

Effects of temperature and salinity on body fluid dynamics and metabolism in the estuarine diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*)

Amanda Southwood Williard, Leigh Anne Harden, T. Todd Jones and
Stephen R. Midway

© 2019. PUBLISHED BY THE COMPANY OF BIOLOGISTS LTD | JOURNAL OF EXPERIMENTAL
BIOLOGY (2019) 222, JEB202390. DOI:10.1242/JEB.202390



Introduzione

La testuggine dal dorso di diamante è l'unica specie di tartaruga di ambienti temperati che **abita esclusivamente** nelle **paludi**, nelle **insenature di marea** e negli **estuari** lungo la **East Coast** e la **Costa del Golfo** degli Stati Uniti.

Essa sperimenta un **ampio range di salinità (11-35 psu)**, perciò la regolazione di acqua e sali è una delle prime sfide a cui si trova a far fronte, questa è realizzabile attraverso:

- ❑ strategie evasive -> **avoidance**, per ridurre gli scambi passivi
- ❑ meccanismi energia dipendenti per introdurre ed **estrudere attivamente sali**



La pressione osmotica dei fluidi corporei delle testuggini in condizioni naturali ricade nel range di **300-350 mOsm**, ed è tipicamente **IPOOSMOTICA** rispetto all'ambiente acquatico circostante

Caratteristiche morfologiche, fisiologiche e comportamentali le permettono di regolare la pressione osmotica dei fluidi corporei in un ambiente che presenta elevate variazioni di salinità (11-35 psu), tra queste:

- ❑ bassa permeabilità del tegumento
- ❑ aquatic-terrestrial shuttling e infossamento nel fango
- ❑ variazioni nell'approvvigionamento idrico e alimentare
- ❑ ghiandola lacrimale del sale



Regolazione osmotica

- ▶ I rettili hanno capacità limitate di modulare la loro pressione osmotica attraverso l'escrezione di sostanze di scarto perché il loro **reni non sono capaci di generare urina iperosmotica**
- ▶ Produzione e ritenzioni di **UREA** e altri osmoliti potrebbe permettere l'**aumento** di **pressione osmotica** e la ritenzione idrica
- ▶ Un'attiva estrusione di ioni inorganici (Na^+ , Cl^-) attraverso la **ghiandola lacrimale del sale**



Variazioni stagionali nel comportamento

- ❑ Ad una temperatura dell'acqua (TW) $\leq 20^{\circ}\text{C}$ le testuggini entrano in uno stato dormiente caratterizzato da **seppellimento nel fango**, **ipofagia** e **diminuzione** della **capacità metabolica**
 - > **riduzione scambi passivi**, minor uptake di sali con l'alimentazione
- ❑ Durante la stagione calda le testuggini possono fare maggior affidamento sull'estrusione attiva di ioni attraverso le ghiandole del sale, dato il maggiore tasso di scambi attivi e passivi di sale e acqua con l'ambiente e la necessità di un continuo intake di energia per supportare l'elevata domanda metabolica



Obiettivi dello studio

In questo studio sono state analizzate:

- ❑ Le **dinamiche dei fluidi corporei** (acqua corporea totale (%TBW), tasso di turnover dell'acqua (WTR), flusso di acqua giornaliero (DWF)
- ❑ Il **consumo di ossigeno** V_{O_2}
- ❑ Lo **stato osmotico** (osmolalità del plasma, ioni inorganici, osmoliti organici)

di testuggini acclimatate per 3 settimane a salinità di 12 psu ed esposte ad un acuto aumento di salinità (da 12 a 35 psu) per 3-5 gg a due t sperimentali, 10 e 25 °C, per comprendere l'importanza relativa di

aggiustamenti comportamentali VS aggiustamenti osmotici

nell'OSMOREGOLAZIONE,

in un range di T stagionalmente rilevanti



► I ricercatori si aspettavano

1. Una **diminuzione nel tasso di turnover dell'acqua** (WTR) e **nel flusso di acqua giornaliero** (DWF), riflessi di aggiustamenti comportamentali (cioè di una modulazione dell'ingestione di cibo e acqua) per ridurre gli scambi di acqua e sali con l'ambiente

2. **Un aumento nel consumo di ossigeno** (VO_2), riflesso dell'attivazione di meccanismi fisiologici compensatori energia dipendenti, come l'escrezione di ioni attraverso le ghiandole del sale.

Materiali e metodi

- ▶ **11 individui** di *Malaclemys terrapin* (6 femmine e 5 maschi) sono stati catturati nel torrente di mare adiacente al Grice Marine Laboratory di Charleston (Sud Carolina) il 26 e 27 Settembre 2013. La T dell'acqua (TW) nel sito di cattura era di 23°C e la salinità di 20 psu.
- ▶ le testuggini sono state trasferite all'Università della Nord Carolina Wilmington presso il Centre for Marine Science il 27 Set. 2013 e successivamente alloggiate in vasche a flusso (flow-through) all'aperto semi ombreggiate (107×107×56 cm, length×width×depth) con acqua di mare (35.6 ± 1.4 psu)
- ▶ Blocchi di cemento sono stati piazzati nelle vasche per fornire alle testuggini ripari e piattaforme per crogiolarsi
- ▶ Sono state nutrite con un regime al 7% della massa corporea un giorno sì e un giorno no con una dieta di loro prede naturali acclimatate alla salinità delle vasche

Trattamenti di T e salinità

- ▶ Indoor, in vasche t controllate con un sistema di ricircolo dell'acqua, due vasche ovali così da tenere separati maschi e femmine
- ▶ Lo **status metabolico e osmotico** sono stati valutati **per 4 trattamenti** temperatura-salinità:
 - Temperatura alta e bassa salinità (25°C – 12 psu)
 - Temperatura alta e alta salinità (25°C – 35 psu)
 - Temperatura bassa e bassa salinità (10°C – 12 psu)
 - Temperatura bassa e alta salinità (10°C – 35 psu)
- ▶ Il 17 Ottobre del 2013, 5 testuggini (3 femmine e due maschi) trasferite al sistema di vasche interno per l'acclimatazione al trattamento a 25°C – 12psu
- ▶ Le **variabili di risposta** indicative dello status osmotico, le dinamiche dei fluidi corporei e il consumo di ossigeno VO_2 sono stati determinati dopo **un'acclimatazione di 3 settimane a 25°C – 12 psu** e poi, dopo la salinità dell'acqua è stata aumentata a 35 psu. Le variabili di risposta sono state determinate di nuovo **dopo 3-5 giorni di esposizione a 25°C – 35 psu**



Status osmotico

- ▶ I **campioni di sangue** (1-2ml) stati raccolti dalla vena sottocarapaciale **dopo 3 settimane** di acclimatazione **al trattamento con bassa salinità** (25°C – 12 psu e 10°C – 12 psu) e dopo la successiva esposizione di **3 giorni al trattamento ad elevata salinità** (25°C – 35 psu e 10°C -35 psu).
- ▶ Un sub.campione (70 µl) di sangue è stato preso per **analisi immediate** di **Na⁺** (mmol l⁻¹), **Cl⁻** (mmol l⁻¹) e **glucosio** (mg dl⁻¹)
- ▶ Il resto del sangue è stato centrifugato a 2800 g per **separare il plasma** dalle cellule del sangue. Il plasma è stato trasferito in fiale di 0.5 ml per lo stoccaggio criogenico, avvolte in Parafilm® e stoccate in un freezer a -80°C per le successive analisi
- ▶ Un sub-campione di 10 µl di plasma è stato usato per **misurare l'osmolalità (mOsm)** con un osmometro a pressione di vapore ed un secondo sub-campione di 30 µl di plasma è stato usato per la determinazione dell'**urea** (mg dl⁻¹)

Dinamiche dei fluidi corporei

- ▶ I cambiamenti nelle dinamiche dei fluidi corporei in risposta ad un aumento nella salinità ambientale a differenti temperature di acclimatazione sono stati valutati usando **l'isotopo stabile deuterio (2H)**.
- ▶ Le percentuali di TBW (**% TBW**), **WTR** (ml day⁻¹) e **DWF** (% TBW day⁻¹) sono state **determinate dopo 3 settimane** di trattamenti di **acclimatazione alla bassa salinità** (25°C – 12 psu e 10°C -12 psu) e **dopo** una successiva esposizione acuta di **3 giorni** al trattamento ad **elevata salinità** (25°C- 35 psu e 10°C-35 psu)

- ▶ Un sub campione di plasma era stato riservato alla **determinazione dei valori di background di arricchimento di ^2H ($E_{\text{background}}$)** nell'acqua corporea delle testuggini
- ▶ Hanno iniettato una dose di ^2H nella cavità celomatica, il dosaggio di ^2H è stato calcolato usando un'equazione pubblicata da Speakman, 1997, eqn 12.1) e i dati sulla % TBW, con lo scopo **di raggiungere un arricchimento iniziale desiderato (DIE) ≥ 600 ppm sopra all' $E_{\text{background}}$.**
- ▶ Un **secondo** campione di sangue è stato raccolto di modo da determinare la **concentrazione di ^2H** nei fluidi corporei **dopo il periodo di raggiungimento dell'equilibrio (E_{equil})**
- ▶ Un **terzo** campione di sangue (**E_{final}**) è stato raccolto e processato dopo circa due giorni per le testuggini acclimatate a 25°C e dopo 3 giorni per le testuggini acclimatate a 10°C
- ▶ I campioni di plasma sono stati stoccati a -80°C per un max di 4 mesi prima dell'analisi isotopica

- ▶ E' stato usato uno spettrometro (**isotop ratio mass spectrometer**) per **determinare i livelli di 2H nei campioni di plasma**
- ▶ I valori sono stati poi convertiti in ppm usando la seguente equazione:

$$\text{ppm } ^2\text{H} = \frac{1,000,000}{1 + (1/\{[(\delta^2\text{H}/1000) + 1] \times 0.00015576\})}, \quad (1)$$

where $\delta^2\text{H}$ is per million ^2H with respect to the Vienna Standard Mean Ocean Water (VSMOW), and the constant 0.00015576 is the $^2\text{H}/^1\text{H}$ ratio of VSMOW.

The two-sample technique (Speakman, 1997) was used to estimate the turnover rate of ^2H (k_d) during the time between E_{equil} and E_{final} sample collection, and the plateau method was used to estimate isotope dilution space (N_d) for calculations of %TBW and WTR. Daily water flux was estimated by multiplying %TBW by k_d .

Consumo di ossigeno

- ▶ E' stato usato un respirometro a circuito chiuso per misurare il VO₂. I trial di respirometria sono stati coordinati con il programma di alimentazione, così da tenere le testuggini a **digiuno per 40-48 h prima dei trial**
- ▶ Per ogni trial, **un individuo** è stato piazzato in una **vasca circolare** da 90 L riempita con acqua alla t e salinità sperimentale
- ▶ Una **cupola in acrilico parzialmente sommersa con portali di input e output per l'aria** è stata posizionata sul top della vasca
- ▶ Un iniziale campione di aria è stato estratto dalla cupola dopo il termine del periodo di acclimatazione
- ▶ **Campioni di aria (40-50 ml)** venivano raccolti dalla cupola attraverso il Drierite (solfato di calcio, agente essiccante) e cartucce soda lime collegate col portale di uscita usando una siringa attaccata ad un rubinetto a 3 vie
- ▶ I campioni venivano successivamente ad un **borsa respiratoria sotto vuoto di 500ml** e sigillata per il trasferimento all'**analizzatore di ossigeno**

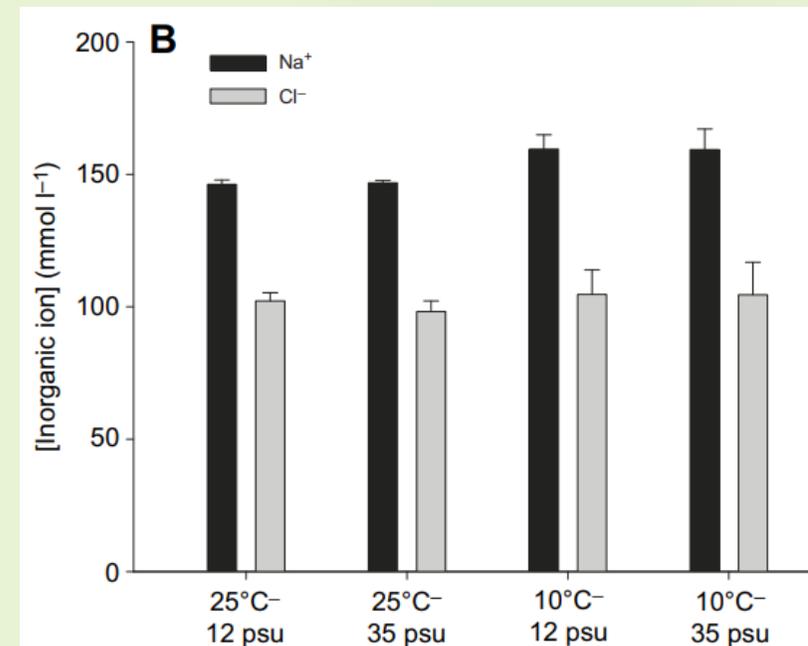
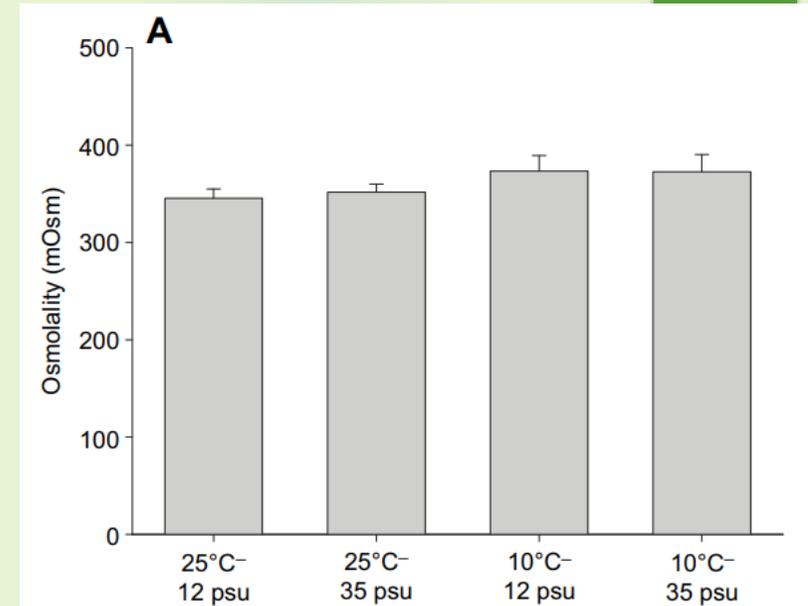
Analisi statistica

- ▶ Sono stati usati **modelli misti lineari** per valutare gli effetti delle temperature sperimentali, della salinità, della massa degli individui sulle variabili di risposta.
- ▶ si sono fatti **9 modelli separati per ognuna delle risposte** (Na⁺, Cl⁻, glucosio, urea, osmolalità, VO₂, % TBW, WTR, DWF). Tutti e nove i modelli avevano gli stessi 3 predittori tranne quello del VO₂ che aveva un ulteriore predittore dato dal tempo passato in immersione durante il trial di respirometria) come proxy del livello di attività.

Risultati

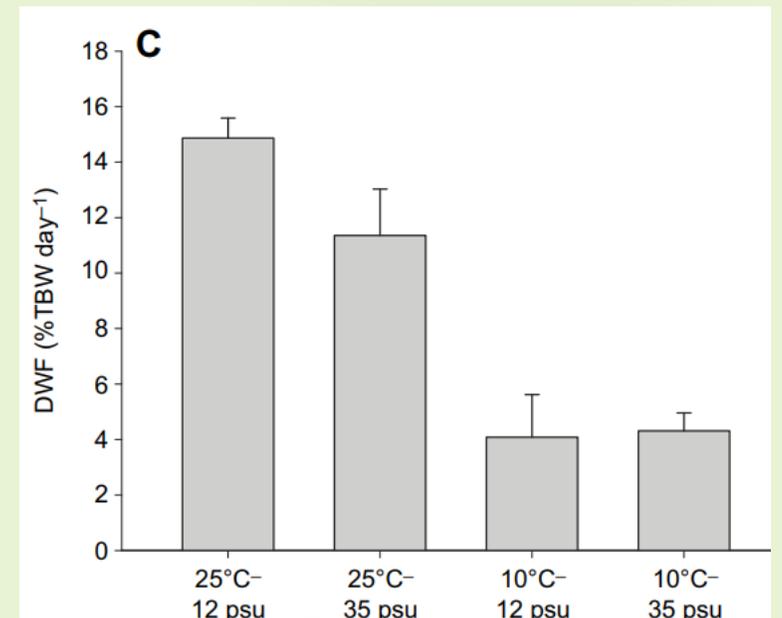
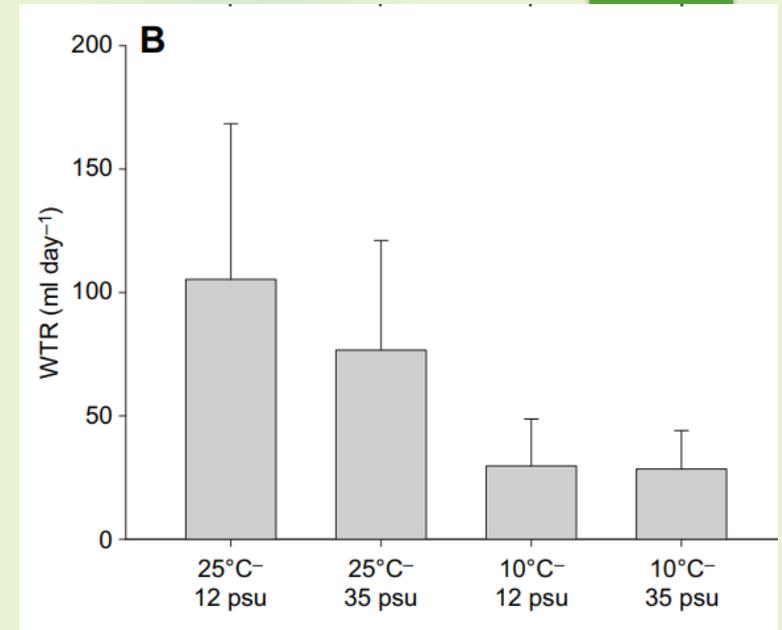
Status Osmotico

- ▶ **l'Osmolalità del plasma** era significativamente **minore a 25°C** rispetto che a 10°C, ma **non** c'erano **effetti** significativi della **salinità** o della **massa** in questa variabile di risposta
- ▶ La **quantità di Na⁺ nel plasma** era anch'essa significativamente **minore a 25°C** rispetto che a 10°C ma non c'era un effetto significativo della temperatura sul Cl⁻
- ▶ I due osmoliti organici che sono stati inclusi in questo studio, **glucosio** ed **urea**, **non** erano significativamente **influenzati** dalla **t**, dalla **salinità** o dalla **massa**



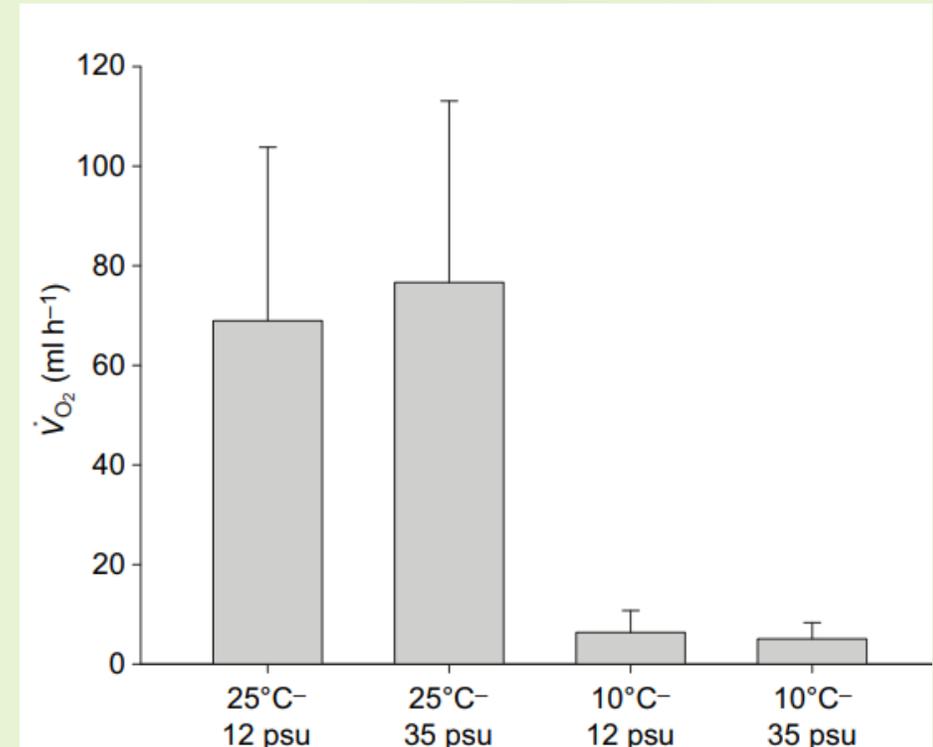
Dinamiche dei fluidi corporei

- ▶ non c'è stato **nessun effetto significativo della t, salinità o massa sulla % TBW**. La T ha avuto un **effetto significativo sia sul WTR che sul DWF**; queste variabili erano correlate positivamente con la T
- ▶ l' **aumento nella salinità** ha provocato una **diminuzione** nel **DWF**
- ▶ C'era una significativa **correlazione positiva** tra la massa e il **WTR**



Consumo di ossigeno

- ▶ la risposta del $\dot{V}O_2$ all'aumento della salinità non era statisticamente significativa ma la **T** aveva un **effetto significativo e forte sul $\dot{V}O_2$** . Per le testuggini esposte a **bassa salinità** (12 psu) il consumo medio di ossigeno $\dot{V}O_2$ a **25°C era 10.9 volte maggiore** del consumo medio $\dot{V}O_2$ a 10°C. Durante l'esposizione **all'elevata salinità**, il consumo medio $\dot{V}O_2$ a 25°C era **15.3 volte maggiore** del $\dot{V}O_2$ a 10°C
- ▶ La massa aveva un effetto significativo sul $\dot{V}O_2$; le testuggini più grandi avevano maggiori $\dot{V}O_2$



Per riassumere

Nel complesso, gli **effetti della temperatura erano più forti** di quelli della salinità. Le tartarughe acclimatate a 25°C hanno avuto:

- ▶ - un'osmolalità del sangue significativamente minore, così come minor Na⁺ e
- ▶ -maggiori tassi di turnover dell'acqua
- ▶ -maggiori flussi giornalieri di acqua (daily water flux DWF)
- ▶ - maggiore consumo di ossigeno VO₂

Rispetto alle tartarughe acclimatate a 10°C

- ▶ **L'effetto della salinità è stato limitato al DWF**, che è significativamente **diminuito** in risposta ad un'esposizione acuta **a 35 psu**. Questi risultati supportano la teoria che gli aggiustamenti comportamentali predominano nelle strategie di osmoregolazione di queste tartarughe

Discussione

- ▶ I risultati di questo studio indicano che le testuggini **non fanno un forte affidamento su aggiustamenti osmoregolatori** che richiedono energia quando devono affrontare un **acuto aumento della salinità** ambientale in un ampio range di temperature stagionalmente rilevanti.
- ▶ Semmai, una **riduzione nei tassi attivi di scambio di acqua e sali con l'ambiente**, come indicato da una **diminuzione nel DWF** con l'esposizione all'elevata salinità, è sufficiente per difendere l'omeostasi osmotico nel breve termine.

Status osmotico

- ▶ Lo **status osmotico** delle testuggini **non è stato alterato** da un aumento acuto della salinità ad entrambe le t sperimentali

Favorito da:

Impermeabilità del **tegumento**, grandi **riserve di acqua** nei fluidi interstiziali, **urina ipoosmotica** nella vescica

.....ma una **un'esposizione prolungata** (di mesi) porta ad un graduale **aumento nell'osmolalità del plasma** e nella concertazione di **Na⁺** e ad una perdita di peso indicativa della **disidratazione**

- ▶ le testuggini acclimatate a **10°C** avevano un'**osmolalità del sangue** significativamente **maggiore** così come una maggiore concentrazione di **Na⁺** rispetto alle testuggini acclimatate a 25°C.
- ▶ Harden et. al (2015) ha trovato che le **tartarughe svernanti** nelle paludi del Nord Carolina mostravano un **aumento nell'osmolalità del sangue e nel Na⁺ con il diminuire della t del carapace**. Questo potrebbe riflettere la progressiva **perdita di acqua** o il progressivo **guadagno di ioni** attraverso scambi passivi con l'ambiente. Anche una **diminuzione dei meccanismi di trasporto attivo** di ioni in risposta ad una **diminuita capacità metabolica** indotta dal freddo potrebbe giocare un ruolo.

Dinamiche dei fluidi corporei

- ▶ In questo studio si è osservato una **significativa diminuzione nel DWF** e un trend verso il decremento del WTR nelle testuggini esposte ad elevata salinità, indicativi della **diminuzione nell'ingestione di cibo e acqua**.
- ▶ Infatti le testuggini acclimatate a 25°C hanno mangiato l'intera razione per tutta l'esposizione a 12psu, ma **hanno lasciato cibo** nelle vasche quando esposte **a 35 psu**
- ▶ E' stato trovato che sia il **WTR** che il **DWF** erano **diminuiti con la t**, il che riflette probabilmente un **diminuzione** sia **negli scambi passivi di acqua** attraverso il tegumento che nell'**ingestione di cibo e acqua**. La diminuzione nel turnover dell'acqua a basse t potrebbe anche riflettere **minori tassi metabolici e respiratori**.

Consumo di ossigeno

- ▶ non hanno trovato effetti significativi della salinità nel consumo di ossigeno
- ▶ Possibilità di **riallocare l'energia** oppure **improbabile** che esse facciamo molto **affidamento su meccanismi energia dipendenti** per secernere i Sali accumulati **come risposta iniziale** alla sfida di salinità.
- ▶ Durante l'esposizione acuta ad **elevata salinità** le testuggini acclimatate a **25°C** hanno **aumentato** il consumo di ossigeno **VO2** in media del **12.8 +- 8.2%** e le testuggini acclimatate a **10°C** hanno **diminuito** il consumo di ossigeno in media del **10.9+-28.1%**. -> differenze indotte dalla t nella capacità metabolica influenzano le strategie usate nell'osmoregolazione oppure riflette differenze nel comportamento alimentare

Conclusioni

- ▶ Una comprensione dell'equilibrio degli aggiustamenti comportamentali e fisiologici nelle strategie di osmoregolazione delle testuggini fornisce informazioni sulla **transizione evuzionistica da ambienti di acqua dolce ad ambienti marini**
- ▶ Le evidenze di questo studio e di altri mostrano che le testuggini rappresentano una forma intermedia in questa progressione. Esse mantengono efficacemente un equilibrio osmotico in condizioni di salinità variabile usando **aggiustamenti comportamentali energeticamente efficienti** e strategie di **conservazione dell'acqua**
- ▶ Questo aspetto della biologia delle testuggini le rende particolarmente **vulnerabili ai cambiamenti degli ambienti costieri** a causa del climate change e dell'innalzamento del livello dei mari.

**GRAZIE PER
L'ATTENZIONE!**

