

Ryszard Pado*, Magdalena Greczek*

Fotoreaktywacyjne działanie światła białego na dynamikę podziałów *Paramecium bursaria*

Streszczenie

Zbadano wpływ ultrafioletu (UV) na przeżywalność orzęsków *Paramecium bursaria*. Dawka letalna promieniowania UV wynosiła 131 W m^{-2} po czasie ekspozycji 95 s. Niższe dawki UV wpływały na zwolnienie ruchu orzęsków. Ultrafiolet hamuje tempo podziałów komórkowych. Orzęski przechowywane po naświetleniu UV w ciemności zwalniały tempo podziałów do wartości 9,5% kontroli po 3 dniach od momentu ekspozycji, podczas gdy orzęski po naświetleniu UV przeniesione do światła wykazywały tempo podziałów zbliżone do kontroli. W tym przypadku działanie światła białego po wcześniejszym napromieniowaniu UV jest działaniem typowo fotoreaktywacyjnym - znoszącym szkodliwy efekt promieniowania ultrafioletowego (UV).

WSTĘP

Promieniowanie ultrafioletowe (UV) wywiera duży wpływ na organizmy żywe. Oprócz efektu mutagennego UV ma wyraźny efekt letalny. Pod wpływem ultrafioletu zachodzą złożone reakcje w napromieniowanych komórkach, gdyż UV jest absorbowany nie tylko przez DNA i RNA, ale także przez białka, wolne puryny i pirymidyny znajdujące się w cytoplazmie (Gajewski 1987).

* Instytut Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej.

W piśmiennictwie znanych jest wiele prac podejmujących problem działania ultrafioletu w różnych grupach roślinnych (Borgeson 1985; Steinmuller 1985) oraz zwierzęcych (Davison 1986). Obserwowano również wpływ ultrafioletu na zachowanie się mikroorganizmów. Håder (1985) stwierdził, że promieniowanie UV hamuje ruchliwość oraz niektóre reakcje na bodźce świetlne wiciowca *Euglena gracilis*. Stwierdzono również wpływ ultrafioletu na szereg reakcji fizjologicznych organizmów. Badania prowadzone na bakteriach i fagach *in vitro* wykazały, że większość efektów letalnych, jak i mutagennych, zanika, gdy komórki po napromieniowaniu UV poddane były działaniu światła widzialnego (Novicka 1946). Proces ten nazwano fotoreaktywacją. W komórkach eukariotycznych występuje fotoreaktywacja dimerów pirymidynowych oraz reperacja uszkodzeń przez wycinanie (Gajewski 1987). Ohki i współprac. (1980) zaobserwowali, że pod wpływem promieni ultrafioletowych następowało nieodwracalne odbarwienie się zielonych komórek *Euglena*, przy czym dawka letalna dla tych organizmów była znacznie wyższa. Promieniowanie UV wywołuje zmiany nie tylko w strukturze tylakoidów *Chlorella fusca* (Wilhelm 1985). Sasa (1961) obserwował wpływ UV na procesy fizjologiczne *Chlorella* stwierdzając, że powoduje ono hamowanie podziałów komórkowych. W zależności od dawki pochłoniętego promieniowania następowało obniżenie przeżywalności komórek w kulturach.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu promieniowania ultrafioletowego (UV) na tempo podziałów i przeżywalność orzęsków *Paramecium burasaria* oraz wykazanie fotoreaktywacyjnego działania światła białego.

MATERIAŁ I METODY

Obiektem badań niniejszej pracy jest orzęsek *Paramecium burasaria*, który znany jest w literaturze jako klasyczny przykład endosymbiozy obligatoryjnej. Endosymbiotyczne glony *Chlorella* występują w peryferycznej części cytoplazmy pierwotniaka zlokalizowane w odrębnych wakuolach i zawierają odrębną ścianę komórkową (Reisser 1985). Liczba endosymbiontów przypadających na komórkę orzęska ulega wahaniom w dość szerokich granicach: od 110 do 1000 komórek *Chlorella* w jednym orzęsku (Pado 1965).

W niniejszych eksperymentach orzęski *Paramecium bursaria* hodowane były na pożywce sałatowej wg Sonnenborna (1950), zaszczipionej bakteriami *Enterobacter aerogenes* (szczep 503C), które stanowiły podstawowe źródło pokarmu dla orzęsków. Bakterie te wprowadzano do jałowej pożywki 24 godz. przed przeniesieniem do niej pierwotniaków. W tym czasie pożywka pozostawała w termostacie w temperaturze 37°C, co pozwalało na szybkie rozmnażanie bakterii w pożywce.

Hodowla *Paramecium bursaria* w tak przygotowanej pożywce odbywała się w stałym świetle białym uzyskanym z lamp jarzeniowych o natężeniu 1600 lx w temperaturze 21°C.

Linia hodowlana orzęsków wyprowadzona została z jednego osobnika, co jest powszechnie stosowane w tego typu eksperymentach dla uniknięcia różnic genetycznych materiału, a co za tym idzie - zmiennej reaktywności. Pierwotniaki były hodowane w stałych warunkach temperatury, oświetlenia i składu pożywki. W konsekwencji prowadziło to do ustalenia liczby symbiontów na stałym poziomie wynoszącym 200 komórek *Chlorella* na jednego pierwotniaka. Liczbę endosymbiotycznych glonów określano w ciągu kolejnych 7 do 10 dni rozgniatając każdorazowo na szkiełkach mikroskopowych po 10 pierwotniaków.

Pierwotniaki z hodowli rozdzielano na 4 grupy, z których 2 uznać należy za doświadczalne, a 2 za kontrolne. Charakter eksperymentu narzucał konieczność zastosowania 2 grup kontrolnych - ciemniowej i jasnej. We wszystkich grupach wydzielono po 20 orzęsków branych przypadkowo z hodowli i przenoszono je na szkiełka zegarkowe z niewielką objętością pożywki (3 ml), a następnie zamykano w szalkach Petriego stwarzając warunki stałej wilgotności. Dwie serie doświadczalne napromieniowywano ultrafioletem uzyskiwanym z lampy rtęciowej z palnikiem Q-700 o orientacji poziomej z metalizowanym odbłyśnikiem. Dla pierwszego etapu eksperymentów zmierzono całkowitą energię emitowaną przez stosowany palnik Q-700 docierającą do badanej próby. Drugi etap eksperymentu wymagał zastosowania filtra UG-11, który daje możliwość "wycięcia" ultrafioletu uzyskując maksimum przy 325 nm.

Materiał w seriach doświadczalnych po odpowiednim napromieniowaniu ultrafioletem zamykano w wilgotnych komorach i przenoszono pierwszą gru-

pę eksperymentalną do termostatu świetlnego w światło białe o natężeniu 1600 lx. Druga grupa analogicznie napromieniowana umieszczona została w termostacie ciemniowym. W tym samym czasie obok serii doświadczalnych wprowadzono do obydwu termostatów materiał kontrolny.

W dalszej części eksperymentu orzęski kontrolowano przeprowadzając obserwacje mikroskopowe w odstępach 24 godz. w ciągu 5 kolejnych dni. Określano liczbę osobników w poszczególnych seriach, także w innych pomiarach liczono endosymbionty *Chlorella* przypadające na 1 komórkę *Paramecium* w kolejnych dobach eksperymentu.

WYNIKI

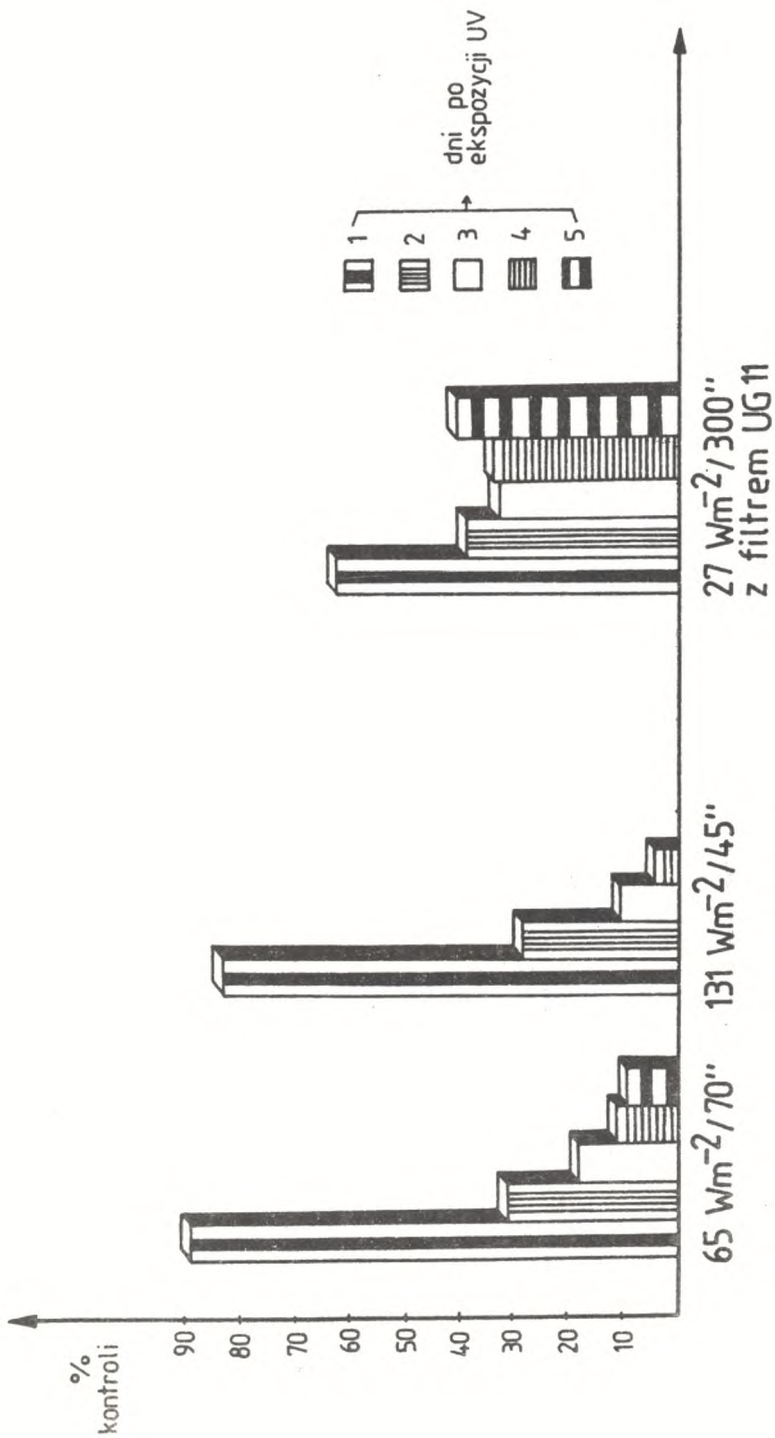
W celu stwierdzenia wpływu promieniowania UV na przeżywalność komórek *Paramecium bursaria* konieczne było określenie dawki letalnej (DLM). W rezultacie liczbnych prób stwierdzono, że w wyniku działania dawki 131 W m^{-2} w czasie 95 s zginęło 100% badanej populacji. Na tej podstawie w eksperymentach posłużono się dawkami promieniowania UV niższymi od powyższej wartości. Orzęski po ekspozycji UV i przeniesieniu do ciemności wykazywały spadek tempa podziałów komórkowych zależnie od zastosowanej dawki. Promieniowanie rzędu 65 W m^{-2} w czasie 70 s powodowało, że tempo podziałów komórkowych w seriach doświadczalnych w ciemności spadło osiągając po 5 dniach wartość 9,5% kontroli (tab. 1, ryc. 1).

Tabela 1

Efekt działania promieniowania UV na *Paramecium bursaria*.
Orzęski po naświetleniu ultrafioletem były przeniesione do ciemności
(% kontroli)

Dzień po naświetleniu Wartość promieniow. $\text{W m}^{-2}/\text{s}$	1	2	3	4	5
65/70	88,3*	31,0*	18,1*	10,9*	9,5*
131/45	82,6*	28,1*	9,5*	3,5*	0*
filtr UG-11 27/300	63,3*	37,7*	32,3*	33,1*	40,8*

* Wyniki statystycznie istotne - $P < 0,01$



Ryc. 1. Efekt działania promieniowania UV na Parametrium bursaria - orzęski po naświetleniu ultrafioletem były przeniesione do ciemności (% kontroli)

Zastosowanie wyższych dawek promieniowania UV: 131 W m⁻² w czasie 45 s zwalniało jeszcze bardziej tempo podziałów, a wartość 9,5% kontroli osiągnięta było już po 3 dniach od momentu ekspozycji. Najniższą wartość podziałową, wynoszącą 3,5% kontroli, zaobserwowano po 4 dniach. Równocześnie stwierdzono, że między 4 a 5 dobą przy omawianych wartościach promieniowania występował efekt letalny dla badanej serii. Taka dynamika procesu podziałowego wskazuje na przedłużony efekt działania UV prowadzący w konsekwencji do śmierci komórek.

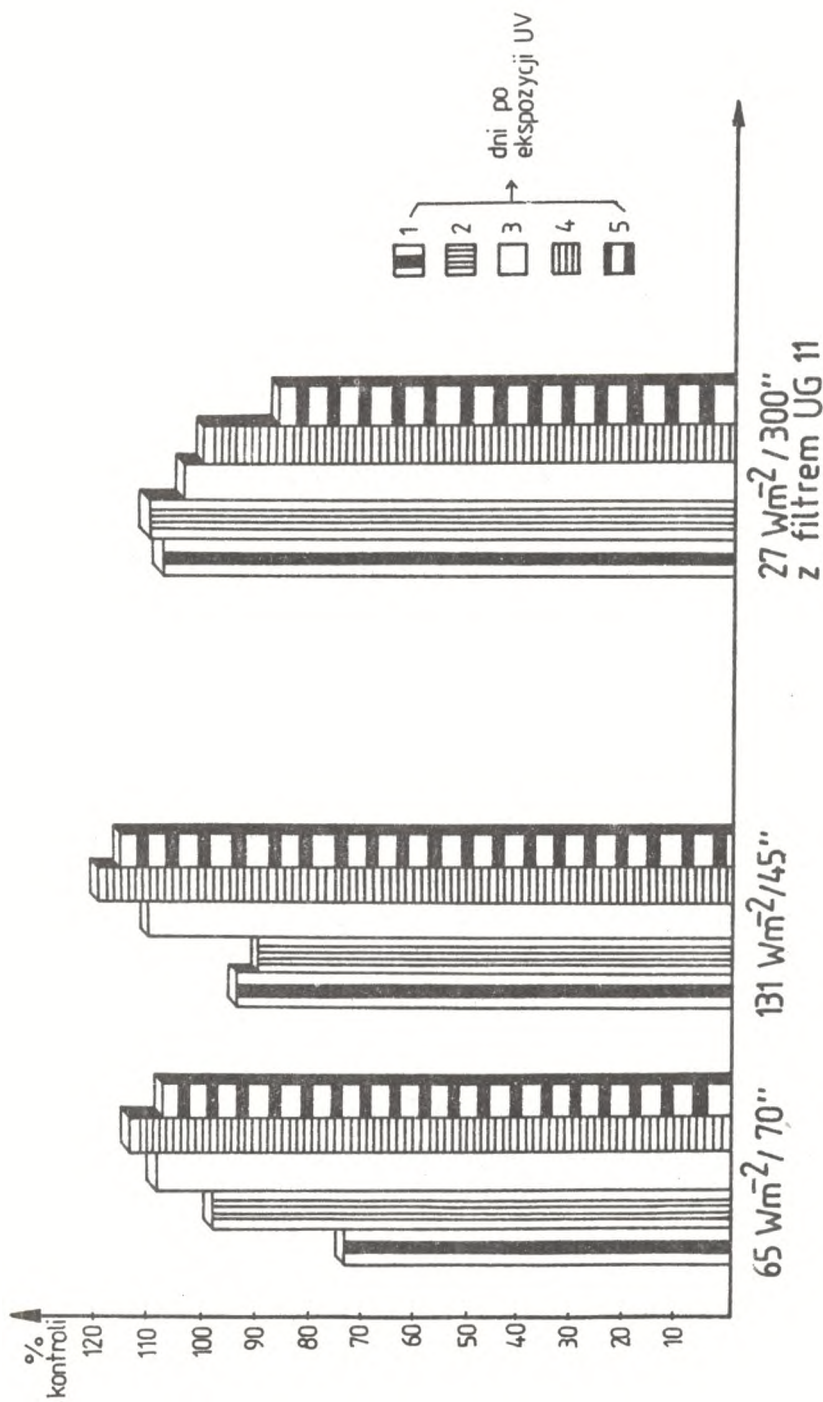
Zastosowanie filtra UG-11 zmieniło w sposób wyraźny kinetykę procesu podziałowego. Spadek tempa podziałów w pierwszej fazie po naświetleniu jest gwałtowny, osiąga 63,3% kontroli po 1 dobie, by po następnej osiągnąć wartość 37,7% kontroli, przy czym maksymalne zwolnienie tempa podziałów obserwowano po 3 dniach. Takie tempo podziałów utrzymywało się w zasadzie przez cały czas trwania eksperymentu (tab. 1).

Na podstawie uzyskanych rezultatów stwierdzić można ewidentny wpływ światła białego na orzęski, które uprzednio naświetlano ultrafioletem. Światło białe wyraźnie znosi szkodliwy efekt promieniowania UV. Komórki Paramecium bursaria napromieniowane uprzednio energią w dawce 65 W m⁻² w czasie 70 s przeniesione do światła białego o natężeniu 1600 lx w pierwszej dobie po naświetleniu wykazywały spadek tempa podziałów do 74,3% kontroli, co wskazywało że szkodliwy efekt został zniesiony. W kolejnych przedziałach czasowych tempo podziałów osiągało wartości równe lub nieco przewyższające kontrolę (tab. 2, ryc. 2).

Efekt działania promieniowania UV na Paramecium bursaria. Tabela 2
Orzęski po naświetleniu ultrafioletem były wystawione na ciągłe działanie światła białego (% kontroli)

Dzień po naświetleniu: Wartość promieniow. W m ⁻² /s	1	2	3	4	5
65/70	74,3*	97,8	107,5	113,8*	107,0
131/45	93,0	90,4	111,2*	137,3*	129,5*
filtr UG-11 27/300	109,0	110,0	104,8	101,4	87,9*

* Wyniki statystycznie istotne - P < 0,01



Ryc. 2. Efekt działania promieniowania UV na Paramacium bursaria - orzeszki po naświetleniu ultrafioletem były wystawione na ciągłe działanie światła białego (% kontroli)

Zastosowanie filtra UG-11 dawało nieco odmienny obraz reakcji. Do 4 doby po naświetleniu działanie UV było zupełnie zniesione w następstwie naświetlania światłem białym. W kolejnych dobach wartości podziałowe przewyższały nieznacznie kontrolę. Poczynając od 5 doby obserwowano tendencję spadku tempa podziałów komórkowych, które to wartości były poniżej wartości osobników grup kontrolnych (tab. 2, ryc. 2).

W eksperymentach tych starano się również prześledzić wpływ promieniowania UV na liczbę endosymbiontów *Chlorella* obecnych w komórkach *Paramecium bursaria*. Z otrzymanych rezultatów wynika, że stosowane dawki promieniowania ultrafioletowego nie mają znamiennej wpływu na liczbę endosymbiontów w komórce orzęska. Wyniki te wskazują, że orzęsek jest znacznie bardziej wrażliwy na szkodliwe działanie promieniowania ultrafioletowego. Endosymbionty *Chlorella* są pod tym względem w korzystniejszej sytuacji, gdyż mieszczą się one pod orzęsioną pelikulą pierwotniaka i chronione są dodatkowo warstwą jego cytoplazmy. Gruba celulozowa ściana komórkowa endosymbiontów stanowi kolejną barierę dla promieniowania ultrafioletowego.

DYSKUSJA

Uzyskane rezultaty wskazują, że promieniowanie UV wywiera wpływ na tempo podziałów *Paramecium bursaria*. W porównaniu z grupą kontrolną promieniowanie ultrafioletowe powodowało hamowanie procesów podziałowych. Hamujący efekt UV był wielokrotnie silniejszy, gdy orzęski po naświetleniu umieszczono w warunkach ciemniowych. W seriach doświadczalnych uzyskano zależnie od stosowanych dawek 10 do 30-krotne zwolnienie tempa podziałów. Tak więc działanie ciemności utrwala szkodliwy wpływ promieniowania UV na komórki orzęska. Orzęski, które po naświetleniu UV pozostawały w świetle wykazywały zwiększone tempo podziałów w porównaniu z tymi, które po naświetleniu ultrafioletem pozostawiano w ciemności. Szkodliwe działanie UV zaznaczyło się w pierwszej dobie po naświetleniu jako obniżenie tempa podziałów komórkowych, następnie wróciło do wartości kontrolnych, a nawet nieznacznie je przywyższyło. Efekt ten, znany

pod nazwą fotoreaktywacji, zdefiniował Jägger (1958), przy czym podkreślił, że światło potrzebne do naprawy uszkodzeń musi być o dłuższym zakresie spektralnym niż to, które je wywołało. Wyjątkiem jest *Platymonas*, u którego efekt immobilizacji po UV znoszono światłem o krótszej długości fali, co było związane z metabolizmem komórkowym (Halldal 1961).

Z otrzymanych wyników widać, że fotoreaktywacyjne działanie światła białego przekracza wartości kontrolne w pewnym okresie. Jeżeli efekt ten nie jest związany ze zmianami troficznymi w środowisku orzęsków, wówczas można sądzić, że światło białe ma stymulujący wpływ na podziały komórkowe po uprzednim działaniu ultrafioletu. Efekt światła niebieskiego jest dyskutowany w literaturze. Claus (1970) uważa, że światło niebiesko-zielone i fioletowe wywiera stymulujący wpływ na wzrost kultur glonów. Wilhelm (1985) twierdzi, że światło niebieskie wpływa na system tylakoidów u *Chlorella fusca* przypominający dokładnie efekt silnego światła białego. Kubin i współprac. (1983) zaobserwowali natomiast hamujący wpływ światła niebieskiego na wzrost kultury glonów w stosunku do grup naświetlanych światłem białym i zielonym.

Wyniki niniejszej pracy wskazują na znacznie wyższą oporność endosymbiotycznych *Chlorella* na promieniowanie UV niż samego orzęska. W doświadczeniach stwierdzono, że liczba glonów w komórce *Paramecium* nie zmieniła się po ekspozycji ultrafioletem. Brak efektu stymulacji bądź inhibicji podziałów endosymbiontów wynika z tego, że są one otoczone wieloma strukturami błonowymi (Karakashian 1968) i w związku z tym ilość pochłoniętego promieniowania jest wielokrotnie mniejsza. Podobnie u wirusów (Kleczkowski 1960) stwierdzono, że inaktywacja kwasów nukleinowych poprzez działanie promieniowania UV jest dużo trudniejsza niż inaktywacja wyizolowanych kwasów nukleinowych. Häder i współprac. (1985) zaobserwowali efekt fotowysielenia chloroplastów u *Euglena gracilis* pod wpływem UV. Efektu tego nie ma u *Paramecium bursaria*, gdyż endosymbionty, w odróżnieniu od chloroplastów *Euglena*, są odrębnymi organizmami.

Literatura

- Borgeson C. E., Browman B. J., 1985. Blue light-reducible cytochromes in membrane fractions from *Neurospora crassa*. *Plant Physiol.* 78, 433-437.
- Claus H., 1970. Effects of red and blue light on morphogenesis and metabolism of *Acetabularia mediterranea*. W: *Biology of Acetabularia*. (Brachet J. i' Bonntto S. red.). Academic Press, New York 177-194.
- Devison E. A., Stross R. G., 1986. A blue light reversible reaction in animal system (*Daphnia pulex*). *Experientia* 42, 620-622.
- Gajewski W., 1987. *Genetyka ogólna i molekularna*. (Jarosławska W. red.) PWN, Warszawa 258-261.
- Hader D. P., 1985. Effects of UV-B on motility and photobehavior in green flagellate, *Euglena gracilis*. *Arch. Microbiol.* 141, 159-161.
- Halldal P., 1961. Ultrafiolet action spectra of positive and negative phototaxis in *Platymonas subcordiformis*. *Physiol. Plant.* 14, 133-139.
- Jagger J., 1958. Photoreactivation. *Bact. Rev.* 25, 99-112.
- Karakashian S., Karakashian M. W., Rudzińska M. A., 1985. Electron observations on the symbiosis of *Paramecium bursaria* and its intracellular algae. *J. Protozool* 15/1, 113-128.
- Kleczkowski A., Bawien F. C., 1960. Photoreactivation in viruses and plants. *Virology* 10, 293-295.
- Kubin S., Borns E., Doucha J., Seiss U., 1983. Light absorption and production rate of *Chlorella vulgaris* in light of different spectral composition. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 178, 193-205.
- Novicka, Szilarda, 1949. Wpływ światła widzialnego na przeżywalność komórek *Escherichia coli* napromieniowanych UV. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 35, 591-593.
- Ohki Y., Musashi A., Tsubo Y., 1980. Absence of recovery in dark of chloroplast formation in UV-irradiated *Euglena*. *Experientia* 36, 407-408.
- Pado R., 1965. Mutual relation of protozoans and symbiotic algae in *Paramecium bursaria*. I. The influence of light on the growth of symbionts. *Folia Biol. Kraków* 13, 173-182.

- Reisser W., Meier R., Gortz H. D., Jeon K. W., 1985. Establishment, maintenance and integration mechanism of endosymbionts in Protozoa. J. Protozool. 32 (3), 383-390.
- Sasa T., 1961. Effect of ultraviolet light upon various physiological activities of Chlorella cells at different stages in their life cycle. Plant and Cell Physiol. 2, 253-270.
- Sonneborn T. N., 1950. Methods in the general biology and genetics of Paramecium aurelia. J. Expr. Zool. 113, 87-148.
- Steinmuller D., Tevini M., 1985, Action of ultraviolet radiation (UV-B) upon cuticular waxes in some crop plants. Planta. 164, 557-564.
- Wilhelm C., Kramer P., Wild A., 1985. Effect of different light qualities on the ultrastructure, thylacoid membrane composition and assimilation metabolisms of Chlorella fusca. Physiol. Plant. 64, 359-364.

EFFECT OF PHOTOREACTIVATION OF WHITE LIGHT
ON THE DYNAMICS OF FISSIONS PARAMECIUM BURSARIA

Summary

We have studied the effect of UV-irradiation on the survival of ciliates Paramecium bursaria. We have found that a lethal dose of UV light is equal to 131 W m^{-2} after 95 s of exposition. The lower fluence rates only decrease the motility of the ciliates. After being exposed to UV light, the ciliates were kept in the dark for 3 days, which caused that the rate of fission decreased to 9,5% of control, whereas the ciliates kept in the light did not show any differences in comparison with the control group.

Form these data, we assume that after UV-irradiation cell viability depends on a repair mechanism of the light - it's a typical effect of photoreactivation.

Рышард Падо, Магдалена Гречек

Фотореактивационное действие белого света
на динамику делений *Paramecium bursaria*

Резюме

Предметом исследования является влияние ультрафиолетовой радиации на выживаемость инфузорий *Paramecium bursaria*. Летальная доза излучения UV равняется 131 Wm^{-2} в течение 95 секунд экспозиции. Низшие дозы UV влияют на замедление движения инфузорий. Ультрафиолетовые лучи UV тормозят темпы деления клеток. Инфузории, хранимые после облучения UV в темноте в течение 3 дней, замедлили темп клеточного деления до 9,5 % контрольного темпа. Инфузории же, после экспозиции UV, подвергнутые действию натурального света, проявляли темпы деления клеток, близкие к контрольным. В этом случае влияние белого света после предшествующего облучения UV является типичным фотореактивационным действием, ликвидирующим вредный эффект облучения UV.