# Wstęp

## Niesporczaki

Małe, pierwouste zwierzęta bezkręgowe. Zasiedlają praktycznie wszystkie obszary, od lodowców, gór, małych ekosystemów roślinnych, po arktyczne zlodowacenia. Siedliska mają głównie wodne i wilgotne. Rozmiary wahają się od 0.01 mm do 1.2 mm, przez co teoretycznie nie można ich zobaczyć gołym okiem. Niesporczaki są fascynującymi organizmami dla wielu badaczy dzięki swoim dość unikalnym zdolnościom. Potrafią przetrwać w wysokich ekstremalnych temperaturach, są odporne na oddziaływania mechaniczne, takie jak wysokie i niskie ciśnienie, ich kutykula nie przepuszcza promieniowania.

## Życie utajone u niesporczaków

Anhydrobioza, bo taki rodzaj anabiozy występuje niesporczaków, jest stanem życia utajonego wywołanym odwodnieniem środowiska. W tym stanie *Tardigrada* są w stanie znieść bardzo nieprzyjazne warunki i ponadto w życiu utajonym mogą trwać rekordowo długo.

## Mechanizmy fizjologiczne anhydrobiozy

## Mitochondrialna oksydaza alternatywna

Mitochondrialna alternatywna oksydaza (AOX) jest białkiem wewnętrznej błony mitochondrialnej. Enzym ten zapewnia elektronom w mitochondriach transport alternatywną ścieżką podczas łańcucha oddechowego, poprzez przeprowadzenie utleniania ubichinonui redukcję O2 do H2O. Oksydaza alternatywna przenosi elektron na tlen, pomijając kompleks III i kompleks IV (pub. 3, tutaj rysunek). Taki mechanizm, potocznie nazywany oddychaniem niewrażliwym na cyjanek jest powszechny u wszystkich roślin, grzybów i pierwotniaków, jest także obecny u niektórych zwierząt. Enzym ten wykorzystywany jest podczas pojawienia się w łańcuchu oddechowym inhibitora oksydazy cytochromowej, na przykład wyżej wymienionego cyjanku.   
Według nowo opublikowanych artykułów naukowych zawierających analizy materiału genetycznego niektórych niesporczaków, organizmy te również kodują i produkują alternatywną oksydazę (pub. 1, 2, 6). Pierwotnie AOX ma pochodzenie roślinne, gdzie wykorzystywana jest do podnoszenia temperatury organizmu w warunkach stresu termicznego, co u niektórych taksonów może skutkować zwiększeniem wydzielania substancji mających na celu zwabianie owadów.

# Cel pracy

Celem pracy jest identyfikacja mitochondrialnej oksydazy alternatywnej u określonych gatunków niesporczaków w oparciu o źródła naukowe i wyniki przeprowadzonych eksperymentów na tych gatunkach.

# Materiały

## Badane gatunki niesporczaków

Do badań wykorzystano niesporczaki *Milnesium tardigradum* i *Hypsibius dujardini* z gromady *Eutardigrada.* Gatunki te pozyskano z Zakładu Taksonomii i Ekologii Zwierząt Instytutu Biologii Środowiska Wydziału Biologii UAM, dzięki uprzejmości dr hab. Łukasza Kaczmarka, który również zapewnił miejsce do pracy w pracowni. Dodatkowo wykorzystywano niesporczaki wybrane z prób środowiskowych pobranych z okolic kampusu Morasko i szpitala na Przybysza.

## Stosowane odczynniki

Do przeprowadzania prób badawczych na niesporczakach użyto inhibitora mitochondrialnej oksydazy alternatywnej, kwasu beznohydroksamowego (BHAM), który ma właściwości redukujące. Kwas ten w formie wyjściowej występuje w postaci stałego granulatu, dlatego rozpuszczano go za pomocą metanolu. Do przeprowadzenia prób kontrolnych wykorzystano wodę Żywiec Zdrój i wodę z MetOH.

# Metody

## Metody laboratoryjne

### Hodowla niesporczaków

Przez pół roku hodowano gatunki *H. dujardini* i *M. 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, tak samo jak w eksperymentach, 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 pozyskanoz hodowli prowadzonej przez dr Roberta Sobkowiaka z Zakładu Biologii Komórki w Instytutu 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 kilkukrotnie 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 cieplarce 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. W naszym laboratorium nie opracowano dotychczas schematu przeprowadzania skutecznej anhydrobiozy i wybudzenia dla tego gatunku. Istnieją jednak publikacje na ten temat. 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 wchodzą 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.

### Badanie wpływu kwasu beznohydroksamowego (BHAM) na przebieg anhydrobiozy

Część populacji hodowli *M. tardigradum* wykorzystano do przeprowadzenia anhydrobiozy z użyciem inhibitora mitochondrialnej 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 doby 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 rozciągnięty (kształt bardzo wydłużony, odnóża odstające na boki, w dominującej większości przypadków przedstawia martwego niesporczaka), stan baryłki (kulisty kształtem, ewidentnie różniący się od stanu martwego, osobnik jest ‘skupiony’, przypomina beczkę), i stan niepełnej baryłki (osobnik ma kształt nieco wydłużony, odnóża są schowane, inaczej to tzw. „stan przejściowy”). 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 rozciągnięty(osobnik nie rusza się, analogicznie jak powyżej) i stan niewybudzony (jest to po prostu niesporczak w kształcie baryłki). Dla każdego widoku po dehydratacji istnieje też próg błędu, tzn. że określony widok nie zawsze musi implikować określony stan niesporczaka po ponownym zalaniu wodą.   
Przykładowo: niesporczak odwodniony, nie wyglądający jak baryłka, lecz jak martwy, może się wybudzić. Na szczęście takie odstępstwo pojawiło się tylko raz w eksperymencie drugim.

|  |  |
| --- | --- |
| H:\efekt_bezposredni\0_kostka.tif  Zdjęcie . *Niesporczak po rehydratacji w stanie aktywnym* | H:\efekt_bezposredni\3_kostka.tif  Zdjęcie . *Niesporczak po rehydratacji martwy* |
| mt_w_wylicne.png  Zdjęcie . *Niesporczak po rehydratacji składający jaja* | H:\efekt_bezpośredni_06.05.2018\3_zoom.tif  Zdjęcie . *Niesporczak po dehydratacji w stanie przejściowym (po lewej), po prawej stronie baryłka. Jak widać, różnica jest nieznaczna* |

|  |  |
| --- | --- |
| H:\efekt_bezposredni\0_zoom_poza.tif  Zdjęcie . *Niesporczak po dehydratacji w stanie baryłki* | H:\efekt_bezposredni_29.03.2018\3_zoom.tif  Zdjęcie . *Niesporczak po dehydratacji martwy* |

# Wyniki i dyskusja

## Eksperyment nr 1

W pierwszym eksperymencie wykorzystano 80 osobników,które po 10 sztuk umieszczano na porysowanych szalkachw kropli o objętości 400 µl wody i 1.2 µl 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 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 1 mM;
* 400 µl wody i 1.2µl 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 niewybudzony,  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 niewybudzony | 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*

## Eksperyment nr 4

W tym eksperymencie, przez sześć dni, na szlace wielodołkowej (w każdym dołku po pięć osobników) inkubowano niesporczaki na porysowanym podłożu w następujących warunkach:

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

Nie przeprowadzano tym razem anhydrobiozy, obserwowano wpływ na niesporczaki w stanie aktywnym odpowiednich odczynników. Próby przeglądano w odstępach czasu wynoszących około 24 godziny, przez sześć dni. Obserwacje zapisano w tabeli.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Kontrola  w wodzie  + MetOH | Kontrola  w wodzie  + MetOH | 0.1 mM BHAM | 0.1 mM BHAM |
| **Dzień 0** | 5 osobników aktywnych | 5 osobników aktywnych | 5 osobników aktywnych | 5 osobników aktywnych |
| **Dzień 1** | 5 osobników aktywnych | 5 osobników aktywnych | 2 osobniki aktywne,  3 spowolnione | 3 osobniki aktywne,  2 spowolnione |
| **Dzień 2** | 2 osobniki aktywne,  3 spowolnione | 2 osobniki aktywne,  3 spowolnione | 1 osobniki aktywny,  4 spowolnione | 2 osobniki aktywne,  2 spowolnione,  1 martwy |
| **Dzień 3** | 3 osobniki spowolnione,  2 bez ruchu | 2 osobniki spowolnione,  2 bez ruchu | 1 osobnik aktywny, 1 składa jaja, 3 martwe | 2 osobniki aktywne, 1 składa jaja, 2 martwe |
| **Dzień 4** | 2 osobniki spowolnione,  3 bez ruchu | 2 osobniki spowolnione,  2 bez ruchu, 1 martwy | 1 osobnik aktywny, 1 składa jaja, 3 martwe | 1 osobnik aktywny, 1 składa jaja, 3 martwe |
| **Dzień 5** | 1 osobnik spowolniony,  1 bez ruchu, 3 martwe | 2 osobniki spowolnione, 2 bez ruchu, 1 martwy | 1 osobnik spowolniony, 1 składa jaja,  3 martwe | 1 osobnik aktywny, 1 składa jaja, 3 martwe |
| **Dzień 6** | 1 osobnik spowolniony,  1 bez ruchu, 3 martwe | 1 osobnik spowolniony,  2 bez ruchu, 2 martwe | 1 osobnik składa jaja, 4 martwe | 1 osobnik spowolniony, 1 składa jaja,  3 martwe |

Tabela 5. *Obserwacje kultury niesporczaków podczas inkubacji z inhibitorem BHAM.*