

Słowa kluczowe: respiracja, aktywność lokomotoryczna, Micro-oxymax, MFB, metale, pestycydy, bezkręgowce

Agnieszka J. BEDNARSKA*, Justyna KASZOWSKA*, Almut GERHARDT**

WYKORZYSTANIE POMIARÓW TEMPRA RESPIRACJI ORAZ AKTYWNOŚCI LOKOMOTORYCZNEJ W BADANIACH EKOTOKSYKOLOGICZNYCH

Brak wyraźnego wpływu substancji toksycznej na podstawowe cechy historii życiowej organizmu (przeżywalność, reprodukcja) w klasycznych testach na toksyczność ostrą nie świadczy jeszcze o faktycznym braku kosztów, jakie mogą wynikać z chronicznej ekspozycji na skażenia. W związku z tym, w badaniach ekotoksykologicznych coraz częściej sięga się po metody umożliwiające badanie nie letalnych skutków oddziaływania czynników stresowych, w warunkach zbliżonych do tych, jakie panują w środowisku naturalnym. Do takich metod należą m.in. badania tempa respiracji oraz behawioru. Ze względu na zbyt niską czułość respirometrów umożliwiających ciągły pomiar tempa respiracji, do niedawna możliwości stosowania tej metody do badań na drobnych bezkręgowcach były bardzo ograniczone. Obecnie jednak badania tempa respiracji nawet u bardzo małych organizmów są możliwe dzięki wykorzystaniu super-czułych respirometrów, np. Micro-Oxymax. Podobnie, do niedawna nie istniała żadna możliwość pomiaru aktywności lokomotorycznej zwierząt żyjących w nieprzejrzyistych ośrodkach, takich jak gleba, osady dennie, czy ścieki lub niedostatecznie przejrzysta woda. Zautomatyzowany system do pomiaru aktywności (*ang.* Multispecies Freshwater Biomonitor - MFB) umożliwia tego rodzaju badania. Obie te metody są obecnie coraz szerzej wykorzystywane do badań nad wpływem substancji toksycznych na organizmy. Pomiar respirometryczny pozwoliły na wykazanie zmian w tempie metabolizmu u drobnych bezkręgowców narażonych na oddziaływanie metali śladowych i pestycydów, zaś przy pomocy MFB stwierdzono zmiany w aktywności lokomotorycznej u glebowych i wodnych bezkręgowców pod wpływem tych substancji. Zastosowanie obu technik w badaniach ekotoksykologicznych, zarówno u bezkręgowców glebowych, jak i wodnych zostanie omówione na przykładzie konkretnych badań własnych, a także pochodzących z najnowszej literatury ekotoksykologicznej.

* Instytut Nauk o Środowisku, Uniwersytet Jagielloński, Gronostajowa 7, 30-387 Kraków;
a.bednarska@uj.edu.pl, Polska

** LimCo International, An der Aa 5, 49477 Ibbenbueren, Niemcy

1. POMIARY TEMPA RESPIRACJI U WODNYCH I GLEBOWYCH BEZKRĘGOWCÓW Z WYKORZYSTANIEM RESPIROMETRU MICRO-OXYMAX

Działanie substancji chemicznych (metale, pestycydy) wymusza odmienną gospodarkę zasobami energetycznymi w organizmie, co wynika z konieczności ponoszenia dodatkowych kosztów związanych z uruchamianiem mechanizmów pozwalających na zapobieganie skutkom działania czynnika stresogennego (np. produkcja metalotionein czy magazynujących metale granul u bezkręgowców [7,18]).

Ponoszenie dodatkowych kosztów powinno mieć odzwierciedlenie w zmianach tempa respiracji organizmu. Należy zatem przypuszczać, że istnieje zależność pomiędzy tempem respiracji a stężeniem substancji chemicznej w organizmie i/lub stopniem skażenia terenu, z którego organizmy pochodzą.

Pomiary tempa respiracji u organizmów narażonych na działanie substancji toksycznych, stosowane w ekotoksykologii od wielu lat, pokazują, że jest to wygodna i użyteczna miara wpływu substancji toksycznych na procesy fizjologiczne [6,13]. Jednak ze względu na zbyt niską czułość respirometrów oraz niemożność śledzenia zmian tempa respiracji w trakcie dokonywania pomiaru, do niedawna stosowanie tej metody do badań na drobnych bezkręgowcach było bardzo ograniczone. Obecnie jednak analizowanie zmian w tempie respiracji nawet u bardzo małych organizmów jest możliwe dzięki wykorzystaniu super-czułych respirometrów, np. Micro-Oxymax (Columbus Instruments, USA).

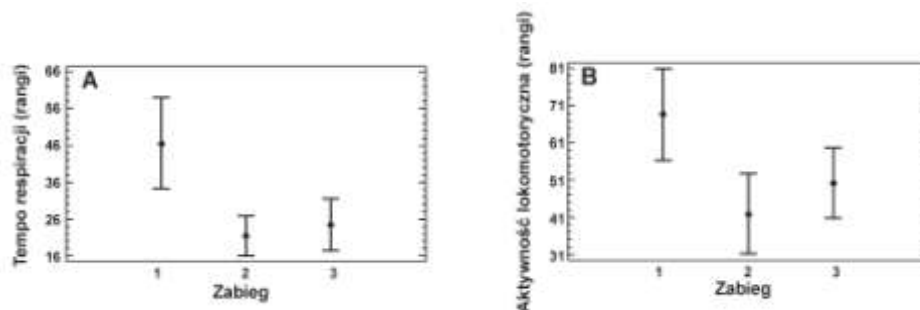
Micro-Oxymax jest zautomatyzowanym respiometrem wielokanałowym o obwodzie zamkniętym, który okresowo monitoruje stężenie gazu zawartego w komorze pomiarowej. Pozwala to na obliczenie ilości tlenu zużywanego i dwutlenku węgla produkowanego w jednostce czasu oraz ich skumulowanych wartości dla całego okresu pomiarowego. Poza tempem respiracji, system umożliwia także, po zaopatrzeniu w odpowiednie analizatory, pomiar stężenia metanu, tlenu węgla, siarkowodoru czy wodoru. Dodatkową zaletą respiometru Micro-Oxymax jest możliwość automatycznej wymiany powietrza w komorach pomiarowych, gdy stężenie któregoś z gazów przekroczy zadeklarowaną uprzednio wartość, co pozwala na prowadzenie bardzo długich pomiarów (nawet trwających wiele dni), co nie było możliwe w przypadku respirometrów manometrycznych lub elektrolitycznych.

W literaturze ekotoksykologicznej pojawia się coraz więcej badań wykorzystujących respiometr Micro-Oxymax do oceny wpływu różnego typu czynników stresowych na tempo respiracji glebowych i wodnych bezkręgowców, przy czym notuje się zarówno wzrost, jak i spadek tempa metabolizmu pod wpływem substancji toksycznych. Na przykład Łukasik i Laskowski [12] wykazali wzrost tempa respiracji (zużycia O_2) u chrząszczy *Tribolium confusum* traktowanych przez kilka

pokoleń hodowli laboratoryjnej miedzią. Jednak w trakcie 6-dniowych pomiarów tempo respiracji osobników eksponowanych na miedź spadało szybciej niż u chrząszczy kontrolnych, co doprowadziło do tego, że pod koniec okresu pomiarowego to chrząszcze kontrolne wykazywały wyższe tempo metabolizmu. Prawdopodobnie ze względu na wysokie koszty detoksykacji, u chrząszczy eksponowanych na miedź dochodziło do szybszego wyczerpywania zasobów w trakcie pomiarów, podczas których chrząszcze nie były karmione. Również kilkupokoleniowa ekspozycja ciem *Spodoptera exigua* na cynk spowodowała wzrost tempa respiracji (konsumpcji O₂ i produkcji CO₂) u ich larw [10]. Z kolei Rowe i in. [15] stwierdzili wzrost tempa metabolizmu u krewetek *Procambarus acutus* chronicznie eksponowanych na podwyższone stężenia metali śladowych, jednak zależności takiej nie zaobserwowano po dłuższym okresie ekspozycji na zanieczyszczenie. Różnic w tempie respiracji nie wykazano także w pokoleniu F₁ chrząszczy *Pterostichus oblongopunctatus* zebranych ze stanowisk o różnym stopniu skażenia metalami, chociaż u samców można było zaobserwować słabą, na pograniczu istotności statystycznej, dodatnią korelację pomiędzy produkcją CO₂ a poziomem zanieczyszczenia środowiska, z którego pochodzili rodzice badanych chrząszczy [11].

Odwrotnie rzecz się miała w przypadku badań Bednarskiej i Laskowskiego [2], które wykazały spadek tempa respiracji u chrząszczy *P. oblongopunctatus* po długiej, trwającej 192 dni, ekspozycji na nikiel. Jednak gdy chrząszcze były eksponowane na tę samą dawkę niklu (2500 mg Ni kg⁻¹) przez okres 64 dni, ich tempo metabolizmu albo nie różniło się wcale, albo było nieznacznie niższe w porównaniu z chrząszczami z zabiegu kontrolnego. W innych badaniach [1] chrząszcze (*P. oblongopunctatus*) poddano trzem zabiegom: (1) ekspozycja na Ni przez okres 96 dni, (2) ekspozycja na Ni przez 64 dni (okres kontaminacji), po której chrząszcze karmiono nieskażonym pokarmem przez 32 dni (okres eliminacji), oraz (3) chrząszcze karmione pokarmem nieskażonym przez cały czas trwania eksperymentu (kontrola). Okazało się, że chrząszcze z zabiegu 1. miały istotnie wyższe tempo respiracji po 96 dniach ekspozycji na Ni w porównaniu do chrząszczy z zabiegu 2. po okresie eliminacji i kontrolnych (zabieg 3). Ponadto, nie stwierdzono różnic w tempie respiracji pomiędzy chrząszczami po okresie eliminacji i kontrolnymi (rys. 1A).

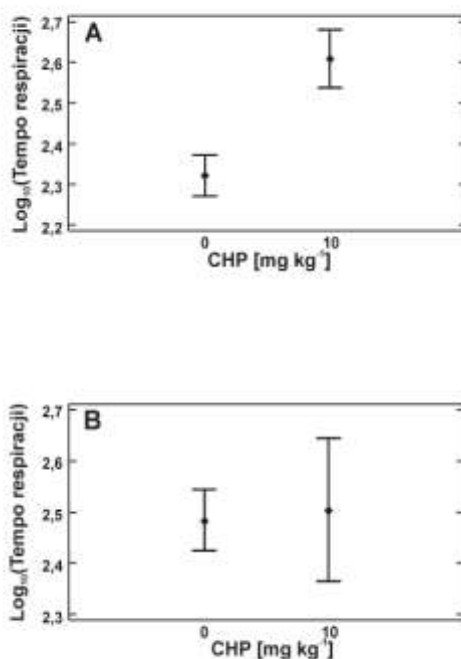
Ta zmienność tempa metabolizmu w czasie ekspozycji chrząszczy na Ni może odzwierciedlać różne etapy, przez jakie przechodzi organizm poddany działaniu substancji toksycznej [14].



Rys. 1. Różnice w tempie respiracji (A) oraz aktywności lokomotorycznej (B) chrząszczy *Pterostichus oblongopunctatus* pochodzących z trzech zabiegów: (1) chrząszcze eksponowane na Ni przez okres 96 dni, (2) chrząszcze eksponowane na Ni przez 64 dni (okres kontaminacji), a następnie karmione nieskażonym pokarmem przez 32 dni (okres eliminacji), oraz (3) chrząszcze karmione pokarmem nieskażonym przez cały czas trwania eksperymentu (kontrola) [1]

Początkowo tempo metabolizmu spada, gdyż ujawniają się pierwsze skutki intoksykacji – uszkodzenie niektórych enzymów, przy jednoczesnym braku mechanizmów obronnych (w badaniach na *P. oblongopunctatus* odpowiadał temu nieznaczny spadek tempa respiracji u chrząszczy po 64 dniach intoksykacji). W kolejnym etapie tempo metabolizmu rośnie, co ma związek z uruchomieniem mechanizmów detoksykacyjnych oraz wzrastającymi nakładami energetycznymi na odtwarzanie uszkodzonych enzymów (w badaniach na *P. oblongopunctatus* miało to miejsce w 96 dniu intoksykacji). Jeśli substancja toksyczna zostanie usunięta z ekosystemu, poziom metabolizmu wraca do normy (o czym świadczy zaobserwowany brak różnic w tempie metabolizmu pomiędzy chrząszczami kontrolnymi i intoksykowanymi po okresie eliminacji). Jednak w przypadku utrzymującego się wysokiego stężenia substancji toksycznej, gdy mechanizmy detoksykacyjne nie nadążają z odtruwaniem organizmu, tempo metabolizmu zaczyna spadać (jak to miało miejsce po 192 dniach ekspozycji chrząszczy na Ni), aż w końcu organizm ginie.

Podobnie jak w przypadku Ni, również chloropiryfos (CHP) istotnie wpływał na metabolizm *P. oblongopunctatus*, powodując wzrost tempa respiracji u osobników karmionych pokarmem skażonym 10 mg CHP kg⁻¹ (rys. 2A). Jednak gdy po okresie ekspozycji chrząszcze karmiono przez 32 dni pokarmem czystym, ich tempo respiracji wróciło do poziomu obserwowanego u chrząszczy kontrolnych (rys. 2B).



Rys. 2. Różnice w tempie respiracji chrząszczy *Pterostichus oblongopunctatus* karmionych pokarmem skażonym chloropiryfosem (10 mg CHP kg⁻¹) lub pokarmem czystym (0 mg CHP kg⁻¹) przez okres 32 dni (A) oraz eksponowanych na chloropiryfos przez 64 dni, a następnie karmionych nieskażonym pokarmem przez 32 dni (10 mg CHP kg⁻¹) lub karmionych pokarmem czystym (0 mg CHP kg⁻¹) przez cały czas trwania eksperymentu (B)

Z przytoczonych wyżej przykładów badań można wysnuć wniosek, że wpływ substancji toksycznej na tempo respiracji bezkręgowców zależy nie tylko od badanego gatunku, ale także rodzaju substancji toksycznej, jej stężenia w środowisku oraz czasu ekspozycji organizmu na tę substancję. Istotny wpływ na tempo metabolizmu mają także takie czynniki, jak masa ciała, płeć, stan fizjologiczny, rytm okołodobowy czy temperatura [2,3,11,15]. Ponadto należy pamiętać, że ewentualne koszty detoksykacji substancji chemicznych mogą wyrażać się nie tylko w zmianie tempa respiracji, ale także w innych składowych budżetu energetycznego, takich jak wzrost czy reprodukcja [16].

2. POMIARY AKTYWNOŚCI LOKOMOTORYCZNEJ U WODNYCH I GLEBOWYCH BEZKRĘGOWCÓW Z WYKORZYSTANIEM ZAUTOMATYZOWANEGO SYSTEMU MFB (ang. Multispecies Freshwater Biomonitor)

Od czasu gdy pomiary aktywności lokomotorycznej zostały zautomatyzowane, w literaturze ekotoksykologicznej można znaleźć coraz więcej informacji na temat wpływu różnego typu substancji chemicznych na behavior [np. 8,17]. Badania aktywności lokomotorycznej wodnych i glebowych bezkręgowców, dokonywane przy użyciu systemu do analizy obrazu z kamery video, umożliwiają nie tylko określenie położenia badanego organizmu, ale także czas trwania określonego zachowania, prędkość poruszania się osobnika, czy na przykład długość przebytej drogi. Niemniej jednak fakt, że badany organizm musi być wyraźnie widoczny w trakcie pomiaru, czyni tą metodę nieprzydatną w badaniach zachowania organizmów, które żyją w glebie, osadach dennych, ściekach, czy nieprzejrzystej wodzie. Od niedawna istnieje jednak możliwość dokonywania pomiarów aktywności lokomotorycznej także u zwierząt żyjących w takich właśnie środowiskach. Pozwala na to zautomatyzowany system do pomiaru aktywności (ang. Multispecies Freshwater Biomonitor, MFB) opracowany i produkowany przez niemiecką firmę LimCo Company.

MFB automatycznie rejestruje zmiany pola elektromagnetycznego pomiędzy parą elektrod umieszczonych w ścianach komory pomiarowej, w której znajduje się obiekt badań. Zarejestrowane sygnały są następnie analizowane przy użyciu transformacji Fouriera i rozróżniane na podstawie ich amplitudy i częstotliwości. Dane dotyczące aktywności wyrażane są jako czas spędzony na czynnościach powodujących zmiany pola o określonej częstotliwości, a wysoka czułość urządzenia pozwala na rozróżnienie pomiędzy ruchami związanymi z przemieszczaniem się a ruchami związanymi z utrzymywaniem funkcji życiowych organizmu (np. ruchy oddechowe).

Ze względu na możliwość zastosowania różnej wielkości komór pomiarowych w zależności od wielkości badanych organizmów, system ten znalazł szerokie zastosowanie w monitoringu stanu wód oraz badaniach wpływu różnego typu substancji (metale, substancje organiczne) na aktywność lokomotoryczną takich bezkręgowców wodnych, jak na przykład kielż *Gammarus pulex* [5] czy skorupiak *Corophium volutator* [9]. MFB został również z powodzeniem wykorzystany w badaniach aktywności lokomotorycznej bezkręgowców glebowych, w tym dżdżownic, skoczogonków i równonogów [4]. Przy użyciu MFB wykazano także wzrost aktywności lokomotorycznej chrząszczy *Pterostichus oblongopunctatus* eksponowanych na nikiel [1] (Rys. 1B). Można zatem śmiało stwierdzić, że ekotoksykologia została wzbogacona w nowe narzędzie do badań wpływu różnego typu substancji chemicznych na aktywność lokomotoryczną zwierząt w warunkach odzwierciedlających te, które panują w ich naturalnym środowisku życia.

LITERATURA

- [1] Bednarska A.J., Gerhardt A., Laskowski R. 2008. *Nickel affects locomotor activity and respiration rate of the ground beetle, Pterostichus oblongopunctatus*. W: Book of abstracts of SETAC Europe 18th Annual Meeting, Warszawa, 200.
- [2] Bednarska A.J., Laskowski R. 2008. *Effects of nickel and temperature on the ground beetle, Pterostichus oblongopunctatus (Coleoptera: Carabidae)*. *Ecotoxicology*, 17: 189-198.
- [3] Chaabane K., Josens G., Loreau M. 1999. *Respiration of Abax ater (Coleoptera, Carabidae): a complex parameter of the energy budget*. *Pedobiologia*, 43: 305-318.
- [4] Filsher J., Fahrenholz N., Birken M., Gerhardt A. *The soil animal activity monitor: a new tool for investigating soil invertebrate movements under semi-natural conditions*. W: Book of abstracts of SETAC Europe 18th Annual Meeting, Warszawa, 200.
- [5] Gerhardt A., Kienle C., Allan I.J., Greenwood R., Guigues N., Fouillac A.-M., Mills G.A., Gonzales C. 2007. *Biomonitoring with Gammarus pulex at the Meuse (NL), Aller (GER) and Rhine (F) rivers with online Multispecies Freshwater Biomonitor[®]*. *J. Environ. Monit.*, 9: 979-985.
- [6] Handy R.D., Depledge M.H. 1999. *Physiological responses: their measurements and use as environmental biomarkers in ecotoxicology*. *Ecotoxicology*, 8: 329-349.
- [7] Hopkin S.P. 1989. *Ecophysiology of Metals in Invertebrates*. Elsevier, Applied Science, London, England.
- [8] Jensen C.S., Garsdal L., Baatrup E. 1997. *Acetylcholinesterase inhibition and altered locomotor behavior in the carabid beetle Pterostichus cupreus. A linkage between biomarkers at two levels of biological complexity*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1727-1732.
- [9] Kienle C., Gerhardt A. 2008. *Behavior of Corophium volutator (Crustacea, Amphipoda) exposed to the water-accomodated fraction of oil in water and sediment*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27: 599-604.
- [10] Kramarz P., Kafel A. 2003. *The respiration rate of the beet armyworm pupae (Spodoptera exigua) after multi-generation intoxication with cadmium and zinc*. *Environ. Pollut.*, 126: 1-3.
- [11] Łagisz M., Laskowski R. 2002. *Respiratory metabolism in Pterostichus oblongopunctatus originating from metal contaminated and reference areas*. *Fresenius Environ. Bull.*, 11: 74-77.
- [12] Łukasik P., Laskowski R. 2007. *Increased respiration rate as a result of adaptation to copper in confused flour beetle, Tribolium confusum Jacquelin du Val*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 79: 311-314.
- [13] Migula P., Kędziorski A., Nakonieczny M., Kafel, A. 1989. *Combined and separate effects of heavy metals on energy budget and metal balances in Lacheta domesticus*. *Uttar Pradesh J. Zool.*, 9: 140-149.
- [14] Migula P., Laskowski R. 2004. *Ekotoksykologia od komórki do ekosystemu*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa.
- [15] Rowe C.L., Hopkins W.A., Zehnder C., Congdon J.D. 2001. *Metabolic costs incurred by crayfish (Procambarus acutus) in a trace element-polluted habitat: further evidence of similar responses among diverse taxonomic groups*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 129: 275-283.
- [16] Sibly R.M., Calow P. 1989. *A life-cycle theory of responses to stress*. *Biol. J. Linn. Soc.*, 37: 101-116.
- [17] Sørensen F.F., Weeks J.M., Baatrup E. 1997. *Altered locomotory behavior in woodlice (Oniscus Asellus (L.)) collected at a polluted site*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 685-690.
- [18] Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B. 2006. *Principles of Ecotoxicology*. 3rd edition, Taylor and Francis.

RESPIRATION RATE AND LOCOMOTOR ACTIVITY MEASUREMENTS IN ECOTOXICOLOGICAL STUDIES

Chronic exposure to low levels of environmental contaminants can negatively impact overall performance of an individual without being directly lethal. Therefore, the methods which allow to measure sublethal effects of different stressors on organisms are more and more frequently used in ecotoxicological studies. One useful approach is to examine respiration rate changes after exposure of an organism to environmental stress. Nowadays, long-term respiration rate measurements are possible even in small invertebrates using high sensitivity computer-controlled, close-circuit Micro-Oxymax respirometer. Studies concerning the effects of different toxicants (metals, pesticides) on metabolic rate confirm the usefulness of the respiration rate measurements as a convenient endpoint in ecotoxicological studies. Also, a substantial amount of information has been gathered on the effects of toxicants on locomotor activity of both aquatic and terrestrial invertebrates, allowing to suggest animal locomotor behavior as a sensitive biomarker of chemical stress. The new approach using the Multispecies Freshwater Biomonitor (MFB) has simplified locomotor activity measurements in aquatic species. Recently, the utility of MFB for quantification of behavioral changes was also demonstrated for locomotor activity measurements in soil-dwelling invertebrates, e.g. earthworms, springtails and carabids. The advantages of both respiration rate and MFB measurements is discussed based on the results from our own study and the literature data.