

Grzegorz Formicki

Wpływ promieniowania ultrafioletowego UV-A na konsumpcję tlenu przez larwy ropuchy szarej (*Bufo bufo* L.) w różnych okresach rozwojowych

Wstęp

W ciągu ostatnich kilkunastu lat doszło do znacznego spadku liczebności płazów. Zjawisko to występuje obecnie na całym świecie (Pechman i inni 1991; Blaustein 1994). Spadek liczebności płazów może być związany z rosnącym poziomem promieniowania ultrafioletowego docierającego do powierzchni Ziemi (Wake 1991). Promieniowanie ultrafioletowe UV-B (280–320 nm) może zwiększać śmiertelność zarodków i larw niektórych gatunków płazów. Fakt ten dotyczy zarówno gatunków północnoamerykańskich (Blaustein i in. 1994), jak i europejskich (Lizana i Pedraza 1998; Nagl i Hofer 1997).

Prowadzone dotychczas badania nad wpływem promieniowania ultrafioletowego na liczebność i biologię płazów dotyczą wyłącznie populacji występujących na terenach górskich. Może się okazać, że gatunki płazów ewoluujące na obszarach nizinnych, gdzie promieniowanie słoneczne jest znacznie mniej intensywne niż na dużych wysokościach, są wrażliwe nawet na niewielkie wahania tego promieniowania. Wykazano bowiem, że w Alpach już na wysokości 580 metrów n.p.m. w ciągu kilku słonecznych dni mogą zginąć wszystkie larwy traszki górskiej żyjące w płytkich nieosłoniętych zbiornikach wodnych (Nagl i Hofer 1997).

Brak również danych na temat wpływu promieniowania ultrafioletowego A (UV-A 320–400 nm) na larwy płazów. Wykazano, iż promieniowanie to podobnie jak promieniowanie UV-B może być przyczyną powstawania reaktywnych form tlenu (Linetsky i in. 1996) i mutacji w cząsteczkach DNA (Robert i in. 1996). Ponadto UV-A penetruje zbiorniki wodne na znacznie większą głębokość niż UV-B (Williamson 1996).

Z powyższych danych wynika, że promieniowanie UV-A, panujące w środowisku naturalnym, może zakłócać przebieg istotnych dla każdego organizmu procesów metabolicznych. Przydatnym wyznacznikiem stanu fizjologicznego organizmu jest poziom metabolizmu podstawowego (Zug 1993). Dlatego też celem prezentowanej

pracy jest ocena wpływu promieniowania UV-A w dawkach panujących w środowisku naturalnym na metabolizm podstawowy larw ropuchy szarej (*Bufo bufo* L.).

Materiał i metody

Hodowla larw

Do eksperymentu wykorzystano larwy ropuchy szarej wyhodowane z jaj złożonych w laboratorium. Kijanki hodowano w krystalizatorach o pojemności 0,9 litra (15 osobników w każdym), wypełnionych odstaną wodą wodociągową. Głębokość wody w używanych krystalizatorach wynosiła ok. 5 cm, a jej temperatura $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Kijanki karmiono suszoną pokrzywą.

Pomiary i dawki promieniowania ultrafioletowego

W miesiącach wiosennych i letnich 1998 roku zmierzono natężenie napromienienia UV-A. Pomiary wykonywano w okolicach Krakowa ($50^{\circ}04'\text{N}$, $19^{\circ}57'\text{E}$; 220 m n.p.m.) kilka razy w tygodniu, niezależnie od warunków atmosferycznych w godzinach 10–14, radiometrem Spectroline DRC-100X, wyposażonym w czujnik DIX 365 (zakres 320–400 nm, pik spektralny 365 nm). Uzyskane wartości w $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ przeliczono następnie na potencjalne średnie dawki w kJ/m^2 , które mogły działać na organizmy żywe w środowisku.

Dawki te wykorzystano w eksperymentalnej części badań do naświetlania hodowanych larw. Badane kijanki podzielono na 4 grupy (I, II, III i IV) po 15 osobników, które naświetlano codziennie lampami UV-A (320–400 nm), Sylwania (W-30 WTS-A) od I dekady kwietnia do II dekady maja. Czas naświetlania był tak dobrany w poszczególnych grupach, aby uzyskać potencjalne dawki panujące w środowisku naturalnym. Dawki te odpowiadały ekspozycji na promieniowanie słoneczne trwającej jedną (grupa II), dwie (grupa III) lub cztery godziny (grupa IV) (tab. 1 i 2). Osobniki grupy I nie były naświetlane promieniowaniem ultrafioletowym. W celu zapewnienia fotoreaktywacji zwierzęta ze wszystkich grup naświetlane były dodatkowo lampami fluorescencyjnymi imitującymi spektrum słoneczne (15 W, SUN-GLO Japan). Zachowano 12-godzinny okres światła i ciemności. Raz w tygodniu dostosowywano laboratoryjne dawki promieniowania UV-A do warunków środowiskowych, zmieniając czas naświetlania larw.

Pomiary metabolizmu podstawowego

W celu zmierzenia metabolizmu podstawowego larwy umieszczano pojedynczo w naczyniach szklanych o pojemności 53–55 ml na okres 1 godziny. Naczynia pomiarowe po umieszczeniu kijanek zamykano, aby nie dopuścić do dyfuzji tlenu z powietrza. Początkową i końcową zawartość tlenu w naczyniach pomiarowych oznaczono przy pomocy tlenomierza firmy Hana HI 9143 z automatyczną kompen-

sacją temperatury. Wszystkie pomiary wykonywano w temperaturze $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Metabolizm podstawowy kijanek podano w mgO_2/g masy ciała \times h.

Badania przeprowadzono na larwach w okresach premetamorfozy i prometamorfozy (Etkin 1964). Aby wyeliminować wpływ masy ciała badanych osobników na metabolizm podstawowy, kijanki podzielono na klasy wagowe. Konsumpcję tlenu oznaczono u larw ze wszystkich grup eksperymentalnych przypisanych do tej samej klasy wagowej. Waga badanych osobników w okresie premetamorfozy wynosiła 0,06–0,09 g, a w czasie prometamorfozy 0,14–0,2 g.

Wyniki

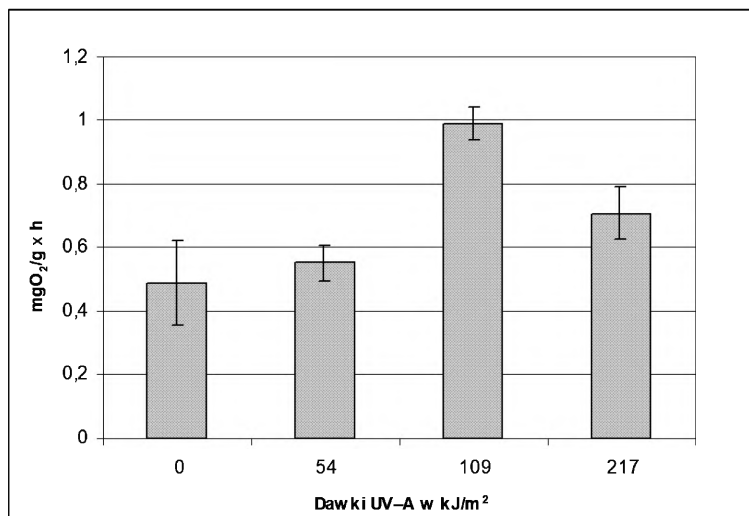
Wczesne stadia rozwojowe kijanek ropuchy szarej (premetamorfoza) występujące w I dekadzie kwietnia otrzymywały codziennie następujące dawki promieniowania ultrafioletowego A: grupa I 0 kJ/m^2 ; grupa II 54 kJ/m^2 ; grupa III 109 kJ/m^2 ; grupa IV 217 kJ/m^2 . W okresie tym stwierdzono statystycznie istotne różnice w aktywności metabolicznej badanych larw, wywołane zróżnicowanymi dawkami promieniowania ultrafioletowego. Najniższą aktywność metaboliczną wykazały kijanki grupy I (brak promieniowania UV-A) – $0,489 \text{ mgO}_2/\text{g}\times\text{h} \pm 0,133$. W grupach II i III stwierdzono wzrost aktywności metabolicznej larw towarzyszący rosnącym dawkom promieniowania UV-A. W grupie II ilość pobieranego tlenu wynosiła średnio $0,551 \text{ mgO}_2/\text{g}\times\text{h} \pm 0,058$, a w III $0,990 \text{ mgO}_2/\text{g}\times\text{h} \pm 0,052$. U kijanek grupy IV, naświetlanych najwyższymi dawkami promieniowania UV-A stwierdzono istotny spadek aktywności metabolicznej w porównaniu z grupą III. Średni poziom pobieranego tlenu przez larwy z IV grupy wynoszący $0,708 \text{ mgO}_2/\text{g}\times\text{h} \pm 0,081$ był zarazem wyższy niż w przypadku larw z grup I i II. Uzyskane wyniki tej części eksperymentu przedstawia tabela 1 i ryc 1.

W kolejnym okresie badań przypadającym na II dekadę maja zmierzono metabolizm podstawowy u kijanek w okresie prometamorfozy. Średnie dzienne dawki promieniowania UV-A wynosiły: w grupie I 0 kJ/m^2 ; w grupie II 55 kJ/m^2 ; w grupie III 110 kJ/m^2 i w grupie IV 220 kJ/m^2 . Najwyższą aktywność metaboliczną wykazały w tym okresie badań larwy z grupy I (brak promieniowania UV-A) – $0,247 \text{ mgO}_2/\text{g}\times\text{h} \pm 0,013$. Naświetlanie małymi i średnimi dawkami promieniowania UV-A spowodowało wyraźny spadek ilości pobieranego przez larwy tlenu w porównaniu z grupą I. Średnia konsumpcja tlenu wynosiła w grupie II $0,197 \text{ mgO}_2/\text{g}\times\text{h} \pm 0,024$ oraz w grupie III $0,077 \text{ mgO}_2/\text{g}\times\text{h} \pm 0,019$. Ilość pobranego tlenu przez larwy grupy IV – $0,156 \text{ mgO}_2/\text{g}\times\text{h} \pm 0,017$ – była wyższa niż w grupie III oraz wyraźnie niższa niż w grupach I i II. Różnice w aktywności metabolicznej pomiędzy osobnikami z poszczególnych grup eksperymentalnych były statystycznie istotne. Uzyskane wyniki z drugiej części eksperymentu zebrano w tabeli 2 i zilustrowano na ryc. 2.

Grupa	Dawki w kJ/m ²	Średnia konsumpcja tlenu w mgO ₂ /g×h ± SD	t		
I	0	0,489 ± 0,133			
II	54	0,551 ± 0,058	t _{I-II} =1,098		
III	109	0,990 ± 0,052	t _{I-III} =7,798*	t _{II-III} =13,459*	
IV	217	0,708 ± 0,081	t _{I-IV} =3,068*	t _{II-IV} =3,946*	t _{III-IV} =6,566*

Tabela 1. Konsumpcja tlenu przez kijanki ropuchy szarej w okresie premetamorfozy pod wpływem określonych dawek promieniowania UV-A

*różnica statystycznie istotna przy p<0,05

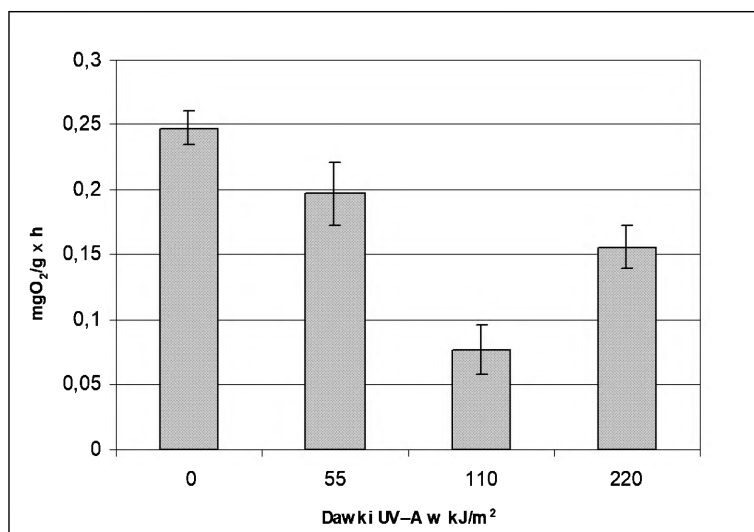


Ryc. 1. Wpływ promieniowania UV-A na konsumpcję tlenu przez kijanki ropuchy szarej w czasie premetamorfozy

Grupa	Dawki w kJ/m ²	Średnia konsumpcja tlenu w mgO ₂ /g×h ± SD	t		
I	0	0,247 ± 0,013			
II	55	0,197 ± 0,024	t _{I-II} =4,811*		
III	110	0,077 ± 0,019	t _{I-III} =19,461*	t _{II-III} =9,176*	
IV	220	0,156 ± 0,017	t _{I-IV} =10,693*	t _{II-IV} =3,089*	t _{III-IV} =7,066*

Tabela 2. Konsumpcja tlenu przez kijanki ropuchy szarej w okresie premetamorfozy pod wpływem określonych dawek promieniowania UV-A

*różnica statystycznie istotna przy p<0,05



Ryc. 2. Wpływ promieniowania UV-A na konsumpcję tlenu przez kijanki ropuchy szarej w czasie prometamorfozy

Dyskusja

Uzyskane wyniki badań dowodzą, że promieniowanie UV-A wykazuje istotny wpływ na aktywność metaboliczną larw ropuchy szarej (*Bufo bufo* L.).

Winckler i Fidhiany (1996) wykazali, że promieniowanie UV-A obniża metabolizm podstawowy u ryby pielęgnicy zebry (*Cichlasoma nigrofasciatum*). Badane przeze mnie kijanki w starszych stadiach rozwojowych również reagowały obniżeniem aktywności metabolicznej na stosowane dawki promieniowania ultrafioletowego. Obniżenie aktywności metabolicznej wywołane przez działanie promieniowania ultrafioletowego zostało także potwierdzone przez wyniki badań prowadzonych na larwach gładzicy (*Pleuronectes platessa*). Zjawisko to może być związane z zakłóceniem mechanizmów regulujących przebieg procesów oddechowych (Freitag i in. 1998). Okazuje się, że promieniowanie UV-A zwiększa przepuszczalność błon białkowo-lipidowych i wykazuje niszczący wpływ na organella komórkowe (Beer i in. 1993). Ma to z pewnością ogromne znaczenie dla przebiegu procesów oddechowych na poziomie komórkowym. Inne badania (Nagl i Hofer 1997; Formicki – dane niepublikowane) wykazują, że promieniowanie ultrafioletowe zwiększa grubość naskórka u larw różnych gatunków płazów. Zjawiska te mogą utrudnić dyfuzję tlenu z wody do naczyń włosowatych w skórze (Spotila i in. 1992), co prawdopodobnie wywiera negatywny wpływ na konsumpcję tlenu przez naświetlane larwy.

Z drugiej strony istnieje wiele danych wskazujących na to, że promieniowanie ultrafioletowe nasila procesy wymagające dużych nakładów energetycznych, co z kolei może zwiększać konsumpcję tlenu. Do zjawisk tych można zaliczyć nasilenie podziałów mitotycznych w naskórku (Noceda i in. 1997), indukcję melanogenezy (Abdel-Malek i in. 1994) czy zwiększenie aktywności enzymów oksydoredukcyjnych (Dziubek i Formicki 1996; Steenvoorden i Vanhenegouwen 1998).

Na szczególną uwagę zasługuje zjawisko odmiennej reakcji kijanek w różnych okresach rozwojowych na działanie promieniowania UV-A. Aktywność metaboliczna kijanek w okresie premetamorfozy była wyższa niż w stadiach późniejszych (prometamorfoza). Zjawisko to związane jest zapewne z większą masą ciała starszych osobników (Whitford i Meltzer 1976). W przypadku młodych kijanek największa konsumpcja tlenu wystąpiła po zastosowaniu średnich dawek promieniowania UV-A. Ilość pobranego tlenu była natomiast znacznie niższa u osobników nie naświetlanych oraz w grupach naświetlanych niskimi i wysokimi dawkami promieniowania UV-A. Kijanki starsze (prometamorfoza) najwyższą aktywność metaboliczną wykazały przy braku promieniowania ultrafioletowego. Stosunkowo dużą konsumpcją tlenu charakteryzowały się również kijanki naświetlane niskimi oraz najwyższymi dawkami promieniowania UV-A. Najniższy poziom metabolizmu podstawowego odnotowano u larw w okresie prometamorfozy naświetlanych średnimi dawkami promieniowania UV-A. Obniżenie aktywności metabolicznej u kijanek może być związane ze zwolnieniem, a wzrost konsumpcji tlenu z przyspieszeniem rozwoju larw (Duellman i Trueb 1986). Juszczak (1987) podaje, że niekorzystne warunki środowiskowe hamują rozwój kijanek we wczesnych stadiach. Natomiast u starszych larw obserwuje się zjawisko przyspieszenia rozwoju pod wpływem stresu środowiskowego (ucieczka od niekorzystnych czynników). Z powyższych danych wynika, że zbyt małe lub zbyt wysokie dawki UV-A, obniżając aktywność metaboliczną młodych kijanek, mogą mieć hamujący wpływ na ich rozwój. Wzrost aktywności metabolicznej u starszych larw naświetlanych zbyt niskimi lub zbyt wysokimi dawkami promieniowania może być związany z przyspieszeniem rozwoju i ucieczką od niekorzystnych warunków życia. Przypuszczenie to częściowo potwierdzają wyniki badań przeprowadzonych przez innych autorów. Okazuje się, że stres związany ze wzrostem temperatury powoduje zwiększenie konsumpcji tlenu (Seidel i Lindeborg 1973), z kolei wyższa aktywność metaboliczna kijanek skraca okres życia larwalnego (Duellman i Trueb 1986). Reakcja stresowa płazów związana jest ze wzrostem poziomu katecholamin w osoczu krwi (Herman 1992), które z kolei zwiększają zapotrzebowanie tlenowe organizmu (Hutchinson i Dupre 1992). Przyspieszenie tempa rozwoju larw płazów skojarzone jest ze wzrostem poziomu hormonów tarczycowych. Jednak hormony te nie mają wpływu na ilość pobieranego tlenu przez kijanki (Ziennicki 1984). Dlatego też należy sądzić, że odnotowane zmiany aktywności metabolicznej larw ropuchy szarej nie są bezpośrednio związane z aktywnością tarczycy.

Uzyskane przez mnie wyniki wskazują, że występujące w Europie Środkowej dawki promieniowania ultrafioletowego wywierają wyraźny wpływ na aktywność metaboliczną larw ropuchy szarej. Zmiany te mogą świadczyć o tym, że promieniowanie UV-A panujące w okresie wiosenno-letnim może być czynnikiem wpływającym na rozwój larw tego gatunku. Dotyczy to zarówno wysokich, jak i zbyt niskich dawek oraz braku promieniowania UV. Można także przypuszczać, że zakłócenia przemian metabolicznych u larw ropuchy szarej mogą mieć pewien wpływ na szanse przeżycia tych zwierząt, szczególnie wobec działania wielu innych zagrożeń ze strony środowiska.

Bibliografia

- Abdel-Malek Z., Swope V., Smalara D., Babcock G., Dawes S., Nordlund J., 1994, *Analysis of the UV-Induced Melanogenesis and Growth Arrest of Human Melanocytes*, *Pigment Cell Res.*, 7, 326–332
- Beer J.Z., Olvey K.M., Miller S.A., Thomas D.P., Godar D.E., 1993, *Non-Nuclear Damage and Cell Lysis Are Induced by UVA, but not UVB or UVC, Radiation in Three Strains of L5178Y Cells*, *Photochem. Photobiol.*, 58, 676–681
- Blaustein A.R., 1994, *Chicken Little or Nero's Fiddle? Perspective on Declining Amphibian Populations*, *Herpetologica*, 50, 85–97
- Blaustein A.R., Hoffman P.D., Hokit D.G., Kiesecker J.M., Walls S.C., Hays J.B., 1994, *UV Repair and Resistance to Solar UV-B in Amphibian Eggs: A Link to Populations Declines?*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Ecology*, 91, 1791–1795
- Duellman W.E., Trueb L., 1986, *Biology of Amphibians*, McGraw-Hill Book Company, New York, St. Louis, San Francisco
- Dziubek K., Formicki G., 1996, *Wpływ promieniowania UV-A na poziom glutationu zredukowanego (GSH) w wybranych narządach Rana esculenta L. w okresie odrętwienia zimowego*, *Biologia Płazów i Gadów. IV Ogólnopolska Konferencja Herpetologiczna*, Kraków 26–27 września 1996. Materiały konferencyjne, 16–20
- Etkin W., 1964, *Metamorphosis*, [w:] *Physiology of the Amphibia*, red. J.A. Moore, Academic Press, New York, 427–468
- Freitag J.F., Steer H.U., Storz U.C., Paul R.J., 1998, *Sublethal Impairment of Respiratory Control in Plaice (Pleuronectes platessa) Larvae Induced by UV-B Radiation, determining Using a Novel Biocybernetical Approach*, *Marine Biology*, 132, 1–8
- Herman C.A., 1992, *Endocrinology*, [w:] *Environmental Physiology of the Amphibians*, red. M.E. Feder, W.W. Burggren, The University of Chicago Press/Chicago and London, 40–54
- Hutchinson V.H., Dupre R.K., 1992, *Thermoregulation*, [w:] *Environmental Physiology of the Amphibians*, red. M.E. Feder, W.W. Burggren, The University of Chicago Press/Chicago and London, 206–249
- Juszczyk W., 1987, *Płazy i gady krajowe*, PWN, Warszawa
- Linetsky M., James H.L., Ortwerth B.J., 1996, *The generation of Superoxide Anion by the UVA Irradiation of Human Lens Protein*, *Exp. Eye Res.*, 63, 67–74
- Lizana M., Pedraza E.M., 1998, *The Effects of UV-B Radiation on Toad Mortality in Mountainous Areas of Central Spain*, *Conservation Biology*, 12, 703–707
- Nagl A.M., Hofer R., 1997, *Effect of Ultraviolet Radiation on Early Larval Stages of the Alpine Newt, Triturus alpestris, under Natural and Laboratory Conditions*, *Oecologia*, 110, 524–519

- Noceda C., Sierra S.G., Martinez J.L., 1997, *Histopatology of UV-B Irradiated Brown Trout Salmo trutta Skin*, Dis. Aquat. Org., 31, 103–108
- Pechmann J.H.K., Scott D.E., Semlitsch R.D., Caldwell J.P., Vitt L.J., Gibbons J.W., 1991, *Declining Amphibian Populations: The Problem of Separating Human Impacts from Natural Fluctuations*, Science, 253, 892–895
- Robert C., Muel B., Benoit A., Dubertret L., Savasin A., Stary A., 1996, *Cell Survival and Shuttle Vector Mutagenesis Induced by Ultraviolet A and Ultraviolet B Radiation in a Human Cell Line*, J. Invest. Dermatol., 106, 721–728
- Seidel M.E., Lindeborg R.G., 1973, *Lags in Metabolic Response to Temperature of Two Garter Snakes, Thamnophis elegans and Thamnophis radix*, Herpetologica, 29, 358–360
- Spotila J.R., O'Connor M.P., Bakken G.S., 1992, *Biophysics of Heat and Mass Transfer*, [w:] *Environmental Physiology of the Amphibians*, red. M.E. Feder, W.W. Burggren, The University of Chicago Press/Chicago and London, 59–80
- Steenvoorden D.P.T., Vanhenegouwen G.M.J.B., 1998, *The Use of Endogenous Antioxidants to Improve Photoprotection*, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 41, 1–2
- Wake D.B., 1991, *Declining Amphibian Populations*, Science, 253, 860
- Whitford W.G., Meltzer K.H., 1976, *Changes in O₂ Consumption, Body Water and Lipid in Burrowed Desert Juvenile Anurans*, Herpetologica, 32, 23–25
- Williamson C.E., 1996, *Effects of UV Radiation on Freshwater Ecosystems*, Intern. J. Environmental Studies, 51, 245–256
- Winckler K., Fidhiany L., 1996, *Significant Influence of UVA on the General Metabolism in the Growing Cichlid fish, Cichlasoma nigrofasciatum*, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 33, 131–135
- Ziennicki K., 1984, *Metabolizm energetyczny w mitochondriach wątroby żaby Rana lessonae Cam. podczas rozwoju larwalnego i metamorfozy*, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Seria Zoologia, 12, 1–123
- Zug G.R., 1993, *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*, Academic Press, INC, California

Effects of ultraviolet UV-A radiation on oxygen consumption in grey toad (*Bufo bufo* L.) tadpoles during various developmental stages

Abstract

The effects of ambient UV-A radiation (Cracow district, Poland, 50°04'N, 19°57'E; 220 m a.s.l.) on general metabolism was studied in gray toad tadpoles (*Bufo bufo* L.). General metabolism was measured as oxygen consumption at rest. Measurements were taken in tadpoles during premetamorphosis and prometamorphosis. Applied radiation caused significant increases in oxygen consumption in young tadpoles (premetamorphosis). On the other hand tadpoles exposed to UV-A radiation during the period of prometamorphosis significantly decreased their metabolic rate. These results suggest that ambient levels of UV-A radiation affect the metabolic rate of gray toad larvae living in shallow habitats. This phenomenon may increase the susceptibility of larvae to predation and ecologically relevant pathogens. The mechanism of action of UV-A on general metabolism in tadpoles is discussed.