

Wpływ zakwaszania wody dwutlenkiem węgla na procesy fizjologiczne bałtyckich bezkręgowców

Magdalena Anna Jakubowska

Stężenie dwutlenku węgla w atmosferze znacząco wzrosło od początku okresu industrialnego, głównie na skutek spalania paliw kopalnych. Szacuje się, że wody oceaniczne pochłonęły dotychczas prawie połowę wyemitowanego do atmosfery dwutlenku węgla. Gaz ten rozpuszcza się w wodzie morskiej tworząc szybko dysocjujący, słaby kwas węglowy. Na skutek tego procesu równowaga między nieorganicznymi formami węgla przesuwana jest w stronę zwiększonego stężenia CO_2 i obniżonej koncentracji jonów węglanowych, co z kolei powoduje wzrost kwasowości, a zatem obniżanie pH wody. W wyniku tego zjawiska pH powierzchniowych wód morskich obniżyło się o około 0,1 jednostki w stosunku do okresu, kiedy przemysł był mniej rozwinięty. Zakładając dalszy wzrost stężenia atmosferycznego CO_2 , przewiduje się, że do końca tego stulecia pH wód morskich może obniżyć się nawet o 0,4 jednostki. Zjawisko to, nazywane zakwaszaniem oceanów, uważane jest za jedno z największych zagrożeń dla różnorodności biologicznej. Spowodowane jest to faktem, że CO_2 z łatwością dyfunduje przez błony biologiczne i powoduje zakwaszanie płynów ustrojowych, zarówno wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowych, zaburzając równowagę kwasowo-zasadową organizmu. To z kolei może mieć dalsze, poważne konsekwencje dla różnych procesów fizjologicznych. Dotychczasowe badania wykazały, że wartości pH, bądź ciśnienia parcjalego CO_2 prognozowane dla wód oceanicznych na niedaleką przyszłość, wpływają negatywnie między innymi na zachowanie, osmoregulację, transport tlenu, tempo metabolizmu, kalcyfikację, syntezę białek, wzrost, reprodukcję i w efekcie na przeżywalność organizmów morskich. W konsekwencji, może to mieć poważne skutki dla całego ekosystemu. Co więcej, wpływ zakwaszania wód morskich na skutek absorpcji atmosferycznego CO_2 może być także lokalnie wzmacniany przez inny antropogeniczny problem - eutrofizację, obserwowaną przede wszystkim w rejonach przybrzeżnych. Pomimo, że w Morzu Bałtyckim notuje się podobny trend obniżania się odczynu pH jak w wodach oceanicznych, to dekompozycja dużych ilości materii organicznej w tym zbiorniku dodatkowo zwiększa uwalnianie CO_2 , prowadząc do zakwaszania wody, w szczególności warstw przydennych. Warto wspomnieć, że w niektórych przybrzeżnych rejonach Morza Bałtyckiego notuje się obecnie dużo niższe wartości pH niż prognozowane dla otwartych wód oceanicznych na koniec tego wieku. Podobnie jak inne przybrzeżne rejony Bałtyku,

również Zatoka Gdańska charakteryzuje się znacznymi sezonowymi wahaniami pH, często przekraczającymi 1 jednostkę. Są one obserwowane zarówno w wodach powierzchniowych, jak i przydenne i jest to powiązane z rzeczny dopływem związków biogenicznych, mineralizacją materii organicznej i dynamiką wody [1]. W związku z tym organizmy żyjące w przybrzeżnych rejonach Morza Bałtyckiego, szczególnie fauna bentosowa, mogą być narażone na gwałtowne oraz znaczne zmiany pH i równowagi węglanowej w wodzie, co potencjalnie stanowi dla nich duży stres. Jednak prognozowanie przyszłych zmian w chemizmie wody w tak dynamicznym środowisku, jak również ich fizjologicznych konsekwencji dla organizmów jest znacznie trudniejsze niż dla powierzchniowych wód oceanicznych. Warto również wspomnieć, że w większości przybrzeżnych ekosystemów problem zakwaszania współwystępuje z innymi negatywnymi czynnikami. Wzajemne oddziaływania między acydyfikacją a innymi stresorami są często skomplikowane i mogą wykazywać działanie synergistyczne. W Morzu Bałtyckim, wzrastające zjawisko eutrofizacji, które przyczynia się do fluktuacji pH, jest również główną przyczyną niedoborów tlenowych - innego negatywnego czynnika, który wpływa na behavior i fizjologię organizmów bentosowych. Pomimo, że zakwaszanie wód jest problemem globalnym, niewiele jest badań nad wpływem tego czynnika na organizmy występujące w Bałtyku. Istniejąca na ten temat literatura ogranicza się do kilku badań równowagi kwasowo-zasadowej, respiracji, wzrostu osobiczego i ekspresji genów u dwóch gatunków małży, głównie z zachodniego Bałtyku. Zupełnie brakuje natomiast badań nad wpływem potencjalnego synergistycznego działania acydyfikacji i innych czynników na organizmy żyjące w Bałtyku. Warto również zauważyć, że pomimo obserwowanego w ciągu ostatnich lat wzrostu zainteresowania badaniami dotyczącymi wpływu zakwaszania na organizmy morskie, niewiele z nich koncentruje się na zmianach behavioru i tempa metabolizmu, będącymi pierwszymi zauważalnymi reakcjami organizmu na stres środowiskowy, a także niespecyficznymi wskaźnikami (bioindykatorami) stresu środowiskowego. Należy także pamiętać, że reakcje na zakwaszanie wody mogą się istotnie różnić nawet między blisko spokrewnionymi gatunkami. Co więcej, obserwowana jest również duża zmienność wewnątrzgatunkowa, związana z wykształcaniem lokalnych przystosowań do tego czynnika. Dalsze badania, szczególnie na organizmach z miejsc charakteryzujących się naturalnymi wahaniami CO₂ wydają się zatem niezwykle potrzebne.

Powyższe rozważania przyczyniły się do podjęcia badań, których celem było określenie wpływu zakwaszania wody dwutlenkiem węgla na procesy fizjologiczne czterech gatunków bezkręgowców: podwoja wielkiego *Saduria entomon*, kielża oceanicznego *Gammarus oceanicus*, rogowca bałtyckiego *Macoma balthica* i omułka *Mytilus edulis*

trossulus, reprezentujących skorupiaki i małże, które stanowią istotny składnik zespołów bentosowych w Morzu Bałtyckim. W tym celu określono zmiany tempa metabolizmu, które odzwierciedlają zmiany wszystkich procesów fizyko-chemicznych zachodzących w organizmie. Badania przeprowadzono podczas krótko- (12 godzin), jak i długookresowej (14 dni) ekspozycji na różne warianty pH (8,2 – 6,0), przy zastosowaniu kalorymetrii bezpośredniej, opartej o pomiar ciepła wyprodukowanego przez organizm. Jest to jedyna bezpośrednia i bezinwazyjna metoda pozwalająca na pomiar tempa metabolizmu całkowitego. Jest to szczególnie ważne w przypadku badań na organizmach zdolnych do uzyskiwania energii na drodze metabolizmu beztlenowego, do których należą m.in. niektóre bezkręgowce. U takich organizmów zastosowanie metod pośrednich, jak np. pomiar respiracji, może nie dostarczyć wiarygodnych wyników. Istotny jest również fakt, że pierwszą zauważalną reakcją organizmu na stres środowiskowy jest zmiana jego behawioru. Jest to niespecyficzny biomarker stanu środowiska, podobnie jak tempo metabolizmu. Co więcej obie zmienne są skorelowane – behawior (aktywność) organizmu determinuje poziom metabolizmu (spoczynkowy i aktywny), co sprawia iż monitorowanie zachowania jest niezwykle istotne podczas badań tempa metabolizmu. Zastosowana w niniejszych badaniach kalorymetria bezpośrednia umożliwiła jednoczesny pomiar tych dwóch parametrów. W związku z tym w pracy określono także behawior, tj. aktywność lokomotoryczną skorupiaków i zmiany w otwieraniu i zamykaniu muszli małży, u wszystkich badanych gatunków [1-4]. Ponadto, u *S. entomon* i *M. balthica* przeprowadzono także badania aktywności związanej z zakopywaniem się w osadzie, monitorując jednocześnie ich przeżywalność [1,3]. Dodatkowo u *S. entomon* i *G. oceanicus* określono stężenie osmotyczne [1,2], jak również stężenie jonów chlorkowych i pH hemolimfy [1]. U skorupiaków osmolalność hemolimfy lub różnica między osmolalnością hemolimfy i wody jest uważana za miarodajny wskaźnik stresu środowiskowego, szczególnie gdy jest on związany ze zmianami składu jonowego wody. Wydaje się też, że monitorowanie tego parametru jest szczególnie istotne w przypadku bałtyckich skorupiaków pochodzenia morskiego, które utrzymują osmolalność hemolimfy na poziomie dużo wyższym niż wartości otaczającego hiposmotycznego środowiska. Wiąże się to z ponoszeniem wysokich kosztów energetycznych związanych z regulacją osmotyczną. Jak wspomniano wcześniej, wpływ acydyfikacji może być dodatkowo wzmacniany przez inne czynniki, między innymi nasycenie wody tlenem. W związku z tym, za kolejny cel pracy przyjęto określenie, czy zakwaszenie wykazuje silniejsze działanie w wodzie o obniżonym nasyceniu tlenem. Badania przeprowadzono na *M. edulis trossulus* [4].

W pracy poczyniono szereg założeń. Jednym z nich było, że zakwaszanie wody wpłynie w istotny sposób na zachowanie badanych gatunków, co u skorupiaków może być związane ze zwiększoną aktywnością lokomotoryczną, spowodowaną chęcią ucieczki z niekorzystnych warunków środowiskowych. Przeciwnie, u małży należy się raczej spodziewać, że acydyfikacja może wywołać zmniejszenie aktywności poprzez odizolowanie się od niekorzystnych warunków i zamknięcie muszli, co z kolei obniży tempo metabolizmu. Również behavior związany z zakopywaniem się w osadzie u *S. entomon* i *M. balthica* może być zaburzony przez niskie pH, w związku z faktem, że gatunki należące do infauny podczas długotrwałych, niekorzystnych warunków środowiskowych zwykle zmniejszają głębokość zakopania i wychodzą na powierzchnię osadu. Jest to zazwyczaj związane z gorszymi warunkami panującymi w osadzie niż w wodzie naddennej. Podczas zakwaszania jedynie aktywny transport jonów między płynami ciała a środowiskiem umożliwia utrzymanie równowagi kwasowo-zasadowej. Brak kompensacji obniżonego pH płynów ustrojowych powoduje redukcję tempa metabolizmu. U małży, które posiadają mało wydajne mechanizmy wymiany jonowej, należy się zatem spodziewać obniżenia tempa metabolizmu związanego nie tylko z obniżoną aktywnością lokomotoryczną, ale również z brakiem buforowania zakwaszenia płynów ciała. W warunkach ekspozycji na niskie pH wody tempo metabolizmu skorupiaków może być natomiast podwyższone na skutek wzmożonej aktywności pompy sodowo-potasowej i innych enzymów. To z kolei może mieć wpływ na stężenie osmotyczne hemolimfy. Wiadomo, że u wielu gatunków bezkręgowców zarówno acydyfikacja, jak i niedobór tlenu w wodzie powodują obniżenie tempa metabolizmu. Postawiono zatem kolejną hipotezę, że jednoczesna ekspozycja na niskie pH i niskie nasycenie wody tlenem spowoduje większe zmiany w badanych parametrach niż oba czynniki niezależnie. Należy także przypuszczać, że ze względu na fakt, iż małże są słabymi jono- i osmoregulatorami, to zakwaszanie wody bardziej wpłynie na badane u nich parametry niż u skorupiaków, które mają dobrze rozwinięte mechanizmy wymiany jonowej. Z drugiej strony, wpływ acydyfikacji na bałtyckie bezkręgowce może być mniejszy niż na organizmy z innych rejonów. Osobniki żyjące w okresowo zakwaszonym środowisku Morza Bałtyckiego mogą być w pewnym stopniu odporne i zaadaptowane do środowiskowej hiperkapnii. Także adaptacje do innych negatywnych czynników (np. niedoborów tlenowych, niskiego zasolenia, eutrofizacji), mogły w pewnym stopniu przyczynić się do wykształcenia preadaptacji do zakwaszania u badanych gatunków.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że krótkookresowa ekspozycja na zakwaszanie wody nie wpłynęła istotnie na behavior badanych skorupiaków i małży, które

zachowywały się w sposób naturalny. Można było wyróżnić u nich okresy spoczynku i aktywności, którym odpowiadały odpowiednio niskie i wysokie wartości produkcji ciepła. Zaobserwowano, że zarówno tempo metabolizmu aktywnego, jak również zakres aktywności (stosunek między tempem metabolizmu aktywnego i spoczynkowego) nie zmieniły się pomimo zmian pH wody [1-4]. Ponadto u *M. balthica* i *M. edulis trossulus* nie zaobserwowano zmian w behawiorze związanym z zamykaniem i otwieraniem muszli podczas ekspozycji na różne warianty pH [3,4]. Aktywność związana z zakopywaniem się, mierzona po dwóch tygodniach ekspozycji, również potwierdziła naturalne zachowanie *S. entomon*, który spędza większość swojego życia zakopany w osadzie [1]. Z kolei u *M. balthica* odnotowano istotne różnice w wyżej wymienionym behawiorze w wariantach obniżonego pH w stosunku do warunków kontrolnych. Zanotowany wysoki udział procentowy osobników znajdujących się na powierzchni osadu w najniższym badanym wariantcie pH, może natomiast wskazywać, że gatunek ten nie musi znacząco obniżać aktywności podczas odżywiania i zmniejszać wydatków energetycznych, co również należy uznać za przystosowanie do badanego czynnika [3]. Behawior związany z poruszaniem się na powierzchni osadu w związku z odżywianiem się zdeponowaną tam materią, wymaga większych nakładów energetycznych niż pożywanie się zawieszoną w toni materią za pomocą wystawionego z osadu syfonu.

Przeprowadzone badania wykazały również, że krótkookresowa ekspozycja na zakwaszenie wody nie wpłynęła istotnie na tempo metabolizmu spoczynkowego żadnego z badanych gatunków [1-4]. Otrzymane wyniki wskazują zatem na to, że acydyfikacja nie wywołała tzw. depresji metabolicznej ani nie doprowadziła do zwiększonych wydatków energetycznych. Zaobserwowana sytuacja powinna być uważana za bardzo korzystną dla badanych gatunków, ponieważ zarówno redukcja jak i wzrost tempa metabolizmu powoduje zmiany w gospodarce energetycznej organizmu i zaburza rozdysponowanie energii na różne procesy fizjologiczne. Zdolność badanych organizmów do pozostania aktywnymi i prawdopodobnie do uzyskiwania energii na drodze metabolizmu tlenowego w warunkach hiperkapnii powinna być uznana za adaptację, która umożliwia im utrzymanie podstawowych funkcji fizjologicznych, jak np. odżywianie czy wymiana gazowa. U *M. edulis trossulus* nie zaobserwowano również synergistycznego wpływu obniżonego pH i obniżonego nasycenia wody tlenem. Jednakże niskie nasycenie tlenem w przeciwieństwie do pH było sygnałem do zamknięcia muszli i odizolowania się od niekorzystnych warunków, co wpłynęło na istotne obniżenie czasu spędzonego aktywnie. Wskazuje to, że niedobór tlenu jest dla tego gatunku bardziej stresującym czynnikiem, niż acydyfikacja [4]. Z drugiej strony można przypuszczać,

że adaptacje bałtyckich małży do okresowych niedoborów tlenowych mogły również przyczynić się do podwyższonej tolerancji na acydyfikację. Podczas zamknięcia muszli ograniczona wymiana gazowa ze środowiskiem, jak również kwasy produkowane podczas metabolizmu beztlenowego, powodują zakwaszanie płynów ciała. Organizmy zaadaptowane do niskiego natlenienia posiadają natomiast przystosowania, które umożliwiają im długookresowe przetrwanie w tych warunkach, takie jak np. zmniejszoną ilość produkowanych protonów i zmniejszone tempo ich akumulacji.

W przypadku długookresowej ekspozycji na obniżone pH u *M. balthica* zaobserwowano natomiast zmiany w tempie metabolizmu. Zarówno spoczynkowe, jak i aktywne tempo tego procesu u badanego gatunku wzrosło istotnie w najniższym eksperymentalnym pH (6,0) w stosunku do wariantu kontrolnego. Może to być związane z dodatkowymi kosztami regulacji kwasowo-zasadowej i ekspresją enzymów odpowiedzialnych za procesy związane z biomineralizacją. Można to również uznać za pewnego rodzaju przystosowanie do zakwaszania, gdyż jak wiadomo z literatury, podwyższone tempo metabolizmu (świadczące o zachodzących procesach kompensacji) uważane jest za mechanizm związany z adaptacją do podwyższonego ciśnienia parcjalnego CO₂. Zakres aktywności obniżył się jednak u tego gatunku, wskazując na przeniesienie energii z aktywności na np. regulację kwasowo-zasadową, co w dłuższej perspektywie może być niekorzystne [3]. Zdolność badanych gatunków małży do utrzymania niezmiennego lub podwyższonego tempa metabolizmu podczas ekspozycji na zakwaszanie może być związana z faktem, że *M. edulis trossulus* i *M. balthica* mogą czerpać pewne korzyści z eutrofizacji. Jak wiadomo z literatury, podwyższone stężenia związków biogenicznych, przyczyniające się do nadmiernego rozwoju fitoplanktonu w Bałtyku, zapewniają im pozyskanie wraz z pokarmem wystarczającej ilości energii na wzrost, utrzymanie wysokiego tempa metabolizmu i pozwalają radzić sobie ze stresem środowiskowym, prawdopodobnie również z acydyfikacją.

Otrzymane wyniki pokazały również, że bałtyckie skorupiaki są zdolne do utrzymywania wysokiej osmolalności hemolimfy zarówno podczas krótko- jak i długookresowej ekspozycji na zakwaszanie, co zaobserwowano odpowiednio u *S. entomon* i *G. oceanicus* [1,2]. Przy czym w przypadku drugiego z gatunków taka sytuacja nie generowała dodatkowych kosztów fizjologicznych, ponieważ tempo metabolizmu spoczynkowego nie uległo zmianie [2]. U *S. entomon* zakwaszanie również nie wpłynęło na tempo metabolizmu, natomiast trzeba wspomnieć, że było ono mierzone po krótszym czasie niż stężenie osmotyczne hemolimfy. U tego gatunku wysoka osmolalność hemolimfy podczas acydyfikacji była za to związana z jej podwyższonym pH, co wskazuje na bardzo

efektywną kompensację. Co ciekawe, nie zanotowano zmian w stężeniu jonów chlorkowych w hemolimfie, co oznacza, że u badanego gatunku występuje inny, efektywny mechanizm regulujący zmiany równowagi kwasowo-zasadowej niż obserwowana często u skorupiaków wymiana jonów chlorkowych na wodorowęglanowe [1]. Fakt, że utrzymanie wysokiego stężenia osmotycznego płynów ciała nie generowało dodatkowych kosztów energetycznych może wskazywać, że badane gatunki są zaadaptowane do dużych wahań CO_2 w środowisku. Z drugiej strony można przypuszczać, że podczas długotrwałej adaptacji do życia w hipotonicznym środowisku Morza Bałtyckiego skorupiaki wykształciły mechanizmy, umożliwiające im funkcjonowanie także w środowisku o obniżonym pH. Jest to o tyle prawdopodobne, że oba przystosowania są oparte o podobne procesy. W środowisku o niskim zasoleniu hiperregulujące skorupiaki wymagają dodatkowej energii na regulację osmotyczną płynów ciała, więc mechanizmy te muszą już i tak wydajnie funkcjonować. Na wyżej wymienione adaptacje badanych gatunków wskazywać może również ich wysoka przeżywalność podczas długookresowej ekspozycji na zakwaszenie [1,3].

Przeprowadzane badania potwierdziły hipotezę, że bałtyckie bezkręgowce są odporne na zakwaszenie wody dwutlenkiem węgla. Co więcej, badane gatunki okazały się nawet lepiej przystosowane niż zakładano, ponieważ u większości z nich nie zaobserwowano zmian w mierzonych parametrach. Natomiast nieliczne, zanotowane zmiany także można uznać za przystosowanie do badanego czynnika. Ponadto badane gatunki małży okazały się być równie tolerancyjne na acydyfikację jak skorupiaki. Przy czym nawet niskie nasycenie wody tlenem nie miało wpływu na obniżenie tej tolerancji. Przedstawiona rozprawa dostarcza pierwszych informacji na temat wpływu niskiego pH wody, spowodowanego wzrostem ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla, na procesy fizjologiczne bezkręgowców z południowego Bałtyku i pierwszych informacji na temat wpływu tego czynnika na bałtyckie skorupiaki. Również po raz pierwszy przeprowadzono badania jednoczesnego wpływu niskiego pH i nasycenia wody tlenem na bałtyckie organizmy. Warto także dodać, iż zaprezentowane badania są pierwszymi, w których do określenia jednoczesnych zmian w zachowaniu (aktywności) i tempie metabolizmu podczas ekspozycji na acydyfikację wody została wykorzystana kalorymetria bezpośrednia. Wydaje się także, że uzyskane wyniki istotnie uzupełniają informacje na temat osmoregulacji organizmów morskich w warunkach obniżonego pH, zwłaszcza iż badania dotyczące potencjalnych kosztów regulacji osmotycznej w warunkach hiperkapnii są nieliczne. W związku z tym można przypuszczać iż prezentowana rozprawa stanowi ważny wkład w badania z zakresu ekofizjologii organizmów morskich i tym samym stanowi istotne uzupełnienie literatury światowej.

Literatura:

- [1] Jakubowska M., Jerzak M., Normant M., Burska D., Drzazgowski J. 2013. Effect of carbon dioxide-induced water acidification on the physiological processes of the Baltic isopod *Saduria entomon*. *Journal of Shellfish Research* 32(3), 825-834.
- [2] Jakubowska M., Normant-Saremba M. 2016. The influence of carbon dioxide-induced water acidification on the osmotic and metabolic responses of the Baltic amphipod *Gammarus oceanicus*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 49(3), in press.
- [3] Jakubowska M., Normant-Saremba M. 2015. The effect of CO₂-induced seawater acidification on the behaviour and metabolic rate of the Baltic clam *Macoma balthica*. *Annales Zoologici Fennici* 52(5-6), 353-367.
- [4] Jakubowska M., Normant M. 2015. Metabolic rate and activity of blue mussel *Mytilus edulis* trossulus under short-term exposure to carbon dioxide-induced water acidification and oxygen deficiency. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 48(1), 25-39.