

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Katedra biologických disciplín

Respirace pavouků během sytosti a hladovění

Bakalářská práce

Roman Kraus

Vedoucí práce

Mgr. Michal Berec Ph.D.

Odborný školitel

Doc. RNDr. Oldřich Nedvěd

České Budějovice 2012

Anotace

Před samotným zpracováním své bakalářské práce jsem si zakoupil sklípkaný známého druhu *Lasiadora parahybana*, které jsem vychoval do stádia vhodného pro uskutečnění cíle práce. Cílem práce bylo změřit a graficky vyjádřit průběh spotřeby kyslíku (O₂) a zaznamenat hodnoty metabolismu nasycených sklípkanů během hladovění. Toto měření jsem prováděl na Warburgově respirometru. U sklípkanů po určité době došlo k regulaci metabolismu až k hodnotám životaschopnosti. Na výsledných hodnotách je tedy vidět pokles metabolismu a váhový úbytek.

Klíčová slova: *Lasiadora parahybana*, metabolismus, hladovění, Warburgův respirometr, respirace

Anotation

I bought spiders known species *Lasiadora parahybana* before the processing of my thesis. I have brought to the stage suitable for achieving the objective of work. The goal of the work was to measure and graphically express the consumption of oxygen (O₂) and record the saturated values of metabolism during starvation spiders. I made this measurement on Warburg respirometer. The spiders after some time has been to regulate metabolism, to the values of viability. The resulting values are therefore visible decrease in metabolism and weight loss.

Key words: *Lasiadora parahybana*, metabolism, starvation, Warburg respirometer, respiration

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG, provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne.....

Podpis:.....

Poděkování:

Touto cestou bych chtěl poděkovat svému školiteli, Mgr. Michalu Berecovi, Ph.D., za odborné vedení, konzultace a cenné rady při zpracování mé bakalářské práce. Dále děkuji Doc. RNDr. Oldřichu Nedvědovi za pomoc při řešení komplikací, poskytnuté prostory a přístroje potřebné k realizaci pokusů. Také děkuji Mgr. Janu Okrouhlíkovi za jeho trpělivost při zpracování výsledků.

Obsah:

1	Úvod.....	5
2	Literární přehled.....	7
2.1	Systém sklípkanů	7
2.2	Lasiadora parahybana.....	8
2.3	Teraristický chov sklípkana	9
2.4	Anatomie těla pavouků	10
2.4.1	Stavba těla	11
2.4.2	Dýchací soustava pavouků a sklípkanů	11
2.4.3	Respirace	12
2.4.4	Cévní soustava a hemolymfa.....	13
2.5	Trávicí soustava.....	14
2.6	Metabolismus	15
2.7	Manometrické měření spotřeby kyslíku.....	16
3	Metodika	18
3.1	Obstarání a výchova juvenilních pavouků	18
3.2	Sestavení Warburgova respirometru	20
3.3	Ověření metodiky měření energetického metabolismu sklípkanů	21
3.4	Měření energetického metabolismu sklípkanů Lasiadora parahybana	24

1 Úvod

Pavouci vždy upoutávali lidskou pozornost, ať už tím, že vzbuzovali obdiv složitostí a dokonalostí sítí, které vytvořili, nebo strachem z jejich jedu. Pro pozorování a chov jsou pavouci (*Araneida*) velmi vděčným objektem a v zajetí jsou schopni přežívat po velice dlouhou dobu. Zároveň jsou také jednou z nejstarších skupin členovců, které se na světě vyskytují. V této době žije na Zemi 40 000 druhů pavouků, z nichž 880 je sklípkanovitých. Sklípkanovití jsou v ČR jedinou z 11 čeledí starobylého podřádu sklípkanů (*Orthognatha*) (Buchar, Kůrka 2001).

Pro sklípkaný je neaktivnější částí dne soumrak a průběh noci, při kterém se snaží ulovit svou kořist. Ve volné přírodě ale zároveň riskují, že se sami mohou stát potravou pro ostatní živočichy. I přes to, že jsou velice dobře smyslově i konstrukčně vybaveni a jsou velice draví, mohou mít při shánění potravy a lovu samotném nejrůznější problémy, a to i ve svém přirozeném prostředí.

Na burzách, v obchodech nebo na obrázcích v knihách či internetu můžeme vidět neobyčejně robustní sklípkaný s velkými, až nafouklými chlupatými zadečky. Tato skutečnost je dána tím, že jsou překrmováni. Následkem je jejich horší pohyblivost a jsou tak zranitelnější. V jejich původním biotopu bychom takového sklípkanu jen stěží našli. V přírodě musí být sklípkaný velmi obratný a hbitý, což by jim velký zadeček neumožnil. Jejich zadečky jsou ve většině případů stejně velké jako hlavohruď, avšak vlivem hladovění jsou často menší až scvrklé.

Sklípkaný ovládají schopnost dlouhodobě hladovět a umějí hospodařit s vodou. Tato schopnost může být součástí fyziologických adaptací organismu pavouků na nepříznivé podmínky (Schauer, 2008). V krajních případech nízké energetické dostupnosti dokáží sklípkaný regulovat metabolismus až do takové míry, že dochází k minimální spotřebě energie, tj. bazální metabolismus. V tomto „úsporném stavu“ vydrží velmi dlouhou dobu. Po určité době strádání sklípkaný zpomalují své dýchání na hranici minima, v níž setrvávají. Tato endogenní změna se děje proto, aby nedocházelo k úbytku tělesné hmotnosti za stálého iontového složení. Metabolismus je řízen takovým způsobem, aby strádání neovlivňovalo funkci vnitřních orgánů, to znamená, že v těle sklípkanu probíhají pouze energetické toky

potřebné k udržení základních životních funkcí. Po nasycení sklípkanů se respirace v krátkém časovém úseku opět vrátí k normálním hodnotám.

Nepravidelný stravovací cyklus evokuje sklípkanů k tomu, aby stále lovili potravu a ukládali ji v pružném zadečku. Ten může mít kapacitu až dvojnásobku původní tělesné hmotnosti. Je to rezervoár energie, se kterou dle potřeby dobře nakládají. Jelikož jsou sklípkanů za světla neaktivní, uspoří tak mnoho energie k lovení kořisti za soumraku.

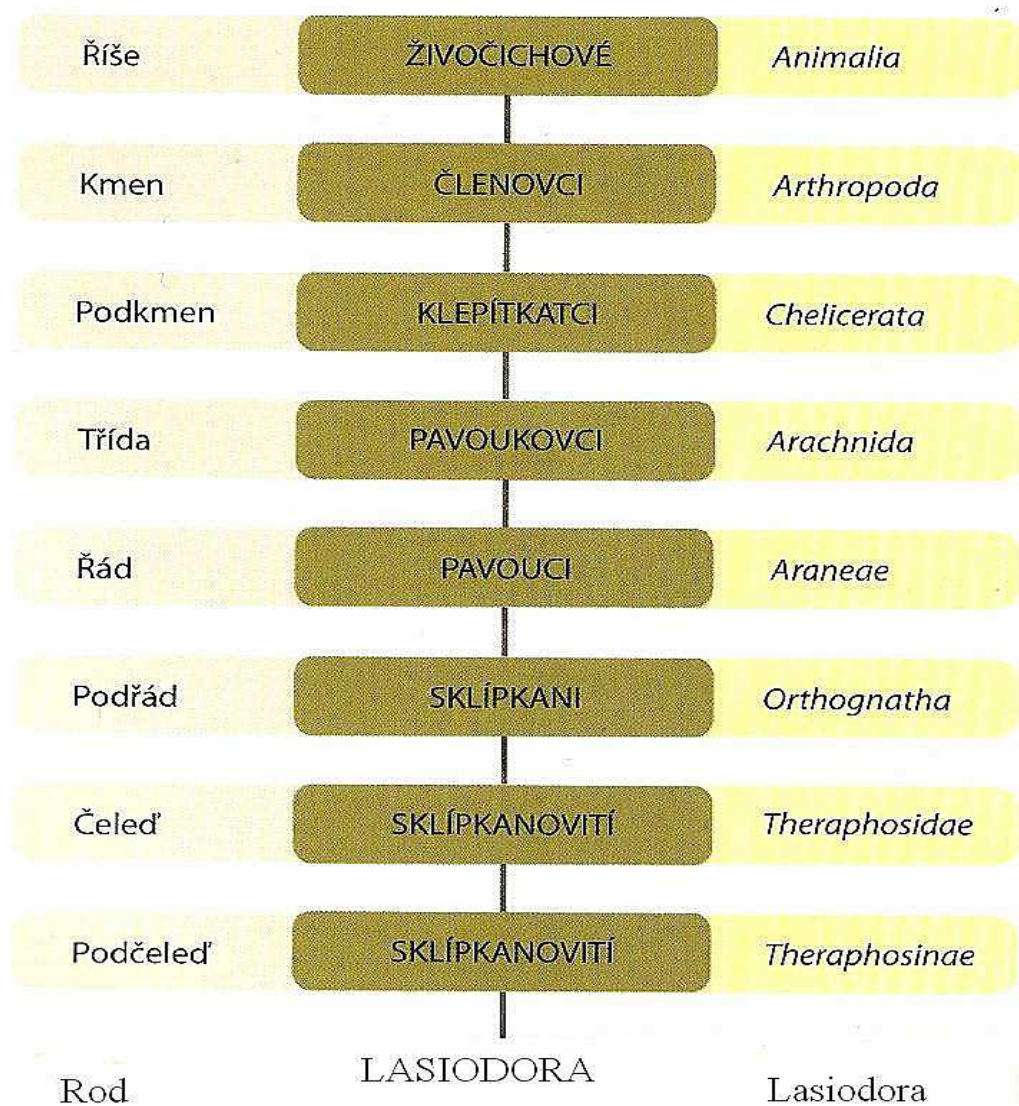
Tato bakalářská práce je zaměřena na měření hodnot respirace u juvenilních sklípkanů *Lasiadora parahybana*. Hodnoty jsem měřil ihned po jejich nasycení a v průběhu 37 dní následujícího hladovění. V tomto období jsem hledal fázi, kdy sklípkanů začnou snižovat své metabolické procesy v těle až na bazální hodnotu. Zároveň jsem také měřil váhový úbytek během celého období.

2 Literární přehled

2.1 Systém sklípkanů

V této tabulce je jednoduše naznačeno, do které podčeledě, čeledě atd. spadají pokusní pavouci *Lasiadora parahybana*.

Obr. 1: Tabulka zařazení pavouka do systému



Orthognata neboli Mygalomorphae je podřád sklípkanů, který se skládá z 15 čeledí (Bruins, 2001). Nadčeleď Theraphosoidea, čeleď Theraphosidae, kterou taxonomicky vyčlenil

Thorell v roce 1870, má kosmopolitní areál rozšíření. Nejvíce druhů z této čeledi se vyskytuje na jihoamerickém kontinentě, a proto se také označují jako američtí sklípkaní (Wirth, 1998).

Rod *Lasiadora* popsal poprvé C. L. Koch v roce 1850. Jsou to sklípkaní Střední a Jižní Ameriky s 38 zaznamenanými druhy, z nichž většinu tvoří endemité Brazílie (Kovařík, 2006).

2.2 *Lasiadora parahybana*

Sklípkana parahybského - *Lasiadora parahybana* - poprvé popsal a objevil Mello-Leitao v roce 1917. Název pro tohoto sklípkana byl odvozen od typového místa lokality Campina Grande (Parahyba do Norte), která se nachází ve východní Brazílii (Kovařík, 2001). Tito sklípkaní patří mezi největší na světě. V délce těla měří i přes 9 cm a s končetinami mohou dosáhnout velikosti až přes 20 cm. Samice mají robustnější tělo, zatímco samci jsou drobnější a mají delší končetiny, což je důležité především při reprodukci.

Na prvním páru končetin mají samci tibiální háky, kterými zachycují chelicery samičky a nadzvedávají ji, aby došlo k zasunutí bulbu do spermatéky. Bulbus je samčí pohlavní orgán, který je umístěný na makadlech. Samec se tibiálními háky také chrání před případným kousnutím od samičky. Po rozmnožovacím aktu se samec dá okamžitě na úprk, aby se sám nestal kořistí oplodněné samičky (Bruins, 2001).

Sklípkan *Lasiadora parahybana* není barevně nikterak nápaditý. Je celý černohnědý, až na končetiny a zadeček (*Abdomen*), kde má dlouhé, světlé žluto-růžové rovné chlupy. Barevná odlišnost mezi samcem a samičkou není výrazná, jsou si podobní. Tento sklípkan ovšem vyniká svou velikostí a rovněž zavalitostí. Velice podobnější jsou, mimo rod *Lasiadora*, druhy sklípkanů *Brachypelma albopilosa* a *Grammostola rosea* (Kovařík, 2001).

Lasiadora parahybana je druhem pozemního pavouka, který obývá suchý brazilský les a křovinaté stepní lokality. Žije skrytě, i když si nory nedělá. Často si však buduje při zemi hnízda, která připomínají koule z listů. Dále se také mohou ukrývat pod kusy kůry, v kořenech stromů, popřípadě vhodný úkryt naleznou v dutinách kmenů. Jejich hnízda, či úkryty nejsou stálé, častokrát se stěhují do jiných lokalit. Tito sklípkaní jsou schopni ulovit

hlodavce, malého ptáčka nebo ještěrku, ale hlavní potravou jsou především bezobratlí (Wirth, 1998).

2.3 Teraristický chov sklípkana

Lasiadora parahybana je pro svoji velikost, nenáročnost na chov, cenu, menší agresivitu a nevýznamnou toxicitu mezi sklípkany hojně chován v tropických suchých teráriích. Někdy se doporučuje i začínajícím chovatelům sklípkanů (Kovařík, 2006).

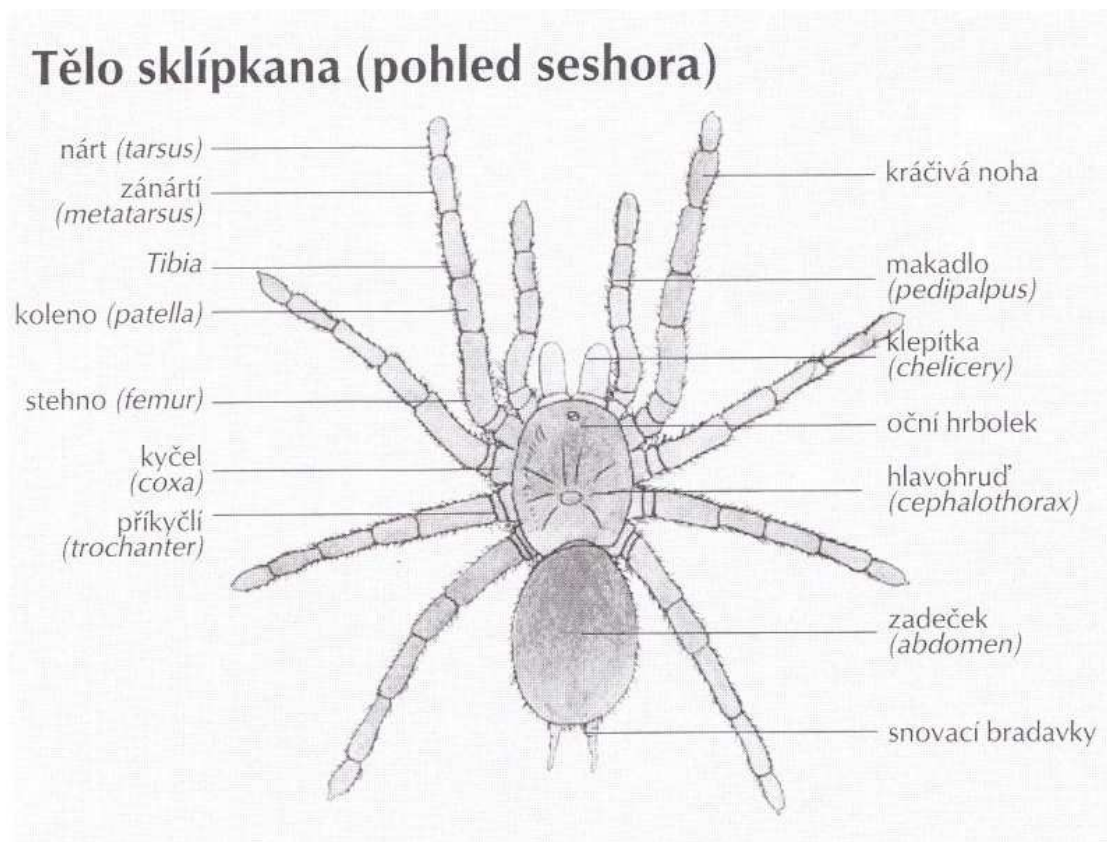
Sklípkana chováme v teráriu typu „B“ pro pozemní druh sklípkanů. Dostačující velikost terária je 40 x 30 x 40 cm. Pro sklípkany vybíráme větší terárium, protože přihlížíme k velikosti tohoto sklípkana. Pozemní druh sklípkana má tělo robustnější, přizpůsobené k pohybu na zemi, proto jej určitě neumístujeme do vysokých terárií. Při šplhání po stěnách by hrozil pád s následky vnitřního poranění zadečku a pozdější smrt. Jako nejvhodnější podklad dáváme maximálně 5cm vrstvu kokosové drti (lignocel), hrabanku. Písek není příliš vhodný, ale v kombinaci s kokosovou vrstvou nebo hrabankou je také možným substrátem. Substrát se musí přiměřeně rosit, a to tak, aby pavouk měl vždy na výběr mezi suchou a vlhkou polovinou terária (Kovařík, 2006). Vlhkost terária by neměla být příliš vysoká. Nejvhodnější je okolo 65 – 75 %, a proto je žádoucí mít zajištěné dobré odvětrávání, a to nejlépe na dvou místech, aby byla zajištěna dobrá cirkulace vzduchu a zabránilo se tak tvorbám nežádoucích plísní.

Teplotu udržujeme na 26 °C a dáváme pozor, aby nepřesáhla teplotní extrémy 20 °C a 32 °C, které by pavouka stresovaly (Kovařík, 2006). Teplo je nejlépe dodáváno žárovkou o malém příkonu 15 W, s červeným zabarvením, které nedráždí pavouky (Klátil, 2008). Důležitou součástí terária je mělká napáječka s vodou, protože tento pavouk často pije. Zároveň je třeba myslet na možnost úkrytu pavouka, i když většinu času tráví pavouk mimo svou skrýš. Rostliny se nedoporučují, neboť vhodných rostlin do pavoučích terárií je málo. Pavouk dříve či později stejně rostlinu zničí, a také je náročnější kombinovat chov pavouka s tropickou rostlinou. Pokud tedy na rostlině trváme, dáme přednost rostlinám bez trnů a bez toxinů. Jako dekoraci můžeme použít větévku, skalku nebo lze zadní stěnu polepit borovou

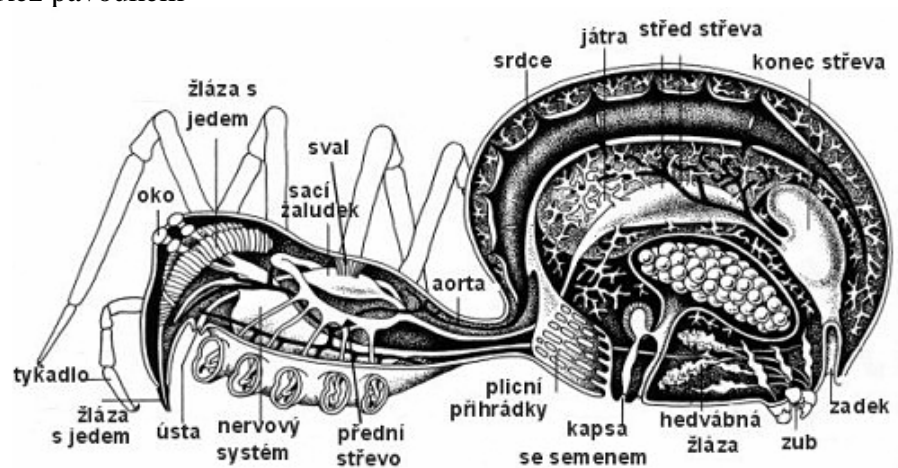
kůrou. Každý takový předmět zvyšuje estetiku terária a welfare chovaného jedince, ale také podporuje větší riziko výskytu plísní a nežádoucích mikroorganismů (Wirth, 1998).

2.4 Anatomie těla pavouků

Obr. 2: Tělo pavouka, pohled shora



Obr. 3: Řez pavoukem



2.4.1 Stavba těla

Tělo pavouka se skládá ze dvou tagmat, a to z opistosoma (zadeček, abdomen) a prosoma (hlavohruď, cephalothorax). Opistosoma je zaměřeno na trávicí procesy pavouka, dýchání, reprodukci, produkci pavučiny atd. Z vnější části opistosoma se nachází snovací bradavky, vyústění rozmnožovací soustavy, trávicí soustavy...(viz obrázek 2., 3.).

Prosoma slouží k příjmu potravy, pohybu a integraci nervové soustavy. Nese dva páry přeměněných končetin - *chelicer*y a *pedipalpy* a 4 páry kráčivých končetin s háčky. Celé prosoma je kryto pevnou kutikulou z chitinu. V popředí prosomatu jsou umístěny 4 páry jednoduchých očí.

Chelicer y slouží pavoukům nejen k obraně nebo pokoření kořisti, ale i k uchopení předmětů. Skládají se ze dvou článků, z nichž jeden je mohutnější a druhý tenčí a má podobu drápku. Na konci tohoto drápku je otvůrek, kterým vyústuje jedová žláza.

Pedipalpy pavouků jsou makadlovité a připomínají kráčivou končetinu, oproti chelicerám. Pedipalpy nejsou k lokomoci vůbec používány. Jejich úlohou je manipulace s kořistí a také dokonalý hmat. U samců jsou pedipalpy zakončeny druhotným pohlavním orgánem zvaný bulbus, který slouží k přenosu spermatu.

2.4.2 Dýchací soustava pavouků a sklípkanů

Dýchací soustavu pavouků původně tvořily páry plicních vaků. Jeden pár byl později nahrazen pseudotrachejemi (Buchar, 1995). U některých drobných pavouků plicní vaky zcela chybějí, o příjem vzduchu se tak starají pouze tracheje. Stavba plicních vaků je u jednotlivých skupin pavouků více či méně uniformní, ale struktura a rozsah trachejí se u jednotlivých čeledí výrazně liší. Plicní vaky jsou uloženy na ventrální straně opistosomatu a navenek se otevírají za podpory úzké štěrbin. Vchod do plicních vaků může být dle potřeby rozšířen za pomoci specifických svalů. Vnitřní prostor vaků vyplňuje úzká předsíňka, která navazuje na bohatě řasené dýchací lišty. Ty mají spoustu podpůrných sloupků a bočních výrůstků.

Pseudotracheje, které mají své místo těsně před snovacími bradavkami, vypadají jako tenké větevnaté trubičky (Buchar, Kůrka, 2001).

2.4.3 Respirace

Sklopčani mají pouze dva páry plicních vaků a žádné tracheje (Bruins, 2001). Plicní vaky mají ektodermální původ. Vstup do plicních vaků, zvaný také stigma, je chráněn hustou spleť chloupků, aby se zabránilo vniknutí nečistot mezi plicní lišty, které jsou přímo omývány hemolymfou (Klátil, 2008). Mezi desítkami horizontálních plicních lupínků je systém vertikálních sloupků, který zabraňuje slepení lupínků. Těmito průchody je okysličená hemolymfa. Plicní vaky pracují pasivně, protože nemají žádný mechanismus, který by poháněl vzduch dovnitř a ven (Preston - Mafham, 1998). Potřebný vzduch volně proniká do plicních lupínků, kde se odehrává výměna plynů na principu difuze. Přivedený kyslík, který se dále rozpouští v hemolymfě, nahrazuje oxid uhličitý, který je vydechován stigmatem (Knoz, 1973). Od plicních vaků je okysličená hemolymfa přiváděna sací činností srdeční trubice bezprostředně do perikardu (osrdečníku), který svou přední částí souvisí s plicními vaky.

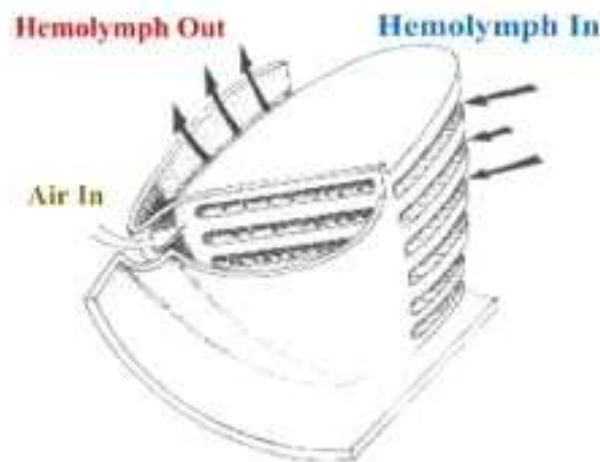
Funkční vlastnosti dýchacích systémů na výměnu plynů byly u pavouků hodnoceny na základě vztahů popisujících dýchací povrchové plochy, plicní objemy, míry spotřeby kyslíku a srdeční frekvence na funkce změny velikosti těla. Většina pavouků má sazby nižší než metabolismus jiných poikilotermů. Pavouci s nejnižšími sazbami jsou přizpůsobeni k životu v prostředí charakterizovaném nízkou energetickou dostupností (Anderson a Prestwich, 1982).

2.4.4 Cévní soustava a hemolymfa

Cévní soustava u pavouků je otevřená. To znamená, že tekutina plnicí funkce krve koluje v cévách jen zčásti. Většinou se přelévá v prostorách mezi orgány a tkáněmi, proto ji nenazýváme krev, ale krvomíza (hemolymfa). K tomu, aby vůbec došlo k pohybu krvomízy i mimo cévy, je u pavouků vyvinuto nápadně mohutné srdce na hřbetní straně zadečku (Buchar, Kůrka, 1998).

Krvomíza, která již protékla kolem orgánů zadečku, vtéká do srdce mnoha otvory rozmístěnými po celé jeho délce. Srdce se pak smrští a pohání okysličenou krvomízu (hemolymfu) hlavní cévou do hlavohrudi, kde se rozdělí do hlavy a končetin. Krvomíza se pak vylévá do dutiny hlavohrudi, teče stopkou zpět do dutiny zadečku a celý cyklus se opakuje (Preston-Mafham, 1998).

Obr. 4: Řez plicním vakem (Foelix, 1996



Hemolymfa obsahuje různé anorganické i organické látky (bílkoviny, hormony, atd.). Oproti krvi není sice tak efektivní v přenosu plynů, ale pro fyziologické funkce pavouků je dostačující (Breene, 1996). Velmi důležitým úkolem hemolymfy je přenos kyslíku, proto je v ní respirační pigment, který se nazývá hemocyanin. Hemocyanin je protein, v jehož středu jsou dva atomy mědi, které na sebe váží kyslík. U pavouků se hemocyanin tvoří ve speciálních buňkách, které se nazývají cyanocyty (Foelix, 1996).

Funkce hemolymfy:

- Transportní medium
- Zásobní rezervoár
- Imunitní reakce
- Zástava krvácení
- Mechanická funkce
- Termoregulace

(<http://chibikun.blog.cz/1004/cevni-soustava>) (Anonymus, 2010)

2.5 Trávicí soustava

U pavouků se vyvinul zvláštní způsob přijímání potravy, a to mimotělní. Tento druh trávení umožňuje pavoukům přijímat jenom stravitelné látky. Tím šetří svou energii, kterou by musel vynaložit na odstranění některých nestravitelných částí kořisti.

Před ústním otvorem je filtr z chloupků umožňující pouze nasávání ztekucených tkání mimotělně natrávené kořisti (Sedlák, 2000). Hltanem je tekutina dopravována přes jícen do savého žaludku pomocí podtlaku vznikajícího jak působením hltanu samotného, tak právě savého žaludku (<http://www.evarcha.wz.cz/cross/pavouci/pavouci.htm>) (Anonymus, 2011).

Savým žaludkem končí první ze tří oddílů trávicí trubice. Hned za savým žaludkem se trávicí trubice začíná větvit. V hlavohrudi mohou slepé výběžky těchto větví sahát až do kyčlí nohou. Ještě bohatší rozvětvení středního oddílu trávicí trubice nastává v zadečku, kde spleť jemných větévek vyplňuje podstatnou část jeho vnitřního prostoru (Buchar, Kůrka 2001). Střední střevo a slepé výběžky středního střeva vstřebávají tekutou tráveninu do hemolymfy.

Třetí oddíl trávicí trubice začíná rozsáhlou dutinou, ve které se formují výkaly. Jde o tzv. kloaku, do níž ústí pár rozvětvených malpigických trubic (Buchar, Kůrka, 2001).

Díky rozsáhlému systému slepých výběžků středního střeva vydrží pavouci dlouhodobě hladovět. A ukládáním guaninu, místo jeho vylučování, předchází i vysokým ztrátám vody, což je nutné zvláště v období hladovění, kdy nedochází ani k příjmu tekutin.

2.6 Metabolismus

Sklípkani se nepravidelně stravují. V aktivní fázi dne, tj. za soumraku, jsou dle potřeby aktivními lovci. Každým pohybem mimo skrýš riskují, že oni sami se stanou někomu potravou, proto potravu ukládají v pružném zadečku.

Ovládají schopnost dlouhodobě hladovět a hospodařit s vodou. Tato schopnost může být součástí fyziologických adaptací organismu pavouků na nepříznivé podmínky (Schauer, 2008), proto je v chovech krmíme nepravidelně menším množstvím potravy, a pokud spořádá pavouk kořist v podobě myšního holátka, doporučuje se až dvouměsíční půst. Když zůstane dospělá samice půl roku bez potravy, její život není stále nijak ohrožen (Kovařík, 2001).

Pružný zadeček je rezervoár energie, se kterou pavouci dle potřeby účelově nakládají. Potrava ve stavu tráveniny je uložena v rozsáhlém systému slepých výběžků středního střeva. Sklípkani jsou schopni po určité době strádání zpomalovat soubor všech endogenních reakcí za stálé iontové homeostázy. Regulují tak svůj metabolismus na spodní hranici své životaschopnosti, kdy dochází k minimální spotřebě energie. Děje se tak zpomalením energetických toků pouze na udržení základních životních funkcí = bazální metabolismus. V tomto úsporném režimu dokážou bez příjmu potravy přečkat období trvající i několik měsíců (Bruins, 2001). Při zpomalení metabolismu klesá spotřeba O_2 na nízkou hranici.

Většina pavouků má nižší sazby metabolismu než u jiných poikilothermů. Pavouci s nejnižšími sazbami jsou přizpůsobeni k životu v prostředí charakterizovaném nízkou energetickou dostupností. Ve stavu klidového metabolismu jsou schopni setrvávat až do nasycení. Za nepříznivých podmínek je metabolismus řízen tak, aby strádání neovlivňovalo funkci vnitřních orgánů a nedocházelo ke ztrátám tělesné hmotnosti

Energetický metabolismus

Úloha ATP v přenosu energie

Výroba ATP,

Anaerobní

Aerobní

Cytosol

Mitochondrie

2 mol (ATP/glc)

(cca 32 mol ATP/mol glukózy)

Měření spotřeby O₂ vypovídá o produkci/spotřebě ATP

2.7 Manometrické měření spotřeby kyslíku

Manometrické metody měří změny tlaku nebo objemu plynu napojeného na komoru, v níž je uzavřen respirující objekt. Pro dlouhodobé měření spotřeby kyslíku pavouků rodu *Lasiadora parahybyna* je vhodný např. Warburgův respirometr.

Popis respirometru a jeho princip měření za konstantního objemu

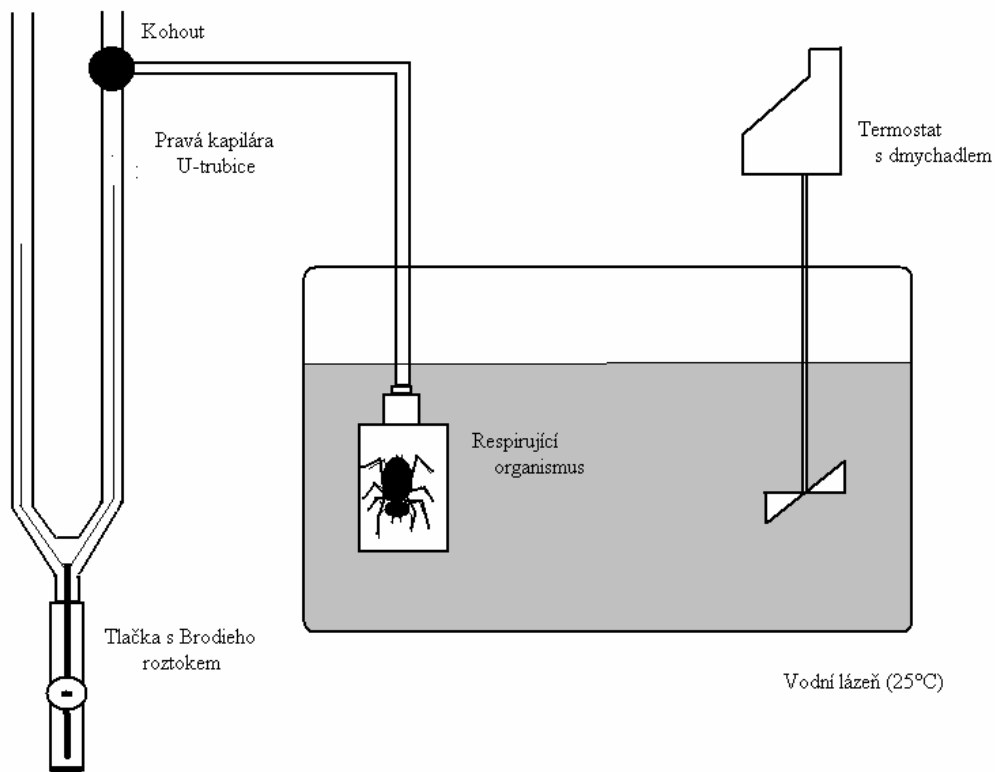
Pro tento typ měření je vhodné použití Warburgova přístroje (respirometru), jehož princip je právě založen na změnách tlaku za konstantního objemu. Warburgův přístroj měří spotřebu kyslíku v plynné fázi v uzavřeném systému.

Respirometr se skládá ze tří hlavních částí doplněných termobarometrem:

1. Termostatické lázně – součástí vodní lázně je termostat s topným tělesem a s míchacím motorkem.
2. Baňka – obsahuje pokusné objekty. Při měření spotřeby O₂ musí být součástí baňky také papírek nasáklý roztokem hydroxidu sodného nebo draselného, který absorbuje CO₂ produkovaný měřeným objektem.

3. Manometr – je to U trubice do poloviny zaplněná kapalinou. Její hladinu lze upravovat tlačkou, která je na rezervoárku napojeném na T kusem v ohbí trubice. Ramena U trubice mají milimetrovou stupnici, jedno z nich je nahoře otevřené do atmosféry, na druhém je ventil, kterým může být rameno uzavřeno. Na rameno s ventilem je postranní kapilární trubicí napojena baňka s pokusnými objekty, která se připojuje k manometru zábrusem.
4. Termobarometr – jedná se o kontrolní z výše popisovaných manometrů, který nemá v baňce pokusný objekt. Jeho funkcí je reagovat na změny atmosférického tlaku, protože odečítáme změny tlaku proti okolní atmosféře a výkyvy teploty vodní lázně, které mohly nastat během měření. Tyto změny se zaznamenávají na stupnici manometru a později se použijí pro korekci údajů z pokusných manometrů.

Obr. 5: Schéma Warburgova respirometru



3 Metodika

Tato část bakalářské práce se skládá ze 3 celků, a to jsou:

1. obstarání a výchova juvenilních pavouků do stadia vhodného pro měření respirace,
2. vlastní experiment měření spotřeby O₂ na Warburgově respirometru,
3. zpracování výsledků a vrácení sklípkanů zpět do chovu.

3.1 Obstarání a výchova juvenilních pavouků

Zakoupil jsem 30 kusů juvenilních sklípkanů druhu *Lasiadora parahybana*, kteří pocházeli ze stejného kokonu. Tento druh jsem volil coby začínající chovatel kvůli finanční dostupnosti a nenáročnosti chovu. Vhodná byla i jejich malá agresivita a nevýznamná toxicita.

Sklípkaný jsem zakoupil v plastových krabičkách o rozměrech 10 x 5 x 5 cm. Každý sklípkan byl samostatně v jedné krabičce, která měla kvůli cirkulaci vzduchu částečně perforované boky a perforované víko. Na dně byla cca centimetrová vrstva lignocelu bez dalšího vybavení. V těchto krabičkách jsem je umístil do insektária v budově ENTÚ AVČR v březnu 2008.

V insektáriu byla stálá teplota 30 °C, odvětrávání a pravidelná perioda střídání světla a tmy po 12 hodinách. Podle označení na krabičce byli sklípkaní staří 4–5 svleků, což může odpovídat stáří cca 1-2 měsíce. Velikost sklípkanů byla asi 1,3 cm v těle a s končetinami do 3,5 cm. U takto vzrostlých sklípkanů je vysoká úspěšnost odchovu, kdy může přežít i 98 % jedinců (Kovařík, 2001). Podmínky pro úspěšný odchov byly v insektáriu takřka ideální, zajišťoval jsem pouze požadovanou vlhkost částečným vlhčením lignocelu v krabičkách.

Nejprve jsem se chodil o sklípkaný starat raději 2-3x týdně. Kontroloval jsem správnou vlhkost lignocelu a lignocel kypřil, abych eliminoval případnou tvorbu plísní. Krmil jsem je cirká 1x za týden malými cvrčky domácími (*Acheta domestica*), které sklípkaní

ochotně přijímali. Občas jsem v krabici posbíral zbytky nestrávené kutikuly z těl cvrčků, které mohly hrozit výskytem nežádoucích mikroorganismů.

Za 14 dní pobytu v insektáriu se během 2-4 dní všichni sklípkaní úspěšně svlékli do 5. svleku a za další měsíc do 6. svleku. Opticky i chováním se jevíli jako silnější, a tak jsem začal měnit cvrčky domácí (*Acheta domestica*) za šváby americké (*Periplaneta americana*). Sklípkaní se začali nerovnoměrně stravovat, někteří měli větší nároky na spotřebu potravy. S tímto faktem se začali i nepravidelně svlékat.

Těsně před svlékáním si sklípkán utkal na povrchu lignocelu pavučinový polštářek, na kterém se následně svlékal. Tento proces mohl trvat řádově několik hodin a sklípkaní vždy leželi obráceně, dorzální stranou k povrchu. Po svleku byli sklípkaní celí rosolovití a namodralého zbarvení. Po 3–4 dnech byli už zpevnění a vybarvení do svých typických barev. Jejich chelicery měly už tmavě hnědou až černou barvu a opistosoma bylo zřetelně menší.

Nepravidelnost 7. svlékání trvala mezi sklípkanými 14 dní a mezi stejně starými jedinci se objevily patrné velikostní abnormality. Koncem července se svlékali poosmé, v polovině října podeváté a někteří jedinci se touto dobou svlékali již podesáté. S jejich velikostí rostla i jejich agresivita. Při každé manipulaci jsem byl zasažen jejich vyčesanými chloupky na ruku a krku. Nepříjemné svědění a reakce v podobě drobných pupínků vždy do druhého dne odezněly.

Mezi stejně starými sklípkanými, chovanými v konstantních podmínkách, se objevily značné velikostní rozdíly. S tímto faktem jsem pro svoji práci nepočítal a musel jsem z pokusu vyřadit 7 sklípkanů, kteří byli výrazně větší nebo menší než ostatní. Pro pokus je důležité mít jedince co nevíce velikostně a hmotnostně podobné. Měření by bylo vlivem rozdílných velikostí tkání a jejich zásobování kyslíkem dosti zkreslené.

U juvenilních sklípkanů jsou vyšší hodnoty metabolismu na gram jedince, než u adultních sklípkanů. Proto museli být sklípkaní stejně staří, aby výsledky nebyli tímto faktem negativně ovlivněny. Dále jsem pokus prováděl v období, kdy velikost sklípkanů byla vhodná pro manipulaci, ale především k správně zvolené velikosti baněk. Při použití baněk většího objemu by měření ztrácelo na přesnosti.

S většími pavouky by byla problémová manipulace a v baňkách by neměli dostatek prostoru, což by vedlo ke stresu a následnému ovlivnění spotřeby kyslíku.

3.2 Sestavení Warburgova respirometru

Sestavil jsem skleněnou soustavu 11 manometrů, které jsou hlavní součástí Warburgova respirometru. Poslední, 11. manometr, je kontrolní, označený jako termobarometr, neobsahuje respirujícího jedince a měří změny hodnoty tlaku. Pomocí skleněných trubic a gumových hadiček jsem připojil k Warburgově respirometru baňky o objemu 50 ml, které byly pro sklípky velikostně přijatelné. Sklípky měli možnost se v baňce otočit a protáhnout si končetiny. Každá baňka byla očíslovaná a připojená na kohout U-trubice příslušného manometru. Celý systém spojů byl kvůli těsnosti namazán laboratorním tukem a spoje podléhající tahu gravitace byly staženy gumičkou.

Napustil jsem do lázně vodu a zapnul termostat s míchadlem. Termostat jsem nastavil na stálou teplotu 25 °C s odchylkou +/- 1 °C. Pro případné ochlazení lázně na požadované hodnoty jsem měl k dispozici chladicí zařízení s ledem.

Na čirou U-trubicí nanometrů jsem na T-kus připojil stlačitelnou hadičku (tlačku) naplněnou modrým Brodieho roztokem. Hadička byla ze spodní strany plně uzavřena, naplněna po horní okraj Brodieho roztokem a otevřeným koncem připevněna na T-kus. Na každý manometr jsem připevnil přes hadičku s roztokem šroub, který hadičku stlačuje a obarvený roztok rovnoměrně vytlačuje do čirých kapilár U-trubice.

V každé baňce, která byla připevněna na svůj manometr, byl respirující sklípan. Respirující jedinci zajišťují v polozavřeném systému spotřebu O₂ a produkci CO₂. Aby se dala odečíst spotřeba O₂ na kapiláře U-trubice, musí vznikat podtlak úměrný spotřebě O₂, který posouvá hladinu Brodieho roztoku v kapiláře. Sklípkanem vydechovaný CO₂ by podtlak v U-trubicí kompenzoval, proto musí být striktně pohlcován hydroxidem. Pokud vše správně kooperuje, posouvá se hladina Brodieho roztoku směrem ke kohoutu U-trubice, kde je respirující jedinec.

Jako absorbent CO₂ jsem použil hydroxid draselný (KOH). Zrno hydroxidu jsem nasypal do silně perforované plastové zkumavky v množství 1–2 laboratorní lžičky. Hydroxid kromě CO₂ absorbuje také vodu a kapalín. Zkapalněný hydroxid se nesmí dírkami dostat z plastových zkumavek do kontaktu s respirujícím sklípkanem. Proto jsem pro perforaci použil horký špendlík a plastové zkumavky jsem mnohočetně propíchal malými dírkami. Nad zrno hydroxidu jsem vložil harmonikovým způsobem složený filtrační papír, aby se zvýšila

sorpční plocha hydroxidu. Zkumavku jsem zazátkoval a vložil do baňky. Do baňky jsem přidal vodou navlhčenou buničinu, která byla zdrojem tekutin pro sklípkanu. Přítomnost vody v baňce také napomáhala kapalnění hydroxidu, a tak lepší absorpci CO₂.

3.3 Ověření metodiky měření energetického metabolismu sklípkanů

Abych mohl získat věrohodná data z mého pokusu, musel jsem celé měření i se sklípkany nejprve vyzkoušet. Šlo o ověření metodiky a o eliminaci komplikací, které by mohly nastat.

Sestavený respirometr měl 10 manometrů, proto jsem vybral odpovídající množství velikostně shodných sklípkanů. Pro lepší orientaci jsem krabičky se sklípkany označil čísly a sklípkany zvážil na analytických vahách. Každému sklípkanovi jsem předložil potravu švába amerického (*Periplaneta americana*), aby se nasytil. Po hodině a 30 minutách, kdy se sklípkani sytili, jsem sklípkany opět zvážil a opatrně přesunul do předem připravených měrných baněk 1 – 10. Baňky se sklípkany jsem uzavřel, vkládal do lázně a napojoval gumovou hadičkou na kohouty U-trubice daného manometru. Vodní lázeň byla již při sestavování respirometru nastavena na teplotu 25 °C. Na kontrolní manometr označený jako termobarometr jsem stejným způsobem připojil prázdnou baňku a vložil ji do lázně. Kohout na manometrech jsem nastavil do otevřené polohy, aby ke sklípkanům mohl volně procházet vzduch. Celou soustavu skleněných trubic a baněk se sklípkany jsem nechal 2 hodiny vytemperovat. Teplotně chladnější skleněné baňky ponořené do teplé lázně by ovlivnily tlakový posun Brodieho roztoku v kapiláře na hodnoty, které neprodýchal měřený sklípkan, proto je nutné nechat teploty v celém systému Warburgova respirometru vyrovnat.

9. listopadu 2008 jsem začal dlouhodobý měřicí pokus. Před měřením jsem stiskem na tlačku T-kusu vyrovnal hladiny levé i pravé strany kapiláry na hodnotu 150 jednotek. Spustil jsem měření otočením kohoutu do polohy polozavřeného systému na jednotlivých manometrech včetně termobarometru. Poloha kohoutu byla nasměrována tak, aby respirující organismus byl propojen pouze do kapiláry, kde bude spotřebovávat O₂, a tak posouvat hladinu Brodieho roztoku. Po otočení všech kohoutů jsem zapisoval přesný čas začátku měření. Po hodině měření jsem si tlačkovým šroubem posunul hladinu roztoku v levé kapiláře

zpět do hodnoty 150 jednotek a v pravém sloupci kapiláry jsem odečetl jednotky spotřeby O_2 . Zapsal jsem hodnoty z pravého sloupce s příslušným časem včetně hodnot z termobarometru. Dále jsem otočením kohoutu o 90° otevřel systém a pouštěl vzduch do pravé kapiláry U-trubice a tím se vyrovnaly hladiny Brodieho roztoku v kapilárách. Následným otočením o 45° byla poloha neměřená, kdy skrze kohout proudil vzduch do měrných baněk ke sklípkanům. Takto je popsáno jedno celé měření. Zprvu jsem měřil intenzivně, a to hodinu měření po každých dvou hodinách ve dne i v noci. Toto intenzivní měření trvalo první 4 dny pokusu.

Druhý den zjišťuji, že sklípkani jsou v baňkách aktivní a pohybují plastovými zkumavkami a vodou navlhčenou buničinou. Většinou byla vlhká buničina v těsném kontaktu s perforovanou zkumavkou. Třetí den měření v pokusné baňce číslo 3 je uhynulý sklípkan. Má končetiny stočené pod tělem, což signalizuje jeho špatný stav. Leží na žlutavě zbarvené buničině. Jemná vlákna buničiny nasála přes otvory ze zkumavky hydroxid. Silná koncentrace louhu v buničině leptala kutikulu sklípkana, a tak se buničina obarvila do žluté barvy.

Zbylé baňky jsem opticky zkontroloval. Nebylo nic v nepořádku, a tak jsem pokračoval v měření. 4. den se ale situace opakovala v baňce číslo 1. Sklípkan uhynul z identické příčiny jako předešlý. Baňky jsem vyndal z vodní lázně a z baněk odstranil plastové zkumavky a buničinu. Do dvou baněk protéklo nepatrné množství vody, proto jsem baňky i se sklípkany vysušil buničinou sevřenou v dlouhé pinzetě. Vyměnil jsem hydroxid ve zkumavkách a vložil zpět do baněk. Vlhkou buničinu jsem v baňce uložil za víčko zkumavky, aby byla nejdál od děr ve zkumavce. Zábrusné hrdlo baňky jsem utěsnil laboratorním tukem a zazátkoval. Baňky jsem vložil do lázně a připojil na respirometr.

5. den jsem snižoval intenzitu měření, ale prodlužoval intervaly měření na 2 a více hodin. Řešil jsem drobné závady, kvůli kterým jsem přišel o některé naměřené hodnoty daného měření na určitém manometru, kde se závada vyskytla. Jednalo se o vniknutí vzduchu do baňky skrze rozpojenou hadičku během měření. Další překážkou byl kohout ucpaný laboratorním tukem na U-trubici. Tyhle drobné nedostatky jsem byl schopen do následného měření odstranit.

8. den jsem našel uhynulého sklípkana v baňce číslo 5. Následující den uhynuli sklípkani v baňkách 2, 10 a 9. Sklípkani byli intoxikováni hydroxidem nasátým v buničině. Pohyb sklípkanů dostal opět vlhkou buničinu k dírkám zkumavky a tudíž se buničina naplnila louhem. Zbylé 4 sklípkany jsem vyndal a převedl do svých plastových krabiček.

Šlo už o nadpoloviční ztrátu pokusných jedinců, a tak ztrátu mnoha dat z tohoto pokusu. Pro další měření jsem musel sklípky zcela oddělit od plastové zkumavky s louhem. Použil jsem stavební sklovláknitou tkaninovou síť (perlinka). Jedná se o pevnou a ohybnou síť s oky 0,05 x 0,05 cm. Tu jsem nůžkami nastříhal na obdélníky 5 x 3 cm. V plastových zkumavkách jsem vyměnil hydroxid a zkumavky vložil do měrných baňek. Nad zkumavky jsem nově vložil nastříhanou perlinku, na tu jsem pinzetou vložil vlhkou buničinu a převedl sklípky. Baňky jsem uzavřel, vložil do lázně, připojil na respirometr a nechal vytemperovat.

Stavební sklovláknitá síť byla napříč měrné baňky, plně oddělila sklípky s buničinou od louhu a neomezila výměnu a absorpci plynů v systému. Díky perlince se sklípky mohl v baňce lépe pohybovat.

10. den (19. 11. 2008) pokračuji v měření se 4 sklípky do stanoveného konce, tedy do 9. 12. 2008. Měření probíhalo standardně bez větších problémů. Interval jednoho měření jsem si dovilil prodloužit i na 7 hodin, ale jen za stálého počasí. Případná bouře a změna tlaku by mohla posunout hladinu Brodieho roztoku tak výrazně nad jednotky v kapiláře, že by dané měření bylo ztracené.

9. 12. 2008 jsem ukončil měření. Sklípky jsem odpojil od respirometru, vyndal z vodní lázně a zvážil na analytických vahách. Sklípky jsem převedl do jejich plastových krabiček. Pro zajímavost jsem vyměnil hydroxid ve zkumavkách a sklípky ještě změřil 21. 12. 2008 a 31. 12. 2008. Až nyní jsem sklípky opět nakrmil cvrčkem domácím (*Acheta domestica*).

Celé tohle měření splnilo účel ověření fungující metodiky. Plně a spolehlivě jsem se naučil pracovat s respirometrem a včas eliminovat případné nedostatky. V tomto pokusu jsem přišel na to, jakým způsobem vyloučit mortalitu pokusných jedinců vlivem intoxikace louhem. Zjistil jsem také, že rok staří sklípky vydrží bez příjmu potravy přežít i 60 dní.

Na výsledné hodnoty spotřeby O₂ u sklípky *Lasiadora parahybana* se nebudu v této práci odvolávat, neboť hodnoty byly zprvu ovlivněny stresem pokusných jedinců z intoxikace louhem.

3.4 Měření energetického metabolismu sklípkanů *Lasiodora parahybana*

Vybral jsem 10 opticky stejně velkých sklípkanů pro následující měření. Sklípkaný jsem zvažil na analytických vahách a vrátil zpět do jejich plastových krabiček. Podal jsem jim potravu švába amerického (*Periplaneta americana*) a nechal je sytit. Mezitím jsem si připravil louh do plastových zkumavek, a to tak, že místo hydroxidu draselného (KOH) v granech jsem si připravil roztok o 1 molární koncentraci hydroxidu sodného (NaOH). Jde o to, aby prostředí v měrné baňce bylo velmi zásadité a docházelo k dokonalé sorpci oxidu uhličitého (CO₂). Roztok NaOH lépe absorbuje CO₂ než dříve použitý KOH v granech. Důležité je kontrolovat stále vysokou zásaditost roztoku NaOH v plastových zkumavkách pomocí pH papírků.

Do plastových perforovaných zkumavek jsem odpipetoval 300 µl 1 molárního roztoku NaOH, zkumavku uzavřel a vložil do měrné baňky. Nad zkumavky s louhem jsem vložil sklovláknitou síť (perlinku) a vložil buničinu, do které jsem pipetou kápl 2-3 kapky vody. Sklípkaný jsem po hodině a 30 minutách sycení opět vážil, abych zjistil sytostní příbytek a převáděl do měrných baněk. Baňky jsem zazátkoval a vložil do lázně, připojil k respirometru na manometry a nechal 2 hodiny vytemperovat teploty ve skleněném systému.

7. února 2009 večer jsem zahájil 5týdenní měřicí proces. Se zaznamenaným časem jsem otáčel kohoutem na pravé kapiláře U-trubice včetně termobarometru, a spustil tak první měření. Po hodině jsem tlačkou srovnal hodnoty v levé kapiláře na U-trubici a s časem odečítal naměřené hodnoty. Poté jsem otočením kohoutu vyrovnal tlak a srovnal hladiny Brodieho roztoku v kapilárách U-trubice. Dalším otočením jsem sklípkanům pustil vzduch do měrných baněk. Za dvě hodiny jsem měření opakovl stejným způsobem. Měřil jsem intenzivně, nepřetržitě 4 dny. Vždy po dvou hodinách jedna hodina měření.

4. den odpojuji měrné baňky se sklípkaný od respirometru a vyndávám z lázně. Pinzetou jsem uchopil plastovou zkumavku a kolem sklípkanu jsem ji vytáhl z baňky. V gumových rukavicích otevírám víko zkumavky a vkládám kontrolní pH papírek. Ověřil jsem zásaditost NaOH v plastové zkumavce, uzavřel a pinzetou vložil zpět na dno měrné baňky pod perlinku. Zkontroloval jsem zásaditost ve všech plastových zkumavkách a také jsem zkontroloval vitalitu sklípkanů. Uzavřené baňky se sklípkaný jsem vrátil do vodní lázně, připojil k respirometru a po vytemperování jsem mohl dál pokračovat v měření. Prodloužil jsem interval měření na 2 a více hodin a snížil intenzitu měření.

7. den měření jsem poprvé měnil louh. Baňky jsem odpojil od respirometru a vyndal z lázně. Sklípky jsem převedl z baněk do plastových krabiček. Z baněk jsem vyndal veškeré příslušenství a baňky jsem vyčistil, popř. vysušil suchou buničinou drženou v pinzetě. Plastové zkumavky jsem v rukavicích otevřel a obsah vylil. Do každé jsem opět odpipetoval 300 μ l 1 molárního roztoku NaOH, zkumavku uzavřel a vložil do měrné baňky. Dále jsem vložil perlinku, přidal buničinu a zakápl buničinu 2–3 kapkami vody. Převedl jsem sklípky do měrných baněk, baňky vložil do lázně, připojil baňky k respirometru a nechal před následujícím měřením 2 hodiny vytemperovat.

Třetí týden měření při výměně louhu jsem v měrné baňce č. 5 objevil vedle sklípka také svlečku. Sklípka se během měření v měrné baňce úspěšně svlékl. Opticky byl v pořádku, svlečku jsem odstranil a vyměnil louh obvyklým způsobem a pokračoval v měření. O 4 dny později při kontrole pH jsem našel svlečky u sklípkanů č. 2, 3 a 9. Během 14 dní se sklípky v měrných baňkách všichni svlékli. Svlečky jsem při manipulaci s baňkami odstranil a standardně pokračoval v měření.

Měření probíhalo bez komplikací, tak jsem jen zapisoval hodnoty z měření pro výsledné zpracování. Kontroloval jsem zásaditost v plastových zkumavkách uvnitř baněk jednou cca za 3–4 dny a louh jsem měnil cca jednou za 5–7 dní. Z předchozího pokusu jsem věděl, že spotřeba O_2 už nepřesáhne víc jak 50 jednotek na kapiláře U-trubice za dobu 7 hodin měření, proto jsem uvážlivě prodloužil intervaly měření a hlídal náhlé změny počasí, kvůli změnám tlaku, které mají přímý vliv na pokus.

15. března 2009 v noci po 36 dnech ukončuji měření. Odpojuji baňky od respirometru a vyndávám je z vodní lázně. Sklípky vyndávám z měrných baněk, vážím na analytických vahách a převádím zpět do jejich plastových krabiček. V baňce č. 9 byl uhynulý sklípka, poslední den si pravděpodobně při otáčení poranil zadeček o roh perlinky. Sklípky byli místy na končetinách od laboratorního tuku a měli malé zadečky. Druhý den jsem je nakrmil švábem americkým (*Periplaneta americana*).

5. Výsledky

Měření energetického metabolismu hladovějících pavouků

Vážení (hmotnost xx g +/- SD), krmení (m žrádla yy g +/- SD), vážení (hmotnost xx g +/-SD), umístění do respirometru, objem banky včetně objemu trubic respirometru (70.8 ml), teplota lázně, umístění sorbentu CO₂, celková doba experimentu. Doba 1 měření, frekvenci výměn CO₂ sorbentu, vážení po konci experimentu (hmotnost xx g +/- SD).

Tabulka 1: Váhy sklípanů [g] před nasycením a po nasycení

Číslo měrného jedince	Váha sklípanů před nasycením[g]	Váha sklípanů po nasycení[g]	Váha potravy (šváb) [g]	Váha zbytku potravy [g]
1	2,34	2,41	0,60	0,44
2	2,31	2,36	0,55	0,42
3	1,97	2,04	0,69	0,52
4	1,83	1,88	0,46	0,31
5	2,02	2,08	0,43	0,29
6	2,15	2,17	0,5	0,34
7	1,99	2,05	0,48	0,37
8	1,70	1,74	0,46	0,31
9	1,69	1,69	0,45	0,39
10	1,53	1,58	0,41	0,31

Výpočet

Spotřeba kyslíku byla vypočtena ze změn výšky sloupce Brodieho kapaliny (korigovaných za pomoci termobarometru) po přepočtu na hladinu moře dle vzorce:

$$Spotřeba\ O_2 [\mu l * g^{-1} * h^{-1}] = \frac{(mm_{pok} - mm_{THB}) * \frac{p[atm]}{10000[\frac{mm}{atm}]} * V[\mu l] * \frac{273K}{T[K]}}{t[h] * m[g]}$$

kde:

mm_{pok} - mm pokusného manometru

mm_{THB} - mm THB

p - aktuální tlak v atmosférách

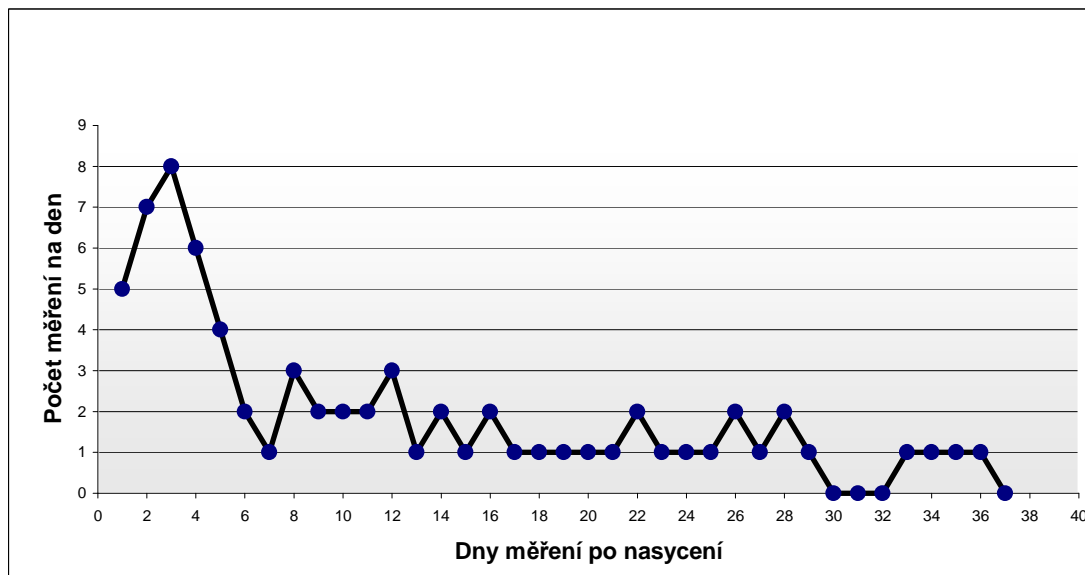
V - objem baničky v μl

T - teplota v K

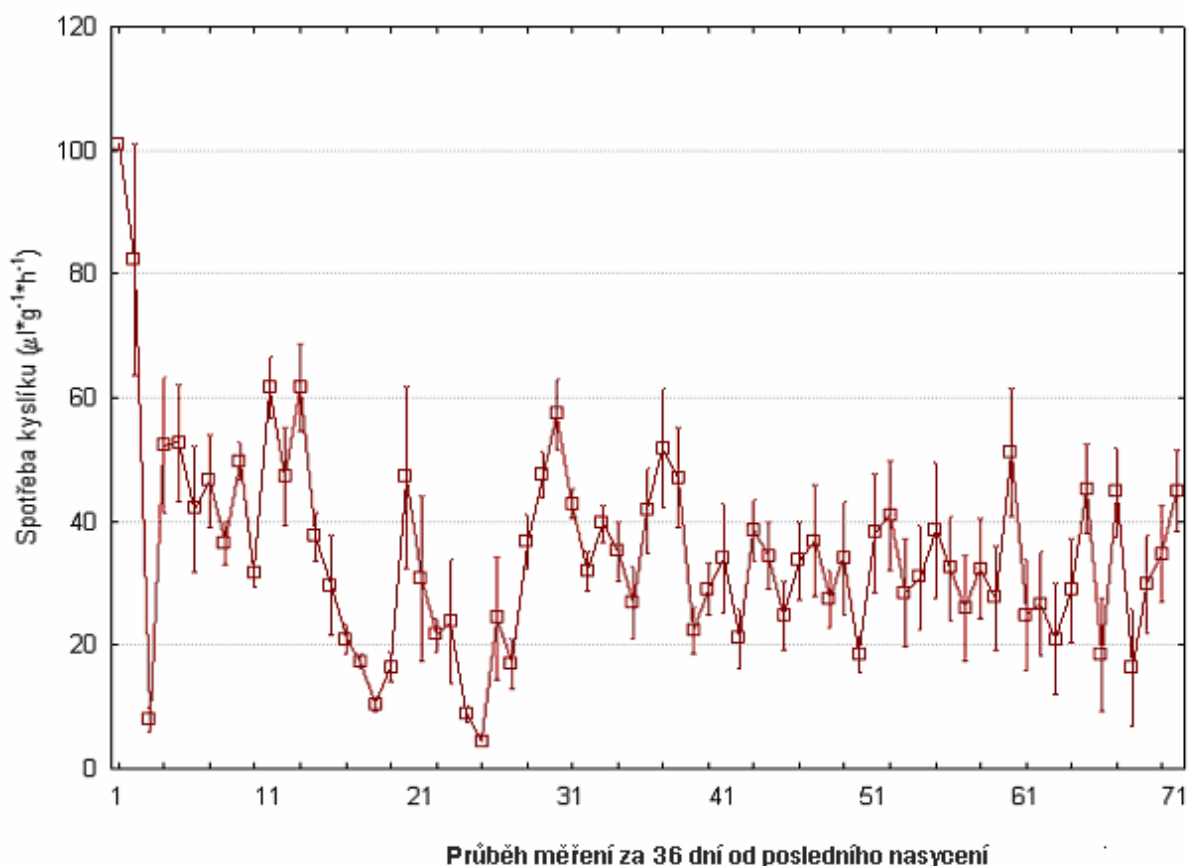
t - doba měření

m - hmotnost na počátku pokusu

Graf č. 1: Frekvence měření spotřeby kyslíku během pokusného období



Graf č. 2: průběh měření energetického metabolismu hladovějících sklípkanů



Graf znázorňuje počet jednotlivých měření (71) v průběhu 36 dní od posledního nasycení. Nejprve je hodnota spotřeby O_2 oproti pozdějšímu průběhu velmi vysoká. Tato situace mohla být vyvolaná stresem při manipulaci. Po nasycení sklípkanů museli být převedeni na analytickou váhu a do měrných baněk.

Při druhém a třetím měření je patrný pokles spotřeby O_2 . Tato měření probíhala intenzivně po sobě v rozmezí 5–11 hodin po nasycení, kdy jsem byl v laboratoři stále přítomen a svítil. Světlo v laboratoři na sklípkanů působilo jako světelná fáze dne. Tato část dne je obecně pro pavouky neaktivní a klidová.

Od 4. měření do 14. jsou u sklípkanů naměřeny, za stálého svícení v laboratoři, poměrně vyrovnané hodnoty metabolismu s větší směrodatnou odchylkou. Hodnoty spotřeby O_2 průměrně okolo $50 \mu\text{l}/\text{g}/\text{h}$. Poté na přelomu 2. a 3. dne měření spotřeba O_2 klesala k nižším hodnotám pod $20 \mu\text{l}/\text{g}/\text{h}$.

Klesající charakter hodnot respirace náhle zvedlo následující měření po výrazné manipulaci s baňkou při kontrole zásaditosti louhu. Větší směrodatná odchylka značí, že manipulace stresovala každého sklípkana individuálně jinak. Při dalších měřeních hodnoty opět sestupovaly pod 20 $\mu\text{l/g/h}$. 4. den se zkracováním intenzity měření následoval vzestup. Bez mé přítomnosti byla v laboratoři tma a sklípkani byli aktivní. Výměnou hydroxidu 7. den následovalo 29. měření, kdy se hodnoty stresem při manipulaci s jedinci dostaly na téměř 60 $\mu\text{l/g/h}$.

Dále jsem intervaly měření prodlužoval a měřil 1–2 x za den. V laboratoři byla převážně tma s výjimkou odečítání dat a práce s louhem v baňkách. Aktivní fáze sklípkanů má sestupnou tendenci. Za následujících 20 dní měření od cca 40 $\mu\text{l/g/h}$ zhruba k 20 $\mu\text{l/g/h}$. Sestupné, ale nepravidelné hodnoty spotřeby O_2 s místy většími odchylkami má za důsledek svlékání sklípkanů v baňkách v průběhu měření.

Poslední týden měření se střídala nevyrovnaná respirace. Sklípkani reagovali zvýšením spotřeby O_2 na práci s louhem vně baňky. Mohli individuálně reagovat na delší dobu hladovění ve snaze si zajistit potravu.

Z celkového pohledu na graf (č. 2) je patrné zpomalování energetických toků v těle sklípkana, což přímo souvisí se snížením spotřeby O_2 . Projevilo se snížení hodnot respirace z cca 60 $\mu\text{l/g/h}$ na 20 $\mu\text{l/g/h}$ během 36 dní měření.

Nepovedená měření způsobená povolením těsnění na respirometru jsou z grafů eliminována.

Tabulka č. 1: Hmotnosti sklípkanů v pokuse v gramech.

Číslo měrného jedince	Váha sklípkanů před nasycením (m1) [g]	Váha sklípkanů po nasycení (m2) [g]	Váha sklípkanů po 36 hladovění (m3) [g]
1	2,34	2,41	2,19
2	2,31	2,36	2,16
3	1,97	2,04	1,84
4	1,83	1,88	1,72
5	2,02	2,08	1,91
6	2,15	2,17	2,01
7	1,99	2,05	1,87
8	1,7	1,74	1,61
9	1,69	1,69	1,53
10	1,53	1,58	1,43

Tabulka č. 2: Hmotnostní rozdíl sklípkanů před nasycením a po nasycení za dobu 36 dní v %.

% váhový úbytek od váhy po nasycení $(m_2 - m_3) / (m_2 / 100) [\%]$	% váhový úbytek od váhy před nasycením $(m_1 - m_3) / (m_1 / 100) [\%]$
9,13	6,41
8,47	6,49
11,27	8,12
8,51	6,01
8,17	5,45
7,37	6,51
8,78	6,03
7,47	5,29
9,47	9,47
9,49	6,54

6. Diskuse

Několik různých autorů v problematice měření metabolismu uvádí odlišné způsoby pokusů i jiné výsledky. K tomuto tématu by se měla soustředit větší pozornost a upřesnit popř. sjednotit údaje o podmínkách a postupech měření.

Cirkadiální rytmus

Cannals a kol. (2007) uvádí v místě experimentu dodržování periody dne a noci 12:12. Jinak pokus uvádí Paul a kol. (1994), kde pokusné objekty byly měřeny za tmy. Pavouci obecně jsou aktivní za soumraku. Celý pokus by mohl být ovlivňován cirkadiálním rytmem. (Cannals a kol., 2007) tvrdí, že jedinci by měli vykazovat vyšší respiraci a tím vyšší spotřebu kyslíku během noci. Tuto teorii jsme neprokázali. V laboratoři není okno a světelná fáze byla závislá na mé přítomnosti. Přesnou periodu den / noc nebylo možné zařídit.

Vliv teploty na spotřebu O₂

U studie zaměřené na druh *Geolycosa goddeffroyi* (Humphreys, 1977) se setkáváme s možným vlivem teploty. Jedinci zde měli vyšší spotřebu kyslíku při vyšších teplotách. Tomuto vlivu jsme zabránili, sklípkaní při měření byli s měrnými baňkami zcela potopeny ve vodní lázni s konstantní teplotou. Teplota během celého pokusu činila 25 °C +/- několik desetin stupně.

Vhodnost velikosti a použitého vývojového stadia

Nepřehlédnutelný vliv na respiraci má také velikost jedinců. Větší jedinci mají vyšší potřebu zásobování tkání kyslíkem (Anderson a Prestwich, 1982). Ale mladý pavouk má relativně větší specifický metabolismus (ml O₂/g/h). Proto jsem vybral 10 stejně starých a opticky stejně velkých sklípkanů. Dále byly naměřené hodnoty metabolismu přepočtené na spotřebu O₂ (μl/g/h) jedince.

Lepší by bylo použití adultních jedinců, ale ti jsou velcí, finančně náročnější popř. dlouho trvá je dochovat. S velkými sklípkanými by se hůře pracovalo a použití nádoby o vyšším objemu by snižovalo přesnost měření. Cannals a kol. (2007) zjistili u dospělého sklípkanu druhu *Grammostola rosea* průměrnou hodnotu metabolismu 0,027 (ml O₂/g/h). Denková,

(2010) u starších mláďat sklípkana *Brachypelma vagans* naměřila průměrnou hodnotu metabolismu 0,074 (ml O₂/g/h). Naopak použití juvenilních sklípkanů v pokuse by vedlo k vysoké mortalitě. Celkově úmrtnost u mladých jedinců sklípkanů je poměrně vysoká a snižuje se s počtem svleků.

Vliv pohlaví

Humphreys (1977) uvedl možnou větší míru spotřeby O₂ u samic. Toto tvrzení jsem nemohl potvrdit a ni vyvrátit. V experimentu byli měřeni jedinci starší 1 roku, ale nebyli dospělí. Neměli klíčové adultní znaky, podle kterých bych identifikoval pohlaví.

Směrodatná odhylnka (SD)

V průběhu mnohačetného měření (71) u 10 stejně starých měřených sklípkanů byly hodnoty spotřeby O₂ (μl/g/h) více či méně rozchodné. Při podrobném pohledu na graf č. 2 je vidět při snižování spotřeby O₂ se zmenšují SD. Všichni sklípkani mají podobný průběh. Mám prokázáno, že následnou manipulací (výměna louhu, kontrola zásaditosti louhu) byli sklípkani velmi stresováni a v následujícím měření se výrazně navýšila potřeba O₂. Na stres sklípkani reagovali individuálně, na to ukazuje výraznější rozsah SD. Následně se spotřeba O₂ opět snižuje a zmenšuje i rozsah SD. Tato situace se opakuje.

Použitím jiných lépe řešených měrných baněk, nebo zvolením lepší metodiky, aby se sklípkani nevystavovali přímé manipulaci při kontrole zásaditosti louhu. To by vedlo k přesnějšímu průběhu respirace.

Průběh metabolismu během hladovění

Vlivem hladovění dochází k snížení potřeby kyslíku a metabolickým změnám (Koichi a kol., 1985). Nejvyšší hodnoty metabolismu byly naměřeny 4 hodiny po nasycení jedinců. Tuto dobu bychom mohli považovat za dobu potřebnou k trávení potravy, kdy jedinci potřebují rychlý metabolismus k získání živin. Podle Secora (2009) trvá specifická dynamická akce (SDA), tj. přírůstek v metabolismu po jídle, od několika hodin do několika dní.

S výraznějším klesáním hodnot metabolismu se setkáváme třetí den po nakrmení. Tato doba může být u všech druhů různá. Například u druhu *Brachypelma vagans* byla tato doba dva dny (Denková, 2010) u druhu *Grammostola rosea* na tři dny (Cannals a kol., 2007).

Dále jsou hodnoty metabolismu neurovnané, ale propojíme-li naměřené hodnoty regresní přímkou má značně sestupnou tendenci. Hodnoty mají průběh cca od 40 $\mu\text{l/g/h}$ k 20 $\mu\text{l/g/h}$ do 30 dne měření. Poslední týden měření jsou zaznamenány vyšší hodnoty, aniž by tomu předcházela stresová manipulace se sklípkanem. Nevyrovnaná frekvence respirace ke konci pokusů může být vysvětlena tím, že pavouk po dlouhé době hladovění začne hledat potravu, tudíž dochází ke zvýšení aktivity a tím i zrychlení metabolismu (Koichi a kol., 1985).

Průměrná hodnota respirace 10 sklípkanů byla na začátku 47,9 $\mu\text{l/g/h}$ a během 36 dní měření poklesla na 30,2 $\mu\text{l/g/h}$. Celkový průměr všech naměřených hodnot spotřeby O_2 byl 33,8 $\mu\text{l/g/h}$.

Váhový úbytek

Aby se sklípkaní úspěšně a plně nasýtli, před pokusem nedostali cca 15 dní potravu. Dalo by se říct, že už lehce strádali. Obsah jejich tráveniny, zásoby energie, byl do jisté míry vyčerpán, proto uvedené váhy jsou vyloženě váhy jejich tkání a vnitřního ústrojí. Průměrně vážili sklípkaní před nasycením 1,95 gramů a po nasycení 2,00 gramu. Po 36 dnech hladovění jejich průměrná váhová hodnota byla 1,824 gramů. Váhový úbytek proti vážení sklípkanu před nasycením byl průměrně 0,129 gramů a celkový váhový úbytek sklípkanu, po nasycení do konce měření, byl 0,176 gramů. Sklípkaní tedy ztratili na váze hmotnost tráveniny, kterou se nasýtli. Navíc při dlouhém hladovění sklípkaní ztratili průměrně 6,63 % ze své původní váhy. Anger, (1986) tvrdí, že proteiny a lipidy slouží jako metabolický substrát při hladovění, ale většina energie pochází z rozpadu bílkovin. Podle Provencher, L., Riechert, S. E. (1991) je prokázáno, že pavouci mohou snadno získat zpět hmotnosti, které ztratili v období nedostatku potravy.

Shrnutí

Přímé srovnání vývoje spotřeby O_2 od nasycení po dlouhodobém s použitím měrného objektu sklípkanu *Lasiadora parahybana* nemám. Podobné práce s pavouky jsou zaměřeny na

rychlost a hodnoty metabolismu v závislosti na nestálou teplotu, srovnání s jinými pavoukovci popř. s jinými poikilotermními organismy a podobně.

7. Závěr

- Podle výsledků měření sklípkani zvýšili hodnoty metabolismu za 4 hodiny po nasycení. Specifická dynamická akce, nebo-li rychlý metabolismus k získání živin trval po dobu 3 dnů.
- Výsledky prokázaly u všech sklípkanů sestupné snižování hodnot metabolismu během 30 dní hladovění. Jejich pružný zadeček je skutečný rezervoár energie, se kterou dokážou hospodařit za minimálního váhového deficitu.
- Sklípkani 7. týden měření začali individuálně zvyšovat nepravidelně hodnoty metabolismu. Spotřebovávali energii ve snaze nalézt kořist.
- Průměrná hodnota spotřeby O_2 byla na začátku pokusu 47,9 $\mu\text{l/g/h}$ a na konci 30,2 $\mu\text{l/g/h}$. Průměrná hodnota respirace u cca 2 g sklípkanů *Lasiadora parahybina* je 33,8 $\mu\text{l/g/h}$.
- Celkový, průměrný, váhový úbytek od nasycení do konce měření byl 8,81 %. Náklady na přežití z vlastní hmotnosti sklípkanů činily 6,63 %.
- Na pokus měl vliv cirkadiánní rytmus. Při mé přítomnosti v laboratoři byli sklípkani za světelné fáze neaktivní a to odpovídalo nízké spotřebě O_2 . V temné fázi měření byly naměřeny hodnoty respirace vyšší.
- Stres a manipulace se sklípkany při nutné kontrole zásaditosti louhu nebo jeho výměny se výrazně projevila na vyšší spotřebě O_2 .

8. Přehled použitých zdrojů

- ANDERSON J. F. A PRESTWICH K. N. (1982): Respiratory Gas Exchange in Spiders. *Physiological Zoology* **55**(1), 72-90
- ANGER, K. (1986):
<http://www.springerlink.com/content/107188334tu111ww/>, získáno z internetu,
březen 2012
- Anonymus (2010): <http://chibikun.blog.cz/1004/cevni-soustava>, získáno z internetu, leden 2012
- Anonymus (2011):
<http://www.evarcha.wz.cz/cross/pavouci/pavouci.htm>, získáno z internetu, březen 2012
- ANDERSON, J.F., PRESTWICH, K. N.: *Respiratory gas exchange in spiders*. Physiol 1982
- BUCCHAR, J.: *Stručný přehled zoologie bezobratlých*. Praha, Universita Karlova, Přírodovědecká fakulta 1995
- BUCCHAR, J., KŮRKA, A.: *Naši pavouci*. Praha, Academia 1998
- BUCCHAR, J., KŮRKA, A.: *Naši pavouci*. Praha, Academia 2001
- BREENE, R. G.: *Respiration in spiders. Forum magazine of american tarantula society* 8 (6)
- BRUINS, E.: *Encyklopedie teraristiky*. Praha, Rebo Čestlice 1999
- CANALS, M., SALAZAR, M.J., DURAN, C., FIGNEROA, D., VELOSO, C.: *Respiratory refinements in the mygalomorph spider Grammostola rosea Walchenaer 1837*. Journal of arachnology 9 (2007).

- DENKOVÁ, A.: *Vliv hladovění na metabolismus brachypelmy vagans*. Bakalářská práce, České Budějovice 2010
- FOELIX, R. F.: *Biology of spiders*. Oxford university press, New York 1996
- HUMPHREYS, W.F.: *Respiration studies on geolycosa godeffroyi (araneae, lycosidae) and their relationship to field estimates of metabolic heat loss*. Comparative biochemistry and physiology, 57: 255-263, (2007)
- KLÁTIL, L.: *Sklípkani rodu Brachypelma*. Roudná u Prahy, Robimaus 2008
- KNOZ, J.: *Obecná zoologie II*. Praha, Státní pedagogické nakladatelství 1973
- KOICHI A KOL. (1985):

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030096298590060X>,

získáno z internetu, březen 2012
- KOVAŘÍK, F.: *Chov sklípkanů*. Jihlava, Madagaskar 2001
- KOVAŘÍK, F.: *Svět sklípkanů*. Jihlava, Madagaskar 2006
- PRESTON – MAFHAM, R.: *Kniha o pavoucích a štírech*. Praha, Svojtka 1998
- PROVENCHER, L., RIECHERT, S. E. (1991):

<http://www.jstor.org/discover/10.2307/3545261?uid=2&uid=4&sid=47699036927797>

získáno z internetu, duben 2012
- SCHAUER, R. (2008):

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065231808601092>,

získáno z internetu, leden 2012
- SEDLÁK, E.: *Zoologie bezobratlých*. Brno, Masarykova univerzita 2000
- SECOR, 2009 <http://business.highbeam.com/437053/article-1G1-131958747/effect-meal-composition-specific-dynamic-action-burmese>, získáno z internetu, leden 2012
- WIRTH, V.: *Sklípkani*. Praha, Jan Vašut 1998

9. Přílohy

