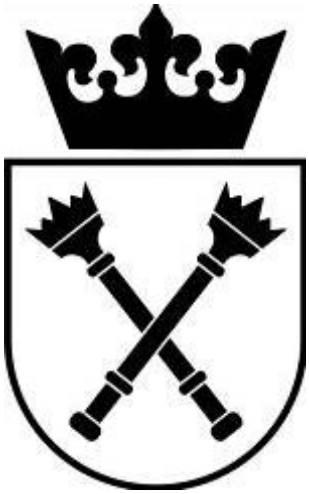
Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego



PRACA DOKTORSKA

Rehydratacja anhydrobiotycznych larw ochotki afrykańskiej, *Polypedilum vanderplanki* Hinton, 1951 *ex situ* (Diptera: Chironomidae)

Ewelina Baran

Promotorzy:
dr hab. Hubert Harańczyk
Instytut Fizyki
Zakład Fizyki Medycznej
dr hab. Stanisław Knutelski
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Zakład Entomologii

Kraków 2018

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej
Uniwersytet Jagielloński

Oświadczenie

Ja niżej podpisana Ewelina Baran (nr indeksu: 1061180) doktorantka Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego kierunku Biofizyka oświadczam, że przedłożona przeze mnie praca doktorska pt. „Rehydratacja anhydrobiotycznych larw ochotki afrykańskiej, *Polypedilum vanderplanki* Hinton, 1951 *ex situ* (Diptera: Chironomidae)" przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem dr hab. Huberta Harańczyka oraz dr hab. Stanisława Knutelskiego. Pracę napisałam samodzielnie.

Oświadczam, że moja praca dyplomowa została opracowana zgodnie z Ustawą o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dziennik Ustaw 1994 nr 24 poz. 83 wraz z późniejszymi zmianami).

Jestem świadoma, że niezgodność niniejszego oświadczenia z prawdą ujawniona w dowolnym czasie, niezależnie od skutków prawnych wynikających z ww. ustawy, może spowodować unieważnienie stopnia nabytego na podstawie tej pracy.

…… ……

Kraków, dnia *podpis doktorantki*

Kraków,……. r.

Oświadczenie

Oświadczamy, że przedłożone egzemplarze pracy doktorskiej pani mgr inż. Eweliny Baran, pt. „Rehydratacja anhydrobiotycznych larw ochotki afrykańskiej, *Polypedilum vanderplanki* Hinton, 1951 *ex situ* (Diptera: Chironomidae)", stanowią wersję ostateczną.

dr hab. Hubert Harańczyk

dr hab. Stanisław Knutelski

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować mojemu Promotorowi, panu dr. hab. Hubertowi Harańczykowi za umożliwienie wykonania badań, nieocenioną pomoc merytoryczną, cenne wskazówki, a także za poświęcony czas i zaangażowanie.

Szczególne słowa podziękowań kieruję do mojego Promotora, pana dr. hab. Stanisława Knutelskiego za wszechstronną pomoc, wnikliwe dyskusje naukowe, zaangażowanie i ogromną życzliwość.

Dziękuję także panom: prof. dr. hab. Kazimierzowi Strzałkce z Małopolskiego Centrum Biotechnologii oraz dr. Takashiemu Okudzie z National Institute of Agrobiological Sciences (Japonia) za udostępnienie larw ochotki afrykańskiej *Polypedilum vanderplanki* oraz celne uwagi.

Osobne podziękowania składam moim Koleżankom i Kolegom z Zakładu Fizyki Medycznej, a szczególnie: inż. Tomaszowi Malarzowi za niezawodną pomoc w obsłudze spektrometrów i dr. Piotrowi Nowakowi za pomoc w wykonaniu pomiarów i ich opracowaniu.

Dziękuję również dr. Andrzejowi Wróblowi, dr. Bartoszowi Leszczyńskiemu, dr. hab. inż. Jackowi Tarasiukowi oraz dr. hab. Jackowi Niziołowi za wykonanie zdjęć mikrotomograficznych.

Bardzo dziękuję moim Rodzicom Renacie i Mirosławowi za wszechstronne wsparcie podczas powstawania tej pracy, a także mojemu mężowi Szymonowi oraz Dzieciom za ich wyrozumiałość i cierpliwość.

Spis treści

Wprowadzenie i zawartość pracy ***12***

1. Wstęp ***14***

1.1. Polypedilum vanderplanki *17*

1.1.1. Systematyka gatunku 18

1.1.2. Rozwój *Polypedilum vanderplanki* 19

1.1.3. Historia badań 24

1.1.4. Znaczenie systemu odwodnienia dla pomyślnego przejścia w stan anhydrobiozy 25

1.1.5. Rola trehalozy 26

1.1.5.1. Trehaloza – nieredukujący disacharyd 26

1.1.5.2. Trehaloza, a stan anhydrobiozy 29

1.1.6. Niezależność indukcji anhydrobiozy od centralnego układu nerwowego 33

1.1.7. Odpowiedź na stres oksydacyjny i antyoksydanty 34

1.1.8. Białka szoku cieplnego (HSP) 35

1.1.9. Silnie hydrofilowe białka LEA 35

1.1.10. Akwaporyny - specyficzne kanały wodne 36

1.1.11. Porównanie genomów *Polypedium vanderplanki* i wrażliwego na desykację *Polypedilum nubifer* 37

1.1.12. Porównanie anhydrobiotycznych larw *P. vanderplanki* i *Polypedilum pembai* 39

1.2. Woda w układach biologicznych *41*

1.2.1. Molekuła wody 42

1.2.2. Właściwości fizykochemiczne wody 43

1.3. Izoterma sorpcyjna *44*

1.3.1. Izoterma Langmuira 46

1.3.2. Model izotermy sorpcyjnej BET 47

1.3.3. Model izotermy sorpcyjnej Denta 49

1.4. Elementy magnetycznego rezonansu jądrowego - opis półklasyczny *52*

1.4.1. Moment pędu i moment magnetyczny 53

1.4.2. Energia oddziaływania momentu magnetycznego z zewnętrznym polem magnetycznym 54

1.4.3. Magnetyzacja jądrowa 54

1.4.4. Precesja Larmora 55

1.4.5. Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego 56

1.4.6. Równania Blocha. Procesy relaksacyjne 57

1.4.6.1. Czas korelacji 59

1.4.7. Kwantowe ujęcie magnetycznego rezonansu jądrowego i procesu relaksacji. Operator gęstości 60
1.4.8. Hamiltonian jądra 62
1.4.9. Teoretyczne podstawy pomiarów MRJ w domenie czasu i w domenie częstości 64
1.4.9.1. Wytworzenie wirującego pola magnetycznego 64
1.4.9.2. Sygnał zaniku swobodnej precesji 64
1.4.9.3. Transformacja Fouriera 67
1.4.9.4. Składowa zaniku swobodnej precesji pochodząca od spinów fazy stałej 67
1.4.9.5. Zastosowanie funkcji Gaussa w analizie widma NMR oraz FID 68
1.4.9.6. Model funkcji Abragama 69
1.4.9.7. Dublet Pake'a 69
1.4.9.8. Zastosowanie funkcji Lorentza w analizie widma NMR 72
***2. Materiał i metody* 73**
2.1. Materiał 73
2.2. Metody 73
2.2.1. Pomiary grawimetryczne i suchej masy 73
2.2.2. Wyznaczanie poziomu uwodnienia, kinetyka hydratacji i dehydratacji, izoterma sorpcyjna 74
2.2.3. Pomiary magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) 75
2.2.4. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM) 81
2.2.5. Mikrotomografia komputerowa 82
2.2.6. Morfometria 83
2.2.7. Numeryczne opracowanie danych 85
***3. Wyniki* 86**
3.1. Mikrogramy SEM larw żywych w różnych etapach uwodnienia 86
3.2. Mikrotomografia rentgenowska 91
3.3. Morfometria zmian ciała larw w trakcie hydratacji z fazy cieczowej 95
3.4. Pomiary kinetyki hydratacji i izotermy sorpcyjnej larwPolypedilum vanderplanki 100
3.4.1. Kinetyka hydratacji z fazy gazowej 100
3.4.1.1. Kinetyka hydratacji dla niskich wilgotności względnych 101
3.4.1.2. Kinetyka hydratacji w atmosferach o wysokich wilgotności względnych 104
3.4.2. Izoterma sorpcji 109
3.5. Pomiary magnetycznej relaksacji ^{1}H-NMR dla larw Polypedilum vanderplanki 113
3.5.1. Pomiary zależności hydratacyjnych zaniku swobodnej precesji ^{1}H-NMR FID dla protonów u żywych larw *Polypedilum vanderplanki* 113
3.5.1.1. Sygnał składowej stałej ^{1}H-NMR FID 113
3.5.1.2. Zależność hydratacyjna sygnału cieczowego ^{1}H-NMR FID 115
3.5.2. Pomiary zależności hydratacyjnych zaniku swobodnej precesji dla protonów ^{1}H-NMR FID u martwych larw *P. vanderplanki* 117
3.5.2.1. Sygnał składowej stałej w funkcji FID 117
3.5.2.2. Zależność hydratacyjna sygnału cieczowego ^{1}H-NMR FID 118

3.6. Spektroskopia ^{1}H-NMR larw Polypedilum vanderplanki *120*

3.6.1. Analiza kształtu i pomiary zależności hydratacyjnych widm ^{1}H-NMR dla rehydratowanych żywych larw *P. vanderplanki* 120

3.6.2. Analiza kształtu i hydratacyjne pomiary widm ^{1}H-NMR dla martwych larw *P. vanderplanki* 125

3.6.3. Czas relaksacji poprzecznej T_2 129

3.6.4. Widmo ^{1}H-NMR dla żywych aktywnych larw *Polypedilum vanderplanki* uwodnionych z fazy ciekłej 129

3.6.5. Pomiary temperaturowe widm ^{1}H-NMR dla larw *Polypedilum vanderplanki* 131

3.6.5.1. Pomiary temperaturowe widm ^{1}H-NMR dla żywych larw *P. vanderplanki* 131

3.6.5.2. Pomiary temperaturowe widm ^{1}H-NMR dla martwych larw *P. vanderplanki* 138

3.6.6. Spektroskopia relaksacyjna ^{1}H-NMR 141

3.6.6.1. Temperaturowe pomiary czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 dla protonów żywych larw *Polypedilum vanderplanki* 141

3.6.6.2. Temperaturowe pomiary czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 dla protonów martwych larw *Polypedilum vanderplanki* 143

4. Dyskusja wyników ***146***

5. Wnioski ***153***

6. Bibliografia ***154***

7. Spis publikacji Autorki ***169***

8. Wystąpienia konferencyjne Autorki ***170***

9. Spis rycin ***171***

10. Spis tabel ***175***

Wprowadzenie i zawartość pracy

W pracy przedstawiono wyniki badań procesu rehydratacji (uwodnienia) larw ochotki afrykańskiej, *Polypedilum vanderplanki* Hinton, 1951 (Insecta: Diptera: Chironomidae) w różnych warunkach środowiskowych *ex situ* od stanu anhydrobiozy do całkowitego uwodnienia uwidaczniającego się rozpoczęciem aktywności życiowych tego owada. Badano kinetykę hydratacji, izotermę sorpcyjną oraz unieruchamianie molekuł wody w trakcie obniżania temperatury oraz porównano rehydratację larw w próbkach wody o różnym składzie chemicznym.

Treść niniejszej pracy ujęto w kilku częściach poświęconych, najpierw podstawom teoretycznym, a następnie metodom przeprowadzonych badań oraz uzyskanym wynikom, dyskusji i wnioskom.

Rozdział pierwszy stanowi wstęp obejmujący wiele różnych i podstawowych informacji, niezbędnych do zrozumienia badanego problemu oraz zjawisk biologicznych i fizycznych z nim związanych. Opisano w nim zjawisko anhydrobiozy, definicję tego stanu oraz strategie ewolucyjne wykorzystywane przez organizmy w celu przetrwania w środowiskach naturalnych z niedoborem wody. Zawiera on także charakterystykę przedmiotu badań, czyli larw *P. vanderplanki*, w której przedstawiono rozwój gatunku oraz najważniejsze cechy poszczególnych stadiów larwalnych. Następnie, skoncentrowano się na wyszczególnieniu najważniejszych mechanizmów zachodzących podczas indukcji anhydrobiozy oraz na porównaniu genomu badanego gatunku z gatunkami pokrewnymi. Podano również podstawowe informacje o wodzie - kluczowym związku chemicznym potrzebnym do życia. Zaprezentowano jej podstawowe własności chemiczne i fizyczne. W dalszej części scharakteryzowano podstawowe modele teoretyczne opisujące wiązanie się molekuł wody do powierzchni adsorbenta. Porównano ze sobą modele zaproponowane przez Langmuira; Brunauera, Emmeta i Tellera (model BET) oraz Denta. Przedstawiono także teoretyczne wprowadzenie do magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), głównej techniki pomiarowej wykorzystanej w badaniach. Opisano procesy relaksacyjne możliwe do zaobserwowania przy pomocy spektroskopii i relaksometrii rezonansu protonowego.

W rozdziale 2 opisano materiały i metody wykorzystane w zrealizowanych badaniach. Zawarto w nim opis procedury przygotowania do analizy próbek, pomiarów grawimetrycznych, magnetycznego rezonansu jadrowego, uwodnieniowych z fazy ciekłej oraz mikroskopii elektronowej i mikrotomografii komputerowej.

Rozdział 3 obejmuje opis oryginalnych wyników własnych badań doświadczalnych. Ze względu na różnodność metodyczną badań zostały one ujęte w dwóch podstawowych podrozdziałach: 1) wyniki z analizy metodami stosowanymi w badaniach biologicznych i 2) wyniki z badań metodami fizycznymi. Przy czym, w podrozdziale 1 przedstawiono zdjęcia z mikroskopu elektronowego skaningowego (SEM), w 2 pokazano mikrogramy larw. W podrozdziale 3 omówiono wyniki pomiarów uwodnieniowych z fazy ciekłej, a w następnym - kinetykę hydratacji badanych larw oraz izotermy sorpcyjne. Podrozdział 5 obejmuje wyniki hydratacyjnych pomiarów sygnału zaniku swobodnej precesji, a 6 - pomiary widm ^{1}H-NMR w funkcji hydratacji oraz temperatury.

Dyskusję wyników, wnioski płynące z przeprowadzonych badań oraz cytowane źródła informacji i załączniki ujęto w kolejnych (4-10) rozdziałach pracy.

1. Wstęp

Organizmy w celu przetrwania stosują różnego rodzaju strategie adaptacyjne (Futuyma 2008). Większość z nich musi przeciwstawiać się niekorzystnym warunkom środowiskowym, takim jak np. niskie i wysokie temperatury, ograniczony dostęp żywności, wysokie stężenie soli i metali ciężkich, utlenienie i niedotlenienie, czy odwodnienie (Danks 1987, Watanabe 2006). Odwadnianie jest jednym z najpoważniejszych stresów środowiskowych, zarówno dla organizmów wodnych, jak i lądowych.

Woda jest jedną z najbardziej zagadkowych cieczy dotychczas poznanych. Żadna inna jej nie dorównuje pod względem własności fizycznych i chemicznych (Ball 1999; Rothschild, Mancinelli 2001). Woda jest jedną z najważniejszych substancji na Ziemi, bez niej nie istniałoby życie. Odgrywa ona bardzo ważną rolę w metabolizmie organizmów, bierze udział w reakcjach chemicznych zachodzących w komórkach. Średnia zawartość wody w ciele organizmów bezkręgowych wynosi około 70% (17% - 90%) i stanowi 95-99% całkowitej liczby wszystkich cząsteczek w ich ciałach (Edney 1977; Hadley 1994). Dla porównania ciało człowieka reprezentującego kręgowce składa się z ok. 60% wody, a już przy 10% jej utraty następują poważne zaburzenia i spada odporność, natomiast przy 20% odwodnieniu następuje śmierć (Sol 90 2013). Większość innych organizmów po utracie ok. 50% całkowitej objętości wody w ciele ginie (Watanabe 2006). Wszelkie więc ograniczenia dostępu wody dla organizmów w ich środowisku życia stanowią trudne wyzwanie, z którym sobie one radzą w rozmaity sposób. W celu przetrwania w środowiskach z naturalnym niedoborem wody organizmy wykształciły dwie główne strategie ewolucyjne.

Istotą pierwszej z nich jest „unikanie wysuszania", czyli zmniejszanie strat wody poprzez morfologiczne, fizjologiczne i behawioralne adaptacje, np. pogrubiona kutikula, wydalanie suchych odchodów, wchodzenie w estywację bądź zmianę zachownia, np. migracje poziome albo pionowe, włącznie z zagrzebywaniem się głęboko w ziemi (Cornette 2010). Przykładem tego rodzaju strategii są niektóre gatunki ryb dwudysznych żyjących w zbiornikach wodnych powstających na terenach bagnistych tropikalnej Afryki. Tworzą one wodoodporne kokony ze śluzu w celu zapobieżenia prawie całkowitemu odwodnieniu (dehydratacja) podczas pory suchej.

Drugi rodzaj strategii, zwany "tolerancją na wysuszanie", polega na przetrwaniu organizmu w stanie jego niemal całkowitego odwodnienia (dehydratacja). „Utajone" życie w tak esktremalnych warunkach środowiskowych zostało nazwane anhydrobiozą. W takim stanie organizm nie wykazuje widocznych oznak życia, jego aktywność metaboliczna jest

trudna do rejestrowania, a w skrajnych przypadkach, kiedy zawartość wody jest mniejsza niż 3% jego masy ciała, wykrycie jej staje się niemożliwe (Crowe i in. 1992, Watanabe i in. 2003, Watanabe 2006). Podczas anhydrobiozy organizm nie doznaje żadnych trwałych uszkodzeń i następuje stabilizacja błony oraz innych struktur komórkowych, zapobiegając śmiertelnym uszkodzeniom wywołanym ekstremalnymi warunkami środowiskowymi (Hengherr i in. 2009). Przy ponownym nawodnieniu (hydratacji) ciała, może się on „odradzać", szybko wznawiając swoją aktywność. Wtedywracają w pełni wszystkie jego funkcje życiowe oraz normalny rozwój (Sømme 1995; Cornette, Kikawada 2011). Oznacza to, że taki organizm wykazuje odporność na wysuszenie (desykację).

„Wskrzeszanie animalcules", czyli wrotków (Rotifera) z suchych próbek mułu zostało po raz pierwszy udokumentowane przez Antoniego van Leeuwenhoeka już w 1702 roku, ale dopiero w latach sześćdziesiątych XX wieku zostało ono szczegółowo opisane i zdefiniowane (Keilin 1959).

Istnieje także inna ilościowa definicja całkowitego wysuszenia (dehydratacji). Według niej organizm poddawany desykacji to taki organizm, u którego zawartość wody w ciele jest mniejsza niż 0,1 g wody swobodnej na gram suchej masy komórek (Alpert 2005).

Anhydrobiozę stwierdzono u wielu rozmaitych organizmów reprezentujących różne grupy systematyczne, zarówno jednokomórkowych, np.: bakterie, pierwotniaki, jak również wielokomórkowych, np.: drożdże, zarodniki grzybów, jaja wirków, nicienie, wrotki, niesporczaki, skoczogonki, cysty niektórych skorupiaków, włącznie z *Artemia salina* oraz larwy pewnych ochotek i rośliny, w tym nasiona, a także niektóre tkanki wegetatywne (Clegg 2001; Crowe 1971; Crowe i Clegg 1978; Glasheen i Hand 1988; Wright 1989; Potts 1994; Sømme 1995; Orstan 1998; Danks 2000; Wharton 2002a, 2002b; Watanabe 2006). Wspólną cechą większości bezkręgowców anhydrobiotycznych są ich niewielki rozmiary ciała, nieprzekraczające 1 mm długości. Wyjątek stanowią larwy *Polypedilum vanderplanki* Hinton, 1951(Insecta: Diptera: Chironomidae), zwanej po polsku ochotką afrykańską (Knutelski i in. 2016). Są to największe wielokomórkowe organizmy anhydrobiotyczne na świecie, ich ostatnie stadium larwalne wchodzące w stan anhydrobiozy osiąga do 7-8 mm długości ciała (Watanabe 2006).

Polypedilum vanderplanki występuje w półpustynnych regionach Afryki. Larwy tego gatunku ochotki potrafią przetrwać skrajne warunki wysuszenia tworząc rurkowate osłony z błota i śliny na dnie okresowo wysychających basenów naskalnych. W stanie anhydrobiozy przeczekują one okres suszy, mogący trwać nawet 8 miesięcy. Do normalnej aktywności wraz z nadejściem pory deszczowej. Kiedy zawartość wody spada u nich poniżej 75%, następują

zmiany w równowadze jonowej hemolimfy i płynów komórkowych, co wyzwala szereg zdarzeń fizjologicznych indukujących anhydrobiozę, np. ekspresja wielu genów, w tym kodujących białka LEA (ang.: Late-embryogenesis abundant proteins) (Watanabe i in. 2003). Syntetyzowana jest trehaloza w ciele tłuszczowym i przenoszona przez hemolimfę do innych komórek oraz tkanek (Kikawada T i in. 2006). Wraz z postępującym ubytkiem wody w organizmie, wewnątrzkomórkowe środowisko może zmienić się z ośrodka zdominowanego przez wodę na region z dominującą trehalozą, co skutkuje równomiernym rozkładem tego disacharydu w organizmie. W stanie skrajnie odwodnionym, przy zawartości wody wynoszącej około 3% ogółu objętości w ciele, związane cząsteczki wody otaczające białka oraz błony są zastępowane przez trehalozę i silnie hydrofilowe białka. Mieszanina tego dwucukru oraz białek jest w stanie szklistym i zawiera wszystkie niezbędne do życia makrocząsteczki, jak: enzymy, DNA i lipidy błonowe. Podczas ametabolicznego stanu, charakterystycznego dla anhydrobiozy, unieruchomione składniki komórkowe nie ulegają fizycznej, ani chemicznej destrukcji, a podczas procesu rehydratacji (ponownego uwodnienia) wracają do swoich pierwotnych postaci. Mechanizm indukcji anhydrobiozy jak i ponownej hydratacji u larw *P. vanderplanki* jest niezależny od jakiejkolwiek kontroli centralnego układu nerwowego lub wpływu wewnątrzwydzielniczych gruczołów. Podczas rehydratacji, poddane dekapitacji larwy tej ochotki, „wykonywały" ruchy wahadłowe, typowe dla żywych osobników.

Ruch wody w ciele organizmów anhydrobiotycznych jest ważny dla zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw pomyślnej anhydrobiozy i powrotu do aktywnego życia. Organizmy tolerujące wysuszenie mogą fizycznie i fizjologicznie kontrolować szybkość odwadniania i nawadniania ciała. Na przykład przesuszane niesporczaki kurczą się, aby zmniejszyć powierzchnię ciała, co powoduje zmniejszanie się wskaźnika odwodnienia (Wright i in. 1992). Z tego samego powodu większość wysuszonych nicieni anhydrobiotycznych tworzy zwiniętą strukturę (Crowe i Madin 1974, Wharton 2002a). Są to tzw. zewnętrzne czynniki morfologiczne pomocne dla udanej indukcji anhydrobiozy. U ochotki afrykańskiej osłonka w formie rurkowatej tubki, która zabezpiecza fizycznie ciało larwy i jej warunki wilgotnościowe, może być czynnikiem zewnętrznym odpowiadającym za szybkość wysychania.

Larwy *P. vanderplanki* są organizmami zdolnymi do życia w bardzo niskiej wilgotności względnej. Funkcjonowanie w takich warunkach wymaga wykształcenia szeregu mechanizmów pomagających znosić proces głębokiej dehydratacji oraz umożliwiających

rehydratację. Głęboka dehydratacja komórek tych larw jest jednym ze sposobów na przetrwanie w ekstremalnych warunkach środowiska.

W znacznym stopniu poznano już mechanizm indukujący anhydrobiozę, a także wiele zmian morfologicznych, fizjologicznych, biochemicznych, fizykochemicznych i behawioralnych zachodzących podczas dehydratacji i rehydratacji larw ochotki afrykańskiej. Pozwoliło to lepiej zrozumieć swoisty stan biologiczny, jakim jest kryptobioza (Clegg 2001; Watanabe i in. 2002, 2003, 2004; Watanabe 2006). Pozostało jednak jeszcze wiele niewyjaśnionych szczegółów mechanizmów molekularnych, a także morfologicznych związanych z procesem rehydratacji. Dotychczas nie stosowano także technik magnetycznego rezonansu jądrowego (MRJ) do obserwacji właściwości wody związanej w tym organizmie, jak również nie zbadano wpływu składu chemicznego wody na rehydratację larw. Podjęto się więc tego zadania, żeby uzupełnić stan wiedzy dotyczący procesu rehydratacji anhydrobiotycznych larw *P. vanderplanki* w warunkach *ex situ*.

Celem podjętych badań było poznanie odporności larw *P. vanderplanki* na dehydratację oraz szczegółowa analiza procesu rehydratacji wraz konsekwencjami morfologicznymi towarzyszącymi temu zjawisku w różnych warunkach środowiskowych *ex situ*, od stanu anhydrobiozy do całkowitego uwodnienia, z zastosowaniem technik biologicznych i fizycznych.. Interdyscyplinarne badania i przedstawienie ich wyników, łączących określone zagadnienia biologiczne z fizycznymi technikami badawczymi, wydawało się niezwykle istotne i potrzebne w celu lepszego zrozumienia adaptacji organizmów wielokomórkowych do życia w ekstremalnych warunkach środowiskowych. Inną motywacją przyświecającą podjęciu się tego zadania badawczego jest stały regres liczebności populacji i zasięgu tego gatunku, grożący jego ekstynkcją w przyszłości (inf. ustna dr. Takashi Okudy z Japonii).

1.1. *Polypedilum vanderplanki*

Polypedilum vanderplanki Hinton, 1951 występuje w półpustynnych regionach Afryki (Hinton 1951, 1960). W okresie życia larwalnego podczas pory deszczowej zasiedla płytkie, tymczasowe zbiorniki naskalne wypełnione deszczem, które często w czasie suszy całkowicie wysychają (Hinton 1951, 1960). W tym czasie następuje prawie całkowite odwodnienie (dehydratacja) larwy.

Larwa tej ochotki w stanie prawie całkowitego wysuszenia jest zdolna przetrwać przez wiele miesięcy, a nawet lat, bez odżywiania się i pobierania wody ze środowiska. Dzięki wieloletnim badaniom, głównie profesora Takashiego Okudy (Tsukuba, Japonia), *P.*

vanderplanki stał się modelowym gatunkiem w poznawaniu, zarówno samego zjawiska anabiozy u zwierząt, jak również mechanizmów umożliwiających komórkom i tkankom przechodzenie poprzez tak skrajne stany życiowe jak ekstremalne wysuszenie (anhydrobioza), wywołane cyklicznymi przemianami warunków środowiskowych, nie ponosząc przy tym żadnych uszkodzeń morfologicznych i fizjologicznych. Spośród stosunkowo niewielu organizmów zdolnych do prawie całkowitego zatrzymania procesów metabolicznych, ochotka afrykańska jest filogenetycznie gatunkiem najbliżej spokrewnionym z człowiekiem.

1.1.1. Systematyka gatunku

Polypedilum vanderplanki, zwany po polsku ochotką afrykańską lub też ochotką śpiącą (z ang.: *Sleeping Chironomid)* jest gatunkiem owada z rzędu muchówek, który reprezentuje rodzinę ochotkowatych (Insecta: Diptera: Chironomidae).

Ochotkowate w stadium dorosłym są małymi owadami podobnymi do komarów, mają wydłużone przednie odnóżą i wydatne czułki (Ryc. 1). Są jedną z najliczniejszych w gatunki (opisano ponad 10 000) rodzin w świecie zwierząt (Armitage i in. 1995). Ich systematyka (Tab. 1) jest dość skomplikowana i wciąż opisywane są nowe dla nauki gatunki oraz dokonywane rewizje systematyczne. W rozwoju ontogenetycznym przechodzą, podobnie jak inne muchówki, cztery stadia rozwojowe: jajo, larwa, poczwarka i postać dorosła (imago). Czas trwania stadium larwalnego może wynosić od dwóch tygodni do nawet kilkunastu lat. Stadium poczwarki nie trwa dłużej niż kilka dni. Larwy rozwijają się w środowisku wodnym lub w wilgotnej glebie. Większość gatunków odżywia się glonami i martwymi szczątkami organizmów, są także larwy roślinożerne, pasożytnicze i drapieżne. Formy dorosłe z reguły się nie odżywiają. Muchówki z rodziny ochotkowatych opanowały ekosystemy słodkowodne prawie całej hydrosfery, jednak zdarzają się również gatunki zasiedlające wody słone oraz gleby (Thienemann 1954, Armitage i in. 1995). Ochotki występują w strefie umiarkowanej, tropikalnej oraz w okolicach podbiegunowych. Znane są ze swoich umiejętności adaptacyjnych do różnych środowisk. Jednym z najbardziej interesujących pod względem przystosowania do środowiska życia przedstawicieli ochotek, jest *Polypedilum vanderplanki.*

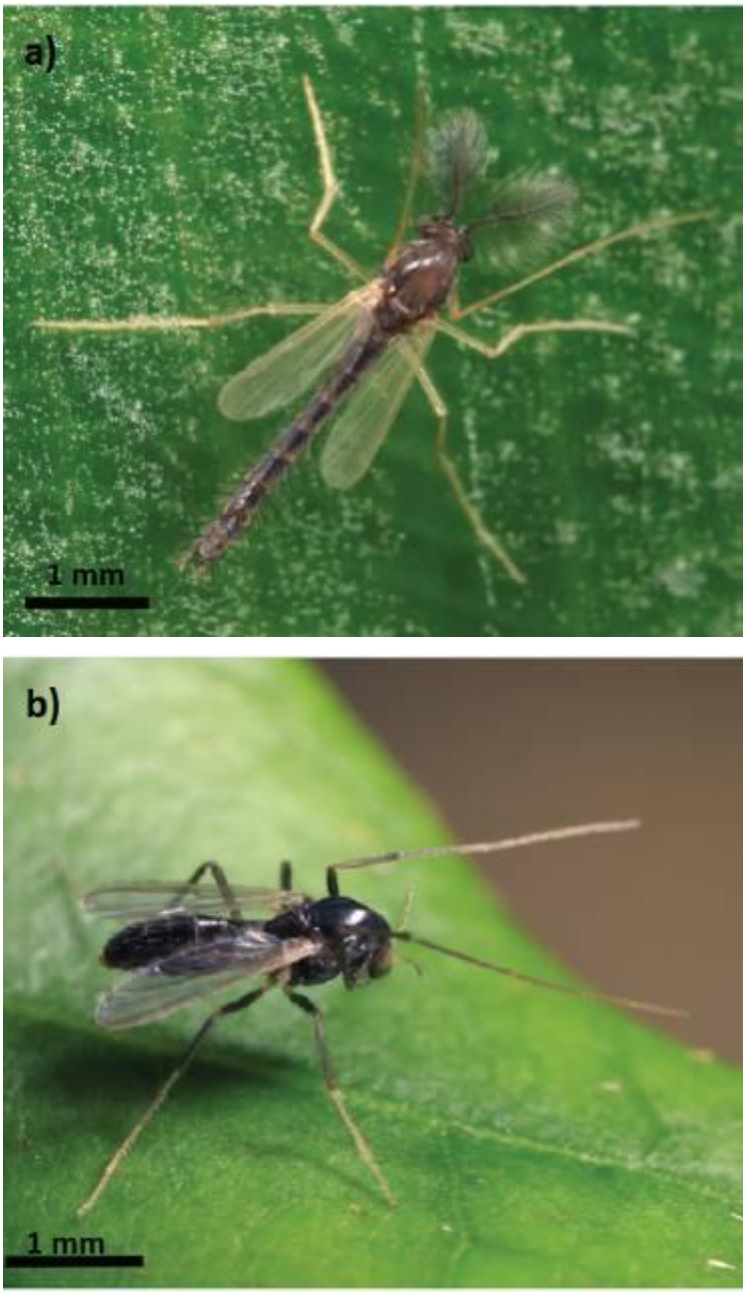
Tabela 1. Systematyka gatunku *Polypedilum vanderplanki*

Domena	Eucaryota (eukarionty)
Królestwo	Animalia (zwierzęta)
Podkrólestwo	Eumetazoa (tkankowce właściwe)
Nadtyp	Protostomia (pierwouste)
Typ	Arthropoda (stawonogi)
Podtyp	Hexapoda (sześcionogi)
Gromada	Insecta (owady)
Podgromada	Pterygota (owady uskrzydlone)
Rząd	Diptera (muchówki)
Rodzina	Chironomidae (ochotkowate)
Rodzaj	*Polypedilum*
Gatunek	*Polypedilum vanderplanki*

1.1.2. Rozwój *Polypedilum vanderplanki*

Cykl życiowy *P.vanderplanki*, jak już wspomniano, składa się z czterech etapów: jajo, larwa, poczwarka oraz imago (dorosły osobnik). Samica składa zapłodnione jaja do wody. Z otoczonych galaretowatą, pęczniejącą w wodnie otoczką jaj w złożu jajowym, wylęgają się larwy (Ryc. 2). Stadium larwalne może trwać od dwóch tygodni nawet do kilkunastu lat. Jego długość zależy od warunków środowiska, głównie od temperatury i dostępu do wody. Następnie wchodzi w stadium poczwarki trwające maksymalnie kilka dni, aby ostatecznie przeobrazić się w owada dorosłego. W stadium doskonałym (imago), trwającym również kilka dni, muchy te przypominają swoim wyglądem znane nam komary i często są z nimi mylone, chociaż mają wydłużone przednie odnóża oraz bardziej wydatne czułki. Ochotkom brakuje również długiej kłujki, służącej samicom komarów do wysysania krwi lub nektaru kwiatów. Na głowie dorosłej ochotki afrykańskiej znajdują się nieduże oczy oraz czułki, dzięki którym można zaobserwować zjawisko dymorfizmu płciowego. Czułki samców są pierzaste i dłuższe niż u samic, u których są one proste, nitkowane i względnie krótkie (Ryc. 1). Cały aparat gębowy obu płci jest w dużej mierze uwsteczniony, gdyż dorosłe osobniki nie odżywiają się. Na ciemnobrązowym, z lśniącym oskórkiem tułowiu, znajduje się jedna para przeźroczystych skrzydeł pozbawionych drobnych łuseczek, typowych dla komarów (Ryc. 1). Pierwsza para długich, cienkich odnóży *P. vanderplanki* jest wyraźnie dłuższa od drugiej i trzeciej pary. Odwłok samca jest cieńszy i dłuższy niż u samicy i

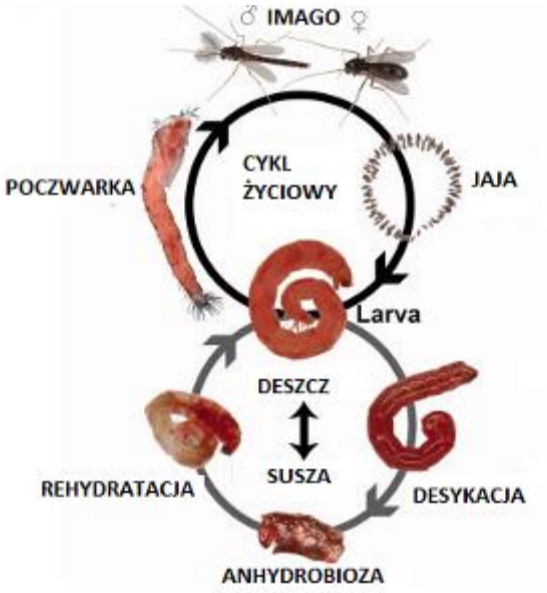
wyraźnie sięga poza jego złożone skrzydła, a u samicy jest pękaty i jest nieco tylko dłuższy od jej złożonych skrzydeł (Ryc. 1). Długość całego ciała samca wynosi od około 2,8 do 4 mm, a jego białawych skrzydeł od 1,7 do 2 mm, natomiast samicy ok. 2.2 mm, przy długości jej szarawych skrzydeł ok 1,41 mm (Cornatte i in. 2017).



Rycina 1. Samiec (a) i samica (b) dorosłych osobników *Polypedilum vanderplanki*; na podstawie Cornette i in. (2017)

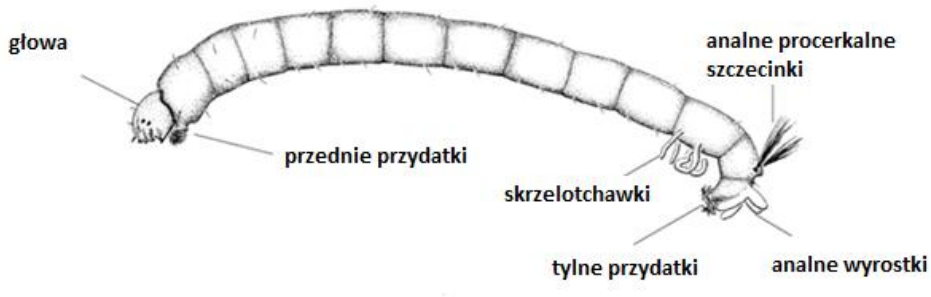
W sprzyjających warunkach czas całego cyklu życiowego (ontogeneza) gatunku wynosi ok. 1 miesiąca, w tym jego poszczególnych stadiów: jajo - 2 dni, larwa 3-4 tygodnie; poczwarka - 1-2 dni, imago - 2-3 dni (Cornette, Kikawada 2011). Jednakże przetrwanie

niekorzystnych warunków środowiskowych w odwodnionej formie możliwe jest tylko w stadium larwalnym, gdyż ani jaja, ani poczwarki, czy też imago nie są zdolne do anabiozy. Schemat cyklu życiowego *P. vanderplanki* wraz z procesem wejścia w stan anhydrobiozy przedstawiono na Rycinie 2.



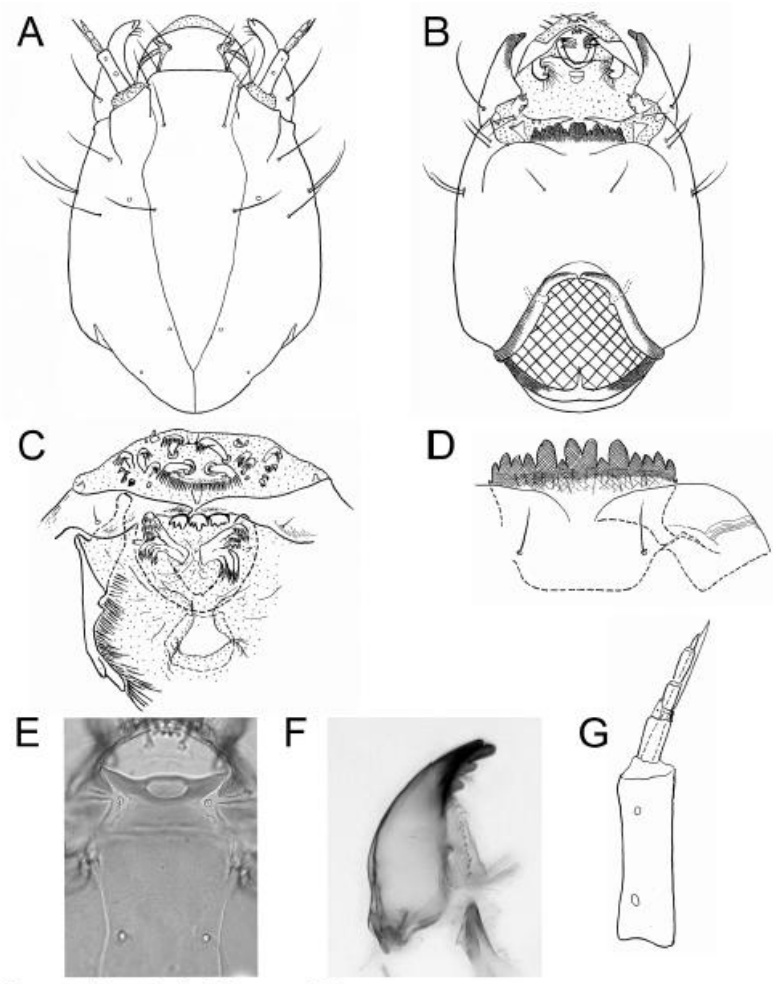
Rycina 2. Cykl życia ochotki *Polypedilum vanderplanki* wraz ze zjawiskiem desykacji i wejściem w stan anhydrobiozy oraz rehydratacji i powrotnym przejściem do stanu aktywnego życia larwy na podstawie Cornette i in. (2017)

W naturalnych warunkach larwy *P. vanderplanki* żyją w płytkich zbiornikach naskalnych istniejących jedynie podczas pory deszczowej (Hinton 1951, 1960; Watanabe i in. 2004). Aktywna larwa ostatniego stadium osiąga średnio 6,6 mm długości i ok. 1 mg wagi. Jej ciało jest lekko wygięte i wydłużone. Z przodu i z tyłu ciała widoczne są przydatki umożliwiające jej przemieszczanie się i zdobywanie pokarmu (żywią się głównie bakteriami i pierwotniakami) oraz przyczepianie się do podłoża. Na odwłoku larwy znajdują się nitkowate skrzelotchawki, a na jego ostatnim segmencie – przydatki odwłokowe (Ryc. 3).



Rycina 3. Budowa morfologiczna larwy ochotki *Polypedilum vanderplanki*; wg Epler (2001), nieco zmienione

Głowa larwy (szerokości 250-310 μm) jest żółtawobrązowa, boczna część szwu potylicznego, wierzchołek żuwaczki oraz wszystkie jej zęby i podbródek są są ciemnobrązowe. Jest względnie mała i wyposażona jest w szczecinkowy aparat gębowy. Żuwaczka (Ryc. 4F) ma długość ok. 126μm, a jej ząb grzbietowy jest cienki i ostry; grzebień żuwaczki składa się z 4 do 5 wyrostków. Wewnętrzna szczecina jest cechą taksonomiczną, charakterystyczną dla rodzaju *Polypedilum*. Narząd pierścieniowy zlokalizowany jest na pierwszym członie czułka. Długość narządów Lauterborna nie przekracza długości środka trzeciego członu czułka (Ryc. 4G).

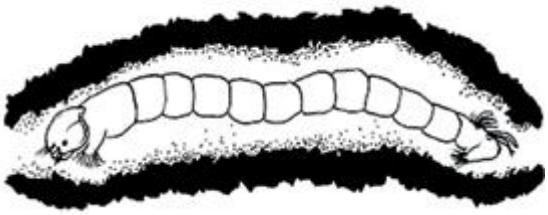


Rycina 4. Budowa morfologiczna głowy larwy *Polypedilum vanderplanki*: A) strona grzbietowa, B) strona brzuszna; C) okolice otworu gębowego, D) bródka, E) warga górna, F) żuwaczka, G) czułek; wg Cornette i in. (2017)

Ciało larwy, w zależności od ilości obecnej hemoglobiny w hemolomfie może przybierać kolor czerwony, brunatny lub ciemnobrunatny. To właśnie dzięki barwnikowi hemoglobinie larwy te mogą osiedlać się w środowiskach wodnych z obniżoną zawartością tlenu, takich jak np. dna zbiorników wodnych. Wymiana gazowa zachodzi poprzez oskórek i naskórek, a barwnik ten pomaga rozprowadzać tlen po całym organizmie.

Wraz z nadejściem pory suchej zbiorniki zaczynają wysychać, a larwy pozbywają się wody z własnego ciała i otaczają się cylindrycznymi osłonkami utworzonymi z dennych osadów zlepionych własną śliną (Ryc. 5). Są one zdolne usunąć aż 97% wody z własnego ciała i przejść w stan anhydrobiozy, w którym mogą przetrwać od dwóch tygodni do nawet kilkunastu lat. Kiedy w środowisku jest wystarczająca ilość wody larwa może ponownie się nawodnić (rehydratacja) i powrócić do stanu żywotności w stosunkwo bardzo krótkim czasie, nawet w ciągu ok. jednej godziny. Najdłuższy czas przetrwania ochotki afrykańskiej w stanie anhydrobiozy wynosi 17 lat (Adams 1985) i jest on rekordowy wśród anhydrobiotycznych

zwierząt (Watanabe 2006). Larwy, które przetrwały tak długi okres zostały wysuszone przez Hintona, odkrywcę tego gatunku i przechowywane w szczelnie zamkniętych szklanych probówkach zawierających żel krzemionkowy.



Rycina 5. Przekrój przez rurkowatą osłonkę śluzowo-piaskową ze znajdującą się wewnątrz larwą *Polypedilum vanderplanki,* będącą na początku procesu odwodnienia (dehydratacji); wg Kikawada i in. (2005)

W stanie odwodnienia larwy *P. vanderplanki* oprócz tolerancji na ekstremalne wysuszenie, są odporne także na różne czynniki stresogenne. Wytrzymują np. skrajne wahania temperatur od -227^{o}C do +102^{o}C (Hinton 1960b), proces zanurzenia w glicerynie i etanolu, długotrwałą ekspozycję na próżnię i promieniowanie kosmiczne oraz bardzo wysoki poziom promieniowania gamma (Watanabe 2006).

1.1.3. Historia badań

W latach 1950 i 1960, Hinton studiował anhydrobiozę u *P. vanderplanki* z fizjologicznego punktu widzenia. Jego badania zostały jednak przerwane i dopiero w 2000 roku grupa badawcza pod kierunkiem dr. Takashiego Okudy z National Institute of Agrobiological Sciences (NIAS) z Tsukuby (Japonia) na skutek udanego wprowadzenia systemu hodowlanego wznowiła badania mechanizmów leżących u podstaw tego zjawiska. Wczesne eksperymenty Japończyków wykazały, że indukcja anhydrobiozy jest możliwa w izolowanych tkankach i niezależna od centralnego układu nerwowego. Jednakże, w celu osiągnięcia pomyślnego stanu anabiozy larwy potrzebują reżimu powolnego wysuszenia, co pozwala im na syntetyzowanie cząsteczek, które będą chronić komórki i tkanki przed szkodliwym wpływem odwodnienia (Watanabe i in. 2002). Nie wiadomo jednak, jaki dokładnie mechanizm molekularny odpowiada za niezwykłe właściwości wysuszonej larwy *P. vanderplanki.* Występuje związek między szybkością przejścia w stan odwodnienia, a wzrostem stężenia trehalozy w organizmie. Nadal nie jest również znany schemat budowy wewnętrznej *P. vanderplanki* w trakcie powrotu do stanu aktywnego po desykacji.

Indukcja anhydrobiozy jest niezależna od ośrodkowego układu nerwowego (Watanabe i in. 2002). Stwierdzono tak, po tym jak hydratowano larwy poddane dekapitacji (odcięcie głowy). Po nawodnieniu dekapitowane larwy „wykonywały" typowe dla żywych larw ruchy wahadłowe, wykazując, że mózg, ani jego przydatki nie są zaangażowane w proces rehydratacji (nawodnienia). Wykazano również, że dla udanej indukcji anhydrobiozy ważne są także czynniki zewnętrzne. Dla *P. vanderplanki*, cylindryczna osłonka rurkowa otaczająca larwę w stanie anhydrobiotycznym, kontroluje odpowiednią wilgotność i może być jednym z ważnych czynników odpowiadających za szybkość wysychania. W dalszej części pracy opisano czynniki wewnętrzne indukujące anhydrobiozę u larwy badanego gatunku.

1.1.4. Znaczenie systemu odwodnienia dla pomyślnego przejścia w stan anhydrobiozy

Pomyślne wejście larwy ochotki śpiącej w stan anhydrobiozy zależy od tempa odwadniania jej ciała (Watanabe i in. 2003). W warunkach laboratoryjnych wymagane jest powolne odwodnienie trwające około 48 godzin. W trakcie procedury, zawartość wody zmniejsza się stopniowo od ok. 80% do 75% w ciągu pierwszych 16 godzin i jest utrzymywana na tym poziomie w ciągu kolejnych 16 godzin. Następnie gwałtownie zmniejsza się do poniżej 3% w ostatnich 16 godzinach procesu desykacji. W trakcie trwania dehydratacji larwy wyjmuje się z wody i umieszcza na kawałkach bibuły filtracyjnej z 0,44 ml destylowanej wody na szklanej szalce Petriego w eksykatorze o wilgotności względnej 5%, w temperaturze pokojowej. Ta metoda susząca zapewnia podobny efekt do naturalnej desykacji (Watanabe i in. 2002). W naturalnych warunkach cylindryczne osłonki wydają się utrzymywać mikroklimat wilgotności wokół larw, co pozwala na powolne wysuszanie, aż do osiągnięcia ostatecznego stanu anhydrobiozy. W laboratorium rolę osłonek spełnia papier filtracyjny, który jest kluczem do indukcji procesu ze względu na powolne odwadnianie wywołane zmianą ciśnienia pary wytwarzanej z mokrej bibuły.

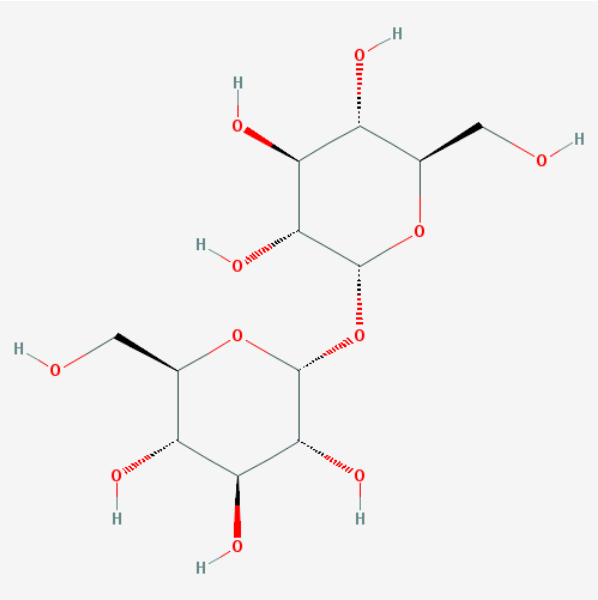
Zauważono, że szybkie suszenie z reguły nie wywołuje anhydrobiozy u zwierząt (Womersley 1987, Watanabe 2002a). Ciałko tłuszczowe larwy powtórnie nawodnione po powolnej desykacji wygląda podobnie do tego, które nie przeszło procesu wysuszania. Tkanki szybko suszone nie przeżyły odwadniania, ponieważ nie mogły zsyntezować trehalozy oraz odpowiednich białek do poziomu potrzebnego do przywrócenia funkcji życiowych.

1.1.5. Rola trehalozy

1.1.5.1. Trehaloza – nieredukujący disacharyd

Trehaloza (alfa-D-glukopiranozylo-1, 1-alfa-D-glukopiranozyd) jest nieredukującym disacharydem, składającym się z dwóch jednostek glukozy połączonych wiązaniem α, α-1,1-glikozydowym (Ryc. 6). Chociaż istnieją trzy możliwe anomery trehalozy: α, β-1,1-; β, β-1,1- i α, α1,1-, jedynie α, α-trehaloza zostały wyizolowane po biosyntetzie w żywych organizmach (Elbein i in. 2003). Trehaloza powstaje przez związanie dwóch redukujących grup aldehydowych, więc nie ma zdolności do wzięcia udziału w reakcji Maillarda (seria reakcji chemicznych zachodzących najczęściej pod wpływem ciepła, pomiędzy aminokwasami a cukrami redukującymi). Wiązanie to sprawia, że trehaloza jest bardzo odporna na hydrolizę kwasową, a zatem jest stabilna w roztworze w wysokich temperaturach, nawet w warunkach kwaśnych. Wiązanie utrzymuje również nieredukujące cukry w zamkniętej postaci pierścienia, tak że końcowe grupy aldehydowe lub ketonowe nie wiążą się z resztami lizyny lub argininy białek (proces zwany glikacją).

Trehaloza jest słabiej rozpuszczalna niż sacharoza, z wyjątkiem wysokich temperatur (> 80 ° C). W wodnych roztworach wykazuje dużą skłonność do tworzenia wiązań wodorowych z wodą, jak również z innymi cząsteczkami trehalozy. To wiązanie wodorowe wpływa nie tylko na strukturę wody, ale także sprzyja intensywnej agregacji zależnej od cząsteczek trehalozy (Sapir i in. 2011). Analizując wielkość klastra trehalozy i wymiar fraktalny oszacowano próg perkolacji klastra na 1,5-2,2 mola (Sapir i in. 2011).



Rycina 6. Chemiczny wzór strukturalny trehalozy; wg https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7427#section=Top

Wykazuje ona wysoką hydrofilność i stabilność chemiczną. Obecnie uważa się, że nie tylko sama trehaloza i produkty jej metabolizmu, służą jako sygnały w mechanizmie wyczuwania cukrów, lecz uczestniczą w nim także intermediaty biosyntezy trehalozy, głównie trehalozo-6-fosforan. Struktury trehalozy i cukrozy (sacharozy) są do siebie zbliżone. Oba nie posiadają właściwości redukujących, przy czym w cukrozie cząsteczki glukozy i fruktozy połączone są wiązaniem α,β-1,2-glikozydowym. Trehaloza ma jednak niższą higroskopijność, co umożliwia ochronę białek poprzez tworzenie niehigroskopijnego „szkliwa" na ich powierzchni. Trehaloza dobrze rozpuszcza się w wodzie, jednak charakteryzuje się trzykrotnie niższą rozpuszczalnością od cukrozy.

Trehaloza ma postać białego, bezwonnego proszku. Jest to ponoć słynna biblijna „manna z nieba". Trehaloza została odkryta w 1832 roku przez H. A. L. Wiggersa w sporyszu żyta (Wiggers 1832). W 1859 roku francuski chemik Marcellin Berthelot nadał nazwę trehaloza substancji, identycznej z cukrem grzybowym, wyizolowanej przez niego z kolebek poczwarkowych *Larinus onopordi*, chrząszcza z rodziny ryjkowcowatych (Tillequin 2009). Ryjkowiec ten, zwany lokalnie *trehala manna*, jest szeroko rozprzestrzeniony w bardzo ciepłych oraz suchych rejonach Morza Śródziemnego i Czarnego (Tillequin 2009). U chrząszczy, pustynnych roślin, drożdży piekarniczych lub piwnych pełni rolę substancji zapasowej, z której łatwo uwolnić glukozę. Cukier ten jest naturalnie obecny w zwierzętach, roślinach, bakteriach, a nawet w wodzie morskiej. Trehaloza jest również głównym cukrem w hemolimfie owadów. W drożdżach i roślinach może również służyć jako cząsteczka sygnałowa do kierowania lub kontrolowania pewnych szlaków metabolicznych, a nawet wpływania na wzrost. Ponadto wykazano, że trehaloza może chronić białka i błony komórkowe przed inaktywacją lub denaturacją wywołaną różnymi warunkami stresowymi, w tym wysuszeniem, odwodnieniem, upałem, zimnem i utlenianiem (Crowe i in. 1984). Wreszcie, w mykobakteriach i korzeniach bakterii trehaloza jest integralnym składnikiem różnych glikolipidów, które są ważnymi strukturami ściany komórkowej (Elbein 2003). To, że może być nagromadzona w dużych ilościach w organizmie bez toksyczności i jej synteza lub degradacja jest względnie łatwa, może wyjaśnić, dlaczego została „wybrana" jako zgodna substancja rozpuszczona w tak szerokim zakresie taksonów. Trehaloza występuje w wielu rodzajach żywności, które regularnie jemy, takich jak grzyby, algi lub krewetki. Fakt, że suszony grzyb może odzyskać swój pierwotny kształt po zanurzeniu w wodzie, wynika z obecności trehalozy w jego tkankach.

Trehaloza ma wiele zastosowań. Wydobywanie trehalozy było niegdyś trudnym i kosztownym procesem, ale około 2000 r. firma Hayashibara (Okayama, Japonia) zastosowała

niedrogą technologię ekstrakcji ze skrobi kukurydzianej do produkcji masowej (Cargill 2011). Właściwości trehalozy dają możliwości licznych zastosowań w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym oraz weterynarii i medycynie. Między innymi trehaloza używana jest jako zamiennik sacharozy, której użycie powoduje często nadmierną słodkość wyrobów. Może mieć również zastosowanie w walce z osteoporozą (Higashiyama, 2002).

Trehaloza pełni przede wszystkim funkcję zabezpieczającą integralność struktur komórkowych, a w szczególności błon biologicznych. Jej działanie polega na zabezpieczaniu struktury białek lub dwuwarstwowych błon lipidowych przez wytwarzanie wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydroksylowymi cukrów, a polarnymi grupami białek bądź fosfolipidami błony (Higashiyama 2002). Trehaloza bezpośrednio oddziałuje z kwasami nukleinowymi, ułatwia topienie dwuniciowego DNA i stabilizuje jednoniciowe kwasy nukleinowe (Bezrukavnikov i in. 2014). Wpływa na metabolizm, wzrost i rozwój roślin, oddziałuje na alokację węgla, metabolizm węglowodanów, aktywność enzymów, fotosyntezę oraz ekspresję genów. Działa nie tylko jako źródło glukozy, ale także analogicznie do sacharozy, daje takie same efekty jak sacharoza.

Istnieje kilka biologicznych szlaków biosyntezy trehalozy. Najbardziej znana i szeroko rozpowszechniona ścieżka obejmuje transfer glukozy z UDP-glukozy (lub GDP-glukozy w niektórych przypadkach) do glukozo-6-fosforanu z wytworzeniem trehalozo-6-fosforanu i UDP. Reakcja jest katalizowana przez syntazę trehalozy-P . Organizmy, które używają tego szlaku, zwykle mają również fosfatazę trehalozy-P, która przekształca trehalozę-P w wolną trehalozę (Mitsumasu 2010). Ta reakcja została po raz pierwszy opisana w drożdżach (Cabib i Leloir 1958). Drugi szlak, który opisano w kilku niezwykłych bakteriach, obejmuje konwersję maltooligosacharydów lub skrobi do trehalozy.

Innym ważnym enzymem w metabolizmie trehalozy jest trehalaza (T), która może uczestniczyć w metabolizmie energetycznym, a także pełni regulacyjną rolę w kontrolowaniu poziomu trehalozy w komórkach. Po raz pierwszy trehalazę zaobserwowano w *Aspergillus niger* (Bourquelot 1893). Ponieważ wysokie stężenia trehalozy mogą powodować problemy z osmolarnością, hamować kluczowe reakcje metaboliczne lub być toksyczne w inny sposób, trehalaza może mieć istotne znaczenie w regulowaniu poziomu trehalozy w komórce. Poziomy trehalozy są znacznie zwiększone w komórkach, gdy są wystawione na różne stresy środowiskowe. Dlatego w niektórych przypadkach trehalaza może odgrywać rolę w usuwaniu trehalozy i przywróceniu komórki do homeostazy po zakończeniu stresu. Trehalaza była opisywana u wielu innych organizmów w królestwie roślin i zwierząt (Elbein1974). Co ciekawe, w przeciwieństwie do innych enzymów metabolizmu trehalozy, trehalazę można

znaleźć również u ssaków zarówno w błonach rąbka szczoteczkowego (wchłaniającego) nerek (Yonemaya, Lever 1987), jak i w błonach kosmówkowych jelit (Dahlqvist 1968). Rola trehalazy w nerkach nadal nie jest jasna. Jednakże w jelicie enzym ten hydrolizuje spożytą trehalozę. Osoby z defektem w swojej trehalazie jelitowej mają biegunkę podczas jedzenia pokarmów o wysokiej zawartości trehalozy (Ruf i in. 1990).

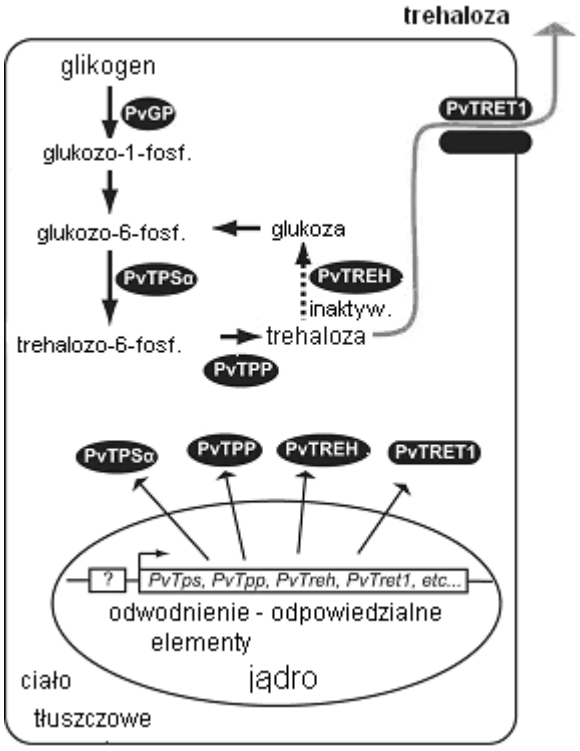
1.1.5.2. Trehaloza, a stan anhydrobiozy

Zaobserwowano, że synteza trehalozy odgrywa ważną rolę w procesie anhydrobiozy. Trehaloza chroni białka i błony przed uszkodzeniem w wyniku odwodnienia poprzez mechanizmy opisane przez trzy hipotezy: „wymiany wody", „witryfikacji" i „uwięzienia wody" (Crowe 2007). Pierwsza hipoteza objaśnia, że trehaloza zamiast wody tworzy wiązania wodorowe zarówno wewnątrz jak i na zewnątrz odwodnionych fosfolipidowych, dwuwarstwowych błon w celu utrzymania ich integralności (Crowe i in. 1987; Crowe, Crowe 1988; Crowe Hoekstra, Crowe 1992; Crowe 2002). Druga przewiduje, że powstawanie wewnątrzkomórkowej formacji szklistej trehalozy, spowodowane przez odwodnienie, chroni biocząsteczki przez ograniczenie ich mobilności i zmniejszenie prawdopodobieństwa oddziaływania chemicznego i fizycznego (Green, Angell 1989; Franks, Hatley, Mathias 1991; Crowe 1998; Crowe, Carpenter, Crowe 1998; Clegg 2001; Sakurai i in. 2008). W konsekwencji, chroni komórki przed zapaścią poprzez napełnienie przestrzeni pierwotnie zajmowanej przez wodę (Koster 1991; Kanias, Acker 2006). Trzecia hipoteza sugeruje, że trehaloza zatrzymuje cienką warstwę wody na powierzchni białka, aby zapobiec denaturacji związanej z desykacją (Belton, Gil 1994; Cottone, Ciccotti, Cordone 2002; Lins, Pereira, Hunenberger 2004). Ponadto trehaloza tworzy stabilny kompleks z jednym ze składników fosfolipidów obecnych w komórkowych membranach, który chroni przed samoutlenianiem błon komórkowych wywołanym przez stresy środowiskowe (Watanabe i in. 2003). Jest rozłożona równomiernie w tkankach i komórkach larw, ponieważ należy chronić wszystkie wewnątrz i zewnątrzkomórkowe biomolekuły przed szkodliwymi naprężeniami tak, aby larwy mogły ożywić się bez zmian fizjologicznych. Założenie to oznacza, że trehaloza może przenikać przez błony komórkowe. Hipotezy wyjaśniające, w jaki sposób komórki są chronione podczas odwadniania, wymiany wody za pomocą zgodnych substancji rozpuszczonych i nitryfikacji, są wzajemnie zgodne.

Różnicowe pomiary kalorymetrii skaningowej (DSC) i analizy w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR) wykazały, że larwy anhydrobiotyczne mogą być w stanie szklistym aż do 65°C, natomiast w przypadku larw poddanych reżimowi szybkiego

odwadniania nie zaobserwowano zmian stanów. W przyrodzie, larwy *P. vanderplanki* potrafią przetrwać 8 miesięcy podczas suchej pory roku w wyschniętym błocie na skałach, pomimo tego, że temperatury powierzchni skał mogą osiągać 60°C w południe, co jest zgodne z uzyskanymi wynikami badań. Gdy wysuszone larwy anhydrobiotyczne zostały poddane obróbce cieplnej lub wilgotnej, stan szklisty zmienił się na stan gumowaty, ich zdolność do regeneracji po nawodnieniu uległa znacznemu zmniejszeniu.

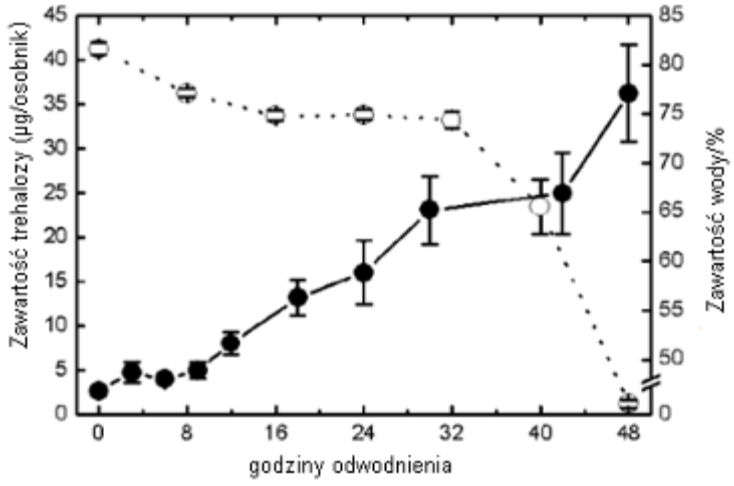
U owadów trehaloza jest wytwarzana w komórkach tkanki tłuszczowej i odprowadzana do hemolimfy (Watanabe i in. 2005), a następnie przepływa przez całe ciało, co wskazuje, że przechodzi przez błony komórek tkanki tłuszczowej (Ryc. 7). Niemniej, dwuwarstwy fosfolipidowe, podstawowe jednostki strukturalne błon komórkowych, są zasadniczo nieprzepuszczalne dla większości rozpuszczalnych w wodzie cząsteczek, takich jak jony, aminokwasy i węglowodany, w tym dla trehalozy (Kikawada i in. 2007). U larw *P. vanderplanki* w przenikaniu trehalozy w poprzek błony komórkowej pośredniczą transportery, którymi są białka błonowe. U tej ochotki dominującym transporterem jest tzw. TRET1 (ang. *Trehalose transporter)*. Ekspresja TRET1 indukuje się przez stres wysychania i dominuje w ciele tłuszczowym. Występuje ona równocześnie z gromadzeniem się trehalozy (Kikawada i in. 2005), co wskazuje, że TRET1 bierze udział w transportowaniu cukru zsyntetyzowanego w ciele tłuszczowym do hemolimfy. TRET1 jest transporterem specyficznym, kierunek transportu jest odwracalny w zależności od gradientu stężenia trehalozy. W odwodnionym organizmie rozmieszczenie zeszklonej już trehalozy jest również równomierne w celu stabilizacji struktury biocząsteczek. Jednocześnie cukier ten utrzymuje błony w stanie ciekłokrystalicznym poprzez wiązanie bezpośrednio do membrany. Stwierdzono, że TRET1 funkcjonuje również w komórkach ssaczych (Eroglu 2000). Te charakterystyczne cechy sugerują, że TRET1 w połączeniu z trehalozą ma duży potencjał do podstawowych i praktycznych zastosowań in vivo.



Rycina 7. Uproszczony schemat struktury komórki ciała tłuszczowego larwy *Polypedilum vanderplanki* inicjującej syntezę trehalozy podczas indukcji anhydrobiozy; wg Cornette i Kikawada (2011)

Jak już wcześniej wspomniano, podczas procesu odwadniania larwy gromadzą duże ilości trehalozy, która zapewnia skuteczną ochronę przed wysuszeniem ze względu na wysoką zdolność do wymiany wody i witryfikacji. W trakcie trwania procesu wykazano więc odwrotnie proporcjonalną zależność ilości cukru w stosunku do zawartości wody w organizmie (Ryc. 8), dlatego też zmiany osmolarności w ciele są uważane za sygnał do syntezy trehalozy. Rzeczywiście, narażenie na wysokie zasolenie powoduje szybką i skuteczną akumulację trehalozy, nawet bez potrzeby dehydratacji. Ponieważ ta szybka produkcja występuje głównie w wysokich stężeniach roztworów soli, dochodzimy do wniosku, że wzrost wewnętrznego stężenia jonów powoduje syntezę trehalozy związaną z kryptozbiozą u tego gatunku (Watanabe i in. 2003). Jednak podczas eksperymentu w trakcie, którego wkładano larwy m.in. do jednoprocentowego roztworu NaCl wykazano, że jednodniowa inkubacja w wysokich stężeniach roztworu soli wyzwoliła skuteczną syntezę trehalozy, ale wszystkie larwy natychmiast lub po kolejnym wysuszeniu przestały żyć (Watanabe i in. 2003). Jednym z powodów śmierci larw może być stres związany z szokiem osmotycznym i/lub przedostawaniem się jonów do organizmu. Naprężenia jonowe często mają szkodliwy wpływ na organizmy poprzez mylenie różnych stanów i funkcji

fizjologicznych (Hasegawa i wsp. 2000). Drugim wyjaśnieniem może być to, że nagromadzenie trehalozy nie jest jedynym istotnym czynnikiem niezbędnym do udanej anhydrobiozy. Rzeczywiście, dodatkowe, nieznane krytyczne czynniki i mechanizmy są często potrzebne do pomyślnej indukcji kryptobiozy (Crowe 2002, Oliver i wsp. 2002). Tę hipotezę potwierdza fakt, że larwy po dekapitacji poddane anhydratacji syntezują o połowę mniej trehalozy niż larwy zdrowe, a pomimo tego następuje u nich udana kryptobioza (Watanabe i in. 2002). Wskazuje to na udział dodatkowego czynnika (lub czynników), który wyzwala wybuchową syntezę trehalozy podczas suszenia. Czynnik ten jednak pozostaje nadal nieznany.



Rycina 8. Zmiany ilości wody i trehalozy w ciele larwy *Polypedilum vanderplanki* podczas procesu desykacji trwającego 48 godzin: linie ciągłe z wypełnionymi symbolami - zawartość trehalozy; linie przerywane z otwartymi symbolami - zawartość wody; wg Watanabe i in. (2003)

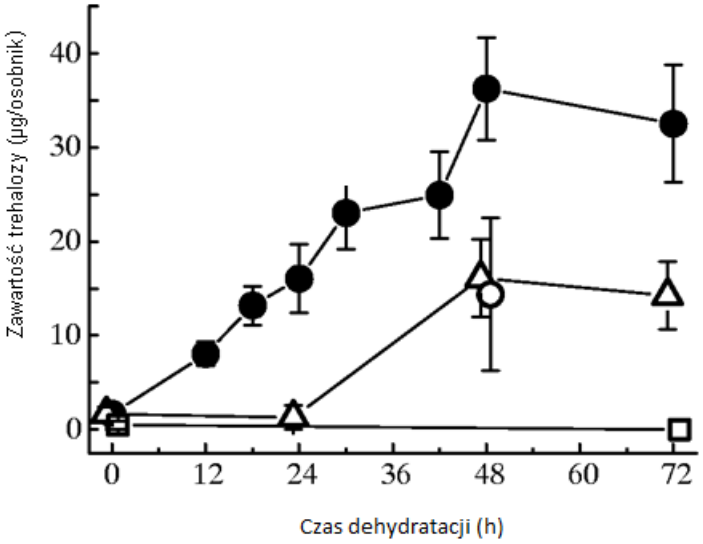
Chociaż trehaloza może być jednym z kluczowych składników powstawania wewnątrzkomórkowego szkła w powoli osuszanych larwach, na jego stan fizyczny mogą mieć wpływ inne składniki. Jeśli bezwodna, zeszklona trehaloza, bez dodatków, jest wystawiona na działanie wilgoci względnej powyżej 44%, przekształca się w dihydrat i krystalizuje (Iglesias i in. 1997). Pomiary dyfrakcji rentgenowskiej nie wykryły tworzenia się kryształów w wolno suszonych larwach, nawet po ekspozycji na wyższą wilgotność względną. Wskazuje to, że krystalizacja trehalozy była utrudniona przez obecność substancji rozpuszczających cytoplazmy, takich jak białka (Imamura i in. 1998). Nie uzyskano dowodów na to, że białka ulegają witryfikacji, podczas anhydrobiozy. Jednak nie można też

wykluczyć możliwości, że wysoce hydrofilowe białka LEA mogą być współodpowiedzialne za wewnątrzkomórkowe stany szkliste u larw *P. vanderplanki* (Kikawada i in. 2006).

1.1.6. Niezależność indukcji anhydrobiozy od centralnego układu nerwowego

Wiele owadów żyjących w klimacie umiarkowanym zamiast w anhydrobiozę wchodzi w odrętwienie lub diapauzę w różnych stadiach rozwojowych, aby przetrwać niekorzystne warunki (Keilin 1959). Chociaż mechanizmy dokrewne regulujące larwalną, poczwarkową i imaginalną diapauzę różnią się, mózg i zwoje brzuszne są ogólnymi regulatorami diapauzy (Denlinger 1985).

W celu odkrycia, czy zwoje mózgowe regulują indukcję anhydrobiozy u larw *P. vanderplanki* przeprowadzono eksperyment. Poddano wysuszaniu i ponownej rehydratacji larwy w stanie nienaruszonym z larwami po dekapitacji oraz usunięciu zwojów mózgowych, podprzełykowych – SG i zwoju piersiowego – TG (Watanabe i in. 2002). Wszystkie osobniki były przesuszane przy użyciu metody 2-dniowej (wolnej desykacji). Podczas suszenia larwy tej muchówki szybko gromadziły dużą ilość trehalozy (18% suchej masy ciała). Sugeruje to, że wysoki poziom akumulacji disacharydu przyczynił się do udanej indukcji kryptobiozy. Podczas suszenia osobniki uszkodzone również gromadziły trehalozę, chociaż o połowę mniej w porównaniu z nieuszkodzonymi (Ryc. 10). W trakcie odwadniania kolor czerwony stał się bardziej intensywny w przednich i tylnych częściach ciała. Wskazuje to, że woda z ciała ewaporuje głównie poprzez otwór gębowy i odbytowy. Nawodnionie larwy są jednorodnie czerwone ze względu na równomierne rozmieszczenie hemoglobiny w hemolimfie. Larwy pozbawione zwojów mózgowych, podprzełykowych i piersiowych po ponownej rehydratacji były w stanie poruszać się nawet przez 2 tygodnie. U larw uszkodzonych czas rehydratacji był jednak dłuższy. Stwierdzono, że wymienione zwoje nie wpływają na indukcję i zakończenie kryptobiozy. Jednakże w indukcji nie można wyeliminować możliwości zaangażowania zwojów odwłokowych (AG), ponieważ ośrodkowy układ nerwowy owadów składa się ze sparowanego segmentowego zwoju, w tym mózgu, SG, TG i AG. Wyizolowana tkanka tłuszczowa, czyli główne miejsce produkcji trehalozy, może być zachowana w stanie suchym w temperaturze pokojowej przez okres ponad 18 miesięcy w żywej formie (Watanabe i in. 2005). W związku z tym centralny układ nerwowy z pewnością nie bierze udziału w indukcji anhydrobiozy, nawet w tak złożonym organizmie wielokomórkowym.



Rycina 9. Zmiany ilości trehalozy w ciele larwy *Polypedilum vanderplanki* w różnych warunkach morfologicznych podczas dehydratacji: pełne koła - larwa zdrowa, nieuszkodzona; puste trójkąty – larwa tylko bez zwojów mózgowych; puste koła – larwa bez zwojów mózgowych, zwoji podgardzielowego i przedtułowiowego; puste kwadraty - larwa uwodniona po dekapitacji; wg Watanabe i in. (2002), zmienione

1.1.7. Odpowiedź na stres oksydacyjny i antyoksydanty

Podczas wchodzenia w stan wysuszenia, larwy wytwarzają enzymy przeciwutleniające oraz różne związki chemiczne, w celu złagodzenia stresu oksydacyjnego związanego z odwodnieniem komórek. Stres oksydacyjny decyduje o pozytywnym przejściu w stan anhydrobiozy, gdyż w czasie jego trwania wytwarzane są reaktywne formy tlenu, które mogą prowadzić do peroksydacji lipidów błonowych, karbonylowania białek oraz uszkodzenia DNA (Franca i in. 2007). Wykazano, że geny odpowiedzialne za reakcje na stres oksydacyjny były silnie regulowane w górę w trakcie desykacji, a względna aktywność antyoksydacyjna również się zwiększyła (Gusev i in. 2010).

Larwy oczyszczają organizm z reaktywnych form tlenu dzięki dysmutazie ponadtlenkowej oraz katalazie. Dysmutaza ponadtlenkowa przekształca wolne rodniki tlenowe w nadtlenek wodoru, który następnie zostanie zredukowany do wody przez katalazę. Wytwarzane przez larwy przeciwutleniacze minimalizują uszkodzenia komórek. Kolejny układ przeciwutleniający stanowi szlak glutationowy. Peroksydaza glutationowa jest angażowana w redukcję nadtlenków lipidów z błon komórkowych i detoksykację nadtlenku wodoru (Denekamp i in. 2009). Mitochondrialna tioredoksyna była najsilniej regulowanym antyutleniaczem. Mitochondria stanowią główne miejsce produkcji reaktywnych form tlenu, które może usuwać zredukowana tioredoksyna jednocześnie chroniąc białka przed

utlenianiem (Corona, Robinson 2006). Wytwarzanie różnych przeciwutleniaczy wydaje się kluczowe w minimalizowaniu uszkodzeń oksydacyjnych cząsteczek biologicznych.

1.1.8. Białka szoku cieplnego (HSP)

Do tej pory wyizolowano kilka białek odpowiedzialnych za tolerancję wysychania. Białka opiekuńcze (czaperony) są jednym z reprezentatywnych przykładów. Najbardziej znanymi białkami opiekuńczymi są białka szoku cieplnego (HSP ang. *Heat shock proteins*), których rodzina obejmuje HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 i małe HSP (sHSP), klasyfikowane zgodnie z ich masą cząsteczkową (Vierling 1997, Narberhaus 2002). W szczególności, sHSP mają monomeryczną masę cząsteczkową 15-42 kDa, ale łączą się w oligomery od dziewięciu do ponad 30 podjednostek (Vierling 1997). Funkcje HSP są podobne u wszystkich organizmów żywych. Działają one jako białka opiekuńcze odpowiedzialne za prawidłowe zwijanie się innych białek, ich oligomeryzację, translokację oraz degradację (Bhutani, Udgaonka 2002). Ich sekwencja aminokwasowa jest silnie konserwatywna.

Zauważono, że ekspresja niektórych białek szoku cieplnego u larw *P. vanderplanki* (Pv-hsp90, Pv-hsp70, Pv-hsc70 i Pv-hsp60) była znacząco podwyższona w czasie wprowadzania ich w stan anhydrobiozy. W szczególności, indukowane przez desykację sHSP (Pv-hsp20 i Pv-p23) mogą przyczyniać się do witryfikacji larw (Gusev i in. 2011). Tak więc, HSP prawdopodobnie nadają organizmowi odporność na wysuszanie poprzez zapobieganie denaturacji białek i ponowne fałdowanie zdenaturowanych białek. Występują one zarówno u organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych, w tym nie tylko u tych odpornych na desykację, ale także w innych organizmach wrażliwych na utratę wody, np. u ludzi. W związku z tym, HSP przyczyniają się do utrzymania integralności białka w ogóle, ale niektóre z nich, takie jak sHSP, wydają się być w szczególności związane z tolerancją na osuszanie.

1.1.9. Silnie hydrofilowe białka LEA

W odpowiedzi na stres odwodnieniowy duży udział mają też silnie hydrofilowe białka LEA (ang. *Late-embryogenesis abundant proteins*) wytwarzane podczas późnej embriogenezy roślin (Galau, Dure 1981, Gaubin i in. 1983). Zapewniają one odporność na wysuszenie nasionom. Białka LEA zostały również wykryte w ciele wysuszonej larwy. Wyróżnia się trzy ich główne grupy (od 1 do 3) w oparciu o strukturę i wzorzec ekspresji (Cuming 1999). W szczególności w grupie 3 stwierdzono białka u wielu organizmów wykazujących tolerancję na utratę wody. Co ciekawe, grupa ta wykazuje niezwykłą cechę strukturalną, którą jest przejście

od natywnej struktury cewki w roztworze do struktury alfa helisy, mogącej tworzyć stowarzyszenia w zwojach cewki, w stanie wysuszenia.

Białka LEA mogą działać jako osłona molekularna podczas odwodnienia (Goyal i in. 2005). Analizy obliczeniowe sugerują, że grupa 3 białek LEA może pełnić potencjalne funkcje akceptora jonów do ochrony innych białek przed wysoleniem i mieć udział we wzmocnieniu wytrzymałości mechanicznej odwodnionych komórek poprzez wytwarzanie nitkowatych struktur związanych z cytoszkieletem.

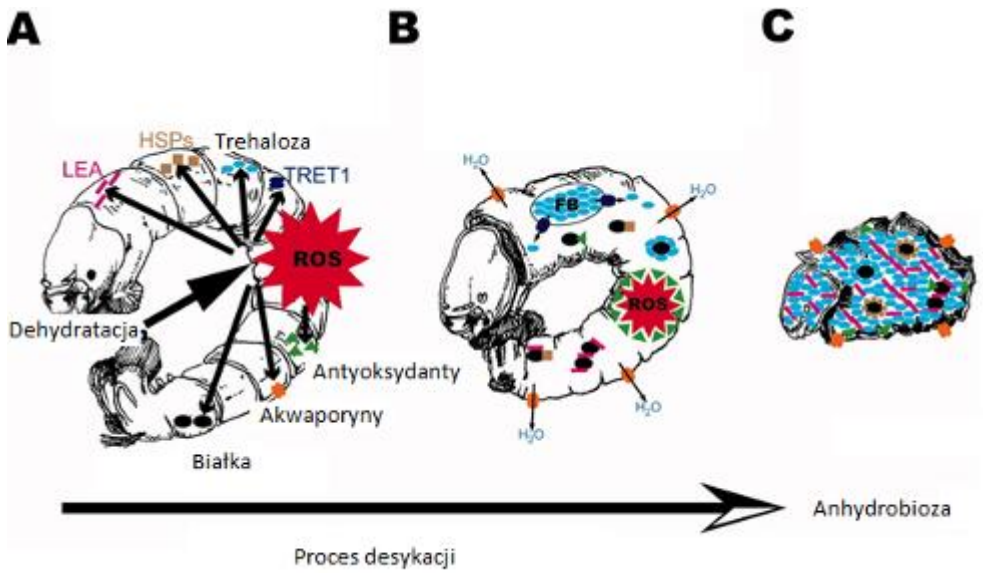
Funkcje te mogą zapewniać komórkom, jak i nawet całym organizmom, tolerancję na wysuszenie. U larw *P. vanderplanki* występuje najsilniejsza ekspresja genów kodujących właśnie białka LEA w czasie ich dehydratacji. Transkrypty odpowiadające białkom LEA stanowiły do 12% całkowitej ekspresji genów po 12 godzinach od chwili rozpoczęcia procesu desykacji. Sugeruje to, że są one niezbędne dla skutecznej anhydrobiozy (Cornette 2010). Białka LEA również aktywnie uczestniczą w procesie witryfikacji, tworząc nie tylko same „szkliwo", ale także stabilizując trehalozę i tworząc szklistą matrycę, która chroni cząsteczki biologiczne i integralność strukturalną larw podczas wysuszania (Shimizu 2010). Ponieważ białka LEA są szeroko rozpowszechnione w organizmach tolerujących wysuszenie, mechanizm zwalczania stresu odwodnienia jest wspólny dla zwierząt, roślin i mikroorganizmów.

1.1.10. Akwaporyny - specyficzne kanały wodne

Ostatnim ważnym czynnikiem przyspieszającym odwodnienie są specyficzne kanały wodne, zwane akwaporynami (AQP). Woda powoli przenika przez dwuwarstwę fosfolipidową błony komórkowej poprzez zwykłą dyfuzję. Jednakże akwaporyny, dzięki pasywnemu transportowi kanałowemu dla wody, ułatwiają proces przenikania. AQP odgrywają nieodłączną rolę w fizjologicznych ruchach wody w organizmie. Na przykład, u rośliny *Graptopetalum paraguayense*, stosującej strategię unikania desykacji, poziom ekspresji AQP jest względnie bardzo niski podczas odwadniania. Wobec czego, przepuszczalność wody w błonach plazmatycznych i tonoplastach komórek liści tej rośliny jest też bardzo niska (Ohshima i in. 2001). Z kolei, roślina *Craterostigma plantagineum,* tolerująca wysychanie, zwiększa ekspresję AQP podczas desykacji, co może być wymagane do kontrolowania wypływu wody podczas odwadniania i jej pobierania w trakcie nawadniania (Mariaux i in. 1998). Prawdopodobnie oba te gatunki kontrolują przepuszczalność wody na

poziomie komórkowym organizmu poprzez regulację ekspresji AQP w inny sposób, aby stawić czoła stresowi desykacji przy pomocy przeciwstawnych strategii.

Białka kanałowe larw *P. vanderplanki* wykazały tendencję do przepuszczania wody i zatrzymywania glicerolu. Wyróżnia się szczególnie białko PvAQP1 (wszechobecne) odpowiedzialne za odprowadzenie całej zawartości wody z organizmu podczas procesu anhydrobiozy, oraz białko PvAQP2 (specyficzne dla tkanki tłuszczowej), odpowiedzialne za sterowanie gospodarką wodną komórek tłuszczowych w korzystnych warunkach naturalnych (Kikawada i in. 2008). Ekspresja PvAQP1 i budowa cylindrycznych osłonek najprawdopodobniej początkowo regulują odwodnienie z opóźnieniem prędkości dehydratacji i przyspieszanie utraty wody w ostatnim etapie desykacji w celu udanej indukcji anhydrobiozy u *P. vanderplanki* (Watanabe i in. 2003).

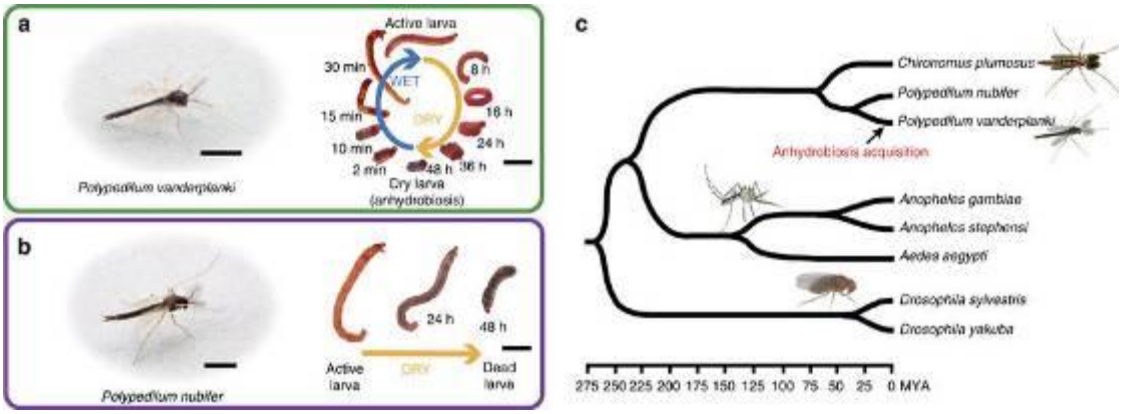


Rycina 10. Główne przemiany zachodzące w ciele larwy *Polypedilum vanderplanki* podczas procesu desykacji: A – stres dehydratacyjny i oksydacyjny (ROS) oraz ekspresja genów indukujących anhydrobiozę; B – przyspieszona utarta wody (AQP1), aktywacja systemu antyoksydacyjnego, antyagregacja białek, ponowne fałdowanie białek przy udziale HSP; C – antyagregacja małych białek, witryfikacja trehalozy i białek LEA; wg Cornette i Kikawada (2011)

1.1.11. Porównanie genomów *Polypedium vanderplanki* i wrażliwego na desykację *Polypedilum nubifer*

Kolejnym krokiem w kierunku lepszego zrozumienia tła molekularnego udanej tolerancji wysychania są badania przesiewowe całego genomu pod kątem cech związanych z anhydrobiozą (Li i in. 2012; Marunde i in. 2013). Blisko spokrewniony z *P. vanderplanki*

gatunek z tego samego rodzaju - *Polypedilum nubifer* (Skuse, 1889) jest wrażliwy na wysychanie (Ryc. 11). Porównano genomy obu gatunków ochotek w celu rozszyfrowania tła genetycznego anhydrobiozy. W rezultacie udało się zidentyfikować kilka grup genów mających wpływ na indukcję anhydrobiozy. Natura siedlisk *P. vanderplanki*, słaba zdolność do latania i silna presja selekcyjna ze względu na długi okres suszy, ułatwiły mikroewolucyjne wzorce tego gatunku. Inną możliwością jest nieadaptacyjne pochodzenie genetyczne obserwowanych zmian w genomie *P. vanderplanki*.



Rycina 11. Cykl anhydrobiotyczny (a) i drzewo filogenetyczne ochotki afrykańskiej, *Polypedilum vanderplanki* (c) oraz „łagodne" wysuszanie *P. nubifer*: a) dorosły samiec (po lewej) i cykl anhydrobiotyczny larwy (po prawej); b) dorosły samiec (po lewej) i „łagodne" wysuszanie larw *P. nubifer*; podobnie jak inne ochotki, ale nie mogą przejść do stanu anhydrobiozy (po prawej); skala – dł. paska 2 mm; c) drzewo filogenetyczne ukazujące pokrewieństwo genetyczne pomiędzy *P. vanderplanki* i *P. nubifer* oraz innymi taksonami muchówek (Diptera); czas ewolucji poszczególnych gatunków podany w milionach lat (MYA), wg Gusev i in. 2014

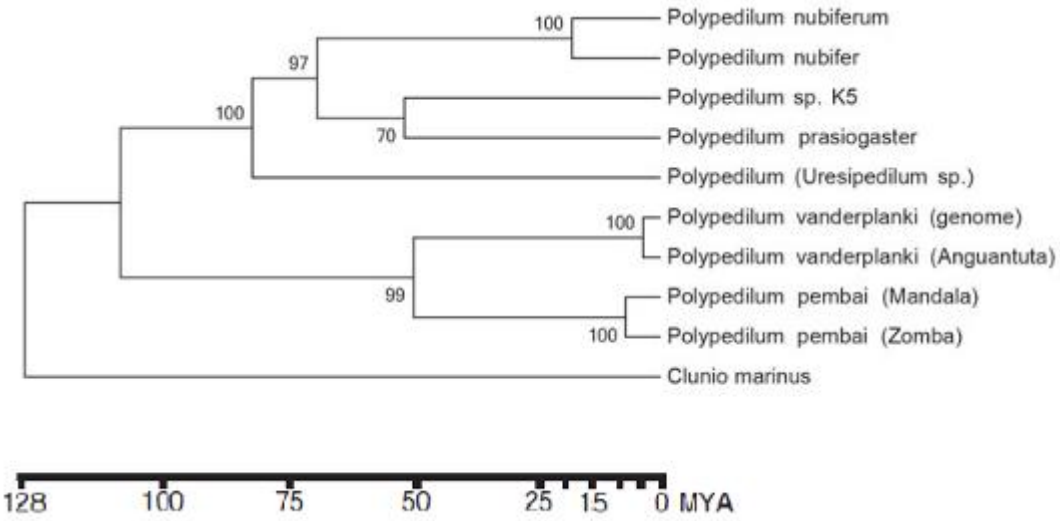
Profil transkrypcji całego genomu różni się między dwoma gatunkami ochotek w warunkach desykacji. W sytuacjach bezstresowych pierwotne rozmieszczenie domen u *P. vanderplanki* i *P. nubifer* jest podobne. Jednak w procesie desykacji obserwuje się u *P. vanderplanki* podwyższenie ekspresji genów. Zauważono, że w wielu przypadkach geny kodujące specyficzne dla desykacji mRNA u *P. vanderplanki* znajdują się w zwartych klastrach w genomie. Zdefiniowano specyficzne obszary genomowe, w których te zestawy genów są zlokalizowane jako "wyspy genowe związane z anhydrobiozą" (ARId) (Suetsugu i in. 2013). Genom *P. vanderplanki* zawiera co najmniej dziewięć potencjalnych wysp genowych. Przeciwnie, genom *P. nubifer* nie zawiera regionów odpowiadających kryteriom ARId (Gusev i in. 2014). Pokazano również, że u *P. vanderplanki* nagromadzenie trehalozy

podczas wystąpienia anhydrobiozy jest mediowane, nie przez specjalny zestaw genów, ale raczej przez ewolucję mechanizmów kontroli ekspresji genów reagujących na wysuszenie.

1.1.12. Porównanie anhydrobiotycznych larw *P. vanderplanki* i *Polypedilum pembai*

Do niedawna *P. vanderplanki* był jedynym gatunkiem spośród wszystkich owadów wykazującym zdolność do przeżycia w prawie całkowitej dehydratacji. W 2017 roku zespół naukowców udowodnił, że pokrewny gatunek *Polypedilum pemba* pochodzący z Malawi, jest także anhydrobiotyczny i że jego mechanizm tolerancji desykacji jest prawdopodobnie podobny do obserwowanego u *P. vanderplanki* (Cornette i in. 2017).

Osobniki do badań były zbierane w Nigerii i Malawi. Jedna z populacji nigeryjskich była naturalna (z Anguantuta), natomiast druga była szczepem wysoce wsobnym, pochodzącym z różnych populacji osobników pierwotnie złowionych w pobliżu stanowisk, z których Hinton pozyskiwał ochotki. Następnie były one hodowane w w laboratorium w Japonii. Z tej samej próby, z hodowli laboratoryjnej, pochodzą larwy ochotek będące przedmiotem niniejszych badań. Dla porównania, osobniki z populacji z Malawi (okolice Bunda koło Mandali i Bwailain Zomba) były naturalne. Analiza filogenetyczna wykazała, że oba gatunki są blisko spokrewnione. Sugeruje to, że anhydrobioza wyewoluowała tylko raz u ich wspólnego przodka około 49 milionów lat temu, przed rozdzieleniem się obu gatunków. W analizie genetycznej stwierdzono również czasy radiacji wynoszące około 3,3 (4,1 do 2,6) miliona lat pomiędzy linią wsobną *P. vanderplanki* NIAS, a populacją z Anguantuta i około 6,5 (8,2 do 4,8) mln lat między populacjami *P. pembai* (Cornette i in. 2017). Drzewo filogenetyczne prezentujące wyniki tych badań zaprezentowano na Rycinie 12. Dane dotyczące sekwencji DNA wykazały, że szczep laboratoryjny i próbki zbierane przez Hintona były identyczne. W konsekwencji, kariotyp przedstawiony dla populacji z Nigerii powinien być uznany za referencyjny dla *P. vanderplanki*. Kariotypowe porównanie obu gatunków wykazało znaczne różnice.



Rycina 12. Pokrewieństwa filogenetyczne pomiędzy *Polypedilum vanderplanki* i innymi taksonami w obrębie rodzaju *Polypedilum*: pod drzewem filogenetycznym skala czasowa (w milionach lat, MYA) ewolucji poszczególnych taksonów; wg Cornette i in. (2017)

Analiza chromosomów politenicznych wykazała, że diploidalna liczba chromosomów (2n = 8) była identyczna dla obu gatunków (Petrova i in. 2015), a jednocześnie taka sama jak u innych owadów z rodzaju *Polypedilum*, które pod tym kątem badano (Tavcar 1967, Porter i Martin 1977, Petrova i wsp. 1981, Kiknadze i wsp. 1991, Gavrikova i Belyanina 1993, Kerkis i wsp. 1996, Michailova 1989). Zaobserwowano jednak znaczne różnice cytogenetyczne w sekwencjach pasmowych chromosomów olbrzymich oraz w liczbie i rozmieszczeniu regionów aktywnych (Petrova i in. 2015). Gatunki wykazują też pewne różnice pod względem morfologicznym i fizjologicznym.

Pomimo tych różnic stwierdzono, że przy około 4% resztkowej zawartości wody w suchej postaci larwy *P. pembai,* można uznać za gatunek anhydrobiotyczny (Cornette i in. 2017). Larwy tego gatunku charakteryzują się wysokimi wartościami wskaźnika przeżywalności po rehydratacji, podobnie jak badane larwy *P. vanderplanki,* które po 2 latach przetrzymywania w eksykatorze wykazały normalną aktywność po rehydratacji. Odwadniane larwy *P. pembai* gromadziły także trehalozę, której ilość wzrastała dziesięciokrotnie w stosunku do poziomu początkowego, prawie dwukrotnie więcej niż u *P. vanderplanki* (Cornette i in. 2017). Można zatem założyć, że larwy *P. pembai* osiągają anhydrobiozę poprzez podobny mechanizm do larw *P. vanderplanki.*

Niedawno opisano nowy gatunek ochotek *Polypedilum ovahimba* pochodzący z Namibii (Cranston, 2014). Jednakże możliwe jest, że larwy tej muchówki przetrwały porę suchą, unikając nadmiernego odwodnienia w kokonie, bez osiągnięcia ametabolicznego stanu anhydrobiozy. Gatunek *P. dewulfi* z zachodniej Nigerii został opisany również jako

tolerancyjny na wysuszanie (Miller 1969). Jednakże jego identyfikacja wydaje się niepewna ze względu na słabą terminologię dostępną w tym czasie (Hinton 1951, Freeman 1958). Przyszłe genomiki porównawcze różnych populacji *P. vanderplanki* i *P. pembai*, a także spokrewnionych gatunków, mogą pomóc potwierdzić ewolucyjny scenariusz anhydrobiozy oraz pokazać, czy jest ona izolowanym zdarzeniem wśród wszystkich owadów, czy też zjawisko to ewoluowało niezależnie.

1.2. Woda w układach biologicznych

Woda jest jedną z najpospolitszych substancji występujących na Ziemi, jednak nadal nie wiadomo skąd wzięła się w takiej ilości na błękitnej planecie. Odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu organizmów żywych, a jej niedobór zwykle oznacza śmierć lub poważne uszkodzenie. Z biologicznego punktu widzenia ma wiele właściwości kluczowych dla rozprzestrzeniania się życia, które odróżniają ją od innych substancji.

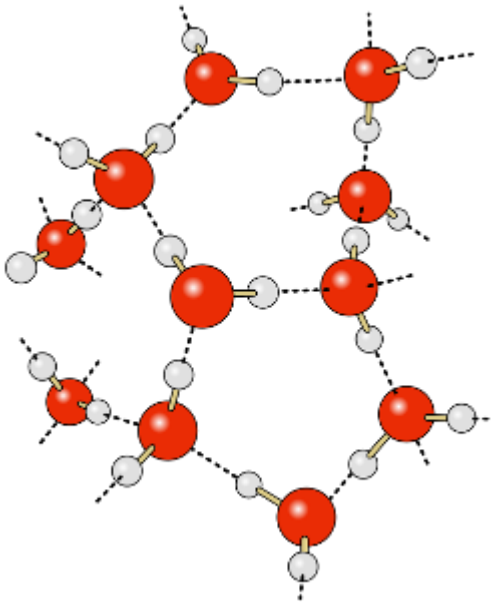
Już w czasach Homera woda była bardzo ważnym elementem łączącym ludzi i bogów (De Santo i in. 2009).

Arystoteles w „Metafizyce" pisze, że Tales twierdził, że „naturą jest woda". Prawdopodobnie stąd uważał, że Ziemia unosi się na wodzie. Ten swoisty pogląd o wodzie jako naturze opierał prawdopodobnie na spostrzeżeniu, że pokarm, jakim żywią się wszelkie jestestwa, jest wilgotny i że z wilgotnego powstaje samo ciepło, dzięki czemu ono żyje. Gdyż „zasadą każdej powstającej rzeczy jest to, z czego ona powstaje" (Arystoteles). Dopiero w XVIII wieku Henry Cavendish wykazał, że woda składa się z tlenu i wodoru (West 2004). Pierwszego rozkładu wody na wodór i tlen poprzez elektrolizę dokonali w 1800 roku William Nicholson i Anthony Carlisle (Russel 2003). Z kolei w 1805 roku Joseph Louis Gay-Lussac i Alexander von Humboldt odkryli, że woda składa się z dwóch części wodoru i jednej części tlenu (Gay-Lussac, von Humboldt 1805).

Istnieje kilka izotopów wodoru i tlenu, co prowadzi do powstania kilku znanych izotopów wody. Naturalnie występująca woda składa się niemal całkowicie z neutronowego izotopu wodoru i właśnie ona będzie w dalszej części nazywana wodą. Tylko 155 ppm to tzw. ciężka woda zawierająca deuter (^{2}H lub D), izotop wodoru z jednym neutronem. Z kolei tryt (^{3}H lub T), który ma dwa neutrony, ma w swoim składzie mniej niż 20 części na kwintillion. Tlen ma również trzy stabilne izotopy : ^{16}O (stanowi ponad 99% tlenu naturalnego), ^{17}O oraz ^{18}O. Wszystkie izotopy wody wykazują między sobą znaczne różnice we właściwościach fizykochemicznych.

1.2.1. Molekuła wody

Sumaryczny wzór chemiczny cząteczki wody został opisany jako H_2O. Jest to tetraedr o hybrydyzacji sp^3, zawierający jeden atom tlenu i dwa atomy wodoru połączone wiązaniami kowalencyjnymi spolaryzowanymi. Energia takiego wiązania wynosi około 420 kJ/mol. Ponieważ atom tlenu ma wyższą elektroujemność niż atomy wodoru, jest to cząsteczka polarna z elektrycznym momentem dipolowym. Atom tlenu przenosi niewielki ładunek ujemny, podczas gdy atomy wodoru są nieznacznie dodatnie. Cząsteczki wody są nieliniowe, a wiązania H–O są silnie spolaryzowane. Kąt między wiązaniami wodór-tlen-wodór (H—O—H) w fazie ciekłej jest pośredni między geometrią czworościenną a kątem płaskiego pięciokąta i wynosi 104.48°.



Rycina 13. Struktura agregatów cząsteczek wody: czerwone kule – tlen, szare kule – wodór; wg Hoy i Bunker (1979)

Cząsteczka wody w stanie ciekłym lub stałym może tworzyć do czterech wiązań wodorowych z sąsiednimi cząsteczkami. Siła przyciągania między cząsteczkami wody jest określona przez wysoką energię zawartą w wiązaniu OH wynoszącą 5,5 Kcal/mol i interakcję Van der Waalsa (Tabor i in. 2011). Z powodu wiązania wodorowego cząsteczki stale poruszają się względem siebie, a wiązania wodorowe nieustannie pękają i reformują się w skali czasowej szybciej niż 200 femtosekund (Smith i in. 2005). Wiązania te są przyczyną wysokiego napięcia powierzchniowego wody (Campbell i in. 2006) i sił kapilarnych. Wiązania wodorowe są również przyczyną znacznie wyższych temperatur topnienia i wrzenia

wody oraz ciepła właściwego wody, niż w przypadku innych analogicznych związków, takich jak np. siarkowodór (H_2S). Ta sytuacja wyjaśnia paradoks, że woda znajduje się w stanie ciekłym w szerokim zakresie temperatur sprzyjających procesom fizjologicznym, a nie jako gaz, jakby należało oczekiwać, biorąc pod uwagę jej małą masę cząsteczkową wynoszącą 18μ (Robinson 2002).

1.2.2. Właściwości fizykochemiczne wody

Woda jest polarnym związkiem nieorganicznym, który w warunkach standardowych występuje w stanie ciekłym. Nie posiada smaku, ani zapachu. W małych ilościach wydaje się bezbarwna, chociaż ma swój własny, bardzo lekki, niebieski odcień, wynikający z pochłaniania przez nią promieniowania elektromagnetycznego z zakresu światła widzialnego odpowiadającego barwie czerwonej. Oprócz stanu ciekłego, woda w warunkach ziemskich, może występować w stałym (lód) i gazowym stanie skupienia oraz jako para wodna (Reece 2013). Woda ciekła ma bardzo wysoką pojemność cieplną właściwą 4,1814 J / (g · K) w temperaturze 25°C. W porównaniu lód i para wodna mają tę wartość prawie dwa razy mniejszą, pomimo tego, że dla innych substancji topnienie prawie jej nie zmienia. Właściwa pojemność cieplna każdej substancji, za wyjątkiem wody, rośnie wraz ze wzrostem temperatury. Wykres zależności właściwej pojemności cieplnej wody od temperatury posiada minimum przy temperaturze około 37 ^{o}C, czyli odpowiada temperaturze ciała człowieka. Podczas zamarzania woda słodka zwiększa swoją objętość. Maksimum gęstości osiąga ona w temperaturze ok. 4°C. Zwykły, heksagonalny lód jest mniej gęsty niż ciekła woda - po zamrożeniu gęstość wody zmniejsza się o około 9% (Perlman, Howard 2016). Lód jest lżejszy od wody i dlatego pływa po jej powierzchni. Kolejną nietypową cechą wody jest możliwość istnienia wody w stanie ciekłym poniżej 0°C. Stan ten nazywa się przechłodzeniem i zaburza go pojawienie się tzw. zarodków krystalizacji (np. kurz, pęcherzyk powietrza). Woda ulega również zeszkleniu, czyli przejściu w niekrystaliczne bezpostaciowe ciało stałe.

Woda jest bardzo dobrym rozpuszczalnikiem dla wielu substancji np. kwasów, alkoholi i soli, dlatego jest nazywana „rozpuszczalnikiem uniwersalnym". Substancje niepolarne, takie jak tłuszcze i oleje, nie rozpuszczają się w niej. Ta cecha powoduje, że woda, z której korzystamy, rzadko jest czysta chemicznie; zwykle zawiera w sobie kilka dodatkowych minerałów. Większość występującej na Ziemi wody jest „słona", tzn. zawiera dużo rozpuszczonych soli, głównie chlorku sodu. Jeśli woda ma nawet niewielką ilość takiego „zanieczyszczenia", może znacznie łatwiej przewodzić prąd elektryczny. Czysta woda ma

niskie przewodnictwo elektryczne (0,055 μS/cm). Teoretyczna maksymalna rezystywność elektryczna dla wody wynosi w przybliżeniu $1{,}82 \cdot 10^5$ MΩm, w temperaturze 25 °C.

Wiązanie wodorowe między cząsteczkami wody, jest przyczyną dwóch unikalnych właściwości wody: spójności i przyczepności. Spójność, kohezja, odnosi się do faktu, że cząsteczki wody pozostają blisko siebie, dzięki zbiorowemu działaniu wiązań wodorowych między nimi. Te wiązania wodorowe nieustannie pękają, tworząc nowe wiązania z różnymi cząsteczkami wody; ale w dowolnym momencie w próbce ciekłej wody, duża część cząsteczek jest utrzymywana razem (Campbell, Reece *2009*). Adhezja oznacza, że woda bardzo dobrze przylega do innych rzeczy, rozprzestrzenia się tworząc cienką warstwę na niektórych powierzchniach, takich jak szkło. Gdy woda styka się z tymi powierzchniami, siły przyczepności są silniejsze niż siły kohezyjne.

Woda ma również wysoki poziom napięcia powierzchniowego ($71{,}99 \cdot 10^{-3}$ N/m przy 25 °C). Każda cząsteczka znajdująca się wewnątrz cieczy jest równomiernie otoczona przez inne cząsteczki i ma wysycone siły wzajemnego przyciągania, które równoważą się, działając na wszystkie strony. Natomiast cząsteczki znajdujące się na powierzchni fazowej są poddane oddziaływaniom obu ośrodków. Siła wypadkowa, skierowana prostopadle do powierzchni fazowej, dąży do wciągania cząsteczek w głąb cieczy i nosi nazwę ciśnienia powierzchniowego, natomiast siła styczna do powierzchni jest miarą napięcia powierzchniowego. W wyniku działania tych sił ciecz dąży do zmniejszenia powierzchni swobodnej. Z tego właśnie powodu kropelki cieczy przybierają kształt kulisty, wykazujący najmniejszą powierzchnię przy danej objętości.

Woda jest zaangażowana w różne procesy biomolekularne. Podjęto wysiłki w celu wyjaśnienia mechanizmów leżących u podstaw oddziaływania wody z innymi substancjami w tych procesach, w tym zwijania i stabilności białek, a także interakcji między enzymem a substratem (Finney 2004). Ze względu na swoje unikalne właściwości, takie jak wysokie ciepło właściwe i zdolność rozpuszczania substancji polarnych, woda jest niezbędna do termoregulacji, transportu i wydalania substancji endogennych i egzogennych, i jest idealnym środowiskiem ułatwiającym wiele reakcji biochemicznych (Riveros-Perez, Riveros 2018).

1.3. Izoterma sorpcyjna

Izoterma sorpcyjna opisuje zależność masy substancji zaadsorbowanej na powierzchni badanego układu od wilgotności względnej otoczenia $h = p/p_0$ (stosunek panującego ciśnienia pary wodnej względem ciśnienia pary nasyconej), w stałej temperaturze. Inaczej mówiąc jest

to jako związek pomiędzy równowagowym uwodnieniem substancji i względną wilgotnością w stałej temperaturze. Uwodnienie równowagowe rośnie wraz ze wzrostem względnej wilgotności, jednakże maleje wraz ze wzrostem temperatury. Izotermę sorpcyjną wyznacza się na dwa sposoby (Furmaniak 2013). Pierwszy z nich wiąże się z procesem dehydratacji próbki i sprowadza się do określenia ubytku masy wody w niej zawartej przy zmniejszającej się aktywności wody .Tak uzyskaną krzywą nazywa się izotermą desorpcji Drugi typ krzywych to izotermy adsorpcji, są one związane z procesem ponownej hydratacji próbki.

Adsorpcja to zjawisko występujące na granicy zetknięcia dwóch faz. Związane jest z występowaniem niewysyconych sił międzycząsteczkowych (sił wiązań jonowych lub kowalencyjnych, sił Van der Waalsa). W wyniku oddziaływania tych sił mogą występować różnice stężeń pomiędzy składem ośrodka gazowego lub ciekłego, a składem warstw przyległych do granicy faz. Substancja, na której powierzchni zachodzi adsorpcja to adsorbent, natomiast substancja która ulega adsorpcji to adsorbat. Oprócz adsorpcji, polegającej na powierzchniowym zagęszczaniu adsorbatu, występuje zjawisko absorpcji, czyli równomierne pochłanianie adsorbatu przez całą masę adsorbentu. Zjawisko adsorpcji i absorpcji nazwano ogólnie sorpcją

W zależności od natury sił działających pomiędzy adsorbentem a adsorbatem rozróżniamy adsorpcję fizyczną (fizysorpcję) i chemiczną (chemisorpcję). W adsorpcji fizycznej cząsteczki adsorbatu będące na granicy faz podlegają niezrównoważonym siłom Van der Waalsa, natomiast w przypadku chemisorpcji wiążą się z powierzchnią za pomocą połączeń chemicznych, którymi najczęściej są wiązania kowalencyjne. W przypadku fizysorpcji pojedyncze cząsteczki mają dwa stopnie swobody, dlatego mogą przemieszczać się po powierzchni i tworzyć więcej niż jedną warstwę. Cząsteczki zaadsorbowane chemicznie tworzą na powierzchni tylko jedną warstwę, pojedyncza cząsteczka ma zero stopni swobody. Entalpia chemisorpcji jest wyższa od entalpii adsorpcji fizycznej, wynoszącej od kilku do 50 kJ/mol i wynosi średnio od 100 do 400 kJ/mol (Natkański 2010).

Izotermy sorpcyjne dzielimy obecnie według klasyfikacji IUPAC (Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej) (Sing 1985), która zastąpiła poprzednią stworzoną przez Brunauera (Brunauer 1943).Wyróżnia ona VI typów izoterm, z których trzy pierwsze są zgodne z poprzednią klasyfikacją. Typ I jest charakterystyczny dla adsorbentów mikroporowatych, opisywany izotermą Langmuira. Typ II, który jest najczęściej stosowany i III – bardzo rzadko występujący - są charakterystyczne również dla adsorbentów mikroporowatych, jednak opisuje się je za pomocą sigmoid. Typ IV (rozpowszechniony) i V

(rzadko występujący) stosuje się do adsorbentów mezoporowatych. Ostatni VI jest charakterystyczny dla adsorpcji wielowarstwowej na powierzchni jednorodnej.

Badanie izoterm sorpcyjnych wody ma istotne znaczenie praktyczne. Znajomość zależności zawartości wody od jej aktywności jest ważna w procesach przetwórstwa, przechowywania i transportu żywności (Furmaniak 2013). Analiza izoterm umożliwia także wyznaczenie wilgotności optymalnej dla przeżycia niektórych organizmów. Izotermę sorpcyjną opisuje wiele modeli, w szczególności zaś wyróżnia się: model Langmuira, opisujący sorpcję jednowarstwową, model BET oraz model Denta.

1.3.1. Izoterma Langmuira

Izoterma sorpcyjna Langmuira (Langmuir 1918) jest pierwszym modelem opisującym mechanizm przyłączania i odłączania molekuł wody z powierzchni układu adsorbującego. Wyprowadzony został dla układu gaz – ciało stałe. Przedstawia jednowarstwowe pokrycie powierzchni sorbentu. Model ten zakłada istnienie na powierzchni adsorbentów szczególnie aktywnych miejsc zwanych centrami aktywnymi, które wiążą molekuły sorbatu. Przyjmuje się, iż prawdopodobieństwo przyłączenia cząstki wody jest takie samo dla każdego centra aktywnego oraz cząstki już przyłączone nie wpływają wzajemnie na siebie. Każde centrum może zaadsorbować tylko jedną cząstkę, czyli adsorbent pokrywa się warstwą monomolekularną. Proces adsorpcji ma charakter dynamicznej równowagi pomiędzy adsorpcją i desorpcją. Zgodnie z tą teorią, w miarę wzrostu ciśnienia powiększa się udział powierzchni ciała stałego, która pokryta jest cząsteczkami adsorbatu. Model Langmuira poprawnie charakteryzuje wiązanie się wody do powierzchni adsorbującej dla niskich wilgotności otoczenia ($h \leq 0.1$).

Stopień pokrycia powierzchni θ, określa wyrażenie:

$$\theta = \frac{n}{n_m} \tag{1}$$

gdzie:

n — liczba moli substancji zaadsorbowanej przez daną masę adsorbentu (liczba zajętych centrów adsorpcyjnych),

n_m – liczba moli przy której następuje zapełnienie wszystkich centrów adsorpcyjnych.

Zgodnie z tą definicją $0 < \theta < 1$.

Szybkość adsorpcji każdej substancji na wolnych miejscach powierzchni v_{ads} jest proporcjonalna do liczby jej cząsteczek zderzających się z powierzchnią adsorbentu, a więc

do wartości jej stężenia (c) w fazie ciekłej lub ciśnienia (p) w fazie gazowej oraz do ułamka powierzchni adsorbentu nie pokrytej przez adsorbat (1- θ), czyli do wolnej powierzchni

$$v_{ads} = k(1-\theta)p \tag{2}$$

k - stała szybkości reakcji adsorpcji.

Szybkość desorpcji jest zależna od ułamka powierzchni pokrytej przez adsorbat:

$$v_{des} = k'\theta \tag{3}$$

k' - stała szybkości reakcji adsorpcji

W stanie równowagi w warunkach izotermicznych, szybkość adsorpcji i desorpcji są równe.

$$k(1-\theta)p = k'\theta \tag{4}$$

Po prostych przekształceniach otrzymujemy związek między stopniem pokrycia powierzchni, a ciśnieniem w postaci:

$$\theta = \frac{b_1 p}{1 + b_1 p} \tag{5}$$

gdzie: $b_1 = \frac{k}{k'}$ - zwany jest współczynnikiem adsorpcji.

Równanie izotermy sorpcyjnej Langmuira wyrażone w jednostkach liczby molekuł wody przypadających na miejsce wiążące (y/y_m) przedstawia się w postaci:

$$\frac{y}{y_m} = \frac{b_1 h}{1 + b_1 h}. \tag{6}$$

To samo równanie wyrażone w jednostkach względnego przyrostu masy wody można zapisać następująco:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0}\frac{b_1 h}{1 + b_1 h}, \tag{7}$$

gdzie: Δm – masa przyłączonych cząstek wody, $(\Delta M/m_0)$ – masa wody związanej do wszystkich centr aktywnych wyrażona w jednostkach suchej masy adsorbenta m_0, h - względna wilgotność otoczenia układu.

1.3.2. Model izotermy sorpcyjnej BET

Izoterma Langmuira, dobrze opisuje przypadki chemisorpcji, natomiast w przypadku adsorpcji fizycznej na ogół zawodzi. W przypadku fizysorpcji dochodzi do tworzenia się warstw wielomolekularnych. Dzieje się tak ponieważ ten sam rodzaj sił, jakie odpowiedzialne są za adsorpcję fizyczna pierwszej warstwy adsorbatu, działa również pomiędzy nią a dalszymi, zbliżającymi się do powierzchni adsorbentu cząsteczkami. W 1938 r. Brunauer,

Emmett i Teller opracowali teorię adsorpcji wielomolekularnej, zwanej w skrócie teorią BET. W ten sposób rozszerzyli oni model sorpcji jednowarstwowej Langmuira. Podstawowym założeniem teorii BET jest to, że powierzchnia jest wielowarstwowa, tzn. każda warstwa zaadsorbowanych cząsteczek stanowi podłoże, na którym adsorbują się cząsteczki drugiej warstwy, a na niej kolejne. Dla każdej z warstw stosuje się równanie izotermy sorpcji Langmuira, a energia pierwszej warstwy jest o wiele większa niż kolejnej. Wiązania cząsteczek adsorbatu z adsorbentem są na tyle silne, aby zaadsorbowane cząsteczki nie przemieszczały się po powierzchni. Ilość zaadsorbowanych cząsteczek adsorbatu zależy od ciśnienia jego par. Wraz ze wzrostem ciśnienia zmniejsza się ilość wolnych miejsc na powierzchni adsorbentu i jednocześnie tworzą się kompleksy adsorpcyjne. Parowanie i kondensacja adsorbatu zachodzą na powierzchniach niepokrytych.

Równanie BET (Brunauer i in. 1938) ma postać:

$$v = v_m \frac{c\left(\frac{p}{p_o}\right)}{\left(1-\frac{p}{p_o}\right)\left[1+(c-1)\frac{p}{p_o}\right]} \tag{8}$$

v jest całkowitą objętością zaadsorbowanej wody, v_m jest objętością gazu zaadsorbowanego, gdy cała powierzchnia adsorbentu jest pokryta pełną warstwą jednocząsteczkową, c to stała, p - ciśnienie, p_0 to ciśnienie nasycenia gazu.

Dla $p<<p_0$ równanie 9 redukuje się do zależności:

$$v = v_m \frac{c\left(\frac{p}{p_o}\right)}{\left[1+c\frac{p}{p_o}\right]}. \tag{9}$$

Równanie izotermy sorpcyjnej BET wyrażone w jednostkach względnego przyrostu masy wody przedstawia się w postaci:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0}\frac{b_1 h}{(1-h)(1+b_1 h-h)}, \tag{10}$$

gdzie:

$\frac{\Delta M}{m_0}$ - masa pierwszej warstwy,

b_1 - współczynnik logarytmiczny związany z ciepłem adsorpcji,

h -wilgotność względna.

Do sprawdzania zgodności danych eksperymentalnych z modelem sorpcji BET używa się wzoru przekształconego do zależności parabolicznej:

$$\frac{h}{\Delta m / m_0} = A + (C - A)h - Ch^2, \tag{11}$$

gdzie stałe:

$$A = \frac{1}{b_1 \dfrac{\Delta M}{m_0}}, \tag{12}$$

$$C = \frac{b_1 - 1}{b_1 \dfrac{\Delta M}{m_0}}. \tag{13}$$

Stałe te pozwalają na wyznaczenie parametrów izotermy BET.

Model izotermy BET poprawnie charakteryzuje wiązanie się wody do powierzchni adsorbującej dla wilgotności otoczenia $h \leq 0.4$.

1.3.3. Model izotermy sorpcyjnej Denta

Model izotermy sorpcyjnej wielowarstwowej zaproponowany przez Denta (Dent 1977) w 1977 roku wyróżnia dwa rodzaje miejsc wiążących wodę. Są to miejsca pierwotne, umiejscowione na powierzchni materiału adsorbującego oraz wtórne, wiążące wodę do wcześniej związanych molekuł wody. W odróżnieniu od modelu BET kolejne warstwy przyłączanych molekuł wody nie muszą być zapełnione, aby mogły pojawiać się nowe warstwy. Model ten nie odróżniał jednak cząstek przyłączonych w drugiej i kolejnych warstwach.

Jeżeli przez S_0 oznaczy się liczbę pustych miejsc wiążących na powierzchni adsorbenta, przez S_1 liczbę miejsc z zaadsorbowaną jedną molekułą, S_2 z dwoma itd., to suma wszystkich miejsc wiążących na powierzchni adsorbenta wyniesie N. W stanie równowagi termodynamicznej liczba poszczególnych rodzajów miejsc wiążących w stosunku do ich sumy jest stała w czasie. Zgodnie z powyższym można zapisać następujący układ równań:

$$\begin{cases} \dfrac{1}{N}\dfrac{dS_0}{dt} = C_0 \dfrac{S_1}{N} - ap\dfrac{S_0}{N} = 0 \\ \dfrac{1}{N}\dfrac{dS_1}{dt} = C\dfrac{S_2}{N} - ap\dfrac{S_1}{N} - C_0\dfrac{S_1}{N} + ap\dfrac{S_0}{N} = 0 \\ \dfrac{1}{N}\dfrac{dS_2}{dt} = C\dfrac{S_3}{N} - ap\dfrac{S_2}{N} - C\dfrac{S_2}{N} + ap\dfrac{S_1}{N} = 0 \end{cases} \tag{14a, 14b, 14c}$$

itd.,

w którym: ap oznacza szybkość wiązania molekuł, taką samą dla wszystkich warstw (a jest współczynnikiem przyłączania, p to ciśnienie atmosferyczne), C_0 – współczynnik odłączania

molekuł z pierwotnych miejsc wiążących, *C* współczynnik odłączania molekuł z miejsc wtórnych.

W celu wyznaczenia liczby miejsc wiążących *i* molekuł w zależności od S_0 należy przekształcić poszczególne równania do zależności:

$$\frac{S_1}{N} = \frac{a}{C_0} p \frac{S_0}{N} , \tag{15a}$$

$$\frac{S_2}{N} = \frac{a}{C} \frac{a}{C_0} p^2 \frac{S_0}{N} , \tag{15b}$$

$$\frac{S_3}{N} = \left(\frac{a}{C}\right)^2 \frac{a}{C_0} p^3 \frac{S_0}{N} , \tag{15c}$$

…,

Następnie możemy uogólnić:

$$\frac{S_i}{N} = \left(\frac{a}{C}\right)^{i-1} \frac{a}{C_0} p^i \frac{S_0}{N} . \tag{16}$$

Średnią liczbę molekuł możemy zapisać:

$$\overline{S} = \sum_{1=0}^{\infty} i \frac{S_i}{N} = \frac{a}{C_0} p \frac{S_0}{N} \left[1 + 2\left(\frac{a}{C}\right)p + 3\left(\frac{a}{C}\right)^2 p^2 + 4\left(\frac{a}{C}\right)^3 p^3 + ...\right] . \tag{17}$$

Podobnie jak wcześniej korzystając ze wzoru na sumę otrzymuje się:

$$\overline{S} = \left(\frac{a}{C_0}\right)p\left(\frac{S_0}{N}\right)\frac{1}{\left[1-\left(\frac{a}{C}\right)p\right]^2} . \tag{18}$$

Wiedząc, że:

$$\sum_{1=0}^{\infty} \frac{S_i}{N} = 1 \tag{19}$$

rozpisujemy:

$$1 = \frac{S_0}{N} + \frac{a}{C_0} p \frac{S_0}{N} \left[1 + \left(\frac{a}{C}\right)p + \left(\frac{a}{C}\right)^2 p^2 + ...\right]. \tag{20}$$

Korzystając ze wzoru na sumę szeregu geometrycznego otrzymuje się:

$$\frac{S_0}{N} = \frac{1-\left(\frac{a}{C}\right)p}{1+\left(\frac{a}{C_0}\right)-\left(\frac{a}{C}\right)p} . \tag{21}$$

Podstawiając równanie (21) do (18) uzyskujemy zależność:

$$\overline{S} = \frac{\left(\frac{a}{C_0}\right)p}{\left[1-\left(\frac{a}{C}\right)p\right]\left[1+\left(\frac{a}{C_0}\right)-\left(\frac{a}{C}\right)p\right]} \ . \tag{22}$$

Przyjmując $h = \frac{p}{p_0}$, $b_1 = \frac{a}{C_0}$, $b = \left(\frac{a}{C}\right)p_0$ dostajemy wzór na liczbę molekuł średnio przypadających na jedno miejsce wiążące:

$$\overline{S} = \frac{b_1 h}{(1-bh)(1+b_1 h-bh)} \ . \tag{23}$$

Równanie izotermy sorpcyjnej Denta wyrażone w jednostkach względnego przyrostu masy wody przedstawia się w postaci:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{\Delta M}{m_0}\frac{b_1 h}{(1-bh)(1+b_1 h-bh)} \ , \tag{24}$$

gdzie:

$\Delta M / m_0$ - masa wody wysycającej pierwotne miejsca wiążące, wyrażona w jednostkach suchej masy. Parametr *b* można przedstawić jako

$$b = \left.\frac{S_{i+1}}{S_i}\right|_{h=1|} = \frac{a}{C}p_0 \, . \tag{25}$$

Oznacza on iloraz liczby miejsc wiążących, do których jest przyłączonych *i+1* molekuł do liczby miejsc wiążących, do których jest przyłączonych *i* molekuł dla wilgotności *h=1*. Natomiast odwrotność b_1 jest liczbą pustych miejsc wiążących dla wilgotności *h=1* na jednostkę liczby miejsc wiążących z przyłączoną jedną molekułą wody:

$$\frac{1}{b_1} = \left.\frac{S_0}{S_1}\right|_{h=1|} = \frac{C_0}{ap_0} \, . \tag{26}$$

Do testowania zgodności danych doświadczalnych z modelem Denta używa się funkcji parabolicznej:

$$\frac{h}{\Delta m / m_0} = A + Bh - Ch^2 \ , \tag{27}$$

gdzie *A*, *B*, *C* to współczynniki izotermy wyrażone w formie parabolicznej, związane ze współczynnikami sigmoidalnymi:

$$A = \frac{1}{b_1 \frac{\Delta M}{m_0}}, \tag{28}$$

$$B = \frac{b_1 - 2b}{b_1 \frac{\Delta M}{m_0}}, \tag{29}$$

$$C = \frac{b_1 b - b^2}{b_1 \frac{\Delta M}{m_0}} . \tag{30}$$

Z kolei parametry izotermy sorpcyjnej Denta w formie sigmoidalnej na podstawie współczynników parabolicznych przedstawiają się zgodnie ze wzorami:

$$b = \frac{\sqrt{B^2 + 4AC} - B}{2A} , \tag{31}$$

$$b_1 = \frac{\sqrt{B^2 + 4AC}}{A} , \tag{32}$$

$$\frac{\Delta M}{m_0} = \frac{1}{\sqrt{B^2 + 4AC}} . \tag{33}$$

W przypadku modelu BET parametr b = 1. Natomiast w modelu Langmuira b = 0, czyli C również wynosi zero, więc uzyskana zależność $\frac{h}{\Delta m / m_0}$ jest liniowa, a nie paraboliczna jak w pozostałych dwóch przypadkach:

$$\frac{h}{\Delta m / m_0} = A + Bh . \tag{34}$$

1.4. Elementy magnetycznego rezonansu jądrowego - opis półklasyczny

Magnetyczny Rezonans Jądrowy (NMR, ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) wykorzystuje oddziaływanie jąder o niezerowym spinie z zewnętrznym polem magnetycznym (stałym lub zmiennym). W wyniku relaksacji, czyli powrotu układu spinów jądrowych do stanu równowagi termodynamicznej, rejestruje się promieniowanie elektromagnetyczne, dzięki któremu można wnioskować o dynamice układu spinów. W związku z tym, że woda jest podstawowym składnikiem układów biologicznych, protonowy rezonans magnetyczny pozwala na oznaczenie poziomu hydratacji, a także dynamiki i fazy zawartej wody.

1.4.1. Moment pędu i moment magnetyczny

Moment pędu $\vec{L}$ to iloczyn wektorowy promienia wodzącego $\vec{r}$, oraz pędu, $\vec{p}$ (Hennel, Kryst-Widźgowska 1995):

$$\vec{L} = \vec{r}x\vec{p} \tag{35}$$

Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego obserwuje się dla jąder atomowych posiadających własny moment pędu $\vec{L}$.

W polu magnetycznym o indukcji $\overrightarrow{B_0}$ na jądro posiadające moment magnetyczny $\vec{\mu}$ działa moment siły $\overrightarrow{M_S}$ (Ejchart, Gryff-Keller 2004):

$$\overrightarrow{M_s} = \vec{\mu} \times \overrightarrow{B_0} \tag{36}$$

W elektrodynamice klasycznej moment magnetyczny $\vec{\mu}$ jest związany z momentem pędu w następujący sposób:

$$\vec{\mu} = \gamma\vec{L}. \tag{37}$$

Współczynnik proporcjonalności γ nazywamy współczynnikiem giromagnetycznym i jest on równy:

$$\gamma = g_m \frac{e}{2m_p}, \tag{38}$$

gdzie g_n jest czynnikiem Landego dla jądra, e ładunkiem protonu, a m_p masą protonu.

Wszystkie jądra atomowe złożone z nieparzystej liczby nukleonów, posiadają niezerowy własny moment pędu (spin jądrowy) oraz niezerowy moment magnetyczny. Rzut wektora momentu pędu na wyróżniony w przestrzeni kierunek, równoległy do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego jest skwantowany. Dozwolone wartości składowej $\vec{L}$ w kierunku osi z w dowolnie wybranym układzie współrzędnych można zapisać zgodnie z równaniem:

$$L_z = \hbar m, \tag{39}$$

gdzie $\hbar=h/(2\pi)$, natomiast m to magnetyczna liczba kwantowa charakteryzująca stan własny jądra. Zgodnie z warunkiem kwantowania magnetyczne liczby kwantowe są związane ze spinową liczbą kwantową jądra I:

$$m = I, I-1, I-2, \ldots, -I \tag{40}$$

Spinowa liczba protonu wynosi ½, więc m = + ½ lub m = -½. Proton występuje w dwóch stanach stacjonarnych i jest dipolem magnetycznym. Spiny jądrowe umieszczone w stałym i jednorodnym zewnętrznym polu magnetycznym $B_0=[0,0,B_0]$ mogą przyjmować $2I+1$

wartości. Każda z tych orientacji ma inną energię oddziaływania jądrowego momentu magnetycznego z zewnętrznym polem magnetycznym.

1.4.2. Energia oddziaływania momentu magnetycznego z zewnętrznym polem magnetycznym

Energię oddziaływania jądrowego momentu magnetycznego $\vec{\mu}$ z zewnętrznym polem magnetycznym $\overrightarrow{B_0}$ wyraża się wzorem:

$$E = -\vec{\mu} \circ \overrightarrow{B_0}. \tag{41}$$

Najczęściej jako oś kwantyzacji wybiera się oś z kartezjańskiego układu współrzędnych, wyznaczoną przez wektor pola $\overrightarrow{B_0}$. Energię oddziaływania możemy wtedy opisać za pomocą przekształceń:

$$E = -\mu_z B_0 = -\gamma L_z B_0 = -\gamma \hbar m B_0, \tag{42}$$

Różnica energii między dwoma sąsiednimi poziomami energetycznymi wynosi:

$$\Delta E = -\gamma \hbar B_0. \tag{43}$$

1.4.3. Magnetyzacja jądrowa

W stanie równowagi termodynamicznej, bez obecności zewnętrznego pola magnetycznego, spiny jądrowe ułożone są przypadkowo, a wypadkowa magnetyzacja wynosi zero. Jeśli próbka zostanie umieszczona w zewnętrznym polu magnetycznym nastąpi porządkowanie momentów magnetycznych tak, że część z nich zorientuje się zgodnie z kierunkiem wektora indukcji magnetycznej, pozostałe zaś przeciwnie. Ustawienie równoległe spinu i momentu magnetycznego protonu względem pola jest korzystniejsze energetycznie niż ustawienie antyrównoległe. W zewnętrznym polu magnetycznym częściej będzie występować sytuacja, kiedy moment magnetyczny ustawi się w kierunku tego pola, co oznacza większe obsadzenie poziomu o niższej energii. Namagnesowanie podłużne powstaje w wyniku nierównomiernego obsadzenia przez cząstkę lub jądro stanów o spinie skierowanym zgodnie lub przeciwnie do kierunku oddziałującego pola magnetycznego. Różnicę w ilości obsadzeń poszczególnych poziomów energetycznych, opisuje rozkład Boltzmanna:

$$N_m = \frac{N}{2I+1} e^{\frac{-E_m}{k_B T}}, \tag{44}$$

gdzie k_B – stała Boltzmanna, a T oznacza temperaturę bezwzględną próbki. Stosunek obsadzeń dwóch sąsiednich poziomów energetycznych N_{E_1} i N_{E_2} o energiach E_1 i E_2 dany jest równaniem:

$$\frac{N_{E_2}}{N_{E_1}} = e^{-\frac{E_2 - E_1}{k_B T}}. \tag{45}$$

Stosunek obsadzeń sąsiednich poziomów zeemanowskich wynosi:

$$\frac{N_{m+1}}{N_m} = e^{\frac{\gamma \hbar B_0}{k_B T}}. \tag{46}$$

Swobodny spin jądrowy umieszczony w polu B_0 może więc przyjmować dyskretne wartości energii. W temperaturze pokojowej obsadzenia różnią się jednak nieznacznie i nawet niewielkie ich różnice prowadzą do powstania makroskopowego momentu magnetycznego. Wypadkowy moment magnetyczny próbki makroskopowej przypadający na jednostkę objętości V nazywa się magnetyzacją $\overrightarrow{M}$

$$\vec{M} = \frac{\sum_{i=1}^{n} \vec{\mu}_i}{V} \tag{47}$$

W przypadku braku zewnętrznego pola magnetycznego, wartość wektora magnetyzacji jest równa 0. Jeżeli występuje niezerowe zewnętrzne pole magnetyczne o indukcji $\overrightarrow{B_0}$, to wartości składowe magnetyzacji M_x i M_y, uśredniają się do zera, natomiast składowa M_z pozostaje niezerowa i jest opisana wzorem:

$$M_Z = \frac{\sum_{i=1}^{n} \mu_{i_Z}}{V} = \frac{\sum_{m=-1}^{I} \mu_{Z_m} N_m}{V}. \tag{48}$$

Magnetyzacja próbki w stanie równowagi termodynamicznej jest równoległa do indukcji magnetycznej $\overrightarrow{B_0}$.

1.4.4. Precesja Larmora

Według mechaniki klasycznej, zmiana momentu pędu ciała jest równa działającemu na to ciało momentowi siły:

$$\vec{M} = \frac{d\vec{L}}{dt}. \tag{49}$$

Wektor momentu magnetycznego jądra, które jest umieszczone w polu magnetycznym $\overrightarrow{B_0}$, zgodnym z wybranym kierunkiem porusza się w tym polu zgodnie z równaniem :

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma \vec{\mu} \times \vec{B}_0. \tag{50}$$

Transformując to równanie do układu wirującego z częstością kołową $\vec{\omega}$ otrzymuje się równanie o następującej postaci:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma\vec{\mu} \times \left(\vec{B}_0 + \frac{\vec{\omega}}{\gamma} \right). \tag{51}$$

W układzie tym moment magnetyczny oddziałuje z polem efektywnym

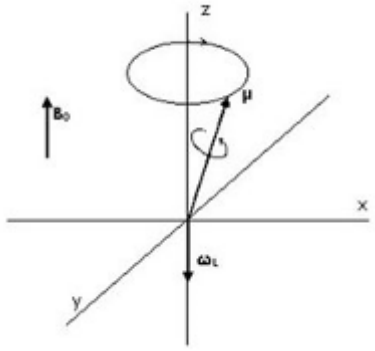
$$\vec{B}_{ef} = \vec{B}_0 + \frac{\vec{\omega}}{\gamma} \tag{52}$$

i precesuje wokół kierunku tego pola. Jeśli w układzie wirującym, pole efektywne jest równe zeru, to w takim układzie odniesienia moment magnetyczny $\vec{\mu}$ jest nieruchomy w stosunku do obserwatora ruchomego. Dzieje się tak wtedy, gdy:

$$\vec{B}_0 = -\frac{\vec{\omega}}{\gamma}, \tag{53}$$

Prędkość kątową tego ruchu nazywa się częstością Larmora (Ryc.14):

$$\vec{\omega}_0 = -\gamma\vec{B}_0. \tag{54}$$



Rycina 14. Precesja magnetycznego momentu jądrowego $\vec{\mu}$ obserwowana w laboratoryjnym układzie współrzędnych, wg Oleszczuk (2006)

1.4.5. Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego

W celu zaobserwowania zjawiska magnetycznego rezonansu jądrowego próbkę umieszczoną w stałym, jednorodnym polu $\vec{B}_0$ poddaje się działaniu dodatkowego zmiennego pola magnetycznego o indukcji $\vec{B}_1$. Pole $\vec{B}_1$ wiruje w płaszczyźnie prostopadłej do $\vec{B}_0$ z częstością $\vec{\omega}$ taką, że dla obserwatora w układzie rotującym jest niezmienne. Gdy częstość tej fali jest równa częstości Larmora, następuje absorpcja promieniowania przez układ spinów badanej próbki. Równanie ruchu należy uzupełnić o dodatkowe pole $\vec{B}_1$ zapisując (Hausser, Kalbitzer 1993):

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma\vec{\mu} \times \left(\vec{B}_0 + \frac{\vec{\omega}}{\gamma} + \vec{B}_1 \right). \tag{55}$$

W takim układzie efektywne pole magnetyczne B_{eff} przyjmuje postać:

$$\vec{B}_{eff} = \vec{B}_0 + \frac{\vec{\omega}}{\gamma} + \vec{B}_1. \tag{56}$$

Precesję wokół pola efektywnego wykonuje wtedy spin lub układ spinów.

Jeżeli częstość wirowania układu jest równa lub bardzo bliska częstości Larmora, wtedy jedynym polem widzianym przez moment magnetyczny będzie pole $\vec{B}_1$. Moment magnetyczny będzie precesował wokół kierunku pola $\vec{B}_1$ z częstością

$$\vec{\omega}_1 = \gamma\vec{B}_1. \tag{57}$$

Podobnie precesja wektora magnetyzacji będzie odbywała się właśnie wokół pola $\vec{B}_1$, co prowadzi do odchylania wektora od osi *z*, $B_1 << B_0$. Wynika z tego, że za pomocą małego, zmiennego pola magnetycznego możemy zmienić orientację, względem $\vec{B}_0$, momentu magnetycznego, który precesuje w dużo silniejszym polu, pod warunkiem, że pole zmienne $\vec{B}_1$ jest w rezonansie z precesującym momentem magnetycznym (Hausser, Kalbitzer 1993).

Działanie pola zmiennego ma charakter wybiórczy pod względem rodzaju jąder. Oznacza to, że jeśli ustawimy pole o częstości spełniającej warunek rezonansu dla danych jąder atomowych, to magnetyzacja innych jąder znajdujących się w próbce, nie zostanie odchylona. Właściwość ta wynika ze znacznych różnic wartości współczynnika giromagnetycznego (oraz częstości rezonansu) poszczególnych rodzajów jąder.

1.4.6. Równania Blocha. Procesy relaksacyjne

Po wytrąceniu ze stanu równowagi termodynamicznej, magnetyzacja próbki podlega procesom relaksacyjnym, aby powrócić do stanu równowagowego. Relaksację magnetyczną można podzielić na podłużną i poprzeczną.

Relaksacja podłużna, czyli tzw. spinowo-sieciowa, związana jest z odrostem składowej M_z wektora magnetyzacji do wartości początkowej. W jej trakcie mamy do czynienia z oddawaniem do otoczenia termodynamicznego (w żargonie NMR tzw. „sieci") energii układu spinów jądrowych zaabsorbowanej podczas pobudzenia układu spinowego. Przyrost wartości składowej M_z w czasie jest konsekwencją zwiększania się liczby spinów zorientowanych w kierunku pola $\vec{B}_0$. Parametrem, który charakteryzuje relaksację spinowo-sieciową jest czas relaskacji T_1 - czas powrotu składowej magnetyzacji równoległej do

wektora $\vec{B}_0$ do wartości równowagowej M_0. Czas relaksacji T_1 zależy od substancji i np. w tkankach jego wartość waha się w zakresie od 200 do 2500 ms, natomiast w bardzo czystej wodzie, wolnej od rozpuszczonego tlenu, w temperaturze 20 ^{0}C wynosi 3100 ms (Hennel, Kryst-Widźgowska 1995).

Relaksacja spinowo-spinowa jest zanikiem poprzecznej składowej magnetyzacji jądrowej M_{xy} prostopadłej do wektora indukcji pola magnetycznego $\vec{B}_0$. W procesie relaksacji poprzecznej nie zachodzi wymiana energii układu z otoczeniem, ponieważ energia układu spinów nie zależy od wartości składowej prostopadłej magnetyzacji jądrowej (wzór 41). W wyniku oddziaływania z innymi spinami tracone jest uporządkowanie układu spinów. Stałą czasową charakteryzującą relaksację spinowo-spinową jest czas relaksacji poprzecznej T_2.

Zachowanie wektora magnetyzacji pod wpływem pól magnetycznych $\vec{B}_0$ i $\vec{B}_1$ oraz procesów relaksacji w układzie laboratoryjnym opisują równania Blocha (Bloch 1946):

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma\left(\vec{M} \times \vec{B}\right)_x + \frac{M_x}{T_2}, \tag{58}$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma\left(\vec{M} \times \vec{B}\right)_y + \frac{M_y}{T_2} \tag{59}$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma\left(\vec{M} \times \vec{B}\right)_z + \frac{M_0 - M_z}{T_1}, \tag{60}$$

gdzie $\vec{M}$ to magnetyzacja, $\vec{\mathrm{B}}$ - indukcja pola magnetycznego, γ – współczynnik giromagnetyczny, T_1 - czas relaksacji podłużnej, T_2 - czas relaksacji poprzecznej.

Jeśli wektor magnetyzacji jądrowej $\vec{M}$ skierowany jest wzdłuż osi z to iloczyn $\vec{M} \times \vec{B}$ = 0. Wtedy równania Blocha mają postać:

$$\frac{dM_x}{dt} = \frac{M_x}{T_2}, \tag{61}$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \frac{M_y}{T_2}, \tag{62}$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 - M_z}{T_1}. \tag{63}$$

Rozwiązaniem równania 62 jest wtedy:

$$M_z = -\exp\left(-\frac{T}{T_1}\right) + M_0 + c. \tag{64}$$

Natomiast rozwiązaniem równania $\frac{dMxy}{dt} = -\frac{M_{xy}}{T_2}$ jest

$$M_{xy} = -\exp\left(-\frac{T}{T_2}\right) + c_1. \tag{65}$$

Gdzie c i c_1 to stałe całkowania.

Po rozwiązaniu równań Blocha możliwe jest obliczenie dynamicznej podatności magnetycznej χ związanej z polem $\vec{B}_0$. Dynamiczna podatność magnetyczna składa się z części dyspersyjnej χ', która jest zgodna w fazie z polem $\vec{B}_1$, oraz części absorpcyjnej χ'', przesuniętej w fazie o kąt $\pi/2$ względem $\vec{B}_1$. Po wprowadzeniu statycznej podatności $x_0 = \frac{M_0}{B_0}$ i współczynnika nasycenia $S = \frac{1}{1+\gamma^2 B_0{}^2 T_1 T_2}$ równania na χ' i χ'' przybierają postać:

$$\mathrm{X'} = \omega_0 x_0 T_2 \frac{(\omega_0 - \varpi) T_2 S}{1+(\omega_0-\omega)^2 T_2{}^2 S}, \tag{66}$$

$$\mathrm{X''} = \omega_0 x_0 T_2 \frac{S}{1+(\omega_0-\omega)^2 T_2{}^2 S}. \tag{67}$$

1.4.6.1. Czas korelacji

Z czasami relaksacji T_1 i T_2 związany jest czas korelacji τ_c. Jest to czas, w którym cząstka zmieni swoje położenie o 1 radian w płaszczyźnie lub 1 steradian w przestrzeni. Czas korelacji opisuje ruchliwość molekuł. Jego wartości są duże, gdy cząsteczki poruszają się powoli (np. w ciałach stałych) i małe jeśli cząsteczki poruszają się szybko (np. w cieczach). Zależność czasów relaksacji od czasu korelacji dla pary różnych spinów opisują równania:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{10}\frac{\gamma_1^2\gamma_2^2\hbar^2}{b^6}\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2\left(\frac{\tau_c}{1+(\omega_1-\omega_2)^2\tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1+4\omega_1^2\tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1+(\omega_1+\omega_2)^2\tau_c^2}\right), \tag{68}$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{20}\frac{\gamma_1^2\gamma_2^2\hbar^2}{b^6}\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2\left(4\tau_c + \frac{\tau_c}{1+(\omega_1-\omega_2)^2\tau_c^2} + \frac{3\tau_c}{1+4\omega_1^2\tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1+4\omega_2^2\tau_c^2} + \frac{6\tau_c}{1+(\omega_1+\omega_2)^2\tau_c^2}\right), \tag{69}$$

gdzie b to odległość między oddziałującymi spinami. Jeżeli mamy do czynienia z parą jednakowych spinów $\gamma_1=\gamma_2=\gamma$, $\omega_1=\omega_2=\omega$ powyższe wzory upraszczają się do:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{6}{20}\frac{\gamma^4\hbar^2}{b^6}\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2\left(\frac{\tau_c}{1+\omega^2\tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1+4\omega^2\tau_c^2}\right), \tag{70}$$

$$\frac{1}{T_2}=\frac{3}{20}\frac{\gamma^4\hbar^2}{b^6}\left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2\left(3\tau_c+\frac{5\tau_c}{1+\omega^2\tau_c^2}+\frac{2\tau_c}{1+4\omega^2\tau_c^2}\right). \tag{71}$$

1.4.7. Kwantowe ujęcie magnetycznego rezonansu jądrowego i procesu relaksacji. Operator gęstości

Zjawiska magnetycznej relaksacji jądrowej opisuje teoria BWRH (Hubbard 1961; Redfield 1957; Wangsness, Bloch, 1953), w której podstawową rolę odgrywa operator gęstości spinowej. Końcowym wynikiem tej teorii jest wyprowadzenie równania ruchu dla średniego operatora gęstości, opisującego stan układu spinowego z równania Liouville'a-von Neumanna, zastosowanego do całej makroskopowej próbki. Punktem wyjściowym jest natomiast umowny podział makroskopowej próbki na układ obserwowany w MRJ, czyli układ spinów jądrowych i na otoczenie termodynamiczne, czyli sieć (tę traktuje się jako łaźnię termiczną o nieskończenie dużej pojemności cieplnej pozostającą w stanie równowagi termodynamicznej). Zmienne sieciowe traktuje się w sposób klasyczny, z kolei rachunek kwantowo-mechaniczny ogranicza się jedynie do spinów jądrowych. Kwantowo–mechaniczny stan części obserwowanej opisuje się w przestrzeni Liouville'a pojedynczego molekularnego układu spinowego.

Teoria BWRH do opisu zmiennych spinowych stosuje zredukowany operator gęstości $\hat{\sigma}(t)$, który jest śladem operatora $\hat{\rho}(t)$ po zmiennych sieciowych *f*:

$$\hat{\sigma}(t)=Tr_f\left(\hat{\rho}(t)\right). \tag{72}$$

Zredukowany operator gęstości przy warunkach normalizacji

$$Tr\,\hat{\sigma}=1 \tag{73}$$

spełnia równanie Liouville'a-von Neumanna

$$\frac{d\hat{\sigma}(t)}{dt}=-i\left[\hat{H},\hat{\sigma}(t)\right]. \tag{74}$$

Pozwala on wyznaczyć wartość oczekiwaną dowolnego operatora obserwabli $\langle\hat{Q}\rangle(t)$:

$$\langle\hat{Q}\rangle(t)=Tr\left(\hat{Q}\hat{\sigma}(t)\right). \tag{75}$$

Niech $\hat{H}$ będzie hamiltonianem spinowym opisanym zależnością:

$$\hat{H}=\hat{H}_0+\hat{H}' \tag{76}$$

składającą się z części statycznej $\hat{H}_0$ (niezależnej od czasu) oraz z części $\hat{H}'$ zależnej od czasu. Dla statycznego oddziaływania zeemanowskiego, jeśli $\hat{H}_0=-\omega_0\hat{I}_z$, przejście do

reprezentacji oddziaływania wiąże sie z transformacją do układu wirującego wokół osi z z częstością równą $\omega_0 = \gamma B_0$:

$$\tilde{X} = e^{iH_0 t} X e^{-iH_0 t}. \tag{77}$$

Przejście to powoduje, że prawa strona równania Liouville'a-von Neumanna upraszcza się do dwóch pierwszych iteracji. Jeśli nie występuje korelacja miedzy operatorami $\hat{\rho}$ oraz $\hat{H}'$, a czasy korelacji są krótkie, otrzymuje się:

$$\frac{d\tilde{\sigma}}{dt} = -\left(A(\tilde{\sigma}) - A(\tilde{\sigma}_0)\right) = -\tilde{\Gamma}\cdot(\tilde{\sigma} - \tilde{\sigma}_0), \tag{78}$$

oraz:

$$\frac{d\sigma}{dt} = -i[H_0, \sigma] - \tilde{\Gamma}\cdot(\sigma - \sigma_0), \tag{79}$$

gdzie:

$$A(\sigma) = \tilde{\Gamma}\cdot\sigma = \frac{1}{2}\int_{-\infty}^{+\infty}\langle\left[\tilde{H}'(t), \left[\tilde{H}'(t+\tau), \sigma\right]\right]\rangle d\tau \tag{80}$$

natomiast σ_0 jest wartością operatora $\hat{\sigma}$ w stanie równowagi termodynamicznej:

$$\sigma_0 = \frac{e^{-\frac{H_0}{kT}}}{Tre^{-\frac{H_0}{kT}}}. \tag{81}$$

Dla wartości oczekiwanych <*Q*> dowolnego operatora spinowego $\hat{Q}$ czasy relaksacji T_Q wyraża się następująco (Blicharski i in. 1994):

$$\frac{1}{T_Q} = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} Tr\left\{\left[\hat{Q}, \tilde{H}(t)\right]\left[\hat{Q}, \tilde{H}(t+\tau)\right]^+\right\} d\tau}{2Tr\left(\hat{Q}\cdot\hat{Q}^+\right)}. \tag{82}$$

Wartości oczekiwane <*Q*> spełniają równanie Blocha:

$$\frac{d\langle Q\rangle}{dt} = -\frac{\langle Q\rangle - \langle Q_0\rangle}{T_Q}. \tag{83}$$

W celu otrzymania wzorów na czasy relaksacji podłużnej T_1 i poprzecznej T_2 należy przyjąć $\hat{Q} = I_z$ oraz $\hat{Q} = (I_+ + I_-)/2$, gdzie $I_\pm = I_x \pm iI_y$, dla składowych magnetyzacji:

$$M_z = \gamma\hbar\langle I_z\rangle \text{ i } M_x = \gamma\hbar\langle I_x\rangle. \tag{84}$$

Po przejściu do operatorowej przestrzeni Liouville'a o wymiarze n^2 (gdzie n to wymiar przestrzeni Hliberta) zredukowany operator gestosci $\hat{\boldsymbol{\sigma}}(\boldsymbol{t})$ można przedstawić za pomocą rozwinięcia Fano (Rose 1957; Wigner 1959), czyli jako liniową kombinację tensorów kulistych:

$$\sigma(t) = \sum_{j=1}^{n^2} c_j(t) T_j, \tag{85}$$

$T_j = T_{LM}(\vec{I}_1, ..., \vec{I}_N)$ to ortonormalne spinowe tensory kuliste, c_j - współczynniki kombinacji liniowej. Tensory T_j zbudowane ze składowych dowolnego wektora $\vec{a}$ uzyskiwane są w procesie polaryzacji sferycznych harmonik (Edmonds 1957):

$$T_{LM}(\vec{a}_1,\ldots,\vec{a}_l) = \aleph_L \Pi_{k=1}^{L}(\vec{a}_k \cdot \nabla)\{r^L C_{LM}(\theta,\varphi)\}, \tag{86}$$

gdzie $\aleph_L$ jest czynnikiem normalizacyjnym, $C_{LM}(\theta,\varphi)$ to funkcje Racah'a. W przestrzeni Liouville'a wartości oczekiwane tensorów kulistych wyrażone są następująco:

$$\langle T_j \rangle(t) = \langle T_j | \sigma(t) \rangle = Tr(T_j^+ \sigma(t)) = c_j(t). \tag{87}$$

Równania 79 oraz 85-87 prowadzą do:

$$\frac{d\langle T_j \rangle}{dt} = -\sum_k A_{jk} \langle T_k \rangle - \sum_k R_{jk}\left(\langle T_k \rangle - \langle T_k \rangle_{eq}\right), \tag{88}$$

gdzie A_{jk} jest macierzą dynamiki spinowej daną przez:

$$A_{jk} = iTr\{T_j^+ [T_k, \tilde{H}_0]\}, \tag{89}$$

a R_{jk} macierzą relaksacji:

$$R_{jk} = \frac{1}{T_{jk}} = \frac{1}{2}\int_{-\infty}^{+\infty} Tr\left\{\left[T_{ji}, \tilde{H}(t)\right]\left[T_k, \tilde{H}(t+\tau)\right]^+\right\} d\tau\,. \tag{90}$$

1.4.8. Hamiltonian jądra

Pełny Hamiltonian jądra przedstawia się następująco:

$$\hat{H} = \hat{H}_Z + \hat{H}_{SK} + \hat{H}_{CS} + \hat{H}_D + \hat{H}_Q\,, \tag{91}$$

gdzie kolejne wyrazy opisują: oddziaływanie Zeemana, hamiltonian oddziaływań pośrednich (sprzężenie spinowo-spinowo), hamiltonian przesunięcia chemicznego, hamiltonian oddziaływań bezpośrednich (sprzężenie dipol-dipol) oraz hamiltonian oddziaływań kwadrupolowych. Najistotniejszą rolę w układach biologicznych w procesie relaksacji odgrywa oddziaływanie dipolowe dla jąder o spinie I=1/2 oraz oddziaływanie kwadrupolowe dla jąder o spinie I>=1.

W ciałach stałych szczególną rolę odgrywa oddziaływanie dipolowe. W próbkach polikrystalicznych lub amorficznych mamy do czynienia ze sprzężeniem dipolowym zarówno pomiędzy sąsiednimi jądrami, ale także z jądrami z sąsiednich cząsteczek. Oddziaływanie to nie ma z kolei większego znaczenia w cieczach, ponieważ w wyniku ruchów Browna (powodujących szybką reorientację cząsteczek) lokalne pola magnetyczne zostają uśrednione do zera i oddziaływanie dipolowe zanika. W niektórych układach biologicznych obserwuje się poszerzenie linii rezonansowej, zaś np. w płynach tkankowych linie są wąskie.

Oddziaływanie dipolowe ma największe znaczenie dla protonowego MRJ z powodu wysokiej koncentracji protonów w badanych próbkach oraz dużego momentu magnetycznego jąder ^{1}H. Hamiltonian oddziaływania dipolowego H_D zapisuje się jako:

$$H_D = \sum_{i\rangle j} d_{ij}\left[\vec{I}_i \cdot \vec{I}_j - 3\left(\vec{I}_i \cdot \hat{r}_{ij}\right)\left(\vec{I}_j \cdot \hat{r}_{ij}\right)\right], \tag{92}$$

$$d_{ij} = \frac{\mu_0 \gamma_i \gamma_j \hbar}{4\pi r_{ij}^3}\ , \tag{93}$$

gdzie d_{ij} jest stałą oddziaływania dipolowego, $\boldsymbol{\gamma_i}$ i $\boldsymbol{\gamma_j}$ są czynnikami żyromagnetycznymi dwóch różnych spinów I_i oraz I_j, a $\cdot\, \hat{\boldsymbol{r}}_{\boldsymbol{ij}}$ jest wersorem wektora $\vec{\boldsymbol{r}}_{\boldsymbol{ij}}$ o kierunku wyznaczonym przez prostą, na której leżą spiny *i* oraz *j* i zwrocie od spinu *i* do spinu *j*.

W przypadku braku równoważności chemicznej rozważanej pary oddziałujących spinów, oprócz oddziaływania dipolowego, należy uwzględnić również pośrednie oddziaływanie skalarne poprzez powłoki elektronowe (Abragam 1961). Hamiltonian tego oddziaływania H_{sk} można zapisać jako:

$$H_{SK} = \sum_{i\langle j} A_{ij} \vec{I}_i \cdot \vec{I}_j\,, \tag{94}$$

gdzie A_{ij} jest stałą sprzężenia skalarnego. W obecności szybkiej wymiany chemicznej, stała sprzężenia staje się funkcją czasu i przyjmuje wartość 0 lub A_{ij}. W takim przypadku hamiltonian oddziaływania skalarnego można rozłożyć na część statyczną oraz część zależną od czasu.

W przypadku jąder o spinie większym niż 1/2 elektryczny jądrowy moment kwadrupolowy jest niezerowy. W rozważaniach należy wtedy uwzględnić oddziaływanie kwadrupolowe. Jądrowy moment kwadrupolowy jest wielkością, która opisuje deformację ładunku jądra od symetrii sferycznej. Moment ten oddziałuje z gradientem pola elektrycznego (EFG) wygenerowanym przez anizotropowy rozkład ładunku w jądrze. Takie oddziaływanie prowadzi do powstania tzw. rozszczepienia kwadrupolowego, obserwowanego w widmie rotacyjnym.

Gradient pola elektrycznego, wywołany zewnętrznymi (względem jądra) ładunkami, po ustaleniu środka układu współrzędnych w miejscu jądra można wyznaczyć ze wzoru:

$$V_{jk} = \frac{\partial^2 V}{\partial r_j \partial r_k}\ \Big|_0\,, \tag{95}$$

gdzie V jest potencjałem elektrostatycznym. Poprzez diagonalizację otrzymujemy jego postać charakteryzowaną trzema składowymi diagonalnymi, które spełniają równanie Laplace'a:

$$\sum_{i=x,y,z} V_{ii} = 0\,. \tag{96}$$

Ogranicza to liczbę parametrów opisujących gradient do dwóch. Zazwyczaj wybiera się

$$eq = V_{zz} \tag{97}$$

jako maksymalną wartość gradientu (*e* jest ładunkiem elementarnym, a *q* ładunkiem jądra) oraz tzw. parametr asymetrii η:

$$\eta = \frac{V_{yy} - V_{xx}}{V_{yy} + V_{xx}} = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}} . \tag{98}$$

Parametr asymetrii dobiera się tak, by $0 \leq \eta \leq 1$. Energia oddziaływania jest równa:

$$E_Q = \frac{1}{6} \sum_{i,j=x,y,z} V_{ij} Q_{ij} . \tag{99}$$

Hamiltonian opisujący omawiane oddziaływanie wyraża się wzorem (Suits 2006):

$$H_Q = \frac{e^2 qQ}{4I(2I-1)} \left[3I_z^2 - I^2 + \eta \left(I_x^2 - I_y^2 \right) \right]. \tag{100}$$

1.4.9. Teoretyczne podstawy pomiarów MRJ w domenie czasu i w domenie częstości

1.4.9.1. Wytworzenie wirującego pola magnetycznego

Dzięki zestawieniu ze sobą dwóch prostopadłych do siebie cewek, przez które płynie prąd o częstotliwości *v=ω/(2π),* w drugiej cewce przesunięty o *π/2* możliwe jest wytworzenie wirującego pola magnetycznego. W praktyce stosuje się jedną cewkę i podaje do niej sinusoidalnie zmienną siłę elektromotoryczną, co skutkuje wytworzeniem pola oscylującego, które można rozłożyć na dwie składowe wirujące z częstością ω w przeciwnych kierunkach, o takich samych wartościach indukcji $\vec{B}_1$. Wypadkowe pole dane jest wzorem:

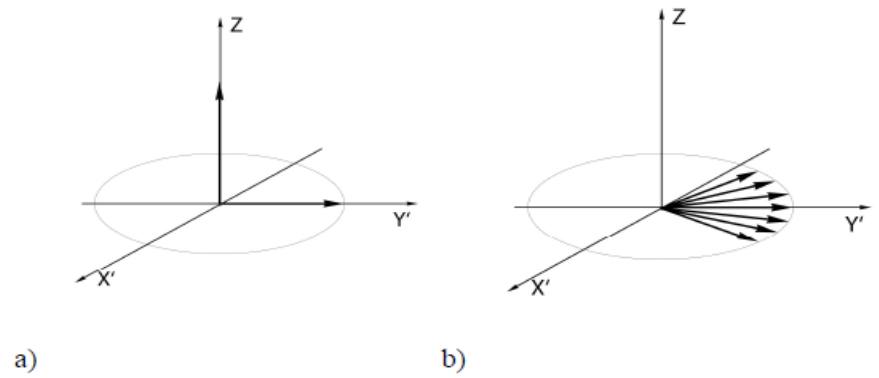
$$B_{wyp} = 2B_1 \sin(\omega t). \tag{101}$$

Tylko pole wirujące z prędkością Larmorowską będzie widziane w układzie wirującym, jako prostopadłe do $\vec{B}_0$ mogące spowodować obrót magnetyzacji. Pole antylarmorowskie natomiast (składową o częstości -ω) może zostać zaniedbane, gdyż tylko nieznacznie odchyla pole $\vec{B}_0$.

1.4.9.2. Sygnał zaniku swobodnej precesji

Po przyłożeniu do próbki znajdującej się w zewnętrznym, stałym polu magnetycznym $\vec{B}_0$ impulsu π/2, wypadkowy wektor magnetyzacji zostanie obrócony o kąt 90^0 wokół osi prostopadłej do kierunku zewnętrznego pola magnetycznego $\vec{B}_0$. Rejestracja sygnału MRJ

polega na detekcji siły elektromotorycznej wyindukowanej w cewce nadawczo–odbiorczej przez magnetyzację jądrową wirującą w płaszczyźnie XY, w której znajduje się cewka odbiorcza. Zaraz po obróceniu wszystkie składowe magnetyzacji precesują zgodnie, z tą samą fazą na płaszczyźnie poprzecznej *XY*. Indukują wtedy sygnał. Wskutek niejednorodności pola $\vec{B}_0$ niektóre składowe wysuwają się do przodu, a inne opóźniają w ruchu precesyjnym (tzw. zjawisko rozwinięcia w wachlarz). Ich wypadkowa maleje w czasie krótszym niż czas relaksacji poprzecznej, T_2. Po pewnym czasie składowe magnetyzacji rozkładają się równomiernie we wszystkich kierunkach na płaszczyźnie *XY* i ich wypadkowa równa się zeru, a sygnał zanika (Hennel, Kryst-Widźgowska 1995). W wyniku zjawiska relaksacji i niejednorodności zewnętrznego pola magnetycznego wektor magnetyzacji powraca więc do stanu równowagi, jego składowa *Mxy* ulega zmniejszeniu, a indukowana w cewce siła elektromotoryczna maleje.



Rycina 15. Powstawanie sygnału swobodnej precesji: a) zadziałanie impulsu π/2,
b) tzw. „ rozwijanie magnetyzacji w wachlarz”

Siła elektromotoryczna indukowana w cewce odbiorczej pod wpływem zmieniającej się w czasie poprzecznej składowej magnetyzacji nazywa się sygnałem zaniku swobodnej precesji (FID = free induction decay). Zanik swobodnej precesji jest transformatą Fouriera widma MRJ. Amplituda sygnału jest proporcjonalna do liczby jąder rezonansowych w próbce. Jeżeli pole $\vec{B}_0$ jest jednorodne, to czas zaniku swobodnej precesji jest równy czasowi relaksacji spinowo-spinowej, T_2. Natomiast w przypadku rzeczywistym, o zaniku swobodnej precesji decyduje głównie niejednorodność pola $\vec{B}_1$, czas zniku oznacza się symbolem T_2*. Niejednorodności pola $\vec{B}_1$ stanowią czynnik przyspieszający, czas T_2* jest zwykle znacznie krótszy od T_2. Zależność tę można opisać:

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{\gamma \Delta B_0}{2}, \tag{102}$$

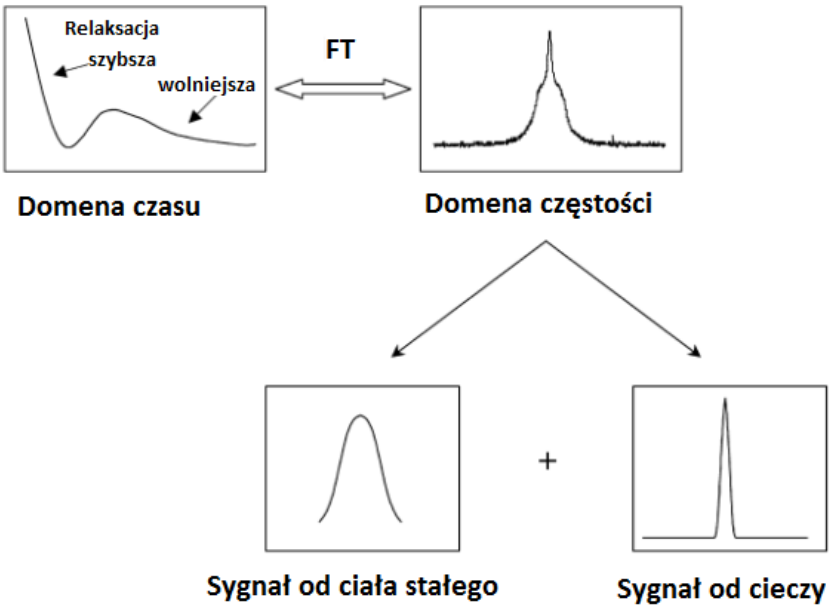
gdzie ΔB_0 jest miarą niejednorodności pola, a g jest czynnikiem giromagnetycznym jądra.

W próbkach układów biologicznych o niskiej hydratacji sygnał zaniku swobodnej precesji dla protonów jest sumą składowych pochodzących od frakcji stałej i frakcji ciekłej. W próbkach cieczowych molekuły poruszają się szybko, wartość pól lokalnych uśrednia się, a linia rezonansowa jest wąska – opisana jest funkcją Lorentza. Zanik swobodnej precesji FID opisany jest wtedy funkcją eksponencjalną. W ciałach stałych ruch molekuł jest znacznie wolniejszy, pola lokalne nie ulegają uśrednieniu, dlatego linia absorpcji jest szeroka. Wzbudzenie występuje w większym zakresie częstości.

W próbkach, w których sygnał pochodzi zarówno od ciała stałego, jak i od cieczy rejestrowany sygnał FID będzie sumą (Derbyshire i in. 2004):

$$F(t) = fs\,Fs(t) + f_L\,F_L(t) \tag{103}$$

gdzie $F_S(t)$ to sygnał pochodzący od frakcji stałej sygnału FID, natomiast $F_L(t)$ to sygnał pochodzący od protonów mobilnych, f_S i f_L, to współczynniki, będące miarą udziału składowej stałej oraz składowej cieczowej w sygnale. Schemat sygnału FID wraz z widmem MRJ pochodzącym z układu dającego sygnał ciała stałego oraz cieczy, przedstawiony został na Rycinie 16.



Rycina 16. Zestawienie zaników swobodnej precesji oraz widm NMR pochodzących od próbki zawierającej zarówno frakcję stałą, jak i frakcję cieczową (Derbyshire i inni, 2004)

1.4.9.3. Transformacja Fouriera

Sygnał zaniku swobodnej precesji FID jest obserwowany w domenie czasu. Dzięki przejściu do domeny częstotliwości, za pomocą transformacji Fouriera, możemy uzyskać informacje o częstościach ω fali elektromagnetycznej, która jest pochłaniana w czasie zjawiska magnetycznego rezonansu jądrowego oraz emitowana podczas relaksacji jądrowej.

Mając funkcję czasu *F(t),* taką, że istnieją całki: $\int_{-\infty}^{+\infty} \boldsymbol{F(t)dt}$ oraz $\int_{-\infty}^{+\infty} |\boldsymbol{F(t)}|^2 \boldsymbol{dt}$ za pomocą transformacji Fouriera możemy uzyskać funkcję *f(ω)* w następujący sposób (Hennel 1966):

$$f(\omega) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} F(t) \exp(-i\omega t) dt. \tag{104}$$

Z kolei mając funkcję *f(ω)* można dostać funkcję *F(t)* stosując odwrotną transformację Fouriera:

$$F(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} f(\omega) \exp(i\omega t) dt\,. \tag{105}$$

W technice impulsowego magnetycznego rezonansu jądrowego w celu wzbudzenia spinów, stosuje się krótkie pola impulsowe o częstotliwości radiowej (rf). Impulsy te, nie są monochromatyczne, lecz polegają na wygenerowaniu fal elektromagnetycznych o częstotliwościach z zakresu zbliżonego do częstotliwości rezonansowej ω. Skrócenie czasu trwania impulsu powoduje, że szerokość tego przedziału częstości poszerza się (Hausser , Kalbitzer 1993).

Przez działanie bardzo krótkiego impulsu, czyli o dużej szerokości spektralnej, chcemy uzyskać równomierne wzbudzenie całej szerokości obserwowanego pasma. Rejestrowany zanik swobodnej procesji będzie wtedy złożeniem wielu różnych funkcji, a nie tylko pojedynczą funkcją eksponencjalną (Hausser, Kalbitzer, 1993). Jeśli mamy do czynienia z układem biologicznym o niskiej hydratacji, sygnał FID jest sumą sygnału pochodzącego od frakcji stałej oraz frakcji cieczowej.

1.4.9.4. Składowa zaniku swobodnej precesji pochodząca od spinów fazy stałej

Jeśli założy się, że hamiltonian jest sumą tak dużej liczby oddziaływań dipolowych, że prowadzi do szerokiej linii z bardzo skomplikowaną strukturą, składową stałą funkcji zaniku swobodnej precesji, F_S, warto rozwinąć w szereg momentów statystycznych linii MRJ:

$$F_s(t) = \sum_{n=0}^{\infty} M_{2n} \frac{(-1)^n t^{2n}}{(2n)!} = 1 - \frac{M_2 t^2}{2!} + \frac{M_4 t^4}{4!} - \frac{M_6 t^6}{6!} + ..., \tag{106}$$

gdzie M_{2n} oznacza kolejne parzyste momenty linii rezonansowej. Momenty nieparzyste wynoszą zero (Abragam 1961).

1.4.9.5. Zastosowanie funkcji Gaussa w analizie widma NMR oraz FID

Pola lokalne w ciele stałym nie uśredniają się do zera. Jądra, które wchodzą w skład badanej próbki oddziałują zarówno z zewnętrznym, stałym polem magnetycznym o indukcji B_0, jak i z lokalnymi polami wytwarzanymi przez sąsiadujące jądra. W zależności od tego jakie jądra sąsiadują z jądrem rezonansowym, takie będzie lokalne pole. W przypadku substancji amorficznej rozkład pól lokalnych, a przez to również częstości rezonansowych, jest przypadkowy i dobrze opisany funkcją Gaussa:

$$f(\omega) \propto \exp\left(-\frac{\omega^2}{2\sigma^2}\right), \tag{107}$$

gdzie jest σ stałą.

Transformacja Fouriera funkcji Gaussa jest również funkcją Gaussa:

$$F(t) \propto \exp\left(-\frac{\sigma^2 t^2}{2}\right), \tag{108}$$

Składowa zaniku swobodnej precesji pochodząca od ciała stałego może być opisywana właśnie krzywą gaussowską. Model ten wielokrotnie został już wykorzystany do opisu układów biologicznych, takich jak plechy grzybów zlichenizowanych (Harańczyk i in. 2009), DNA (Harańczyk i in. 2012a), czy dentyny (Funduk i in. 1986).

Funkcję Gaussa można rozwinąć w następujący szereg momentów (Abragam 1961):

$$F_G(t) = \exp\left[-\left(\frac{t}{T_{2G}}\right)^2\right] = \exp\left(-\frac{M_2 t^2}{2}\right) = \exp\left(-\frac{a^2 t^2}{2}\right) = \Sigma_{n=0}^{\infty} a^{2n} \frac{(-1)^n t^{2n}}{n! 2^n}\ , \tag{109}$$

gdzie M_2 to drugi moment statystyczny, przedstawiany jako:

$$M_2 = a^2 = \frac{2}{T_{2G}}\ , \tag{110}$$

natomiast T_{2G} to efektywny czas relaksacji poprzecznej, zwykle oznaczany przez T_2^*. Sygnał zaniku swobodnej precesji, F_s, może być opisany sumą większej liczby funkcji Gaussa:

$$F_s(t) = \Sigma_{i=1}^{N} S_i e^{-\left(\frac{t}{T_{2Gi}^*}\right)^2}\ , \tag{111}$$

gdzie S_i są amplitudami składowych stałych, a T_{2Gi}^* mierzonymi czasami relaksacji spin–spin.

1.4.9.6. Model funkcji Abragama

Sygnał zaniku swobodnej precesji pochodzący od matrycy stałej dla niektórych próbek zawierających protony o małej ruchliwości, w układach krystalicznych bądź w fazie szklistej, lepiej opisuje tzw. funkcja Abragama (Abragam 1961, Dries van Den i in. 1998). W domenie czasu jest ona iloczynem funkcji Gaussa i funkcji sinkus:

$$F_s(t) = \exp\left(-\frac{a^2t^2}{2}\right)\frac{\sin bt}{bt}. \tag{112}$$

Rozwinięcie funkcji w Abragama w szereg momentów przedstawia się następująco:

$$, F_s(t) = 1 - \left(a^2 + \frac{1}{3}b^2\right)\frac{t^2}{2!} + \left(3a^4 + 2a^2b^2 + \frac{1}{5}b^4\right)\frac{t^4}{4!} - ..., \tag{113}$$

gdzie drugi i czwarty moment są równe:

$$M_2 = a^2 + \frac{1}{3}b^2, \tag{114}$$

$$M_4 = 3a^4 + 2a^2b^2 + \frac{1}{5}b^4. \tag{115}$$

Funkcja Abragama była z powodzeniem używana do opisu sygnału MRJ w domenie czasu dla wielu układów biologicznych np. w kompleksie CTMA - DNA (Harańczyk i in.2012a) czy w niektórych porostach antarktycznych (Harańczyk i in. 2012c). Sygnał FID opisywany funkcją Abragama oraz odpowiadające mu widmo MRJ przedstawiony został na Rycinie 18.

1.4.9.7. Dublet Pake'a

Dla jąder o spinie I = 1/2 tylko dwa rzuty spinów na oś kwantyzacji są dozwolone. Kąt między wektorem łączącym dipole $\vec{r}$ a wektorem indukcji zewnętrznego pola $\vec{B_0}$ wyraża się jako θ. *E*nergię oddziaływania dipolowego można zapisać jako:

$$E_D = m_1 m_2 \frac{\mu_0}{4\pi}\frac{\gamma_1\gamma_2}{r^3}\hbar^2\left(1 - 3\cos^2\theta\right) = m_1 m_2 J_D, \tag{116}$$

gdzie *r* to odległość między oddziałującymi spinami.

Korzystając z powyższego wzoru zależne od orientacji rozszczepienie dipolowe można przedstawić jako:

$$J_D = D\left(1 - 3\cos^2\theta\right), \tag{117}$$

gdzie

$$D = \frac{\mu_0}{4\pi}\frac{\gamma_1\gamma_2}{r^3}\hbar^2 \tag{118}$$

jest niezależną od pola magnetycznego stałą sprzężenia dipolowego.

Dla próbki monokrystalicznej, zawierającej odizolowane pary jąder, ze wzoru 116 można wywnioskować, że widmo będzie złożone z dwóch linii rozdzielonych na odległość rzędu *D*, zależną od orientacji kryształu względem pola zewnętrznego. W próbce polikrystalicznego proszku, dozwolone są wszystkie wartości kąta $\boldsymbol{\theta}$, przez co widoczny jest tzw. dublet Pake'a (Pake 1948), czyli superpozycja wszystkich linii położonych w zakresie dozwolonym przez wartości wyrażenia $(\mathbf{1-3cos^2\theta})$. W przypadku takiej próbki, rejestrowany sygnał jest zdominowany przez oddziaływanie dipolowo-dipolowe między dwoma najbliższymi spinami, poszerzony oddziaływaniem ze spinami dalszymi. Widmo przedstawiające dublet Pake'a *P(ω)* będzie sumą dwóch składników $P_1(\omega)$ oraz $P_2(\omega)$, odpowiadającym dwóm stanom spinowym sąsiada (Derbyshire i in. 2004):

$$P(\omega)=P_1(\omega)+P_2(\omega), \tag{119}$$

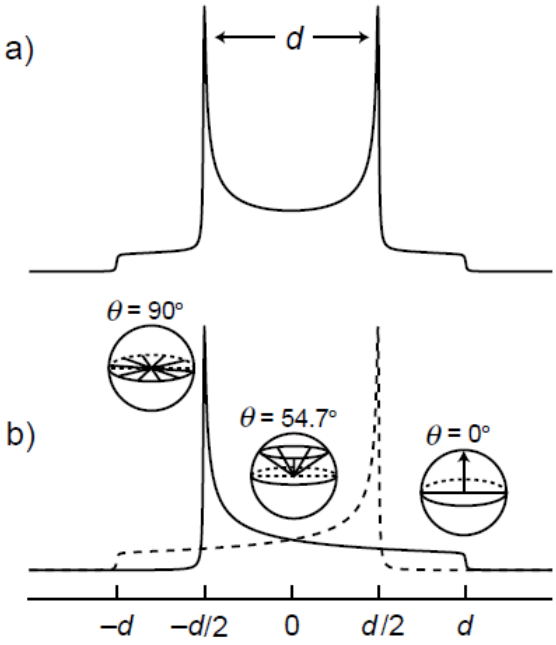
gdzie:

$$\begin{cases} P_1(\omega)=\left(\frac{1}{2}L+\omega\right)^{-\frac{1}{2}} & \omega\in\left(-\frac{1}{2}L,L\right) \\ P_1(\omega)=0 & \omega\notin\left(-\frac{1}{2}L,L\right) \end{cases}, \tag{120}$$

oraz:

$$\begin{cases} P_2(\omega)=\left(\frac{1}{2}L-\omega\right)^{-\frac{1}{2}} & \omega\in\left(-L,\frac{1}{2}L\right) \\ P_2(\omega)=0 & \omega\notin\left(-L,\frac{1}{2}L\right) \end{cases}. \tag{121}$$

Parametr *L* określa maksymalne rozszczepienie. W wyniku heterojądrowego sprzężenia dipolowego odległość pomiędzy maksimami w dublecie jest równa stałej sprzężenia dipolowego *D* (Rys. 17) (Laws, Bitter, Jerschow 2002). Wierzchołki dubletu Pake'a odpowiadają sytuacji, kiedy wektor $\vec{r}$ jest prostopadły (θ = 90°) oraz równoległy (θ = 0) do wektora zewnętrznego pola magnetycznego $\vec{B}_0$. Jeśli wektor $\vec{r}$ jest zorientowany pod kątem θ = 54,7° do wektora $\vec{B}_0$ sprzężenie dipolowe jest równe zero i nie ma wpływu na częstotliwość rezonansową (Laws, Bitter, Jerschow 2002). W przypadku homonuklearnym piki w dublecie są rozszczepione na odległość $\frac{3}{2}D$.

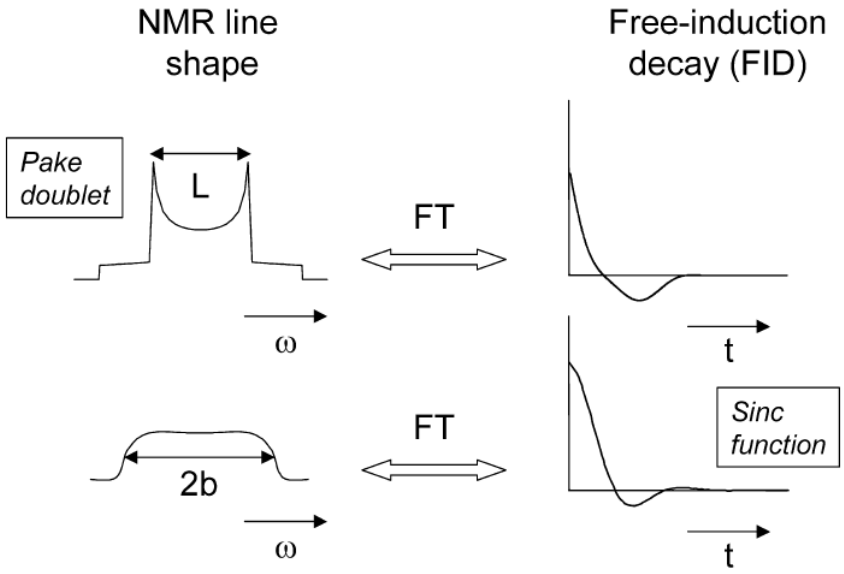


Rycina 17. Dipolowy dublet Pake'a dla pary spinów oddziałujących w polikrystalicznej próbce proszkowej. a) W wyniku heterojądrowego sprzężenia dipolowego odległość pomiędzy maksimami w dublecie jest równa stałej sprzężenia dipolowego d. b)Wierzchołki dubletu Pake'a odpowiadają sytuacji, kiedy wektor $\vec{r}$ jest prostopadły (θ = 90°) oraz równoległy (θ = 0) do wektora zewnętrznego pola magnetycznego $\vec{B}_0$. Jeśli kąt θ = 54,7° sprzężenie dipolowe jest równe zero; wg Laws i in. (2002)

Uwzględniając poszerzenie wynikające z oddziaływania z bardziej odległymi jądrami, sygnał zaniku swobodnej precesji można policzyć korzystając z transformacji Fouriera (Derbyshire i in. 2004):

$$F_p(t) = \exp\left(-\frac{a^2t^2}{2}\right)\int_0^\infty P(\omega)\exp(-\omega t)d\omega \qquad (122)$$

gdzie *a* jest odchyleniem standardowym gaussowskiego poszerzenia funkcji, będącym miarą stopnia poszerzenia rejestrowanego sygnału. Przykładowe widmo z widocznym dubletem Pake'a z odpowiadającym mu sygnałem FID przedstawiono na Rycinie 18.



Rycina 18. Widoczny na widmie NMR dublet Pake'a. Poniżej widoczny sygnał FID opisywany funkcją Abragama oraz jego transformacja Fouriera do domeny częstości – funkcja „kapeluszowa" (Derbyshire i inni, 2004)

1.4.9.8. Zastosowanie funkcji Lorentza w analizie widma NMR

W próbkach cieczowych, szybkie ruchy molekularne powodują uśrednienie pól lokalnych. Skutkiem tego linia rezonansowa ma kształt funkcji Lorentza:

$$f(\omega)=\frac{\Delta\omega_{1/2}}{\left(\Delta\omega_{\frac{1}{2}}\right)^2+(\Delta\omega)^2}, \tag{123}$$

gdzie $\Delta\omega_{1/2}$ to szerokość połówkowa linii rezonansowej, natomiast $\Delta\omega = \omega_0 - \omega$. Związek między szerokością połówkową linii rezonansowej, a czasem relaksacji poprzecznej T_2 ma postać:

$$\Delta\omega_{1/2}=\frac{1}{T_2}. \tag{124}$$

Ponieważ linie rezonansowe są poszerzone wskutek niejednorodności pola $\vec{B}_0$, jako miarę szerokości połówkowej stosujemy efektywny czas relaksacji poprzecznej T_2^*:

$$\Delta\omega_{1/2}=\frac{1}{T_2^*}. \tag{125}$$

Transformacja Fouriera funkcji Lorentza jest funkcją eksponencjalną. Dlatego też sygnał zaniku swobodnej precesji, FID, pochodzący od cieczy jest funkcją zanikającą

eksponencjalnie. W przypadku sygnału pochodzącego z *N* różnych podukładów cieczowych sygnał zaniku swobodnej precesji można przedstawić następująco:

$$F_L(t) = \sum_{j=1}^{N} L_j \exp\left(-\frac{t}{T_{2Lj}^*}\right), \quad (126)$$

gdzie *N* jest liczbą różnych składowych cieczowych, L_j ich amplitudami, a $T_{2L_j}^*$ ich efektywnymi czasami relaksacji poprzecznej.

2. Materiał i metody

2.1. Materiał

Badania przeprowadzono na larwach *Polypedilum vanderplanki* Hinton, 1951, gatunku muchówki z rodziny Chironomidae (Insecta: Diptera: Nematocera) nazwanej po polsku ochotką afrykańską. Larwy tych ochotek zostały zebrane przez profesora Takashiego Okudę (National Institute of Agrobiological Science w Sukubie, Japonia) w Nigerii w 2000 roku, w pobliżu stanowisk po raz pierwszy odkrytych dla nauki przez Hintona (Hinton 1951). Następnie, zostały one przetransportowane do laboratorium w Japonii, gdzie je hodowano w warunkach zbliżonych do naturalnych (Watanabe i in. 2002). Larwy w stanie anhydrobiozy zostały nam przez prof. Okudę przesłane w probówkach (ependorfkach) w szczelnie zamkniętym pojemniku z silica żelem w celu zapobieżenia niekontrolowanej rehydratacji. Pojemnik ten otwierano jedynie w przypadku pobierania larw do badań, po czym go zaraz zamykano.

2.2. Metody

2.2.1. Pomiary grawimetryczne i suchej masy

Pomiary grawimetryczne przeprowadzono przy użyciu wagi laboratoryjnej RADWAG WAX 110 z dokładnością skali 0,00001g w temperaturze pokojowej (22 st. C).

W celu wyznaczenia suchej masy, próbki poddano prażeniu w temperaturze 70 ºC przez 72 godziny. Temperaturę tę przyjęto jako odnośnik w pomiarach, ponieważ jest ona stosowana do określania suchej masy innych układów biologicznych, jak np. plechy porostów i pozwala uniknąć rozkładu niektórych organicznych składników plechy (Gaff, 1977).

2.2.2. Wyznaczanie poziomu uwodnienia, kinetyka hydratacji i dehydratacji, izoterma sorpcyjna

Do wyznaczenia poziomu uwodnienia larw posłużyły wartości suchych mas próbek, zgodnie ze wzorem:

$$\frac{\Delta m}{m_0} = \frac{m_p - m_0}{m_0}, \tag{127}$$

gdzie m_0 to sucha masa, a m_p to masa próbki.

Pomiary tras hydratacyjnych zostały przeprowadzone z fazy gazowej, w temperaturze pokojowej, w eksykatorach zawierających substancje zmieniające ciśnienie (kwasem fosforowym, przesyconymi roztworami soli oraz nad powierzchnią wody destylowanej) pary wodnej nad ich powierzchnią (Tab. 2). Taki sposób uwadniania pozwala łatwo wytworzyć i utrzymać odpowiednie warunki wilgotności, a wrażliwość na zmiany temperatury jest niewielka. Wytworzenie stabilnej wilgotności atmosfery zależy od układu obejmującego czystość wody i użytych substancji chemicznych. Niewielkie zanieczyszczenie wody lub roztworów soli i kwasów może wpłynąć na proces oraz kinetykę hydratacji (Barbosa-Cánovas i in. 2008). Przyrosty masy były określane poprzez ważenie próbek na wymienionej już wcześniej wadze elektronicznej RADWAG WAX 110.

Tabela 2. Substancje wykorzystywane do uzyskiwania odpowiednich wilgotności względnych w trakcie hydratacji z fazy gazowej

Wzór związku	**Wilgotność względna (RH%)**
żel krzemionkowy	0%
$H_3PO_4 \cdot 1/2H_2O$	9%
$KC_2H_2O_2$	23%
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	32%
K_2CO_3	44%
NH_4NO_3	63%,
$Na_2SO_3 \cdot 5H_2O$	76%
K_2CrO_4	88%
$Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$	93%
K_2SO_4	97%
H_2O	100%

Jeden cykl pomiarowy trwał średnio 140 godzin. Przeprowadzono dwa cykle pomiarowe dla larw wysuszonych oraz dla serii, która nie przeszła pomyślnie w stan anhydrobiozy.

2.2.3. Pomiary magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

Larwy umieszczanow specjalnych probówce NMR o średnicy 5 mm. Uwadnianie zachodziło w otwartych probówkach w eksykatorze o wilgotności względnej 100%. Na czas pomiaru probówki zaklejano parafilmem w celu zminimalizowania efektu wysychania.

Relaksometria

Pomiary relaksacyjne dla protonów wykonano spektrometrem impulsowym WNS HB65 (Ryc. 19) firmy Waterloo NMR Spetrometers, Waterloo, Ontario, Kanada.

Częstotliwość rezonansowa zastosowana do pomiarów wynosiła 30 MHz, dla pola magnetycznego o wartości indukcji B_0 około 0,7 T. Długość impulsu $\pi/2$ była równa 1.5 μs, przy mocy impulsu 400 W. Czas repetycji wynosił 2.003 s, a czas martwy spektrometru był równy 9.8 μs. Wynik pomiaru był uśrednieniem 1000 akwizycji i trwał 34 minuty. Każda

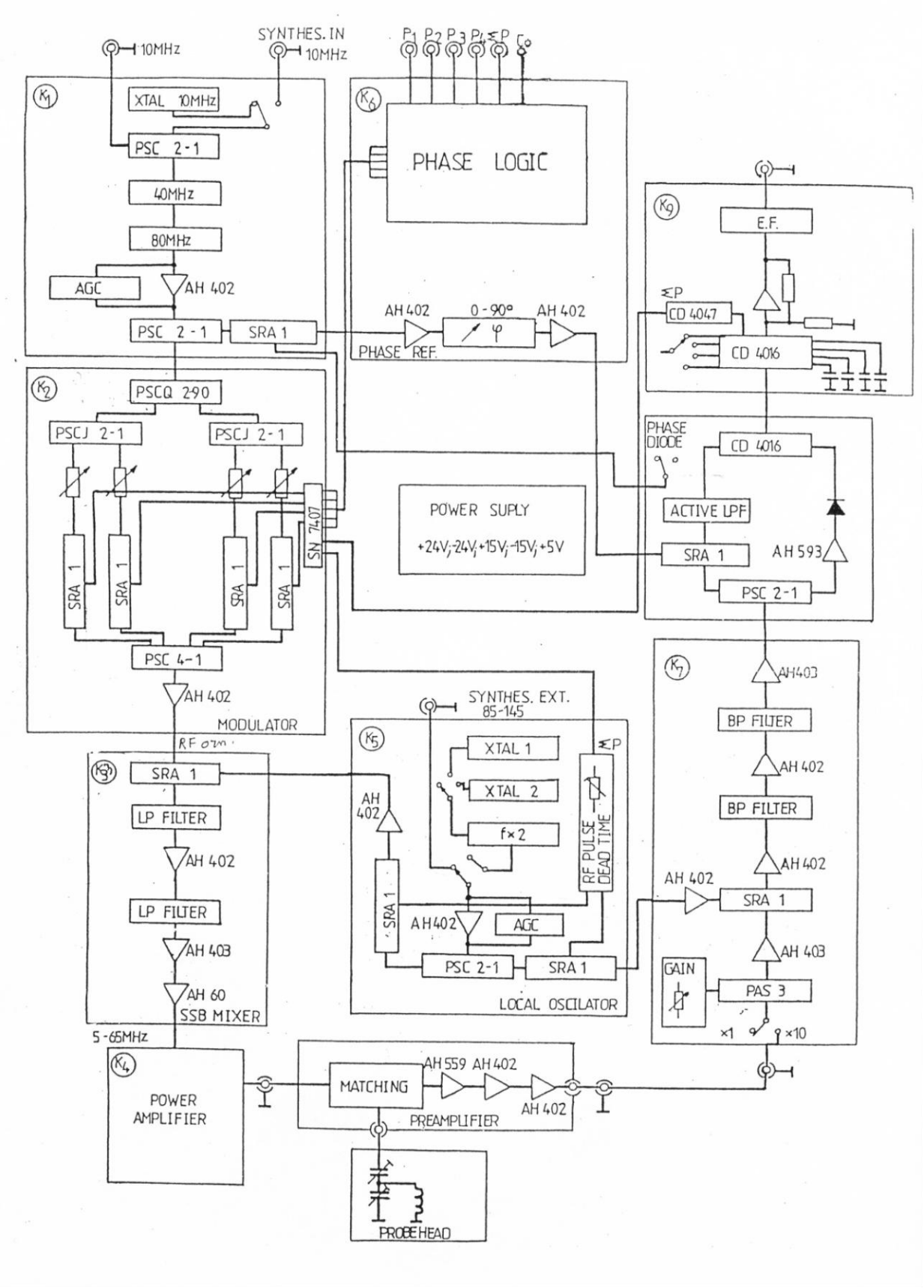
seria pomiarowa składała sie ze 120 punktów pomiarowych (9.8 – 1430 μs), podzielonych na trzy grupy:

(i) 9.8 – 25 μs , 40 punktów, z odstępem czasowym 0.4 μs,

(ii) 25 – 225 μs, 40 punktów, z odstępem czasowym 5 μs,

(iii) 225 – 1430, 40 punktów, z odstępem czasowym 30 μs.

Pomiary były przeprowadzane w temperaturze pokojowej. Próbki uwadniano z fazy gazowej. Do projektowania impulsów służył komputer typu IBM-PC, pracujący w systemie operacyjnym DOS. Posługiwano się programem TEX dostarczonym przez producenta spektrometru. Zaimplementowana sekwencja przekazywana była do programatora impulsów, który generował schodkowy sygnał elektryczny o amplitudzie 5 V i zadanym czasie trwania. W czasie nadawania impulsu z generatora w module K1otrzymywany jest sinusoidalny sygnał o częstotliwości 10 MHz, który po dostarczeniu do powielacza częstotliwości modulowany jest do sygnału o częstotliwości 80 MHz. Następnie, sygnał ten zostaje doprowadzany do segmentu K2, gdzie jest rozdzielany do czterech mieszaczy i modulowany amplitudowo impulsami prostokątnymi wytwarzanymi przez programator impulsów. Dalej impulsy wysokiej częstości pochodzące z modułu K3 są mieszane z sygnałem o częstotliwości 110 MHz, z bloku K5. Po przejściu przez filtr dolnoprzepustowy powstaje sygnał 30 MHz, który jest wzmacniany i przesyłany do głowicy pomiarowej (Probehead) będącej elementem łączącym tor nadawczy i odbiorczy. Głowica, umieszczona między nabiegunnikami elektromagnesu wytwarzającego pole B_0 stanowi układ LC, w którego cewce umieszcza się próbkę. Dostraja się ją do częstotliwości rezonansowej za pomocą kondensatora o zmiennej pojemności. Sygnał siły elektromotorycznej indukowanej przez magnetyzację jądrową wirującą z częstością larmorowską z głowicy pomiarowej, po wzmocnieniu w przedwzmacniaczu, trafia do modułu K7, gdzie jest mieszany z sygnałem o częstotliwości 110 MHz. Za pomocą filtra pasmowoprzepustowego zostaje wyodrębniony sygnał o częstotliwości 80 MHz, który jest dalej wzmacniany przy użyciu segmentu GAIN. W bloku K8 następuje demodulacja synchroniczna lub diodowa, natomiast w module K9 (będącym filtrem dolnoprzepustowym) następuje przygotowanie sygnału do wyjścia. W wyniku dzielenia elektronicznego otrzymany sygnał jest odfiltrowany od częstotliwości Larmora przez co uzyskuje się jego obwiednię, nazywaną zanikiem swobodnej precesji (FID), która podawana jest bezpośrednio na oscyloskop oraz zbierana przez kartę cyfrowego oscyloskopu Compuscope 2000 komputera PC 80386.



Rycina 19. Schemat blokowy regulatora spektrometru impulsowego WNS HB65

Spektrometria

Badania NMR w domenie częstotliwości wykonywane były przy użyciu spektrometru Bruker Avance III, OneBay, Bruker Biospin (Ryc. 20). Częstotliwość rezonansowa dla protonów wynosi 300.14 MHz. W skład układu pomiarowego wchodzą także: głowica pomiarowa wysokiej mocy, magnes nadprzewodzący typu *wide bore* o wartości indukcji pola magnetycznego B_0 = 7 T (średnica otworu 89 mm), stacja robocza z oprogramowaniem TopSpin 3.0 oraz regulator temperatury. Magnes nadprzewodzący umieszczony jest w ciekłym helu (temperatura około -270°C) oraz otoczony płaszczem izolującym, zawierającym ciekły azot (o temperaturze poniżej -196°C).

Rycina 20. Spektrometr Bruker Biospin

Spektrometr ten obejmuje cztery części: blok kontroli akwizycji, przedwzmacniacz wysokiej wydajności, system wzmacniaczy oraz system kontroli magnetycznej. Blok kontroli akwizycji składa się z części, która generuje impulsy o częstotliwościach radiowych wykorzystywane do pobudzenia próbek oraz z części odbierającej sygnał z badanej próbki. Zadaniem przedwzmacniacza wysokiej wydajności jest transmisja i filtracja uprzednio wygenerowanego i wzmocnionego sygnału do cewki nadawczo – odbiorczej (tor nadawczy),w której umieszczona jest próbka. Jednostka ta wzmacnia również sygnał generowany przez próbkę po pobudzeniu jej odpowiednimi impulsami (tor odbiorczy). System wzmacniaczy wzmacnia sygnały generowane w bloku akwizycji. System kontroli magnetycznej kontroluje stałe pole magnetyczne, jest odpowiedzialny za jego stabilizację oraz kompensuje niejednorodności. Czas martwy spektrometru wynosił 6.5 μs, szerokość pasma - 500 kHz, wzmocnienie impulsów - 400 W, długość impulsu π/2 była równa 2.2 μs, a

czas repetycji - 1.5 s. Dla pomiarów w temperaturze pokojowej utrzymywano temperaturę na tym samym poziomie, czyli 22°C. Do ochładzania próbki w pomiarach w funkcji temperatury wykorzystano strumień azotu gazowego odparowywanego grzałką zawieszoną w dewarze z ciekłym azotem. Sterownik temperatury Eurotherm umożliwiał stabilizację temperatury z dokładnością do 0.1°C. Otrzymane dane analizowane były za pomocą programu dostarczonego przez producenta spektrometru TopSpin 3, oraz za pomocą programu OriginPro 7.0.

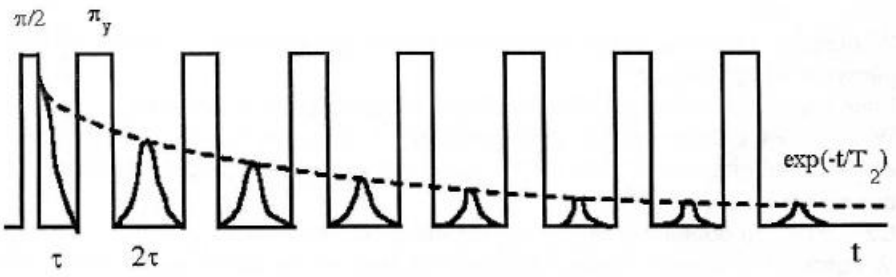
Pomiary pojedynczych widm

Pojedyncze widma w funkcji uwodnienia otrzymywano dzięki rejestracji sygnału FID po potraktowaniu próbki pojedynczym impulsem $\pi/2$. Moc impulsu była równa 400 W, a czas repetycji 1.5 s. Widmo powstawało z 40 akwizycji. Pojedynczy czas pomiaru wynosił około 3 minut.

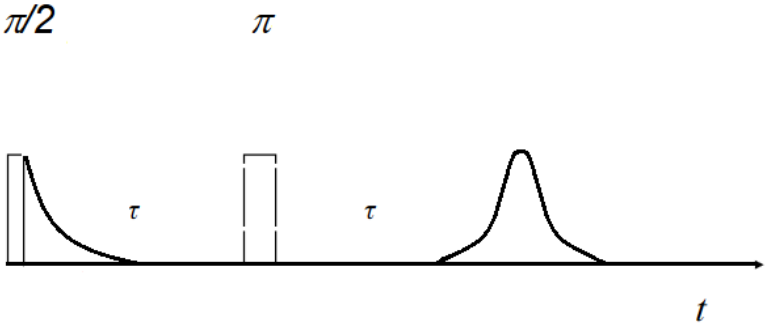
Sekwencja echa Hahna oraz sekwencja Carra-Purcella-Meibooma-Gilla (CPMG)

Zanik sygnału swobodnej precesji FID daje nam bezpośrednią informację dotyczącą efektywnego czasu relaksacji poprzecznej T_2^*. Czas ten jest skrócony przez niejednorodności zewnętrznego pola magnetycznego. Dla frakcji stałej efekt ten jest niewielki, natomaist dla protonów cieczowych jest znaczący. Do wyznaczenia faktycznego czasu T_2 sygnału cieczowego używa się sekwencji Carra-Purcella-Meibooma-Gilla (CPMG). W czasie τ po impulsie $\pi/2$ następuje seria impulsów π przesuniętych w fazie o 90^o oddalonych od siebie o czas 2τ (Ryc. 21). W przerwach między impulsami rejestrowane są sygnały echa spinowego. Wskutek relaksacji spinowo-spinowej, kolejne echa spinowe mają coraz mniejszą amplitudę (Ryc. 21). Ich obwiednia wyznacza sygnał NMR zapisany następującym wzorem:

$$FID_L(t) = Le^{-\frac{t}{T_{2L}}} \tag{128}$$



a)



b)

Rycina 21. Sekwencja impulsów a) w metodzie CPMG oraz b) w metodzie echa Hahna, wg. Hahn (1950)

W moich pomiarach używałam prostszej metody echa Hahna, w której po impulsie $\pi/2$ następuje tylko jeden impuls π. Przyczyną był bardzo dobry stosunek sygnału do szumu i relatywnie krótkie wartości czasów relaksacji, co nie powodowało nadmiernego obciążenia czasowego spektrometru. Odstęp τ wynosił 30 μs, co oznacza, że dla najkrótszego odstępu między impulsami echo było obserwowane po czasie 60 μs.

W zastosowanej sekwencji echa Hahna podawane są jedynie dwa impulsy: π /2 oraz - po zadanym przez użytkownika czasie τ - impuls π, a następnie po stosownym czasie następuje rejestracja widma. Powtarza się tę sekwencję dwóch impulsów ze zwiększającym się odstępem czasowym między impulsami π /2 i π. Odstęp ten początkowo zwiększany był co 30 μs (16 cykli), potem co 60 μs (kolejne 22 cykle), aż w końcu co 120 μs (kolejne 50 cykli) i 360 μs (kolejne 22 cykle). Łącznie podano 110 sekwencji impulsów.

Istotna różnica między faktycznym czasem relaksacji poprzecznej (wyznaczonym za pomocą sekwencji CPMG lub echa Hahna), a czasem efektywnym (wyznaczonym z szerokości połówkowej linii) wynika z oddziaływania jąder wodoru z lokalnymi polami magnetycznymi wytworzonymi przez obecne w matrycy stałej paramagnetyki (Barnhart, Berk 1986). Obecność jonów paramagnetycznych powoduje poszerzenie linii, wpływa na skrócenie czasu relaksacji poprzecznej T_2, oraz przesunięcie jej położenia. Przy dużej koncentracji

jonów, czas relaksacji spinowo-spinowej T_2 może być skrócony na tyle, że staje się krótszy od czasu martwego spektrometru, co uniemożliwia jego obserwacje (6.5 μs dla spektrometru 300 MHz).

Sekwencja zaniku inwersji (IR) - spektroskopia relaksacyjna

Sekwencja zaniku inwersji (IR) służy do wyznaczania czasu relaksacji podłużnej T_1. Polega to na potraktowaniu jąder kolejno impulsami π i $\pi/2$ rozdzielonych czasem τ. Pierwszy z nich obraca magnetyzację przeciwnie do zwrotu osi *z* laboratoryjnego układu odniesienia, drugi zaś przerzuca magnetyzację na płaszczyznę *xy*. Między impulsami (w czasie τ) przebiega relaksacja podłużna jądrowych momentów magnetycznch. Czas T_1 można wyznaczyć na podstawie zależności pola pod powierzchnią rejestrowanego widma po drugim impulsie ($\pi/2$) od czasu między impulsami τ.

2.2.4. Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)

W celu porównania szczegółowej budowy ciała larwy w różnym stanie uwodnienia przeprowadzono obserwacje z zastosowanie elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM). Najpierw pobrano larwę w stanie anhydrobiozy, a inne wysuszone osobniki z jednej serii umieszczono w pojemniku z wodą kranową o temperaturze pokojowej.

Potem je wyciągano z tego pojemnika w różnych etapach uwodnienia po następujących okresach czasu: a) przebywające w wodzie przez 60 minut, 3) przebywające w wodzie przez 150 minut, przebywające w wodzie 180 min., całkowicie uwodnione, aktywne.

Poszczególne próby odpowiednio oznaczone zostały następnie przygotowane do obserwacji w SEM wg standardowo stosowanej procedury w takich przypadkach. Najpierw próbki utrwalano przez 2 godziny w 2,5% roztworze glutaraldehydu, w 0,1M buforze kakodylowym. Następnie je płukano 2 razy po 10 minut w roztworze soli fizjologicznej PBS i odwadniano we wzrastających stężeniach alkoholu etylowego (POCH). Potem, preparaty umieszczono w przejściowej cieczy (100% acetonu) i przeniesiono do suszarki punktowej (CPD E3000/E3100, Quorum Technologies). Tak przygotowane próbki przymocowywano do tacek, a następnie pokryto je złotem technicznym za pomocą napylarki jonowej JFC-1100E (JEOL). Zabieg ten wykonuje się w celu poprawy jakości zdjęć i zniwelowania niekorzystnego efektu związanego ze skondensowaną wiązką elektronów w komorze mikroskopu. Gotowe do obserwacji próbki wkładano do odpowiedniej komory SEM i je obserwowano, rejestrując zdjęcia struktur morfologicznych badanych larw. Był to skaningowy mikroskop elektronowy firmy JEOL 100 SX, JSM - 5410, pracującego przy

napięciu przyspieszającym 15 kV. Zarówno, sam proces przygotowania larw do obserwacji w SEM, jak również ich obserwacje i wykonanie zdjęć cyfrowych zrealizowano w Pracowni Mikroskopii Elektronowej i Transmisyjnej Zakładu Cytologii i Histologii w Instytucie Zoologii i Badań Biomedycznych Wydziału Biologii UJ.

2.2.5. Mikrotomografia komputerowa

W celu precyzyjnego zobrazowania zmian ciała larwy w stanie anhydrobiozy oraz w trakcie procesu hydratacji wykonano mikrotomogramy. Pomiary te zostały wykonane na dwóch różnych urządzeniach. Larwy w stanie wysuszonym (anhydrobiotyczne) zostały zobrazowane za pomocą urządzenia Nanotom S w Laboratorium Mikro i Nano Tomografii na Wydziale Fizyki i Informatyki Stosowanej (Akademia Górniczo-Hutnicza w Krakowie). Natomiast larwy w różnych etapach uwodnienia, a także wysuszone analizowano za pomocą mikrotomografu komputerowego SkyScan 1172 (Bruker), przeznaczonego do prowadzenia badań materiałowych oraz biomedycznych w Zakładzie Fizyki Medycznej UJ.

Aparat Nanotom S (General Electric) wyposażony jest w lampę rentgenowską o mocy 57 W (15 W na „targecie") zasilaną napięciem do 180 kV. Pozwala to na pomiary szerokiego spektrum materiałów od miękkich tkanek biologicznych po metale i ich stopy. Lampa ta jest typu otwartego z wymienną katodą oraz okienkiem. Okienko stanowi zewnętrzną ściankę lampy, przez którą wydostaje się promieniowanie rentgenowskie, jednocześnie od wewnętrznej strony jest pokryta wolframowym „targetem". Maksymalna rozdzielczość „wokseli" (w zależności od wielkości obiektu) jest mniejsza od 500 nm (0,5 μm). Larwy w stanie anhydrobiozy, w żaden sposób nie modyfikowane przed pomiarami, były mierzone pojedynczo.

Mikrotomografem komputerowym SkyScan 1172 zmierzono larwy suche bez modyfikacji oraz uwadniane w wodzie kranowej larwy w różnych etapach hydratacji: po 30 minutach, 60 min. i 180 min. Najpierw wyciągano je z wody, a następnie, aby zapobiec wysuszaniu podczas pomiarów, moczono w oleju. Potem umieszczano je na podkładce i pokrywano folią z roztworu cykloheksanolu z formvarem, aby zapobiec wysuszaniu podczas pomiarów. Tak przygotowane larwy wkładano do tego mikrotomografu wyposażonego w lampę rentgenowską o mocy 8 W i maksymalnym napięciu 80 kV. Jest to w pełni bezpieczne urządzenie,nie wymagające dodatkowych osłon przed promieniowaniem. Moc dawki nie przekracza 1μSv/h. Czas pomiaru wynosi 32 minuty przy napięciu 40 keV. Podczas pomiarów wielkość piksela na obrazie wynosiła 6 μm. Ten mikrotomograf , obsługiwany

przez komputer DELL Precision T5400 z systemem operacyjnym Windows 7 posiada własne oprogramowanie które umożliwia rekonstrukcję obiektów na podstawie zmierzonych projekcji oraz generuje trójwymiarowe wizualizacje.

2.2.6. Morfometria

Larwy w stanie anhydrobiozy umieszczano w szalce Petriego, a następnie zalewano je różnymi rodzajami wody tak, aby były całkowicie zatopione. Potem całość umieszczano na stoliku pod obiektywem mikroskopu stereoskopowego typu NIKON SMZ1500, wyposażonego w kamerę cyfrową podłączoną do komputera wyposażonego w program NIS-elements BR, który służy do archiwizacji zdjęć i pomiarów ciała. Na wstępie wykonano zdjęcie larwy wysuszonej (Ryc. 22). Kolejne robiono i zapisywano co 2 minuty do czasu, kiedy larwa była już w pełni uwodniona, na co wskazywała jej aktywność: poruszanie się całego ciała oraz jego przydatków. Larwy fotografowano z góry w rzucie poziomym. Każde zdjęcie zostało wykonane w powiększeniu A1x i jakości cyfrowej 2560x1920 pikseli. Dla każdego rodzaju wody (destylowana, kranowa, mineralna niegazowana (Tab. 3)) procedura ta była wielokrotnie powtarzana. Następnie, na każdym zdjęciu mierzono powierzchnię i długość ciała larwy. Długość mierzono, zaznaczając linię krzywą wzdłuż środka ciała larwy od początku głowy do końca ostatniego segmentu odwłoka. Natomiast powierzchnię określano w oparciu o odmienny od wody kolor ciała larwy, którego kontury rejestrował i obliczał wielkość program NIS-elements BR.

Tabela 3. Odczyn i skład chemiczny różnych rodzajów wody użytej do uwadniania larw *Polypedilum vanderplanki* w warunkach laboratoryjnych; wody z kranu pochodzi z ujęcia Raba w Krakowie; wodę mineralną niegazowaną o nazwie „Cisowianka" kupiono w sklepie; woda destylowana pochodziła z laboratorium

Parametr	**Woda z kranu**	**Woda mineralna**
Odczyn (pH)	7.76	6,80
Utlenialność z $KMnO_4$ [mg/dm3]	0.015	0.027
Chlorki [mg/dm3]	20.6	<5
Amonowy jon [mg/dm3]	0.05	0,06
Azotyny [mg/dm3]	<0.01	0.013
Azotany [mg/dm3]	4.9	2.4
Twardość ogólna [mg/dm3]	160	430
Wapń [mg/dm3]	40.1	130.3
Magnez [mg/dm3]	6	21.9
Żelazo ogólne [mg/dm3]	0.04	<0.02
Siarczany [mg/dm3]	30	<10
Glin [mg/dm3]	<0.008	<0.008

Analizowano, zarówno larwy żywe, które się uaktywniały po uwodnieniu oraz martwe, które w tym samym czasie po uwodnieniu jak żywe, nie uaktywniały się.

Rycina 22. Zdjęcie wysuszonych larw *Polypedilum vanderplanki* wykonane w stereoskopowym mikroskopie optycznym NIKON SMZ1500

Badania przeprowadzono łącznie na 78 larwach, w tym na 57 żywych i 21 martwych. W wodzie destylowanej uwodniono 30 osobników (25 żywych i 5 martwych), w wodzie kranowej - 31 (18 żywych, 13 martwych), a w mineralnej niegazowanej - 17 (14 żywych i 3 martwe). Ze względów technicznych, kiedy np. jakaś larwa się obróciła i pomiar nie był miarodajny, to go odrzucano; w sumie odrzucono pomiary 10 larw (6 żywych i 4 martwych). Larwy martwe odwracały się pod wpływem aktywności ruchowej larw żywych.

Dane z pomiarów wielkości larw z poszczególnych etapów uwodnienia w różnych rodzajach wody zostały zgromadzone w programie MS Office Excel, a następnie poddano je analizie za pomocą programu OriginPro 2015. Zarówno zmiany długości, jak i powierzchni ciała larwy w czasie uwodnienia mierzono, porównując kolejne etapy pomiarów wielkości w odniesieniu do pierwszego pomiaru.

W celu kontroli poprawności przeprowadzenia pomiarów larw wykonano dodatkowe, kontrolne pomiary, mierząc trzykrotnie każdą długość i powierzchnię jednego osobnika, a następnie obliczono niepewność każdego pomiaru i porównano je między sobą.

Dla każdego rodzaju wody oraz dla poszczególnych prób wykonano modele matematyczne danych. Zostały one oparte na 5 lub 10 pomiarach przeprowadzonych dla jednej próby. Modele powstały w wyniku uśrednienia pomiarów dla kilku larw z danych prób w określonym czasie uwodnienia. Oznacza to, że np. po 2 minutach od umieszczenia larw w wodzie dokonano pomiarów dla kilku różnych osobników. Dane te zostały następnie przeliczone na procenty i uśrednione dla wszystkich mierzonych osobników. Za ostatni pomiar przyjęto ten, dla którego otrzymano średni czas uaktywnienia się larw w danej próbie. Do uzyskanych modeli również dopasowano odpowiednią funkcję i porównano jej współczynniki ze współczynnikami uśrednionymi dla wielu pomiarów.

2.2.7. Numeryczne opracowanie danych

Dane pomiarowe pochodzące z pomiarów NMR, kinetyki hydratacji, izotermy sorpcyjnej oraz morfometrii analizowano przy pomocy komercyjnie dostępnego oprogramowania OriginPro 2015 oraz Microsoft Office Excel (arkusz kalkulacyjny dla systemów Windows).

Program OriginPro umożliwia pozyskiwanie, analizę i wizualizację danych pomiarowych, wyposażony jest we wszystkie procedury dostępne w środowisku programu Origin i dodatkowo w grupę narzędzi do zaawansowanej analizy z zakresu dopasowania krzywych i powierzchni, dodatkowe procedury analizy statystycznej oraz procedury z zakresu

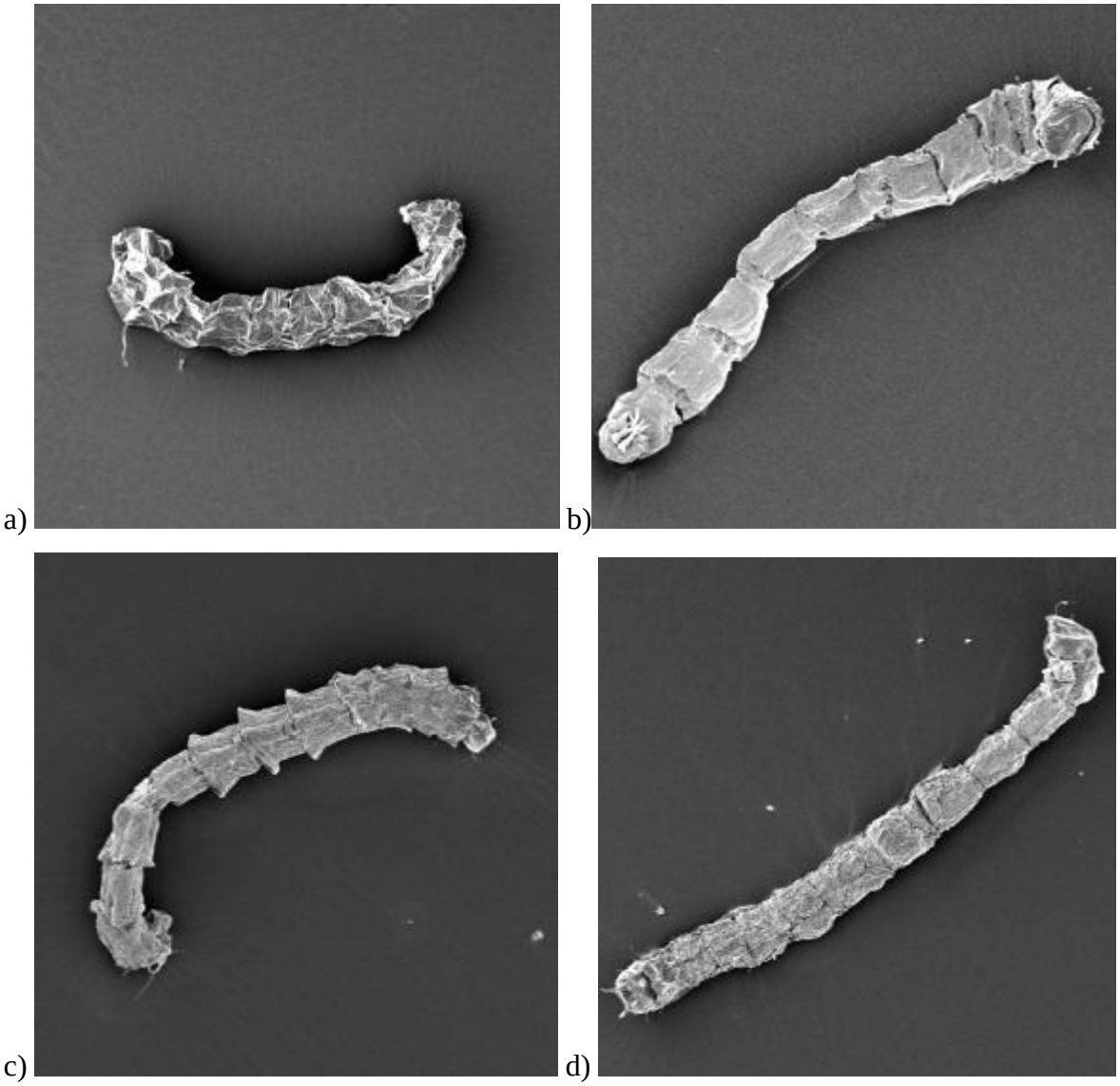
przetwarzania sygnałów i analizy obrazów. Posiada wbudowane narzędzia do importu danych oraz ich przetwarzania. Pozwala na dopasowanie wielu wbudowanych funkcji jak i stworzenie własnych. Dane pobrane i przetwarzane można wizualizować na każdym etapie analizy. Użytkownik ma do dyspozycji j zestaw wielu typów wykresów dwu- i trójwymiarowych. Przy użyciu programu OriginPro 2015 możliwe jest dopasowanie zarówno funkcji Gaussa jak i funkcji eksponencjalnych. Można również ustalić wartości wybranych parametrów.

3. Wyniki

3.1. Mikrogramy SEM larw żywych w różnych etapach uwodnienia

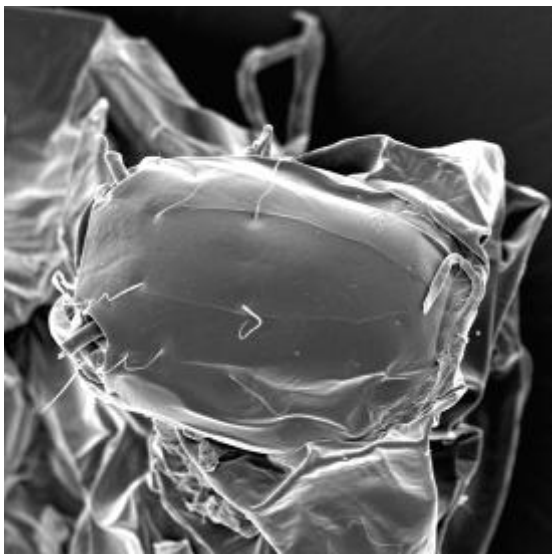
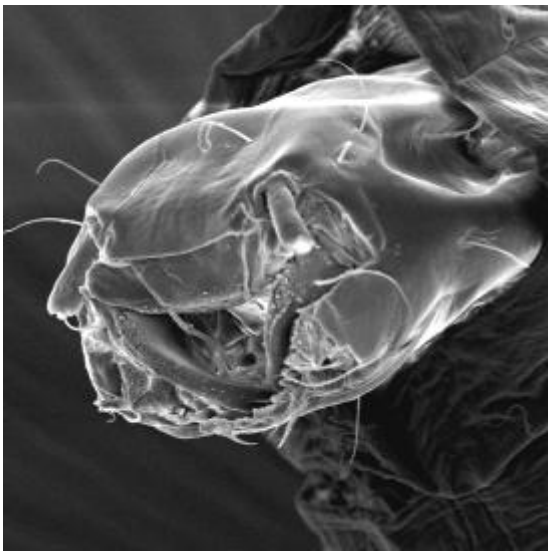
Mikrogramy, w zakresie powiększeń od 15 do 5000 razy, wykonano w celu porównania morfologii ciała larwy *Polypedilum vanderplanki* w różnych etapach uwodnienia w wodzie z kranu. Ryc. 23a obrazuje larwę suchą w stanie anhydrobiozy, a następne zdjęcia larwy uwodnione odpowiednio po 60 (Ryc. 23b), 150 (Ryc. 23c) i 180 minutach (Ryc. 23d). Ostatni mikrogram przedstawia larwę całkowicie uwodnioną i aktywną, przy widocznych procesach życiowych, np. ruch narządów gębowych, czy skurcze ciała oraz przemieszczanie się. Na obrazach tych widać zmiany struktury ciała larwy anhydrobiotycznej poczas uwadniania.

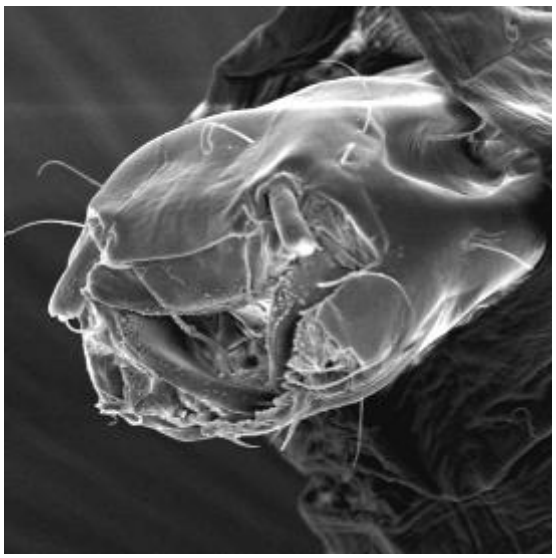
Ciało larwy suchej jest sztywne, lekko wygięte, wydłużone i pomarszczone, bez widocznej segmentacji, charakterystycznej dla larw wielu różnych wolnożyjących muchówek, a w szczególności tych z rodziny Chironomidae. Głowa larwy anhydrobiotycznej jest słabo widoczna, gdyż jest jakby wciśnięta w pierwszy segment części tułowiowej (przedtułowie) ciała. Wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia, segmentacja ciała larwy staje się widoczna coraz lepiej , wzrasta objętość i elastyczność ciała, a głowa staje się lepiej widoczna. Ciało larwy przyjmuje bardziej „wyprostowany" kształt (Ryc. 23b-d). Ostatecznie uwodniona larwa odzyskuje wygląd sprzed dehydratacji (już wcześniej szczegółowo opisany: rozdział 1. Wstęp).



Rycina 23. Porównanie budowy ciała larwy *Polypedilum vanderplanki* w różnym stanie uwodnienia w wodzie z kranu (SEM, 35X): a) larwa sucha w stanie anhydrobiozy, ciało pomarszczone, niewidoczne segmentacja, słabo widoczna głowa; b) po 60 minutach uwodnienia, c) po 150 minutach uwodnienia; d) po 180 min (całkowite uwodnienie)

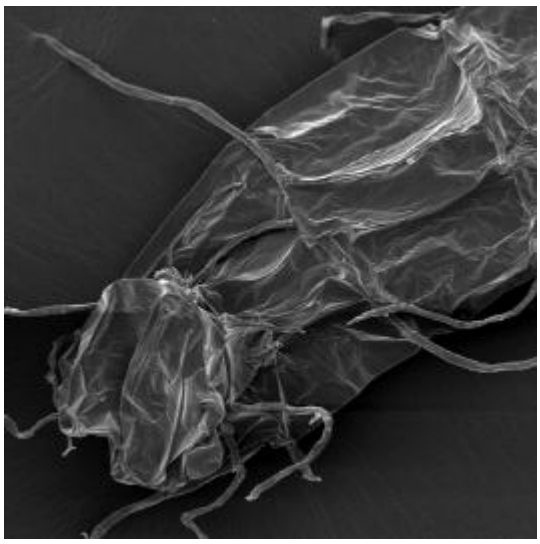
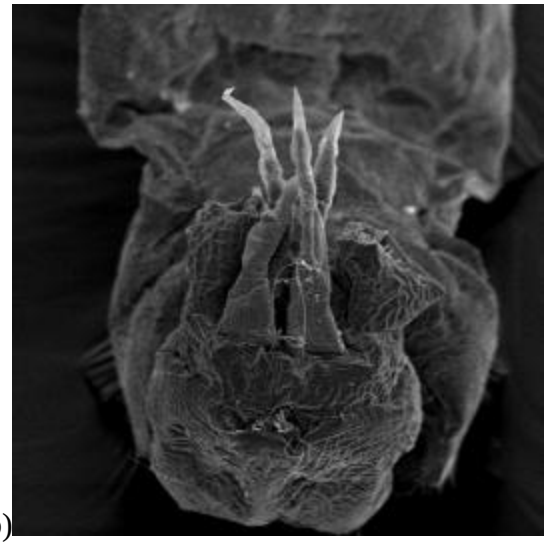
Wyniki przeprowadzonych badań za pomocą SEM wskazują, że podczas uwadniania puszka głowowa larwy nie ulega większym zmianom (Ryc. 24a-d). Głowa jest najbardziej twardą częścią ciała larwy, jej zewnętrzna osłona, tworząca puszkę głowową jest utworzona ze względnie grubej i sztywnej kutikuli (oskórka) głównie z chityny o właściwościach hydrofobowych. Dlatego, głowa prawdopodobnie nie chłonie lub przepuszcza przez swoją ścianę zaledwie niewielkie ilości wody (Ryc. 24a-d).

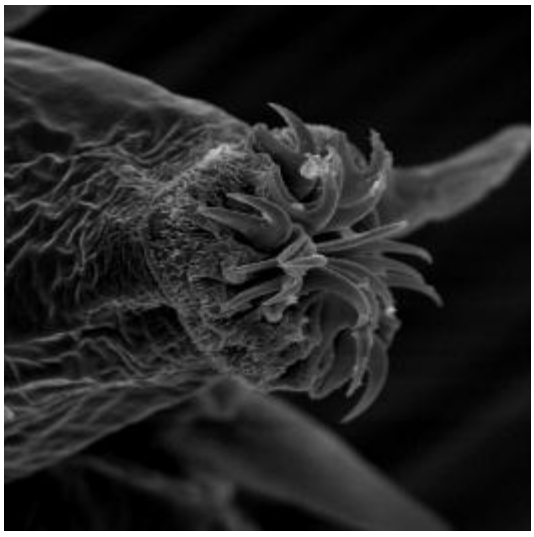
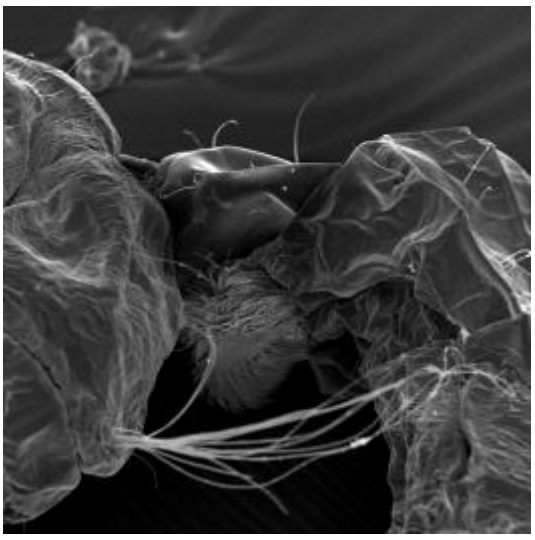
a)  b) 

c)  d)

Rycina 24. Porównanie głowy larwy *Polypedilum vanderplanki* w różnym stanie uwodnienia w wodzie z kranu: a) larwa sucha w stanie anhydrobiozy, powiększenie 200X, widok z góry, pozycja boczna puszki głowowej, o gładkiej kutikuli, z lewej strony widoczne dwa czułki larwalne; b) po 60 minutach uwodnienia, powiększenie 350X, widok przednio-boczny z lewej strony głowy, widoczny czułek,, warga górna i żuwaczki; c) po 150 minutach uwodnienia, powiększenie 350X, widok pdobny jak w przypadku „b"; d) po 180 min (całkowite uwodnienie), powiększenie 350X, widok od strony przednio-brzucznej, widoczne od góry dwa czułki larwalne, żuwaczki, warga górna i warga dolna z wyrostkami

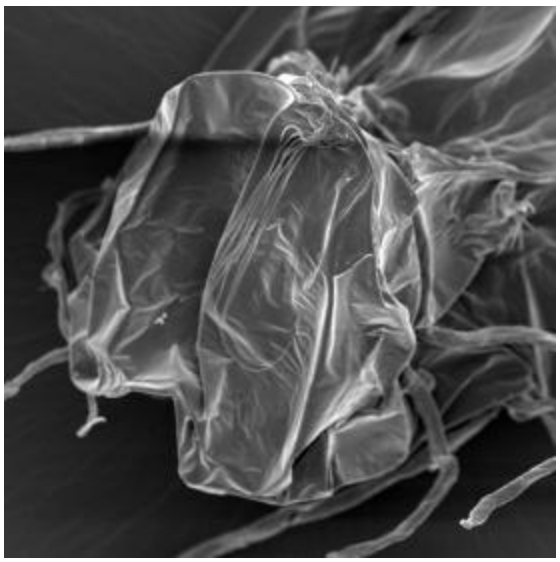
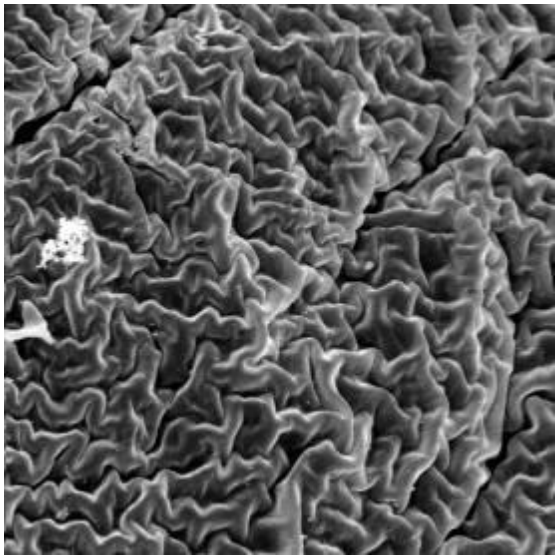
Z przodu i z tyłu ciała larwy widoczne są różne przydatki służące do przemieszczania się, przyczepiania się do podłoża i zdobywania pokarmu. Na odwłoku znajdują się nitkowate skrzelotchawki, a na jego ostatnim segmencie – przydatki odwłokowe (Ryc. 25).

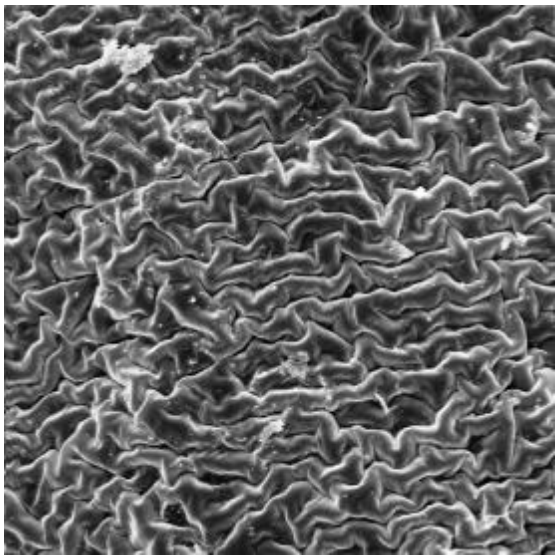
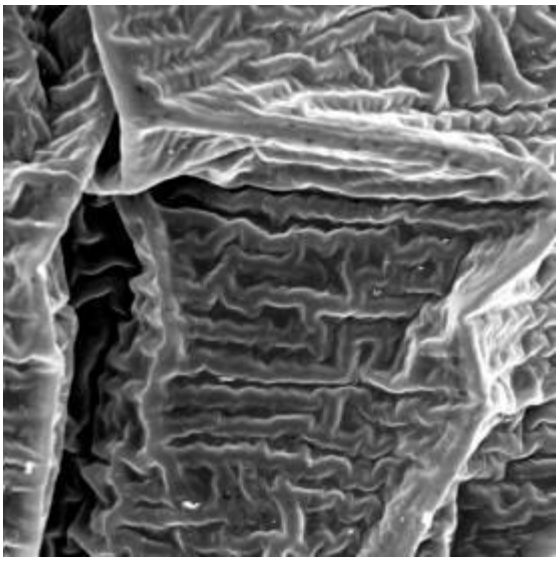
a)  b) 

c)  d) 

Rycina 25. Części ciała larwy *Polypedilum vanderplanki* w różnym stanie uwodnienia w wodzie z kranu: a) larwa sucha w stanie anhydrobiozy, powiększenie 100X – widać nitkowate wypustki na odwłoku; b) po 60 minutach uwodnienia; powiększenie 200X, koniec odwłoka widoczny od strony brzusznej, widoczne przydatki odwłokowe,; c) po 180 minutach uwodnienia, –, powiększenie 750X, widoczna przyssawka z hakowatymi wyrostakami z tyłu odwłokA; d) po 180 min powiększenie 200X, widok od strony grzbietowej, pierwszy segment tułowia (przedtułów) tworzy jakby kołnierz osłaniający głowę

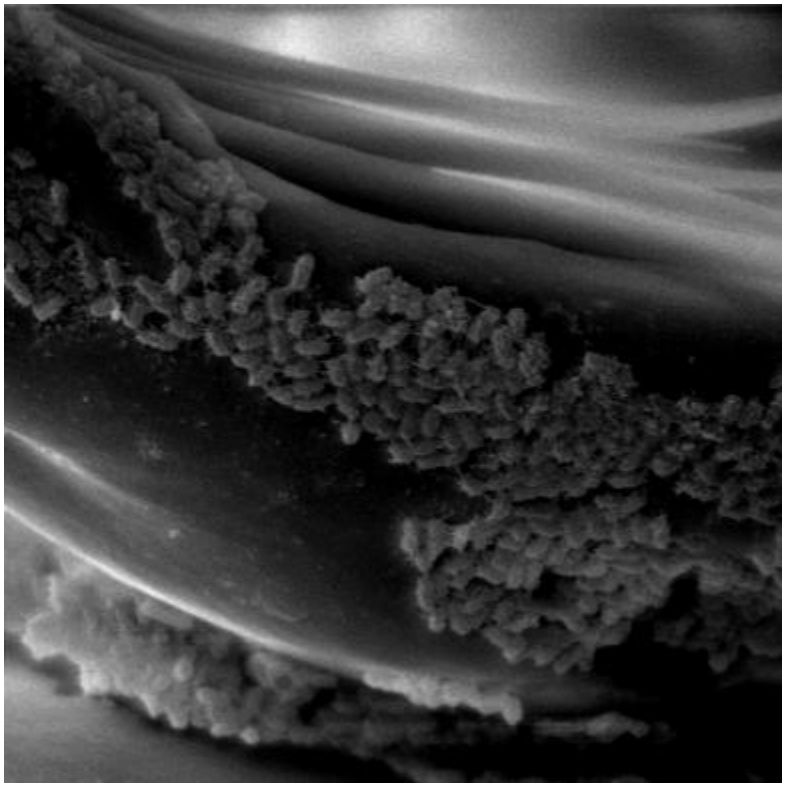
Ilustarcje obrazujące powierzchnię ciała uwadnianej larwy wskazują, że w miarę hydaratcji oskórek, z bardzo pomarszczonego staje się „gładszy" i tworzą się jakby fałdki (Ryc. 26).

a)  b) 

c)  d) 

Rycina 26. Porównanie powierzchni odwłoka larwy *Polypedilum vanderplanki* w różnym stanie uwodnienia w wodzie z kranu: a) koniec odwłoka, pow. 200X; b,c,d),); a) suchej w stanie anhydrobiozy, ; b) po 60 minutach uwodnienia; c) po 150 minutach uwodnienia; d) po 180 min (całkowite uwodnienie); obrazy na fot. b.c i d powiększone 2000X

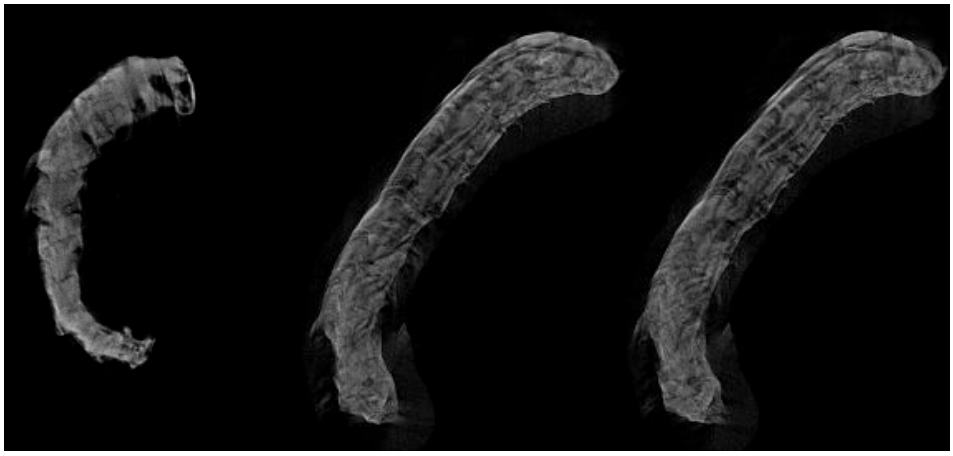
Na powierzchni ciała uwadnianej larwy zaobserwowano liczne mikroorganizmy, prawdopodobnie kultury bakterii lub zarodniki grzybów, widoczne głównie w okolicy głowy (Ryc. 27). Mogą być one współodpowiedzialne za efekt spadku masy obserwowany w trasach hydratacyjnych z fazy gazowej.



Rycina 27. Bakterie widoczne w okolicach głowy larwy *Polypedilum vanderplanki;* wykonano dla larwy uwadnianej przez 150 minut, powiększenie 5000X

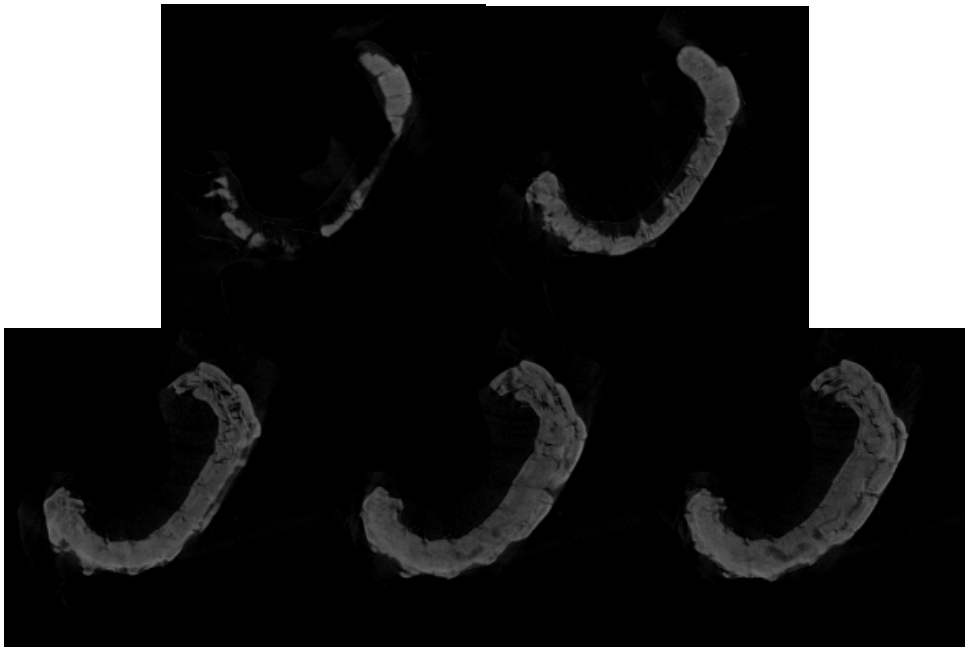
3.2. Mikrotomografia rentgenowska

Pomiary mikrotomograficzne larw wykonano dla obserwacji procesu hydratacji larw dodatkową metodą, określenia schematu morfologicznego suchej larwy, jak również monitorowania zmian morfologicznych podczas procesu hydratacji. Zdjęcia larw wykonano zarówno wzdłuż podłużnej osi ciała, jak również wzdłuż przekrojów poprzecznych. Odcienie ciemne na przekrojach podłużnych wskazują miejsca ciała larwy, przez które następuje mniejsze pochłanianie wody, a miejsca jasne, jej większe przepuszczanie do ciała ze środowiska zewnętrznego (Ryc. 28-33). Uzyskane obrazy wskazują, że największą zmienność w pochłanianiu wody przez larwę obserwuje się w środkowych rejonach jej ciała. Prawdopodobnie dlatego, że w tych rejonach zlokalizowana jest większość najbardziej aktywnych narządów ciała larwy, takich jak: środkowa część jelita wraz z żołądkiem i cewkami Malphigiego, narządy rozrodcze oraz grzbietowe naczynie kriwonośne (serce owada).



Rycina 28. Przekroje podłużne larwy *Polypedilum vanderplanki*, uwadnianej przez 120 minut; widoczne: przekrój najbliżej oskórka larwy, przekrój bliżej środka, przekrój larwy przez jej środek.

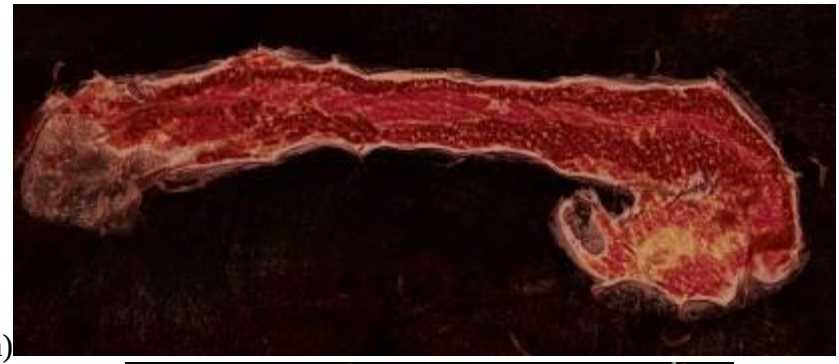
Również obrazy z z przekrojów poprzecznych larwy wskazują na różny poziom pochłaniania wody przez różne części jej ciała. W środku przekroju poprzecznego widać ciemny, duży punkt przedstawiający przekrój poprzeczny przewodu pokarmowego larwy *P. vanderplanki* (Ryc. 34). Jego intensywne zaciemnienie wskazuje, że w jelicie jest względnie nieduże pochłanianie wody z otoczenia przez uwadniająca się larwę ze stanu anhydrobiozy.



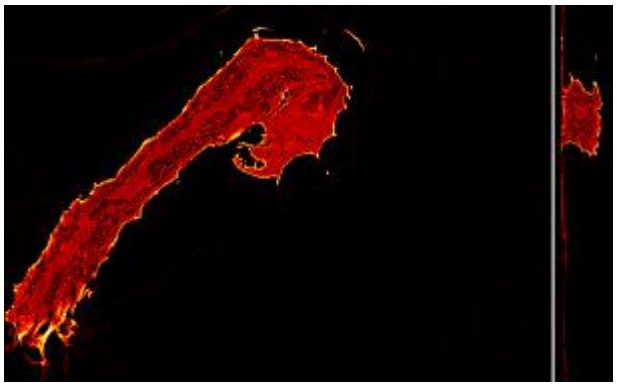
Rycina 29. Przekroje podłużne larwy *Polypedilum vanderplanki* uwadnianej przez 120 minut w różnych odstępach czasu ; w początkowym etapie (pierwsza larwa z lewej od góry) widać, że głownie przedni odcinek ciała pochłania wodę, środkowa część i tylna jest w mniejszym stopniu zaangażowana w proces hydratacji

Ryciny 30-34 ukazują poszczególne części morfologiczne (głowa wraz z pozostałymi częściami ciała: tułów – pierwsze trzy segmenty za głową, oraz odwłok – pozostałe segmenty, oskórek (kutikula) wraz z jego strukturami zewnętrznymi; otwór gębowy i odbytowy) i anatomiczne (ciało tłuszczowe oraz jelito otoczone kutikulą w przednim i tylnym jego odcinku).

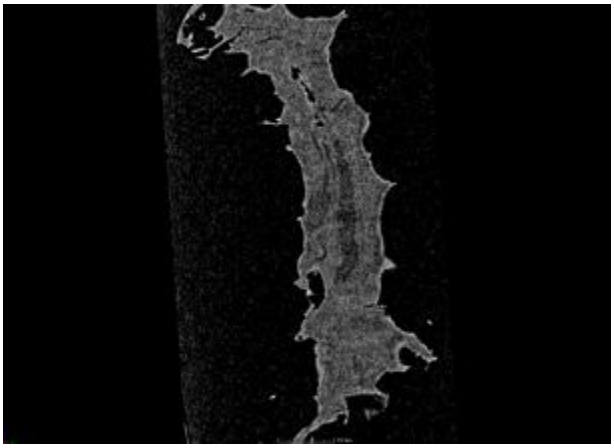
a)



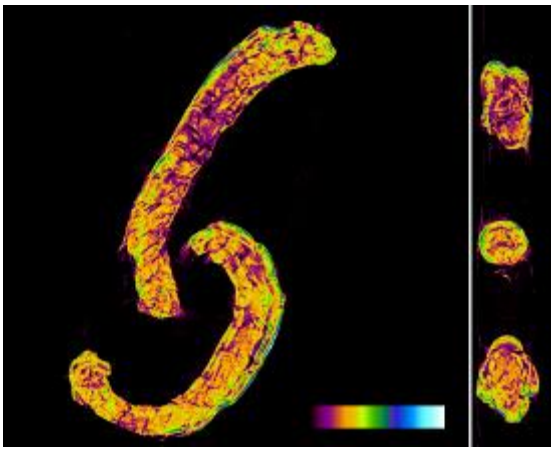
b)



Rycina 30. Przekrój podłużny (obraz a) oraz b) z lewej) i przekrój poprzeczny w części środkowej ciała (obraz z prawej strony b)) larwy *Polypedilum vanderplanki* uwadnianej przez 80 minut; widoczne: głowa (prawa strona larwy u dołu), oskórek (kutikula) – jeśniejsza linia zewnętrzna, ciało tłuszczowe – cimniejsza granulacja pod oskórkiem, jelito wypełnione treścią – jaśniejsze zabarwienie

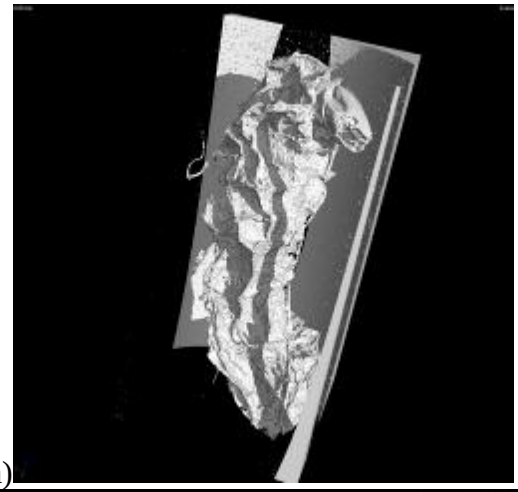


Rycina 31. Przekrój podłużny ciała wysuszonej larwy *Polypedilum vanderplanki*; widoczne: oskórek – jaśniejsza linia zenętrzna okalająca ciało larwy, głowa (strona górna) – ciemniejsza część, środkowa część jelita – ciemniejszy prążek w wewnątrz ciała



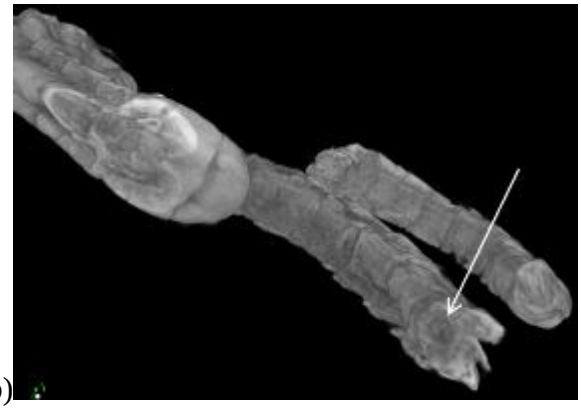
Rycina 32. Przekroje podłużne (obraz z lewej) i poprzeczne (obraz z prawej) ciała larwy *Polypedilum vanderplanki* uwadnianej przez 120 minut; na przekrojach poprzecznych widoczne są: okolice pierwszego segmentu ciała - pierwszy od góry odcinej środkowy larwy - środkowy obraz, okolice ostatniego segmentu – obraz dolny

a)



b)

Rycina 33. Widok larwy *Polypedilum vanderplanki*: a) zewnętrzny ciała larwy anhydrobiotycznej (całkowicie odwodnionej); b) – zewnętrzny larwy uwadnianej przez 120 minut z widoczną głową i segmentacją ciała

a) b) 

Rycina 34. Części ciała larwy *Polypedilum vanderplanki*: a) przedni odcinek z widocznym otworem gębowym (ciamny punkt) b) tylna część z widocznym otworem odbytowym (zaznaczono strzałką)

Analiza mikrotomograficzna była spójna z wcześniejszymi obserwacjami optycznymi za pomocą stereoskopowego mikroskopu optycznego (SMO) i skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Ciało larwy ochotki afrykańskiej, *P. vanderplanki* jest zróżnicowane na wyraźnie widoczną głowę, widoczną nawet w stanie całkowitego odwodnienia (anhydrobioza) oraz na segmenty tworzące tułów (3 segmenty poza głową) i odwłok, które wraz z uwodnieniem zwiększają swoją objętość, ciało się wyprostowuje, a oskórek staje się mniej pomarszczony.

3.3. Morfometria zmian ciała larw w trakcie hydratacji z fazy cieczowej

W celu poznania w jaki sposób proces hydratacji larw z fazy ciekłej wpływa na zmiany struktury i wielkości ich ciała, przeprowadzono pomiary morfometryczne za pomocą stereoskopowego mikroskopu optycznego. Procedura pomiarowa została opisana w rozdziale „Materiał i metody". Obserwowano hydratację zarówno larw żywych, jak i martwych, stosując wodę o różnym składzie chemicznym (użyto wody raz destylowanej, niedejonizowanej; wody z kraklowskiej sieci wodociągowej (*tap water*); oraz wody mineralnej niegazowanej „Cisowianka"). Poszczególne rodzaje wody różniły się przede wszystkim zawartością jonów dwuwartościowych (głównie magnezu i wapnia).

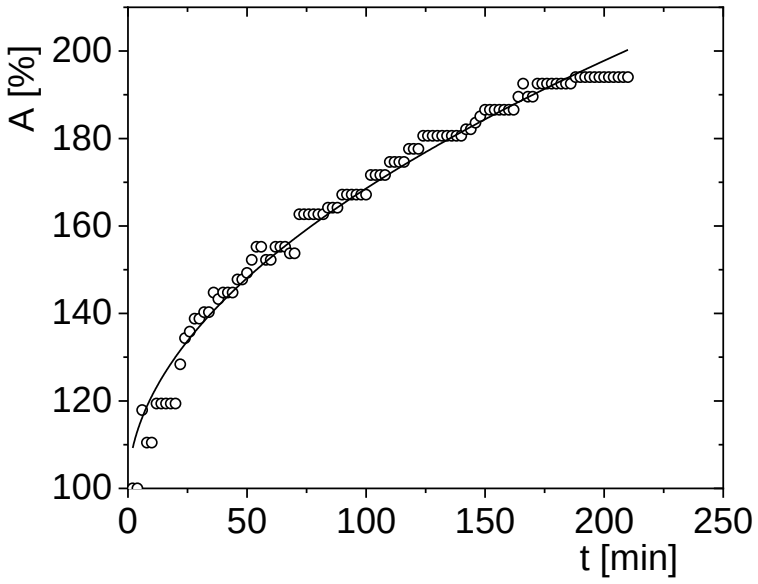
Dla hydratacji każdej larwy z osobna dopasowano funkcję allometryczną (zależność allometryczna to zwykle jest wyrażenie jakiejś własności badanego organizmu w funkcji masy (Knibbe 2005, Lenartowicz 2008, Stupnicki 2016), jednak w tym przypadku badano

wzrost powierzchni obrazu mikroskopowego larwy *P. vanderplanki* hydratowanej z fazy ciekłej. Wzór matematyczny miał postać

$$A(t) = A_0 + b\left(\frac{t}{t_0}\right)^c . \qquad (129)$$

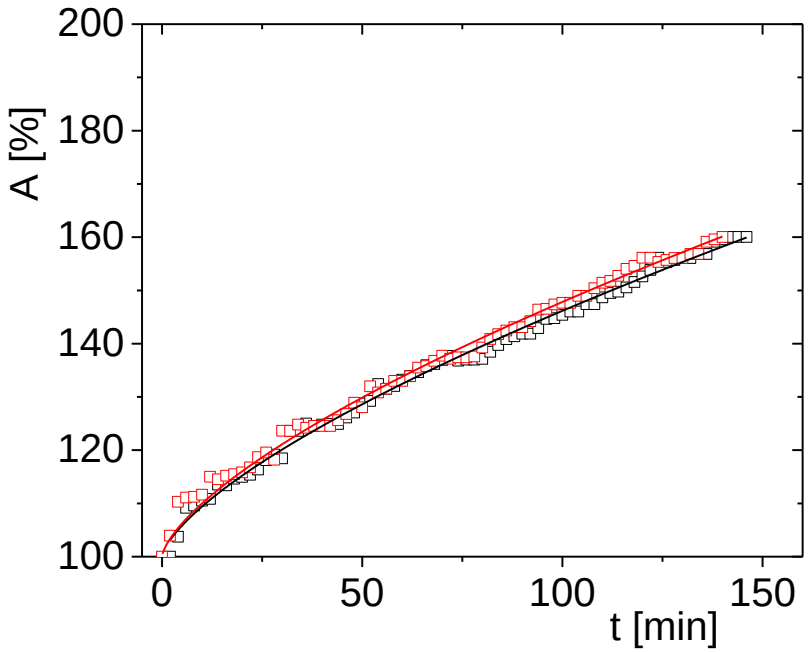
Warto zauważyć, że w przypadku, jeśli wzrost objętości larwy jest liniowo proporcjonalny do czasu hydratacji, mierzona pod mikroskopem powierzchnia larwy, A, wzrasta zgodnie z formułą $A = const \cdot t^{2/3}$. Wiedząc, że $A = const \cdot V^{2/3}$, gdzie V jest objętością, a stała jest charakterystyczna dla określonego kształtu mierzonego obiektu, pomiary pokazały, że objętość anhydrobiotycznej larwy *P. vanderplanki* hydratowanej z fazy ciekłej wzrasta proporcjonalnie do czasu t procesu wchłaniania (Knutelski i in., przygotowywane do publikacji). A_0 jest równe 100, ponieważ za 100% przyjęto powierzchnię przekroju wzdłużnego larwy suchej).

Rezultaty wyrażono w procentach w celu porównania ze sobą wszystkich przyrostów wielkości badanych larw w czasie uwadniania. Na Rycinie 35 przedstawiono przykładowe pomiary wraz z dopasowaniami zależności allometrycznej do punktów pomiarowych.



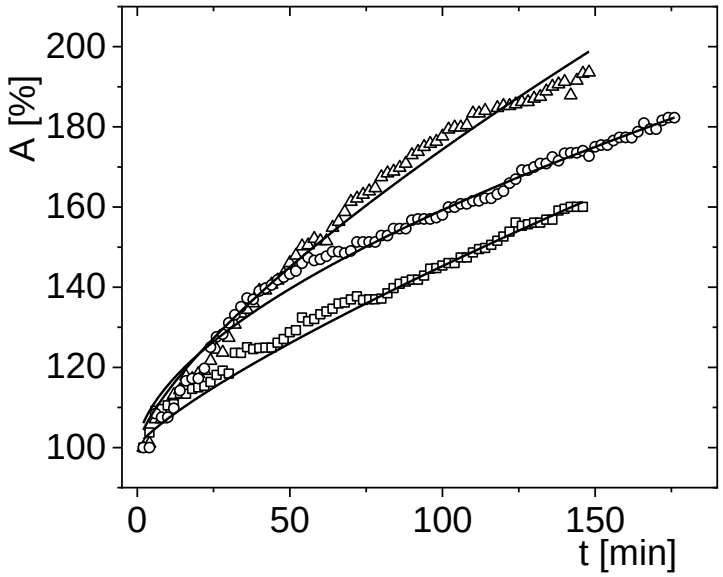
Rycina 35. Zmiany powierzchni (A) ciała larwy *Polypedilum vanderplanki* w czasie (t) jej uwadniania w wodzie destylowanej od stanu anhydrobiozy do pełnego uwodnienia w a) pierwszym dniu po otwarciu pojemnika nr 8 (parametry dopasowania: b = 6.48 ± 0.31, c = 0.51 ± 0.10), (○) – punkty pomiarowe, linia ciągła – dopasowanie funkcji allometrycznej (129)

Na podstawie danych z pomiarów morfometrycznych dla każdego rodzaju wody skonstruowano modele przyrostów powierzchni w miarę uwadniania larw w danych warunkach. Wyniki wskazują, że niezależnie od tego, z którego pojemnika pochodziła próbka, jej uwadnianie było opisywane podobną funkcją (Ryc. 36).



Rycina 36. Zmiany powierzchni (A) ciała larw *Polypedilum vanderplanki* w czasie (t) ich uwadniania w wodzie z kranu od stanu anhydrobiozy do pełnego uwodnienia: czerwone (□) – larwy z pojemnika nr 3 (parametry dopasowania: $b = 2.23 \pm 0.10$, $c = 0.66 \pm 0.01$), czarne (□) - larwy z pojemnika nr 8 (parametry dopasowania: $b = 2.21 \pm 0.09$, $c = 0.66 \pm 0.01$)

Uzyskane modele dla różnych rodzajów składów chemicznych wody stosowanej do uwadnianinia larw, przedstawiono na Rycinie 37, a wyniki uzyskane z dopasowań funkcji allometryczych do modeli w Tabeli 4. Obliczono również współczynniki dopasowań jako średnie z poszczególnych współczynników uzyskanych osobno dla każdego pomiaru (Tab. 4). Uzyskane modele są podobne do siebie, choć wykazują pewne niewielkie różnice. Współczynnik c jest miarą sposobu uwadniania. Wynosi on około 0.66 ± 0.02 (Tab. 4), co oznacza, że przyrost w czasie objętości larwy hydratowanej z fazy ciekłejnej ma charakter liniowy. Nie stwierdza się zmian progowych tej zależności, co oznacza, że przypuszczalne otwieranie się naturalnych otworów ciała, np. przetchlinek, zachodzące wraz ze wzrostem uwodnienia larwy, nie ma znaczącego wpływu na proces hydratacji.



Rycina 37. Zmiany powierzchni (A) ciała larw *Polypedilum vanderplanki* w czasie (t) podczas uwadniania w różnych rodzajach wody od stanu anhydrobiozy do pełnej aktywacji: (○) - woda destylowana, (□) - woda z kranu, (Δ) - woda mineralna. Larwy do analizy pobierano z tego samego pojemnika (nr 8) w pierwszym dniu jego otwarcia

Tabela 4. Średnie wartości pomiarów czasu aktywacji oraz przyrostu powierzchni i długości larw *Polypedilum vanderplanki* podczas uwodnienia w różnych rodzajach wody: MAT - średni czas aktywacji larwy; MMS – średni maksymalny przyrost powierzchni larwy; b, c – współczynniki dopasowań funkcji allometrycznych (129); średnie z pomiarów w pierwszym dniu otwarcia pojemnika z larwami w stanie anhydrobiozy; ogółem – średnia ze wszystkich pomiarów w różnych rodzajach wody

			Parametry liczone jako uśrednienia z poszczególnych pomiarów		**Parametry z dopasowań funkcji do modeli**	
Rodzaj wody	**MAT [min]**	**MMS**	**b**	**c**	**b**	**c**
destylowana	174.50 ± 44.43	182.00 ± 21.83	4.06 ± 2.40	0.57 ± 0.07	4.10 ± 0.23	0.58 ± 0.02
z kranu	145.20 ± 20.03	162.56 ± 17.21	2.74 ± 0.84	0.66 ± 0.14	2.21 ± 0.09	0.66 ± 0.01
mineralna	150.00 ± 17.20	194.60 ± 23.46	2.79 ± 2.05	0.75 ± 0.12	2.65 ± 0.18	0.75 ± 0.02
ogółem	156.57 ± 27.22	179.72 ± 20.83	3.53 ± 1.76	0.66 ± 0.11	2.99 ± 0.17	0.66 ± 0.02

Dla niezależnej analizy zależności hydratacyjnej objętości larwy *P. vanderplanki* od czasu jej trwania, przeprowadzono również pomiary długości larwy, w funkcji czasu

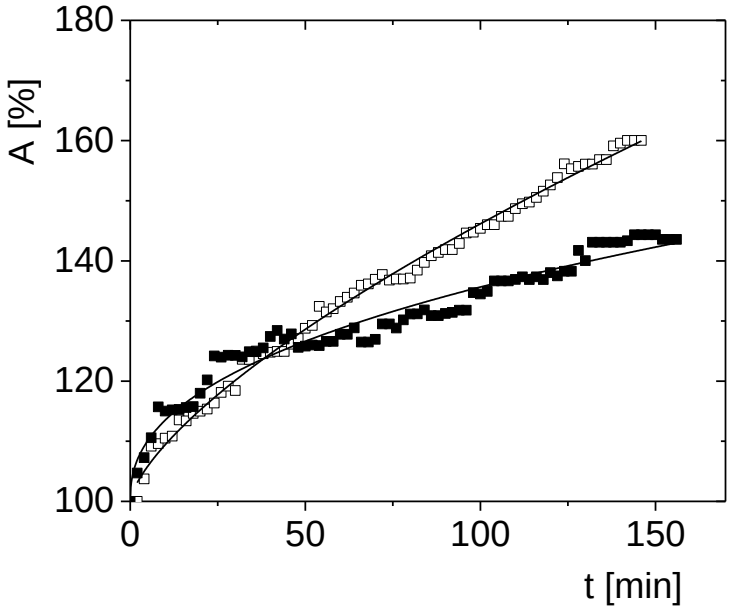
uwadniania po włożeniu osobników do wody. Otrzymane wartości parametrów dopasowań funkcji allometrycznej odniesionej do długości przedstawiają się następująco:

- woda destylowana: $b = 4.73 \pm 0.2$, $c = 0.30 \pm 0.07$,
- woda kranowa: $b = 2.80 \pm 0.67$, $c = 0.36 \pm 0.03$,
- woda mineralna: $b = 4.54 \pm 0.12$, $c = 0.40 \pm 0.04$.

Uśredniony parametr c ma wartość około 0.35 ± 0.05, która jest zbliżona do oczekiwanej 0.(3), ponieważ biorąc pod uwagę tylko pomiar długości ona wzrasta zgodnie z formułą $d = const \cdot t^{1/3}$ (a wtedy $d = const \cdot V^{1/3}$) . Należy jednak wziąć pod uwagę to, że pomiar długości jest obarczony większą niepewnością pomiarową, niż pomiar powierzchni larwy, jak również to iż jest on bardziej zależny od morfologii poszczególnych osobników.

Można stwierdzić, że istnieje różnica w sposobie uwadniania larw żywych w zależności od rodzaju wody użytej do hydratacji. Współczynniki b i c różnią się dla różnych eksperymentów, choć wartości średniego czasu aktywacji larwy oraz średniego maksymalnego przyrostu powierzchni larwy mają znaczące niepewności pomiarowe. Trzeba też zauważyć, że mamy do czynienia z żywymi organizmami, które może charakteryzować duże zróżnicowanie osobnicze. Widoczne to było przy uwadnianiu osobników w kolejnych dniach po otwarciu pojemników. Zaobserwowano, że larwy po pewnym czasie stawały się martwe. Wpływ na to miała wilgoć, która dostawała się do pojemników w trakcie ich otwierania. Jest to zgodne z danymi uzyskanymi z kinetyki hydratacji i izoterm sorpcyjnych, gdzie zauważono śmiertelność larw już przy około 20 % wilgotności. Larwy uwadniane w kolejnych dniach cechował coraz większy rozrzut osobniczy. Można jednak stwierdzić, że im później wykonywany był pomiar po pierwszym otwarciu pojemnika, tym hydratacja larwy do postaci aktywnej trwała dłużej.

Dla porównania wykonano pomiary uwadniania larw martwych (Ryc. 38). Parametry uzyskane z dopasowania funkcji (129) wyniosły: $b = 5.12 \pm 0{,}32$ oraz $c = 0.42 \pm 0.02$. Wartość współczynnika c wskazuje na odchylenie od liniowości procesu uwadniania z fazy ciekłej larw martwych. Mechanizm ten wygląda inaczej niż u osobników żywych, jednak nie można zapomnieć, że ocena przyrostu długości, obarczona jest większą niepewnością.



Rycina 38. Zmiany powierzchni (A) ciała larw żywych (□) i martwych (■) *Polypedilum vanderplanki* w czasie, *t*, uwadniania w wodzie z kranu od stanu anhydrobiozy do pełnego uwodnienia larw żywych; analiza w pierwszym dniu otwarcia pojemników: żywe - z pojemnika nr 8, martwe - pojemnik nr 32, linia ciągła dopasowanie funkcji allometrycznej (129)

3.4. Pomiary kinetyki hydratacji i izotermy sorpcyjnej larw*Polypedilum vanderplanki*

3.4.1. Kinetyka hydratacji z fazy gazowej

Kinetykę hydratacji definiuje się jako przyrost masy wody w danym układzie w funkcji czasu. Umożliwia opisanie procesu wiązania i odłączania cząstek wody dla danej substancji biologicznej.

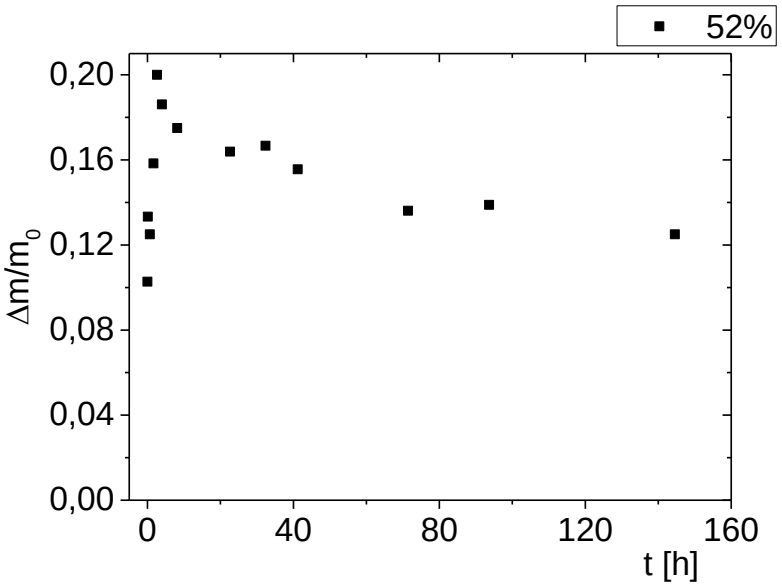
Kinetykę hydratacji przyrównuje się do procesu aktywacyjnego, dzięki czemu jej przebieg można opisać za pomocą funkcji eksponencjalnej lub sumy kilku funkcji eksponencjalnych (Harańczyk 2003).

Odwodnione larwy *P. vanderplanki* hydratowano z fazy gazowej umieszczając je w atmosferze o kontrolowanej wilgotności względnej (p/p_0). Zadaną wilgotność atmosfery uzyskiwano przez umieszczenie próbki nad powierzchniami kwasu fosforowego, nasyconymi roztworami różnych soli oraz wody. W trakcie procesu uwadniania dokonywano pomiarów masy. Proces prowadzono przez 144 h. Wzrost pleśni na niektórych próbkach uwadnianych w wysokich wilgotnościach względnych (93%, 97% i 100%), utrudnił wyznaczenie suchej

masy. W takim przypadku jej wartość ekstrapolowano na podstawie uzyskanych wartości dla innych próbek.

3.4.1.1. Kinetyka hydratacji dla niskich wilgotności względnych

Dla larw żywych uwadnianych w wilgotności $h \leq 52\%$ oraz larw martwych uwadnianych w wilgotności $h \leq 44\%$ zaobserwowano efekt spadku $\Delta m/m_0$ w trakcie hydratacji z fazy gazowej. Efekt ten dla przykładowej próbki (zaobserwowany dla larw żywych dla wilgotności względnej 52%) został przedstawiony na Ryc. 38.



Rycina 39. Hydratacja z fazy gazowej żywych larw *P. vanderplanki* w atmosferze o wilgotności względnej p/p_0 = 52%

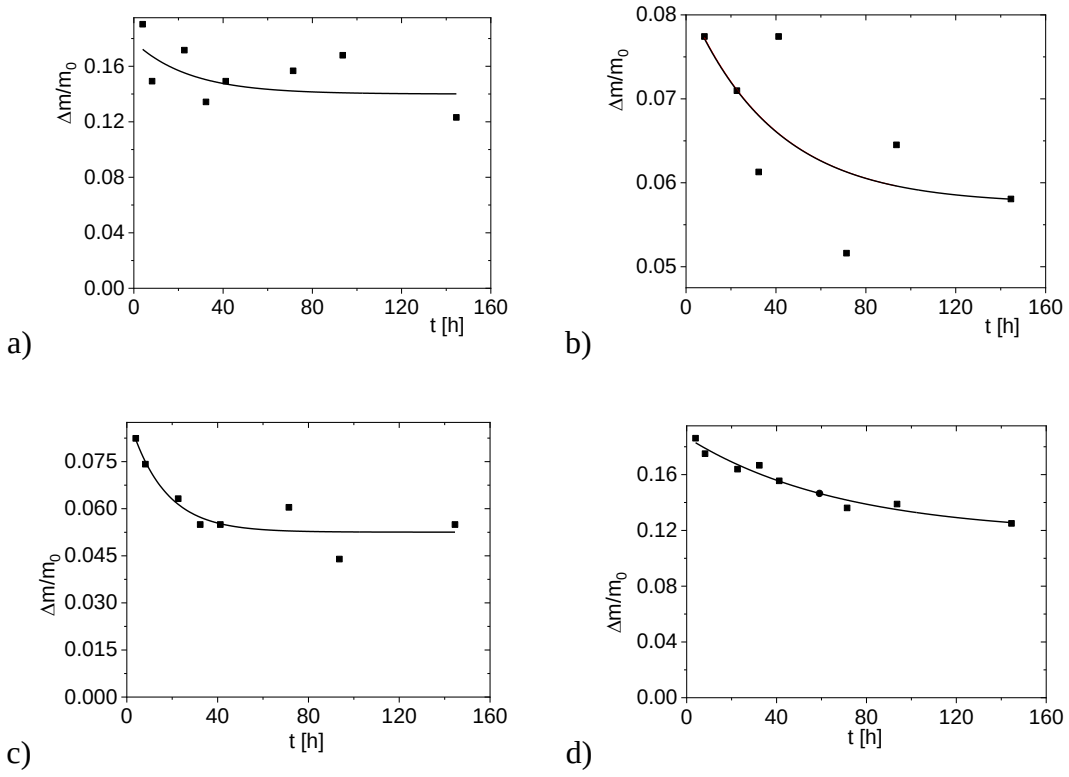
Dla początkowych czasów hydratacji dominuje proces szybkiego wzrostu masy, jednakże począwszy od czasu t_0 następuje nieoczekiwany spadek masy sięgający około 5%. W długotrwałym procesie subtelnej hydratacji mógł się uwidocznić możliwy wpływ trawienia przez bakterie przewodu pokarmowego larwy (Koroiva i in. 2013).

Trasy hydratacyjne w atmosferach o niskich wilgotnościach względnych, dla larw żywych w zakresie od 23% do 52%, oraz dla larw martwych pomiędzy 9% a 44%, dopasowano funkcją eksponencjalną w postaci:

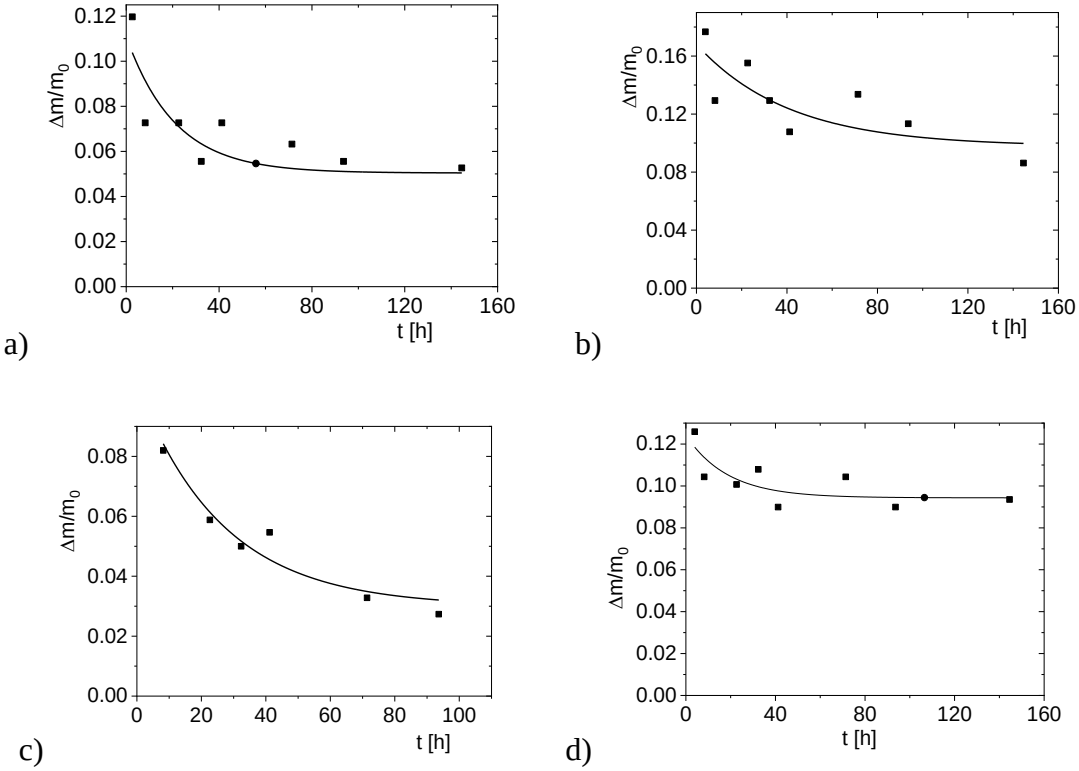
$$\Delta m / m_0 = A_{t0}^h - A_t^h \cdot \left[1 - \exp(-\frac{t - t_0^h}{t_t^h})\right], \tag{130}$$

gdzie: Δm to zmierzony spadek masy, m_0, to sucha masa larwy, wreszcie A_{t0}^{h} to poziom hydratacji dla wilgotności względnej h = 0% związany z rozpoczęciem procesu trawienia przez bakterie, A_t^h to maksymalny poziom hydratacji dla pierwszej składowej podczas trawienia, t_0^h – wybrany arbitralnie czas, związany z rozpoczęciem procesu trawienia przez bakterie, t_t^h – czas trawienia.

Efekt spadku masy dominuje dla tras hydratacyjnych przeprowadzanych w atmosferach o niskich wilgotnościach względnych. Z tego powodu w prezentowanych dopasowaniach pominięto pierwsze 4 godziny obserwacji, stanowiących jedynie około 2.5% trwania całego pomiaru, w których następuje wzrost masy charakterystyczny dla procesu hydratacji. Trasy hydratacyjne larw żywych i martwych przedstawiono na Rycinach 40 i 41, natomiast parametry uzyskanych zależności kinetycznych zestawiono w Tabelach 5 i 6.



Rycina 40. Kinetyka hydratacji larw żywych *Polypedilum vanderplanki* dla wilgotności względnych: a) 23%, b) 32%, c) 44%, d) 52%, linia ciągła - dopasowane funkcje (130)



Rycina 41. Kinetyka hydratacji larw martwych *Polypedilum vanderplanki* dla wilgotności względnych: a) 9%, b) 23%, c) 32%, d) 44%, linia ciągła - dopasowane funkcje (130)

Tabela 5. Parametry kinetyki hydratacji żywych larw *P. vanderplanki* dla niskich wilgotności atmosfery

h	A_{t0}^{h}	t_0^h **[h]**	A_t^h	t_t^h **[h]**
23%	0.142 ± 0.015	21 ± 12	0.0164 ± 0.0078	25 ± 14
32%	0.058 ± 0.024	26 ± 15	0.0124 ± 0.0021	39 ± 20
44%	0.053 ± 0.004	3.3 ± 1.9	0.0308 ± 0.0034	15.6 ± 8.5
52%	0.117 ± 0.013	23.2 ± 8.3	0.0497 ± 0.0097	69 ± 28

Tabela 6. Parametry kinetyki hydratacji martwych larw *P. vanderplanki* dla niskich wilgotności atmosfery

h	A_{t0}^{h}	t_0^h **[h]**	A_t^h	t_t^h **[h]**
9%	0.051 ± 0.002	12.6 ± 5.8	0.0343 ± 0.0031	22 ± 16
23%	0.098 ± 0.017	2.8 ± 0.01	0.0657 ± 0.0010	41 ± 4.7
32%	0.029 ± 0.003	0.960 ± 0.008	0.0713 ± 0.0062	27 ± 20
44%	0.094 ± 0.004	6.7 ± 0.001	0.0209 ± 0.0027	18.7 ± 2.8

Z uwagi na rozrzut wartości nie uśredniono parametrów t_0^h i A_{t0}^h. Dla różnych wilgotności atmosfery proces trawienia tkanki może być opisywany różnymi stałymi czasowymi.

Równowagowym poziomem uwodnienia układu jest suma uwodnień wszystkich zaobserwowanych składowych wody:

$$C^h = A_{t0}^h + \sum_i A_i^h \ . \tag{131}$$

Całkowity poziom uwodnienia dla niskich wilgotności względnych dla larw żywych oraz dla larw marwych martwych wyniki przedstawiono w Tabeli 7. Dla wilgotności względnej 23% całkowity poziom uwodnienia jest zbliżony dla próbek martwych, jak i larw żywych (około 0.16), jednak dla innych uwodnień nie obserwujemy takiej zależności.

Tabela 7. Całkowity poziom uwodnienia larwy *P. vanderplanki* dla różnyc wilgotności względnych atmosfery

LARWY ŻYWE		**LARWY MARTWE**	
h	**C**	***h***	**C**
23%	0.158 ± 0.063	**9%**	0.085 ± 0.008
32%	0.071 ± 0.023	**23%**	0.16 ± 0.027
44%	0.084 ± 0.011	**32%**	0.101 ± 0.021
52%	0.167 ± 0.034	**44%**	0.115 ± 0.005

3.4.1.2. Kinetyka hydratacji w atmosferach o wysokich wilgotności względnych

Hydratacja martwych larw *P. vanderplanki* prowadzona z atmosfery o wilgotności względnej w zakresie od p/p_0 = 52% do 100% oraz dla wilgotności od 63% do 88% dla larw żywych dobrze dopasowywana jest funkcją jednoeksponencjalną:

$$\Delta m / m_0 = A_0^h + A_1^h \cdot \left[1 - \exp(-t / t_1^h)\right], \tag{132}$$

gdzie: $\Delta m/m_0$ to względny przyrost masy, A_0^h to poziom hydratacji dla wilgotności względnej 0%, A_1^h jest nasyceniowym poziomem hydratacji składowej hydratacyjnej, t_1^h jest czasem hydratacji dla tej składowej. Suma $C^h = A_0^h + A_1^h$ wyznacza całkowity poziom hydratacji dla nasycenia.

Dla hydratacji żywych larw *P. vanderplanki* w atmosferze o wilgotności względnej p/p_0 = 93% pojawia się druga składowa o poziomie nasyceniowym A_2^h. Zaobserwowano ją dla

wyższych wilgotności względnych, więc można ją powiązać z frakcją wody luźno związanej. Trasy hydratacyjne dopasowano funkcją dwueksponencjalną:

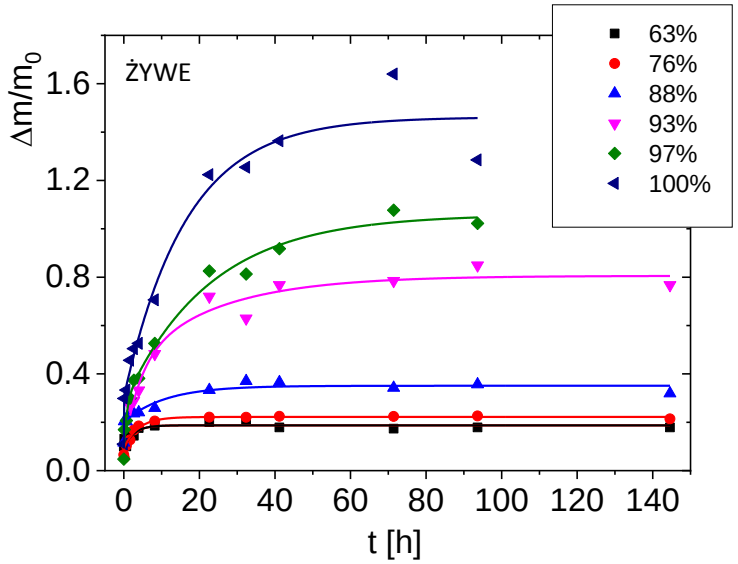
$$\frac{\Delta m}{m_o} = A_0^h + A_1^h \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{t_1^h}\right)\right) + A_2^h \cdot \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{t_2^h}\right)\right), \tag{133}$$

gdzie A_2^h i t_2^h są odpowiednio nasyceniowym poziomem hydratacji oraz czasem hydratacji dla drugiej, wiążącej się następnie składowej wody hydratującej układ. W tym przypadku całkowity poziom uwodnienia stanowi suma składowych $C^h = A_0^h + A_1^h + A_2^h$.

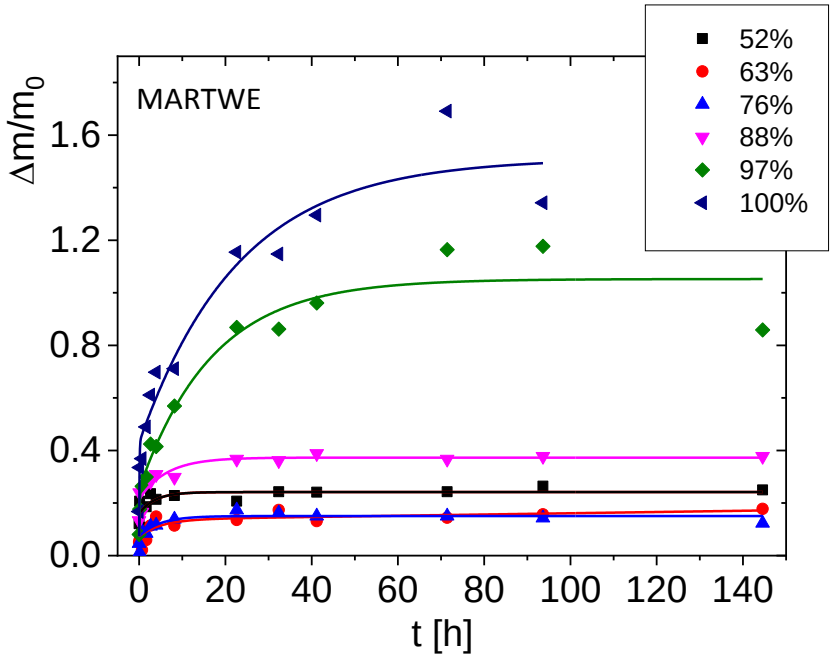
Frakcja A_2^h ma dłuższy czas hydratacji niż frakcja A_1^h. Wiążącą się najpierw składową wody związanej określa parametr A_1^h, gdyż adsorbowane molekuły wody w czasie t_1^h silniej przyłączają się do powierzchni materiału. Warstwę tych molekuł nazywa się wodą ściśle związaną. Parametr A_2^h, będący wolniejszą składową uwodnienia, jest odpowiedzialny za adsorbowanie kolejnych warstw cząsteczek wody. Następne warstwy wody słabiej i wolniej przyłączają się do powierzchni. Określa się je mianem wody luźno związanej.

W atmosferze o wilgotności względnej 97% oraz 100% kinetykę hydratacji żywych larw *P. vanderplanki* opisano funkcją jednoeksponencjalną, jednak z widoczną tylko skłądową A_2^h. Czas hydratacji pokazał, że to woda luźno związana, której było tak dużo, że ściśle związanej nie można było wyodrębnić. Możliwe, że jest to wynik procesów życiowych. Następuje zmiana czasu wiązania wody oraz zmienia się charakter oskórka, a w związku z tym zmienia się opis kinetyki hydratacji.

Składowa wiążąca się z krótszym czasem odpowiada frakcji wody ściśle związanej, wiążącej się najszybciej. Natomiast składowa charakteryzowana dłuższym czasem hydratacji odpowiada wodzie luźno związanej. Dla wysokich wilgotności oczekiwano dopasowania dwóch funkcji eksponencjalnych, jednakże nie udało się ich wyodrębnić. U larw martwych nie da się wyróżnić frakcji wody ściśle związanej i frakcji wody luźno związanej. Obserwuje się proces uśredniony. Trasy hydratacyjne dla larw żywych oraz dla larw martwych przedstawiono na Ryc. 42 i 43. Parametry uzyskanych zależności kinetyki hydratacji przedstawiono w Tabelach 8 i 9.



Rycina 42. Kinetyka hydratacji z fazy gazowej żywych larw *Polypedilum vanderplanki* w atmosferach o wilgotnościach względnych od 63% do 100%



Rycina 43. Kinetyka hydratacji z fazy gazowej żywych larw *Polypedilum vanderplanki* w atmosferach o wilgotnościach względnych od 52% do 100%

Wartości uwodnienia w p/p_0 = 0%, A_0^h, uśredniono, gdyż uwodnienie początkowe powinno być stałe niezależnie od wilgotności względnej atmosfery, w której następuje hydratacja. Również wartości czasu hydratacji, t_1^h, larw żywych dla wilgotności od 63% do 93% uśredniono. Dla larw żywych A_0^h, wartość poziomu hydratacji dla względnej wilgotności

0% (poziom hydratacji nasycenia frakcji wody bardzo ściśle związanej), wspólnego dla wszystkich tras wyniósł 0.093±0.006. Dla larw martwych (próbek, które nie przeszły pomyślnie w stan anhydrobiozy) wartość ta była mniejsza i wyniosła 0.073±0.008. Wartości te są wyższe od poziomu wyznaczonego dla niektórych innych układów biologicznych, np. dla czystego DNA, który wynosi 0.057±0.010 (Harańczyk i in. 2010). Natomiast możemy je również porównać z wartościami dla pokryw niektórych chrząszczy, np. dla *Liparus glabrirostris* parametr ten jest równy 0.037 ± 0.004 (Harańczyk i in. 2012b), dla niektórych porostów antarktycznych, np. dla *U. antarctica* A_0^h = 0.101 ± 0.018 (Harańczyk 2003), czy też u *Cetraria aculeata* A_0^h = 0.04 ± 0.02 (Harańczyk i in. 2016). Różnice w wartości poziomu hydratacji A_0^h mogą świadczyć o zróżnicowaniu gęstości miejsc wiążących wodę na powierzchniach różnych próbek biologicznych.

Amplituda frakcji wody ściśle związanej A_1^h dla próbek anhydrobiotycznych jest najniższa dla *h* = 63% i wynosi 0.09 ± 0.01 i rośnie wraz ze wzrostem wilgotności do 0.25 ± 0.02 dla poziomu uwodnienia 88%. Uśredniony czas hydratacji frakcji wody ściśle związanej dla zakresu wilgotności od 63% do 88% to (3.32 ± 0.71) h. Po nasyceniu frakcji wody silnie związanej, wraz z dalszym wzrostem wilgotności otoczenia, wiąże sie kolejna frakcja wody (luźno związanej) o dłuższym czasie hydratacji wynoszącym dla 93% (23.22 ± 21.82) h. Dla hydratacji w atmosferze o wilgotności względnej 97% oraz 100% zaobserwowano tylko jedną frakcję wody (lużno związanej) o amplitudzie A_2^h. Wody ściśle związanej nie udało się zaobserwować. Dla p/p_0 = 97% czas hydratacji wyniósł (22.61 ± 4.45) h, natomiast dla wilgotności 100% - (16.49 ± 4.1) h.

Dla larw martwych amplituda A_1^h jest najniższa dla *h* = 76% (0.078 ± 0.009), przy również najmniejszym czasie hydratacji $t_1^{76\%}$ = (4.7 ± 2.6) h. Z kolei dla h = 100% udział tej frakcji wody jest najwyższy i wynosi 1.26 ± 0.09, przy czasie (6.9 ± 2.1) h. Najwyższy czas hydratacji t_1^h wynosi (8.9 ± 2.2) h dla poziomu uwodnienia 97%.

Porównując larwy *P. vanderplanki* do innych układów biologicznych, możemy stwierdzić, że uzyskane amplitudy frakcji wody ściśle związanej A_1^h są wyższe niż np. w niektórych kompleksach DNA (np. dla DNA – CTMA parametr ten jest równy 0.039 ± 0.004 (Harańczyk i in. 2012b)) czy porostach (np. dla *C. aculeata* 0.034 ± 0.009 (Harańczyk i in. 2016)). Czasy hydratacji t_1^h są z kolei podobne z czasami innych próbek biologicznych, tak dla wspomnianego kompleksu wynosi on (1.04 ± 0.21) h, z kolei dla porostu (3.31 ± 0.93) h. Czas t_2^h dla DNA – CTMA to (19.1 ± 3.2) h, dla *C. aculeata to* (25.5 ± 7.8) h (Harańczyk i in. 2012b, Harańczyk i in. 2016).

Tabela 8. Parametry kinetyki hydratacji larw żywych dla wysokich wilgotności

h	A_0^h	t_1^h [h]	A_1^h	t_2^h [h]	A_2^h
63%	0.093 ± 0.006	3.32 ± 0.71	0.09 ± 0.01	-	-
76%			0.13 ± 0.01	-	-
88%			0.25 ± 0.02	-	-
93%			0.34 ± 0.36	23.22 ± 21.82	0.38 ± 0.34
97%				22.61 ± 4.45	0.97 ± 0.05
100%				16.49 ± 4.1	1.16 ± 0.08

Tabela 9. Parametry kinetyki hydratacji martwych larw P. vanderplanki dla hydratacji z fazy gazowej, wysokie wilgotności atmosfery

p/p0	A_0^h	t_1^h [h]	A_1^h
52%	0.073 ± 0.008	1.33 ± 0.69	0.166 ± 0.016
63%		7.2 ± 4.8	0.081 ± 0.013
76%		4.7 ± 2.6	0.078 ± 0.009
88%		1.51 ± 0.55	0.286 ± 0.021
97%		8.9 ± 2.2	0.931 ± 0.052
100%		6.9 ± 2.1	1.26 ± 0.09

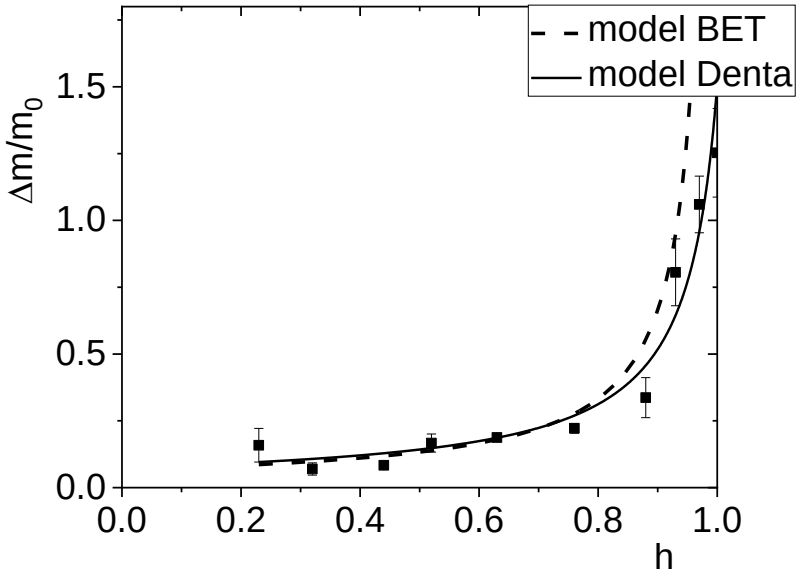
Całkowity poziom uwodnienia rehydratowanych z fazy gazowej w atmosferze o wysokich wilgotnościach względnych żywych oraz martwych larw *P. vanderplanki* w przedstawiono w Tabeli 10. W przypadku larw żywych, poziom hydratacji nasyceniowej wzrasta wraz ze wzrostem uwodnienia. Dla larw martwych obserwujemy niższy poziom hydratacji przy wilgotności względnej atmosfery p/p_0 = 63% i 76%.

Tabela 10. Całkowity poziom uwodnienia z atmosfer o wysokich wilgotnościach względnych

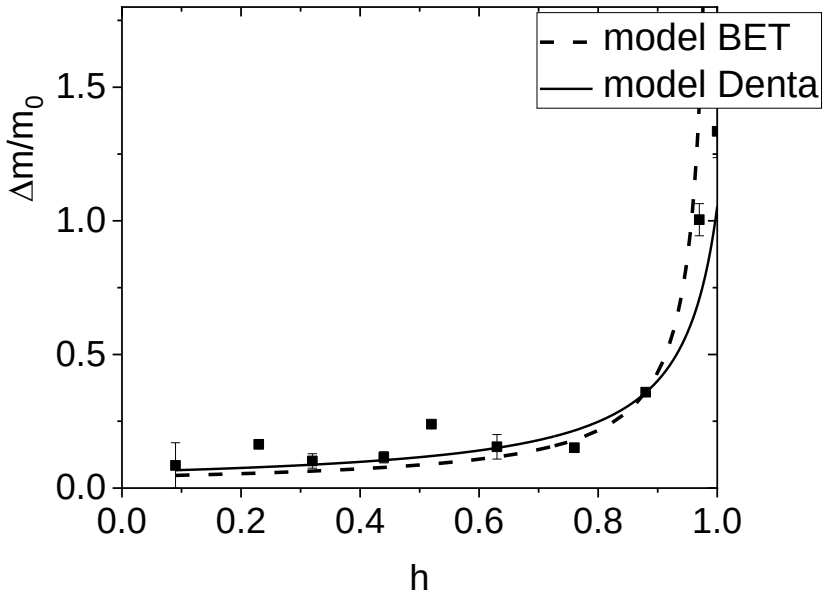
LARWY ŻYWE		**LARWY MARTWE**	
p/p_0	**C^h**	**p/p_0**	**C^h**
63%	0.187 ± 0.002	**52%**	0.239 ± 0.046
76%	0.222 ± 0.018	**63%**	0.154 ± 0.004
88%	0.337 ± 0.075	**76%**	0.151 ± 0.002
93%	0.806 ± 0.125	**88%**	0.359 ± 0.106
97%	1.06 ± 0.106	**97%**	1.01 ± 0.06
100%	1.26± 0.166	**100%**	1.34 ± 0.098

3.4.2. Izoterma sorpcji

Całkowite poziomy uwodnienia zebrane w funkcji wilgotności względnej atmosfery umożliwiły skonstruowanie izoterm sorpcyjnych dla rehydratowanych larw *P. vanderplanki*. Uzyskane izotermy sorpcyjne miały kształt funkcji sigmoidalnej charakterystyczny dla sorpcji wielowarstwowej. Dopasowano do nich dwa modele izotermy sorpcyjnej – model izotermy BET oraz model izotermy Denta (GAB). Model Denta (GAB) lepiej opisuje dane eksperymentalne. Izotermy sorpcyjne otrzymane dla larw *P. vanderplanki* są anomalne, podobnie jak te otrzymane dla kutikuli stawonogów, pokryw chrząszczy *Liparus glabrirostris* (Harańczyk i in. 2012b). Otrzymane dopasowania modelu BET i Denta (GAB) do izoterm sorpcyjnych dla żywych i dla martwych larw *P. vanderplanki* przedstawiono na Rycinach 44 i 45.



Rycina 44. Izoterma sorpcyjna dla larw żywych *Polypedilum vanderplanki*: dopasowanie modelu BET – linia przerywana, dopasowanie modelu Denta (GAB) – linia ciągła



Rycina 45. Izoterma sorpcyjna dla larw martwych *Polypedilum vanderplanki*: dopasowanie modelu BET – linia przerywana, dopasowanie modelu Denta (GAB) – linia ciągła

Według modelu Denta frakcja wody wysycającej pierwotne miejsca wiążące dla żywych larw *P. vanderplanki* jest równa $\Delta M/m_0$ = 0.0749 ± 0.0017, natomiast dla larw martwych wynosi 0.0611 ± 0.0215. Otrzymane wartości są zbliżone do otrzymywanych dla grzybów zlichenizowanych i dla kompleksów DNA-surfaktant. Np. dla porostu o plesze listkowatej, *Usnea antarctica*, $\Delta M/m_0$ = 0.073, a dla porostu o plesze krzaczkowej *Usnea*

aurantiaco-atra $\Delta M/m_0$ = 0.063 (Harańczyk 2003; Harańczyk i in. 2006). Natomiast dla kompleksu DNA-BA 0.0568±0.0046, a dla kompleksu DNA-CTMA $\Delta M/m_0$ = 0.102±0.021 (Harańczyk i in. 2012b).

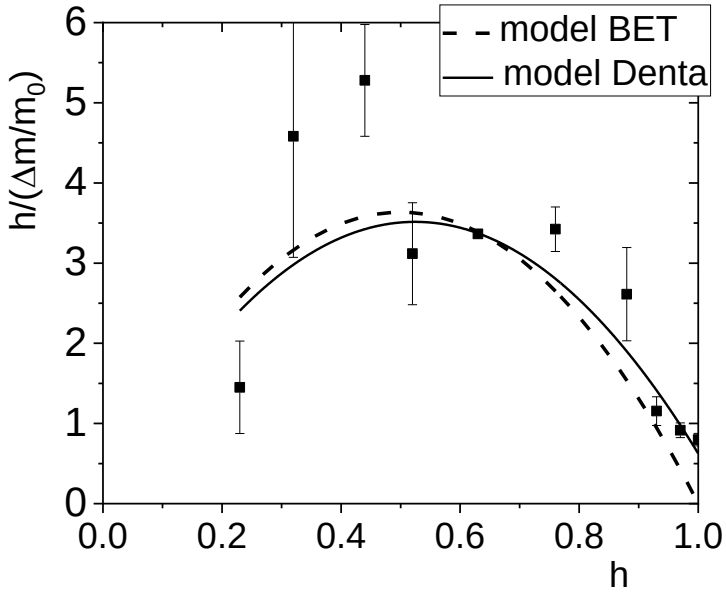
Wartości parametru *b*, którego różnica od wartości 1 jest miarą stosowalności modelu Denta, wyniosły dla larw anhydrobiotycznych 0.95 ± 0.01, a dla larw martwych 0.94 ± 0.06. Wartości tego parametru są zbliżone na przykład dla kompleksów DNA-surfaktant czy dla czystego DNA (wartość *b* wynosi 0.965 (Harańczyk i in. 2010)). Dla pokryw chrząszczy *L. glabrirostris* parametr wynosi b = 0.865.

Wkład od nieobsadzonych pierwotnych miejsc wiążących przy wilgotności względnej *h* = 100% wyrażony w procentach wyniósł 0% dla larw żywych i 0.02% dla larw martwych (nieanhydrobiotycznych). Jest on znacznie niższy niż w przypadku kompleksów DNA, ale na podobnym poziomie jak u *L. glabrirostris.* Parametry dopasowania izotermy sorpcyjnej w postaci sigmoidy dla modelu BET oraz Denta zestawiono w Tabeli 11.

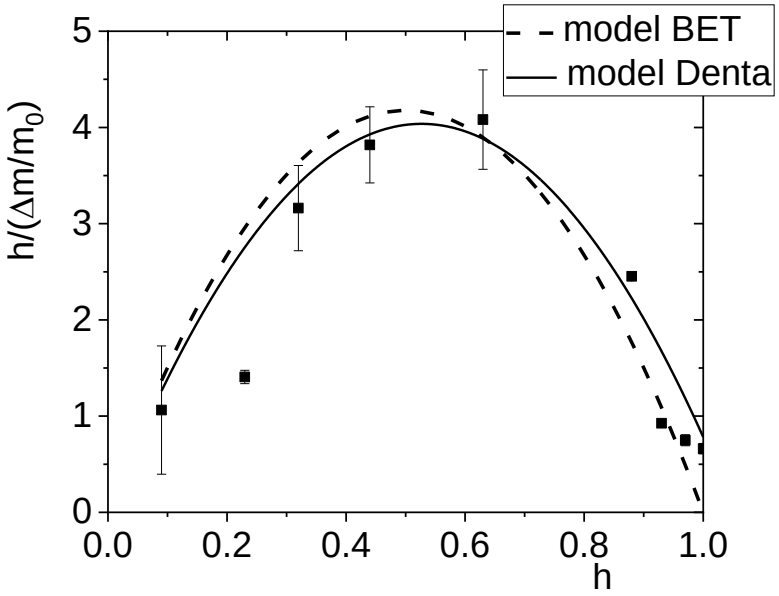
Tabela 11. Parametry dopasowania izoterm sorpcyjnych dla larw *P. vanderplank*i

	MODEL DENTA			**MODEL BET**	
	b	**$1/b_1$ [%]**	**$\Delta M/m_0$**	**$1/b_1$ [%]**	**$\Delta M/m_0$**
larwy żywe	0.95 ± 0.01	0 ± 0.001	0.0749 ± 0.0017	0	0.0665 ± 0.0133
larwy martwe	0.94 ± 0.06	0.016± 0.006	0.0611 ± 0.0215	0	0.0451 ± 0.0052

Dla oceny stosowalności poszczególnych modeli teoretycznych sorpcji wielowarstwowej, uzyskane izotermy przedstawiono w postaci parabolicznej. W takiej reprezentacji krzywa opisująca izotermę dla modelu BET przechodzi dla wilgotności 100% przez zero. Odstępstwo od tej wartości jest miarą stosowalności modelu Denta. Skoro parabola znacząco wyżej przechodzi powyżej zera, uznano, że parabola dopasowana do danych modelem Denta lepiej opisuje izotermę sorpcyjną dla larw *P. vanderplanki* niż model BET. Otrzymane dopasowania przedstawiono na Ryc. 46 i 47.



Rycina 46. Postać paraboliczna izotermy sorpcyjnej dla żywych larw *Polypedilum vanderplanki*, linia przerywana – model BET, linia ciągła – model Dent (GAB)



Rycina 47. Postać paraboliczna izotermy sorpcyjnej dla marwych larw *Polypedilum vanderplanki*, linia niebieska przerywana – model BET, linia ciągła – model Dent (GAB)

Parametry dopasowania izotermy sorpcyjnej w postaci parabolicznej dla modelu Denta oraz odpowiadające współczynnikom *A, B, C* parametry $\Delta M/m_0$, $1/b_1$, b, (Tabela 12).

Tabela 12. Wartości parametrów dopasowania izoterm sorpcyjnych w postaci parabolicznej

	A	B	C	b	$1/b_1$ [%]	$\Delta M/m_0$
żywe	0	13.4 ± 0.4	12.8 ± 0.4	0.95	0	0.0746
martwe	0	15.4 ± 2.1	14.6 ± 2.4	0.95	0.016	0.065

3.5. Pomiary magnetycznej relaksacji ^{1}H-NMR dla larw *Polypedilum vanderplanki*

Pomiary relaksacji ^{1}H-NMR larw *P. vanderplanki* hydratowanych z fazy gazowej przeprowadzono w zakresie $\Delta m/m_0$ = 0.01 – 0.16. Larwy uwodnione z fazy gazowej do poziomu powyżej około 20% nie wykazywały aktywności po umieszczeniu ich następnie w wodzie ciekłej (larw uwadniane z fazy gazowej w niższych wilgotnościach względnych po zanurzeniu w wodzie ciekłej powracały do pełnej aktywności).

Sygnały zaniku swobodnej precesji ^{1}H-NMR (FID) dla protonów dopasowano funkcją będącą sumą jednej funkcji Gaussa, o amplitudzie *S*, pochodzącą od znacząco unieruchomionych protonów matrycy stałej larw oraz dwóch funkcji eksponencjalnych o amplitudach L_1 i L_2, pochodzących od mobilnych protonów frakcji wody ściśle i wody luźno związanej:

$$FID(t) = y_0 + S\exp\left[-\left(\frac{t}{T_{2G}^*}\right)^2\right] + L_1\exp\left(-\frac{t}{T_{2L1}^*}\right) + L_2\exp\left(-\frac{t}{T_{2L2}^*}\right) \qquad (134)$$

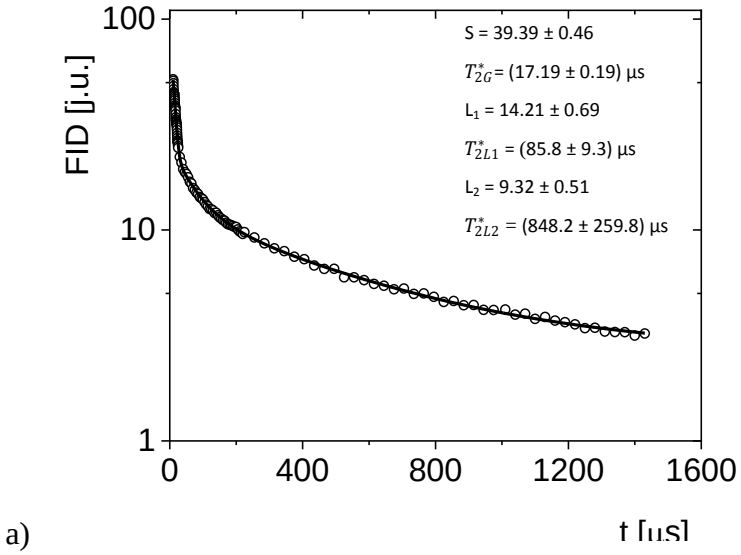
Stała y_0 to składowa stała zmierzonej siły elektromotorycznej, która wynika z ustawień odbiornika. Jej wartość, może być różna od zera, co wynika z powodów aparaturowych, a nie sygnału od próbki. T_{2G}^* to czas relaksacji spinowo-spinowej dla składowej znacznie unieruchomionej (ciała stałego), T_{2L1}^* i T_{2L2}^* są efektywnymi czasami relaksacji poprzecznej dla składowych mobilnych (cieczowych).

3.5.1. Pomiary zależności hydratacyjnych zaniku swobodnej precesji ^{1}H-NMR FID dla protonów u żywych larw *Polypedilum vanderplanki*

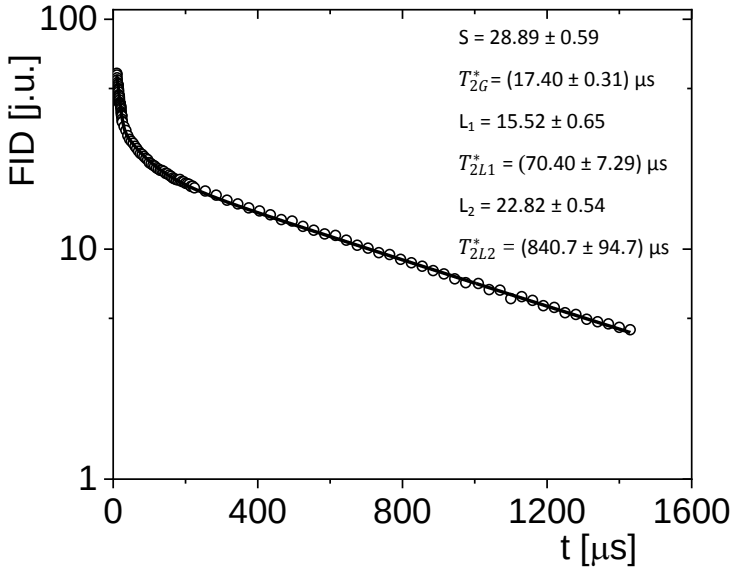
3.5.1.1. Sygnał składowej stałej ^{1}H-NMR FID

Wybrane zaniki swobodnej precesji ^{1}H-NMR FID zmierzone dla larw anhydrobiotycznych przedstawione zostały na Ryc. 48. Na wykresach przedstawiających

zanik swobodnej precesji od frakcji stałej sygnału nie zaobserwowano charakterystycznej „falki" typowej dla funkcji Abragama (112), dlatego też nie dopasowano tego modelu.



a)



b)

Rycina 48. Sygnał zaniku swobodnej precesji ^{1}H-NMR FID dla żywych larw *P. vanderplanki* uwodnionych do poziomu: a) $\Delta m/m_o = 0.077$, b) $\Delta m/m_o = 0.122$

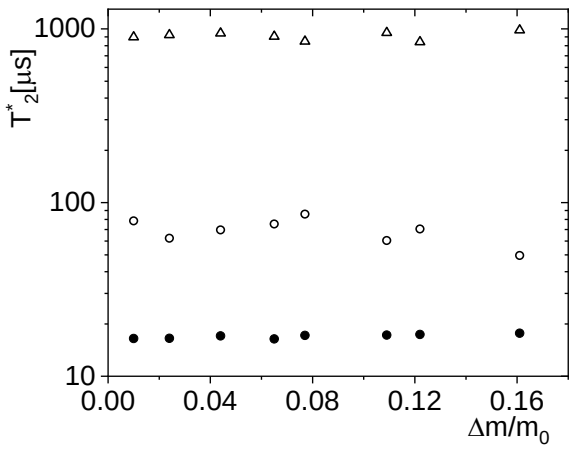
Efektywny czas relaksacji spinowo-spinowej dla protonów matrycy stałej żywych larw *P. vanderplanki* wynosił około $T_{2G}^{*} \approx 17$ μs. Jego wartość tylko nieznacznie zmieniała się wraz z uwodnieniem larw, co sugeruje, że podczas procesu hydratacji matryca stała nie zmienia sie znacząco. Jest to wartość bliska wartościom otrzymanym dla innych układów biologicznych (np. dla porostu *Umbilicaria aprina* wynosiła $T_{2G}^{*} \approx 19$ μs (Harańczyk i in.

2008), dla kutikuli chrząszczy *Liparus glabrirostris* wynosiła około 20 μs (Harańczyk i in. 2012b), oraz dla innych stałych tkanek, takich jak: szkliwo zebów (Harańczyk 2003), dla liofilizatów błon fotosyntetycznych (Harańczyk i in. 2015), dla kory czy łyka drewna (Harańczyk i in. 1998)). Wykorzystano więc amplitudę składowej stałej, *S*, do skalowania składowej cieczowej sygnału ^{1}H-NMR FID, *L/S*.

3.5.1.2. Zależność hydratacyjna sygnału cieczowego ^{1}H-NMR FID

Dla hydratowanych z fazy gazowej larw *P. vanderplanki* wartości efektywnych czasów relaksacji spinowo-spinowej frakcji protonów mobilnych, L_1, słabo zależą od poziomu hydratacji i są równe około $T_{2L1}^{*} \approx 72$ μs, natomiast dla składowej o najdłuższym czasie zaniku, L_2, zmierzono $T_{2L2}^{*} \approx 912$ μs. Dwie składowe wody związanej zaobserwowano wcześniej m. in. w plechach grzybów zlichenizowanych (Haranczyk i in., 2008), w pokrywach chrząszczy (Harańczyk i in. 2012b), czy w kompleksach DNA-surfaktant (Harańczyk i in. 2012a).

Hydratacyjne zależności efektywnych czasów relaksacji spinowo-spinowej zaobserwowanych dla obu frakcji protonów mobilnych przedstawiono na Rycinie 49.



Rycina 49. Zależność hydratacyjna efektywnych czasów relaksacji spinowo-spinowej ^{1}H-NMR FID dla protonów larw żywych *P. vanderplanki*: (●) frakcja stała, (○) frakcja wody ściśle związanej, (Δ) frakcja wody luźno związanej

Zależność hydratacyjna amplitudy całkowitego sygnału cieczowego wyrażonego w jednostkach sygnału stałego, $(L_1 + L_2)/S$, przedstawiona została na Rycinie 49. Nie jest ona

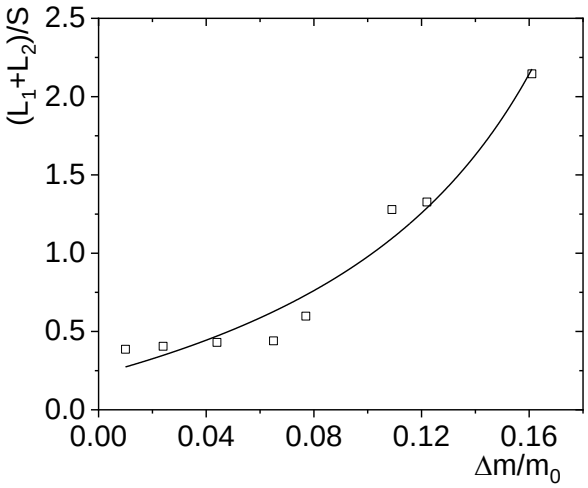
zależnością liniową, natomiast opisana została funkcją wymierną. Dopasowano funkcję w postaci:

$$\frac{L_1+L_2}{S}\left(\frac{\Delta m}{m_0}\right)=\frac{A\cdot\frac{\Delta m}{m_0}+B}{C\cdot\frac{\Delta m}{m_0}+1}, \tag{135}$$

gdzie A = 3.78 ± 1.93, B = 0.225 ± 0.107, C = -3.83 ± 0.71.

Współczynnik *B* jest miarą ilości wody zapułapkowanej w odwodnionej próbce, która to ilość nie jest wykrywalna metodami grawimetrycznymi. Zaobserwowano występowanie bardzo małej puli wody pułapkowanej (współczynnik B jest powyżej zera). Taka frakcja wody została zaobserwowana również w liofilizowanych błonach fotosyntetycznych pszenicy (Harańczyk i in. 2006a).

Wymierna postać zależności hydratacyjnej sygnału od frakcji mobilnej świadczy o obecności frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie (Harańczyk i in. 1999, 2016, 2017). Gdy rozpuszczalna frakcja stała, w całości zostaje rozpuszczona, zależność hydratacyjna sygnału cieczowego na jednostkę sygnału stałego staje się funkcją liniową (Harańczyk i in., 1999). Nie zaobserwowano jednak takiego efektu w badanych próbkach. Innym mechanizmem wywołujacym wymierną formę wzmiankowanej zależności jest akcja enzymatyczna lichenazy w organiźmie budzącym się ze stanu anhydrobiozy, grzybach zlichenizowanych z gatunku *Cetraria aculeata* (Harańczyk i in. 2016), czy *Turgidosculum complicatulum* (Bacior i in. 2017).

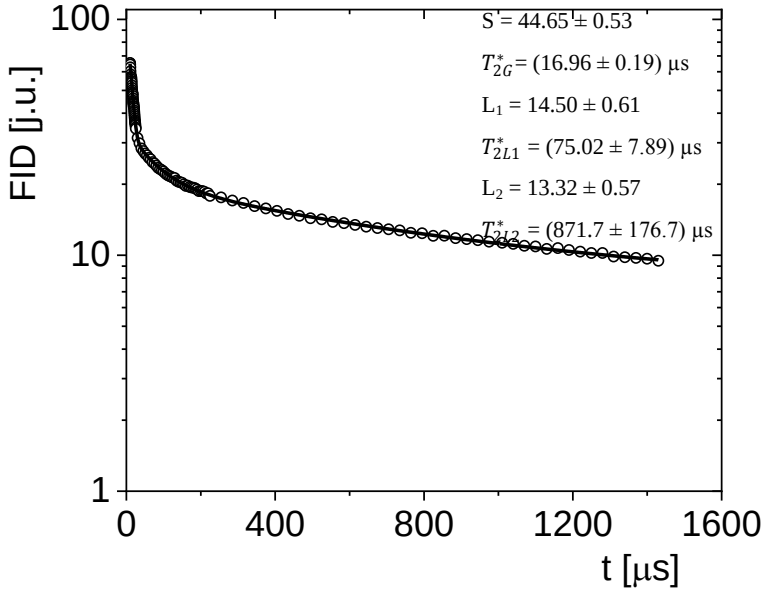


Rycina 50. Zależność hydratacyjna cieczowego sygnału ^{1}H-NMR FID, wyrażonego w jednostkach sygnału stałego, $(L_1+L_2)/S$, dla żywych larw *P. vanderplanki*; do danych dopasowano funkcję wymierną postaci (135) - linia ciągła

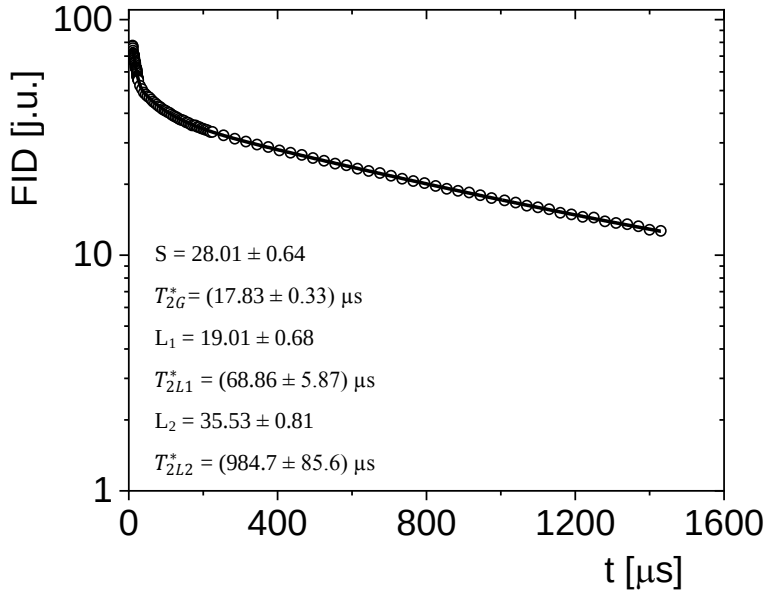
3.5.2. Pomiary zależności hydratacyjnych zaniku swobodnej precesji dla protonów ^{1}H-NMR FID u martwych larw *P. vanderplanki*

3.5.2.1. Sygnał składowej stałej w funkcji FID

Podobnie jak w przypadku żywych larw *P. vanderplanki* sygnał zaniku swobodnej precesji dla protonów ^{1}H-NMR FID, dobrze opisywany jest superpozycją jednej funkcji Gaussa o amplitudzie S oraz dwóch składowych zanikających eksponencjalnie o amplitudach L_1 i L_2. Przykładowe sygnały ^{1}H-NMR FID dla larw martwych (nieanhydrobiotycznych) pokazano na Ryc. 51. W przypadku tych próbek również nie zaobserwowano występowania na wykresach „falki" typowej dla funkcji Abragama.



a)



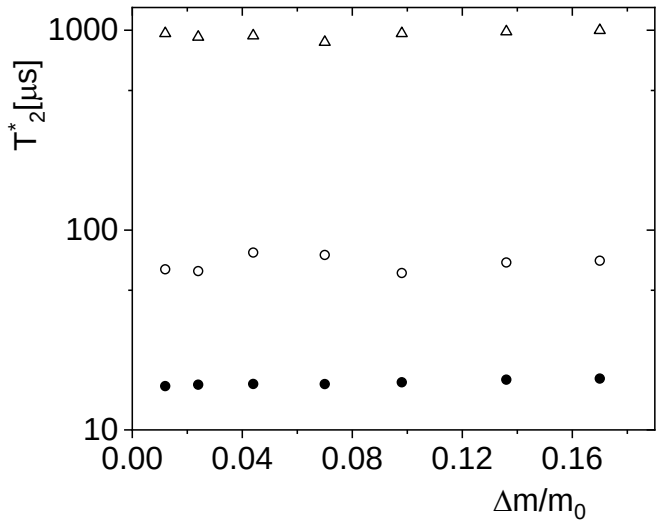
b)

Rycina 51. Sygnał zaniku swobodnej precesji dla protonów ^{1}H-NMR FID martwych larw *Polypedilum vanderplanki* uwodnionych do poziomu: a) $\Delta m/m_0$ = 0.07, b) $\Delta m/m_0$ = 0.136

Efektywny czas relaksacji poprzecznej dla znacząco unieruchomionych protonów zmierzony w eksperymencie ^{1}H-NMR FID dla martwych larw *P. vanderplanki* wynosił po uśrednieniu T_{2G}^{*} ≈ 17 μs. Jego wartość nieznacznie wzrastała wraz ze wzrostem poziomu uwodnieniem próbek (najniższa wartość to 16.54 μs, z kolei najwyższa wartość 18.06 μs). Wartość czasu jest zbliżona do uzyskanej dla próbek anhydrobiotycznych. Amplitudę składowej stałej *S*, podobnie jak w próbce larw żywych, użyto do skalowania cieczowej składowej sygnału zaniku swobodnej precesji.

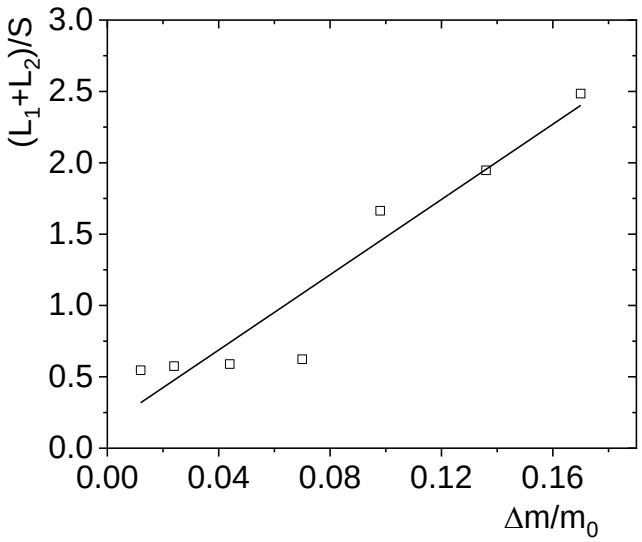
3.5.2.2. Zależność hydratacyjna sygnału cieczowego ^{1}H-NMR FID

W próbkach martwych larw *P. vanderplanki* również wyodrębniono dwie składowe protonów różniących się mobilnością, a mianowicie sygnał pochodzący od protonów wody ściśle związanej oraz sygnał pochodzący od protonów wody luźno związanej. Uśredniona w funkcji poziomu uwodnienia wartość czasów relaksacji dla wody ściśle związanej wyniosła T_{2L1}^{*} ≈ 68 μs, z kolei dla składowej od wody luźno związanej, L_2 , zmierzono czas wynoszący około T_{2L2}^{*} ≈ 950 μs. Wartości są zbliżone do otrzymanych dla larw żywych. Wartości czasów relaksacji dla wszystkich składowych sygnału FID dla badanych nieanhydrobiotycznych larw *P. vanderplanki* zostały przedstawione na Rycinie 52.



Rycina 52. Zależność hydratacyjna efektywnych czasów relaksacji spinowo-spinowej ^{1}H-NMR FID dla protonów martwych larw *P. vanderplanki*: (●) frakcja stała, (○) frakcja wody ściśle związanej, (Δ) frakcja wody luźno związanej

Zależność Hydratacyjna całkowitego sygnału cieczowego wyrażonego w jednostkach sygnału stałego, $(L_1+L_2)/S$, jest opisana funkcją liniową ($\frac{L_1+L_2}{S}\left(\frac{\Delta m}{m_0}\right)=(13.19\pm1.83)\cdot\left(\frac{\Delta m}{m_0}\right)+(0.16\pm0.18)$) i została przedstawiona na Ryc. 53. Postać liniowa funkcji wskazuje na nieobecność frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie. Warto zauważyć, że dopasowanie funkcji wymiernej, w szczególnym przypadku martwych larw może też wchodzić w grę. W takim przypadku parametry dopasowania to: A =7.69 ± 2.56, B = 0.309 ± 0.231, C = -2.13 ± 1.97. Otrzymany współczynnik *B* jest nieco wyższy dla larw martwych co może świadczyć o większej ilości wody zapułapkowanej w odwodnionej próbce. Oznaczałoby to, że nieliniowy kształt zależności hydratacyjnej wynika z aktywowania procesów życiowych w trakcie rehydratacji larwy.



Rycina 53. Zależność hydratacyjna cieczowego sygnału ^{1}H-NMR FID, wyrażonego w jednostkach sygnału stałego, *(L₁+ L₂)/S*, dla martwych larw *P. vanderplanki*; do danych dopasowano funkcję liniową - linia ciągła

3.6. Spektroskopia ^{1}H-NMR larw *Polypedilum vanderplanki*

Wpływ poziomu uwodnienia i temperatury na larwy *P. vanderplanki* badano również metodą ^{1}H-NMR w domenie częstości (dla 300 MHz).

3.6.1. Analiza kształtu i pomiary zależności hydratacyjnych widm ^{1}H-NMR dla rehydratowanych żywych larw *P. vanderplanki*

Widma ^{1}H-NMR dla żywych larw *P. vanderplanki* zarejestrowano w zakresie uwodnień uzyskiwanych z fazy gazowej zakresach do $\Delta m/m_0$ = 0.161. Wykonano również dodatkowe pomiary dla hydratacji równych $\Delta m/m_0$ = 0.31 oraz $\Delta m/m_0$ = 0.34.

Dla zakresu hydratacji niższych, aż do $\Delta m/m_0$ = 0.161, wyodrębniono jedną składową widma pochodzącą od protonów unieruchomionych w znacznym stopniu a opisaną funkcją Gaussa oraz jedną, uśrednioną składową pochodzącą od protonów mobilnych, cieczową, dobrze przybliżoną funkcją Lorentza:

$$A(\nu) = y_0 + \frac{A_G\sqrt{\ln 4}}{\Delta\nu_G \cdot \sqrt{\pi/2}} \exp\left[-2\ln 4 \cdot \left(\frac{\nu-\nu_G}{\Delta\nu_G}\right)^2\right] + \frac{2A_L}{\pi}\left[\frac{\Delta\nu_L}{4\cdot(\nu-\nu_L)^2+\Delta\nu_L^2}\right], \quad (136)$$

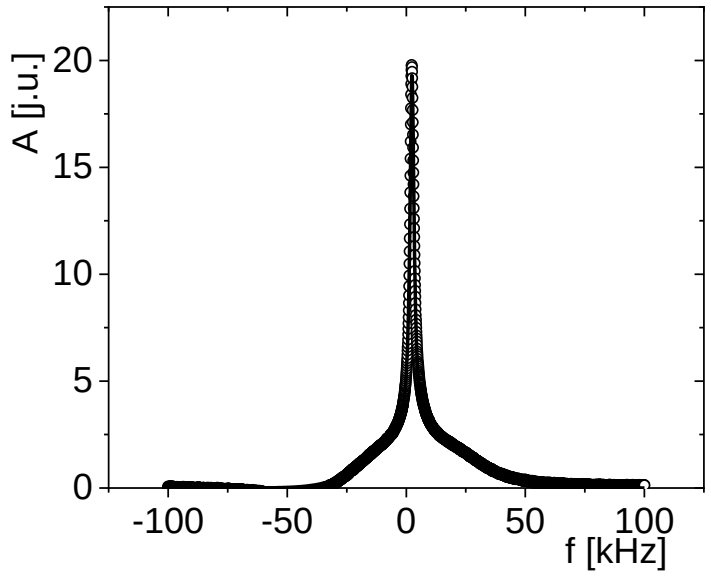
gdzie y_0 jest składową stałą sygnału związaną z aparaturą pomiarową, A_G i A_L są polami powierzchni pod pikami Gaussa i funkcji Lorentza, odpowiednio; $\Delta\upsilon_G$, $\Delta\upsilon_L$ to szerokości

połówkowe funkcji Gaussa i funkcji Lorentza; natomiast υ_G oraz υ_L są położeniami środków linii Gaussa i linii Lorentza.

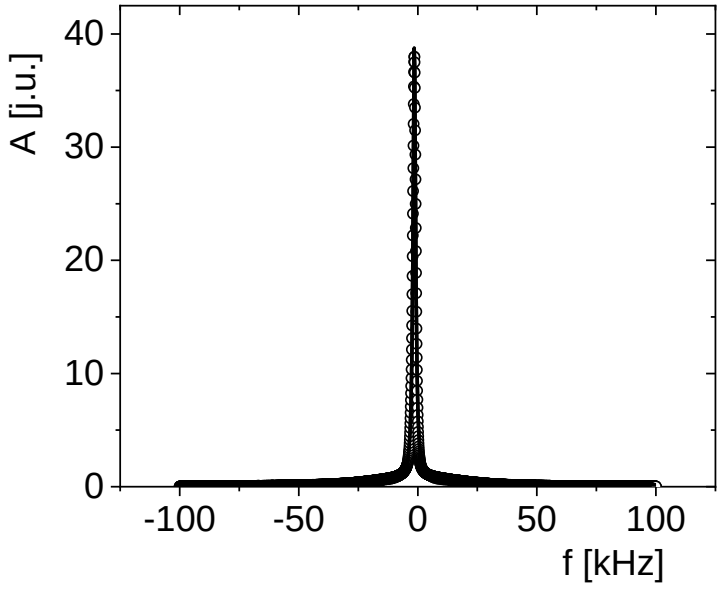
Dla najwyższych poziomów hydratacji ($\Delta m/m_0$ = 0.31 oraz $\Delta m/m_0$ = 0.34), sygnał cieczowy wzrasta i nie udało sie wyodrębnić składowej stałej widma. Dla poziomu uwodnienia $\Delta m/m_0$ = 0.31 oraz dla $\Delta m/m_0$ = 0.34 stwierdza się tylko jedną wąską linię cieczową o kształcie funkcji Lorentza:

$$A(\nu) = y_0 + \frac{2A_L}{\pi}\left[\frac{\Delta\nu_L}{4\cdot(\nu-\nu_L)^2+\Delta\nu_L^2}\right]. \qquad (137)$$

Rycina 54 przedstawia wybrane widma dla niskiego i dla wysokiego poziomu uwodnienia ($\Delta m/m_0$ = 0.024 oraz $\Delta m/m_0$ =0.31).



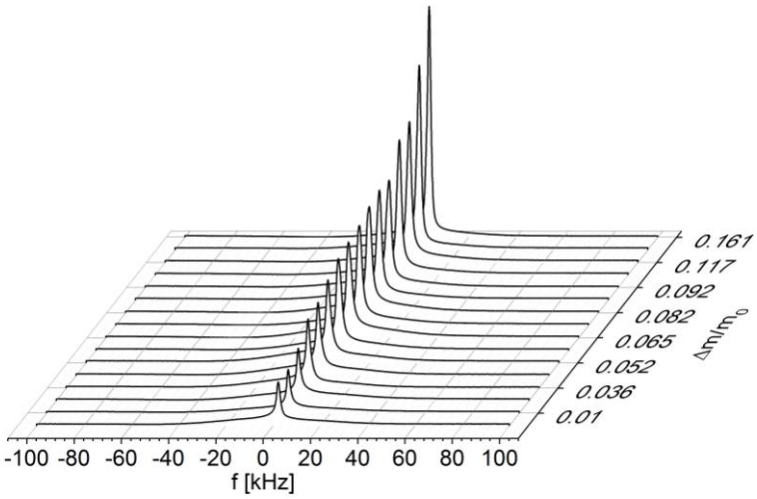
a)



b)

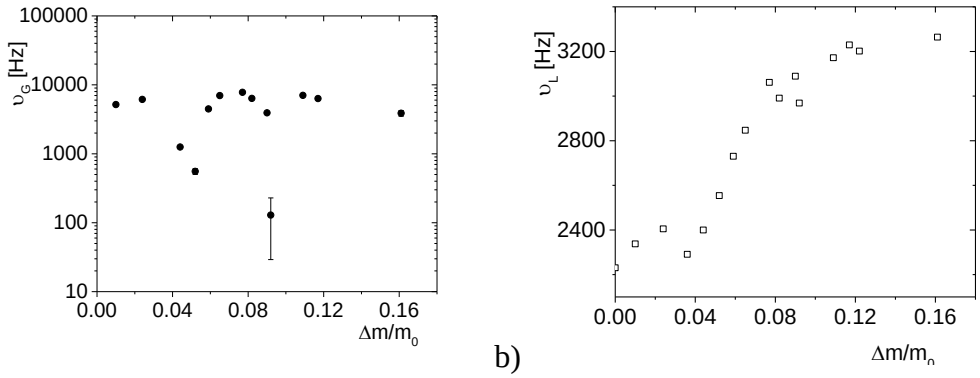
Rycina 54. Widmo ^{1}H-NMR larw żywych *P. vanderplanki* uwodnionych do poziomu a) $\Delta m/m_0 = 0.024$, dopasowane złożeniem funkcji Gaussa i Lorentza; oraz b) - uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0.31$, dopasowane wyłącznie funkcją Lorentza: (○) - zmierzone widmo, linia ciągła – dopasowany kształt funkcji

Widma zebrane dla zakresu hydratacji do $\Delta m/m_0$ = 0,161 zostały zestawione na zbiorczej Rycinie 55.



Rycina 55. Widma ^{1}H-NMR zmierzone dla temperatury pokojowej w funkcji poziomu hydratacji dla żywych larw *Polypedilum vanderplanki*

Położenia środków składowych widma opisanych funkcją Gaussa wynoszą po uśrednieniu $\upsilon_G \approx 4.3$ kHz względem częstotliwości rezonansowej protonów swobodnych w polu magnetycznym o indukcji 7 T, aczkolwiek charakteryzuje je duży rozrzut. Położenie linii sygnału cieczowego ma średnią wartość $\upsilon_L \approx (2.8 \pm 0.4)$ kHz. Wartości położenia wzrastają wraz ze wzrostem poziomu hydratacji próbek. Na Rycinach 56a i 56b przedstawiono zależność położeń środków obu linii wyrażonych w funkcji uwodnienia.



a) b)

Rycina 56. Położenia środków linii składowej stałej (●) oraz składowej cieczowej (□) widma ^{1}H-NMR dla żywych larw *Polypedilum vanderplanki* wyrażone w funkcji poziomu uwodnienia: a) składowa widma pochodząca od protonów o mocno ograniczonej mobilności, b) składowa widma pochodząca od protonów mobilnych

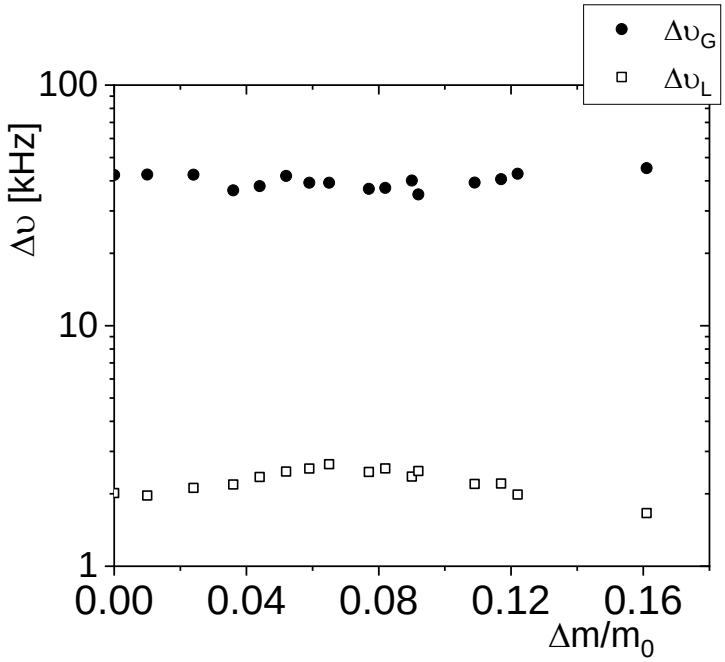
Szerokość połówkowa składowej widma pochodzącej od ciała stałego jest równa $\Delta\upsilon_G \approx$ (39.98 ± 2.74) kHz (Ryc. 57). Jej szerokość połówkowa wskazuje na występowanie pól lokalnych o wartości rzędu 1 mT. Dla badanych poziomów uwodnień, w których możliwe było wyodrębnienie składowej stałej, jej zmiany są bardzo niewielkie. Dla składowej widma opisanej funkcją Gaussa, czas relaksacji poprzecznej może zostać policzony z równania:

$$T_{2G}^{*} = \frac{\sqrt{2}}{\pi \cdot \Delta\upsilon_G}. \qquad (138)$$

Wyniósł on około 11μs, co jest wartością krótszą, niż wyznaczona w eksperymentach relaksacyjnych.

Z widma wyodrębniono jedną, uśrednioną składową cieczową, do której dopasowano funkcję Lorentza o szerokości połówkowej około $\Delta\upsilon_L \approx (2.26 \pm 0.27)$ kHz, i odpowiada wartości efektywnego czasu relaksacji spinowo-spionowej, T_{2L}^{*}, równej około 140 μs , co odpowiada wartości czasu relaksacji dla protonów wody ściśle związanej (Rycina 57). Dla składowej cieczowej widma, czas relaksacji spinowo – spinowej wyznaczono z zależności:

$$T_{2L}^{*} = \frac{1}{\pi \cdot \Delta\upsilon_{L}} \,. \tag{139}$$

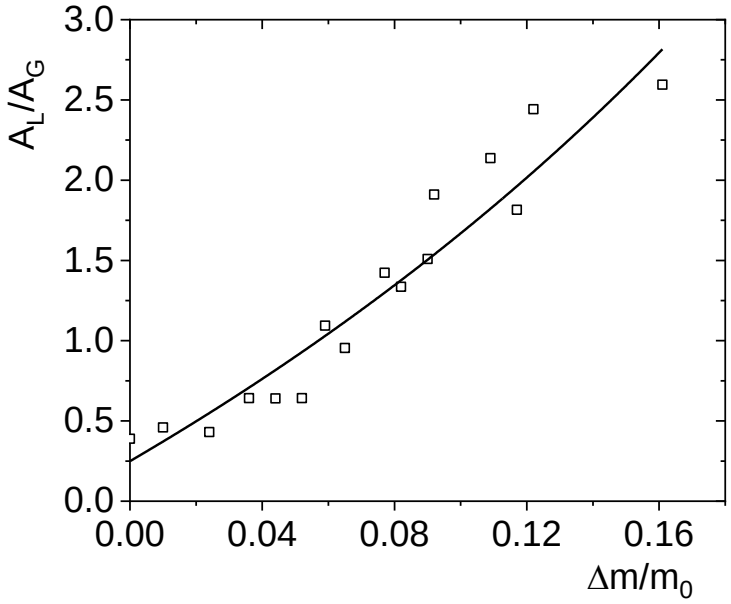


Rycina 57. Szerokości połówkowe składowej stałej (●) oraz składowej cieczowej (□) widma ^{1}H-NMR dla żywych larw *Polypedilum vanderplanki* wyrażone w funkcji poziomu uwodnienia

Zależność hydratacyjna sygnału cieczowego wyrażonego w jednostkach sygnału stałego A_L/A_S jest nieliniowa, dlatego do danych doświadczalnych dopasowano funkcję wymierną postaci:

$$\frac{A_L}{A_S}\left(\frac{\Delta m}{m_0}\right) = \frac{A\cdot\frac{\Delta m}{m_0}+B}{C\cdot\frac{\Delta m}{m_0}+1}, \tag{140}$$

gdzie parametry uzyskane z dopasowania wyniosły: A = 11.66 ± 3.62, B = 0.249 ± 0.142, C = -1.52 ± 0.99. Jest to zachowanie zgodne do zaobserwowanym w domenie czasu. Współczynnik $B = \frac{A_L}{A_S}\left(\frac{\Delta m}{m_0} = 0\right)$ służy jako miara ilości wody zapułapkowanej w odwodnionej próbce, niewykrywalnej metodami grawimetrycznymi. Otrzymany wynik jest zbliżony do wyznaczonego metodą NMR w domenie czasu. Nieliniowa forma zależności hydratacyjnej sygnału pochodzącego od protonów mobilnych oznacza obecność frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie (Harańczyk i in. 1999, 2016, Bacior i in. 2017).



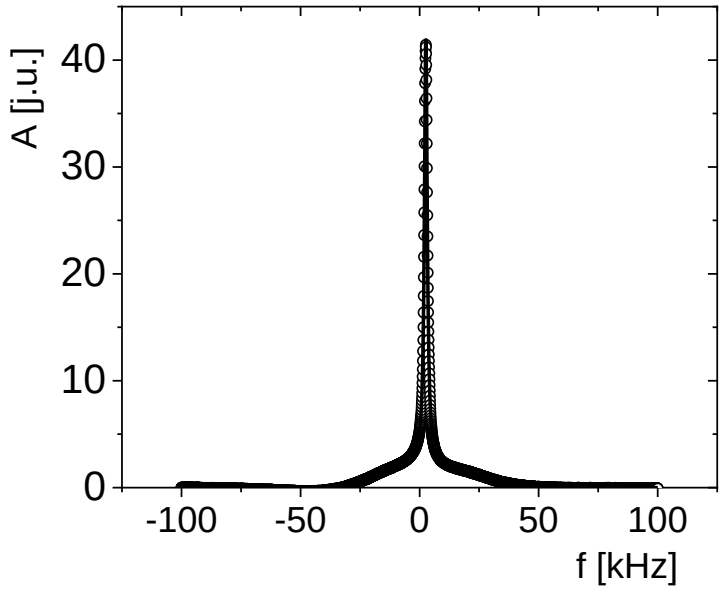
Rycina 58. Hydratacyjna zależność składowej cieczowej widma ^{1}H-NMR, wyrażonej w jednostkach składowej stałej suchej masy, $\Delta m/m_0$, dla żywych larw *Polypedilum vanderplanki*. Do punktów pomiarowych (□) dopasowano funkcję wymierną (135) – linia ciągła

3.6.2. Analiza kształtu i hydratacyjne pomiary widm ^{1}H-NMR dla martwych larw *P. vanderplanki*

Widma ^{1}H-NMR dla martwych larw *P. vanderplanki* hydratowanych z fazy gazowej zarejestrowano w zakresie uwodnień do $\Delta m/m_0 = 0.17$. Warunki wybrano jak przy pomiarach w domenie czasu.

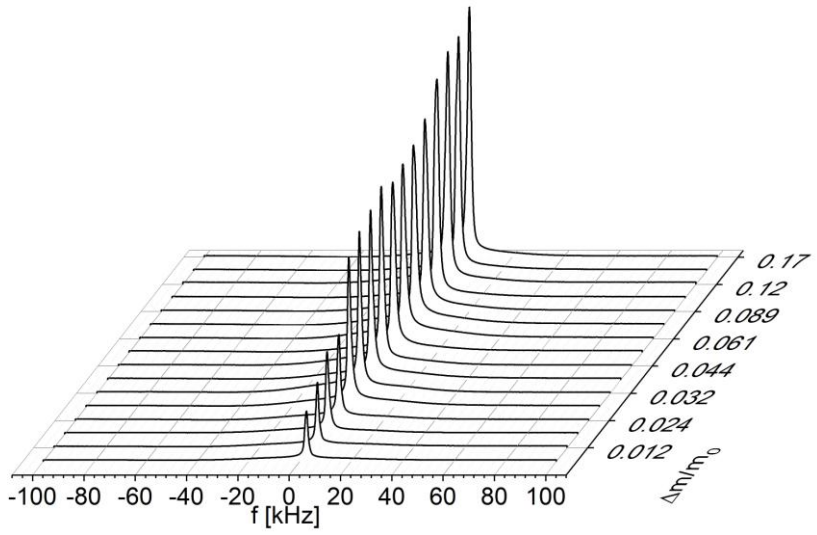
Widma ^{1}H-NMR dla próbek o niskim poziomie uwodnienia (do $\Delta m/m_0 = 0.17$) są superpozycją jednej szerokiej linii o kształcie dobrze przybliżonym funkcją Gaussa, pochodzącej od unieruchomionych w znacznym stopniu protonów (ciała stałego) oraz jednej wąskiej linii od protonów mobilnych, cieczowej, opisanej funkcją Lorentza zgodnie z równaniem (136).

Na Rycinie 59 przedstawiono przykładowe widmo ^{1}H-NMR zmierzone w temperaturze pokojowej dla próbki martwych larw *P. vanderplanki* o uwodnieniu $\Delta m/m_0 = 0.024$.



Rycina 59. Widmo ^{1}H-NMR martwych larw *Polypedilum vanderplanki* uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.024$. Widmo jest złożeniem pojedynczej funkcji Gaussa oraz funkcji Lorentza: (○) - zmierzone widmo, linia ciągła – dopasowany kształt funkcji

Zebrane widma w zależności od poziomu uwodnienia próbek zostały przedstawione na Rycinie 60.

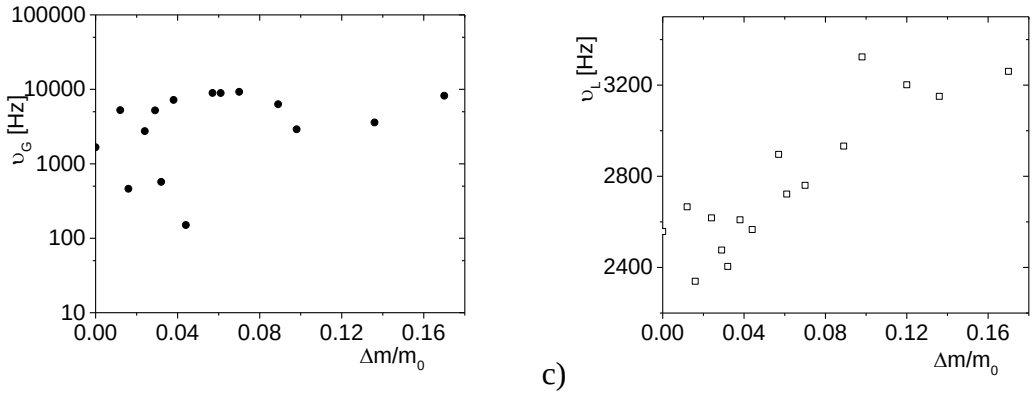


Rycina 60. Widma ^{1}H-NMR dla martwych larw *Polypedilum vanderplanki* zestawione w funkcji poziomu hydratacji zarejestrowane w temperaturze pokojowej

Położenia środków dopasowanych funkcją Gaussa składowych widma po uśrednieniu wynoszą $\upsilon_G \approx 4.7$ kHz i również charakteryzuje je duży rozrzut. Środki dopasowanych

funkcją Lorentza składowych widma sygnału cieczowego mają pozycję około $\upsilon_L \approx (2.8 \pm 0.3)$ kHz rosnącą wraz ze wzrostem poziomu hydratacji larw. Zależność położeń środków pików w funkcji uwodnienia pokazano na Rycinie 61.

a)



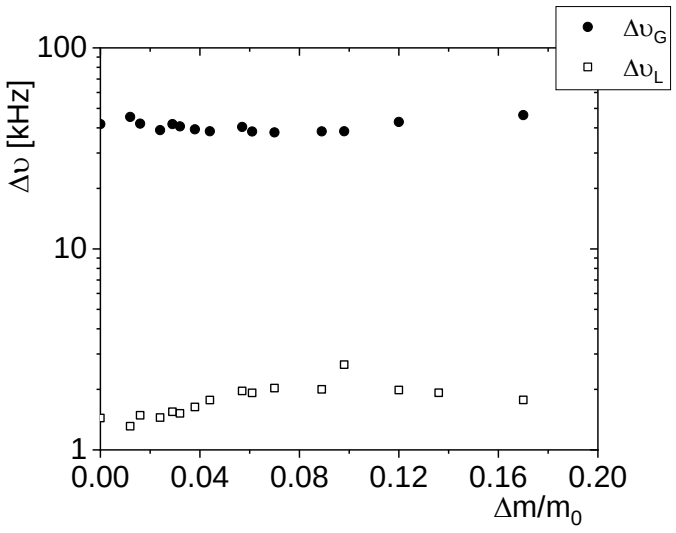
b) c)

Rycina 61. Położenia środków linii składowej stałej (●) oraz cieczowej (□) widma ^{1}H-NMR dla martwych larw *Polypedilum vanderplanki* wyrażone w funkcji uwodnienia:
a) - składowa stała w skali logarytmicznej, b) - rosnący charakter składowej cieczowej

Szerokość połówkowa składowej stałej widma wynosi dla martwych larw *P. vanderplanki* $\Delta\upsilon_G \approx$ (40.73 ± 2.60) kHz (Ryc. 62). Jej zmiany, podobnie jak w przypadku larw żywych są niewielkie, a wartość jest zbliżona. Pole pod powierzchnią piku Gaussa posłużyło do skalowania pola pod składowymi widma opisanymi funkcjami Lorentza. Dla składowej stałej widma, czas relaksacji spinowo - spinowej wyznaczony z równania (138) wyniósł około 11μs.

Podobnie jak dla żywych larw zarejestrowano jedną, uśrednioną składową cieczową, opisaną funkcją Lorentza. Uśredniona szerokość połówkowa wynosi około $\Delta\upsilon_L \approx$ (1.78 ± 0.33) kHz (Rycina 62). Dla składowej cieczowej, czas relaksacji poprzecznej, wyliczony z zależności (139) wyniósł około 179 μs.

Wprawdzie dla próbek martwych i dla żywych otrzymano zbliżone wartości szerokości połówkowych funkcji Gaussa, jednak szerokości połówkowe funkcji Lorentza opisujących składowe mobilne widma ^{1}H-NMR są niższe dla próbek martwych. Sugeruje to, że proces zatrzymania czynności życiowych zwiększył mobilność wody związanej w próbce.

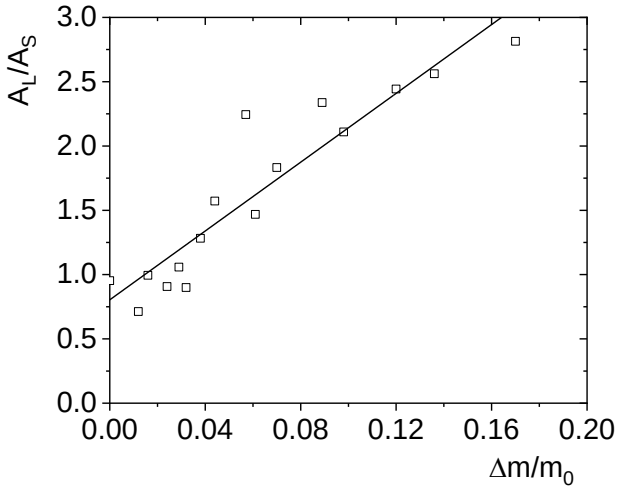


Rycina 62. Szerokości połówkowe składowej stałej (●) oraz cieczowej (□) widma ^{1}H-NMR dla martwych larw *Polypedilum vanderplanki* wyrażone w funkcji poziomu uwodnienia

Hydratacyjna zależność sygnału cieczowego wyrażonego w jednostkach sygnału stałego A_L/A_S jest liniowa, co wskazuje na nieobecność frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie (Ryc. 63). Do uzyskanych danych doświadczalnych dopasowano funkcję liniową:

$$\frac{A_L}{A_S}\left(\frac{\Delta m}{m_0}\right) = (13.37 \pm 1.41) \cdot \left(\frac{\Delta m}{m_0}\right) + (0.80 \pm 0.11). \qquad (141)$$

Wydaje się, że w larwach martwych jest mniej, lub nie ma w ogóle, frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie choćby dlatego, że nie syntezują one trehalozy na takim poziomie jak larwy żywe.



Rycina 63. Hydratacyjna zależność składowej cieczowej widma ^{1}H-NMR, wyrażonej w jednostkach składowej stałej suchej masy, $\Delta m/m_0$, dla martwych larw *Polypedilum vanderplanki*. Do punktów pomiarowych (□) dopasowano funkcję liniową –linia ciągła

3.6.3. Czas relaksacji poprzecznej T_2

Sekwencja Carra-Purcella-Meibooma-Gilla jak i sekwencja echa Hahna umożliwiają wyznaczenie rzeczywistego czasu relaksacji poprzecznej, T_2. Odstęp czasowy $2\cdot\tau$ pomiędzy początkiem sekwencji, a echem spinowym wyklucza obserwację składowej sygnału pochodzącej od mało mobilnych protonów i pozwala na obserwację wyłącznie składowej cieczowej. Do ech zanikającej w czasie składowej poprzecznej zarejestrowanych podczas sekwencji echa Hahna ($2\cdot\tau$ = 60 μs) dopasowano superpozycję dwóch funkcji eksponencjalnych. Dla maksymalnie odwodnionych próbek uzyskano dla larw żywych czasy T_2 równe 266 μs oraz 7.94 ms, z kolei dla próbek martwych wynoszące 150 μs oraz 9.23 ms. Czasy te są zbliżone do otrzymanych dla próbek włosów ludzkich. Wydaje się, że szybko zanikającą składową można interpretować, jako pochodzącą od lipidów, aczkolwiek może to być szybka składowa w przypadku częściowej wymiany spinowej dla dwóch podukładów. Raczej czas T_2 sygnału dla lipidów powinien być krótszy niż otrzymany z pomiarów (MacKay 1981). Na przykład, dla błon fotosyntetycznych wyniósł on 83.6 μs. (Harańczyk i in. 2015).

3.6.4. Widmo ^{1}H-NMR dla żywych aktywnych larw *Polypedilum vanderplanki* uwodnionych z fazy ciekłej

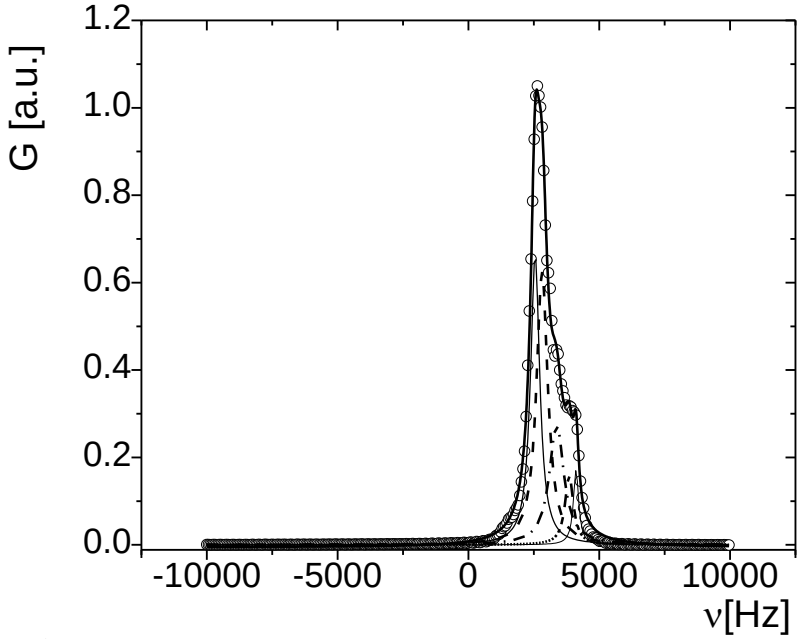
Widma ^{1}H-NMR dla aktywnych (w pełni uwodnionych z anhydrobiozy larw *P. vanderplanki*) zmierzono na spektrometrze Bruker Avance III. Długość impulsu $\pi/2$ = 2.2 μs, a czas repetycji wynosił 3 s.

Dla aktywnych larw *P. vanderplanki*, widmo ^{1}H-NMR, drastycznie różni się od takiego dla larw zdehydratowanych lub dla hydratowanych z fazy gazowej. Sygnał pochodzący od protonów o małej ruchliwości nie jest widoczny. Widmo dobrze opisane przez superpozycję pięciu składowych pochodzących od różnych frakcji bardzo mobilnych (cieczowych) protonów (Ryc. 64) zostało dopasowane przy użyciu superpozycji pięciu funkcji Lorentza, według wzoru:

$$A(\nu)=\sum_{i=1}^{5}\frac{2A_{L_i}}{\pi}\left[\frac{\Delta\nu_{L_i}}{4\cdot\left(\nu-\nu_{L_i}\right)^2+\Delta\nu_{L_i}^2}\right], \tag{142}$$

gdzie A_{L_i} to amplitudy kolejnych frakcji wody opisanych przez funkcje Lorentza, $\Delta\upsilon_{L_i}$ to szerokości połówkowe kolejnych funkcji składowych, natomiast υ_{L_i} są położeniami środków kolejnych składowych linii.

Matryca stała larwy *P. vanderplanki* mogła być częściowo uwodniona lub pozostać niezmieniona pod względem liczby protonów, podczas gdy sygnał pochodzący od mobilnych protonów zawartych w różnych kompartmentach ciała uwodnionej aktywnej larwy drastycznie wzrastał w procesie rehydratacji. Wynikiem tego była zupełnie inna forma widma ^{1}H-NMR dla aktywnej postaci larwy, w której pozostała część sygnału pochodzącego od unieruchomionych protonów nie była dopasowana.



Rycina 64.Widmo ^{1}H-NMR dla larw *Polypedilum vanderplanki* w postaci aktywnej (uwodnionej z anhydrobiozy), zarejestrowane dla 300 MHz w temperaturze pokojowej; długość impulsu $\pi / 2 = 2{,}2\ \mu s$

Najprawdopodobniej widma ^{1}H-NMR dla aktywnej, uwodnionej z anhydrobiozy, larwy *P. vanderplanki* pokazują sygnał od ściśle związanej i luźno związanej frakcji wody. Sygnału od lipidów nie udało się wyodrębnić. Szerokości linii dla składników L_3 i dla L_2 sugerują, że co najmniej linia L_3 pochodzi z mocno związanej frakcji wodnej. Inne składniki widma pochodzą z wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych luźnych i / lub wolnych frakcji wodnych oraz od wody osadzonej w jelitach larw. Czas aktywacji larwy jest stosunkowo krótki dla znacznej syntezy metabolicznej dużej ilości lipidów w ciele larwalnym, w związku z czym obserwowane linie pochodzą z kilku frakcji wody. Wyniki dopasowań przedstawiono w Tabeli 13.

Tabela 13. Wartości parametrów widma ^{1}H-NMR dla aktywnych żywych larw *Polypedilum vanderplanki*. Pola pod poszczególnymi liniami są znormalizowane do obszaru pod widmem.

Kolejna linia	A_{L_i} [%]	$\Delta\upsilon_{L_i}$	υ_{L_i}
1	A_{L_1} = (31.3±5.3) %	$\Delta\upsilon_{L_1}$ = (422±24) Hz	υ_{L_1} = (2548.5±9.9) Hz
2	A_{L_2} = (36.4±8.2) %	$\Delta\upsilon_{L_2}$ = (521±59) Hz	υ_{L_2} = (2816±16) Hz
3	A_{L_3} = (20.7±5.3) %	$\Delta\upsilon_{L_3}$ = (670±110) Hz	υ_{L_3} = (3371±18) Hz
4	A_{L_4} = (6.9±3.3) %	$\Delta\upsilon_{L_4}$ = (390±120) Hz	υ_{L_4} = (3852±21) Hz
5	A_{L_5} = (4.7±1.4) %	$\Delta\upsilon_{L_5}$ = (245±44) Hz	υ_{L_5} = (4112±12) Hz

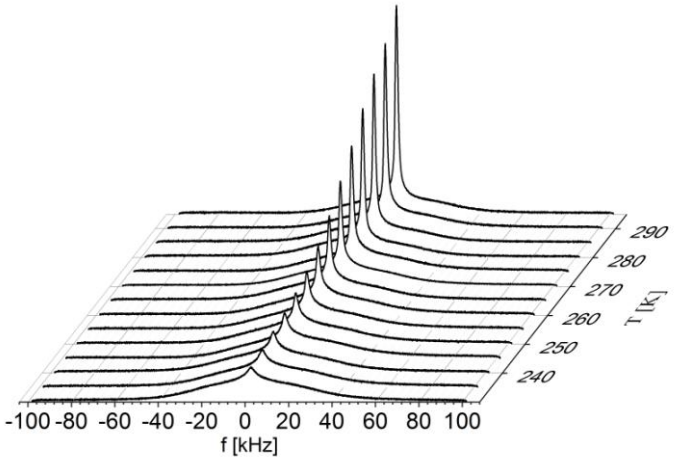
3.6.5. Pomiary temperaturowe widm ^{1}H-NMR dla larw *Polypedilum vanderplanki*

Pomiary widm ^{1}H-NMR przy częstotliwości 300 MHz w funkcji obniżanej temperatury wykonano dla larw *P. vanderplanki*, zarówno dla żywych maksymalnie odwodnionych oraz o hydratacji $\Delta m/m_0$ = 0.122 i $\Delta m/m_0$ = 0.166 oraz dla próbek martwych wysuszonych.

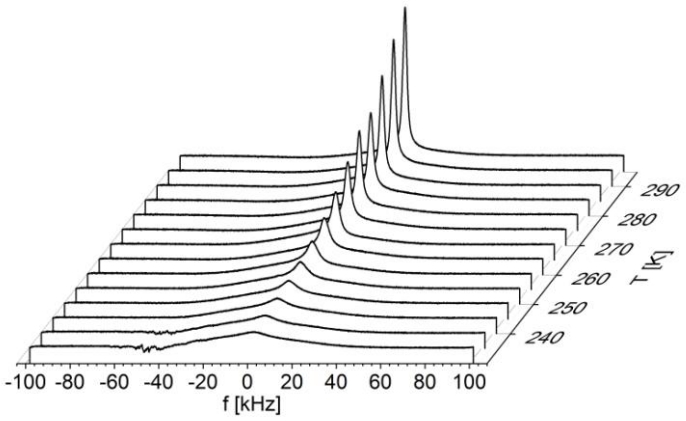
Zmierzone widmo ^{1}H-NMR jest superpozycją składowej stałej opisanej funkcją Gaussa oraz jednej składowej cieczowej mającej kształt funkcji Lorentza zgodnie z formułą (136).

3.6.5.1. Pomiary temperaturowe widm ^{1}H-NMR dla żywych larw *P. vanderplanki*

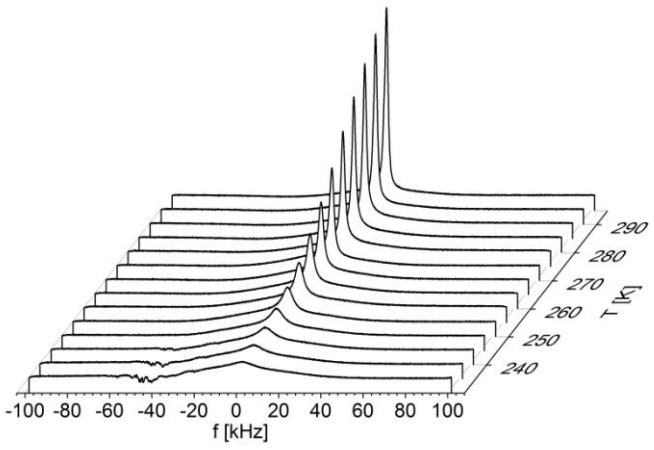
Rycina 65 przedstawia rodziny widm ^{1}H-NMR dla całego zakresu zmierzonych temperatur (między 230 K, a 295 K) dla larw *P. vanderplanki* żywych skrajnie wysuszonych oraz uwodnionych do $\Delta m/m_0$ = 0.122 oraz do $\Delta m/m_0$ = 0.166 zmierzone dla temperatur od 230 K do 295 K.



a)



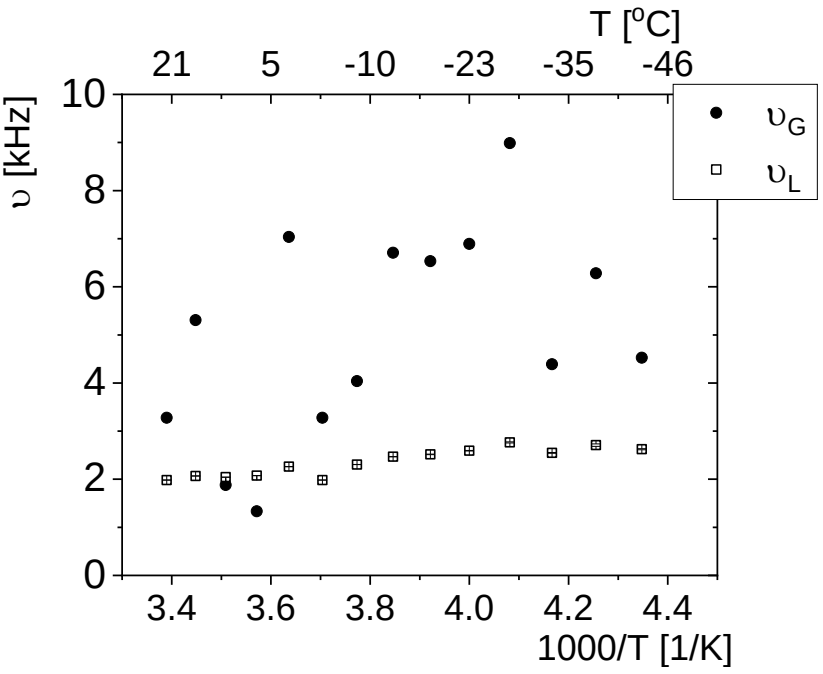
b)



c)

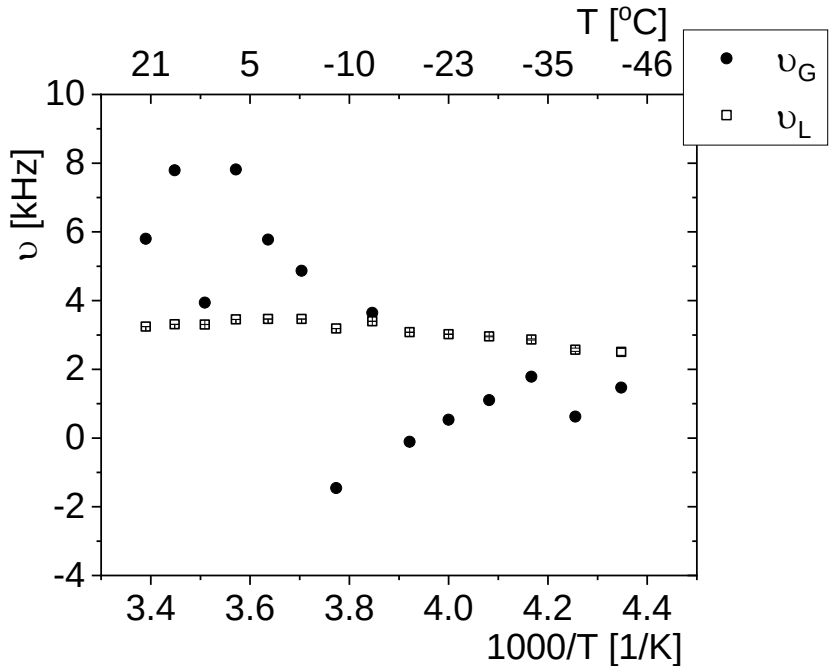
Rycina 65. Widma ^{1}H-NMR dla larw żywych *Polypedilum vanderplanki* dla: a) skrajnie wysuszonej próbki; b) larw o uwodnieniu $\Delta m/m_0$ = 0.122; c) larw o uwodnieniu $\Delta m/m_0$ = 0.166, zmierzone dla temperatur od 230 K do 295 K

Położenia pików pochodzących od składowej Gaussowskiej charakteryzuje duży rozrzut typowy dla szerokiej funkcji Gaussa w przeciwieństwie do stabilnych położeń środków pików składowych Lorentzowskich.. Wraz z obniżaniem temperatury położenie linii Lorentza widm ^{1}H-NMR próbek skrajnie wysuszonych żywych larw *P. vanderplanki* przesuwa się w kierunku wyższych częstotliwości od około 2 kHz w temperaturze pokojowej do 2.7 kHz w temperaturze 230 K. Dla uwodnienia $\Delta m/m_0$ = 0.122 wartość położenia środków linii przesuwała się ku niższym polom wraz z obniżaną temperaturą od około 3.2 kHz do 2.5 kHz. Natomiast dla żywych larw uwodnionych do $\Delta m/m_0$ = 0.166 obniżała się z obniżaną temperaturą od około 3.3 kHz w temperaturze pokojowej do 2.6 kHz w 230 K. Położenia środków linii składających się na widma przedstawione są na Ryc.66.

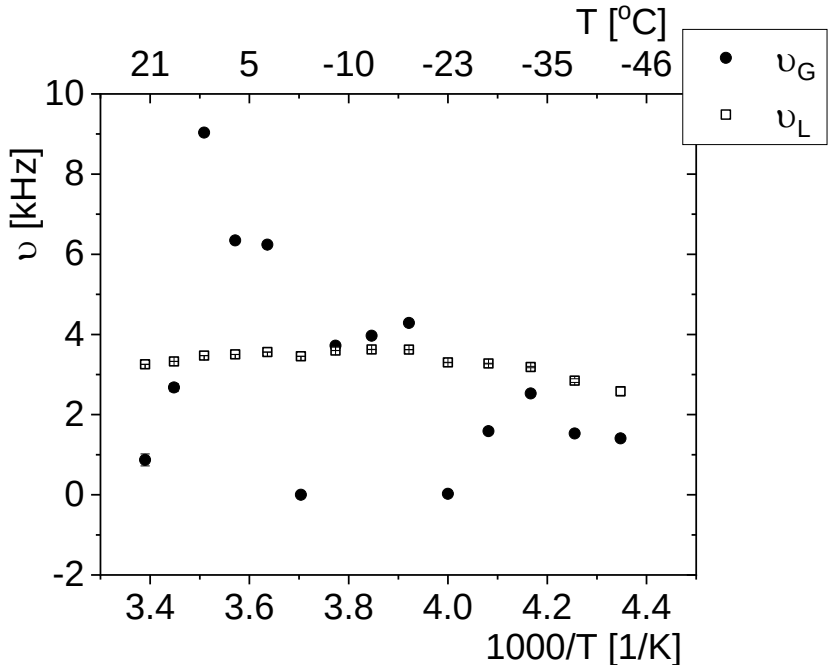


a)

b)



c)

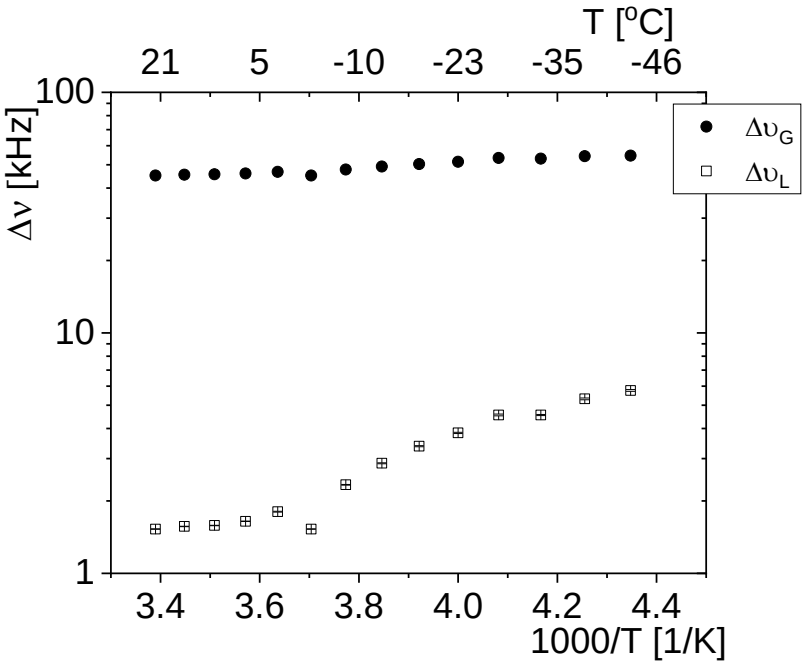


Rycina 66. Położenia linii widm ^{1}H-NMR dla żywych larw *Polypedilum vanderplanki* zmierzone w funkcji obniżanej temperatury; składowa dopasowana funkcją Gaussa (●), składowa opisana funkcją Lorentza (□). Poziom uwodnienia: a) larwy skrajnie wysuszone, b) $\Delta m/m_0$ = 0.122, c) $\Delta m/m_0$ = 0.166

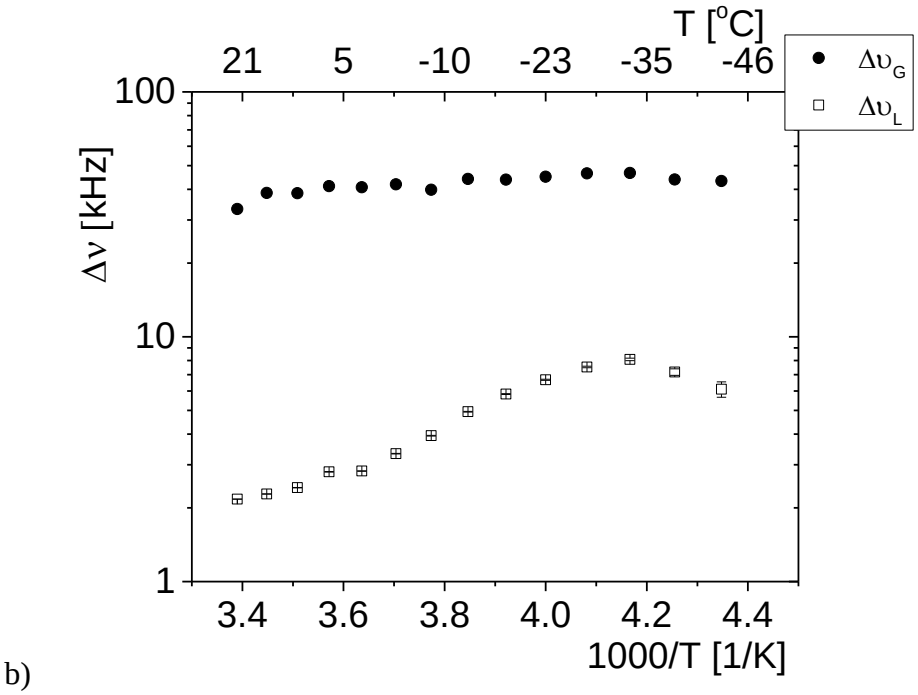
Linia pochodząca od frakcji znacząco unieruchomionych protonów wysuszonych żywych larw *P. vanderplanki* została dobrze dopasowana funkcją Gaussa o szerokości połówkowej około $\Delta\upsilon_G \approx (49 \pm 3.6)$ kHz. Szerokość ta rośnie wraz z obniżaniem temperatury od 45 kHz w 295 K do 55 kHz w 230 kHz. W temperaturze pokojowej wynosi około 45 kHz.

Dla larw uwodnionych szerokość linii Gaussowskiej nie wykazuje tendencji wzrastającej z malejącą temperaturą, a mianowicie dla uwodnienia $\Delta m/m_0$ = 0.122 uśredniona wartość wyniosła $\Delta\upsilon_G \approx (42 \pm 3.6)$ kHz, natomiast dla $\Delta m/m_0$ = 0.166 około (40 ± 4.4) kHz (Rycina 67). Wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia, uśredniona linia od ciała stałego nieznacznie ulega zwężeniu (od 49 do 40 kHz), co może być spowodowane niewielkim wzrostem ruchliwości protonów ciała stałego wraz ze wzrostem hydratacji (do $\Delta m/m_0$ = 0.166).

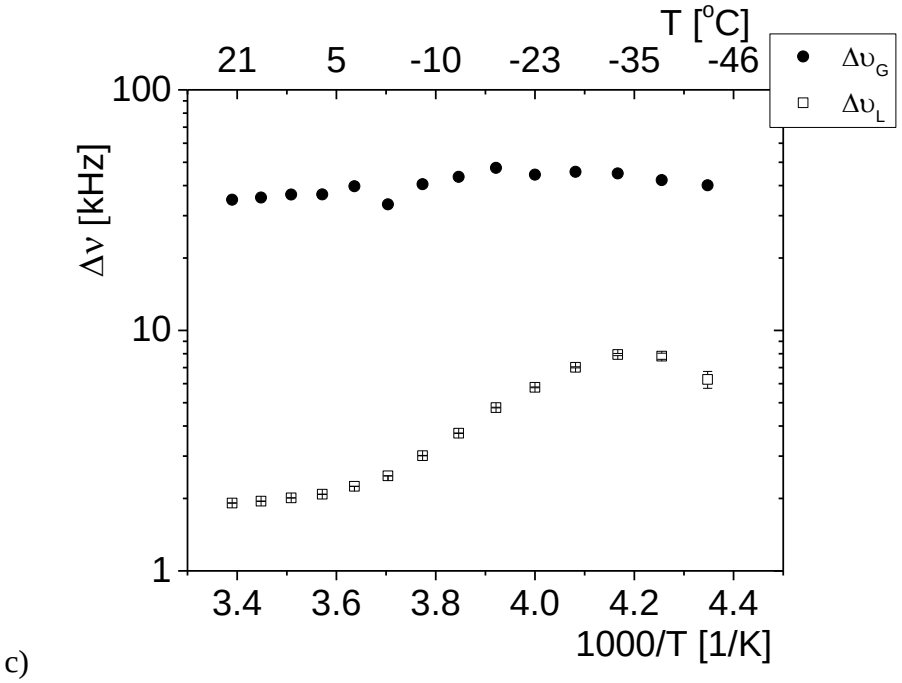
Wraz z obniżaniem temperatury szerokość połówkowa linii pochodzącej od składowej cieczowej dla próbki anhydrobiotycznych larw *P. vanderplanki* rośnie od wartości około 1.5 kHz dla temperatury pokojowej do wartości 5.8 kHz dla najniższej temperatury. Zmiany szerokości połówkowej linii, $\Delta\upsilon_L$, wskazują na proces stopniowego unieruchamiania protonów mobilnych wraz z obniżaniem temperatury. Dla uwodnień $\Delta m/m_0$ = 0.122 oraz dla $\Delta m/m_0$ = 0.166 obserwuje się wzrost szerokości połówkowej, $\Delta\upsilon_L$, a następnie jej spadek wraz z obniżaniem temperatury. Maksimum obserwujemy dla temperatury 240 K. Dla tych uwodnień w temperaturze pokojowej szerokość połówkowa linii Lorentza wynosi około 2 kHz, natomiast obserwowana przy najniższej temperaturze 230 K wynosi około 6 kHz (Rycina 67).



a)



b)



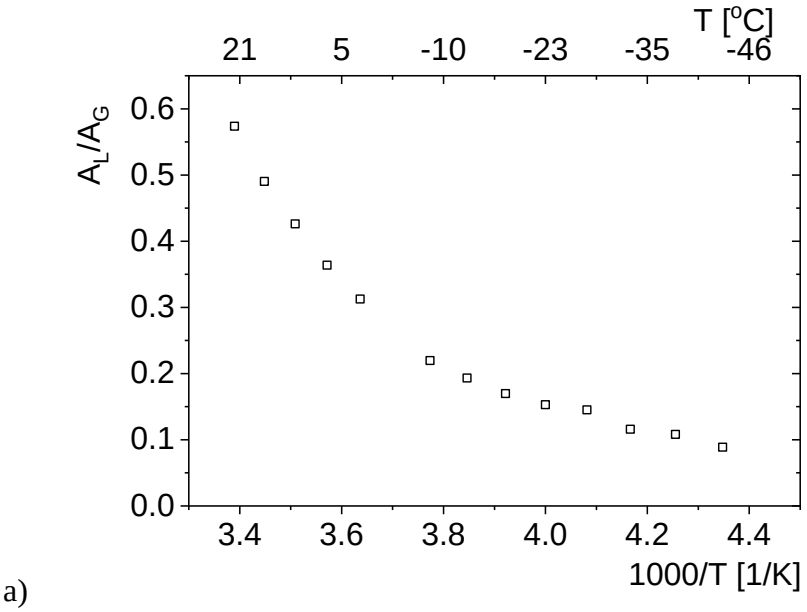
c)

Rycina 67. Zależności temperaturowe szerokości połówkowych linii Gaussa (●) oraz linii Lorentza (□) na widmie ^{1}H-NMR dla ochładzania żywych larw *Polypedilum vanderplanki*: a) skrajnie wysuszonej próbki, oraz b) uwodnionych do poziomu$\Delta m/m_0$ = 0.122 oraz do poziomu c) $\Delta m/m_0$ = 0.166

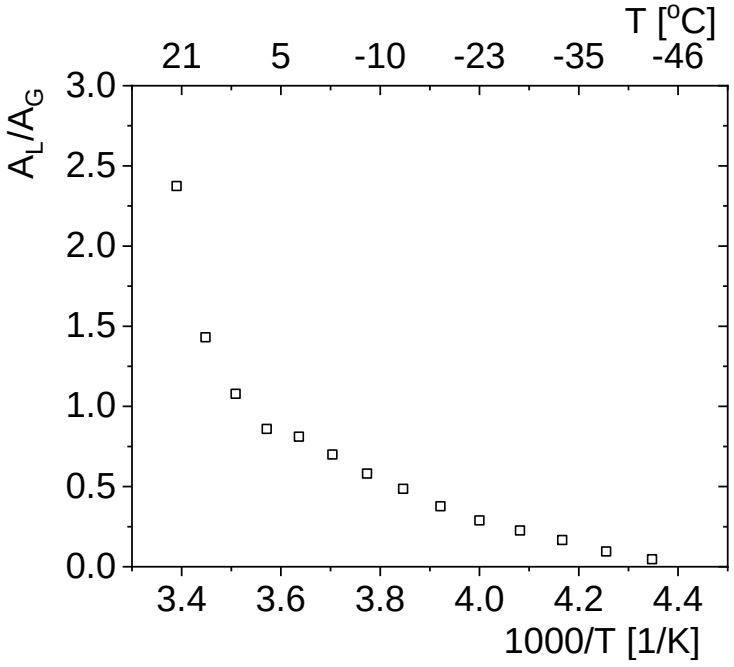
Skoro zmiany kształtu linii Gaussowskiej, wywołane zarówno przez zmianę temperatury, jak i poprzez proces hydratacji nie są znaczne, pole powierzchni pod linią Gaussa przyjęto za jednostkę, do której skalowano sygnały cieczowe. Stosunek pola powierzchni pod linią Lorentza do pola pod pikiem opisanym funkcją Gaussa, A_L/A_G, jest

miarą liczby protonów we frakcji mobilnej wyrażoną w jednostkach protonów matrycy stałej próbki.

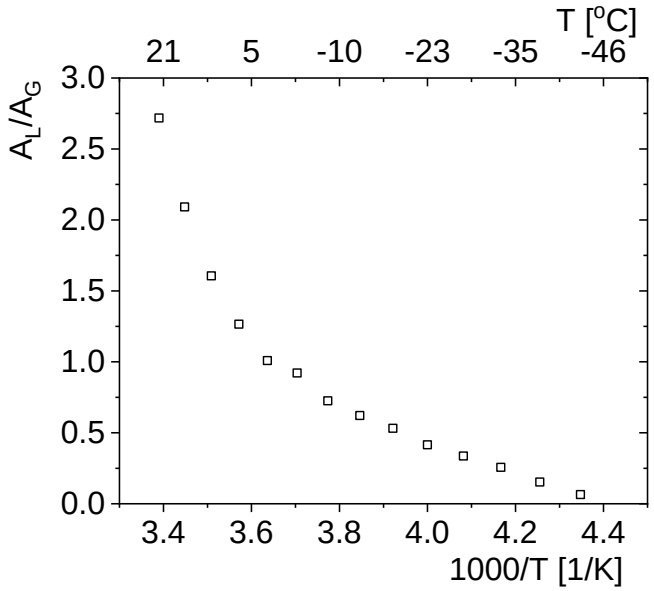
Dla wszystkich zmierzonych próbek obserwuje się spadek A_L/A_G wraz z obniżeniem temperatury (w funkcji rosnącego 1000/T). Dla próbki o najniższym poziomie uwodnienia spadek ten jest ciągły, co wraz ze zwiększaniem się szerokości połówkowej linii cieczowej , jest charakterystyczne dla niekooperatywnego unieruchamiania molekuł wody – bez formowania krystalitów lodu. Podobne zjawisko zaobserwowano dla zlichenizowanych grzybów antarktycznych (Harańczyk i in. 2011). Zależność stosunków A_L/A_G w funkcji 1000/T dla larw żywych przedstawiono na Rycinie 68.



a)



b)

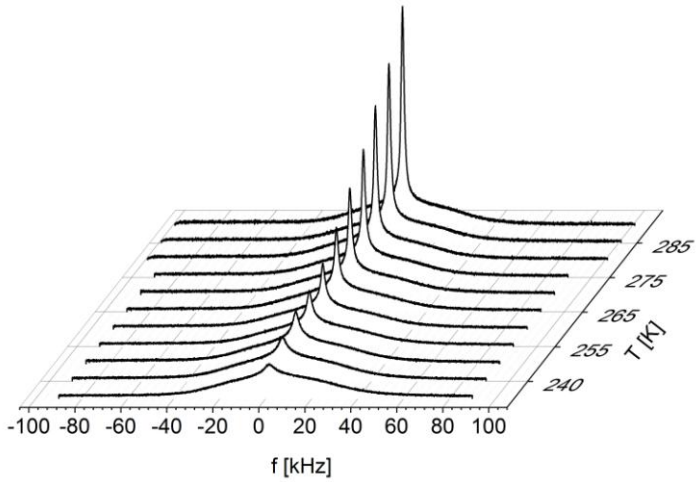


c)

Rycina 68. Temperaturowe zależności sygnału pochodzącego od protonów mobilnych, a wyrażonego w jednostkach sygnału protonów o niskiej mobilności, A_I/A_G, zmierzone dla widm ^{1}H-NMR podczas ochładzania próbek żywych larw *Polypedilum vanderplanki* uwodnionych do poziomów uwodnienia: a) skrajnie wysuszonej próbki, b) $\Delta m/m_0$ = 0.122, c) $\Delta m/m_0$ = 0.166

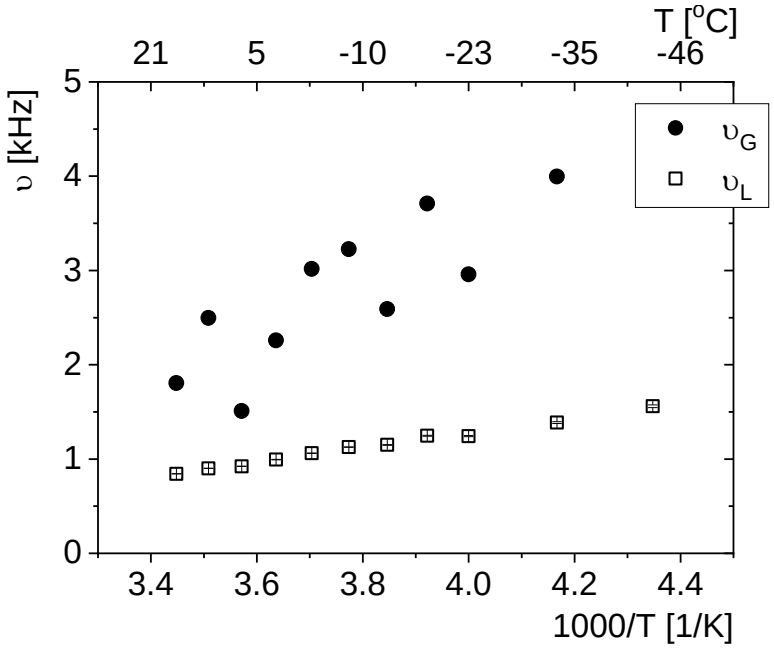
3.6.5.2. Pomiary temperaturowe widm ^{1}H-NMR dla martwych larw *P. vanderplanki*

Widma ^{1}H-NMR wysuszonych martwych larw *P. vanderplanki* są opisywane superpozycją linii pochodzącej od unieruchomionych w znacznym stopniu protonów matrycy stałej ciała larwy, *G*, oraz linii pochodzącej od protonów mobilnych (wody związanej) dobrze dopasowaną funkcją Lorentza. Widma zmierzone dla całego zakresu temperatur od 230K do 290 K w trakcie ochładzania próbki przedstawiono na Rycinie 69.



Rycina 69. Widma ^{1}H-NMR w zakresie od 290 K do 230 K zmierzone dla larw martwych P*olypedilum vanderplanki* dla skrajnie wysuszonej próbki

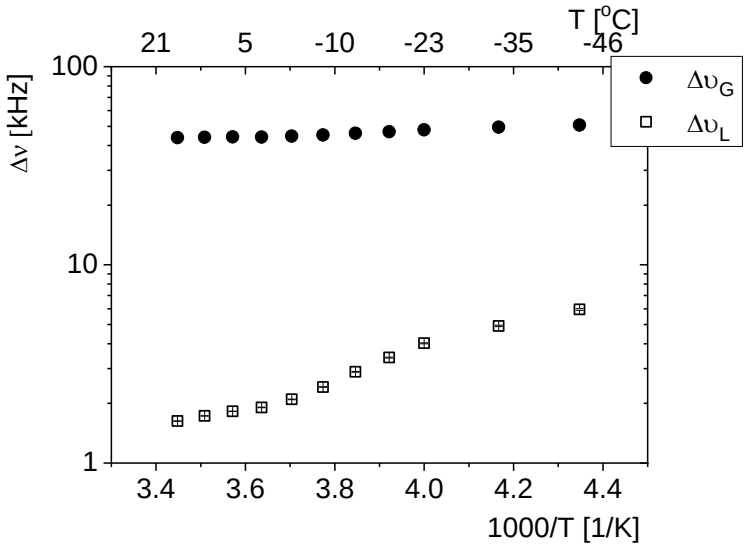
Położenia linii pochodzących od protonów ciała stałego charakteryzuje mniejszy rozrzut niż dla próbek żywych. Można zaobserwować wzrost wartości υ_G wraz z obniżaną temperaturą oraz przesunięcie w kierunku wyższych częstotliwości w stosunku do położeń środków pików pochodzących od frakcji cieczowej. Położenia linii Lorentza w funkcji 1000/*T* dla larw martwych skrajnie wysuszonych również rosną wraz z obniżaną temperaturą od około 0.8 kHz w temperaturze pokojowej do 1.6 kHz. Są więc niższe od wartości uzyskanych dla osobników anhydrobiotycznych. Położenia środków linii pokazano na Rycinie 70.



Rycina 70. Położenia linii widm ^{1}H-NMR pochodzących od matrycy stałej opisanej funkcją Gaussa (●) oraz linii cieczowej opisanej funkcją Lorentza (□) w trakcie ochładzania dla larw martwych *Polypedilum vanderplanki* dla skrajnie wysuszonej próbki

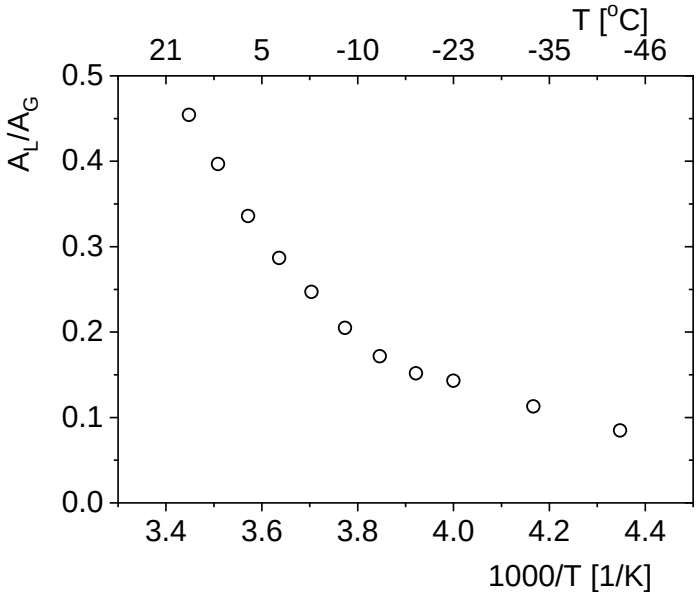
Szerokość połówkowa linii od protonów frakcji stałej wysuszonych martwych larw *P. vanderplanki* wynosi około $\Delta\upsilon_G \approx (46 \pm 2.4)$ kHz i rośnie wraz z obniżaniem temperatury od wartości około 44 kHz w temperaturze pokojowej do ok. 51 kHz w 230 K (Rycina 71). Jest więc niceo niższa od $\Delta\upsilon_G$ dla próbek żywych. Jak dla larw żywych obserwuje się unieruchomienie protonów matrycy stałej próbki i wzrost zakresu lokalnych pól magnetycznych.

Wraz ze spadkiem temperatury szerokość połówkowa linii pochodzącej od składowej cieczowej rośnie od wartości około 1.6 kHz (w 290 K) do 6 kHz (w 230 K), co wskazuje na proces stopniowego unieruchamiania protonów mobilnych zachodzący wraz z obniżaną temperaturą (Ryc. 71).



Rycina 71. Zależności temperaturowe szerokości połówkowych linii Gaussa (●) oraz linii Lorentza (□) na widmie ^{1}H-NMR dla ochładzania martwych larw *Polypedilum vanderplanki* dla skrajnie wysuszonej próbki

Podobnie jak dla próbek żywych larw *P. vanderplanki* również dla larw martwych pole powierzchni pod pikiem Gaussa może zostać użyte do skalowania pola pod sygnałem cieczowym. Dla martwych larw również obserwuje się ciągły spadek A_L/A_G wraz z obniżaną temperaturą, co przedstawiono na Rycinie 72. Oznacza to występowanie niekooperatywnego unieruchamiania molekuł wody, które zachodzi wraz ze spadkiem temperatury.



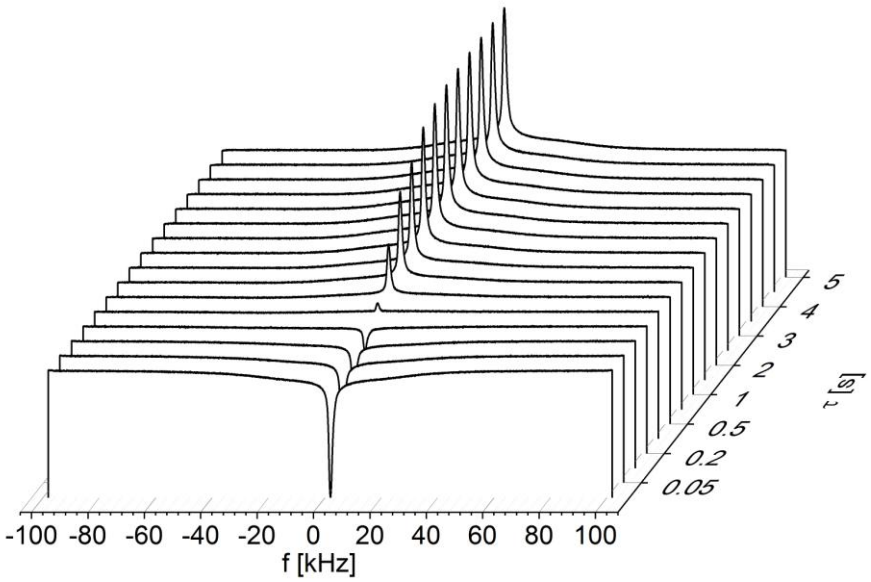
Rycina 72. Temperaturowe zależności sygnału pochodzącego od protonów mobilnych, a wyrażonego w jednostkach sygnału protonów o niskiej mobilności, A_L/A_G, zmierzone dla widm ^{1}H-NMR podczas ochładzania próbek martwych larw *Polypedilum vanderplanki* dla skrajnie wysuszonej próbki

3.6.6. Spektroskopia relaksacyjna ^{1}H-NMR

3.6.6.1. Temperaturowe pomiary czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 dla protonów żywych larw *Polypedilum vanderplanki*

Pomiary czasu relaksacji spinowo-sieciowej dla protonów żywych maksymalnie odwodnionych larw *P. vanderplanki* na spektrometrze 300 MHz dla temperatury obniżanej od 295 K do 230 K.

Eksperyment spektroskopii relaksacyjnej wykonany w temperaturze pokojowej dla próbek żywych skrajnie wysuszonych larw *P. vanderplanki* przedstawiono na Ryc. 73.



Rycina 73. Spektroskopia relaksacyjna ^{1}H-NMR dla temperatury pokojowej dla skrajnie wysuszonych żywych larw *Polypedilum vanderplanki.* Widma uzyskano dla różnych odstępów τ między impulsami : π oraz π/2

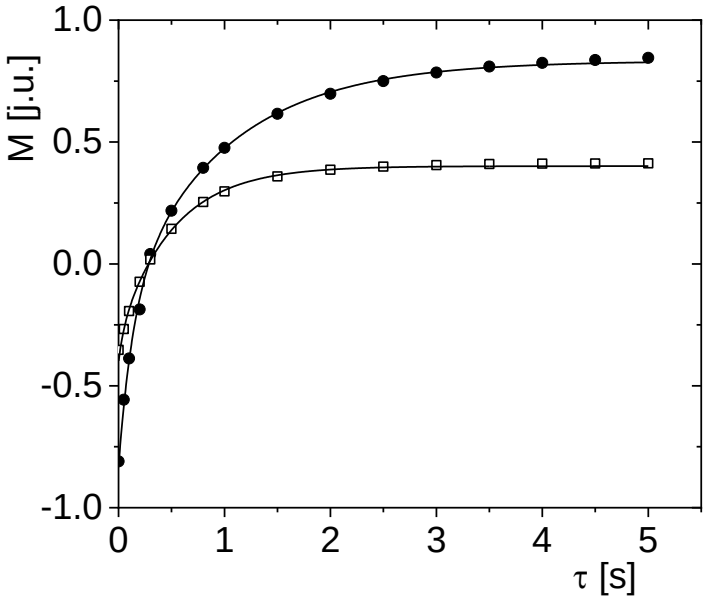
Do każdego z zarejestrowanych widm ^{1}H-NMR składających się na eksperyment spektroskopiii relaksacyjnej dopasowano złożenie funkcji Gaussa o szerokości połówkowej około 48 kHz i Lorentza o szerokości połówkowej około 1.5 kHz zgodnie z równaniem (136).

Zarówno w przypadku magnetyzacji pochodzącej od protonów ciała stałego jak i protonów wody, powrót do równowagi odrostu magnetyzacji jądrowej w funkcji odstępu czasu τ między impulsem π oraz impulsem π/2 opisany jest funkcją jednoeksponencjalną. Do danych doświadczalnych dopasowano funkcję postaci:

$$A(\tau) = A_i - 2A_i \exp(-\frac{\tau}{T_{i1}}), \tag{143}$$

gdzie *i* to numer składowej widma, T_{i1} to czas relaksacji spinowo – sieciowej dla tej składowej, natomiast A_i to pole pod linią dla tej składowej.

Rycina 74 przedstawia wyniki pomiarów spektroskopii relaksacyjnej – zależności pól pod krzywą Gaussa i Lorentza wyrażone w funkcji czasu odstępu między impulsami - dla skrajnie wysuszonej próbki żywych larw *P. vanderplanki,* zmierzone dla temperatury pokojowej.



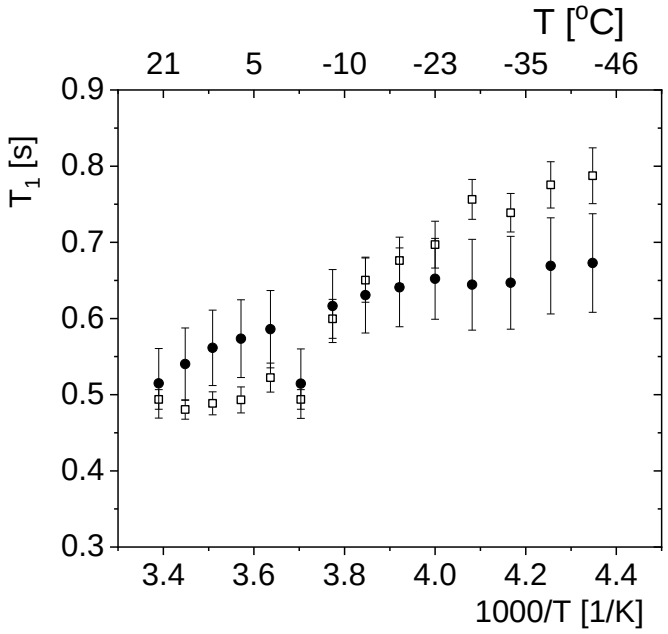
Rycina 74. Odrosty magnetyzacji spinowo-sieciowej dla obu składowych rodziny widm ^{1}H-NMR wyodrębnionych w eksperymencie spektroskopii relaksacyjnej (od ciała stałego (●), od cieczy (□)) w temperaturze pokojowej dla żywych skrajnie wysuszonych larw *Polypedilum vanderplanki*. Linie ciągłe to dopasowania funkcji (143)

.

Czas relaksacji spinowo-sieciowej T_1 dla protonów matrycy stałej ciała anhydrobiotycznej larwy *P. vanderplanki* wyniósł około 500 ms, natomiast dla protonów wody związanej 480 ms. Różnica w obu wartościach czasów relaksacji jest mniejsza niż niepewność dopasowania tych liczb, sugeruje to, że oba te podukłady są w reżimie szybkiej wymiany spinowej, a te wartości dla obu podukładów są po prostu identyczne.

Zależność temperaturowa czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 pokazuje, że dla niskich temperatur podukład matrycy stałej oraz podukład mobilnych protonów wody związanej przechodzi do reżimu pośredniej wymiany spinowej/protonowej i można wyróżnić oddzielne czasy T_1 dla każdego z tych podukładów protonowych. Po dopasowaniu zależności T_1 w funkcji *1000/T* wynikającej z równania BPP otrzymano wartość energii aktywacji

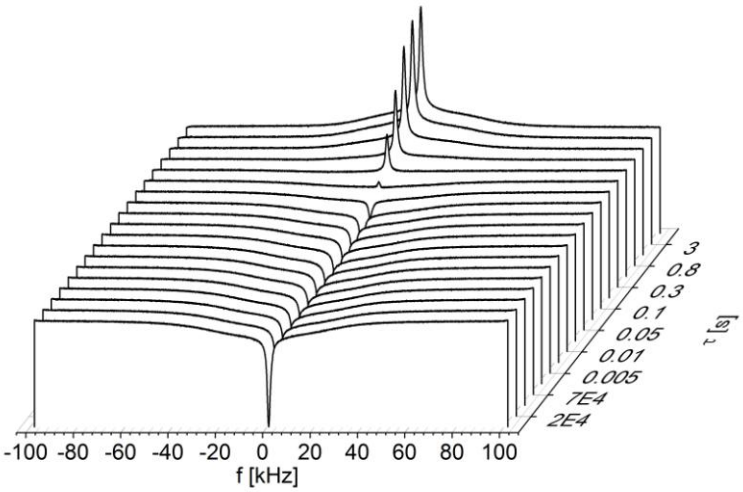
ruchów molekularnych równą E = (6.44 ± 0.01) kJ/mol dla frakcji stałej, średnia odległość między oddziałującymi jądrami wyniosła 2.41 Å. Dla składowej protonów mobilnych energia aktywacji wyniosła E = (31.50 ± 0.89) kJ/mol, co jest wartością charakterystyczną dla energii silnego wiązania wodorowego (Suresh, Naik 2000). Natomiast odległość między relaksującymi protonami składowej cieczowej wyniosła 2.69 Å. Oznacza to, że podukład protonów mobilnych to resztkowa woda związana w tkankach larwy anhydrobiotycznej. Czasy relaksacji podłużnej w funkcji 1000/T zostały pokazane na Rycinie 75.



Rycina 75. Temperaturowa zależność czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 ^{1}H-NMR wyznaczone z eksperymentu spektroskopii relaksacyjnej dla skrajnie wysuszonych żywych larw *Polypedilum vanderplanki* (●– matryca stała tkanki, □– mobilne protony wody związanej)

3.6.6.2. Temperaturowe pomiary czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 dla protonów martwych larw *Polypedilum vanderplanki*

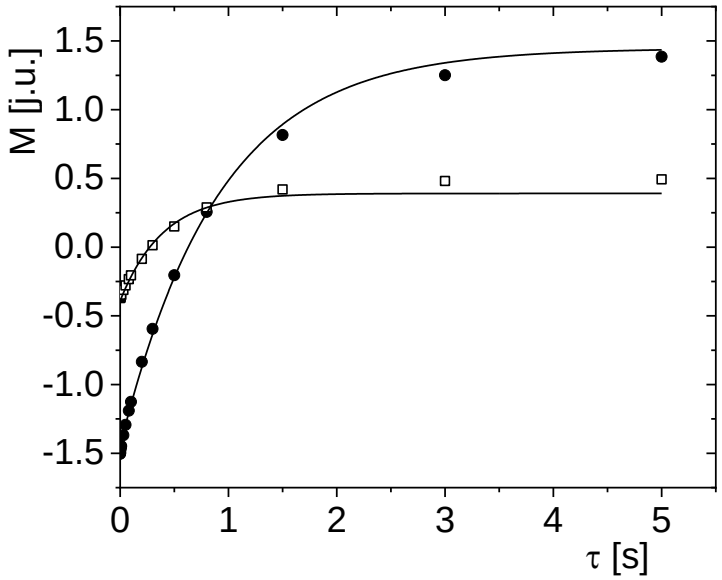
Pomiary czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 dla protonów martwych odwodnionych larw *P. vanderplanki* wykonano metodą spektroskopii relaksacyjnej dla częstotliwości 300 MHz w trybie obniżania temperatury, a zestawienie otrzymanych widm dla temperatury pokojowej przedstawiono na Ryc. 76.



Rycina 76. Spektroskopia relaksacyjna ^{1}H-NMR dla temperatury pokojowej dla skrajnie wysuszonych martwych larw *Polypedilum vanderplanki*. Widma uzyskano dla różnych odstępów τ między impulsami : π oraz $\pi/2$

Do zarejestrowanych widm dopasowano superpozycję funkcji Gaussa (o szerokości połówkowej około 52 kHz) i Lorentza (o szerokości połówkowej około 1.7 kHz) zgodnie z równaniem (136).

Odrost magnetyzacji jędrowej dla unieruchomionych protonów tkanki *P. vanderplanki*, jak i od mobilnych protonów śladowej wody opisany jest funkcją jednoeksponencjalną (142). Rycina 77 przedstawia wynik pomiaru spektroskopii relaksacyjnej – zależności pól pod krzywą Gaussa i pod krzywą Lorentza w funkcji czasu τ między impulsami.



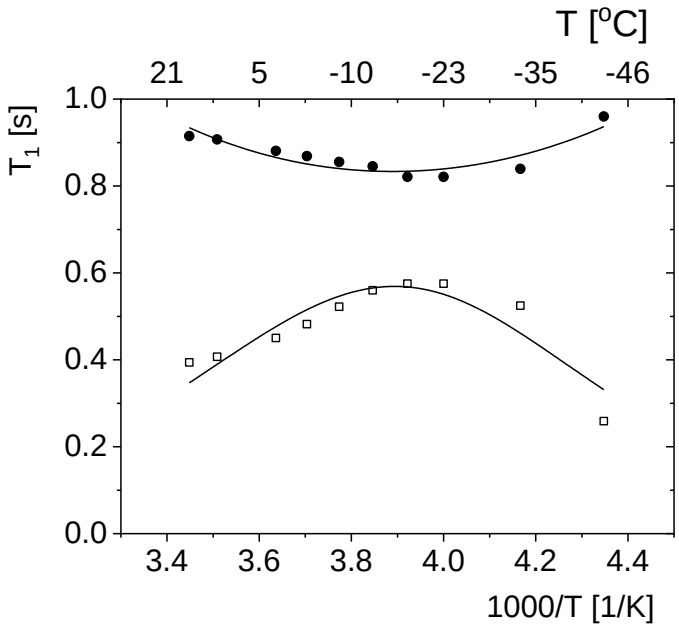
Rycina 77. Odrosty magnetyzacji spinowo-sieciowej dla obu składowych rodziny widm ^{1}H-NMR wyodrębnionych w eksperymencie spektroskopii relaksacyjnej (od ciała stałego (●), od cieczy (□)) w temperaturze pokojowej dla martwych skrajnie wysuszonych larw *Polypedilum vanderplanki*. Linie ciągłe to dopasowania funkcji (143)

Czas T_1 charakteryzujący odrost magnetyzacji protonów frakcji stałej sygnału wyniósł około (908 ± 65) ms, natomiast pochodzący od mobilnych protonów frakcji cieczowej (394 ± 28) ms.

Eksperyment spektroskopii relaksacyjnej dla martwych larw *P. vanderplanki* przeprowadzony w temperaturze pokojowej pokazał zupełnie inny obraz zjawiska magnetycznej relaksacji jądrowej niż dla larw żywych. Otóż, już dla temperatury pokojowej wartości czasów relaksacji spinowo-sieciowej dla protonów T_1 istotnie różnią się od siebie, co oznacza, że układ jest w reżimie pośredniej wymiany spinowej.

Również zależność temperaturowa czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 pokazuje, że w całym zakresie badanych temperatur podukład matrycy stałej larwy oraz podukład mobilnych protonów znajduje się w reżimie pośredniej wymiany spinowej/protonowej, gdyż można wyróżnić istotnie różne czasy T_1 dla każdego z tych podukładów protonowych. Zależność temperaturowa czasów relaksacji podłużnej T_1 w funkcji *1000/T* wynikająca z równania BPP została pokazana na Ryc. 78. Dla składowej mało mobilnej widm ^{1}H-NMR otrzymano wartość energii aktywacji równą E = (9.95 ± 0.92) kJ/mol oraz średnią odległość między oddziałującymi jądrami równą 1.59 Å. Natomiast dla składowej sygnału ^{1}H-NMR pochodzącego od protonów mobilnych energia aktywacji ruchów molekularnych wyniosła E

= (20.93 ± 2.03) kJ/mol, jest to wartość charakterystyczna dla energii słabszego wiązania wodorowego (Suresh, Naik 2000). Średnia zaś odległość pary relaskujących protonów wyniosła 2.47 Å, co jest odległością krótszą niż odległości między parą wodorów w molekule wody, sugerując znaczący wkład procesów międzymolekularnych w procesie relaksacji. Można jednak zinterpretować podukład protonów mobilnych jako resztkową wodę związaną w tkankach larwy anhydrobiotycznej. Czasy relaksacji podłużnej w funkcji 1000/T zostały pokazane na Rycinie 78.



Rycina 78. Temperaturowa zależność czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 ^{1}H-NMR wyznaczone z eksperymentu spektroskopii relaksacyjnej dla skrajnie wysuszonych martwych larw *Polypedilum vanderplanki* (● – matryca stała tkanki, □ – mobilne protony wody związanej, linie ciągłe – dopasowanie modelu BPP)

4. Dyskusja wyników

Hydratację z fazy ciekłej kryptobiotycznych larw *P. vanderplanki* analizowano pod kątem różnic w sposobie uwadniania zdehydratowanych larw anhydrobiotycznych w porównaniu do larw, u których anhydrobioza nie została pomyślnie indukowana, jak również badano proces rehydratacji w zależności od zawartości jonów w użytej wodzie. U larw zanurzonych w wodzie zaobserwowano liniowe narastanie objętości z czasem hydratacji, jednak w przypadku larw martwych widać, iż proces ten przebiega inaczej niż u larw żywych. Brak zmian skokowych w trakcie uwadniania świadczy o tym, że przebiega ono

równomiernie, bez kolejnych wyodrębnionych etapów sterowanych indukowanymi czynnościami organizmu. Zarówno żywe jak i martwe larwy uwadniają się całą powierzchnią ciała, nie tylko „pijąc" wodę przez otwór gębowy, czy pobierając ją przez odbyt. Powierzchnia larw pokryta jest kutikulą, która szczególnie u owadów wodnych pełni ważną rolę w przepuszczalności cieczy (Beament 1961). Białka kanałowe u *P. vanderplanki* wykazują tendencję do przepuszczania wody, a ich ekspresja jest również obserwowana w epidermie. Zakłada się, że PvAQP1 może polepszyć trans-naskórkowy ruch komórkowy wody, wspierając utratę wody z larw, ale może i pomagać w trakcie rehydratacji. Z kolei białko PvAQP2, odpowiedzialne jest za sterowanie gospodarką wodną komórek tłuszczowych w korzystnych warunkach środowiskowych (Kikawada i in. 2008). Prawdopodobnie larwy zdolne do anhydrobiozy indukują w trakcie uwadniania mechanizmy modyfikujące przepuszczalność naskórka, czego nie są w stanie zrobić martwe larwy. Odzwierciedla to różnice w sposobie hydratacji. Przypuszczać można, że transport wody przez powierzchnię ciała larw odbywa się kanałowo oraz przez dyfuzję, która jak się zdaje pełni tu kluczową rolę. Do wnętrza martwych osobników woda prawdopodobnie dostaje się zwłaszcza drogą dyfuzji, ponieważ nie są one w stanie aktywować innego sposobu transportu wody przez kutikulę (nie indukują procesów życiowych). Nie mogą także samodzielnie pobierać wody przez otwór gębowy, jak robią to osobniki żywe. Metodami dodatkowymi pokazującymi zmiany morfologiczne larw w różnych etapach uwodnienia były mikrotomografia oraz skaningowa mikroskopia elektronowa. Potwierdziły one jakościowo, że wraz z uwodnieniem wzrasta objętość całego ciała.

Badane larwy *Polypedilum vanderplanki* cechowała anomalna zależność kinetyki hydratacji z fazy gazowej o niskiej wilgotności względnej. U osobników żywych uwadnianych w wilgotności $h \leq 52\%$ oraz martwych uwadnianych w wilgotności $h \leq 44\%$ po początkowym wzroście zaobserwowano efekt spadku $\Delta m/m_0$ w miarę trwania hydratacji, a spadek został opisany funkcją eksponencjalną. Trasy hydratacyjne dla próbek martwych uzyskiwane z atmosfery o wilgotności względnej wyższej od 52% oraz dla larw żywych dla wilgotności od 63% do 88% zostały dopasowane funkcjami jednoeksponencjalnymi. Z kolei dla względnej wilgotności 93% u larw żywych proces hydratacji opisany został funkcjami dwueksponencjalnymi, co jest związane z pojawieniem się wolniejszego procesu uwodnienia, który jest odpowiedzialny za obecność wody luźno związanej. Dla względnych wilgotności

97% i 100% u larw żywych nie udało się wyodrębnić składowej szybkiej, uzyskano jedynie składową wody luźno związanej.

Anomalny charakter kinetyki hydratacji larwy *P. vanderplanki* z fazy gazowej o niskich wilgotności względnych może być spowodowany trawieniem ciała larw przez bakterie lub inne mikroorganizmy obecne w ich przewodzie pokarmowym (Koroiva i in. 2013). Obecność mikroorganizmów na powierzchni larw potwierdziły zdjęcia mikrotomograficzne. Porównując wyniki hydratacji larwy *P. vanderplanki* dla wyższych wilgotności względnych atmosfery z danymi literaturowymi dla innych układów biologicznych o niskiej hydratacji, należy zauważyć, że jednoeksponencjalną kinetykę hydratacji obserwuje się dla wstępnych faz uwadniania ziaren pszenicy (Harańczyk 2003) oraz dla liofilizatów ich błon fotosyntetycznych (Harańczyk i in., 2009a), dla liofilizatów modelowych błon DGDG (Harańczyk i in. 2009), czy też listkowatych plech grzybów zlichenizowanych, takich jak: *Umbilicaria decussata* (Harańczyk i in., 2008), czy *Umbilicaria antarctica* (Harańczyk, 2003). Dwueksponencjana forma kinetyki hydratacji obserwowana była dla skrobi ziemniaczanej dla wilgotności względnych atmosfery z zakresu między p/p_0 = 52% do p/p_0 = 100% (Witek 2006), jak też w ekstremofilnym organizmie żywym, w plesze grzyba zlichenizowanego *Umbilicaria aprina* w zakresie wilgotności względnych otoczenia od h = 88% do h = 100% (Harańczyk i in., 2008). Również w pokrywach niektórych chrząszczy, np. u *Liparus glabrirostris* obserwujemy dla niższych wilgotności względnych kinetykę jednoeksponencjalną, a dla wyższych dwueksponencjalną (Harańczyk i in., 2012b). Istnieją także układy biologiczne, u których potwierdzono jeszcze inny proces kinetyki hydratacji, np. analiza uwadniania liofilizatu DNA ze spermy łososia pokazała, że dla względnej wartości uwodnienia z zakresu od 9% do 32% proces jest jednoeksponencjalny, między 44% a 63% dwueksponencjalny, wreszcie dla $h \geq 76\%$ trójeksponencjalny. Dla wilgotności względnej 100% dodatkowo zaobserwowano proces pęcznienia opisany funkcją jednoeksponencjalną (Harańczyk i in. 2010). Natura procesu hydratacji larw *Polypedilum vanderplanki* dla niskich wilgotności atmosfery jest zdominowana przez proces rozrostu mikroorganizmów i nie odzwierciedla ogólniejszej prawidłowości tego procesu, charakterystycznej dla różnych układów biologicznych jednakże przy wyższych wilgotnościach względnych atmosfery taką prawidłowość obserwujemy. Zarówno u larw martwych jak i żywych widać wspomniane anomalie, choć między nimi samymi również występują różnice w uwadnianiu prawdopodobnie wynikające z tego, iż oskórek larw może mieć inne właściwości jak również sam proces uwadniania przebiega w larwach w odmienny sposób.

Dla hydratowanych larw *P. vanderplanki* izoterma sorpcyjna ma charakter anomalny. Sorpcja wody z fazy gazowej ma charakter wielowarstwowy. Jej najprostszy model, izoterma BET, gorzej opisuje to zjawisko od bardziej złożonego modelu Denta. Sorpcja na larwach jest zagadnieniem trudnym do analizy ze względu na złożoność tkanek je budujących. Anomalny charakter sorpcji obserwujemy również u stawonogów, takich jak *D. comatus*, *L. glabrirostris* i *T. molitor,* u których badano sorpcję wody z fazy gazowej do pokryw (Harańczyk i in. 2012b). Dla *P. vanderplanki* izoterma sorpcyjna ma postać sigmoidy, jak w przypadku wielu układów biologicznych. Jednakże według dopasowania modelu Denta masa wody wysycającej pierwotne miejsca wiążące dla larw żywych wyniosła $\Delta M/m_0$ = 0.0749, a dla martwych była niższa i równa 0.0611. Różnica między tymi wartościami sugeruje odmienną strukturę oskórka u badanych materiałów, co skutkuje także różnicami w wiązaniu wody do powierzchni. Otrzymane wartości $\Delta M/m_0$ są zbliżone do otrzymywanych dla innych układówbiologicznych. Na przykład dla plechy *U. decussata* masa wody nasycającej pierwotne miejsca wiążące wyniosła $\Delta M/m_0$ = 0.059, dla *Umbilicaria aprina* $\Delta M/m_0$ = 0.054 (Harańczyk i in. 2008), z kolei dla listkowatej *Usnea antarctica* $\Delta M/m_0$ = 0.073 (Harańczyk 2003, Harańczyk i in. 2006). Również dla kompleksów DNA-surfaktant wartości $\Delta M/m_0$ są podobne, np. dla suchych kompleksów DNA-BA $\Delta M/m_0$ = 0.0568, dla DNA-DDCA $\Delta M/m_0$ = 0.043, natomiast dla DNA-CTMA $\Delta M/m_0$ = 0.102 (Harańczyk i in. 2012a, Kobierski 2013). Niższe wartości masy wody nasycającej pierwotne miejsca wiążące wodę, na poziomie 0,036, otrzymano dla pokryw *L. glabrirostris* (Harańczyk i in. 2012b*).*

Masa wody nasycającej pierwotne miejsca wiążące wodę, $\Delta M/m_0$, może zostać użyta do wyznaczenia powierzchni sorbentu dostępnej dla wody. W przypadku larw żywych wyniosła ona 263 m^2/g, natomiast martwych 215 m^2/g. Dla porównania wartości masy wody wysycającej monowarstwę dla pokryw chrząszczy *T. molitor wyniosła 177* m^2/g, a dla *L. glabrirostris 124* m^2/g (Harańczyk i in. 2012b), z kolei dla ziaren komosy – 298 m^2/g (Tolaba i in. 2004). Podobne wartości otrzymano również dla próbek włosów ludzkich (Zalitacz 2018).

Wkład od pustych miejsc wiążących dla wilgotności względnej atmosfery, h = 100% wyrażony w procentach wyniósł 0% dla larw żywych i 0.02% dla nieanhydrobiotycznych. Jest on znacznie niższy niż w przypadku DNA, np. dla DNA spermy łososia $1/b_1$ = 2.95% (Haranczyk i in. 2010), ale na podobnym poziomie jak u *L. glabrirostris*, dla którego $1/b_1$ < 0.01% (Harańczyk i in. 2012b). Np. w przypadku skrobi natywnej wkład wyniósł 0.1% (Witek 2006). Bliskie zeru wartości stosunku $1/b_1$ sugerują większą hydrofilowość

powierzchni zdehydratowanych larw *P. vanderplanki*, szczególnie żywych, w porównaniu z innymi układami biologicznymi, gdzie współczynnik ten jest większy. Prawdopodobnie za różnice między próbkami larw żywych i martwych odpowiadają własności oskórka, jak również to, że u larw anhydrobiotycznych pod wpływem śladowych ilości wody atmosferycznej rozpoczynają się procesy przywracające funkcje życiowe, zachodzą zmiany w komórkach, które nie mogą zostać indukowane u osobników martwych.

Pomiary zaniku swobodnej precesji ^{1}H-NMR pozwoliły na wyodrębnienie trzech pól protonów ze względu na ich ruchliwość: unieruchomionych w znacznym stopniu protonów budujących matrycę stałą, mobilnych protonów należących do frakcji wody ściśle związanej wiążącej się bezpośrednio do matrycy stałej oraz najbardziej mobilnych protonów próbki należących do puli wody luźno związanej. Tak wyodrębnione obie frakcje wody związanej różnią się dynamiką molekularną, nie siłą wiązania do powierzchni sorbentu, jak to jest w przypadku pomiarów kinetyki hydratacji. Sygnał pochodzący od protonów ciała stałego został opisany funkcją Gaussa i wygląda podobnie jak w wielu innych skrajnie suchych układach biologicznych. Potwierdza to tezę Pintara o stosunkowo niewielkim zróżnicowaniu rodzajów grup chemicznych w różnorodnych układach biologicznych, a dzięki temu w podobieństwie pól lokalnych mierzonych w eksperymencie NMR (Pintar 1991). Czas relaksacji spinowo - spinowej dla frakcji protonów matrycy stałej larw wyniósł około $T_{2G}^{*} \approx 17$ µs w obu badanych przypadkach. Jest to wartość bliska do stwierdzonych w innych suchych układach biologicznych takich jak: muszla małża (Harańczyk i in., 1993), szkliwo zęba (Funduk i in. 1984), dentyna (Funduk i in. 1986), liofilizaty błon fotosyntetycznych (Harańczyk i in. 2015), czy pokrywy chrząszczy *L. glabrirostris* (Harańczyk i in. 2012b). Wartości czasów relaksacji poprzecznej frakcji protonów wody ściśle związanej jest równa około $T_{2L1}^{*} \approx 72$ µs dla larw żywych oraz 68 µs dla larw martwych, natomiast dla składowej o najdłuższym czasie zaniku zmierzono odpowiednio czasy T_{2L2}^{*} wynoszące 912 µs oraz 950 µs. Dwie składowe frakcji protonów mobilnych w sygnale ^{1}H-NMR FID, tj. wody związanej, są wyróżniane m. in. w plechach grzybów zlichenizowanych (Harańczyk i in. 2008), w pokrywach chrząszczy (Harańczyk i in. 2012b), czy w DNA (Harańczyk i in. 2012a).

Zależność hydratacyjna całkowitego sygnału cieczowego wyrażonego w jednostkach sygnału stałego $(L_1+L_2)/S$ opisana jest funkcją wymierną w przypadku larw żywych, co świadczy o obecności frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie (Harańczyk i in. 1996). Podobne zjawisko zaobserwowano, w grzybach zlichenizowanych *Cetraria aculeata* (Nowak i in. 2018), czy *Umbilicaria aprina* (Harańczyk i in. 2008), ale również dla niskich uwodnień w

łyku kasztanowca (Harańczyk i in. 1999). Zauważono także występowanie pewnej bardzo małej puli wody zapułapkowanej w odwodnionej próbce, niewykrywalnej metodami grawimetrycznymi, która jest nieco większa w przypadku larw martwych. Woda taka została zaobserwowana również w liofilizowanych błonach fotosyntetycznych pszenicy (Harańczyk i in. 2006a). Natomiast u larw martwych zależność $(L_1+L_2)/S$ opisano funkcją liniową (brak frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie) jednak należy wziąć pod uwagę możliwość dopasowania zależności wymiernej.

Widma ^{1}H-NMR dla dehydratowancyh larw *P. vanderplanki* o niskim poziomie uwodnienia są superpozycją jednej szerokiej linii o kształcie opisanym funkcją Gaussa, pochodzącej w znacznym stopniu unieruchomionych protonów mnatrycy stałej próbki oraz jednej wąskiej, cieczowej, opisanej funkcją Lorentza. Szerokość połówkowa szerokiej składowej linii jest zbliżona dla larw anhydrobiotycznych jak i dla martwych i wynosi około 40 kHz, co wskazuje na występowanie pól lokalnych o wartości rzędu 1 mT. Uśrednione szerokości połówkowe funkcji Lorentza wynoszą 2.26 kHz dla larw anhydrobiotycznych oraz 1.78 kHz dla martwych. Niższe wartości dla larw martwych mogą świadczyć o wpływie procesu zatrzymania czynności życiowych na struktury próbek. Widmo złożone z szerokich linii Gaussa oraz znacznie węższych linii Lorentza jest typowym obrazem otrzymywanym dla próbek biologicznych o skrajnie niskim poziomie uwodnienia. Pokrywy *L. glabrirostris* charakteryzują się szerokością połówkową linii Gausa wynoszącą 44 kHz oraz linii Lorentza o szerokości połówkowej 1.4 – 3.5 kHz (Harańczyk i in. 2012b). W plechach *Claudonia mitis, Himantormia lugubris* i *Usnea aurantiaco-atra* linia Gaussa była nieco węższa i miała szerokość połówkową 32 – 39 kHz, a linia Lorentza rzędu 1.6 kHz (Harańczyk 2003).

Zależność hydratacyjna sygnału cieczowego wyrażonego w jednostkach sygnału stałego A_L/A_S jest opisana funkcją wymierną dla larw żywych. Nieliniowa postać tej zależności potwierdza obecność frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie (Harańczyk i in. 1996). Dla larw żywych ilość wody zapułapkowanej, jaką otrzymano z pomiarów w domenie częstości, jest zbliżona do wyznaczonej metodą NMR w domenie czasu. Natomiast dla larw nieanhydrobiotycznych (martwych) uzyskano zależność liniową, co świadczy o braku frakcji stałej rozpuszczalnej w wodzie. Wydaje się, że przyczyny takiego zachowania należy szukać w występowaniu trehalozy w larwach żywych, która powoduje zwiększoną ilość stężenia substancji rozpuszczonej w wysuszonych osobnikach, której z kolei znacznie mniej jest w larwach martwych (Watanabe i in. 2004).

Sekwencja echa Hahna umożliwia wyznaczenie rzeczywistego czasu relaksacji poprzecznej składowej cieczowej. Dla maksymalnie odwodnionych próbek uzyskano dla larw żywych czasy zbliżone do otrzymanych dla próbek włosów ludzkich (Zalitacz 2018). Szybko zanikającą składową można interpretować, jako pochodzącą od lipidów, jednak należy również wziąć po uwagę, że może to być szybka składowa w przypadku częściowej wymiany spinowej dla dwóch podukładów. Czas T_2 sygnału dla lipidów powinien być raczej krótszy niż otrzymany z pomiarów (MacKay 1981).

Dla wszystkich zmierzonych próbek o niskich hydratacjach obserwuje się spadek wartości pola pod linią od protonów mobilnych, wyrażonych w jednostkach sygnału od matrycy stałej próbki, A_L/A_G, w funkcji spadku temperatury. Informacja ta oraz zwiększanie się szerokości połówkowej linii cieczowej wraz z obniżająca się temperaturą, mówi o niekooperatywnym unieruchamianiu molekuł wody zachodzącym bez formowania krystalitów lodu. Podobną zależność obserwowano np. w zlichenizowanych grzybach antarktycznych (Harańczyk i in. 2012c, Nowak i in. 2018). Wraz ze wzrostem poziomu uwodnienia próbki, linia od ciała stałego nieznacznie ulega zwężeniu. Może być to związane z niewielkim wzrostem ruchliwości protonów ciała stałego wraz ze wzrostem poziomu hydratacji. Przyczyną braku formowania krystalitów lodu w suchej larwie może być występowanie trehalozy (głównie w larwach żywych). Obecność trehalozy zapewnia skuteczną ochronę przed wysuszaniem ze względu na wysoką zdolność do zastępowania wody i następujące zeszklenie (Crowe i in. 1987; Green, Angell 1989; Crowe i in. 1998). W miarę dehydratacji trehaloza zastępuje wodę związaną i wolną, dzięki czemu zachowują się struktury błon komórkowych i białek. Szklista forma trehalozy może wypełniać przestrzenie w tkankach podczas odwadniania, co zapobiega strukturalnemu uszkodzeniu i hamuje agregację cząsteczek biologicznych oraz zwiększa stężenie substancji rozpuszczonej. Wysoka i stabilna lepkość szkieł trehalozowych może również zatrzymać wszystkie reakcje chemiczne wymagające dyfuzji cząsteczkowej (Watanabe i in. 2004). Dodatkowo należy zauważyć, że larwy *P. vanderplanki* żyją w klimacie tropikalnym, więc nie są one zmuszone do wytworzenia mechanizmów obronnych przeciw zamarzaniu. Nie obserwujemy zamarzania i formowania lodu, gdyż nie ma wystarczającej ilości wody do wytworzenia krystalitów. Jednakże ten mechanizm nie jest skorelowany z warunkami środowiskowymi życia *P. vanderplanki*.

Eksperyment spektroskopii relaksacyjnej pozwolił wyznaczyć czasy relaksacji spinowo-sieciowej dla protonów, T_1. W przypadku larw żywych obie składowe linii ^{1}H-NMR relaksują z tym samym czasem T_1, który dla matrycy stałej wyznaczono na 480 ms, natomiast dla wody

związanej na równe w granicach niepewności pomiaru 500 ms. Oznacza to, że oba te podukłady są w reżimie szybkiej wymiany spinowej dla tego zakresu czasu. Dla temperatur niższychwymiana spinowa/protonowa staje się wolniejsza i można wyróżnić dwie wartości czasów relaksacji, co jest zjawiskiem charakterystrycznym dla reżimu pośredniej wymiany spinowej. Dla larw anhydrobiotycznych otrzymano wartość energii aktywacji równą E = 6.44 kJ/mol dla frakcji stałej oraz E = 31.5 kJ/mol dla frakcji cieczowej, co jest energią charakterystyczną dla zrywania silnego pojedynczego wiązania wodorowego w procesie dyfuzji molekularnej. Dla larw martwych w całym zakresie badanych temperatur wartości czasów relaksacji spinowo-sieciowej mają wartości istotnie różne, wynosząc na przykład w temperaturze pokojowej 400 ms dla matrycy stałej tkanki suchej larwy i 900 ms dla śladowej wody zawartej w tkance. Energia aktywacji wynosi dla frakcji stałej E = 9.95 kJ/mol, natomiast E = 20.93 kJ/mol dla frakcji cieczowej. Taki obraz jest charakterystyczny dla reżimu pośredniej wymiany spinowej/protonej. Energia aktywacji dla żywych osobników odpowiada mocnemu pojedynczemu wiązaniu wodorowemu w układzie O – H – O natomiast dla martwych jest niższa, raczej przypominając wartość dla wiązania nieco słabszego (Suresh, Naik 2000). Dopasowanie modelu BPP pozwoliło na wyznaczenie średniej odległości między oddziałującymi ze sobą protonami zaadsorbowanej wody; dla próbek anhydrobiotycznych otrzymano wartość 2.69 Å, natomiast dla martwych 2.47 Å. Otrzymane wartości są trochę wyższe niż uzyskane np. dla pokryw chrząszczy (Harańczyk i in. 2012b), czy dla kompleksów DNA (Kobierski 2013). Obserwujemy relaksację pary protonów, które są w podobnej odległości jak w molekule wody i o energii aktywacji jak dla pojedynczego wiązania wodorowego. Można jednak rozważać oddziaływanie protonów również z innymi molekułami wody, które są blisko umieszczone.

5. Wnioski

1. W procesie rehydratacji larwy *P. vanderplanki* nie stwierdza się progowych zmian ani spowolnień tego procesu. Objętość organizmu liniowo rośnie wraz z upływem czasu rehydratacji. Oznacza to, brak progowych, sterowanych etapów tego procesu.
2. Anomalna kinetyka hydratacji z fazy gazowej o niskiej wilgotności może być wywołana rozrostem drobnoustrojów wewnątrz ciała larwy, sygnalizując tym zagrożenie larwy przebywającej w kolebce larwalnej w środowisku wilgotnym.
3. Anomalny kształt izotermy sorpcyjnej przypomina obserwowany dla kutikuli stawonogów i może być wyznacznikiem szczególnych własności oskórka.

4. Większa masa wody związanej do pierwotnych miejsc wiążących na powierzchniach martwej larwy *P. vanderplanki* w porównaniu z żywą sugeruje spadek poziomu hydrofobowości powierzchni lub też rozluźnienie jej struktury.

5. Nieobecność zamarzania i formowana lodu, a jedynie niekooperatywne unieruchamianie wody w ochładzanej dehydratowanej larwie *P. vanderplanki* może wyjaśniać znakomitą odporność tego organizmu na przemarzanie.

6. Proces magnetycznej spinowo-sieciowej relaksacji jądrowej dla żywych anhydrobiotycznych larw *P. vanderplanki* można w temperaturze pokojowej opisać jako oddziaływanie dwóch podukładów spinowych (matrycy stałej tkanki i śladowej wody związanej), będących w reżimie pośredniej wymiany materiałowej/spinowej; natomiast w temperaturach niższych, a dla próbki martwych larw w całym zakresie temperatury, jako proces pośredniej wymiany między wymienionymi podukładami.

7. Magnetyczną relaksację jądrową mobilnych protonów żywej dehydratowanej larwy *P. vanderplanki* można przybliżyć jako intramolekularną relaksację pary protonów znajdujących się w odległości (2.69 ±□0.06) Å od siebie, zaś energia aktywacji tego procesu jest charakterystyczna dla zrywania mocnego, lecz pojedynczego wiązania wodorowego w układzie O – H – O i wynosi $E_a = 31.5$ kj·mole^{-1}.

8. W przypadku martwych anhydrobiotycznych larw wiązania wodorowe zrywane w procesie dyfuzji mają niższą energię, równą $E = 20.93$ kJ/mol; natomiast wyznaczona odległość relaksującej pary protonów sugeruje znaczący wkład oddziaływań międzymolekularnych.

6. Bibliografia

1. Abragam, A., 1961. The principles of nuclear magnetism. *Clarendon Press*, Oxford.
2. Adams, A., 1985. Cryptobiosis in Chironomidae (Diptera) - two decades on. *Antenna*, 8, 58–61.
3. Alpert, P., 2000. The discovery, scope and puzzle of desiccation tolerance in plants. *Plant Ecol*., 151, 5-17.
4. Alpert, P., 2005. The limits on frontiers of desiccation-tolerant life. *Integr. Comp. Biol*., 45, 685–695
5. Armitage, P. D., Cranston, P. S., Pinder, L. C. V., 1995. The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges. London, *Chapman & Hall.*
6. Arystoteles. *Metafizyka*. t. 1, ks. I, 983b, przekł. T. Żeleźnik, 1986, Lublin, 20-25.

7. Bacior, M., Nowak, P., Harańczyk, H., Patryas, S., Kijak, P., Ligęzowska, A., Olech M., 2017. Extreme dehydration observed in Antarctic *Turgidosculum complicatulum* and in *Prasiola crispa*. *Extremophiles,* 21, 331-343.
8. Ball, P., 1999. H_2O. A Biography of Water. *Weldenfeld & Nicolson*, London.
9. Barnhart, J., Berk, R., 1986. Influence of paramagnetic ions and pH on proton NMR relaxation of biologic fluids. *Investigative Radiology,* 21(2), 132–136.
10. Beament, J. W. L., 1961. The waterproofing mechanism of arthropods: II. The permeability of the cuticle of some aquatic insects. *J. Exp. Biol.*, 38, 277-290.
11. Belton, P. S., Gil, A. M., 1994. IR and Raman spectroscopic studies of the interaction of trehalose with hen egg white lysozyme. *Biopolymers,* 34, 957–961.
12. Bezrukavnikov, S., Mashaghi, A., Wijk, R., Gu, C., Yang, Li J., Gao, Y., Tans, S., 2014. Trehalose facilitates DNA melting: a single-molecule optical tweezers study″. *Soft Matter*, 10 (37), 7269.
13. Bhutani, N., Udgaonkar, J. B., 2002. Chaperonins as protein-folding machines. *Curr. Sci., 83, 1337–1351.*
14. Blicharski, J.S., Jasinski, G., Klose, G., 1994. Nuclear spin relaxation in periodically perturbed systems iv. The relaxation in the presence of double rotation and pulse sequence, *Acta Physica Polonica A,* 86, 1001-1005.
15. Bourquelot, M.E.M., 1893. Remarques sur les ferments solubles secretes par l'aspergillus niger V. Tgh et le pencillium glaucum link. *Compt. Rend. Soc. De biol.*, 9.S., v. 653.
16. Brunauer, S., Emmett, P., Teller, E., 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society,* 60, 309-319.
17. Brunauer, S., 1943. The Adsorption of Gases and Vapors. *Princeton*, Princeton.
18. Cabib, E., Leloir, L., 1958. The biosynthesis of trehalose-phosphate. *J. Biol. Chem*., 231, 259–275.
19. Campbell, N. A., Reece, J. B., 2009. Biology (8th ed.). *Pearson.* ISBN 978-0-8053-6844-4.
20. Campbell, N. A, Williamson, B., Heyden R. J., 2006. *Biology: Exploring Life*. *Pearson Prentice Hall.* Boston, *ISBN 0-13-250882-6.*
21. Cargill, Incorporated, 2011. Cargill, Hayashibara to Introduce Trehalose Sweetener to the Americas. *PR Newswire*.
22. Clegg, J.S., 2001. Cryptobiosis - a peculiar state of biological organization. *Comparative Bioch. and Phys.*, Part B. 128, 613-624.

23. Colin R., 2003. Enterprise and electrolysis.... Chemistry World. *Royal Society of Chemistry.*, Retrieved on 2017-12-17.
24. Cornette, R., Kanamori, Y., Watanabe, M., Nakahara, Y., Gusev, O., Mitsumasu, K., Kadono-Okuda, K., Shimomura, M., Mita, K., Kikawada, T., Okuda, T., 2010. Identification of anhydrobiosis-related genes from an expressed sequence tag database in the cryptobiotic midge *Polypedilum vanderplanki* (Diptera; Chironomidae). *J. Biol. Chem*., 285, 35889–35899.
25. Cornette, R., Kikawada, T., 2011. The induction of anhydrobiosis in the sleeping chironomid: Current status of our knowledge. *IUBMB Life*, 63(6), 419–429.
26. Cornette, R., Yamamoto, N., Yamamoto, M., Kobayashi, T., Petrova, N. A., Gusev, O., Shimura, S., Kikawada, T., Pemba, D., Okuda, T., 2017. A new anhydrobiotic midge from Malawi, *Polypedilum pembai* sp.n. (Diptera: Chironomidae), closely related to the desiccation tolerant midge, *Polypedilum vanderplanki* Hinton. *Systematic Entomology*, 42(4), 814-825.
27. Corona, M., Robinson, G. E., 2006. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Mol. Biol.*, 15, 687–701.
28. Cottone, G., Ciccotti, G., Cordone, L., 2002. Protein--trehalose--water structures in trehalose coated carboxy-myoglobin. *J. Chem. Phys.*, 117, 9862–9866.
29. Cranston, P.S., 2014. A new putatively cryptobiotic midge, *Polypedilum ovahimba* sp. nov. (Diptera: Chironomidae), from southern Africa. *Austral Entomology*, 53, 373–379.
30. Crowe, J. H., 1971. Anhydrobiosis: an unsolved problem. *Am. Nat.*, 105, 563–574.
31. Crowe, J. H., 2007. Trehalose as a "chemical chaperone": fact and fantasy. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 594, 143–158.
32. Crowe, J.H., Clegg, J.S., 1978. Dry Biological Systems. *Academic Press*, New York.
33. Crowe, J. H., Hoekstra, F. A., Crowe, L. M., 1992. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 579–599.
34. Crowe, J., Crowe, L., Chapman, D., 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose. *Science*, 223, 209–217.
35. Crowe, L. M., Crowe, J. H., 1988. Trehalose and dry dipalmitoylphosphatidylcholine revisited. *Biochim. Biophys. Acta*, 946, 193–201.
36. Crowe, J. H., Crowe, L. M., Carpenter, J. F., Wistrom, C.A., 1987. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J.*, 242, 1–10.

37. Crowe, J. H., Carpenter, J. F., Crowe, L. M., 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 60, 73-103.
38. Crowe, J. H., Madin, K. A., 1974. Anhydrobiosis in tardigrades and nematodes. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 93, 513–524
39. Crowe, L. M., 2002. Lessons from nature: the role of sugars in anhydrobiosis. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 131,505-513.
40. Cuming, A., 1999. LEA proteins. *In* Seed Proteins. *(* Shewry, P. R. *and* Casey, R., *eds.). Kluwer Academic Publisher*, Norwell, 753–780.
41. Dahlqvist, A., 1968. Assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.*, 22, 99–107.
42. Danks, H. V., 1987. Insect Dormancy: an Ecological Perspective. *Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthropods)*, Ottawa, Canada, 439.
43. De Santo, R. M., Bisaccia, C., Cirillo, M., Pollastro, R. M., Raiola, I., De Santo, L. S., 2009. The nature of water: Greek thought from Homer to Acusilaos. *J Nephrol.*, 14, 92-7.
44. Denekamp, N. Y., Thorne, M. A., Clark, M. S., Kube, M., Reinhardt, R., Lubzens, E., 2009. Discovering genes associated with dormancy in the monogonont rotifer *Brachionus plicatilis*. *BMC Genomics*, 10, 108.
45. Denlinger, D. L., 1985. Hormonal control of diapause. In Comparative Insect Physiology. Biochemistry and Pharmacology, Endocrinology II (Kerkut, G. A. and Gilbert, L., eds.). *Pergamon Press*, Oxford, 8, 353–412.
46. Dent, R., 1977. A multilayer theory for gas sorption. Part I: Sorption of a single gas. *Textile Research Journal*, 47, 145-152.
47. Desrosiers, R. R., Fanelus, I., 2011. Damaged proteins bearing L-isoaspartyl residues and aging: a dynamic equilibrium between generation of isomerized forms and repair by PIMT. *Curr. Aging Sci*, 4, 8–18.
48. Derbyshire, W., Van den Bosh, M., Van Dusschoten, D., MacNaughtan, W., Farhat, I., Hemminga, M., Mitchel, J., 2004. Fitting of the bit pattern observed in NMR free-induction decay signals of concentrated carbohydrate-water solution, *Journal of Magnetic Resonance*, 168, 278-283.
49. Drake, L. L. et al, 2010. The Aquaporin gene family of the yellow fever mosquito, Aedes aegypti., *PLoS ONE*, 5, e15578.
50. Dries Van Den, I., Dusschoten Van, D., Hemminga, M., 1998. Mobility in Maltose-Water Glasses Studied with 1H NMR. *Journal of Physical Chemistry B*, 102, 10483-10489.

51. Edmonds, A. R., 1957. Angular momentum in Quantum Mechanics. *Princeton University Press*.
52. Edney, E. B., 1977. Water Balance in Land Arthropods. *Springer-Verlag*, 282.
53. Ejchart, A, Gryff-Keller, A., 2004. NMR w cieczach. Zarys teorii i metodologii. *Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej*, Warszawa.
54. Elbein, A. D., 1974. The metabolism of α,α-trehalose. *Adv. Carbohyd. Chem. Biochem*., 30, 227–256.
55. Epler, J., 2001. Identification Manual for the larval Chironomidae (Diptera) of North and South Carolina. *FEBS Letters,* 81(2).
56. Finney, J.L., 2004. Water? What's so special about it? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*., 359 (1448), 1145-1163.
57. Eroglu, A., Russo, M. J., Bieganski, R., Fowler, A., Cheley, S., Bayley, H., Toner, M., 2000. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nat Biotechnol*., 18, 163–167.
58. Franca, M. B., Panek, A. D., Eleutherio, E. C., 2007. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 146, 621–631.
59. Futuyma, D.J., 2008. Ewolucja. *WUW*, Warszawa, 606 pp.
60. Franks, F., Hatley, R. H. M., Mathias, S. F., 1991. Materials science and the production of shelf stable biologicals. *BioPharm*, 10, 38–42.
61. Freeman, P., 1958. A study of the Chironomidae (Diptera) of Africa South of the Sahara part IV. *Bulletin of the British Museum (Natural History), Entomological Series*, 6, 263–367.
62. Funduk, N., Kydon, D. S., Peemoeller, H., Milijković i Pintar, M. M., 1984. Composition and Relaxation of the Proton Magnetization of Human Enamel and its Contribution to the Tooth NMR Image. *Magnetic Resonance in Medicine,* 1, 66-75.
63. Funduk, N., Lahajnar, N., Milijković, L., Skočajić, S., Kydon, D., Scgreiner, L., Pintar, M., 1986. A Comparative NMR Study of Proton Group in Dentin of 20 and 50 Years Old Donors. *Zobozdrasvstveni Vestnik,* 41(1), 139-160.
64. Furmaniak, S., 2013. Sorpcja wody przez produkty żywnościowe. Cz. 2, *LAB Laboratoria, Aparatura, Badania,* R. 18 nr 5.
65. Galau, G. A., Dure, L., III., 1981. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by reciprocal heterologous complementary deoxyribonucleic acid--messenger ribonucleic acid hybridization. *Biochemistry*, 20, 4169–4178.

66. Gaubin, Y., Planel, H., Gasset, G., Pianezzi, B., Clegg, J. S., Kovalev, E. E., Nevzgodina, L. V., Maximova, E. N., Miller, A. T., Delpoux, M., 1983. Results on *Artemia* cysts, lettuce and tobacco seeds in the Biobloc 4 experiment flown aboard the Soviet Biosatellite Cosmos 1129. *Adv. Space Res.*, 3, 135–140.
67. Gavrikova, B. B., Belyanina, S. I., 1993. The karyopool of *Polypedilum nubeculosum* Mg. from the Volga river. In: Chubareva LA, Kuznetsova VG. (Eds) *Karyosystematika Bespozvonochnykh Zhivotnykh*, 2, 65−66. [In Russian with English summary]
68. Gay-Lussac, L. J., von Humboldt, A., 1805. Expérience sur les moyens oediométriques et sur la proportion des principes constituents de l'atmosphère. *Journal de Physique,* 60.
69. Glasheen, J. S., Hand S. C., 1988. Anhydrobiosis in embryos of the brine shrimp Artemia: characterization of metabolic arrest during reductions in cell-associated water. *J. Exp. Biol.*, 135, 363–389.
70. Goyal, K., Walton, L. J., Tunnacliffe, A., 2005. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem. J.*, 388, 151–157.
71. Green, J. L., Angell, C. A., 1989. Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *J Phys Chem.*, 93, 2880–2882.
72. Gusev, O., Nakahara, Y., Vanyagina, V., Malutina, L., Cornette, R., Sakashita, T., Hamada, N., Kikawada, T., Kobayashi, Y., Okuda, T., 2010. Anhydrobiosis-associated nuclear DNA damage and repair in the sleeping chironomid: linkage with radioresistance. *PLoS One,* 5, 4008.
73. Gusev, O., Cornette, R., Kikawada, T., Okuda, T., 2011. Expression of heat shock protein-coding genes associated with anhydrobiosis in an African chironomid *Polypedilum vanderplanki*. *Cell Stress Chaperones*, 16, 81–90.
74. Gusev, O. et al., 2004. Comparative genome sequencing reveals genomic signature of extreme desiccation tolerance in the anhydrobiotic midge. *Nat. Commun.,* 5, 4784.
75. Hadley, N. F., 1994. Water Relations of Terrestrial Arthropods. *Academic Press*, 356.
76. Hahn, E. L., 1950. Spin Echoes. *Physical Review*, 80(4), 580-594.
77. Harańczyk, H., 2003. On water in extremely dry biological systems. *Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego*, Kraków, pp. 276.
78. Harańczyk, H., Bacior, M., Jamróz, J., Jemioła-Rzemińska, M., Strzałka, K., 2009. Rehydration of DGDG (digalactosyl diacylglicerol) model membrane lyophilizates observed by NMR and sorption isotherm. *Acta Phys. Polon.*, A115, 521-525.

79. Harańczyk, H., Bacior, M., Olech, M. A., 2008. Deep dehydration of *Umbilicaria aprina* thalli observed by proton NMR and sorption isotherm. *Antarctic Science,* 20, 527–535.

80. Harańczyk, H., Baran, E., Nowak, P., Florek-Wojciechowska, M., Leja, A., Zalitac,z D., Strzałka, K., 2015. Non-cooperative immobilization of residual water bound in lyophilized photosynthetic lamellae. *Cellular and Molecular Biology Letters*, *20*(5), 717-735.

81. Harańczyk, H., Czak, J., Nowak, P. i Nizioł, J., 2010. Initial Phases of DNA Rehydration by NMR and Sorption Isotherm. *Acta Physica Polonica A,* 117, 397-402.

82. Harańczyk, H., Gaździński, S., Olech, M. A., 1998. The initial stages of lichen hydration as observed by proton magnetic relaxation. *New Phytologist*, 138, 191-202.

83. Harańczyk , H., Florek, M., Nowak, P., Knutelski, S., 2012b. Water Bound in Elytra of the Weevil *Liparus glabrirostris* (Küster, 1849) by NMR and Sorption Isotherm (Coleoptera: Curculionidae). *Acta Phys. Polon. A, 121, 491-496*.

84. Harańczyk, H., Kobierski, J., Zalitacz, D., Nowak, P., Romanowicz, P., Marzec, M., Nizioł, J., Hebda, E., Pielichowski, J., 2012a, Rehydration of CTMA Modified DNA Powders Observed by NMR. *Acta Phys. Polon. A*, 121(2), 485 – 490.

85. Harańczyk H., Leja A., Jemioła-Rzemińska M., Strzałka K., 2009a. Maturation processes of photosynthetic membranes observed by proton magnetic relaxation and sorption isotherm, *Acta Physica Polonica A,* 115, 526-532.

86. Harańczyk, H., Leja, A., Strzałka, K., 2006a. The effect of water accessible paramagnetic ions on subcellular structures formed in developing wheat photosynthetic membranes as observed by NMR and by sorption isotherm. *Acta Physica Polonica A,* 109, 389-398.

87. Harańczyk, H., Nizioł, J., Falniowski, A., 1993. The proton NMR investigations of water bound in shell of mussel (*Mytilius edulis). Materiały XXVI Ogólnopolskiego Seminarium MRJ*, Kraków, IFJ Raport Nr 1658/PL, 179-185.

88. Harańczyk, H., Nowak, Lisowska, M., Florek-Wojciechowska, M., Lahuta, L. B., 2016. A method of water-soluble solid fraction saturation concentration evaluation in dry thalli of Antarctic lichenized fungi, *in vivo, Biochemistry and Biophysics Reports,* 6, 226-235.

89. Harańczyk, H., Nowak, P., Majka, M., 2010. Rehydration of Cetraria aculeata thalli observed by hydration kinetics and sorption isotherm, *Erasmus Intensive Programme*

2010 - Engineering and characterisation of nanostructures by photon, ion beam, and nuclear methods, Leuven, Belgia.

90. Harańczyk, H., Pater, Ł., Nowak, P., Bacior, M., Olech, M. A., 2012c. Initial phases of Antarctic *Ramalina terebrata* Hook f . & Taylor thalli rehydration observed by proton relaxometry. *Acta Physica Polonica A,* 121(2), 480–484.
91. Harańczyk, H., Pietrzyk, A., Leja, A., Olech, M., 2006. Bound water structure on the surfaces of *Usnea antarctica* as observed by NMR and sorption isotherm. *Acta Physica Polonica,* A109, 411-416.
92. Harańczyk, H., Strzałka, K., Jasiński, G., Mosna-Bojarska, K., 1996. The initial stages of wheat (*Triticum aestivum* L.) seed imbibition as observed by proton nuclear magnetic relaxation. *Colloids and Surfaces,* A115, 47-54.
93. Harańczyk, H., Węglarz, W. P., Sojka, S., 1999. The investigation of hydration processes in horse chestnut (*Aesculus Hippocastanu, L.*) and pine *(Pinus silvestri, L.)* bark and bast using proton magnetic relaxation. *Holzforschung*, 53**,** 299-310.
94. Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K., Bohnert, H. J**.**, 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51, 463 -499.
95. Hatanaka, R., Hagiwara-Komoda, Y., Furuki, T., Kanamori, Y., Fujita, M., Cornette, R., Sakurai, M., Okuda, T., Kikawada, T., 2013. An abundant LEA protein in the anhydrobiotic midge, PvLEA4, acts as a molecular shield by limiting growth of aggregating protein particles. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 43, 1055–1067.
96. Hausser, K. H., Kalbitzer, H. R., 1993. NMR w biologii i medycynie. *Wydawnictwo Naukowe UAM*, Poznań.
97. Hengherr, S., Worland, M. R., Reuner, A., Brummer, F., Schill, R. O., 2009. High-temperature tolerance in anhydrobiotic tardigrades is limited by glass transition. *Physiol. Biochem. Zool.*, 82, 749-755.
98. Hennel, J., 1966. Wstęp do teorii magnetycznego rezonansu jądrowego. PWN, Warszawa.
99. Hennel, J. W., Kryst-Widźgowska, T., 1995. Na czym polega tomografia magnetyczno – rezonansowa. *Wydawnictwo IFJ,* Kraków, 5–15.
100. Higashiyama, T., 2002. Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl. Chem.,* 74, 1263-1269.
101. Hinton, H. E., 1951. A new chironomid from Africa, the larva of which can be dehydrated without injury. *Proc. Zool. Soc. London,* 121, 371–380.

102. Hinton, H. E., 1960. Cryptobiosis in the larva of Polypedilum vanderplanki Hint. (Chironomidae). *J. Insect Physiol*., 5, 286–288.
103. Hinton, H. E., 1960b. A fly larva that tolerates dehydration and temperatures of–270° to+ 102°C. *Nature*, 188, 336–337.
104. Hoy, A. R., Bunker, P. R., 1979. A precise solution of the rotation bending Schrödinger equation for a triatomic molecule with application to the water molecule. *Journal of Molecular Spectroscopy,* 74, 1–8.
105. Hubbard, P. S.,1961. Quantum-mechanical an semiclassical forms of the density operator theory of relaxation, *Review of Modern Physics*, 33, 249-264.
106. Iglesias, H. A., Chirife, J., Buera, M. P., 1997. Adsorption isotherm of amorphous trehalose. *J Sci Food Agric,*75,183–186.
107. Imamura, K., Suzuki, T., Kirii, S., Tatsumichi, T., Okazaki, M., 1998. Influence of protein on phase transition of amorphous sugar. *J Chem Eng Jpn*, 31, 325–329.
108. Kanias, T., Acker, J. P., 2006. Mammalian cell desiccation: facing the challenges. *Cell Preserv. Technol*., 4, 253–277.
109. Keilin, D., 1959. The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci*., 150, 149–191.
110. Kerkis, I. E., Nazarova, N. K., Makarchenko, E. A., 1996. Karyotype of the non-biting midge *Polypedilum pedestre*. *Tsitologiia*, 38(2), 155−158. [In Russian with English summary]
111. Khare, S., Linster, C., Clarke, S., 2011. The interplay between protein L-isoaspartyl methyltransferase activity and insulin-like signaling to extend lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE,* 6, e20850.
112. Kikawada, T., Nakahara, Y., Kanamori, Y., Iwata, K., Watanabe, M., McGee, B., Tunnacliffe, A., Okuda, T., 2006. Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1(348), 56-61.
113. Kikawada, T., Minakawa, N., Watanabe, M., Okuda, T., 2005. Factors inducing successful anhydrobiosis in the African Chironomid *Polypedilum vanderplank*i: significance of the larval tubular nest. *Integr Comp Biol.*, 45(5),710-714.
114. Kikawada, T., Saito, A., Kanamori, Y., Nakahara, Y., Iwata, K., Tanaka, D., Watanabe, M., Okuda, T., 2007. Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104(28), 11585-11590.

115. Kikawada, T., Saito, A., Kanamori, Y., Fujita, M., Snigorska, K., Watanabe, M., Okuda, T., 2008. Dehydration-inducible changes in expression of two aquaporins in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1778, 514–520.
116. Kiknadze, I. I., Shilova, A. I., Kerkis, I. E., Shobanov, N. A., Zelentsov, N. I., Grebenyuk, L.P., Istomina, A. G., Prasolov, V. A., 1991. Karyotypes and Morphology of Larvae. *Tribe Chironomini. Atlas. Nauka*, 113. [In Russian with English summary]
117. Knibbe, C. A. J., Zuideveld, K. P., Aarts, L. P. H. J., Kuks, P. F. M., Danhof, M., 2005. Allometric relationships between the pharmacokinetics of propofol in rats, children and adults. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 59(6), 705–711.
118. Knutelski, S., Baran, E., Harańczyk, H., Strzałka, K., Okuda, T., 2014. Jak ochotki afrykańskie radzą sobie z niedoborem wody?. *Wszechświat*, 115, zeszyt 10-12, 255-261.
119. Knutelski, E. Baran, P. Nowak, H. Harańczyk, K. Strzałka, T. Okuda, The sleeping chironomid (Polypedilum vanderplanki Hinton, 1951) larva body reaction on different water condition, from cryptobiosis state up to complete hydration form (Diptera: Chironomidae), przygotowywane do publikacji.
120. Kobierski, J., 2013. Badanie hydratacji polimerów przewodzących na bazie kompleksów DNA-surfaktant. Praca doktorska.: *Uniwersytet Jagielloński*, Kraków.
121. Koroiva, R., Souza, C. W., Toyama, D., Henrique-Silva, F., Fonseca-Gessner, A. A., 2013. Lignocellulolytic enzymes and bacteria associated with the digestive tracts of *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) larvae, *Genet Mol Res.*, 12(3), 3421-34.
122. Koster, K. L., 1991. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiol*, 96, 302–304.
123. Laws, D. D., Bitter, H. - M. L., Jerschow, A., 2002. Solid-State NMR Spectroscopic Methods in Chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed*., 41, 3096.
124. Lenartowicz, P., 2008. Allometria – zasada i narzędzie rekonstrukcji paleontologicznych, W poszukiwaniu swoistości człowieka. *Wyd. Uniwersytetu Kardynała Stefana Wyszyńskiego,* Warszawa, 25-40.
125. Li, S., Chakraborty, N., Borcar, A., Menze, M. A., Toner, M., Hand S. C., 2012. Late embryogenesis abundant proteins protect human hepatoma cells during acute desiccation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 109, 20859–20864.

126. Lins, R. D., Pereira, C. S., Hunenberger, P. H., 2004. Trehalose-protein interaction in aqueous solution. *Proteins,* 55, 177–186.

127. Lowenson, J. D., Clarke, S., 1991. Structural elements affecting the recognition of L-isoaspartyl residues by the L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase. Implications for the repair hypothesis. *J. Biol. Chem.*, 266, 19396–19406.

128. MacKay, A. L., 1981. A Proton NMR moment study of the gel and liquid-crystalline phases of dipalmitoyl phosphatidylcholine, *Biophys. J*., 35 , 301–313.

129. Mariaux, J. B., Bockel, C., Salamini, F., Bartels, D., 1998. Desiccation- and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum. Plant Mol. Biol*., 38, 1089–1099.

130. Marunde, M. R., Samarajeewa, D. A., Anderson, J., Li, S., Hand, S. C., Menze, M. A., 2013. Improved tolerance to salt and water stress in *Drosophila melanogaster* cells conferred by late embryogenesis abundant protein. *J. Insect Physiol.*, 59, 377–386.

131. Maruta, K., Mitsuzumi, H., Nakada, T., Kubota, M., Chaen, H., Fukuda, S., Sugimoto, T., and Kurimoto, M., 1996. Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from thermophilic archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1291, 177–181.

132. Meyer, Y., Siala, W., Bashandy, T., Riondet, C., Vignols, F., Reichheld, J. P., 2008. Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochim. Biophys. Acta,* 1783, 589–600.

133. Michaliova, P., 1989. The polytene chromosomes and their significance to the systematics of the family Chironomidae, Diptera. *Acta Zoologica Fennica,* 186, 1−107.

134. Miller, P. L., 1969. On the occurrence and some characterisitics of *Cyrtopus fastuosus* Bigot (Dipt., Stratiomydae) and *Polypedilum sp*. (Dipt., Chironomidae) from temporary habitats in Western Nigeria. *Entomologist's Monthly Magazine*, 223–238.

135. Mitsumasu, K., Kanamori, Y., Fujita, M., Iwata, K., Tanaka, D., Kikuta, S., Watanabe, M., Cornette, R., Okuda, T., Kikawada, T., 2010. Enzymatic control of anhydrobiosis-related accumulation of trehalose in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *The Febs Journal*., 277(20), 4215-4228.

136. Narberhaus, F., 2002. Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66, 64–93.

137. Natkański, P., 2010. Procesy sorpcyjne, Skrypt do ćwiczeń. *Zakład Technologii Chemicznej*, Kraków.

138. Nowak, P., Harańczyk, H., Kijak, P., Marzec, M., Fitas, J., Lisowska, M., Baran, E., Olech, M., 2018. Bound water behavior in Cetraria aculeata thalli during freezing. *Polar Biology*, 41(5), 865-876.

139. Ohshima, Y., Iwasaki, I., Suga, S., Murakami, M., Inoue, K., Maeshima, M., 2001. Low aquaporin content and low osmotic water permeability of the plasma and vacuolar membranes of a CAM plant *Graptopetalum paraguayense:* comparison with radish. *Plant Cell Physiol*, 42, 1119–1129.

140. Oleszczuk, M., 2006. Magnetyczny rezonans jądrowy w badaniach strukturalnych biomolekuł na przykładzie badania modelowych układów heliakalnych, *Biul. Wydz. Farm. AMW,* 1, 1-16.

141. Oku, K., Watanabe, H., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., 2003. NMR and quantum chemical study on the OH···π and CH···O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. *J. Am. Chem. Soc.,* 125, 12739–12748.

142. Oliver, A. E., Hincha, D. K., Crowe, J. H., 2002. Looking beyond sugars: the role of amphiphilic solutes in preventing adventitious reactions in anhydrobites at low water contents. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 131,515 -*525.*

143. Orstan, A., 1998. Factors affecting long-term survival of bdelloid rotifers: a preliminary study. *Hydrobiologia*, 387/388, 327-331.

144. Stypuła, B., Laboratorium z chemii fizycznej. *Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki AGH.* [dostęp 2018-02-21].

145. Suits, B. H., 2006. Nuclear quadrupole resonance spectroscopy. Handbook of Applied Solid State Spectroscopy. *Springer US*, 65–96.

146. Pake, G.E., 1948. Nuclear Resonance Absorption in Hydrated Crystals: Fine Structure of the Proton Line. *The Journal of Chemical Physics*, 16(4), s.327.

147. Perlman, H., 2016. Water Density. *The USGS Water Science School*. Retrieved *2016-06-03*

148. Petrova, N. A., Chubareva, L. A., Zolotareva, L.V., 1981. The karyotypes of the chironomids of the Bratsk reservoir (Diptera). *Tsitologiia*, 23(10), 1180−1187.

149. Petrova, N. A., Cornette, R., Shimura, S., Gusev, O. A., Pemba, D., Kikawada, T., Zhirov S.V., Okuda, T., 2015. Karyotypical characteristics of two allopatric African populations of anhydrobiotic *Polypedilum* Kieffer, 1912 (Diptera, Chironomidae) originating from Nigeria and Malawi. *Comparative Cytogenetics*, *9*(2), 173–188.

150. Pintar, M. M, 1994. Some considerations of the round table subject, *Magnetic Resonance Imaging*, 9, 753-754.
151. Porter, D, Martin, J., 1977. The cytology of *Polypedilum nubifer* (Diptera, Chironomidae). *Caryologia*, 30(1), 41−62.
152. Potts, M., 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev*., 58, 755–805.
153. Reece, J. B., 2013. Campbell Biology (10 ed.). *Pearson*, 44.
154. Redfield, A. G., 1957. On the theory of relaxation processes, *IBM Journal*, 1, 19-31.
155. Riveros-Perez, E., Riveros, R., 2018. Water in the human body: An anesthesiologist's perspective on the connection between physicochemical properties of water and physiologic relevance, *Annals of Medicine and Surgery*, 26, 1-8.
156. Robinson, J., 2002. Water, electrolytes and acid-base balance, Mann, J., Truswell, S. (Eds.), Essentials of Human Nutrition, *Oxford University Press*, 113-128
157. Rose, M. E., 1957. Elementary theory of angular momentum. *Wiley*, New York.
158. Rothschild, L.J., Mancinelli, R.L., 2001. Life in extreme environments. *Nature*, 409, 1092-11-1.
159. Ruf, J., Wacker, H., James, P., Maffia, M., Seiler, P., Galand, G., v. Kiekebusch, A., Semenza, G., and Mantei, N., 1990. Rabbit small intestine trehalase. Purification, cDNA cloning, expression and verification of GPI-anchoring. *J. Biol. Chem*., 265, 15034–15040.
160. Sakurai, M., Furuki, T., Akao, K., Tanaka, D., Nakahara, Y., Kikawada, T., Okuda, T., 2008. Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(13), 5093–5098.
161. Sapir, L., Harries, D., 2011. Linking Trehalose Self-Association with Binary Aqueous Solution Equation of State. *J. Phys. Chem. B.*, 115 (4): 624–634.
162. Shimizu, T., Kanamori, Y., Furuki, T., Kikawada, T., Okuda, T., Takahashi, T., Mihara, H., Sakurai, M., 2010. Desiccation-induced structuralization and glass formation of group 3 late embryogenesis abundant protein model peptides. *Biochemistry*, 49, 1093–1104.
163. Sing, K., Everett, D. H., Haul, R. A. W., Moscou, L., Pierotti, R. A., Rouquerol, J., Siemieniewska, T., 1985. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. (IUPAC Recommendations 1984), *Pure & Appl. Chem*., 57(4), 603-619.

164. Smith, J. D., Cappa, C. D., Wilson, K. R., Cohen, R. C., Geissler, P. L., Saykally, R. J., 2005. Unified description of temperature-dependent hydrogen bond rearrangements in liquid water. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102 (40), 14171–14174.*

165. Sol 90, 2013. Human Body I (Brittanica Illustrated Science Library), *Encyclopaedia Britannica*, 10.

166. Sømme, L., 1995. Invertebrates in Hot and Cold Arid Environments. *Springer - Verlag*, New York, 95–114.

167. Spring, J. H., Robichaux, S. R., Hamlin, J. A., 2009. The role of aquaporins in excretion in insects. *J. Exp. Biol.*, 212, 358–362.

168. Stupnicki, R., 2016. Pomiary i normy w antropometrii, *Zeszyty Naukowe WSKFiT*, 11,13-20.

169. Suresh, S. J., Naik, V. M., 2000. Hydrogen bond thermodynamic properties of water from dielectric constant data. *Journal of Chemical Physics*, 113(21), pp.9727–9732.

170. Tabor, R. F., Manica, R., Chan, D. Y., Grieser, F., Dagastine, R. R., 2011. Repulsive van der Waals forces in soft matter: why bubbles do not stick to walls. *Phys. Rev. Lett.*, 106 (6).

171. Thienemann, A., 1954. Chironomus. Leben, Verbreitung und wirtschaftliche Bedeutung der Chironomiden. *Binnengewässer,* 20, 1–834.

172. Tillequin, F., 2009. Trehala, a meeting point between zoology, botany, chemistry, and biochemistry. *Revue d'histoire de la pharmacie,* 57 (362): 163–72.

173. Tavčar V. (1967) Grada žlijezda slinovnica i gorostasnih kromosoma nekih ličinaka hironomida, njezin odnos prema načinu života i važnost za determinaciju vrsta. *Bioloski Glasnik*, 19: 11−17. [In Croatian with English summary]

174. Tolaba, M.P. et al., 2004. Grain sorption equilibria of quinoa grains. *Journal of Food Engineering*, 61(3), 365–371.

175. Wangsness, R. K., Bloch, F., 1953. The dynamical theory of nuclear induction, *Physics Review*, 89, 728-739.

176. Watanabe, M., Kikawada, T., Okuda, T., 2003. Increase of internal ion concentration triggers trehalose synthesis associated with cryptobiosis in larvae of *Polypedilum vanderplanki*. *Journal of Experimental Biology*, 206, 2281-2286.

177. Watanabe, M., 2006. Anhydrobiosis in invertebrates. *Appl. Entomol. Zool.,* 41(1), 15–31.

178. Watanabe, M., Kikawada, T., Fujita, A., Forczek, E., Adati, T., Okuda, T., 2004. Physiological traits of invertebrates entering cryptobiosis in a post-embryonic stage. *Eur. J.Entomol.*, 101, 439–444.
179. Watanabe, M., Kikawada, T., Fujita, A., Okuda, T., 2005. Induction of anhydrobiosis in fat body tissue from an insect. *J. Insect. Physiol.*, 51, 727–731.
180. Watanabe, M., Kikawada, T., Minagawa, N., Yukuhiro, F., Okuda, T., 2002. Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. *J. Exp. Biol.*, 205, 2799–2802.
181. West, J.B., Cavendish, H., 1731–1810. hydrogen, carbon dioxide, water, and weighing the world, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*,. 307(1) , 1 Jul 2014, https://doi.org/10.1152/ajplung.00067.2014
182. Wharton, D. A., 2002a. Nematode survival strategies. *Biology of Nematodes*, 16, 389–411.
183. Wharton, D. A., 2002b. Life at the Limits, Organisms in Extreme Environments. *Cambridge University Press*, Cambridge, 307.
184. Wiggers, H. A. L., 1832. Untersuchung über das Mutterkorn, Secale cornutum. *Annalen der Pharmacie, 1 (2). 129–182.*
185. Wigner, A. P., 1959. Group theory. *New York Academic Press*, New York.
186. Witek, M., 2006. Badanie magnetycznej relaksacji jądrowej w amorficznych układachbiologicznych, Praca doktorska, *Uniwersytet Jagielloński*, Kraków.
187. Womersley, C., 1987. A reevaluation of strategies employed by nematode anhydrobites in relation to their natural environment. In Vistas on Nematology. (Veech, J. A. and Dickson, D. W., eds.), *Society of Nematologists, Inc, MD*, pp. 165–173
188. Wright, J. C., 1989. Desiccation tolerance and water - retentive mechanisms in tardigrades. *J. Exp. Biol*., 142, 267–292.
189. Wright, *J. C. Westh, P., Ram*løv, *H., 1992.* Cryptobiosis in Tardigrada. *Biol. Rev.*, 67, 1–29.
190. Wu, *Z.*, Xing, J., 2012. Functional roles of slow enzyme conformational changes in network dynamics. *Biophys. J.*, 103, 1052–1059.
191. Vierling, E., 1997. The small heat shock proteins in plants are members of an ancient family of heat induced proteins. *Acta Physiol. Plant*, 19, 539–547.

192. Yonemaya, Y., Lever, J. E., 1987. Apical trehalase expression associated with cell patterning after inducer treatment of LLC-PK monolayers. *J. Cell. Physiol*., 131, 330–341.
193. Zalitacz, D., 2018. Badanie hydratacji ludzkich tkanek keratynowych. Praca doktorska *Uniwersytet Jagielloński*, Kraków.
194. Żylewski M., Spektroskopia Magnetycznego Rezonansu Jądrowego (NMR,) Materiały do seminariów ze spektroskopii, *Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, Katedra Chemii Organicznej*.
195. PubChem, National Center for Biotechnology Information, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7427#section=Top.
196. Suetsugu, Y., Gusev, O., Cornette, R., Kikawada, T., 2013. ARId sub-genome browser, http://bertone.nises-f.affrc.go.jp/cgi-bin/gb2/gbrowse/arid/.

7. Spis publikacji Autorki

1. Harańczyk, H., Baran, E., Nowak, P., Florek-Wojciechowska, M., Leja, A., Zalitac,z D., Strzałka, K., 2015. Non-cooperative immobilization of residual water bound in lyophilized photosynthetic lamellae. *Cellular and Molecular Biology Letters*, *20*(5), 717-735(DOI: 10.1515/cmble-2015-0040); (IF = 1.593 w 2014).
2. Harańczyk, H., Leja, A., Nowak, P., Baran, E., Strzałka, K., 2016. The effect of mild rehydration on freeze-dried dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) multilamellar membranes as observed by proton NMR and sorption isotherm, *Acta Physica Polonica* A, 129, 179-184 (DOI: 10.12693/APhysPolA.129.179); (IF = 0.530 w 2014).
3. Nowak, P., Harańczyk, H., Kijak, P., Marzec, M., Fitas, J., Lisowska, M., Baran, E., Olech, M.A., 2018. Bound water behavior in *Cetraria aculeata* thalli during freezing, *Polar Biology* 41 (5), 1-12 (DOI 10.1007/s00300-017-2249-2), (IF = 1.84 w 2015).
4. Knutelski, S., Baran, E., Nowak, P., Harańczyk, H., Strzałka, K., Okuda, T., The sleeping chironomid (*Polypedilum vanderplanki* Hinton, 1951) larva body reaction on different water condition, from cryptobiosis state up to complete hydration form (Diptera: Chironomidae), przygotowywane do publikacji.
5. Harańczyk, H., Baran, E., Nowak, P., Knutelski, S., Strzałka, K., Okuda, T., Low temperature induced immobilization of residual water in anhdrobiotic form of

Polypedilum vanderplanki larvae as monitored by ^{1}H-NMR, przygotowywane do publikacji.

6. Knutelski, S., Baran, E., Harańczyk, H., Strzałka, K., Okuda, T., 2014. Jak ochotki afrykańskie radzą sobie z niedoborem wody?. *Wszechświat*, 115, zeszyt 10-12, 255-261.

8. Wystąpienia konferencyjne Autorki

Harańczyk, H., Baran, E., Florek-Wojciechowska, M., Nowak, P., Nizoł, J.,Okuda, T., Strzałka, K., Knutelski, S., Tarasiuk, J., Residual moisture behavior in extremophilic *Polypedilum vanderplanki* monitored by 1H-NMR. *International Symposium and Summer School in Saint Petersburg. Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter, 10th Meeting "NMR in Life Sciences"*, Sankt Petersburg, 8 – 12 July 2013. Book of Abstracts, p. 80.

Baran, E., Knutelski S., Harańczyk, H., Tempo hydratacji larw *Polypedilum vanderplanki* w warunkach laboratoryjnych. Arthropods, Katowice, 30.05-1.06.2014. Book of Abstracts, p. 65.

Baran, E., Nowak, P., Harańczyk, H., Knutelski S., Strzałka, S., Okuda, T., Freezing resistance of cryptobiotic *Polypedilum vanderplanki* larva by ^{1}H-NMR. *XLV Polish Seminar on Nuclear Magnetic Resonance and Its Applications.* Kraków, 1-2 December 2014, Abstracts, p. 1.

Bacior, M., Nowak, P., Kijak, P., Baran, E., Harańczyk, H., Olech, M. A., Freezing and drying resistance of antarctic *Turgidosculum comlicatulum* thalli as observed by ^{1}H-NMR methods. *XLV Polish Seminar on Nuclear Magnetic Resonance and Its Applications.* Kraków, 1-2 December 2014, Abstracts, p.27.

Bacior, M., Nowak, P., Kijak, P., Baran, E., Harańczyk, H., Olech, M. A., Low temperature and humidity effects of Antarctic *Turgidosculum complicatulum* thalli observed by 1H-NMR methods. *Ampere NMR School 2015*, Zakopane, 14-20 June 2015, Book of Abstracts, p. 83.

Zalitacz, D., Harańczyk, H., Nowak, P., Delong, P., Ciułkowska, A., Pieńkowska, K., Baran, E., Exogenous silk protein and collagen effect on properties of hydrated hair by ^{1}H-NMR and sorption isotherm. *2015 International Forum Agriculture, Biology, and Life Science (IFABL)*, Sapporo, Hokkaido, Japan, 23-25 June 2015, Book of Abstracts, p. 248.

Harańczyk, H., Baran, E., Knutelski, S., Okuda, T., Zalitacz, D., Nowak, P., Residual moisture behavior in extremophilic *Polypedilum vanderplanki* monitored by ^{1}H-NMR. *2015 International Forum Agriculture, Biology and Life Science (IFABL),* Sapporo, Hokkaido, Japan, 23-25 June 2015, Book of Abstracts, p. 247.

Zalitacz, D., Nowak, P., Baran, E., Ciułkowska, A., Pieńkowska, K., Harańczyk, H., Inulin and SLES effect on properties of hydrated hair by ^{1}H-NMR and sorption isotherm. *9th World Congress for Hair Research,* Miami, Florida, USA, 18-21 November 2015, p. 242.

Baran, E., Harańczyk, H., Strzałka, K., Nowak, P., Okuda, T., Knutelski, S., Bound water immobilization in extremophilic *Polypedilum vanderplanki* as monitored by ^{1}H-NMR. *7th International Workshop on Dessiccation Sensitivity and Tolerance Across Life forms*, Aquila Private Game Reserve, South Africa, 11-15 January 2016.

Leszczyński, B., Wróbel, A., Śniegocka, M., Elas, M., Sojka-Leszczyńska, P., Baran, E., Kubicz, E., Pędrys, R., Stępień, E., Microtomographic approach to soft tissue analysis. *NanoTech Poland 1st Symposium on Polydopamine*, Poznań, 6-9.06.2018.

9. Spis rycin

Rycina 1. Samiec (a) i samica (b) dorosłych osobników *Polypedilum vanderplanki* 20
Rycina 2. Cykl życia ochotki *Polypedilum vanderplanki* wraz ze zjawiskiem desykacji i wejściem w stan anhydrobiozy oraz rehydratacji i powrotnym przejściem do stanu aktywnego życia larwy 21
Rycina 3. Budowa morfologiczna larwy ochotki *Polypedilum vanderplanki* 22
Rycina 4. Budowa morfologiczna głowy larwy *Polypedilum vanderplanki* 23
Rycina 5. Przekrój przez rurkowatą osłonkę śluzowo-piaskową ze znajdującą się wewnątrz larwą *Polypedilum vanderplanki*, będącą na początku procesu odwodnienia (dehydratacji) .. 24
Rycina 6. Chemiczny wzór strukturalny trehalozy 26

Rycina 7. Uproszczony schemat struktury komórki ciała tłuszczowego larwy *Polypedilum vanderplanki* inicjującej syntezę trehalozy podczas indukcji anhydrobiozy 31
Rycina 8. Zmiany ilości wody i trehalozy w ciele larwy *Polypedilum vanderplanki* podczas procesu desykacji trwającego 48 godzin 32
Rycina 9. Zmiany ilości trehalozy w ciele larwy *Polypedilum vanderplanki* w różnych warunkach morfologicznych podczas dehydratacji 34
Rycina 10. Główne przemiany zachodzące w ciele larwy *Polypedilum vanderplanki* podczas procesu desykacji 37
Rycina 11. Cykl anhydrobiotyczny (a) i drzewo filogenetyczne ochotki afrykańskiej, *Polypedilum vanderplanki* (c) oraz „łagodne" wysuszanie *P. nubifer* 38
Rycina 12. Pokrewieństwa filogenetyczne pomiędzy *Polypedilum vanderplanki* i innymi taksonami w obrębie rodzaju *Polypedilum* 40
Rycina 13. Struktura agregatów cząsteczek wody 42
Rycina 14. Precesja magnetycznego momentu jądrowego $\vec{\mu}$ obserwowana w laboratoryjnym układzie współrzędnych 56
Rycina 15. Powstawanie sygnału swobodnej precesji 65
Rycina 16. Zestawienie zaników swobodnej precesji oraz widm NMR pochodzących od próbki zawierającej zarówno frakcję stałą, jak i frakcję cieczową 66
Rycina 17. Dipolowy dublet Pake'a dla pary spinów oddziałujących w polikrystalicznej próbce proszkowej. 71
Rycina 18. Widoczny na widmie NMR dublet Pake'a. Poniżej widoczny sygnał FID opisywany funkcją Abragama oraz jego transformacja Fouriera do domeny częstości – funkcja „kapeluszowa" 72
Rycina 19. Schemat blokowy regulatora spektrometru impulsowego WNS HB65 77
Rycina 20. Spektrometr Bruker Biospin 78
Rycina 21. Sekwencja impulsów a) w metodzie CPMG oraz b) w metodzie echa Hahna 80
Rycina 22. Zdjęcie wysuszonych larw *Polypedilum vanderplanki* wykonane w stereoskopowym mikroskopie optycznym NIKON SMZ1500 84
Rycina 23. Porównanie budowy ciała larwy *Polypedilum vanderplanki* w różnym stanie uwodnienia w wodzie z kranu (SEM, 35X) 87
Rycina 24. Porównanie głowy larwy *Polypedilum vanderplanki* w różnym stanie uwodnienia w wodzie z kranu 88
Rycina 25. Części ciała larwy *Polypedilum vanderplanki* w różnym stanie uwodnienia w wodzie z kranu 89
Rycina 26. Porównanie powierzchni odwłoka larwy *Polypedilum vanderplanki* w różnym stanie uwodnienia w wodzie z kranu 90
Rycina 27. Bakterie widoczne w okolicach głowy larwy *Polypedilum vanderplanki;* wykonano dla larwy uwadnianej przez 150 minut, powiększenie 5000X 91
Rycina 28. Przekroje podłużne larwy *Polypedilum vanderplanki*, uwadnianej przez 120 minut. 92
Rycina 29. Przekroje podłużne larwy *Polypedilum vanderplanki* uwadnianej przez 120 minut w różnych odstępach czasu 92

Rycina 30. Przekrój podłużny (obraz a) oraz b) z lewej) i przekrój poprzeczny w części środkowej ciała (obraz z prawej strony b)) larwy *Polypedilum vanderplanki* uwadnianej przez 80 minut 93
Rycina 31. Przekrój podłużny ciała wysuszonej larwy *Polypedilum vanderplanki* 93
Rycina 32. Przekroje podłużne (obraz z lewej) i poprzeczne (obraz z prawej) ciała larwy *Polypedilum vanderplanki* uwadnianej przez 120 minut 94
Rycina 33. Widok larwy *Polypedilum vanderplanki*: a) zewnętrzny ciała larwy anhydrobiotycznej (całkowicie odwodnionej); b) – zewnętrzny larwy uwadnianej przez 120 minut z widoczną głową i segmentacją ciała 94
Rycina 34. Części ciała larwy *Polypedilum vanderplanki*: a) przedni odcinek z widocznym otworem gębowym (ciamny punkt) b) tylna część z widocznym otworem odbytowym (zaznaczono strzałką) 95
Rycina 35. Zmiany powierzchni (A) ciała larwy *Polypedilum vanderplanki* w czasie (t) jej uwadniania w wodzie destylowanej od stanu anhydrobiozy do pełnego uwodnienia 96
Rycina 36. Zmiany powierzchni (A) ciała larw *Polypedilum vanderplanki* w czasie (t) ich uwadniania w wodzie z kranu od stanu anhydrobiozy do pełnego uwodnienia 97
Rycina 37. Zmiany powierzchni (A) ciała larw *Polypedilum vanderplanki* w czasie (t) podczas uwadniania w różnych rodzajach wody od stanu anhydrobiozy do pełnej aktywacji 98
Rycina 38. Zmiany powierzchni (A) ciała larw żywych (□) i martwych (■) *Polypedilum vanderplanki* w czasie, *t*, uwadniania w wodzie z kranu od stanu anhydrobiozy do pełnego uwodnienia larw żywych 100
Rycina 39. Hydratacja z fazy gazowej żywych larw *P. vanderplanki* w atmosferze o wilgotności względnej p/p_0 = 52% 101
Rycina 40. Kinetyka hydratacji larw żywych *Polypedilum vanderplanki* dla wilgotności względnych: a) 23%, b) 32%, c) 44%, d) 52% 102
Rycina 41. Kinetyka hydratacji larw martwych *Polypedilum vanderplanki* dla wilgotności względnych: a) 9%, b) 23%, c) 32%, d) 44% 103
Rycina 42. Kinetyka hydratacji z fazy gazowej żywych larw *Polypedilum vanderplanki* w atmosferach o wilgotnościach względnych od 63% do 100% 106
Rycina 43. Kinetyka hydratacji z fazy gazowej żywych larw *Polypedilum vanderplanki* w atmosferach o wilgotnościach względnych od 52% do 100% 106
Rycina 44. Izoterma sorpcyjna dla larw żywych *Polypedilum vanderplanki* 110
Rycina 45. Izoterma sorpcyjna dla larw martwych *Polypedilum vanderplanki* 110
Rycina 46. Postać paraboliczna izotermy sorpcyjnej dla żywych larw *Polypedilum vanderplanki* 112
Rycina 47. Postać paraboliczna izotermy sorpcyjnej dla marwych larw *Polypedilum vanderplanki* 112
Rycina 48. Sygnał zaniku swobodnej precesji ^{1}H-NMR FID dla żywych larw *P. vanderplanki* uwodnionych do poziomu: a) $\Delta m/m_0$ = 0.077, b) $\Delta m/m_0$ = 0.122 114
Rycina 49. Zależność hydratacyjna efektywnych czasów relaksacji spinowo-spinowej ^{1}H-NMR FID dla protonów larw żywych *P. vanderplanki* 115
Rycina 50. Zależność hydratacyjna cieczowego sygnału ^{1}H-NMR FID, wyrażonego w jednostkach sygnału stałego, $(L_1 + L_2)/S$, dla żywych larw *P. vanderplanki* 116

Rycina 51. Sygnał zaniku swobodnej precesji dla protonów ^{1}H-NMR FID martwych larw *Polypedilum vanderplanki* uwodnionych do poziomu: a) $\Delta m/m_0 = 0.07$, b) $\Delta m/m_0 = 0.136$ 118
Rycina 52. Zależność hydratacyjna efektywnych czasów relaksacji spinowo-spinowej ^{1}H-NMR FID dla protonów martwych larw *P. vanderplanki* 119
Rycina 53. Zależność hydratacyjna cieczowego sygnału ^{1}H-NMR FID, wyrażonego w jednostkach sygnału stałego, $(L_1 + L_2)/S$, dla martwych larw *P. vanderplanki* 120
Rycina 54. Widmo ^{1}H-NMR larw żywych *P. vanderplanki* uwodnionych do poziomu a) $\Delta m/m_0 = 0.024$, dopasowane złożeniem funkcji Gaussa i Lorentza; oraz b) - uwodnionych do $\Delta m/m_0 = 0.31$, dopasowane wyłącznie funkcją Lorentza 121/122
Rycina 55. Widma ^{1}H-NMR zmierzone dla temperatury pokojowej w funkcji poziomu hydratacji dla żywych larw *Polypedilum vanderplanki* 122
Rycina 56. Położenia środków linii składowej stałej (●) oraz składowej cieczowej (□) widma ^{1}H-NMR dla żywych larw *Polypedilum vanderplanki* wyrażone w funkcji poziomu uwodnienia 123
Rycina 57. Szerokości połówkowe składowej stałej (●) oraz składowej cieczowej (□) widma ^{1}H-NMR dla żywych larw *Polypedilum vanderplanki* wyrażone w funkcji poziomu uwodnienia 124
Rycina 58. Hydratacyjna zależność składowej cieczowej widma ^{1}H-NMR, wyrażonej w jednostkach składowej stałej suchej masy, $\Delta m/m_0$, dla żywych larw *Polypedilum vanderplanki* 125
Rycina 59. Widmo ^{1}H-NMR martwych larw *Polypedilum vanderplanki* uwodnionych do poziomu $\Delta m/m_0 = 0.024$ 126
Rycina 60. Widma ^{1}H-NMR dla martwych larw *Polypedilum vanderplanki* zestawione w funkcji poziomu hydratacji zarejestrowane w temperaturze pokojowej 126
Rycina 61. Położenia środków linii składowej stałej (●) oraz cieczowej (□) widma ^{1}H-NMR dla martwych larw *Polypedilum vanderplanki* wyrażone w funkcji uwodnienia: 127
Rycina 62. Szerokości połówkowe składowej stałej (●) oraz cieczowej (□) widma ^{1}H-NMR dla martwych larw *Polypedilum vanderplanki* wyrażone w funkcji poziomu uwodnienia ... 128
Rycina 63. Hydratacyjna zależność składowej cieczowej widma ^{1}H-NMR, wyrażonej w jednostkach składowej stałej suchej masy, $\Delta m/m_0$, dla martwych larw *Polypedilum vanderplanki* 128
Rycina 64.Widmo ^{1}H-NMR dla larw *Polypedilum vanderplanki* w postaci aktywnej (uwodnionej z anhydrobiozy), zarejestrowane dla 300 MHz w temperaturze pokojowej 130
Rycina 65. Widma ^{1}H-NMR dla larw żywych *Polypedilum vanderplanki* dla: a) skrajnie wysuszonej próbki; b) larw o uwodnieniu $\Delta m/m_0 = 0.122$; c) larw o uwodnieniu $\Delta m/m_0 = 0.166$, zmierzone dla temperatur od 230 K do 295 K 132
Rycina 66. Położenia linii widm ^{1}H-NMR dla żywych larw *Polypedilum vanderplanki* zmierzone w funkcji obniżanej temperatury 133/134
Rycina 67. Zależności temperaturowe szerokości połówkowych linii Gaussa (●) oraz linii Lorentza (□) na widmie ^{1}H-NMR dla ochładzania żywych larw *Polypedilum vanderplanki* 135/136
Rycina 68. Temperaturowe zależności sygnału pochodzącego od protonów mobilnych, a wyrażonego w jednostkach sygnału protonów o niskiej mobilności, A_L/A_G, zmierzone dla widm ^{1}H-NMR podczas ochładzania próbek żywych larw *Polypedilum vanderplanki* 137/138

Rycina 69. Widma ^{1}H-NMR w zakresie od 290 K do 230 K zmierzone dla larw martwych P*olypedilum vanderplanki* dla skrajnie wysuszonej próbki 138
Rycina 70. Położenia linii widm ^{1}H-NMR pochodzących od matrycy stałej opisanej funkcją Gaussa (●) oraz linii cieczowej opisanej funkcją Lorentza (□) w trakcie ochładzania dla larw martwych *Polypedilum vanderplanki* dla skrajnie wysuszonej próbki 139
Rycina 71. Zależności temperaturowe szerokości połówkowych linii Gaussa (●) oraz linii Lorentza (□) na widmie ^{1}H-NMR dla ochładzania martwych larw *Polypedilum vanderplanki* dla skrajnie wysuszonej próbki 140
Rycina 72. Temperaturowe zależności sygnału pochodzącego od protonów mobilnych, a wyrażonego w jednostkach sygnału protonów o niskiej mobilności, A_L/A_G, zmierzone dla widm ^{1}H-NMR podczas ochładzania próbek martwych larw *Polypedilum vanderplanki* dla skrajnie wysuszonej próbki 140
Rycina 73. Spektroskopia relaksacyjna ^{1}H-NMR dla temperatury pokojowej dla skrajnie wysuszonych żywych larw *Polypedilum vanderplanki*..... 141
Rycina 74. Odrosty magnetyzacji spinowo-sieciowej dla obu składowych rodziny widm ^{1}H-NMR wyodrębnionych w eksperymencie spektroskopii relaksacyjnej w temperaturze pokojowej dla żywych skrajnie wysuszonych larw *Polypedilum vanderplanki* 142
Rycina 75. Temperaturowa zależność czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 ^{1}H-NMR wyznaczone z eksperymentu spektroskopii relaksacyjnej dla skrajnie wysuszonych żywych larw *Polypedilum vanderplanki* 143
Rycina 76. Spektroskopia relaksacyjna ^{1}H-NMR dla temperatury pokojowej dla skrajnie wysuszonych martwych larw *Polypedilum vanderplanki*. 144
Rycina 77. Odrosty magnetyzacji spinowo-sieciowej dla obu składowych rodziny widm ^{1}H-NMR wyodrębnionych w eksperymencie spektroskopii relaksacyjnej w temperaturze pokojowej dla martwych skrajnie wysuszonych larw *Polypedilum vanderplanki*..... 145
Rycina 78. Temperaturowa zależność czasu relaksacji spinowo-sieciowej T_1 ^{1}H-NMR wyznaczone z eksperymentu spektroskopii relaksacyjnej dla skrajnie wysuszonych martwych larw *Polypedilum vanderplanki* 146

10. Spis tabel

Tabela 1. Systematyka gatunku *Polypedilum vanderplanki* 19
Tabela 2. Substancje wykorzystywane do uzyskiwania odpowiednich wilgotności względnych w trakcie hydratacji z fazy gazowej 75
Tabela 3. Odczyn i skład chemiczny różnych rodzajów wody użytej do uwadniania larw *Polypedilum vanderplanki* w warunkach laboratoryjnych..... 84
Tabela 4. Średnie wartości pomiarów czasu aktywacji oraz przyrostu powierzchni i długości larw *Polypedilum vanderplanki* podczas uwodnienia w różnych rodzajach wody..... 98
Tabela 5. Parametry kinetyki hydratacji żywych larw *P. vanderplanki* dla niskich wilgotności atmosfery..... 103
Tabela 6. Parametry kinetyki hydratacji martwych larw *P. vanderplanki* dla niskich wilgotności atmosfery 103

Tabela 7. Całkowity poziom uwodnienia larwy *P. vanderplanki* dla różnyc wilgotności względnych atmosfery..... 104
Tabela 8. Parametry kinetyki hydratacji larw żywych dla wysokich wilgotności 108
Tabela 9. Parametry kinetyki hydratacji martwych larw P. vanderplanki dla hydratacji z fazy gazowej, wysokie wilgotności atmosfery..... 108
Tabela 10. Całkowity poziom uwodnienia z atmosfer o wysokich wilgotnościach względnych 109
Tabela 11. Parametry dopasowania izoterm sorpcyjnych dla larw *P. vanderplank*i 111
Tabela 12. Wartości parametrów dopasowania izoterm sorpcyjnych w postaci parabolicznej 113
Tabela 13. Wartości parametrów widma ^{1}H-NMR dla aktywnych żywych larw *Polypedilum vanderplanki*..... 131