# Metodyka

Przez pół roku hodowano gatunki *Hipsibius dujardini* i *Milnesium tardigradum.* Hodowle prowadzi się na porysowanych szalkach, dzięki której niesporczaki mogą się przyczepić do podłoża. 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 żywią się nicieniami *C. elegans* z hodowli prowadzonej przez doktora Roberta Sobkowiaka z Zakładu Biologii Komórki w Instytutu Biologii Eksperymentalnej Wydziału Biologii UAM*.* W czasie prowadzenia hodowli kilkukrotnie wprowadzano w stan baryłki i z powrotem w stan aktywny osobniki obu tych gatunków, by zapoznać się ze specyfiką tego procesu i dowiedzieć się, jakie warunki są potrzebne do osiągnięcia największej efektywności. Przeprowadzanie anhydrobiozy polega na wysuszeniu, stąd nazwa tego procesu. Umieszcza się niesporczaki w warunkach powolnie wysychającego środowiska, w cieplarce o warunkach TU PODAĆ WARUNKI. Dla *H. dujardini* (niesporczaki przechodzą w stan baryłki i można je wybudzić) przeprowadza się anhydrobiozę wykorzystując szalki z bibułą, gdyż dzięki niej wysychanie próby zachodzi najwolniej. Niemniej jednak gatunek ten nie znosi dobrze zmiany warunków, przez co jest małe prawdopodobieństwo wybudzenia jakiegokolwiek osobnika. Nie opracowano dotychczas optymalnego schematu postępowania dla tego gatunku, dlatego też na nim nie były prowadzone następne eksperymenty. Dla gatunku *M. tardigradum* można wykorzystać porysowane szalki z kroplą o objętości 400 µl lub 600 µl, w której te osobniki się znajdują. Przeżywalność jest znacznie wyższa niż u *H. dujardini.*

# Wyniki

## Eksperyment nr 1

Część populacji hodowli *M. tardigradum* wykorzystano do przeprowadzenia anhydrobiozy z użyciem inhibitora oksydazy alternatywnej BHAM. Wykorzystano 80 osobników,które po 10 sztuk umieszczano na porysowanych szalkachw kropli o objętości 400 µl wody i 1.2 µl odpowiedniego odczynnika. 4 próby przeprowadzono z działaniem pośrednim i 4 z działaniem bezpośrednim odczynnika. Próby zawierały kolejno:

* 400 µl wody (próba kontrolna), dalej nazywaną próbą 0;
* 400 µl wody i 1.2 µl rozpuszczalnika (MetOH, kontrola rozpuszczalnika),   
  nazywaną próbą 1;
* 400 µl wody i 1.2µl roztworu inhibitora AOX o stężeniu 1 mM w rozpuszczalniku,   
  nazywaną próbą 2;
* 400 µl wody i 1.2µl roztworu inhibitora AOX o stężeniu 3 mM w rozpuszczalniku,  
   nazywaną próbą 3. xxxx

Działanie bezpośrednie polegało na natychmiastowym wprowadzeniu w anhydrobiozę w mieszaninie wody i odczynnika. W działaniu pośrednim inkubowało się próby w wodzie z odczynnikami przez 2 godziny, następnie przenosiło się próby do czystej wody (2 ml) i czterokrotnie przepłukiwano odciągając pipetą 1ml wody i dodając 1 ml świeżej, by pozbyć się nadmiaru odczynnika. Dopiero po odpowiednim oczyszczeniu przeprowadzano anhydrobiozę. Po sześciu dniach przeprowadzono wybudzanie, tj. zalewano szalki czystą wodą. Liczono czas, jaki zajmuje odpowiednim osobnikom rozpoczęcie widocznej (nie fizjologicznej) rehydratacji, a następnie sprawdzano ilościową aktywność po odpowiednim czasie. Wyróżniono trzy rodzaje możliwych stanów niesporczaków po eksperymencie, kiedy nie zalano jeszcze próby wodą. 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 eksperymencie, lecz po zalaniu 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). Wyniki obserwacji opisano w tabeli.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | kontrola | kontrola + metanol | kontrola + 1 mM BHAM | kontrola + 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*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Próba 0 | Próba 1 | Próba 2 | Próba 3 |
| **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** | 8 osobników aktywnych | 7 osobników aktywnych | 2 osobniki w rozruchu | Brak jakichkolwiek ruchów |

*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), dalej nazywaną próbą 0;
* 400 µl wody i 1.2 µl rozpuszczalnika (MetOH, kontrola rozpuszczalnika), nazywaną próbą 1;
* 400 µl wody i 1.2µl roztworu inhibitora AOX o stężeniu 0.1 mM w rozpuszczalniku,   
  nazywaną próbą 2;
* 400 µl wody i 1.2µl roztworu inhibitora AOX o stężeniu 1 mM w rozpuszczalniku,  
   nazywaną próbą 3. xxx

Tym razem jednak nie przeprowadzono eksperymentu pośredniego, ponieważ wyniki pokazały, że działanie na niesporczaki w taki sposób przynosi znikome efekty.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | kontrola | kontrola + metanol | kontrola + 0,1 mM BHAM | kontrola + 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 w rozruchu,  3 osobniki w stanie baryłki,  6 osobników martwych |

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

Zakładam, że to opis tego, co do tej pory było zrobione i na tej bazie będzie pisana praca licencjacka jako, że pracę piszę się zupełnie inaczej.

W rozdziale Materiały i Metody, w części eksperymentalnej, powinny się znaleźć podrozdziały:

* Badane gatunki niesporczaków – Wynikach może być podany wynik o niskiej skuteczności tworzenia baryłek w przypadku H.d. i wyborze M.t. do dalszych badań
* Hodowla niesporczaków
* Wprowadzenie niesporczaków w stan anhydrobiozy
* Badanie wpływu kwasu benzohydroksamowego (BHAM) na przebieg anhydrobiozy

W rozdziale Wyniki, w części eksperymentalnej, powinny się znaleźć podrozdział:

* Wpływ inhibitora mitochondrialnej oksydazy alternatywnej na przebieg anhydrobiozy u *Milnesium tardigradum*