

Metodyka i wyniki

Badane gatunki niesporczaków i ich hodowla

Przez pół roku hodowano gatunki *Hipsibius dujardini* i *Milnesium tardigradum*. Hodowle prowadzi się na porysowanych szalkach, dzięki której niesporczaki mogą się przyczepić do podłoża, na gładkich powierzchniach nie potrafią się poruszać. Zaobserwowano, że hodowle najlepiej się utrzymują w wodzie Żywiec Zdrój, dlatego z niej korzystano. Gatunek *H. dujardini* jest roślinożerny, dlatego też jako pożywienie stosowało się glony z rodziny *Scenedesmus*. *M. tardigradum* natomiast są mięsożerne i żywią się nicieniami *C. elegans*, które pozyskano z hodowli prowadzonej przez doktora Roberta Sobkowiaka z Zakładu Biologii Komórki w Instytucie Biologii Eksperymentalnej Wydziału Biologii UAM. Hodowanie *H. dujardini* było znacznie łatwiejsze, ponieważ gatunek ten jest bardzo powszechny w przyrodzie. Osobniki w stanie aktywnym są mało wymagające pod względem środowiska i szybko się rozmnażają. Ponadto łatwo pozyskać glony do pożywienia, mogą także żywić się innym gatunkiem niż *Scenedesmus*. *M. tardigradum* nie rozmnażają do tak licznych ilości jak gatunek poprzedni, są WYBREDNE JEŚLI CHODZI O JEDZENIE i potrzebują ściślejszych warunków niż *H. dujardini*.

Wprowadzenie niesporczaków w stan anhydrobiozy

W czasie prowadzenia hodowli kilkakrotnie wprowadzano w stan baryłki oba te gatunki. Przeprowadzanie anhydrobiozy polega na wysuszeniu, stąd nazwa tego procesu. Umieszcza się niesporczaki w warunkach powolnie wysychającego środowiska, w cieplarni o warunkach TU PODAĆ WARUNKI. Dla *H. dujardini* anhydrobiozę przeprowadza się wykorzystując szalki z bibułą, gdyż dzięki niej wysychanie próby zachodzi najwolniej. Wyschnięcie środowiska nie może zajść gwałtownie, ponieważ doprowadzi to do śmierci niesporczaków. Gatunek ten jednak nie został wykorzystany do właściwych eksperymentów, ponieważ, pomimo powstawania baryłek, osobniki nie wybudzały się. Nie opracowano dotychczas schematu przeprowadzania skutecznej anhydrobiozy i wybudzenia dla tego gatunku. Dla gatunku *M. tardigradum* można wykorzystać porysowane szalki bez bibuły, umieszczając niesporczaki w kropli wody o objętości 400 µl lub 600 µl. Osobniki tego gatunku wchodzi w stan baryłki w warunkach gwałtowniejszego wysuszenia niż u *H. dujardini* i efektywnie wracają do stanu aktywnego w średnim czasie ok. 12 minut, dlatego też *M. tardigradum* wykorzystano do właściwych eksperymentów.

Metodyka przeprowadzania eksperymentów z wykorzystaniem BHAM

Część populacji hodowli *M. tardigradum* wykorzystano do przeprowadzenia anhydrobiozy z użyciem inhibitora oksydazy alternatywnej BHAM. Działanie bezpośrednie polegało na natychmiastowym wprowadzeniu w anhydrobiozę w mieszaninie wody i odczynnika w odpowiednim stężeniu w rozpuszczalniku MetOH. W działaniu pośrednim inkubowało się osobniki w wodzie z dodatkiem odpowiednich odczynników przez określony czas i dopiero po tym czasie i po odpowiednim przepłukaniu wodą przeprowadzano anhydrobiozę w samej wodzie. Próby powolnie wysychały, co szacunkowo zajmowało trzy doby, a pozostałe trzy

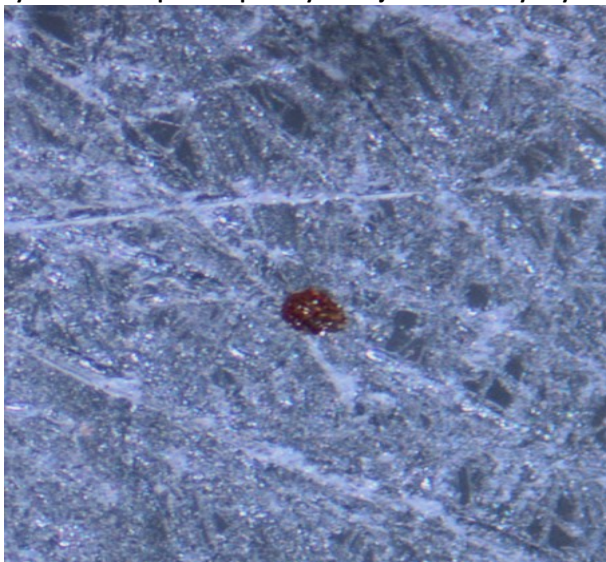
doży przeznaczono na życie utajone niesporczaków. Po sześciu dniach przeprowadzono tzw. wybudzanie, to znaczy zalewano szalki czystą wodą. Wyróżniono trzy rodzaje możliwych stanów niesporczaków po dehydratacji. Są to stany: stan martwy (kształt bardzo wydłużony, odnóża odstające na boki), stan baryłki (kulisty kształtem, ewidentnie różniący się od stanu martwego, osobnik jest 'skupiony', przypomina beczkę), i stan przejściowy (osobnik ma kształt nieco wydłużony, odnóża są schowane). Dla obserwacji po zalaniu próby mamy cztery stany: aktywność (pełna ruchliwość osobnika, taka jak w normalnym środowisku), rozruch (nieznaczne ruchy, po dłuższym czasie przechodzące w ruchy ze stanu aktywności), stan martwy (osobnik nie rusza się, analogicznie jak powyżej), stan baryłki (analogiczny jak powyżej).



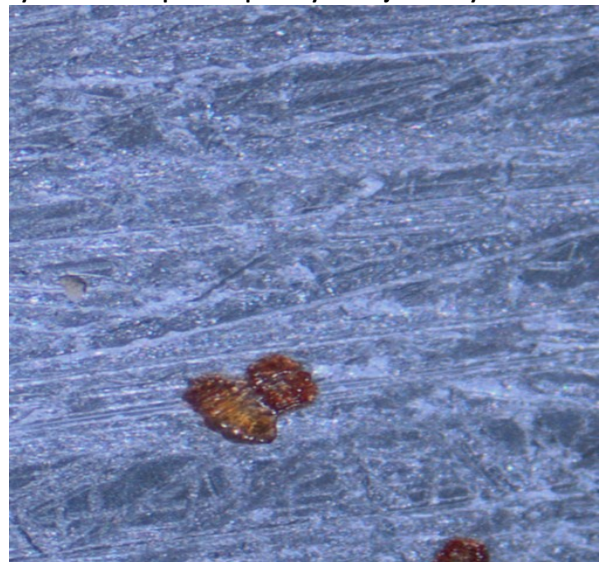
Rysunek 1. Niesporczak po rehydratacji w stanie aktywnym



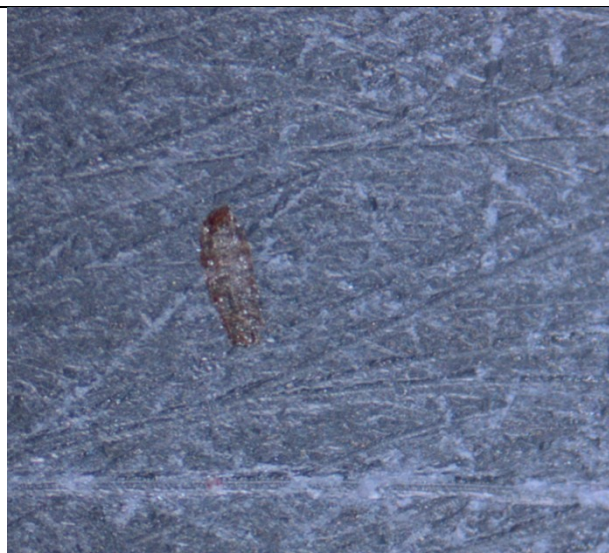
Rysunek 2. Niesporczak po rehydratacji martwy



Rysunek 3. Niesporczak po odwodnieniu w stanie baryłki



Rysunek 4. Niesporczak po dehydratacji w stanie przejściowym (po lewej), po prawej stronie baryłka. Jak widać, różnica jest nieznaczna



Rysunek 5. Nesporczak po dehydratacji martwy

Eksperyment nr 1

W pierwszym eksperymencie wykorzystano 80 osobników, które po 10 sztuk umieszczano na porysowanych szalkach w kropli o objętości 400 μ l wody i 1.2 μ l odpowiedniego odczynnika w odpowiednim stężeniu. Cztery próby przeprowadzono z działaniem pośrednim i cztery z działaniem bezpośrednim odczynnika.

Próby, które polegały na działaniu bezpośrednim i pośrednim zawierały kolejno:

- 400 μ l wody (próba kontrolna);
- 400 μ l wody i 1.2 μ l rozpuszczalnika (MetOH, kontrola rozpuszczalnika);
- 400 μ l wody i 1.2 μ l roztworu odczynnika BHAM w rozpuszczalniku, o końcowym stężeniu 1 mM;
- 400 μ l wody i 1.2 μ l roztworu odczynnika BHAM w rozpuszczalniku, o końcowym stężeniu 3 mM

W eksperymencie pośrednim inkubowano niesporczaki w wodzie z dodatkiem odpowiedniego odczynnika przez dwie godziny szklanych kostkach, następnie przenosiło się próby do czystej wody (2 ml) i czterokrotnie przepłukiwano odciągając pipetą 1 ml wody i dodając 1 ml świeżej, by pozbyć się nadmiaru odczynnika i po tym czasie przeprowadzano anhydrobiozę. Standardowo, po sześciu dniach przeprowadzono wybudzanie i liczono czas, jaki zajmuje odpowiednim osobnikom rozpoczęcie widocznej (nie fizjologicznej) rehydratacji, a następnie sprawdzano ilościową aktywność po odpowiednim czasie. Wyniki obserwacji opisano w tabeli.

	Kontrola w wodzie	Kontrola w wodzie + MetOH	1 mM BHAM	3 mM BHAM
Obserwacja zawartości szalek przed zalaniem	10 w stanie baryłki	8 w stanie baryłki, 2 martwe	8 w stanie baryłki, 2 martwe	9 martwych, 1 zaginiony
Obserwacja pierwszego ruchu po zalaniu szalek	Pierwszy ruch po 7 minutach	Pierwszy ruch po 13 minutach	Pierwszy ruch po 50 minutach	Brak jakichkolwiek ruchów
Obserwacja po dwóch godzinach	8 osobników aktywnych	7 osobników aktywnych	2 osobniki w rozruchu	Brak jakichkolwiek ruchów

*Tabela 1. Obserwacje kultury niesporczaków *M. tardigradum* po pierwszej anhydrobiozie z odczynnikiem BHAM działającym bezpośrednio*

	Kontrola w wodzie	Kontrola w wodzie + MetOH	1 mM BHAM	3mM BHAM
Obserwacja zawartości szalek przed zalaniem	9 w stanie baryłki, 1 zaginiony	10 w stanie baryłki	8 w stanie baryłki, 2 zaginione	9 baryłek, 1 zaginiony
Obserwacja pierwszego ruchu po zalaniu szalek	Pierwszy ruch po 9 minutach	Pierwszy ruch po 6 minutach	Pierwszy ruch po 8 minutach	Pierwszy ruch po 8 minutach
Obserwacja po dwóch godzinach	7 osobników aktywnych	8 osobników aktywnych	8 osobników aktywnych	7 osobników aktywnych

*Tabela 2. Obserwacje kultury niesporczaków *M. tardigradum* po anhydrobiozie z odczynnikiem BHAM działającym pośrednio*

Eksperyment nr 2

W drugim eksperymencie polegającym na poddaniu działaniu bezpośrednim inhibitorem BHAM dziesięciu niesporczaków *M. tardigradum* nie mierzono czasu pierwszego ruchu danego osobnika, lecz obserwowano daną szalkę po godzinie i po dobie dla uzyskania bardziej globalnego poglądu. Tak samo jak w poprzednim eksperymencie w czterech szalkach umieszczono po dziesięć niesporczaków w następujących stężeniach środowiska:

- 400 µl wody (próba kontrolna);
- 400 µl wody i 1.2 µl rozpuszczalnika (MetOH, kontrola rozpuszczalnika);
- 400 µl wody i 1.2 µl roztworu odczynnika BHAM w rozpuszczalniku, o końcowym stężeniu 0.1 mM;

- 400 µl wody i 1.2µl roztworu odczynnika BHAM w rozpuszczalniku, o końcowym stężeniu 1 mM

Tym razem jednak nie przeprowadzono eksperymentu pośredniego, ponieważ wyniki pokazały, że działanie na niesporczaki w taki sposób przynosi znikome efekty, tj. nie obserwuje zmniejszonej ilości wybudzonych niesporczaków.

	Kontrola w wodzie	Kontrola w wodzie + MetOH	0.1 mM BHAM	1 mM BHAM
Obserwacja zawartości szalek przed zalaniem	10 osobników w stanie baryłki	10 osobników w stanie baryłki	5 w stanie baryłki, 5 w stanie przejściowym	8 martwych, 2 w stanie przejściowym
Obserwacja po godzinie	8 osobników aktywnych, 1 osobnik w stanie baryłki, 1 osobnik martwy	7 osobników aktywnych, 3 osobniki w rozruchu	5 osobników aktywnych, 3 osobniki w rozruchu, 2 osobniki martwe	1 osobnik w rozruchu, 3 osobniki w stanie baryłki, 6 osobników martwych
Obserwacja po dobie	9 osobników aktywnych, 1 osobnik martwy	10 osobników aktywnych	8 osobników aktywnych, 2 osobniki martwe	1 osobnik aktywny, 3 osobniki w stanie baryłki, 6 osobników martwych

Tabela 3. Obserwacje kultury niesporczaków *M. tardigradum* po drugiej anhydrobiozie z odczynnikiem BHAM działającym bezpośrednio

Eksperyment nr 3

W czterech porysowanych szalkach umieszczono po dziesięć niesporczaków *M. tardigradum* i poddano je działaniu bezpośredniemu odczynnika BHAM o odpowiednich stężeniach. Na szalkach znajdowały się:

- 400 µl wody (próba kontrolna);
- 400 µl wody i 1.2 µl rozpuszczalnika (MetOH, kontrola rozpuszczalnika);
- 400 µl wody i 1.2 µl roztworu odczynnika BHAM w rozpuszczalniku, o końcowym stężeniu 0.1 mM;
- 400 µl wody i 1.2µl roztworu odczynnika BHAM w rozpuszczalniku, o końcowym stężeniu 0.1 mM.

Zastosowano taką samą metodykę obserwacji jak w eksperymencie drugim, tj. obserwowano szalki po godzinie od zalania wodą i następnie po dobie.

	Kontrola w wodzie	Kontrola w wodzie + MetOH	0.1 mM BHAM	0.1 mM BHAM
Obserwacja zawartości szalek przed zalaniem	10 osobników w stanie baryłki	8 osobników w stanie baryłki, 1 osobnik martwy, 1 osobnik zaginiony	6 osobników w stanie baryłki, 4 osobników w stanie przejściowym	8 osobników w stanie baryłki, 2 osobniki w stanie przejściowym
Obserwacja po godzinie	7 osobników aktywnych, 2 osobniki w rozruchu, 1 osobnik martwy	6 osobników aktywnych, 2 osobniki w rozruchu, 1 osobnik martwy	6 osobników aktywnych, 3 osobniki w rozruchu, 1 osobnik w stanie baryłki	4 osobniki aktywne, 5 osobników w rozruchu, 1 osobnik martwy
Obserwacja po dobie	9 osobników aktywnych, 1 osobnik martwy	7 osobników aktywnych, 1 osobniki w rozruchu, 1 osobnik martwy	7 osobników aktywnych, 2 osobniki w rozruchu 1 osobnik martwy	6 osobników aktywnych, 2 osobniki w rozruchu 2 osobniki martwe

Tabela 4. Obserwacje kultury niesporczaków *M. tardigradum* po trzeciej anhydrobiozie z odczynnikiem BHAM działającym bezpośrednio