het verschil tussen de Td's in feite het verschil tussen de vertrek-temperaturen berekend wordt. Het verschil tussen de opeenvolgende Td's is dus een maat voor de overeenkomst tussen de vertrektemperaturen (Tv).

6.2.2 Het bepalen van de intervallengtes en de Monte Carlo simulatie

De relatie tussen de opeenvolgende Td's is onderzocht door na te gaan of de succesievelijke Td's tot een stijgende dan wel tot een dalende reeks behoren. In tabel 6.2.1 is voor een dalende reeks de gebruikte indeling en terminologie weergegeven. Voor een stijgende reeks is een overeenkomstige klassificatie gebruikt. Uit een voorstudie bleek, dat een intervallengte groter dan 5 niet voorkomt.
Als er een spontane passage optreedt of als twee of meer opeenvolgende Td's gelijk zijn, is het niet meer mogelijk om de intervallengte vast te stellen. Bij een spontane passage wordt de reeks Td's feitelijk afbroken. Bij twee of meer gelijke Td's is niet uit te maken of bij de meetnauwkeurigheid één van deze drempels een turning point geweest zou zijn. Het gevolg is, dat de intervallengte niet met zekerheid bepaald kan worden. In deze situatie is onderzocht of de tweede of één van de daarop volgende Td's tot een reeks behoren.

Tabel 6.2.1 Indeling van de intervallengte bij een dalende reeks

Omschrijving	Intervallengte
$Td_j > Td_{j+1}$	1
$Td_j > Td_{j+1} > Td_{j+2}$	2
$Td_j > Td_{j+1} > Td_{j+2} > Td_{j+3}$	3
$Td_j > Td_{j+1} > Td_{j+2} > Td_{j+3} > Td_{j+4}$	4
$Td_j > Td_{j+1} > Td_{j+2} > Td_{j+3} > Td_{j+4} > Td_{j+5}$	5

Indien de Td's onderling gerelateerd zijn (of met statistische term afhankelijk zijn), betekent dit, dat het aantal malen dat een bepaalde intervallengte voorkomt, anders is dan men op grond van een 'random'

volgorde van de Td's zou verwachten. Dit kan onderzocht worden door elke relatie tussen de succesievelijke Td's te verbreken. Om dit te bereiken zijn de gemeten waarden 'gerandomiseerd'. Omdat het aantal mogelijke combinaties bij 700 tot 1400 waarnemingen zeer groot is, is het randomizeren bij elke dataset 1000-maal herhaald. Na elke 'randomisatie' is het aantal malen, dat de verschillende intervallengtes voorkomen bepaald. Als alle 'randomisaties' voltooid zijn, is voor elke intervallengte het gemiddelde en de standaarddeviatie berekend. De frequentie van het voorkomen van opeenvolgende gelijke Td's is hierbij apart bepaald.
Voor het 'randomizeren' van de Td-volgorde is een 'shuffling' algorithme gebruikt (Knuth 1981). Dit algorithme maakt gebruik van een pseudorandom getallen generator (PRG). In principe is hier sprake van een Monte Carlo methode (Kennedy en Gentle 1980, Knuth 1981). De 'random' getallen, die voortkomen uit een PRG zijn vanuit een mathematisch oogpunt per definitie niet random, maar quasi-random. Dit betekent dat de resultaten beinvloed zouden kunnen zijn door de eigenschappen van de generator. Om dit te onderzoeken is elke simulatie met verschillende PRG's herhaald: een 'linear congruential' (Press et al., 1986), een 'subtractive' generator (Knuth 1981) en een generator voor 16 bits computers (Wichmann en Hill, 1987). Met deze drie PRG's werden dezelfde resultaten verkregen. Hieruit is geconcludeerd, dat de PRG geen invloed gehad hebben op de analyseresultaten.

6.2.3 Een nummeriek voorbeeld

Als toelichting op de gebruikte procedure het volgende nummerieke voorbeeld:

Meetwaarden:	107	110	112	115	103	112	109	109	100	114	101
Label:	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K

Deze reeks representeert een opeenvolgende serie meetwaarden. Onder elk getal staat een letter, het label, waarmee de positie van het getal in de reeks is aangegeven. De getallen A en B vormen een dalende reeks. Bij de intervallengte indeling blijft deze buiten beschouwing, omdat onduidelijk is wat er zich afgespeeld heeft voor het getal A. Bevindt dit getal zich aan het begin of midden in een reeks? De getallen B, C en D vormen een stijgende reeks met intervallengte 2 en de getallen E en F een dalende reeks (intervallengte 1) enz. De getallen G en H vormen een paar gelijken. Met behulp van de labels kunnen de meetwaarden in een 'random' volgorde gezet worden. Voor deze nieuwe volgorde is de intervallengte van de stijgende en dalende reeksen en het aantal opeenvolgende gelijke Td's bepaald. Door deze werkwijze een groot aantal malen te herhalen kan voor elke combinatie een gemiddelde en een standaarddeviatie berekend worden. Als de frequentie van de combinaties van de oorspronkelijke volgorde van de

meetwaarde overeenkomt met het resultaat van de Monte Carlo methode kan hieruit afgeleid worden, dat deze volgorde door het toeval bepaald is.

6.2.4 Het bepalen van de 'turning points'

Bij het vergelijken van drie opeenvolgende experimentele cycli b.v. $_{L}Td_{j}$, $_{R}Td_{j+1}$ en $_{L}Td_{j+2}$, kan de situatie ontstaan dat $_{R}Td$ groter (c.q. kleiner) is dan de beide andere drempels. We definieren deze $_{R}Td$ als een koud (c.q. warm) 'turning point' (TP). De term turning point is ontleend aan Kendall et al. (1983). In het bovenstaande voorbeeld zijn de getallen met het label D en E respectievelijk een koud en een warm TP. Het is van belang zich te realiseren, dat bij een warm turning point de voorafgaande èn de volgende Td groter zijn dan het turning point. Bij een koud turning point is de voorafgaande en de volgende Td juist kleiner. Deze methode kan alleen uitgevoerd worden bij een lange continue reeks waarnemingen, omdat door het optreden van spontane passages het aantal mogelijke turning points aanmerkelijk gereduceerd wordt. Het voorvoegsel L en R heeft betrekking op het linker resp. rechter compartiment.

Om een goede visuele vergelijking mogelijk te maken zijn de warme en koude turning points en de vertrektemperaturen als cumulatieve frequentieverdelingen weergegeven. De Kolmogorov-Smirnov-test voor twee steekproeven is gebruikt voor het vergelijken van deze cumulatieve frequentieverdelingen (Sokal en Rohlf, 1981).

§6.3 De lengte van de intervallen

Zowel de gemeten frequenties van de intervallengtes als de met de Monte Carlo methode verkregen resultaten zijn samengevat in tabel 6.3.1 en het addendum bij hoofdstuk 6. Het is opvallend dat een groot deel van de intervallen nl. 80 - 90% van de dalende en stijgende intervallen de lengte 1 heeft.
De frequentie van de intervallengtes tijdens thermoregulatiegedrag verschilde van die bij de Monte Carlo methode. Intervallengte 1 komt systematisch vaker voor dan men op grond van een random volgorde van Td's zou verwachten (tabel 6.3.1). De grootte van het verschil tussen het gemeten en na simulatie verkregen resultaat is meerdere malen de standaarddeviatie. Dit is een duidelijke aanwijzing, dat er een relatie is tussen de succesievelijke Td's. Met andere woorden ook de opeenvolgende 'metingen' van de vertrektemperaturen (§6.2) zijn statistisch gezien afhankelijk van elkaar. Als de vis bij een lage temperatuur vertrekt is er een grote kans, dat de volgende vertrektemperatuur hoger is en omgekeerd als de vis bij een hoge temperatuur vertrekt is de kans groot dat de volgende vertrektemperatuur lager is. Uiteraard speelt dit fenomeen zich af binnen de 'range' van de Td

verdeling. Dit is aanwijzing dat de vis bij de decisie om over te zwemmen naar het andere compartiment de ervaring gebruikt opgedaan bij de voorafgaande passage. Het dier corrigeert binnen een bepaalde marge zijn gedrag. Wanneer de vis tijdens een experimentele cyclus minder aandacht heeft besteed aan de temperatuurdaling en daardoor bij een lage temperatuur terecht is gekomen, wordt dit bij de volgende passage gecorrigeerd.

Intervallengte 2 komt bij de stijgende tendens systematisch minder vaak voor dan op grond van een onafhankelijke reeks metingen (Monte Carlo methode) verwacht zou worden (tabel 6.3.1). Dit verschil is ter grootte van meerdere standaarddeviaties. Drie opéénvolgende stijgende of dalende Td's komen dus minder vaak voor dan op grond van een toevallige volgorde van de Td's verwacht zou mogen worden.
Er wordt op gewezen, dat de gemeten frequentie van de intervallengtes 3 en 4 bij stijgend en dalend systematisch van elkaar verschillen. Bij stijgend komen deze lengtes minder vaak voor. Stijgend betekent hier dat de succesievelijke Td's groter zijn. Uitgaande van de redenering in §6.1 is er bij stijgend een afname in de motivatie voor thermoregulatiegedrag en bij dalend een toename. Het feit dat bij stijgend de intervallengtes 3 en 4 minder frequent zijn zou een aanwijzing kunnen zijn dat de afname vrijwel momentaan verloopt. De hiermee gepaard gaande verlaging van de vertrektemperatuur zou een geleidelijke verhoging van de alertheid tot gevolg kunnen hebben. Deze toename in de alertheid kan afgeleid worden uit het t.o.v. stijgend veelvuldig voorkomen van intervallengtes 3 en 4 bij dalend. Met deze interpretatie kan het verschil in frequentie tussen stijgend en dalend verklaard worden.

Het komt voor dat twee of meer opeenvolgende Td's gelijk zijn. Onderzocht is of de gemeten frequentie van deze Td's verschillend is van hetgeen men op grond van toeval zou verwachten. Voor deze analyse is dezelfde simulatie methode gebruikt als bij de intervallengtes. In tabel 6.3.2 zijn de resultaten samengevat. De gemeten frequenties blijken overeen te komen met de gemiddelde frequenties na simulatie. De gemeten frequentie van de gelijke drempels is dus onafhankelijk van de volgorde van de Td's en wordt door het toeval bepaald. Als deze conclusie juist is, zal het gemiddelde van de gelijke temperatuurdrempels in het centrum (d.w.z. rond de mediaan) van de totale Td verdeling liggen. In dit gebied bevinden zich naar verhouding de meeste waarnemingen. Op statistische gronden is te verwachten, dat in deze regio de kans op twee of meer opeenvolgende gelijke Td's het grootst is. In tabel 6.3.3 zijn de resultaten van dit onderzoek weergegeven. De gemiddelden van de opeenvolgende gelijke Td's blijken inderdaad weinig af te wijken van de mediaan van de totale Td verdeling.

De resultaten van de analyse van de opeenvolgende gelijke Td's kunnen als volgt geïnterpreteerd worden. Uit de experimenten van Bull (1936), Bardach en Bjorklund (1957) blijkt dat vissen in staat zijn om temperatuursverschillen in de orde van 0.05° Celsius waar te nemen. Hierbij worden waarschijnlijk temperatuurzintuigen in de huid gebruikt. De meetnauwkeurigheid van onze apparatuur was 0.1° Celsius. Als de vis bij het thermoregulatiegedrag van deze meetnauwkeurigheid gebruik had gemaakt, is te verwachten dat het aantal gelijke Td's veel groter zou zijn dan nu gemeten. Hieruit kan afgeleid worden, dat de gevoeligheid van de huidzintuigen niet van doorslaggevende betekenis zijn geweest bij het tot stand komen van de Td. Dit betekent tevens, dat kleine locale fluctuaties in de temperatuur van het compartiment voor de vis van onderschikt belang waren.

Het resultaat van de Monte Carlo methode leek verrassend. Daarom is dezelfde analyse ook uitgevoerd met twee andere randomgeneratoren. Deze analyses gaven overeenkomstige resultaten en worden hier niet verder besproken.

Het veelvuldig voorkomen van de intervallengte 1 is een aanwijzing, dat er bij het thermoregulatiegedrag sprake is van een zig-zag effect: hoge en lage Td's komen alternerend voor. Dit brengt ons bij het onderwerp voor de volgende paragraaf: de turning points.

Tabel 6.3.1 De gemeten (A) en met de Monte Carlo methode (B) verkregen frequenties van de intervallengtes[1] bij vis 454, d.d. 11-15/06/83, N=797 en 22 spontane reacties.

Interval lengte	Dalende tendens A	B	s.d.	Stijgende tendens A	B	s.d.
1	218	153.3	10.1	215	150.2	9.4
2	21	49.1	5.9	26	48.7	6.1
3	12	10.6	3.0	3	10.4	3.0
4	0	1.4	1.2	1	1.4	1.2
5	1	0.2	0.3	0	0.2	0.4

[1] In het addendum van dit hoofdstuk staan de frequenties van de intervallengtes van experimenten met andere vissen.

Tabel 6.3.2 De gemeten (A) en met de Monte Carlo methode (B) verkregen frequenties van de opeenvolgende gelijke Td's[1] bij vis 454, d.d. 11-15/06/83.

aantal gelijke Td's	A	B	s.d.
2	52	54.8	6.4
3	8	5.6	2.3
4	1	0.7	0.9
5	0	0.1	0.3

[1] In het addendum van dit hoofdstuk staan de frequenties van de opeenvolgende gelijke Td's van experimenten bij andere vissen.

Tabel 6.3.3 Het gemiddelde van de verschillende catagoriën van de opeenvolgende gelijke Td's[1] bij vis 454, d.d. 11-15/06/83 (sessie 3 t/m 5), mediaan van de totale Td verdeling: 0.80 N : 789

aantal gelijke Td's	gemiddelde	s.d.	N
2	0.78	0.22	52
3	0.79	0.19	8

[1] In het addendum van dit hoofdstuk staan de frequenties van de opeenvolgende gelijke Td's van experimenten bij andere vissen.

§6.4 Turning points

Onder een 'turning point' (TP) worden de middelste Td van een triplet verstaan, waarbij deze Td-waarde groter (c.q. kleiner) is dan de beide anderen Td's (koud, resp. warm TP). De verdelingen van alle warme en koude turning points zijn in figuur 6.4.1 en 6.4.2 weergegeven. Deze verdelingen zijn gebaseerd op de temperatuurdrempels gemeten in zowel het linker als het rechter compartiment van de shuttlebox. Bij vis 491 was het gedrag overdag anders dan 's nachts. De TP's uit deze perioden zijn bij deze vis daarom afzonderlijk weergegeven (fig. 6.4.2).
Tijdens het uitvoeren van de in de vorige paragraaf beschreven analyse rees de vraag of de warme en koude turning points in beide compartimenten even vaak voorkomen. Bij dit onderzoek zijn alleen de turning points betrokken, waarbij de derde Td van het triplet ook een turning point is (TP1). Een groot deel van het totaal aantal turning points voldoet aan deze conditie (tabel 6.4.1). De interpretatie hiervan is, dat de vis dan als het ware 'zigzagt' tussen twee grenswaarden van de Td. Tijdens een dergelijke periode heeft het dier mogelijk een bijzondere aandacht voor temperatuursveranderingen.

In tabel 6.4.2 zijn de frequenties van de turning points van de vissen uit §6.3 weergegeven. Opmerkelijk is dat het aantal warme en koude TP1's in beide compartimenten verschillend is. De warme TP1's komen vooral voor in het linker compartiment en de koude in het rechter. Dit kan betekenen, dat de vis in het ene compartiment andere kriteria gebruikt heeft voor het uitvoeren van het thermoregulatiegedrag dan in het andere compartiment. Bij alle vissen is er geen aantoonbaar verschil in de Tu waarde tussen de compartimenten, maar het gedrag van in de compartimenten is wèl verschillend. In het ene compartiment zwemt het dier bij een kleinere temperatuurdaling over dan in het andere. Dit resultaat is een aanwijzing, dat de decisies van de vis bepalend zijn voor de grootte van de Td.
Om dit beter te onderzoeken zijn de cumulatieve verdelingen van de Td, het warme TP1 en het koude TP1 van het linker compartiment vergeleken met die uit het rechter. In de figuren 6.4.3 en 6.4.4 worden de resultaten samengevat. Bij vis 454 is de gemiddelde Td rechts hoger dan links (fig. 6.4.3). Dit verschil is in de orde van 0.2° Celsius. In figuur 6.4.3A is te zien dat de verdeling van de rechter Td t.o.v. de linker Td naar rechts verschoven is. Het verschil is significant ($P<0.001$). Het is opmerkelijk, dat de beide warme TP1's en de beide koude TP1's ***niet*** verschillend zijn ($P<0.999$, resp. $P<0.860$) (figuur 6.4.3B). Hieruit blijkt, dat deze vis in beide compartimenten voor het thermoregulatiegedrag dezelfde kriteria heeft gehanteerd.
Bij vis 491 is de vorm van de cumulatieve Td verdeling van het linker compartiment anders dan van het rechter (fig. 6.4.4). Dit komt ook tot uitdrukking in de gemiddelde Td links (1.70° C., s.d. 0.84, N=662) en rechts (1.35° C., s.d. 0.54, N=651). We troffen bij de andere vissen hetzelfde verschijnsel aan.

Tabel 6.4.1 Het aantal turning points (TP) en het aantal en het percentage van de turning points, waarbij de derde Td uit het triplet ook een turning point (TP1) is.

Visno[1]	TP links	TP1 links	(%)	TP rechts	TP1 rechts	(%)
454	250	188	75.2	247	181	73.3
491	449	340	75.7	447	336	75.2
497	402	334	83.1	430	295	68.6
500	314	242	77.1	342	236	69.0

[1] Dezelfde experimentele gegevens zijn gebruikt voor de tabellen van §6.3.

Uit de analyse van de experimentele resultaten blijkt, dat de populatie Td waarnemingen opgebouwd gedacht moet worden uit twee deelpopulaties: de warme en koude turning points. Deze ontstaan doordat het dier in zijn gedrag twee kriteria gebruikt. Aan het ene

kriterium wordt voldaan bij een geringe temperatuurdaling en voor het andere is een grote daling nodig. Uit het veelvuldig voorkomen van intervallengte 1 (tabel 6.3.1) kan afgeleid worden, dat deze kriteria alternerend worden gehanteerd. De beide catagoriën turning points kunnen gezien worden als uiting van de verschillende mechanismen, die betrokken zijn bij het tot stand komen van de decisie om al of niet te reageren op de temperatuurdaling. Uit het feit, dat de helling van de cumulatieve verdeling van de warme en de koude TP1's vrijwel overeenkomt, kan afgeleid worden dat er sprake is van een verschuiving van het kriterium.
Ondanks het feit, dat de verdeling van de Tu bij beide compartimenten gelijk is, heeft vis 491 een duidelijke preferentie voor het linker compartiment (grote Td-waarde). Dit komt ook tot uiting in de cumulatieve distributie van de koude TP's. Dit betekent, dat hoewel de compartimenten in thermisch opzicht niet verschillend zijn, deze vis in het ene compartiment andere maatstaven gebruikt voor het thermoregulatiegedrag dan in het andere. Hieruit kan afgeleid worden, dat voor deze vis de fysische omstandigheden in beide compartimenten verschillend waren. Opmerkelijk is, dat er hier ook sprake is van een verschuiving: de kurve van de koude TP1 uit het rechter compartiment t.o.v. de kurves van de warme TP1's.

De conclusie is, dat decisies van het dier om het kriterium voor overzwemmen te verleggen duidelijk aantoonbaar zijn. Het feit dat er geen verandering van de helling van de cumulatieve verdelingen te zien is, is een indicatie dat de vis steeds hetzelfde detectiemechanisme gebruikt heeft.
Het is aannemelijk dat het systeem van kriteria en decisies gelocaliseerd is in het centraal zenuwstelsel. Wanneer deze veronderstelling juist is dan moeten farmaca, waarvan bij zoogdieren bekend is, dat deze het tot stand komen van decisies beinvloeden, eveneens een kriteriumverschuiving teweeg brengen. De benzodiazepines hebben een kalmerend effect, dat tot uitdrukking komt in het minder alert reageren op stimuli. Deze stoffen zijn agonisten van de neurotransmitter GABA (gamma-aminoboterzuur) (Haefely 1987). Neuronen met deze neurotransmitter hebben een inhiberend effect op andere neuronen in het centraal zenuwstelsel (Kyburz 1986). De benzodiazepines versterken dit effect. Het is denkbaar, dat deze stoffen ook een inhiberend effect hebben op de decisie-eenheden met als gevolg een kriteriumverschuiving. Diazepam, een stof uit deze groep, leek ons het meest geschikte farmacon.
De resultaten van dit onderzoek worden in de volgende paragraaf vermeld.

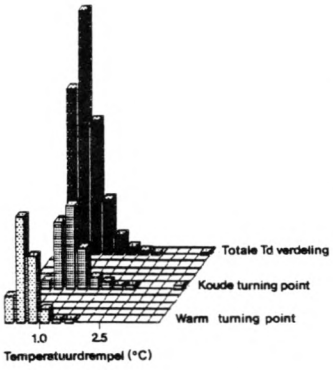


Fig. 6.4.1 Histogrammen van de totale Td-verdeling en van de warme en koude turning points in het linker en rechter compartiment bij vis 454, dd 11-15/06/83. Het achterste histogram geeft de totale Td verdeling weer (gemiddelde 0.85 ° C., s.d. 0.37, N=789), het middelste TP koud TP (gemiddelde 1.13 °C., s.d. 0.36, N=248) en het voorste histogram TP warm (gemiddelde 0.60 °C., sd 0.24, N=249).

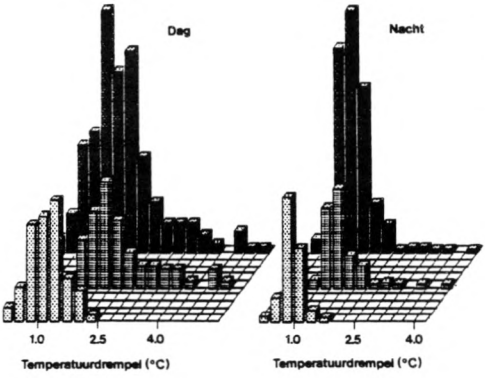


Fig. 6.4.2 Histogrammen van de totale Td verdeling en van de warme en koude turning points overdag (10 - 16 uur) en 's nachts (22 - 4 uur) in het linker en rechter compartiment bij vis 491, dd 10-13/06/83. Het achterste histogram geeft de totale Td verdeling weer (overdag: gemiddelde 1.81 °C., s.d. 0.88 en N=288; 's nachts: gemiddelde 1.16 ° C., s.d. 0.44, N=412), het middelste TP koud TP (overdag: gemiddelde 2.35 °C., s.d. 0.85, N=103; 's nachts: gemiddelde 1.45 °C., s.d. 0.45, N=134) en het voorste histogram TP warm (overdag: gemiddelde 1.16 °C., sd 0.43, N=106; 's nachts: 0.89 °C., s.d. 0.23, N=128).

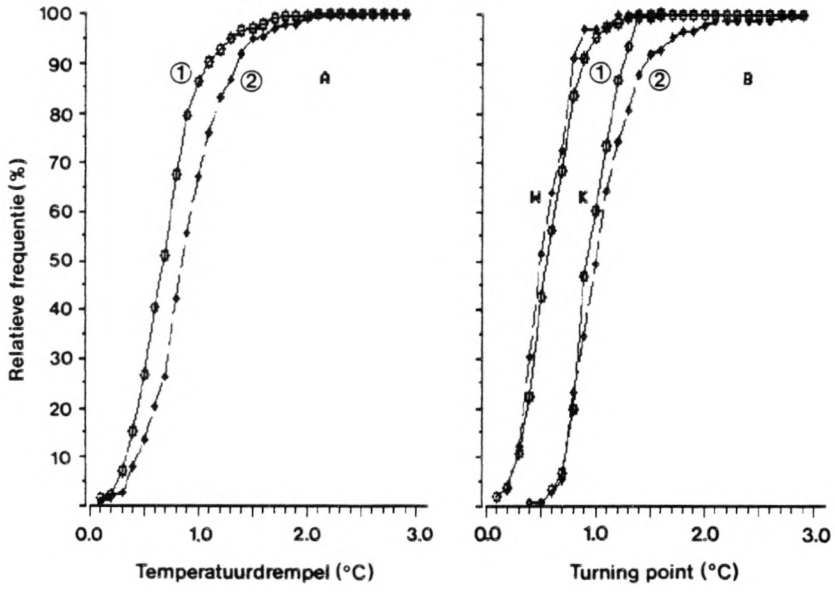


Fig. 6.4.3 Cumulatieve verdelingen van Td (A) en de warme (W) en koude (K) turning points (B) in de beide compartimenten bij vis 454, dd 11-15/06/83. Bij de turning points is als voorwaarde gesteld, dat derde Td uit het triplet ook een turning point is. De open cirkels (1) hebben betrekking op het linker compartiment en de gesloten cirkels (2) op het rechter. De gemiddelde Td links is: 0.76° C., s.d. 0.32, N=397. De gemiddelde Td rechts is: 0.95° C., s.d. 0.39, N=392. Beide cumulatieve verdelingen van de Td verschillen significant (P<0.001). Er is geen significant verschil in de cumulatieve verdeling (B) van de beide warme TP's (W) (P<0.999: links gemiddelde 0.63° C., s.d. 0.25, N=158 en rechts 0.58° C., s.d. 0.22, N=33) en de beide koude TP's (K) (P<0.870: links gemiddelde 1.01° C., s.d. 0.20, N=30 en rechts gemiddelde 1.12, s.d. 0.39, N=148).

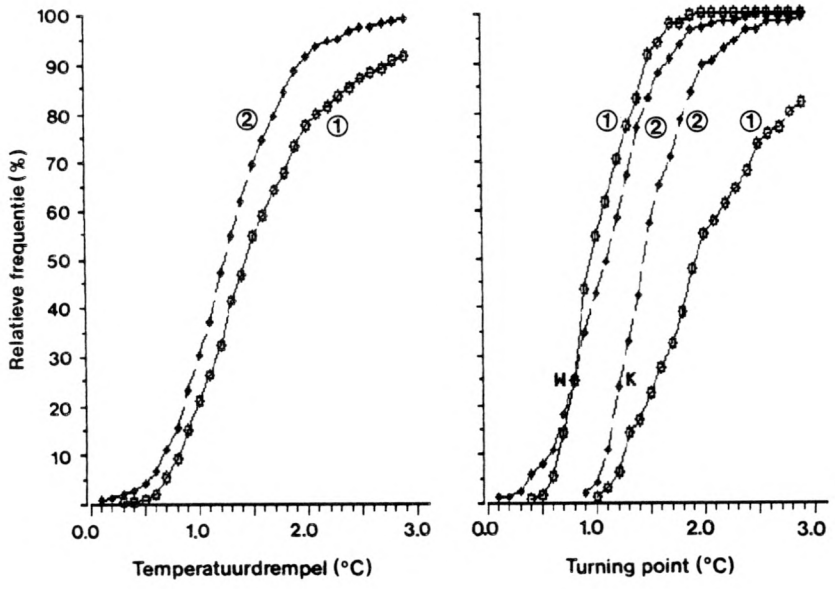


Fig. 6.4.4 Cumulatieve verdelingen van Td (A) en de warme (W) en koude (K) turning points (B) in de beide compartimenten bij vis 491, dd 10-13/06/83. Bij de turning points is als voorwaarde gesteld, dat de derde Td uit het triplet ook een turning point is. De open cirkels (1) hebben betrekking op het linker compartiment en de gesloten cirkels (2) op het rechter. De gemiddelde Td links is: 1.70° C., s.d. 0.84, N=662. De gemiddelde Td rechts is: 1.35° C., s.d. 0.54, N=651. Beide cumulatieve verdelingen van de Td verschillen significant (P<0.001). Er is geen significant verschil in de cumulatieve verdeling van de beide warme TP's (P<0.161: links gemiddelde 1.09° C., s.d. 0.33, N=127 en rechts 1.16° C., s.d. 0.47, N=213). De beide koude TP's verschillen echter wel (P<0.001: links gemiddelde 2.23° C., s.d. 0.87, N=213 en rechts gemiddelde 1.58, s.d. 0.41, N=123).

Tabel 6.4.2 De verdeling van de warme (W) en koude (K) turning points (TP1) over het linker en rechter compartiment.

Visno[1]	W TP1 links	K TP1 links	W TP1 rechts	K TP1 rechts
454	158	30	33	148
491	127	213	213	123
497	135	199	174	121
500	112	130	120	116

[1] De experimentele gegevens waarop deze tabel is gebaseerd, zijn ook gebruikt in de tabellen van §6.3 en het addendum bij dit hoofdstuk.

§6.5 Het effect van diazepam op het thermoregulatiegedrag

6.5.1 Methode

Bij dit onderzoek is continu een diazepamoplossing in beide compartimenten gepompt. Om een goede menging in het water te verkrijgen is de toevoerslang in de luchtbellenstroom van de bruiser geplaatst. Voor de diazepamoplossing werd de inhoud van 1 of meer ampullen Stesolid^{R} (Dumex, 1 ampul bevat 10 mg diazepam per 2 ml vloeistof) met water verdund. Deze diazepamoplossing werd telkens vers aangemaakt. Per uur is 1.5 ml oplossing in een compartiment gepompt. Het water in een compartiment werd via een doorstroomsysteem ververst. De doorstromingsnelheid was 165 ml water/uur. Bij het begin van deze experimenten was niet bekend bij welke concentratie een effect van dit farmacon zichtbaar zou zijn. Bij het eerste experiment met vis 478 zijn daarom oplopende concentraties (75, 225 en 450 µg/uur) toegediend. Bij het laatste experiment (vis 500) is aan het water gedurende het hele experiment 450 µg diazepam per uur toegediend.

6.5.2 Resultaten

Tijdens het toedienen van diazepam, ontstonden na de eerste dag op de wanden van het aquarium slijmafzettingen. Deze slijmafzettingen werden veroorzaakt door irritatie van de huid van de vis. Een controle van het aquariumwater wees uit dat het nitraat- en nitrietgehalte en de pH niet veranderd waren (hoofdstuk 2). Het is bekend, dat diazepam ook als spierrelaxans kan werken. Uit het feit dat beide vissen tijdens het toedienen van diazepam geen afwijkingen vertoonden in het zwemgedrag is geconcludeerd, dat de spierrelaxerende werking van dit farmacon tijdens dit experiment van onderschikte betekenis is geweest. De resultaten van het onderzoek met vis 478 en 500 zijn samengevat in tabel 6.5.1 resp. 6.5.2. Helaas is het materiaal nummeriek beperkt. Bij deze analyse van de TP's zijn evenals in §6.4 alleen de turning points betrokken, waarbij de derde Td uit het triplet ook een turning

point is (TP1).
Bij vis 478 is er tijdens de periode dat diazepam toegediend is een geleidelijke toename van de Td waargenomen. Na het stoppen van het toedienen van diazepam duurt het ongeveer 60 uur voordat de gemiddelde Td weer op het oude niveau is teruggekeerd. De standaarddeviaties van de gemiddelde Td's veranderen niet wezenlijk.
Er is een voorkeur om in het linker compartiment te verblijven dit blijkt uit de gemiddelde Td (tabel 6.5.1, controle periode t/m diazepam periode 1). Dit komt ook tot uitdrukking in de frequenties van de koude TP1's, die hoger is in het linker dan in het rechter compartiment. Aan het einde van de experimentele periode is de voorkeur voor het linker compartiment veranderd in een voorkeur voor het rechter. In figuren 6.5.1 en 6.5.2 zijn de cumulatieve verdelingen van de turning points voor de aanvang en direct na het beeindigen van de belasting met diazepam weergegeven. In deze figuren is eveneens te zien, dat de vis in de twee compartimenten verschillende kriteria heeft gehanteerd. De verdelingen van de warme en koude turning points is in beide compartimenten verschillend. Opmerkelijk is, dat er grote overeenkomst is in de vorm van de verdelingen van beide turning points uit het rechter compartiment.

6.5.3 Discussie
In de psychonomie en in de psychofysica worden overeenkomstige verschuivingen van psychometrische detectiekrommen beschreven (Eijkman, 1976). De cumulatieve verdelingskurven zijn vergelijkbaar met psychometrische detectiekurven. De gevonden verschuiving is een aanwijzing, dat deze turning points zijn gebaseerd op een verschuiving van het kriterium om over te zwemmen (zie ook §6.4). Het toenemen van de gemiddelde Td toont aan, dat het mogelijk is om met diazepam het gedrag van deze vis te beinvloeden. Dit resultaat was aanleiding om een andere vis (500) langdurig met een hogere dosering (450 µg/uur) te belasten. Er is bij deze vis een verschuiving in de frequentie van de turning points in de compartimenten. Aanvankelijk komen de koude turning points voornamelijk voor in het rechter en de warme in het linker compartiment. In de tweede fase van de belasting is dit verschil minder groot en aan het einde van de experimentele periode is de verdeling omgekeerd aan die van de controle periode en komen de warme turning points voornamelijk voor in het rechter compartiment. De gemiddelde Td verschuift in deze periode naar een hogere waarde. Of anders geformuleerd het dier wordt onverschilliger voor zijn omgevingstemperatuur. Dit blijkt ook uit het groter worden van de standaarddeviatie van de Td (tabel 6.5.2). Het toenemen van de standaarddeviatie komt ook tot uitdrukking in de geringe helling van de cumulatieve verdelingskromme (fig. 6.5.4) Op grond hiervan mag verwacht worden, dat het verschil tussen de gemiddelden van de deelpopulaties (in dit geval de warme en koude turning points) veel

groter wordt dan tijdens de controle periode. Uit tabel 6.5.2 en uit de figuren 6.5.3 (controle periode) en 6.5.4 (tweede fase van de diazepam belasting) blijkt, dat de experimenteel verkregen resultaten in overeenstemming zijn met de verwachting.

Hieruit kan geconcludeerd worden, dat diazepam het te verwachten effect op het gedrag van de vis heeft. Tevens is hiermee de rol van een decisie-eenheid bij het tot stand komen van het thermoregulatiegedrag aangetoond.

Tabel 6.5.1 Het effect van diazepam op de gemiddelde Td, de gemiddelde warme (wTP1) en koude turning points (kTP1) bij vis 478.

periode	comp	Td	s.d.	N	wTP1	s.d.	N	kTP1	s.d.	N
controle[1]	L	1.02	0.48	150	0.55	0.28	22	1.23	0.39	52
	R	0.93	0.47	149	0.68	0.21	50	1.25	0.57	15
diazepam 1[2]	L	1.25	0.53	155	0.88	0.28	13	1.43	0.43	55
	R	1.02	0.41	151	0.89	0.26	55	1.24	0.37	14
diazepam 2[3]	L	1.33	0.36	77	1.06	0.20	10	1.64	0.25	16
	R	1.31	0.31	76	1.19	0.28	17	1.45	0.26	13
diazepam 3[4]	L	1.51	0.46	143	0.98	0.41	12	1.71	0.38	76
	R	1.21	0.35	142	1.10	0.26	70	1.49	0.19	15
na	L	1.20	0.42	178	0.87	0.35	15	1.50	0.36	42
diazepam 1[5]	R	1.10	0.39	176	0.85	0.29	45	1.59	0.35	19
na	L	1.15	0.45	254	0.91	0.42	45	1.46	0.37	39
diazepam 2[6]	R	1.22	0.52	251	0.85	0.29	40	1.66	0.45	54
na	L	0.99	0.35	322	0.79	0.25	80	1.26	0.22	34
diazepam 3[7]	R	1.11	0.39	329	0.85	0.29	34	1.25	0.33	76

[1] Deze controle fase heeft betrekking op een periode van 22 uren.
[2] De eerste fase van de belasting met diazepam: 0 t/m 21 uur, gerekend vanaf het begin van het toedienen. Dosis: 75 µg/uur.
[3] 34 uur t/m 43 uur gerekend vanaf start toedienen. Dosis: 225 µg/uur.
[4] 44 uur t/m 65 uur gerekend vanaf start toedienen. Dosis: 450 µg/uur.
[5] 68 uur t/m 97 uur gerekend vanaf start toedienen. In deze periode is geen diazepam meer toegediend en tevens is de doorstromingsnelheid met schoon water vertweevoudigd.
[6] 98 uur t/m 117 uur gerekend vanaf start toedienen. In deze periode is geen diazepam meer toegediend.
[7] 123 uur t/m 167 uur gerekend vanaf start toedienen. In deze periode is geen diazepam meer toegediend.

Tabel 6.5.2 Het effect van diazepam op de gemiddelde Td, de gemiddelde warme (wTP1) en koude turning points (kTP1) bij vis 500.

periode	comp	Td	s.d.	N	wTP1	s.d.	N	kTP1	s.d.	N
controle[1]	L	0.53	0.26	178	0.42	0.13	77	0.89	0.22	8
	R	0.68	0.22	178	0.48	0.22	6	0.77	0.17	83
diazepam 1[2]	L	0.47	0.28	303	0.38	0.17	140	1.42	0.62	9
	R	0.71	0.28	299	0.71	0.44	7	0.81	0.24	136
diazepam 2[3]	L	1.37	1.15	396	0.86	0.83	101	2.37	1.23	69
	R	1.31	1.07	386	0.96	0.55	69	1.71	1.31	96
na	L	1.08	0.93	280	0.75	0.72	81	1.80	1.00	36
diazepam 1[4]	R	1.19	0.99	273	0.77	0.50	32	1.43	1.05	76
na	L	1.45	0.90	323	0.42	0.14	18	1.93	0.78	144
diazepam 2[5]	R	0.64	0.34	303	0.62	0.40	130	0.82	0.21	13

[1] Deze controle fase heeft betrekking op een periode van 15 uren.
[2] De eerste fase van de belasting met diazepam: 15 t/m 44 uur, gerekend vanaf het begin van het toedienen. Dosis: 450 µg/uur.
[3] 44 uur t/m 119 uur gerekend vanaf start toedienen. Dosis: 450 µg/uur.
[4] 120 uur t/m 162 uur gerekend vanaf start toedienen. In deze periode is geen diazepam meer toegediend en tevens is de doorstromingsnelheid met schoon water vertweevoudigd.
[5] 164 uur t/m 210 uur gerekend vanaf start toedienen. In deze periode is geen diazepam meer toegediend.

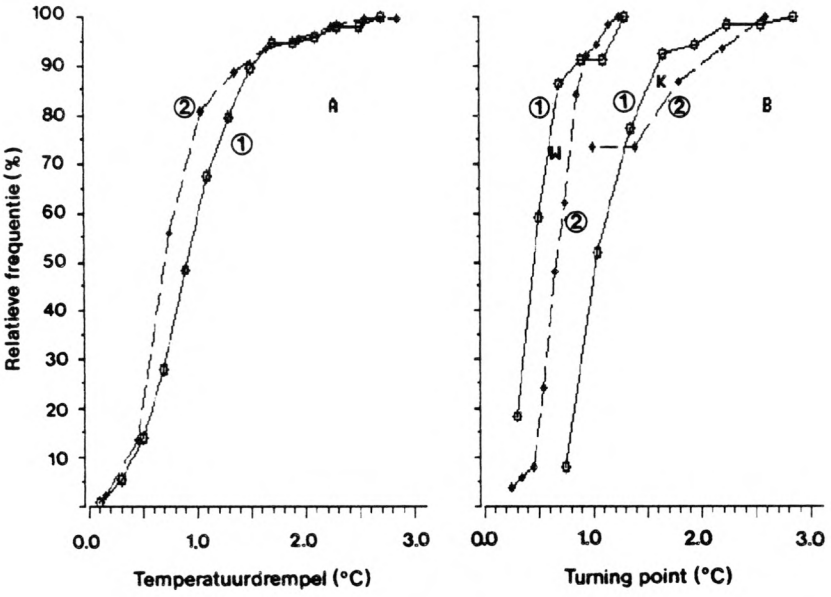


Fig. 6.5.1 Cumulatieve verdelingen van Td (A) en de warme (W) en koude (K) turning points (B) in de beide compartimenten bij vis 478, dd 2/05/83, voordat diazepam is toegediend. Bij de turning points is als voorwaarde gesteld, dat de derde Td uit het triplet ook een turning point is. De open cirkels (1) hebben betrekking op het linker compartiment en de gesloten cirkels (2) op het rechter. Het onregelmatige verloop van de cumulatieve distributie van de warme en koude turning points wordt veroorzaakt door het geringe aantal beschikbare metingen. De statistische parameters van deze verdelingen zijn samengevat in tabel 6.5.1 (controle periode).

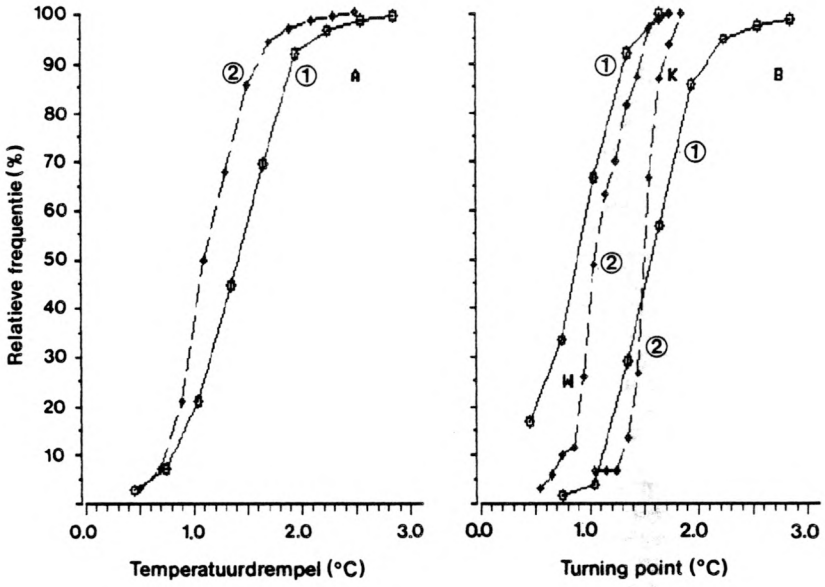


Fig. 6.5.2 Cumulatieve verdelingen van Td (A) en de warme (W) en koude (K) turning points (B) in de beide compartimenten bij vis 478, dd 6/05/83, direct nadat gestopt is met het toedienen van diazepam. Bij de turning points is als voorwaarde gesteld, dat de derde Td uit het triplet ook een turning point is. De open cirkels (1) hebben betrekking op het linker compartiment en de gesloten cirkels (2) op het rechter. Het onregelmatige verloop van de cumulatieve distributie van de warme en koude turning points in het rechter compartiment wordt veroorzaakt door het geringe aantal beschikbare metingen. De statistische parameters van deze verdelingen zijn samengevat in tabel 6.5.1 (na diazepam periode 1).

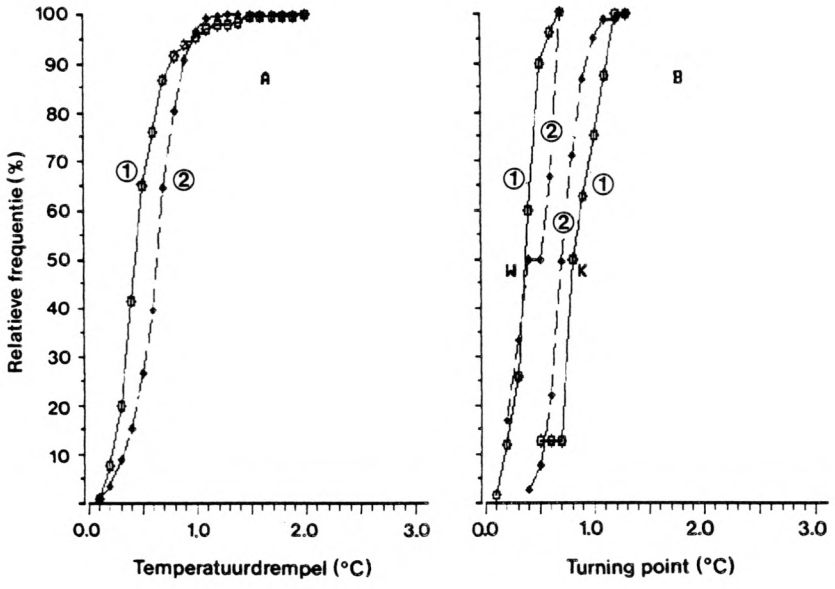


Fig. 6.5.3 Cumulatieve verdelingen van Td (A) en de warme (W) en koude (K) turning points (B) in de beide compartimenten bij vis 500, dd 8/05/83, voordat diazepam is toegediend. Bij de turning points is als voorwaarde gesteld, dat de derde Td uit het triplet ook een turning point is. De open cirkels (1) hebben betrekking op het linker compartiment en de gesloten cirkels (2) op het rechter. Het onregelmatige verloop van de cumulatieve distributie van de warme turning points in het rechter compartiment en de koude turning points links wordt veroorzaakt door het geringe aantal beschikbare metingen in deze compartimenten. De statistische parameters van deze verdelingen zijn samengevat in tabel 6.5.2 (controle periode).

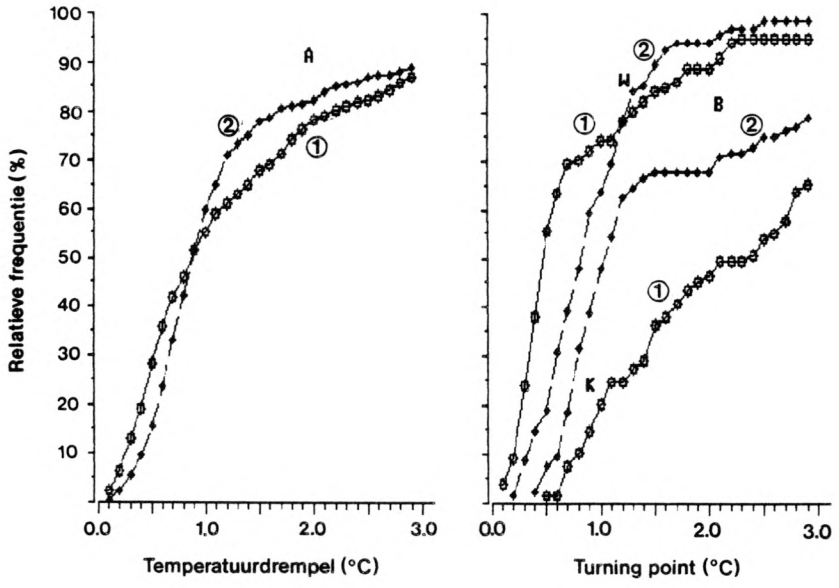


Fig. 6.5.4 Cumulatieve verdelingen van Td (A) en de warme (W) en koude (K) turning points (B) in de beide compartimenten bij vis 500, dd 10-13/05/83, in de laatste fase van de belasting met diazepam. Bij de turning points is als voorwaarde gesteld, dat de derde Td uit het triplet ook een turning point is. De open cirkels (1) hebben betrekking op het linker compartiment en de gesloten cirkels (2) op het rechter. Het onregelmatige verloop van de cumulatieve distributie van de warme turning points in het rechter compartiment en de koude turning points links wordt veroorzaakt door het geringe aantal beschikbare metingen in deze compartimenten. De statistische parameters van deze verdelingen zijn samengevat in tabel 6.5.2 (diazepam 2 periode).

§6.6 Hebben vissen een referentietemperatuur?

In het voorafgaande is vastgesteld, dat het thermoregulatiegedrag gebaseerd is op een systeem van kriteria en decisies. In hoofdstuk 4 wordt geconcludeerd, dat de vis waarschijnlijk een interne referentie'temperatuur' heeft, waarmee de actuele temperatuur vergeleken wordt. De aanwezigheid van een dergelijke 'setpoint'functie is echter

niet bewezen. In deze paragraaf wordt opnieuw de vraag gesteld of bij de thermoregulatie van vissen een 'setpoint'functie betrokken is.
De tot nu toe uitgevoerde analyses hebben betrekking op de Td, dit is de temperatuurdaling, die voorafgaat aan het overzwemmen van de vis. In de voorafgaande paragrafen was het noodzakelijk om het gedrag in beide compartimenten te kunnen vergelijken, dat de compartimenten in thermisch opzicht gelijkwaardig zijn. Daarom zijn alleen die experimenten geanalyseerd, waarbij het verschil tussen de bovengrenstemperaturen van beide compartimenten zo gering mogelijk is en bij voorkeur niet aantoonbaar verschillend. Desondanks is het gedrag van de vis in beide compartimenten soms verschillend (§6.4). De vraag komt op of de vis, als er een groot verschil tussen de bovengrenstemperaturen van beide compartimenten wordt aangebracht, nog steeds een thermoregulatiegedrag uitvoert. In hoofdstuk 4 is waarschijnlijk gemaakt, dat de vis over een eigen referentie'temperatuur' beschikken. Deze referentie ontstaat vermoedelijk in het centraal zenuwstelsel. Wanneer het verschil tussen de bovengrenstemperaturen van beide compartimenten dezelfde grootte orde heeft als de gemiddelde Td (1° Celsius), is deze referentie'temperatuur' het enige vaste punt voor de vis. Alleen met een interne referentie'temperatuur' kan de vis bewerkstelligen, dat de reële temperatuur waarbij het dier uit het compartiment vertrekt, voor beide compartimenten gelijk is. Als de vis in beide compartimenten bij het besluitvormingsproces voorafgaande aan het overzwemmen dezelfde kriteria hanteert, zal de standaarddeviatie van de gemiddelde vertrektemperatuur dezelfde grootte orde hebben als de standaarddeviatie van de gemiddelde Td bij een gering verschil tussen de compartimenten.
Bij het begin van dit onderzoek naar het thermoregulatiegedrag van vissen was de gelijkheid van de bovengrenstemperaturen van beide compartimenten problematisch. Een voorbeeld hiervan is een experiment met vis 480 (dd 07-13/10/1982). Bij dit experiment was de regeling van Tu niet stabiel en is de spreiding in de Tu waarden groot. Deze proef is in hoofdstuk 3 al aan de orde geweest, waarbij de temperatuurdrempel per compartiment geanalyseerd is. Een gedeelte van dit databestand is gebruikt om het effect van verschillende bovengrenstemperaturen op de vertrektemperaturen te onderzoeken. In de onderzochte periode was de gemiddelde bovengrenstemperatuur in het linker compartiment 19.79° C., s.d 0.11, N=134 en in het rechter 18.73° C., s.d. 0.33 en N=132. Bij de analyse van de vertrektemperatuur zijn de passages geselecteerd, waarbij de temperatuur bij het starten van de koeling in het centrum van de Tu verdeling lag: voor het linker compartiment in het gebied 19.8 - 20.0° C. en voor het rechter in 18.5 - 18.8°. De bovengrenstemperatuur verschilt dus 1.2° Celsius. De gemiddelde vertrektemperatuur links was 18.48°, s.d. 0.76, N=83 en rechts 18.32, s.d. 0.89 en N=56. De standaarddeviaties hebben dezelfde orde van grootte als bij de analyse van de gemiddelde Td (vergelijk tabel 3.3.1). In figuur 6.6.1 zijn twee cumulatieve frequentieverdelingen van de vertrektemperatuur in het linker en het rechter compartiment.

De beide verdelingen verschillen niet significant (P>0.999). Met andere woorden de vertrektemperaturen uit het linker en rechter compartiment zijn uit dezelfde populatie afkomstig. Het moment van overzwemmen van de vis wordt dus niet bepaald door de temperatuurdaling (verschil bovengrenstemperatuur en vertrektemperatuur), maar door het bereiken van een bepaalde momentane temperatuur. Dit is alleen mogelijk als in het thermoregulatiesysteem van de vis onafhankelijke referentie'temperatuur' aanwezig is. Hiermee wordt de veronderstelling uit hoofdstuk 4 bevestigd.

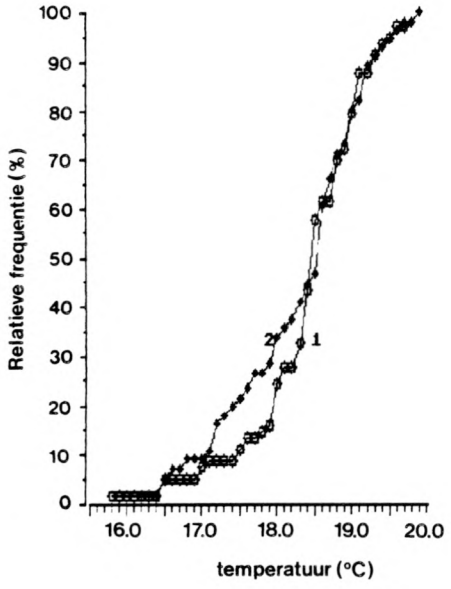


Fig. 6.6.1 In deze grafiek zijn twee cumulatieve frequentieverdelingen van de vertrektemperatuur weergegeven. Bij de open cirkels (1) was de Tu bij het starten van het koelen 19.8 - 20.0° C. (N=83). Bij de gesloten cirkels (2) was deze temperatuur 18.5 - 18.8° C. (N=56) De beide verdelingen verschillen niet significant (P>0.999) en zijn dus uit dezelfde populatie afkomstig.

Literatuurreferenties

Bardach, J.E., Bjorklund, R.G. Then temperature sensitivity of some American freshwater fishes. Am. Naturalist, 91, 233-251, 1957.

Bull,H.O. Studies on the conditioned rsponses in fishes. Part VII. Temperature perception in teleosts. J. Marine Biol. Assoc. 21, 1-27, 1936.

Eibl-Eibesfeldt, I. Ethology. Holt, Rinehart and Winston, New York, 1970.

Eijkman, E.G.J., Psychofysica. In: Handboek der psychonomie. J.A.

Michon, E.G.J. Eijkman en L.F.W. de Klerk (eds). Van Loghum Slaterus, Deventer, 1976.
Haefely, W. Development of anti-anxiety drugs. J. Drugtherapy and Research, 12, 15-, 1987.
Halliday, T.R., Motivation. In: Animal Behavior. Vol. 1. Causes and effects. Blackwell Scientific publications, Oxford, 1983. p. 100-.
Hinde, R.A. Animal behaviour. 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 1970.
Kendall, M., Stuart, A., Ord, J.K. The advanced theory of statistics. Vol. 3. Design and analysis and time-series. 4th ed. Charles Griffin and Co. London, 1983.
Kennedy, W.J., Gentle, J.E. Statistical computing. Marcel Dekker Inc. New York, 1980
Knuth, D.E. The art of computer programming. Vol. 2. Seminumerical algorithms. 2nd ed. Addison Wesley, Reading, 1981.
Kyburz, E. New benzodiazepine receptor ligands. Pharm. Weekblad, 121, 893-. 1986.
Press, W.H., Flannery, B.P., Teukolsky, S.A., Vetterling, W.T. Numerical recipes. The art of scientific computing. Cambridge University Press, Cambridge, 1986.
Roberts, J.L. Seasonal modulation of thermal acclimation and behavioral thermoregulation in aquatic animals. In: Marine Pollution: Functional Responses. Vernberg, W.B., Calabrese, A., Thurnberg, F.P., Vernberg, F.J. (eds). Academic Press, New York, 1979.
Sokal, R.R., Rohlf, F.J. Biometry. 2nd ed. W.H. Freeman and Co. New York, 1981.
Wichmann, B., Hill, D. Building a random-number generator. Byte, 12, 127-, 1987.

Addendum

De gemeten (A) en met de Monte Carlo methode (B) verkregen frequenties van de intervallengtes. Het vervolg van tabel 6.3.1 Vis 491, d.d. 10-13/06/83, N=1319 en 50 spontane reacties. Vis 497, d.d. 16-19/06/83, N=1412 en 245 spontane reacties. Vis 500, d.d. 18-20/05/83, N=1054 en 72 spontane reacties

vis 491

Interval	Dalende tendens			Stijgende tendens		
lengte	A	B	s.d.	A	B	s.d.
1	371	252.0	12.2	374	245.3	12.8
2	54	89.2	7.9	51	89.1	8.1
3	18	21.4	4.4	8	21.1	4.3
4	3	3.4	1.8	0	3.4	1.8
5	0	0.5	0.7	0	0.5	0.7

vis 497

Interval	Dalende tendens			Stijgende tendens		
lengte	A	B	s.d.	A	B	s.d.
1	363	198.7	10.9	344	190.4	11.1
2	32	61.1	7.0	23	61.2	6.8
3	17	13.3	3.5	7	12.7	3.5
4	0	1.9	1.4	0	2.0	1.4
5	1	0.2	0.5	0	0.2	0.5

vis 500

Interval	Dalende tendens			Stijgende tendens		
lengte	A	B	s.d.	A	B	s.d.
1	278	185.9	10.4	258	178.8	10.3
2	35	57.9	6.5	38	57.9	6.7
3	11	12.5	3.3	5	11.7	3.3
4	1	1.6	1.3	0	1.7	1.3
5	0	0.2	0.4	0	0.2	0.4

De gemeten (A) en met de Monte Carlo methode (B) verkregen frequenties van de opeenvolgende gelijke Td's bij vis 491 d.d. 10-13/06/83, vis 497 d.d. 16-19/06/83 en vis 500 18-20/05/83.

		Vis 491	
aantal gelijke Td's	A	B	s.d.
2	53	57.0	6.9
3	8	3.4	1.7
4	1	0.2	0.5
5	0	0.0	0.1

		Vis 497	
aantal gelijke Td's	A	B	s.d.
2	41	49.6	6.4
3	4	2.7	1.5
4	1	0.2	0.4
5	0	0.0	0.1

		Vis 500	
aantal gelijke Td's	A	B	s.d.
2	62	64.9	7.0
3	6	6.1	2.3
4	1	0.7	0.7
5	0	0.1	0.3

Evaluatie en perspectieven voor verder onderzoek

§7.1 Evaluatie
§7.2 Andere vissoorten
7.2.1 Zilverkarper
7.2.2 Karper
7.2.3 Goudvissen
7.2.4 Forel
7.2.5 Concluderende opmerkingen
§7.3 Perspectieven voor verder onderzoek
§7.4 Slotconclusies
Addendum
Literatuurreferenties

§7.1 Evaluatie

In het eerste hoofdstuk (§1.8) zijn op grond van gegevens uit de literatuur een aantal voorwaarden genoemd, waaraan het gedrag bij vissen moet voldoen om als thermoregulatiegedrag geïnterpreteerd te mogen worden. Deze voorwaarden kunnen als volgt samengevat worden:

a. Er moet een correlatie zijn tussen het gedrag van de vis en de temperatuursverandering van de omgeving.
b. De spreiding van de gemiddelde temperatuurdrempel (§2.1 en §3.3) dient kleiner te zijn dan de fluctuaties van de gemiddelde preferentietemperatuur.
c. Andere dan thermische stimuli mogen geen rol van betekenis hebben bij het tot standkomen van het gedrag in de opstelling.
d. Het gedrag mag niet het gevolg zijn van een 'escape'reactie, waarbij het dier als het ware vlucht voor een lage temperatuur.
e. Indien vissen over een thermoregulatiesysteem beschikken, moet onderzocht worden of deze dieren over een setpointfunctie beschikken, bijvoorbeeld in de vorm van een interne referentie'temperatuur'. Met behulp van deze interne referentie kan de vis bepalen of de omgevingstemperatuur veranderd is.

Aan de hand van deze maatstaven wordt nu de vraag beantwoord of de vis tijdens de experimenten een thermoregulatiegedrag uitvoert.

Een eerste vereiste is dat er tussen de daling van de temperatuur en het overzwemmen van de vis naar het andere compartiment een oorzakelijk verband moet zijn. Voldoet het gedrag van de vis in de opstelling aan deze conditie?
Tijdens het onderzoek reageerde het dier altijd op een temperatuurdaling door over te zwemmen naar het andere compartiment. Na één of twee dagen krijgt het gedrag het karakter van een voorwaardelijke

reflex. Er zijn experimenten, waarbij de vis gedurende enkele dagen zonder één fout te maken dit gedrag uitvoert. Op grond van deze resultaten is duidelijk dat aan de correlatievoorwaarde voldaan wordt. Bij sommige experimenten zwom de vis een enkele maal over, voordat de experimentator temperatuurdaling gestart had. Het gaat hierbij om 10-15% van het totaal aantal passages. Toch worden ook deze passages deels, zoals blijkt uit de analyse in §3.11, door een toevallige temperatuurdaling veroorzaakt. Slechts aan een klein gedeelte (4-6% van alle passages) van deze spontane passages is een dergelijke temperatuurdaling niet voorafgegaan; dit zijn de 'echte' spontane passages.
Geconcludeerd kan worden dat ongeveer 95% van de reacties van de vis worden veroorzaakt door een daling van de temperatuur.

De spreiding van de gemiddelde temperatuurdrempel (§3.3) moet gelet op de tijdens dressuurexperimenten gevonden detectiegrens van 0.05° C. (Bardach en Bjorklund 1957, Bull 1936) kleiner zijn dan die van de gemiddelde preferentietemperatuur.
De experimentele resultaten beschreven in hoofdstuk 3 voldoen ruimschoots aan deze tweede conditie. Wanneer wij de resultaten van een preferentietemperatuuronderzoek vergelijken met het in dit proefschrift beschreven onderzoek dan blijkt dat standaarddeviatie van de gemiddelde Td een factor 2 á 3 kleiner te zijn. In fig. 7.1.1 is dit met een histogram van zowel de preferentietemperatuur als de Td aanschouwelijk gemaakt. De regelbreedte van de vis in onze experimentele opstelling is dus aanzienlijk beter dan in een preferentietemperatuuropstelling.

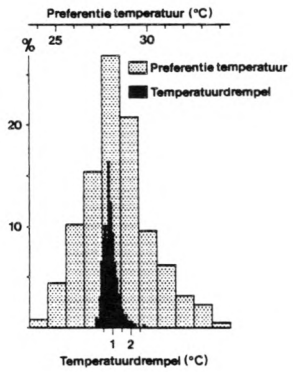


Fig. 7.1.1 In deze figuur zijn twee histogrammen weergegeven. De temperatuur is op de boven in de figuur getekende x-as aangegeven (graden Celsius). Op de y-as staat de relatieve frequentie (procenten) van de x-as aangegeven temperatuurwaarden. Het brede histogram (klassebreedte 1° C.) heeft betrekking op een experiment van Beitinger et al. (1975) met een zonnebaars (Lepomis cyanellus). Deze preferentietemperatuur is in een shuttleboxopstelling bepaald. De waarnemingsperiode was 3 dagen en elke 10 minuten werd de temperatuur in het compartiment, waarin de vis zich bevond gemeten. De gemiddelde preferentietemperatuur: 28.26° C., s.d. 1.83 en N=705. Het andere histogram (klassebreedte 0.1° C.) geeft de verdeling van de temperatuurdrempel weer tijdens een experiment met vis 454 dd 11-15/06/83. De schaalverdeling van dit histogram is op de x-as onder de beide histogrammen getekend. De gemiddelde Td is 0.85° C., s.d. 0.37 en N is 789.

Er is nog een conclusie uit deze experimenten te trekken. Gezien de grootte orde van de gemiddelde Td (1° - 1.5° C.) is het niet waarschijnlijk, dat een drempelwaarde van de thermische zintuigen bepalend zijn geweest voor de grote van de gevonden temperatuurdrempel.

Als derde voorwaarde is gesteld dat bij het tot standkomen van het gedrag mogen andere dan thermische stimuli geen grote rol spelen: het overzwemmen naar het andere compartiment mag dus niet veroorzaakt worden door bijvoorbeeld geluiden die tijdens het koelen kunnen optreden.
Aan deze aspecten is in hoofdstuk 3 veel aandacht besteed. Uit dit onderzoek is gebleken, dat bij het overzwemmen van de vis andere factoren dan de temperatuursdaling van geringe betekenis zijn geweest. Dergelijke onbekende signalen zouden bijvoorbeeld wel de 'echte' spontane passages veroorzaakt kunnen hebben. Wel zijn er factoren die van invloed zijn geweest op de grootte van de temperatuurdrempel. In hoofdstuk 3 worden genoemd: de periode van de dag (overdag/'s nachts), de fluctuaties in de bovengrenstemperatuur en het temperatuursverschil dat de vis heeft ondervonden tijdens de voorafgaande passage door het poortje. In hoofdstuk 6 bleek bovendien dat soms ook het compartiment, waarin de vis zich bevond, van invloed was. Om nog niet achterhaalde redenen had de vis soms een voorkeur voor één van beide compartimen-

ten. Dergelijke factoren hebben dus niet het overzwemmen van de vis veroorzaakt, maar wel de temperatuurdrempel gemoduleerd.

Onze vierde voorwaarde gaat over de achtergronden van het thermogedrag. Roberts (1979) stelt in zijn overzichtsartikel, dat het thermogedrag van de vis gebaseerd is op klinokinesis (zie ook §1.6 en §1.7). De vis zou ten gevolge van het veranderen van de temperatuur telkens en volkomen ongericht in een andere richting zwemmen "in order to escape a stress temperature change". Het thermogedrag is volgens deze opvatting gebaseerd op een 'escape'reactie.
Uit de analyse van de temperatuursverschillen tussen de compartimenten op het moment van overzwemmen (zie §3.6), blijkt, dat de vis soms in een compartiment komt dat kouder is ,maar wel opgewarmd wordt. Onder deze omstandigheden zwemt de vis in een gering aantal gevallen onmiddelijk, d.w.z. binnen 15 seconden, terug (zie tabel 3.6.1). Wanneer aan het thermogedrag een 'escape'reactie ten grondslag had gelegen, zou de vis vrijwel altijd terugzwemmen. Het is hiermee onwaarschijnlijk geworden, dat het thermogedrag van de vis gebaseerd is op een 'escape'reactie en opgevat kan worden als klinokinesis. In een recent beschreven onderzoek naar het temperatuurselectiegedrag (zie §1.6) van guppies (Poecilia reticulata, Peters) komt men eveneens tot deze conclusie. Op grond van een analyse van het bewegingspatroon van deze vissen in een gradiëntopstelling (§1.6) constateren Williams en Brauer (1987), dat de richting waarin de vis zwemt niet primair bepaald wordt door "any instantaneous perception of the local gradient". Dit betekent, dat de vis bij het uitvoeren van het thermogedrag ***niet***, zoals men bij klinokinesis het geval zou zijn, ongericht rondzwemt om zich 'thermisch te orienteren' en vervolgens de 'escape'richting te bepalen.

Onze conclusie is, dat het thermogedrag niet opgevat kan worden als klinokinesis.

Mede in relatie met het thermoregulatiemechanisme van zoogdieren is een cruciale vraag in dit proefschrift: speelt een 'setpoint' een rol bij het tot standkomen van het thermogedrag? Indien er een functioneel 'setpoint' is, hebben vissen een neuraal systeem voor thermoregulatie, dat zoals door Hammel (1972) en Crawshaw et al. (1985) al verondersteld is, overeenkomsten heeft met het regulatiesysteem van de endotherme dieren. Nelson et al. (1984) hebben aan de hand van de resultaten van electrofysiologische onderzoek bij vissen een neuraal thermoregulatiemodel opgesteld (zie §1.5). Tot nu toe heeft men niet onderzocht of vissen bij het uitvoeren van het thermogedrag ook gebruik maken van een dergelijk regelsysteem. Wel blijkt uit de experimenten van Nelson en Prosser (1979), waarbij in het preoptische

gebied van het diëncephalon laesies zijn aangebracht, dat bij vissen net als bij zoogdieren (Prosser 1973) het diëncephalon een belangrijke rol speelt bij het tot stand komen van het temperatuurselectiegedrag (zie §1.6).

Onderzocht is of er experimentele evidentie gevonden kon worden voor een 'setpoint'functie en daarmee voor de aanwezigheid van een thermoregulatiesysteem bij vissen. De uitgangsgedachte was hierbij: de 'setpoint'functie berust op een interne referentie. Deze interne referentie'temperatuur' ontstaat door de activiteit van enkele neuronen, die samen een neuraal netwerk vormen. Na een stapvormige verhoging van de temperatuur zullen de de biochemische processen in het neurale netwerk anders verlopen of zelfs gaan fluctueren. Dit zal tot gevolg hebben dat de referentie'temperatuur' instabiel wordt. In formele zin is er dan zelfs geen sprake meer van een referentie'temperatuur'.
Uitgaande van deze werkhypothese zijn de consequenties voor het thermogedrag te voorspellen. De standaarddeviatie van de gemiddelde temperatuurdrempel zal na een verhoging van de temperatuur groter worden om vervolgens tijdens de acclimatisatieperiode weer af te nemen tot het niveau van voor de verhoging. Uit experimenten, beschreven in hoofdstuk 4, waarbij de bovengrenstemperatuur verhoogd is, blijkt, dat deze te verwachten effecten optreden.
Deze experimentele resultaten geven steun aan het 'setpoint'concept, maar zijn geen strikt bewijs voor de aanwezigheid van een 'setpoint'functie. Een dergelijk bewijs is met de tot nu toe gebruikte onderzoeksmethode moeilijk te geven. Wanneer de vis echt over een neurale referentie'temperatuur' beschikt dan zal de vis deze referentie vergelijken met de watertemperatuur van de omgeving. De vis meet dus als het ware het verschil tussen het 'setpoint' en de omgevingstemperatuur. De grootte van dit verschil bepaalt het gedrag. Dit betekent, dat als de gemiddelde bovengrenstemperatuur in de compartimenten bijvoorbeeld meer dan een graad verschillen, de gemiddelde vertrektemperaturen gelijk moeten zijn voor beide compartimenten. De resultaten van een in §6.6 beschreven experiment met verschillende bovengrenstemperaturen komen inderdaad overeen met deze verwachting. Dit experimentele resultaat kan alleen verklaard worden als de vis over een vaste interne referentie'temperatuur' beschikt.

Op grond van deze resultaten kan geconcludeerd worden, dat vissen over een functioneel 'setpoint' en daarmee over een functioneel neuraal thermoregulatiemechanisme beschikken. Met behulp van dit mechanisme voert de vis in de shuttlebox een ***thermoregulatiegedrag*** uit. Op grond van het onderzoek van Nelson en Prosser (1979) en Nelson et al. (1984) lijkt het waarschijnlijk dat dit regelsysteem zich in het preoptische gebied van het diëncephalon bevindt.
Hensel (1973) stelt in een overzichtsartikel dat voor endothermen de

aanwezigheid van een regelsysteem beslissend is en niet het niveau waarop de lichaamstemperatuur geregeld wordt. Dit regelsysteem dat is opgebouwd uit perifeer en in de hersenen gelegen neurale structuren, stelt het organisme in staat om fluctuaties in de lichaamstemperatuur waar te nemen en om door tegenmaatregelen deze temperatuur weer in balans te brengen. Volgens deze opvatting functioneert de vis in de in dit proefschrift beschreven experimentele opstelling met behulp van het interne regelsysteem als een endotherm dier.
De oorspronkelijke doelstelling van dit onderzoek, dat beoogde aan te tonen dat er overeenkomsten zijn met het thermoregulatiesysteem van zoogdieren is hiermee bereikt.

De aanwezigheid van een interne referentie'temperatuur' is op zichzelf niet voldoende om het thermoregulatiegedrag te verklaren.
Bij de zoogdieren is thermoregulatie een automatisme. Wanneer het dier bij een drie graden lagere omgevingstemperatuur terecht komt, volgt hierop automatisch een reactie. Bij de vissen in de experimentele opstelling was dit niet het geval. Als de vis tijdens een spontane reactie bij een 3 graden lagere temperatuur terecht komt, wacht het dier met overzwemmen totdat de temperatuur verder daalt (§3.11). Het dier neemt onder deze omstandigheden blijkbaar beslissingen om al dan niet te reageren. Ook uit andere experimenten blijkt, dat het thermoregulatiegedrag van vissen geen automatisme is. Williams en Brauer (1987) hebben het bewegingspatroon van guppies (Poecilia reticulata, Peters) in een gradiëntopstelling (§1.6) geanalyseerd. Volgens deze onderzoekers moet het gedrag niet geinterpreteerd worden als een direct thermisch effect maar wel als een 'bewuste' reactie (" a 'concious' response") op een bepaalde temperatuur.

Het gedrag van de vis in de shuttlebox kan goed omschreven worden als een voorwaardelijke refex. De daling van de temperatuur is dan de voorwaarde waaraan voldaan moet worden om het dier te bewegen over te zwemmen. Deze benadering is echter te beperkt voor het verkrijgen van inzicht in het mechanisme van dit gedrag. Een uitbreiding lijkt noodzakelijk. Het in hoofdstuk 6 geponeerde decisiemodel lijkt als werkhypothese perspectieven te bieden bij de analyse van de achtergronden van het thermoregulatiegedrag. Een aanname is, dat de mechanismen die volgen op de decisie-eenheid lineair reageren op het uitgangssignaal van de deze eenheid. De in hoofdstuk 3 beschreven verdelingen van de Td-waarden zijn dan een maat voor de decisiecomponent in het gedrag. De reacties van de vis tijdens het verblijf in het koude compartiment bij spontaan gedrag zijn uitgaande van deze gedachte het gevolg van een verandering in de instelling van de decisie-eenheid. In de psychofysica wordt dit aangeduid als een verandering van de 'kriterium'instelling van de decisie-eenheid (Eijkman

1976).
De vraag is nu of de opeenvolgende decisies van het dier onafhankelijk van elkaar zijn. Als er onafhankelijkheid is, dan is er sprake van een stochastische reeks waarnemingen met een drempelachtig karakter. In hoofdstuk 6 is gebleken, dat dit niet het geval is. Er is een duidelijk verband tussen de opeenvolgende Td-waarden. Dit is een aanwijzing, dat het dier voorafgaande ervaringen gebruikt bij beslissingen in volgende situaties.
Vastgesteld is, dat de spreiding in de gemiddelde temperatuurdrempels overdag groter is dan 's nachts (hoofdstuk 3) en dat de vis soms een voorkeur heeft voor een bepaald compartiment (§6.5). Behalve de temperatuur spelen ook andere factoren een rol bij de decisies.
Voor het aantonen of tenminste waarschijnlijk maken van de betrokkenheid van een decisie-mechanisme bij het thermoregulatiegedrag is gebruik gemaakt van een farmacologische benadering. Het is bekend dat benzodiazepines een kalmerend effect hebben (Kyburz 1986). De werking van deze farmaca komt tot uiting in het minder alert reageren op stimuli. Het effect van de benzodiazepines komt tot stand via een specifieke receptor (BZR), die deel uitmaakt van een supermoleculair complex van de $GABA_A$receptor-BZR-chloridekanaal (Haefely 1987). GABA (gamma-aminoboterzuur) is een neurotransmitter in het centraal zenuwstelsel. Deze transmitter wordt aangetroffen in neuronen, die een inhiberend effect hebben op andere neuronen (Kyburz 1986).
De benzodiazepines zijn agonisten van GABA en versterken dus het effect (Haefely 1987). Als er een decisie-mechanisme betrokken is bij het thermoregulatiegedrag is te verwachten dat er onder invloed van een benzodiazepine een faciliterend effect op de bij dit mechanisme betrokken neuronen optreedt. Een in de humane geneeskunde veel gebruikte benzodiazepine is diazepam. In §6.5 is aangetoond, dat onder invloed van diazepam de verwachte kriteriumverschuiving optrad. Uiteraard moeten deze experimenten met andere farmaca herhaald te worden, waarbij te denken valt aan de andere agonisten, partieel agonisten en antagonisten van GABA. Dit dit verband is het farmacon meprobamaat ook interesssant omdat het overeenkomstige effecten geeft als de benzodiazepines zonder aan te grijpen op de $GABA_A$receptor (Haefely 1987).
De voorlopige conclusie is, dat er bij vissen een decisie-mechanisme voor het gedrag bestaat.

Deze conclusies worden samengevat in een schema, weergegeven in figuur 7.1.2. De vis beschikt voor het thermoregulatiegedrag over een neuraal centrum, waar de referentie'temperatuur' is vastgelegd. Een verschildetector bepaalt het verschil tussen de omgevingstemperatuur en deze referentie'temperatuur'. De grootte van dit verschil wordt gevoerd in de decisie-eenheid. De reactie of de gevoeligheid van deze decisie-eenheid wordt medebepaald door de temperatuur. Andere factoren, zoals b.v. licht, kunnen eveneens een effect hebben op de instelling van de decisie-eenheid. De decisie-eenheid stuurt de motoriek, waardoor de

vis zich verplaatst, het verschil tussen de omgevingstemperatuur en de referentie kleiner wordt en de regellus gesloten is.

Uiteraard moet deze model voorstelling door verder onderzoek op zijn bruikbaarheid getoetst worden. Zowel gedragsonderzoek onder verschillende thermische omstandigheden als farmacologische benaderingen bieden hiertoe perspectieven.

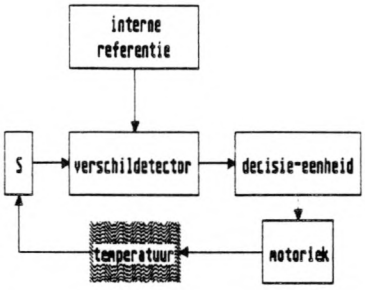


Fig. 7.1.2 Een schematische voorstelling van het verband tussen de structuren, die betrokken zijn bij het thermoregulatiegedrag van vissen. S: temperatuurgevoelige zintuigen, waarmee de temperatuur van de omgeving gemeten wordt; verschildetector: een mechanisme dat het verschil bepaalt tussen de omgevingstemperatuur en de interne referentie. Deze informatie wordt doorgegeven aan de decisie-eenheid. In de decisie-eenheid wordt nagegaan of deze informatie een kriterium (niet in het schema weergegeven) overschreidt. Als dit het geval is, worden motorische centra (motoriek) geactiveerd, waardoor de vis zich verplaatst en bij een andere (omgevings)temperatuur terecht komt.

Tot slot van deze paragraaf wil ik met het oog op een eventueel vervolg van dit onderzoek nog een kritische kanttekening maken over het voorafgaande betoog.
De effecten van de temperatuurstap (hoofdstuk 4) en resultaten van de farmacologische experimenten beschreven in hoofdstuk 5 zijn geinterpreteerd als het gevolg van het instabiel worden van de interne referentie'temperatuur'. Niet bewezen is, dat deze resultaten niet het gevolg zijn van een effect op de neuronen, betrokken bij decisiemechanisme.
Experimenten, waarbij vissen geconditioneerd worden op een bepaalde graduele stimulus en vervolgens aan een temperatuursverhoging blootgesteld worden zouden hierover uitsluitsel kunnen geven. Wanneer vissen na een temperatuurstap minder goed op de stimulus reageren, is hiermee aangetoond dat de effecten van een temperatuurstap en van de farmaca op het gedrag, zoals beschreven in de hoofdstuk 4 het gevolg kunnen zijn van een beinvloeding van het decisie-mechanisme.
Het is bekend, dat eenvoudige reflexhandelingen, maar ook complexe gedragingen beinvloed worden door veranderingen in de temperatuur. Prosser en Nelson (1981) wijzen erop dat motorische reflexen veel minder gevoelig zijn voor temperatuursveranderingen dan geconditioneerde reflexen. Het effect van een temperatuurverhoging of -verlaging

op het gedrag klein is als het gedrag het karakter heeft van een reflex. Bedoeld wordt dat in het dier voor een specifieke stimulus een nerveus mechanisme aanwezig is met behulp waarvan de reactie tot stand komt. In informaticaterminologie: het dier beschikt over nerveuze 'hardware' voor een bepaalde biologische functie. Wanneer het dier daarentegen geconditioneerd is op een bepaalde stimulus, heeft er een leerproces plaats gehad. Ook nu speelt het zenuwstelsel een belangrijke rol. Er wordt als het ware voor dit biologische proces 'software' ontwikkeld. 'Software' is gevoeliger voor temperatuursveranderingen dan 'hardware'. Een voorbeeld: na een temperatuursverhoging (van 5° naar 26° C.) duurt het 6-7 weken voordat de snelheid waarmee rietvoorns (Rutilus erythrophthamus, Linnaeus) een voorwaardelijke 'avoidance'reactie aanleren vergelijkbaar is met de tijd die vissen nodig hebben uit een langdurige bij 26° C. geacclimatiseerde controle groep (Rahmann et al. 1983).
De vraag is nu of het thermoregulatiegedrag via 'hardware' of met 'software' tot stand komt. Roots en Prosser (1962) concluderen op basis van literatuurgegevens, dat vissen sneller acclimatiseren na een verhoging van de temperatuur dan na een temperatuursverlaging. De acclimatisatie heeft zich in drie dagen voltrokken, waarbij het grootste deel van de aanpassing in de eerste dag plaats vindt. Deze bevinding van Roots en Prosser is in overeenstemming met de resultaten beschreven in hoofdstuk 4. Na een verhoging van Tu treden er fluctuaties op in de Td, die de eerste dag het grootst zijn en na drie dagen is het gedrag gestabiliseerd. Volgens Roots en Prosser (1962) verloopt de aanpassing aan een lagere temperatuur langzamer en is na 20 dagen voltooid. In dit opzicht wijken de resultaten van de experimenten uit hoofdstuk 4 af. Na een verlaging van Tu met 5° C. zijn de gemiddelde temperatuurdrempel en de bijbehorende standaarddeviatie kleiner geworden. Blijkbaar heeft de temperatuursverlaging geen effect op de verwerking van de thermisch informatie. De vis heeft echter wel meer belangstelling voor temperatuur.
Op grond van deze overwegingen zou geconcludeerd kunnen worden, dat het thermoregulatiegedrag van vissen hoogst waarschijnlijk overwegend met 'hardware' tot stand komt.
Om te onderzoeken of de resultaten beschreven in hoofdstuk 4 en 5 het gevolg zijn van een effect op de decisie-eenheden, moet bij de conditioneringsexperimenten met dit 'hardware'aspect rekening gehouden worden. Bijvoorbeeld door bij dit onderzoek gebruikt te maken van een natuurlijke reactie van de vis: wegzwemmen nadat het dier aangeraakt is.
Hoyland et al. (1979) hebben goudvissen, geacclimatiseerd bij 20° C., geconditioneerd in een shuttlebox om na aanraking met een glas staafje over te zwemmen. Het lijkt waarschijnlijk, dat bij dit gedrag eveneens decisie-eenheden betrokken zijn. Het geleidelijk verlagen c.q. verhogen van de temperatuur (0.5-1.5° C. per 30 minuten) had in het traject tussen de 10° en 35° C. had geen effect op het percentage geslaagde

'avoidance'responsies.
Het zou interessant zijn om dit experiment te herhalen en de temperatuursveranderingen snel (bijvoorbeeld 0.5 graad per minuut) te laten verlopen. Voorzover ik heb na kunnen gaan is een dergelijk experiment nog niet uitgevoerd.
Onze voorlopige conclusie is, dat werking van de decisie-eenheden in minder gevoelig zijn voor temperatuursveranderingen. Dit betekent, dat de resulaten beschreven in de hoofdstukken 4 waarschijlijk niet het gevolg zijn van het minder goed functioneren van de decisie-eenheden.

§7.2 Andere vissoorten

Het leek van belang om te onderzoeken of de hier beschreven resultaten specifiek waren voor de graskarper of een meer algemene geldigheid hebben. Dit onderzoek is uitgevoerd bij de zilverkarper, de goudvis, de forel en de schubkarper.

7.2.1 Zilverkarpers

De zilverkarpers reageerden na een verblijf van twee dagen in de opstelling niet op het dalen van de temperatuur. Vermoedelijk hield dit verband met het feit, dat deze vis onder natuurlijke omstandigheden, in het stroomgebied van de Amur, in een school leeft (Nikolski 1957). Blijkbaar was door het solitaire verblijf in de opstelling het gedrag van de vis dermate verstoord, dat een natuurlijke reactie op een verandering van de watertemperatuur niet meer mogelijk was. Mogelijk zou een school zilverkarpers in een overeenkomstige opstelling wel thermogedrag vertonen. Een dergelijk experiment is interessant omdat een school alleen kan bestaan, als er een continue informatie-uitwisseling tussen de individuele vissen is: de dieren moeten elkaars positie kennen. Het koelen van het water zou tot gevolg hebben, dat het gedrag van alle vissen in de school beinvloed wordt.

7.2.2 Schubkarper

In tabel 7.2.1 en fig. 7.2.1 worden de resultaten van een experiment met een karper weergegeven. In vergelijking met de graskarper (zie bijvoorbeeld tabel 3.3.1) is de gemiddelde Td bij deze vis lager. Het histogram van de Td heeft bij de karper net als bij de graskarpers een Gaussisch karakter (vergelijk fig. 3.3.1). Het percentage spontane passages is vergeleken met de graskarpers (tabel 3.11.1) hoger.

Tabel 7.2.1 Enkele kengetallen van het onderzoek naar het thermogedrag van de karper

C[1]	Tu	s.d.	Td	s.d.	N	Sp[2]	Asp[3]	Bsp[4]
L	15.13	0.15	0.55	0.35	293	125 (30%)	12 (3%)	70 (17%)
R	15.46	0.17	0.56	0.26	289	79 (22%)	22 (6%)	22 (6%)

[1] Compartiment: (L)inker of (R)echter

[2] Het aantal spontane passages. Tussen haakjes staat de fractie van het totaal aantal passages, dat tot deze catagorie behoord.

[3] Het aantal spontane passages, waarbij de vertrektemperatuur van de vis uit het compartiment kleiner is dan gemiddelde Tu - 3 x sd. Tussen haakjes staat de fractie van het totaal aantal passages, dat tot deze catagorie behoord.

[4] Het aantal spontane passages, waarbij de vertrektemperatuur van de vis uit het compartiment in het traject gemiddelde Tu ± 0.5 x sd. Tussen haakjes staat de fractie van het totaal aantal passages, dat tot deze catagorie behoord.

De relatief lagere Td zou een aanwijzing kunnen zijn dat de karper gevoeliger is voor een daling van de temperatuur. Als deze hypothese juist is, is te verwachten dat deze vis ook gevoeliger is voor toevallige storingen in de temperatuurregeling van de apparatuur. Uit §3.11 is gebleken, dat dergelijke storingen soms gepaard gaan met spontaan gedrag. Bij de graskarper blijkt, dat de Tu bij gemiddeld 20% van de spontane passages laag is (< gemiddelde Tu - 3 x s.d.). Uit een overeenkomstige analyse bij de karper blijkt dat slechts een klein deel spontane passages plaats vinden bij deze lage Tu's (tabel 7.2.1). De vraag rijst of deze vis bij het uitvoeren van het thermogedrag gebruik maakt van een 'setpoint'functie. Dit is onderzocht door het effect van een verhoging van de omgevingstemperatuur op het thermogedrag te analyseren. Hierbij is dezelfde hypothese gehanteerd als in hoofdstuk 4: de 'setpoint'functie is gebaseerd op een interne referentie'temperatuur'. Na een stapvormige verhoging van de temperatuur zullen de processen in het neurale netwerk, waarin deze referentie ontstaat, anders verlopen. Het gevolg is dat deze interne referentie'temperatuur' in stabiel wordt.
Bij de karper is de omgevingstemperatuur verhoogd van 15° naar 25° C. De resultaten van dit experiment zijn weergegeven in tabel 7.2.2. Tijdens de eerste 24 uur is er een verhoging en vervolgens een daling van het aantal spontane passages, waarbij de vertrektemperatuur uit dit compartiment lager is dan de gemiddelde Tu - 3 x sd (in tabel 7.2.2 aan geduid als Asp). In het rechter compartiment is de afname van deze spontane passages minder goed waarneembaar. Dit betekent, dat de vis in de eerste 24 uur gevoeliger is voor afwijkingen in de temperatuurregeling van de apparatuur dan voor de stap. Bij de andere

catagorie spontane passages, waarbij de vertrektemperatuur zich bevindt in het traject van gemiddelde Tu ± 0.5 x sd (in tabel 7.2.2 aangeduid als Bsp), is er in de eerste 24 uur een afname. Alleen in het linker compartiment treedt vervolgens in de tweede 24 uur een toename op.
In de eerste 24 uur de stap is de gemiddelde Td en de bijbehorende standaarddeviatie groter dan tijdens de controle periode. In de tweede 24 uur neemt de standaarddeviatie af tot het niveau van voor de stap. Na twee dagen is er in het linker compartiment nog een gering verschil tussen de gemiddelde Td voor en na de stap. In het rechter compartiment is er wel sprake van een geringe daling in de gemiddelde Td, maar het niveau van voor de verhoging is na twee dagen nog niet bereikt.
Deze waarnemingen bevestigen de hypothese dat het thermogedrag van de karper eveneens gebaseerd is op een interne referentie'temperatuur'. Zoals in §6.6 wordt opgemerkt is hiermee nog niet bewezen dat deze vis over een 'setpoint'functie beschikt. Met de in §6.6 gebruikte benadering is dit wel mogelijk. Omdat er een verschil is in de gemiddelde Tu tussen beide compartimenten (tabel 7.2.1), is deze analysemethode ook toepasbaar bij de karper. In figuur 7.2.2 zijn de cumulatieve frequentieverdelingen van de vertrektemperatuur uit het compartiment dat gekoeld wordt weergegeven. Deze vertrektemperaturen zijn zo gekozen dat de temperatuur bij het starten van het koelen in het linker compartiment 15.0° C en in het rechter 15.5° of 15.6° C. is.
De twee cumulatieve verdelingen blijken niet significant van elkaar te verschillen ($P<0.50$). Dit betekent, dat de vertrektemperaturen uit het linker en rechter compartiment uit dezelfde populatie afkomstig zijn. Net als bij de graskarper uit §6.6 blijkt de momentane temperatuur beslissend te zijn voor het overzwemmen en niet de temperatuur bij het starten van het koelen van belang te zijn voor het thermogedrag. Dit is alleen mogelijk als de karper over een interne referentie'temperatuur' beschikt.

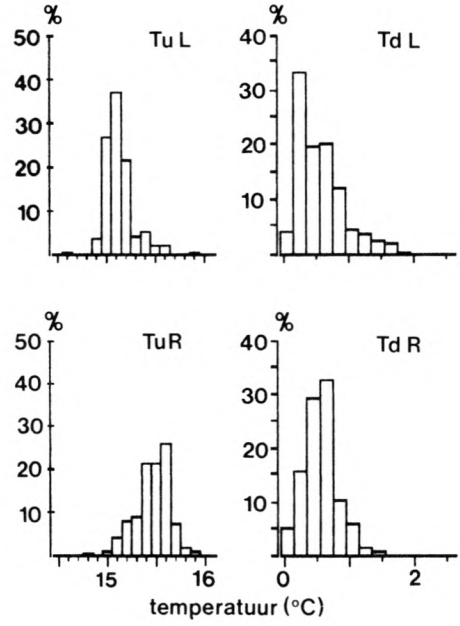


Fig. 7.2.1 Frequentiehistogrammen van de Tu en de Td in het linker (L) en rechter (R) compartiment van de shuttlebox bij een karper (dd 14-15/01/83). De gemiddelde Tu in het linker compartiment is 15.13° C., s.d. 0.15, N=293. In het rechter compartiment is de gemiddelde Tu 15.46° C., s.d. 0.17 en N=289. De gemiddelde Td links is 0.55° C., s.d. 0.35, N=293 en rechts is dit gemiddeld 0.56° C., s.d. 0.26 en N=289. Het percentage spontane passage in het linker compartiment is 30% (293/418) en in het rechter compartiment 22% (79/369).

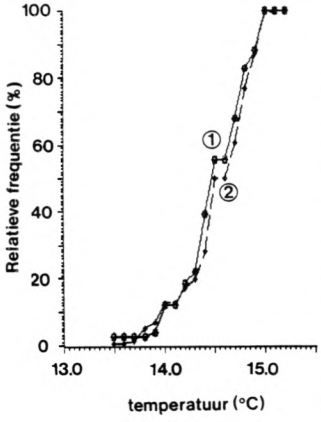


Fig. 7.2.2 De cumulatieve frequentieverdelingen van de vertrektemperatuur uit het het linker (1) (open cirkels) en rechter (2) compartiment (gesloten cirkels) van de shuttlebox bij een karper (dd 14-15/01/83). In het linker compartiment was de temperatuur bij start koelen 15° C. en in het rechter compartiment was deze temperatuur 15.5° of 15.6° C. De gemiddelde vertrektemperatuur links is: 14.55° C., s.d. 0.34, N=81. Rechts is de gemiddelde vertrektemperatuur: 14.59° C., s.d. 0.34 en N=145. De twee verdelingen zijn niet significant verschillend (P<0.50).

Tabel 7.2.2 De gemiddelde Td en Tu met bijbehorende standaarddeviaties en de frequentie van het optreden van spontaan gedrag voor en na een stapvormige verandering van de temperatuur (15 -> 25° C.) bij de karper. Een vervolg van deze tabel (rechter compartiment) staat in het addendum bij dit hoofdstuk.

tijd[1]	C[2]	Tu	s.d.	Td	s.d.	N	sp[3]	Asp[4]	Bsp[5]
	L	15.13	0.15	0.55	0.35	293	125 (30)	12 (3)	70 (17)
0 - 6		24.96	0.24	0.89	0.45	74	33 (31)	15 (14)	4 (4)
7 - 13		24.90	0.17	1.03	0.58	99	30 (23)	17 (13)	3 (2)
14 - 22		24.91	0.17	0.83	0.49	114	43 (27)	21 (13)	1 (1)
23 - 30		24.93	0.17	0.86	0.53	97	37 (28)	9 (7)	10 (8)
31 - 37		25.05	0.15	0.61	0.42	71	50 (41)	7 (6)	19 (16)
38 - 46		25.06	0.22	0.70	0.41	85	46 (35)	2 (2)	23 (18)
47 - 48		25.01	0.15	0.55	0.30	19	10 (35)	1 (1)	0 (0)

[1] Tijd na stapvormige temperatuursverandering (uren)
[2] C: compartiment. L: linker compartiment
[3] Totaal aantal spontane passages. Tussen haakjes is het percentage vermeld.
[4] Het aantal spontane passages, waarbij de vertrektemperatuur van de vis uit het compartiment kleiner is dan gemiddelde Tu - 3 x sd. Tussen haakjes staat de fractie (in procenten) van het totaal aantal passages, dat tot deze catagorie behoord.
[5] Het aantal spontane passages, waarbij de vertrektemperatuur van de vis uit het compartiment in het traject gemiddelde Tu ± 0.5 x sd. Tussen haakjes staat de fractie (in procenten van het totaal aantal passages, dat tot deze catagorie behoord.

7.2.3 Goudvissen

In tabel 7.2.3 worden de resultaten van de experimenten met goudvissen weergegeven. De gemiddelde Td bij deze vissen ligt in dezelfde grote orde als bij de graskarper (vergelijk bijvoorbeeld tabel 3.3.1). Het histogram van de Td heeft bij de karper net als bij de graskarpers een Gaussisch karakter (vergelijk fig. 3.3.1).
Het percentage spontane passages is vergeleken met de graskarpers (tabel 3.11.1) hoger. Onderzocht is of deze spontane passages te maken hebben met de toevallige storingen in de temperatuurregeling van de apparatuur. Bij ongeveer de helft of meer van de spontane passages bij goud vis W is de vertrektemperatuur lager dan de gemiddelde Tu - 3 x sd. Dit betekent dat bij deze vis een groot deel van de spontane passages waarschijnlijk te maken heeft met fluctuaties in de temperatuurregeling van de opstelling. Bij goudvis Rb is dit minder duidelijk.

Tabel 7.2.3 Enkele kengetallen van het onderzoek naar het thermogedrag van goudvissen.

Vis	C[1]	Tu	s.d.	Td	s.d.	N	Sp[2]	Asp[3]	Bsp[4]
W	L	19.92	0.29	0.89	0.46	322	128 (28%)	82 (18)	19 (4)
W	R	20.10	0.20	0.75	0.37	318	109 (25%)	50 (12)	19 (4)
Rb	L	20.04	0.26	1.03	0.50	208	31 (13%)	9 (4)	4 (2)
Rb	R	20.02	0.32	1.02	0.49	208	51 (19%)	21 (8)	15 (6)

[1] Compartiment: (L)inker of (R)echter

[2] Het aantal spontane passages. Tussen haakjes staat de fractie van het totaal aantal passages, dat tot deze catagorie behoord.

[3] Het aantal spontane passages, waarbij de vertrektemperatuur van de vis uit het compartiment kleiner is dan gemiddelde Tu - 3 x sd. Tussen haakjes staat de fractie van het totaal aantal passages, dat tot deze catagorie behoord.

[4] Het aantal spontane passages, waarbij de vertrektemperatuur van de vis uit het compartiment in het traject gemiddelde Tu ± 0.5 x sd. Tussen haakjes staat de fractie van het totaal aantal passages, dat tot deze catagorie behoord.

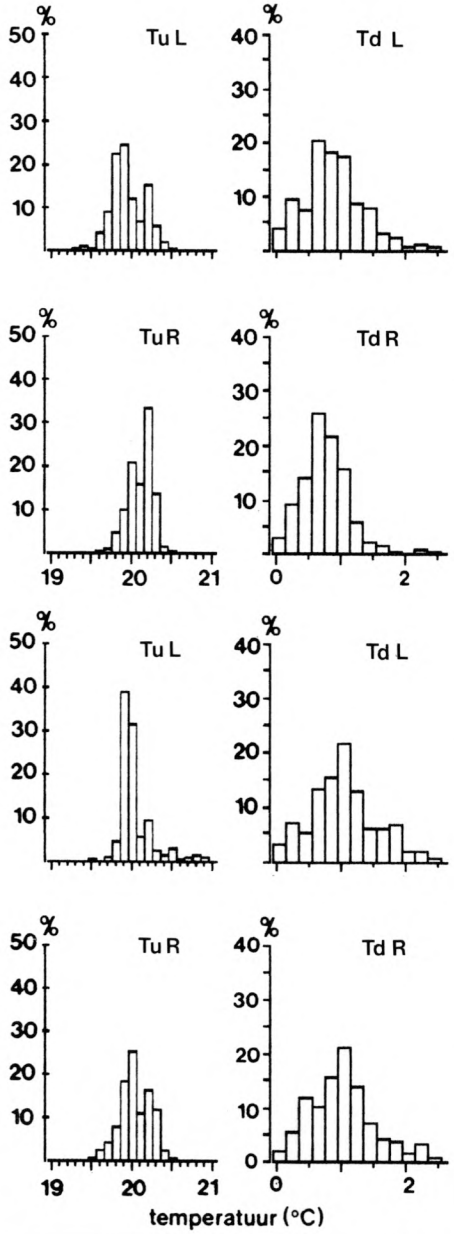


Fig. 7.2.3 Frequentiehistogrammen van de Tu en de Td in het linker (L) en rechter (R) compartiment van de shuttlebox bij goudvis W (dd 24-25/10/82). De gemiddelde Tu in het linker compartiment is 19.92° C., s.d. 0.29, N=322. In het rechter compartiment is de gemiddelde Tu 20.10° C., s.d. 0.20 en N=318. De gemiddelde Td links is 0.89° C., s.d. 0.46, N=322 en rechts is dit gemiddeld 0.75° C., s.d. 0.37 en N=318. Het percentage spontane passage in het linker compartiment is 28% (128/450) en in het rechter compartiment 25% (109/427).

Fig. 7.2.4 Frequentiehistogrammen van de Tu en de Td in het linker (L) en rechter (R) compartiment van de shuttlebox bij goudvis Rb (dd 28-29/03/83). De gemiddelde Tu in het linker compartiment is 20.04° C., s.d. 0.26, N=208. In het rechter compartiment is de gemiddelde Tu 20.02° C., s.d. 0.32 en N=208. De gemiddelde Td links is 1.03° C., s.d. 0.50, N=208 en rechts is dit gemiddeld 1.02° C., s.d. 0.49 en N=208. Het percentage spontane passage in het linker compartiment is 13% (31/239) en in het rechter compartiment 19% (51/259).

7.2.4 Forel

In tabel 7.2.4 worden de resultaten van een experiment met een forel weergegeven. De gemiddelde Td bij deze vis is lager dan bij de graskarper (vergelijk bijvoorbeeld tabel 3.3.1). Het histogram van de Td heeft bij de forel net als bij de graskarpers een Gaussisch karakter (vergelijk fig. 3.3.1).

Het percentage spontane passages (sp in tabel 7.2.4) is vergeleken met de graskarpers (tabel 3.11.1) hoger. Onderzocht is of deze spontane passages te maken hebben met de toevallige storingen in de temperatuurregeling van de apparatuur. Dit blijkt niet het geval te zijn. Bij minder dan de helft van de spontane passages is de vertrektemperatuur uit het compartiment kleiner dan de gemiddelde Tu - 3 x sd (tabel 7.2.4).

Tabel 7.2.4 Enkele kengetallen van het onderzoek naar het thermogedrag van de forel

C[1]	Tu	s.d.	Td	s.d.	N	Sp[2]	Asp[3]	Tsp[4]
L	14.91	0.13	0.60	0.43	256	133 (34%)	22 (6%)	26 (7%)
R	14.98	0.12	0.66	0.45	273	64 (19%)	27 (8%)	22 (7%)

[1] Compartiment: (L)inker of (R)echter

[2] Het aantal spontane passages. Tussen haakjes staat de fractie van het totaal aantal passages, dat tot deze catagorie behoord.

[3] Het aantal spontane passages, waarbij de vertrektemperatuur van de vis uit het compartiment kleiner is dan de gemiddelde Tu - 3 x sd. Tussen haakjes staat de fractie van het totaal aantal passages, dat tot deze catagorie behoord.

[4] Het aantal spontane passages, waarbij de vertrektemperatuur van de vis uit het compartiment in het traject gemiddelde Tu ± 0.5 x sd. Tussen haakjes staat de fractie van het totaal aantal passages, dat tot deze catagorie behoord.

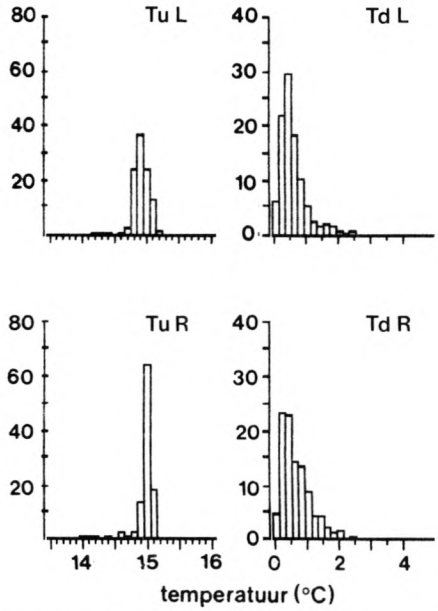


Fig. 7.2.5 Frequentiehistogrammen van de Tu en de Td in het linker (L) en rechter (R) compartiment van de shuttlebox bij een forel (dd 16-17/11/82). De gemiddelde Tu in het linker compartiment is 14.91° C., s.d. 0.13, N=256. In het rechter compartiment is de gemiddelde Tu 14.98° C., s.d. 0.12 en N=273. De gemiddelde Td links is 0.60° C., s.d. 0.43, N=256 en rechts is dit gemiddeld 0.66° C., s.d. 0.45 en N=273. Het percentage spontane passage in het linker compartiment is 34% (133/389) en in het rechter compartiment 19% (64/337).

7.2.5 Concluderende opmerkingen

Concluderend kan gesteld worden, dat met uitzondering van de zilverkarper ook andere vissoorten een thermogedrag in deze opstelling uit kunnen voeren. De gevoeligheid van de karper en de forel voor een temperatuurdaling is groter dan bij de graskarper. Alle in deze paragraaf onderzochte vissen vertonen meer spontaan gedrag dan de graskarper.

Aangetoond kan worden dat de karper eveneens of een interne referentie'temperatuur' beschikt.

De vraag rijst of de karper, de goudvissen en de forel de temperatuur beter regelen dan de graskarpers. Een maat hiervoor is de regelfactor (*r*). Bij eenvoudige regelsystemen kan deze factor berekend worden met (Van der Grinten 1960):

$$r = \sqrt{((T^2-(\delta \times T)^2)/T^2)} \qquad (1)$$

Hierbij is:

r de regelfactor

T optimum van de te regelen temperatuur

δ factor waarmee het traject bepaald wordt waarbinnen de temperatuur wordt geregeld: δ = Td/T

(1) kan vereenvoudigd worden tot: $r = \sqrt{(1-\delta^2)}$

Bij alle in deze paragraaf onderzochte vissen, maar ook bij de graskarper is deze regelfactor groter dan 0.99. Dit is een aanwijzing dat alle onderzochte vissen over een zeer efficiënt regelsysteem beschikken.

§7.3 Perspectieven voor verder onderzoek

Het thermoregulatiegedrag wordt niet alleen beinvloed door stoffen, die in het thermoregulatiesysteem aangrijpen (ontkoppelaars van de oxidatieve fosforylering, hoofdstuk 5), maar ook door stoffen die aangrijpen op het besluitvormingsproces in het centraal zenuwstelsel, dat aan het uitvoeren van gedrag voorafgaat (valium, §6.6). Het is waarschijnlijk ook mogelijk om met de gebruikte experimentele methode de effecten van farmaca, die op deze centrale processen inwerken (b.v. tranquillizers), te bestuderen. Bovendien lijkt het mogelijk om de effecten van een langdurige lage dosering van toxische stoffen op het gedrag van vissen te onderzoeken (verontreiniging van het drinkwater en het oppervlaktewater).

Uiteraard biedt dit onderzoek mogelijkheden op het terrein van de ethologie en de gedragsfysiologie. Overdag is het gedrag van de vissen soms duidelijk anders dan 's nachts (§3.7). Dit zal mogelijk deels toe te schrijven zijn aan de visuele stimuli, die er overdag wel en 's nachts niet waren. Het lijkt mogelijk om met visuele stimuli (b.v. met bewegende of roterende vlakken) de stemming van de vis te beinvloeden.

Uit §3.10 blijkt dat de vis een minimale tijd nodig heeft om te reageren op een temperatuurdaling: de integratietijd. Deze integratietijd kan opgevat worden als een tijdconstante van het regelsysteem. Door deze tijdconstante op een andere manier te bepalen (autocorrelatie) kan mogelijk meer inzicht verkregen worden in het thermoregulatiesysteem van de vis. Een interessant aspect is hoe deze tijdconstante gerelateerd is aan de koelsnelheid van het compartiment. Een andere vraag is of deze tijdconstante onder alle omstandigheden constant blijft.
Voor dit onderzoek is het echter wel vereist dat de temperatuurregeling van de opstelling zeer nauwkeurig is en dat de koelsnelheid van het compartiment ingesteld kan worden.
In het addendum bij hoofstuk 2 worden enkele suggesties waarmee de temperatuurregeling van de apparatuur verbeterd kan worden.

§7.4 Slotconclusies

Vissen kunnen door gedrag hun lichaamstemperatuur regelen. Bij het tot stand komen van het thermoregulatiegedrag is een functioneel 'setpoint' betrokken. Dit 'setpoint' is gebaseerd op een interne referentie'temperatuur'. Het lijkt om het thermoregulatiegedrag van

vissen te gebruiken voor gedragsfysiologisch, -farmacologisch en -toxicologisch onderzoek.

Literatuurreferenties

Bardach, J.E., Bjorklund, R.G. The temperature sensitivity of some American freshwater fishes. Am. Naturalist, 91, 233-, 1957.

Beitinger, T.L., Magnuson, J.J., Neill, W.H., Shaffer, W.R., Behavioral thermoregulation and activity patterns in the green sunfish, Lepomis cyanellus. Anim. Beh., 23, 222-, 1975.

Bull, H.O. Studies on conditioned responses in fishes. Part VII. Temperature perception in teleosts. J. Marine Biol. Assoc. United Kingdom. 221, 1-, 1936.

Crawshaw, L.I., Grahn, D.A., Wollmuth, L., Simpson, L. Central nervous regulation of body temperature in vertebrates: comparative aspects. Pharmac. Ther., 30, 19-, 1985.

Grinten, P.M.E.M. van der, Regeltechniek en automatisering in de procesindustrie. Prisma Technika. Spectrum, Utrecht, 1960.

Haefely, W. Development of anti-anxiety drugs. J. Drugtherapy and Research, 12, 15-, 1987.

Hammel, H.T. The set-point in temperature regulation: analogy or reality. In: Essays on temperature regulation. J. Bligh and R. Moore (eds). North-Holland Publishing Company. Amsterdam 1972. 9. 121-.

Hensel, H. Neural processes in thermoregulation. Physiol. Rev., 53, 948-, 1973.

Hoyland, J., Cossins, A.R., Hill, M.W. Thermal limits for behavioral function and resistence-adaptation of goldfish, Carassius auratus L. J. Comp. Physiol., 129, 241-, 1979.

Kyburz, E. New benzodiazepine receptor ligands. Pharm. Weekblad, 121, 893-, 1986.

Nelson, D.O., Heath, J.E., Prosser, C.L. Evolution of temperature regulatory mechanisms. Amer. Zool., 94, 791-, 1984.

Nelson, D.O., Prosser, C.L. Effects of preoptic leasions on the behavioral thermoregulation of green sunfish, Lepomis cyanellus and of goldfish, Carassius auratus. J. Comp. Physiol., 129, 193-, 1979.

Nikolski, G.W. Spezielle Fischkunde. VEB Deutscher Verlag de Wissenschaften, Berlin, 1957.

Roberts, J.L. Seasonal modulation of thermal acclimation and behavioral thermoregulation in aquatic animals. In: Marine Pollution: Functional responses. W.B. Vernberg, A. Calabrese, F.P. Thurnberg en F.J. Vernberg (eds). Academic Press, New York, 1979. p. 365-.

Prosser, C.L. Comparative animal physiology. Saunders Co. New York, 1973.

Prosser, C.L., Nelson, D.O. The role of the nervous systems in temperature adaptation of poikilotherms. Ann. Rev. Physiol., 43, 281-, 1981.

Rahmann, H., Schmidt, W., Schmidt, B. Effect of long-term thermal acclimation on the electrical avoidance conditioning of fish. In: Workshop on mechanisms of thermal regulation. K. Bowler, J.E. Heath (eds). J. Thermal Biology, 8, 438-, 1983.

Roots, B.I., Prosser, C.L. Temperature acclimation and the nervous system in fish. J. Exp. Biol., 39, 617-, 1962.

Williams, E.E., Brauer, R.W. Thermoregulatory behavior and temperature gradient perception in a juvenile fish (Poecilia reticulata). Can. J. Physiol. Pharmacol., 65, 1389-, 1987.

Addendum

Vervolg tabel 7.2.2 De gemiddelde Td en Tu met bijbehorende standaarddeviaties en de frequentie van het optreden van spontaan gedrag voor en na een stapvormige verandering van de temperatuur (15 -> 25° C.) bij de karper.

tijd[1]	C[2]	Tu	s.d.	Td	s.d.	N	sp[3]	Asp[4]	Tsp[5]
	R	15.46	0.17	0.56	0.26	289	79 (22)	22 (6)	22 (6)
0 - 6		25.09	0.24	0.85	0.41	80	51 (39)	25 (19)	6 (5)
7 - 13		24.94	0.17	0.86	0.34	100	33 (25)	25 (19)	1 (1)
14 - 22		24.98	0.22	0.83	0.28	120	25 (17)	23 (16)	0 (0)
23 - 30		25.02	0.22	0.80	0.31	104	32 (24)	18 (13)	0 (0)
31 - 37		25.29	0.18	0.76	0.27	90	31 (26)	21 (17)	2 (2)
38 - 46		25.33	0.20	0.80	0.26	99	16 (14)	13 (11)	0 (0)
47 - 48		25.27	0.14	0.78	0.21	24	4 (14)	4 (14)	0 (0)

[1] Tijd na stapvormige temperatuursverandering (uren)

[2] Compartiment. R: rechter compartiment

[3] Totaal aantal spontane passages. Tussen haakjes is het percentage vermeld.

[4] Het aantal spontane passages, waarbij de vertrektemperatuur uit het compartiment kleiner is dan de gemiddelde Tu- 3 x s.d. Tussen haakjes is het percentage vermeld.

[5] Het aantal spontane passages, waarbij de vertrektemperatuur van de vis uit het compartiment in het traject gemiddelde Tu ± 0.5 x sd. Tussen haakjes staat de fractie van het totaal aantal passages, dat tot deze catagorie behoord.

Samenvatting

In aansluiting op het uitgebreide onderzoek van de thermoregulatie bij zoogdieren ontstond de behoefte naar proefdieren met een 'eenvoudiger' thermoregulatiesysteem. In dit proefschrift wordt gerapporteerd over een onderzoek van het thermoregulatiegedrag bij vissen.

Anders dan bij zoogdieren is de lichaamstemperatuur van vissen geheel afhankelijk van de omgevingstemperatuur. Uit experimenten, waarbij de vissen geconditioneerd werden op een thermisch signaal, blijkt dat deze in staat te zijn om kleine temperatuursverschillen (in de grootte-orde van 0.05° C.) waar te nemen. Electrofysiologische experimenten laten zien, dat cellen in het diencephalon van vissen gevoelig zijn voor veranderingen in de temperatuur. Bij zoogdieren zijn in een overeenkomstig deel van de hersenen, de hypothalamus, vergelijkbare cellen aangetroffen. Dit is een aanwijzing dat vissen mogelijk over een overeenkomstig neuraal mechanisme voor thermoregulatie beschikken als zoogdieren.

In een temperatuurgradiëntopstelling kiezen vissen een bepaalde temperatuur, de preferentietemperatuur. Deze is hoger dan de acclimatietemperatuur. Bij hogere acclimatisatietemperaturen kiest de vis de 'final preference temperature' (fig. 1.6.1). Het temperatuurstraject waarin de vis dit temperatuurselectiegedrag uitvoert is groot: 5-10° C. (fig. 1.6.2 en fig. 1.6.3). Na het aanbrengen van kleine laesies in het preoptische gebied van het diencephalon voeren vissen geen temperatuurselectiegedrag meer uit. Dit deel van de hersenen van belang is dus betrokken bij het uitvoeren van het gedrag. Uit deze literatuurgegevens kon geen conclusie getrokken worden over hoe het temperatuurselectiegedrag tot stand komt. Bij sommige auteurs is er twijfel of er een relatie is tussen het gedrag en de temperatuur in de opstelling. Roberts (19..) betwijfelt zelfs of vissen over een echt thermoregulatiesysteem beschikken. Volgens deze opvatting wordt de vis in een temperatuurgradiëntopstelling geconditioneerd worden op andere dan thermische signalen. Op een grote verandering in de temperatuur zou de vis reageren met een vlucht- of 'escape'reactie. Daartegenover staat de opvatting van verschillende andere onderzoekers, dat vissen in principe over een overeenkomstig thermoregulatiesysteem beschikken als zoogdieren. De conclusie van het in hoofdstuk 1 beschreven literatuuronderzoek is dat het onduidelijk is of vissen in de tot nu toe gebruikte experimentele opstellingen een thermoregulatiegedrag uitvoeren.

Aan het einde van dit hoofdstuk wordt de probleemstelling geformuleerd en worden kriteria genoemd waar het gedrag van de vis moet voldoen wil het geïnterpreteerd kunnen worden als een thermoregulatiegedrag. Als

het dier bij het gedrag een neurale referentie gebruikt zal deze bepaald worden door celbiologische processen, die temperatuurafhankelijk zijn. Daarom werd besloten om de bovengrens van de temperatuur, waaraan de vis werd blootgesteld, te fixeren op 20° C.

In hoofdstuk 2 wordt vermeld welke vissoorten onderzocht zijn. Bij de meeste experimenten is de graskarper gebruikt. De experimenten zijn uitgevoerd met een geautomatiseerde shuttleboxopstelling (fig. 2.3.1). De experimentele methode wordt uiteengezet in §2.3. De vissen zijn geacclimatiseerd bij 20° C; deze temperatuur is lager dan de preferentietemperatuur. Bij het begin van het experiment werd het compartiment waarin de vis zich bevond gefixeerd op 20° C. (de bovengrenstemperatuur) en het andere compartiment op 15° C. Na verloop van een voor de vis random wachttijd werd het nu nog warme compartiment gekoeld en het ander compartiment snel verwarmd tot 20° C. Op het moment dat de vis door een opening in het tussenschot van het ene naar het andere compartiment overzwom werd de tijd en de temperatuur in beide compartimenten gemeten en vastgelegd en werd een nieuwe cyclus gestart (fig. 2.6.1). Aan het slot van dit hoofdstuk worden enkele suggesties gedaan voor verfijningen van de experimentele opstelling.

Verschillende basale aspecten van het gedrag van de vis in de opstelling worden in hoofdstuk 3 beschreven. Alle vissen zwommen tijdens het koelen van het compartiment over naar het andere. De frequentie waarmee de vis overzwom in de wachttijd, dus voordat het compartiment gekoeld is, geeft aan hoe snel een naïve vis leert op een daling van de temperatuur te reageren (fig. 3.2.1). Na 24 uur zwemt het dier in minder dan 10% van passages over in de wachttijd over naar het andere compartiment. De verdeling van temperatuurdrempel (d.i. de temperatuurdaling nodig om de vis naar het andere compartiment te doen overzwemmen) heeft een Gaussisch karakter (fig. 3.3.1). De gemiddelde temperatuurdrempel is in de grootte-orde van 1° C. Deze drempelwaarde is factor 20 hoger dan de minimale drempel gemeten tijdens experimenten, waarbij gebruik gemaakt werd van een voorwaardelijke reflex.
De grootte van de temperatuurdrempel blijkt onafhankelijk te zijn van de lengte van de wachttijd (tabel 3.4.1, fig. 3.4.1) en daarmee werd uitgesloten dat er tijdens de experimenten een 'tijdsdressuur' was opgetreden.
Het temperatuursverschil tussen de compartimenten op het moment van overzwemmen is van invloed op de daarop volgende temperatuurdrempel. Als dit verschil negatief is, de daarop volgende temperatuurdrempel meestal groter is (tabel 3.6.3). Aannemelijk gemaakt kon worden, dat het gedrag van de vis in de opstelling niet gebaseerd is op een 'escape'reactie.
De variantie van de gemiddelde temperatuurdrempel is gerelateerd aan het moment van de dag (fig. 3.7.1). 's Nachts is de variantie kleiner dan overdag (tabel 3.7.1). Dit is een aanwijzing, dat het gedrag van

de vis door externe factoren beïnvloed wordt.
Terwijl er bij geconditioneerde experimenten dikwijls habituatie optreedt, was dit bij het thermoregulatiegedrag niet het geval. Dit is een aanwijzing dat het gedrag dat de vis in de opstelling uitvoert, overeenkomt met het natuurlijke gedrag.

Bij een uitgebreidere analyse van de resultaten bleek, dat vissen een minimale tijd, in de grootte-orde van 15 sec., nodig hebben om te reageren op het dalen van de temperatuur (fig. 3.10.3, tabel 3.10.1).
Bij een deel van de passages (3 tot 20%) zwemt de vis naar het ander compartiment voordat het koelen gestart is. Deze passages worden aangeduid als een spontane passages. Een groot deel van deze spontane passages heeft het karakter van een vergissing.
Uit de experimenten, waarbij het 'warmtelek' via de opening tussen de compartimenten afwezig was en de beide compartimenten vanaf dezelfde temperatuur gelijktijdig gekoeld werden, blijkt dat de vis primair reageert op het dalen van de temperatuur (fig. 3.12.1 en fig. 3.12.2).

In hoofdstuk 4 worden de effecten van het verhogen en verlagen van de bovengrenstemperatuur (de temperatuurstap) op het gedrag van de vis in de opstelling onderzocht. Geconcludeerd wordt, dat vissen mogelijk beschikken over interne referentie'temperatuur'. Tevens blijkt, dat de aanpassing aan een hogere temperatuur volgens op een andere wijze tot stand komt dan het acclimatiseren aan een lagere temperatuur.

De effecten van twee ontkoppelaars van de oxidatieve fosforylering op het gedrag van de vis in de shuttleboxopstelling worden in hoofdstuk 5 geanalyseerd. Uit dit onderzoek blijkt, dat het mogelijk is met farmacologische middelen het gedrag te beïnvloeden. Aan het slot van dit hoofdstuk worden verschillende hypotheses geopperd om deze effecten te verklaren.

Hoofdstuk 6 geeft de resultaten van een onderzoek naar de relatie tussen de opeenvolgende temperatuurdrempels. Veel vaker dan men op grond van het toeval zou verwachten komen grote en kleine temperatuurdrempels alternerend voor. Er is dus een relatie tussen de succesievelijke drempelwaarden. Bij verdere analyse bleek dat de vis bij het uitvoeren van het gedrag in de shuttlebox als het ware 'zigzagt' tussen twee (temperatuur)grenswaarden. Deze bevindingen zijn een ondersteuning van de gedachte, dat bij het tot stand komen van dit gedrag een decisiemechanisme betrokken is. Na het toedienen van diazepam, een stof die bij mensen een kalmerend effect heeft, werden conform de verwachting deze (temperatuur)grenswaarden groter. De betrokkenheid van een decisie-eenheid bij het tot standkomen van dit gedrag is hiermee waarschijnlijk gemaakt. Tenslotte is bij één vis het effect van een verschil in de bovengrenstemperatuur van de beide compartimenten onderzocht. Uit dit experiment blijkt de verdeling van

de vertrektemperaturen in beide compartimenten gelijk te zijn ondanks een het verschil in de bovengrenstemperatuur (fig. 6.5.4). Dit kan alleen verklaard worden als de vis over een interne referentie'temperatuur' beschikt.

In hoofdstuk 7 worden de analyses van de experimenten geëvalueerd en geconcludeerd wordt dat vissen in de opstellingen een thermoregulatiegedrag uitvoeren.
Op basis van de verkregen experimentele gegevens wordt een model voor het thermoregulatiegedrag bij vissen opgesteld (fig. 7.1.2). Aan de hand van literatuurgegevens wordt onderzocht of de in hoofdstuk 4 beschreven effecten van een temperatuurstap verklaard kunnen worden met een verstoring van het decisiemechanisme. De voorlopige conclusie is, dat de decisie-eenheden minder gevoelig zijn voor temperatuursveranderingen. Indien dit juist is kunnen de resultaten beschreven in hoofdstuk 4 toegeschreven worden aan een verstoring van in de decisie-eenheden.

In het laatste deel van dit hoofdstuk worden de resultaten van experimenten met andere vissoorten beschreven. De zilverkarpers voerden in de opstelling geen thermoregulatiegedrag uit. Dit heeft er waarschijnlijk mee te maken dat deze vissen onder natuurlijke omstandigheden in een school voorkomen. Het solitaire verblijf in de opstelling zou het gedrag zo ingrijpend verstoren, dat een natuurlijke reactie niet meer mogelijk is. De overige vissen, karper, goudvissen en forel voeren wel een thermoregulatiegedrag uit. Op dezelfde wijze als in hoofdstuk 6 voor de graskarper is aangetoond kon ook de karper een interne referentie'temperatuur' plausibel gemaakt worden.
Aan het slot van dit hoofdstuk worden de perspectieven voor verder onderzoek gegeven.

Summary

Are fish able to regulate their temperature by means of specific behaviour? This question is the underlieing theme of this thesis.
It is a well known that fish migrate to an area with a particular temperature. The variation in this preferred temperature is large: for the Green Sunfish, Lepomis cyanellus, for example the s.d. is 1.83° C. (see fig. 1.6.2). In conditioned reflex experiments fish could be trained to react to very small temperature changes: they were in the order of magnitude of 0.05° C.
Neurons with a reaction to temperature changes similar to that found in mammals were demonstrated in the hypothalamus of fish. Previous behavioral experiments failed to prove the existence of a thermoregulatory system in fish. This failure might be due to fluctuations of the body temperature in the fish. These will affect the biochemical processes in the cells and cause an unstable reference point.
To provide evidence for this idea, the upper temperature (Tu) of one compartment of a 'shuttlebox-aquarium', containing one fish, was kept at 20° C. and in the other compartment at 15° C. After a random time delay the compartment with the higher temperature was cooled and the other one heated to 20° C. When the fish swam through the opening in the partition between the compartments to the warmed compartment time and temperatures where recorded. In about 24 h the fish learned spontaneously to leave the cooled compartment. The distribution function of the temperature drop (Td) necessary to persuade the fish to leave the compartment is more or less similar to a normal distribution function (fig. 3.3.1) with a mean 1° C. and a s.d. 0.5. The Td is much higher then the threshold temperature in conditioned reflex experiments. It appeared that the behaviour of the fish is not due to some kind of escape response.
The behaviour, as far as the Td is concerned, was disturbed when Tu was raised with 8° C. Normal behaviour returned within a few days. Biochemical evidence suggest this might be expected when some neuronal reference mechanism is involved.
Experiments with drugs, which affect the energy conversion and influence the thermoregulation of mammals, where not conclusive.
In one experiment there was a one degree difference in Tu between the compartments. The temperature at which the fish left the compartment after cooling were similar in both compartments (fig. 6.6.1). This implies that fish compare the temperature of the water with some kind of internal reference 'temperature'.
Whereas in most experiments the grasscarp (Ctenopharyngodon idella Val.) was used, other fish species (carp, Cyprinus carpio L.; goldfish, Carassius auratus L.; rainbow trout, Salmo gairdneri, Rich.) showed a similar behaviour.

The final conclusion is that the thermoregulatory mechanism of fish is similar to the regulatory mechanism in mammals.

Nawoord

Een proefschrift wordt gezien als het resultaat van het werk van één persoon, de promovendus. Het experimentele onderzoeken het schrijven van het proefschrift zou echter onmogelijk geweest zijn als ik geen beroep had kunnen doen op de specifieke deskundigheid van anderen. Ik ben degenen, die mij gesteund en begeleid hebben, zeer erkentelijk.
Hooggeleerde Bohus. Beste Bela, op het moment dat de vraag kwam of je promotor wilde worden, was het experimentele deel van het onderzoek afgesloten en was met de analyse van de onderzoeksresultaten slechts een aanvang gemaakt. Ik heb het op prijs gesteld, dat je op deze smalle basis toch het promotorschap op je hebt willen nemen. Je stelde eisen en deed suggesties voor de verdere uitwerking van de experimentele gegevens, maar bovenal behoedde je mij voor het inslaan van dwaalwegen. De hartelijke wijze waarop jij en je echtgenote mij in Soest ontvingen heb ik erg gewaardeerd.
Zeergeleerde Frens. Beste Jan, jij staat aan de oorsprong van het onderzoek, waarop dit proefschrift is gebaseerd. Toen ik een aantal jaren geleden bij je kwam met de vraag of ik het onderzoek naar het thermoregulatiegedrag van vissen, dat om technische redenen was gestaakt, mocht continueren, gaf je mij vrijwel onmiddelijk je fiat. Het vertrouwen dat je van begin af aan in mijn ideeën hebt gehad, terwijl anderen soms twijfelden aan de haalbaarheid van het onderzoek, is voor mij voor grote betekenis geweest. Tijdens de experimentele periode maar vooral ook later ben je een waardevolle gesprekspartner geweest.
Hooggeleerde Schönbaum. Beste Ed, van jouw expertise op het terrein van de thermoregulatie heb ik bij de analyse van de experimentele resultaten en het schrijven veel profijt gehad. Je heb mij in de afgelopen jaren gestimuleerd en je was altijd bereid om de eerste versies van de hoofdstukken aandachtig door te lezen en van commentaar te voorzien. Onder jouw invloed heb ik mijn aanvankelijk zo beknopte en daardoor soms moeilijk begrijpbare schrijfstijl gewijzigd. Het feit dat jij ook coreferent bent, symboliseert je betrokkenheid bij mijn promotie.
Geleerde Brethouwer. Beste Henk, ik heb het erg gewaardeerd, dat je mij in de periode dat je algemeen directeur van de AUV was, de gelegenheid hebt gegeven om aan mijn promotie-onderzoek te werken.

Het experimentele werk voor dit proefschrift is uitgevoerd bij de vakgroep Veterinaire Farmacologie, Farmacie en Toxicologie van de Faculteit de Diergeneeskunde van de R.U. Utrecht. Met veel plezier denk ik terug aan de periode dat ik bij deze vakgroep werkzaam was. De medewerkers van deze vakgroep toonden veel begrip als ik aan het experimenteren was. Nooit hebben zij geklaagd als er door een overstroming weer eens enkele centimeters water in de gang stond.

Aan enkele personen ben ik bijzondere dank verschuldigd.
Zeergeleerde Veenendaal. Beste Gert, nadat Jan Frens vertrokken was van de vakgroep werd jij projectleider. In deze periode hebben wij plezierig samengewerkt. Het is mede jouw verdienste dat dit project niet ten prooi is gevallen aan de bezuinigingswoede, die toen in de universitaire wereld heerste.
Nico Miltenburg en Paul Deley van de werkplaats stonden altijd met raad en daad klaar als er iets aan de opstelling mankeerde. Mede dankzij jullie inventiviteit is het gelukt om mijn experimenten tot een goed einde te brengen.
Hans van der Zalm heeft het electronische gedeelte van de opstelling gebouwd. De door jou ontworpen 'hardware' vormde een uitstekende basis voor de noodzakelijke automatisering van de gedragsexperimenten.

Bij het uitvoeren van de experimenten heb ik gebruik kunnen maken van de 'know-how' van de Vakgroep Vergelijkende Fysiologie van de Subfaculteit Biologie, R.U. Utrecht. Ik ben enkele leden van deze vakgroep zeer erkentelijk voor de wijze mij tegemoet traden en geholpen hebben bij mijn onderzoek.
Hooggeleerde Verheijen. U heeft steeds belangstelling getoond voor mijn onderzoek en mij gestimuleerd om het voort te zetten.
Zeergeleerde Bretschneider. Beste Frank, zonder jouw bijdrage aan het automatiseren van de experimentele opstelling had ik niet kunnen beschikken over de grote hoeveelheid digitaal opgeslagen meetgegevens. Het is het de vraag of dit proefschrift ooit gerealiseerd zou zijn als jij me in de aanvangsfase niet geholpen had. Met veel geduld heb je mij wegwijs gemaakt in het gebruik van de microcomputers bij het wetenschappelijk onderzoek en in de 'Apple-logie' in het bijzonder. Van deze kennis heb ik ook later gebruik gemaakt bij de analyse van de onderzoeksresultaten.
Rob van Weerden en Rob Loots van de electronische werkplaats van deze Vakgroep, hebben mij steeds geholpen als er onderdelen van mijn computersysteem defect raakten en het tijdschema in de war dreigde te raken. De discussies die ik met Rob van Weerden heb gevoerd over de techniek van het programmeren zijn voor ons beiden zeer vruchtbaar geweest.

De medewerkers van de helaas opgeheven Afdeling Visziekten van de Faculteit Diergeneeskunde hebben een bijzondere rol gespeeld. Niet alleen hebben zij mij het klaverjassen geleerd, maar veel belangrijker is dat ik gebruik heb kunnen maken van hun kennis over en ervaring met vissen.
Zeergeleerde Bootsma. Beste Remmelt, de discussies die wij over mijn onderzoek gevoerd hebben, zijn voor mij altijd erg stimulerend geweest. Jouw ideeën over het gebruik van vissen als proefdieren, hebben hun effect.
Nico Kool, jouw bijdrage aan dit proefschrift mag niet onvermeld

blijven. Op een voortreffelijke wijze heb je toezicht gehouden op de gezondheid van mijn vissen. Met veel enthousiasme en met schijnbaar tomeloze energie heb je mij ook met andere zaken geholpen. De foto op de omslag is van jouw hand.

Henk Halsema heeft met veel vakmanschap de definitieve vorm aan het proefschrift gegeven. De eer voor het fraaie uiterlijk komt jou toe.
De heer Nienhuis, destijds werkzaam bij het Natuurkundig Laboratorium van de R.U. Groningen, heeft de koelelementen zo gelast, dat de voorheen frequent voorkomende lekkages, voor eens en altijd achterwege zijn gebleven.
Jan Driessen. Beste Jan, ik heb het gewaardeerd dat je mij geadviseerd hebt bij de statistiek. Het concept voor de database, waarin de experimentele resultaten zijn opgeslagen, is van jou afkomstig. Deze database heeft een belangrijke rol gespeeld bij de uitgebreide statistische analyse van de gegevens.
Geleerde Kuiper. Beste Henk-Jan, als student biologie heb je enkele maanden gewerkt met dezelfde en in die periode technisch niet perfecte opstelling. Toch onderkende jij destijds al de wetenschappelijke mogelijkheden van dit onderzoek. Jouw ervaringen waren voor mij de aanleiding om aan dit onderzoek te beginnen. Als geen ander zag je destijds het belang in van een verdere automatisering. Door mij te introduceren bij Frank Bretschneider is in korte tijd een volledige automatisering van de experimentele opstelling tot stand gebracht.
Mijn ouders hebben mij op cruciale momenten de helpende hand gereikt. Dat dit proefschrift mede aan hen is opgedragen heeft voor mij een diepe betekenis. Mijn vader heeft mij jaren geleden al voorgehouden dat de kennis van en het inzicht in biologische processen nog beperkt is. Hij vertelde mij dat hij daarom het diepgaande biologisch onderzoek zo interessant vond. Ik hoop dat hij bij het lezen van mijn proefschrift net zo gefascineerd wordt door dit onderzoek als ik dat werd tijdens de experimenten en later bij het analyseren van de gegevens.
Margriet heeft gedoogd, dat ik in de afgelopen jaren een groot deel van mijn vrije tijd besteed heb aan dit onderzoek. Het proefschrift is daarom ook aan jou opgedragen.