

Adaptacyjne
zdolności
symbiontów
na przykładzie
orzęska
Paramecium
bursaria

Tomasz Bator



Wydawnictwo
Naukowe
Akademii
Pedagogicznej
Kraków

Adaptacyjne
zdolności
symbiontów
na przykładzie
orzęska
Paramecium
bursaria

Akademia Pedagogiczna
im. Komisji Edukacji Narodowej
w Krakowie
Prace Monograficzne nr 413

Adaptacyjne
zdolności
symbiontów
na przykładzie
orzęska
Paramecium
bursaria

Tomasz Bator

Wydawnictwo
Naukowe
Akademii
Pedagogicznej
Kraków 2005

Recenzenci

prof. dr hab. Barbara Przewłocka

prof. dr hab. Leokadia Rakoczy

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe AP, Kraków 2005

projekt okładki Maciej Kwiatkowski

redaktor Jolanta Grzegorzek

ISSN 0239-6025

ISBN 83-7271-326-X

Redakcja/Dział Promocji
Wydawnictwo Naukowe AP
30-084 Kraków, ul. Podchorążych 2
tel./fax (12) 662-67-56
e-mail: wydawnictwo@ap.krakow.pl

łamanie komputerowe Helena Jasek,
druk i oprawa Wydawnictwo Naukowe AP, zam. 20/05

Składam serdeczne podziękowania Panu prof. dr. hab. Ryszardowi Pado za umożliwienie mi wszechstronnego zapoznania się z różnorodnymi aspektami zjawiska symbiozy oraz za cenne uwagi udzielone podczas przygotowywania niniejszej pracy

1. Adaptacja organizmów do zmieniających się warunków życia na tle zjawiska symbiozy

Wspólną cechą wszystkich organizmów zamieszkujących ziemską biosferę jest dążenie do utrzymania procesów życiowych oraz do zapewnienia ciągłości danego gatunku. Warunki życia każdego organizmu ulegają jednak nieustannym zmianom, zarówno w zakresie czynników abiotycznych (temperatury, ciśnienia, wilgotności, natężenia i spektrum promieniowania słonecznego, ukształtowania terenu, chemicznego składu podłoża), jak i biotycznych, wiążących się z obecnością w danym środowisku różnorodnych form życia. Pociąga to za sobą konieczność przystosowania się organizmu do zachodzących zmian.

Adaptacja organizmu polega na wykształcaniu cech, które w danych warunkach zwiększają szanse na przeżycie i wydanie potomstwa. Wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje adaptacji – fenotypową i genotypową. Adaptacja fenotypowa dotyczy cech nabytych w życiu osobniczym i nie jest dziedziczona. Umożliwia ją plastyczność genotypu osobnika, polegająca na uaktywnianiu określonych grup enzymów, pod wpływem bodźców środowiska. Przykładem może być występowanie liści o różnej grubości i powierzchni u roślin tego samego gatunku rosnących w różnych warunkach nasłonecznienia (Daubenmire 1973). Adaptacją fenotypową jest także wzmożenie produkcji erytrocytów u zwierząt bytujących w środowisku górskim, charakteryzującym się obniżoną zawartością tlenu (Ramirez i wsp. 1999). Do adaptacji fenotypowych zalicza się również powstawanie opalenizny skóry w reakcji na działanie promieniowania ultrafioletowego, okresowe przystosowanie oczu do zróżnicowanego natężenia światła oraz nabywanie odporności serologicznej na działanie mikroorganizmów chorobotwórczych.

Silne i długotrwałe oddziaływanie czynnika wywołującego reakcję adaptacyjną organizmu może prowadzić do zmian w puli genowej całej populacji. Zmiany te umożliwiają genetyczne utrwalenie cech wykształconych u poszczególnych osobników w procesie adaptacji. Zjawisko takie określa się jako adaptację genotypową. Wielu autorów uznaje ten rodzaj adaptacji za jeden z podstawowych czynników warunkujących proces ewolucji (Futuyma 1997; Malinowski 2002; Eldredge 2003).

Adaptacja różnych grup organizmów do zmieniających się warunków środowiska jest obecnie przedmiotem badań wielu autorów. Iuchi i Weiner (1996) wykazali, że względnie beztlenowe bakterie *Escherichia coli* mają zdolność przy-

stosowania się do warunków tlenowych poprzez aktywację enzymów typowych dla procesu oddychania tlenowego. Erdal i wsp. (2003) opisali zdolności adaptacyjne różnych gatunków bakterii do niskich temperatur. U bakterii należących do rodzajów *Lactobacillus* (Piuri i wsp. 2003; Derzelle i wsp. 2003) oraz *Vibrio* (McDougald i wsp. 2003) wykazano duże możliwości przystosowawcze do skrajnych warunków środowiskowych. Cases i wsp. (2003) dowiedli, że szybkie adaptowanie się do zmiennych warunków życia jest charakterystyczną cechą większości bakterii. Badania prowadzone przez Querol i wsp. (2003) pozwoliły stwierdzić, że winiarskie szczepy drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* cechuje zdolność do wzrostu w bardzo różnorodnych warunkach, co świadczy o wysoko rozwiniętych możliwościach adaptacyjnych tych organizmów. Przedmiotem licznych badań są zdolności przystosowawcze różnych gatunków roślin (Bohnert, Sheveleva 1998; Cain 1990), bezkręgowców (Zwaan, Putzer 1985; Reinikainen 1998; Davis i wsp. 2000; Mitrovski, Hoffmann 2001; Totskii i wsp. 2002; Hoffmann i wsp. 2003) i kręgowców (Grigorian, Tatevosian 1991; Bronikowski 2000; Larsson i wsp. 2002; Kamalaveni i wsp. 2003; Rasanen i wsp. 2003; Sukhotnik i wsp. 2003), w tym również człowieka (Bojko 1997; Ramirez i wsp. 1999; Majsak-Newman i wsp. 2003).

W światowej literaturze brak jednak – poza nielicznymi wyjątkami – bliższych danych na temat zdolności adaptacyjnych organizmów tworzących symbiotyczne układy. Pierwsze doniesienia na temat możliwości powiązania zjawisk symbiozy i adaptacji przedstawili Buddemeier i Fautin (1993), formułując hipotezę adaptatywnego wybielania (*ABH – adaptive bleaching hypothesis*), dotyczącą zmian zachodzących u koralowców żyjących w symbiozie z jednokomórkowymi glonami *Chlorella sp.* Hipoteza ta jest obecnie przedmiotem dyskusji i testów eksperymentalnych (Kinzie i wsp. 2001; Hoegh-Guldberg i wsp. 2001). Wśród nowszych pozycji jedynie w pracy Provorova (2001) zjawisko symbiozy jest traktowane jako wyraz zdolności adaptacyjnych organizmu do zmieniających się warunków środowiska.

Symbioza jest zjawiskiem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. Termin ten, wprowadzony po raz pierwszy w 1879 roku przez niemieckiego botanika Antona Heinricha de Bary'ego, oznacza współżycie dwóch lub większej liczby organizmów przynoszące korzyści wszystkim partnerom. Układy symbiotyczne charakteryzują się dużą różnorodnością, zarówno pod względem trwałości, jak i wzajemnych relacji między symbiontami. Zależnie od zdolności przeżywania partnerów poza układem symbiotycznym symbiozę określa się jako obligatoryjną lub fakultatywną (Pado, Bator 2001). Wzajemne stosunki symbiontów pozwalają wyróżnić endosymbiozę – gdy jeden lub większa ilość organizmów żyje wewnątrz innego, zwanego gospodarzem, oraz egzosymbiozę – gdy między partnerami symbiotycznymi nie występuje takie połączenie (Trench 1979).

Symbioza występuje na różnych poziomach organizacji życia, zarówno u organizmów jedno- jak i wielokomórkowych. Typowym przykładem symbiozy jest współżycie między krabem pustelnikiem (*Eupagurus bernhardus*) i ukwiałem morskim (*Hydractinia echinata*). Ukwiął przytwierdzając się do skorupy kraba zapewnia mu ochronę bierną – poprzez maskowanie jego obecności, jak i czynną – używając w razie potrzeby parzących czułków. Sam natomiast żywi się resztkami pokarmu pozostawionymi przez skorupiaka. Innym rodzajem symbiozy jest związek roślin motylkowych (*Papilionaceae*) i bakterii z rodzaju *Rhizobium*, które wykazują zdolność wiązania azotu atmosferycznego. W układzie tym bakterie zaopatrują roślinę w związki azotu i witaminę B₁₂, pobierając jednocześnie węglowodany, sole mineralne i substancje wzrostowe. Często przytaczanym przykładem symbiozy są również porosty – symbiotyczne kompleksy, w skład których wchodzi autotroficzne komórki glonów oraz heterotroficzne grzyby. Niejednokrotnie symbioza jest układem złożonym, wielostopniowym. Taka sytuacja ma miejsce w przypadku australijskiego gatunku termita *Mastotermes darwinensis*, w którego jelitach żyje jako symbiont pierwotniak *Mixotricha paradoxa*, tworzący jednocześnie symbiotyczny układ z kilkoma różnymi gatunkami bakterii (Margulis 1971; Pado, Bator 2001).

Na początku XX wieku w pracach Mereschkovsky'ego (1910) i Wallina (1927) po raz pierwszy pojawił się pogląd, że symbioza może odgrywać pewną rolę w procesie ewolucji. Stwierdzona już wówczas względna autonomiczność materiału genetycznego zgromadzonego w niektórych organellach komórkowych pozwoliła na sformułowanie przez Mereschkovsky'ego teorii symbiogenezy, według której powstawanie nowych organelli, narządów, a także organizmów może odbywać się na drodze tworzenia trwałych związków symbiotycznych. Początkowo pogląd ten był odrzucany przez większość naukowców, głównie ze względu na niezgodność z powszechnie panującym przekonaniem, że proces ewolucji polega na rozchodzeniu się linii rozwojowych, a nie na ich łączeniu (Margulis 2000). Dopiero w 1970 roku Margulis (1970) przedstawiła rozszerzoną wersję teorii Mereschkovsky'ego, znaną obecnie jako teoria seryjnej endosymbiozy (*SET – serial endosymbiosis theory*). Według tej teorii wszystkie komórki eukariotyczne powstały w wyniku tworzenia się związków endosymbiotycznych między komórkami prokariotycznymi. Proces ten następował na drodze pochląniania jednej komórki przez inną, odżywiająca się heterotroficznie. Jeśli komórka, która została pochłonięta, była w stanie obronić się przed strawieniem, a jej metabolizm przynosił korzyść komórce heterotroficznej, mogło wówczas dochodzić do wytworzenia typowego układu endosymbiotycznego. Symbiont stopniowo uzależniał się od komórki gospodarza i ostatecznie przekształcał się w typowe organellum. Późniejsze badania przyniosły szereg dowodów potwierdzających ten pogląd. Schnepf i Brown (1971) wykazali, że mitochondria mogą pochodzić od tlenowych bakterii, które zostały wchłonięte przez komórki beztlenowe, a następnie przystosowały się do życia w śród-

wisku wewnątrzkomórkowym, umożliwiając jednocześnie komórce gospodarza przeprowadzanie metabolizmu tlenowego. Potwierdzeniem tego faktu mogą być daleko idące podobieństwa w fizjologii niektórych bakterii (na przykład *Paracoccus denitrificans*) i mitochondriów obecnych w komórkach eukariotycznych (Scholes, Smith 1968; Wee, Wilkinson 1988). Wyniki najnowszych badań dotyczących pochodzenia mitochondriów także pozostają w zgodzie z teorią seryjnej endosymbiozy (Martin i wsp. 2001; Litoshenko 2002). Wykazanie szeregu podobieństw pomiędzy fotosyntetyzującymi organizmami prokariotycznymi i chloroplastami komórek eukariotycznych pozwoliło dowieść, że plastydy również pochodzą od prokariotycznych endosymbiontów (Schnepf, Brown 1971; Andersson, Roger 2002; Hashimoto 2003; Raven, Allen 2003). Obecnie teoria seryjnej endosymbiozy jest uznawana przez zdecydowaną większość autorów i stanowi punkt wyjścia dla licznych badań (Moreira, Lopez-Garcia 1998; Vellai i wsp. 1998; Martin i wsp. 2003; Hoffmeister, Martin 2003).

Wśród wielu opisanych dotąd układów symbiotycznych interesujący przykład stanowią niewątpliwie związki pomiędzy autotrofami i heterotrofami, w których jeden z partnerów (fotoautotrof) dostarcza drugiemu substancje organiczne. Sam z kolei pobiera substraty niezbędne do przebiegu procesu fotosyntezy (wodę, dwutlenek węgla), a także bardzo często inne substancje o charakterze regulatorów wzrostu. W wyniku nawiązania symbiozy między autotrofem i heterotrofem powstaje zupełnie nowy układ o odmiennych właściwościach, które mogą stanowić sumę względnie wypadkową cech prezentowanych przez partnerów symbiozy. W wielu przypadkach kompleksy takie dysponują odpowiednimi mechanizmami zapewniającymi kontynuację lub odnowienie układu symbiotycznego w kolejnych pokoleniach (Trench 1979).

Typowym przykładem symbiotycznego związku organizmu autotroficznego z heterotroficznym jest stłubia *Hydra viridis* – gatunek, u którego w komórkach endodermi występują liczne symbiotyczne glony z rodzaju *Chlorella*, powodujące intensywnie zielone zabarwienie ciała jamochłona. Kontynuacja związku symbiotycznego w kolejnych pokoleniach *Hydra viridis* zapewniona jest poprzez wnikiwanie endosymbiotycznych glonów do tworzącej się podczas generatywnego rozmnażania stłubki komórki jajowej. Ponadto może również dochodzić do pobierania przez stłubię wolno żyjących komórek *Chlorella sp.* (Rahat 1985; Rahat, Reich 1985, 1986).

Innym przykładem wysoce wyspecjalizowanego związku pomiędzy autotrofem i heterotrofem może być małż tropikalny *Tridacna gigas*, u którego również występują komórki *Chlorella sp.*, obecne w wystających na zewnątrz skorupy brzegach płaszczka. Wynika stąd typowe dla tego gatunku małża ułożenie muszli, umożliwiające jak najlepszy dostęp światła do komórek symbiotycznych glonów. Dodatkowo w płaszczu znajdują się specyficzne zespoły komórek tworzące organy hialinowe, które umożliwiają dopływ światła do głębiej położonych warstw endosymbiontów (Thurman 1993).

Układy endosymbiotyczne z komórkami *Chlorella sp.* tworzy również wiele gatunków pierwotniaków (np. *Stentor polymorphus*, *Euplotes daidaleos*, *Paramecium bursaria*). Organizmy te stanowią znakomite obiekty badawcze ze względu na możliwość analizowania relacji między partnerami symbiozy na poziomie pojedynczej komórki. Ponadto, uwzględniając teorię seryjnej endosymbiozy, można przypuszczać, że związki symbiotyczne pierwotniaków z glonami w pewnym stopniu przypominają pośrednie stadium ewolucyjne, które w przeszłości mogło doprowadzić do powstania komórek eukariotycznych (Cavalier-Smith, Lee 1985).

2. Charakterystyka związku symbiotycznego *Paramecium bursaria*

Podział systematyczny pierwotniaków ulegał wielokrotnie zmianom ze względu na uzyskiwanie nowych danych dotyczących budowy, fizjologii i genetyki tych organizmów (Patterson 2000). Pierwszą próbę sklasyfikowania pierwotniaków przedstawił jeszcze w XIX wieku Butschli (1882) łącząc je we wspólną jednostkę taksonomiczną w randze typu – *Protozoa*. Podobną, choć nieco bardziej rozbudowaną systematykę zaproponowali Honigberg i wsp. (1964). W późniejszych opracowaniach jednostka taksonomiczna *Protozoa* traktowana jest jako królestwo (Cavalier-Smith 1998). Coraz częściej jednak pojawia się w literaturze termin *Protista* oznaczający królestwo, do którego włącza się w randze typów wszystkie grupy eukariotycznych organizmów jednokomórkowych (Rotschild 1989; Adoutte i wsp. 1996; Andersen 1998; Corliss 1998; Margulis 2000). Zgodnie z najnowszymi doniesieniami (Lynn, Small 2000) stanowisko systematyczne pierwotniaka *Paramecium bursaria* należy przedstawić następująco:

Królestwo:	<i>Protista</i> – Whittaker 1969
Typ:	<i>Ciliophora</i> – Doflein 1901
Podtyp:	<i>Intramacronucleata</i> – Lynn 1996
Gromada:	<i>Oligohymenophora</i> – de Puytorac et.al. 1974
Podgromada:	<i>Peniculia</i> – Fauré-Fremiet 1956
Rząd:	<i>Peniculida</i> – Fauré-Fremiet 1956
Podrząd:	<i>Parameciina</i> – Jankowski 1985
Rodzina:	<i>Parameciidae</i> – Dujardin 1840
Rodzaj:	<i>Paramecium</i> – O. F. Müller 1773
Gatunek:	<i>Paramecium bursaria</i> – Ehrenberg 1838

Pierwotniak *Paramecium bursaria* jest organizmem kosmopolitycznym zajmującym każde środowisko, w którym możliwy jest jego rozwój (Pado 1978). Podstawowym warunkiem występowania tego pierwotniaka jest odpowiednia ilość wody oraz obecność bakterii lub małych wiciowców, stanowiących dla *Paramecium bursaria* podstawowy pokarm (Pado 1978). Naturalne środowisko życia omawianego orzęska jest zwykle opisywane w literaturze jako wody słodkie o stosunkowo wysokim stopniu czystości, stojące lub wolno płynące, takie jak stawy, potoki oraz inne stałe lub okresowe zbiorniki wodne (Pado 1978; Kosaka 1991, 1994). *Paramecium bursaria* jest gatunkiem stosunkowo rzadkim (Pado 1978). Podczas badań prowadzonych przez Pado i Batora (2001) obecność tego gatunku autorzy stwierdzili tylko w ośmiu stanowiskach spośród kilkudziesięciu.

sięciu przebadanych na terenie Polski. Fakt ten można wiązać z dość specyficznymi wymaganiami troficznymi *Paramecium bursaria*, a zwłaszcza z jego dużą wrażliwością na pH środowiska. Jak wynika z badań Loefera (1937) pierwotniak ten może przeżyć w dość szerokim zakresie pH (4,5–8,5), jednak możliwość normalnej egzystencji, wzrostu i rozmnażania wykazuje w bardzo wąskim przedziale kwasowości z optimum przy wartości pH = 6,5. Począwszy od tej wartości, zarówno w jedną jak i w drugą stronę skali pH intensywność podziałów *Paramecium bursaria* maleje (Pado 1978), a w skrajnych wartościach, zwłaszcza przy zakwaszeniu środowiska (pH = 4,6) występują znaczne deformacje morfologiczne komórki (Bragg 1936; Loefer 1937; Wichterman 1953). Według Pado (1978) tak duży wpływ pH na organizm może świadczyć o ograniczonych możliwościach adaptacyjnych *Paramecium bursaria* do zmieniających się warunków środowiska.

Komórka *Paramecium bursaria* charakteryzuje się owalnym, asymetrycznym i nieco wydłużonym kształtem. Jest krótsza i bardziej spłaszczona niż u innych przedstawicieli rodzaju *Paramecium* (*P. caudatum*, *P. aurelia*). Przeciętna długość komórki *Paramecium bursaria* wynosi: 85–150 μm . Zarówno kształt jak i wymiary komórki mogą ulegać niewielkim zmianom w zależności od kwasowości środowiska (Bragg 1936; Loefer 1937; Wichterman 1953), temperatury (Iwatsuki i wsp. 1998), natężenia światła (Pado 1965, 1972, 1978), wieku komórki (Kosaka 1991, 1994), a także obecności zanieczyszczeń w środowisku (Pado, Bator 2001). Charakterystyczną cechą, która umożliwia jednoznaczną identyfikację *Paramecium bursaria*, jest wyraźnie widoczne zielone zabarwienie komórki, wywołane obecnością w cytoplazmie symbiotycznych glonów z rodzaju *Chlorella* (fot. 1).

Powierzchnia komórki *Paramecium bursaria* jest równomiernie orzęsiona. Rzęski, których liczba sięga kilku tysięcy, ułożone są w równoległych rzędach zwanych kinetami i poruszają się w sposób zsynchronizowany, co umożliwia komórce pierwotniaka wykonywanie różnego rodzaju ruchów: prostoliniowego do przodu i do tyłu, oraz koziółkowania. Daje to komórce możliwość stosunkowo szybkiego reagowania na różnorodne bodźce. Na powierzchni komórki znajduje się cytostom – stały otwór gębowy, zlokalizowany na dnie charakterystycznego zagłębienia – peristomu. W bezpośrednim sąsiedztwie cytostomu występuje wyspecjalizowane adoralne orzęsienie w postaci kwadrulusa i dwóch penikulusów. Są to pseudomembranelle powstające z dużej ilości sąsiadujących ze sobą rzęsek, które ulegają zespoleniu. Działanie pseudomembranelli polegające na napędzaniu pokarmu do cytostomu jest znacznie silniejsze niż w przypadku pojedynczych rzęsek. W błonie komórkowej pierwotniaka występuje również cytopyge – otwór, przez który usuwane są niestrawione resztki pokarmu.

Zewnętrzna powierzchnia błony cytoplazmatycznej, otaczającej komórkę *Paramecium bursaria* charakteryzuje się obecnością niewielkich zgrubień tworzących swoistą rzeźbę. Zapewnia ona sztywność błony komórkowej i jej odporność na uszkodzenia (Lynn, Small 2000).

Okrywająca komórkę *Paramecium bursaria* błona cytoplazmatyczna wraz z zalegającymi pod nią strukturami tworzy pellikulę. Składa się ona z podwójnej błony zewnętrznej, podwójnej błony wewnętrznej i przestrzeni międzybłonowej. W strefie subpellikularnej znajdują się ciała bazalne rzęsek – kinetosomy oraz specyficzny system neurofibryli, który łączy szeregi kinetosomów i umożliwia synchronizację ruchu rzęsek. System ten jest odpowiednikiem układu nerwowego u zwierząt tkankowych. Bezpośrednio pod błoną komórkową zlokalizowana jest warstwa alveoli – spłaszczonych pęcherzyków ograniczonych błoną, których obecność zapewnia wzmocnienie i usztywnienie pelli-kuli (Lynn, Small 2000).

Cytoplazma komórki *Paramecium bursaria* jest zróżnicowana pod względem morfologicznym i funkcjonalnym na ektoplazmę (warstwę zewnętrzną) i endoplazmę (warstwę wewnętrzną). W ektoplazmie obecne są liczne mitochondria, a także organella obronne – trichocysty. Struktury te pod wpływem bodźców mechanicznych i chemicznych wystrzelują włókienka, które służą do chwytania i przytrzymywania ofiary (Schuster i wsp. 1967). Dla przestrzeni ektoplazmatycznej typowe jest również występowanie aparatu osmoregulacyjno-wydalniczego w postaci wodniczek tętniących, w których gromadzi się woda wraz z produktami przemiany materii. Dzięki rytmicznym skurczom wodniczek substancje te usuwane są na zewnątrz komórki. Endoplazma zajmuje środkową część komórki orzęska. W tej części rozmieszczone są typowe dla orzęsków organella komórkowe: mitochondria, wodniczki pokarmowe, retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego, aparat jądrowy. Tutaj odbywają się zasadnicze procesy biochemiczne warunkujące prawidłowe funkcjonowanie komórki pierwotniaka.

Występujący na powierzchni komórki cytostom prowadzi w głąb cytoplazmy do gardzieli (cytofaryngs), gdzie formują się wodniczki pokarmowe, w których na drodze fagocytozy zamykane są cząstki pokarmu. Z wodniczkami pokarmowymi łączą się lizosomy zawierające enzymy trawienne. Dochodzi wówczas do trawienia, a następnie wchłaniania pokarmu. Niestrawione resztki pokarmu są usuwane poza komórkę przez cytopyge.

W endoplazmie orzęska *Paramecium bursaria* występuje aparat jądrowy zróżnicowany na dwa jądra: makronukleus i mikronukleus. Makronukleus jest poliploidalnym jądrem wegetatywnym, które kieruje metabolizmem komórki i jej wzrostem, natomiast mikronukleus – diploidalne jądro generatywne – stanowi archiwum informacji genetycznej i jest czynne tylko podczas procesu płciowego. *Paramecium bursaria* rozmnaża się głównie przez poprzeczny podział komórki. Początkowo powstają dwa połączone ze sobą osobniki: proter (przedni) i opist (tylny), które następnie rozłączają się tworząc dwie komórki potomne. Podział komórkowy poprzedzony jest mitotycznym podziałem mikronukleusa. Makronukleus natomiast przechodzi podział amitotyczny. U *Paramecium bursaria* występuje również koniugacja – proces płciowy pole-

gający na czasowym połączeniu się dwóch osobników, podczas którego dochodzi do wymiany materiału genetycznego znajdującego się w mikronukleusie (Sonneborn 1957; Hiwatashi 1981; Kosaka 1991, 1994).

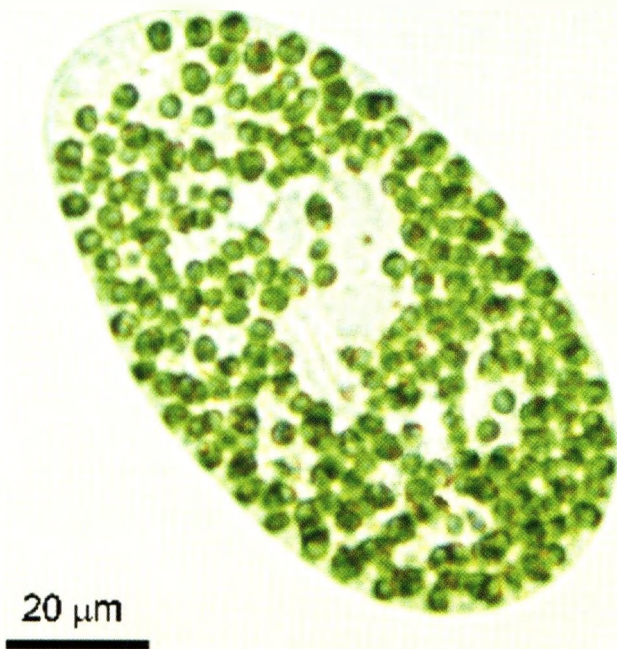
Zasadniczą cechą wyróżniającą gatunek *Paramecium bursaria* w obrębie całego rodzaju *Paramecium* jest obecność w cytoplazmie symbiotycznych glonów z rodzaju *Chlorella*. Endosymbionty występują w komórce pierwotniaka przez cały okres jej życia, a podczas podziału przechodzą do komórek potomnych, co zapewnia ciągłość związku symbiotycznego. Glony zlokalizowane są głównie w peryferycznej części cytoplazmy, jednak przy dużej ich liczebności mogą znajdować się również w endoplazmie wykazując zdolność przemieszczania się wraz z ruchami cytoplazmy (Karakashian i wsp. 1968; Nishihara i wsp. 1999). Komórki *Chlorella sp.* są okrągłe lub owalne o średnicy 4–9 μm i posiadają wewnątrz kubkowaty chloroplast zawierający barwniki fotosyntetyczne o składzie podobnym do występującego u roślin wyższych (Pado 1967, 1978). Obserwacje prowadzone z użyciem mikroskopu elektronowego (Karakashian i wsp. 1968; Meier i wsp. 1984; Reisser i wsp. 1985) wykazały, że każda komórka *Chlorella sp.* zamknięta jest w osobnej wodniczce perialgalnej. Wodniczki te różnią się w zasadniczy sposób od typowych wodniczek pokarmowych (Meier i wsp. 1980), ponieważ w normalnych warunkach sprzyjających rozwojowi *Paramecium bursaria* nie dochodzi do łączenia wodniczek perialgalnych z lizosomami, co zabezpiecza komórki *Chlorella sp.* przed strawieniem (Trench 1979, 1992; Karakashian, Rudzińska 1981).

Metabolizm pierwotniaka *Paramecium bursaria* jest w dużym stopniu zdefiniowany jego symbiotycznym charakterem (ryc. 1). Obecność fotoautotroficznych endosymbiontów w cytoplazmie orzęska zapewnia mu możliwość endogennego pobierania substancji pokarmowych (Karakashian, Karakashian 1973). Odżywianie heterotroficzne nie jest zatem dla *Paramecium bursaria* jedynym sposobem uzyskiwania energii. Komórki *Chlorella sp.* przeprowadzając fotosyntezę wytwarzają tlen oraz węglowodany – glukozę i maltozę. Wykazali to między innymi Muscatine i wsp. (1967), którzy zaobserwowali, że symbiotyczne glony wyizolowane z komórki *Paramecium bursaria* i hodowane w obecności pierwotniaka wydzielają do medium duże ilości glukozy i maltozy, stanowiące nawet do 86% ich całkowitej produkcji fotosyntetycznej. Wydzielanie przez *Chlorella sp.* produktów fotosyntezy do cytoplazmy komórki *Paramecium bursaria* zostało potwierdzone w późniejszych badaniach (Weis 1979; Ziesenisz i wsp. 1981; Reisser 1986; Iwatsuki i wsp. 1998; Pado, Pawłowska-Ćwięk 1998). Produkty te wykorzystywane są przez komórkę pierwotniaka w procesie oddychania (Brown, Nielsen 1974), podczas którego powstaje woda i dwutlenek węgla, stanowiące z kolei substraty dla prowadzonego przez glony procesu fotosyntezy (Reisser 1976, Reisser 1986). Ponadto komórka orzęska zaopatruje endosymbionty w azot, udostępniając go w postaci soli amonowych (Reisser 1976).

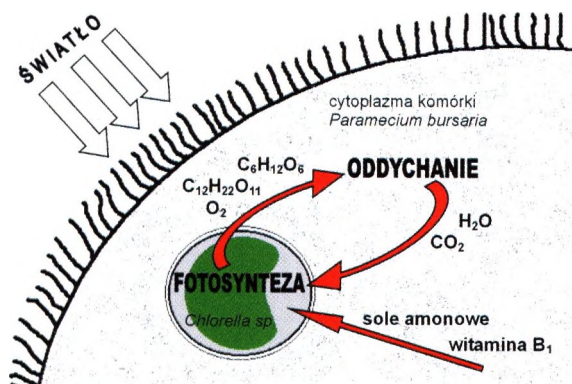
Pado (1967) wykazał, że pomiędzy partnerami symbiozy istnieją zależności związane z substancjami o charakterze regulatorów wzrostu. Wydzielana przez komórkę *Paramecium bursaria* witamina B₁ (tiamina) umożliwia zachodzenie podziałów komórkowych *Chlorella sp.* Pozbawienie endosymbiontów regulatora wzrostu poprzez wyizolowanie ich poza obręb komórki orzęska uniemożliwia im rozwój. Wynika z tego, że endosymbionty *Chlorella sp.* posiadają defekt metaboliczny, gdyż utraciły zdolność syntetyzowania witaminy B₁ (względnie tiazolowej części tego związku), która jest niezbędna dla ich prawidłowego rozwoju. Jest to prawdopodobnie efekt daleko idącego przystosowania glonów do środowiska życia, jakim jest cytoplazma komórki pierwotniaka. Fakt ten może stanowić potwierdzenie teorii dotyczących symbiotycznego pochodzenia chloroplastów (por. rozdz. 1), ponieważ rola endosymbiontów *Chlorella sp.* w komórce *Paramecium bursaria* jest porównywalna z fizjologiczną rolą chloroplastów w komórkach roślinnych (Pado 1978). Występowanie defektu metabolicznego u symbiotycznych glonów może być interpretowane jako początkowa faza uzależniania się od komórki gospodarza. Wiąże się to ze stopniową specjalizacją symbiontów i utratą tych cech, które są nieistotne dla funkcjonowania całego kompleksu symbiotycznego.

Przez szereg lat trudne do wytłumaczenia zagadnienie stanowiły zmiany liczebności endosymbiotycznych glonów *Chlorella sp.* w komórce *Paramecium bursaria*. Pringsheim (1928) uznawał, że liczba glonów przypadających na jedną komórkę orzęska wynosi przeciętnie około 500. Wichterman (1953) i Siegel (1960) stwierdzili występowanie znacznych różnic w ilości endosymbiontów w komórkach *Paramecium bursaria*, wiązali to jednak z różnicami rasowymi w obrębie gatunku. Dopiero badania prowadzone przez Pado (1965, 1978) wykazały, że niezależnie od różnic rasowych, podstawowym czynnikiem powodującym zmiany ilości symbiotycznych glonów *Chlorella sp.* w komórce orzęska *Paramecium bursaria* są warunki oświetlenia (fot. 2).

W hodowlach prowadzonych na świetle większa liczba fotosyntetyzujących komórek *Chlorella sp.* dostarcza odpowiednio większej ilości produktów fotosyntezy, przy takim samym lub niewiele większym wykorzystaniu produktów pochodzących od gospodarza, co jest bardzo korzystne dla pierwotniaka, dlatego też następuje intensywny wzrost populacji endosymbiontów. Ich liczba w jednej komórce *Paramecium bursaria* może wówczas przekraczać 1000 (Pado 1965). Orzęsek staje się wtedy intensywnie zielony (fot. 2a). W takich warunkach odżywianie heterotroficzne odgrywa u *Paramecium bursaria* mniejszą rolę niż u innych gatunków pierwotniaków, które nie wchodzą w związki symbiotyczne z organizmami autotroficznymi (Karakashian 1975). Znajduje to odzwierciedlenie w zachowaniu orzęsków, które w warunkach dobrego oświetlenia charakteryzują się bardzo małą ruchliwością i tendencją do osiadania na dnie naczyń hodowlanych, co wynika z braku konieczności ciągłego poszukiwania pożywienia. Obecność dużej ilości endosymbiotycz-

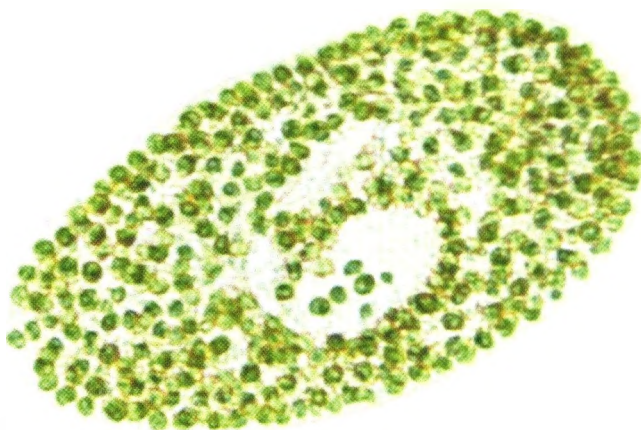


Fot. 1. Komórka *Paramecium bursaria* z widocznymi endosymbiontami *Chlorella* sp. (pow. 500 \times fot. autor)



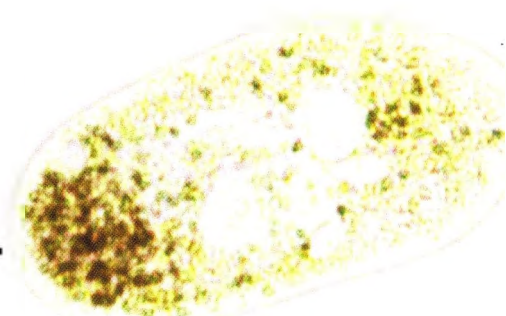
Ryc. 1. Schemat relacji troficznych w układzie symbiotycznym *Paramecium bursaria* – *Chlorella* sp.

a)



20 μm

b)



20 μm

Fot. 2. Komórka *Paramecium bursaria* hodowana w zróżnicowanych warunkach oświetlenia: a) oświetlenie ciągle, b) warunki ciemniowe (pow. 500 \times fot. autor)

nych glonów wiąże się także z wykazywaniem przez *Paramecium bursaria* zjawiska fototaksji (Pado 1972, 1978; Matsuoka, Nakaoka 1988; Nakaoka 1989; Johnson i wsp. 1989; Tokushima i wsp. 1994; Khromechek i wsp. 2002).

Szereg obserwacji wskazuje, że nawet w warunkach ciągłego oświetlenia, dla prawidłowego funkcjonowania komórki pierwotniaka odżywianie heterotroficzne jest niezbędne (Pringsheim 1928; Siegel, Karakashian 1959; Karakashian 1963; Pado 1965, 1978; Barna, Weis 1973; Pado, Bator 2001). Przy ograniczonym dostępie pokarmu bakteryjnego orzęski mogą wprawdzie przeżyć (dzięki wykorzystywaniu produkcji fotosyntetycznej glonów), dochodzi jednak do zahamowania podziałów komórkowych. Prawdopodobnie wynika to z faktu, że częste podziały komórkowe powodowałyby w takiej sytuacji zmniejszanie ilości endosymbiontów, co przy ograniczeniu możliwości odżywiania heterotroficznego byłoby dla komórki orzęska niekorzystne.

W warunkach ciemniowych proces fotosyntezy jest zahamowany. W takiej sytuacji jedynym możliwym sposobem uzyskiwania przez *Paramecium bursaria* energii staje się odżywianie heterotroficzne (Pado 1965). Dowodzi tego fakt, że orzęski hodowane w ciemności wykazują bardzo dużą aktywność ruchową, związaną z ciągłym poszukiwaniem pożywienia (Pado 1978). Jednocześnie związki organiczne uzyskane przez komórkę pierwotniaka na drodze odżywiania heterotroficznego są w takich warunkach wykorzystywane w dużym stopniu przez endosymbiotyczne glony (Pado 1969; Karakashian 1975), które stają się dla orzęska troficznym obciążeniem. Dochodzi wówczas do redukcji liczby endosymbiontów. W komórkach *Paramecium bursaria* hodowanych w ciemności stwierdza się spadek ilości symbiotycznych glonów poniżej 100 (Pado 1965), co jest widoczne jako wyraźne wybielenie komórki pierwotniaka przy jednoczesnym zmniejszeniu jej rozmiarów (fot. 2b). W warunkach naturalnych redukcja liczby symbiotycznych komórek *Chlorella sp.* nie prowadzi jednak nigdy do całkowitej ich utraty. Obserwacje mikroskopowe wskazują, że pierwotniaki hodowane przez dłuższy czas w ciemności nie są zupełnie pozbawione glonów, chociaż ich endosymbionty wykazują objawy uwstecznienia (wyraźnie zmniejszone rozmiary komórek, nieregularny kształt). Pozostawianie niewielkiej ilości glonów w komórce orzęska zapewnia możliwość odnowienia ich populacji. Stwierdzono, że przeniesienie pierwotniaków z ciemności do warunków dobrego oświetlenia powoduje intensywny przyrost ilości endosymbiontów (Pado 1965, 1978).

Regulacja ilości endosymbiotycznych glonów *Chlorella sp.* w komórce orzęska *Paramecium bursaria* zachodzi różnymi sposobami (Pado 1965; Weis 1969). Stwierdzono, że pierwotniak może pobierać ze środowiska wolno żyjące komórki *Chlorella sp.* i zamykać je w wodniczках perialgalnych zwiększając w ten sposób liczebność populacji endosymbiontów (Bomford 1965; Karakashian 1975; Reisser i wsp. 1982; Meier, Wiessner 1989; Trench 1992). Redukowanie ilości glonów może z kolei zachodzić poprzez ich tra-

wienie (Pado 1965; Karakashian, Karakashian 1973; Trench 1979, 1992; Kuźnicki 1985). W takiej sytuacji dochodzi do przyłączania lizosomów do wodniczek perialgalnych, które stają się wówczas typowymi wodniczkami pokarmowymi. Mechanizm przełamania blokady uniemożliwiającej w normalnych warunkach łączenie się lizosomów z wodniczkami perialgalnymi nie został jak dotąd w pełni wyjaśniony. Innym sposobem regulowania liczebności endosymbiontów jest odpowiednie zsynchronizowanie podziałów komórkowych pierwotniaka i glonów (Pado 1965; Weis 1977), związane prawdopodobnie z wydzielaniem przez *Paramecium bursaria* witaminy B₁ jako regulatora wzrostu (Pado 1969). Zwiększenie tempa podziałów komórek *Chlorella sp.* w stosunku do intensywności podziałów komórkowych pierwotniaka powoduje wzrost liczby endosymbiontów obecnych w jednej komórce orzęska. Natomiast w sytuacji odwrotnej – kiedy komórka pierwotniaka dzieli się szybciej niż komórki glonów – dochodzi do zredukowania ilości endosymbiontów.

Kompleks jaki tworzy komórka *Paramecium bursaria* wraz z endosymbiotycznymi glonami *Chlorella sp.* ze względu na złożoność relacji pomiędzy partnerami symbiozy jest doskonałym obiektem badawczym prezentującym przebieg wielu istotnych procesów fizjologicznych, genetycznych i populacyjnych. Układ ten jest modelowym przykładem endosymbiozy obligatoryjnej (Pado 1978; Pado, Bator 2001), charakteryzującym się dużą trwałością. Jedynie zastosowanie odpowiednich metod laboratoryjnych pozwala na rozdzielenie symbiontów i ich niezależne hodowanie (Siegel 1960; Karakashian, Karakashian 1965; Pado 1965; Meier, Wiessner 1989; Gerashchenko i wsp. 2000, 2001; Tanaka i wsp. 2002). Na podstawie dotychczasowych badań i obserwacji nie stwierdzono dominacji któregokolwiek z partnerów symbiozy. Jedynie okresowo może zaznaczać się nadrzędna rola jednego z symbiontów, co uwarunkowane jest oddziaływaniem środowiska (Pado 1978).

3. Eksperymentalne warunki określania zdolności adaptacyjnych *Paramecium bursaria*

Podczas badań prowadzonych w latach 1998–2001 w Zakładzie Mikrobiologii Akademii Pedagogicznej w Krakowie, dotyczących adaptowania dzikich szczepów *Paramecium bursaria* do warunków laboratoryjnych, stwierdzono naturalną obecność tego pierwotniaka w nietypowych, wręcz ekstremalnych warunkach środowiska. Zaskakujące było między innymi odnalezienie przedstawicieli tego gatunku w odpływach ścieków z garbarni w Kurowie (okolice Lublina) oraz w silnie zsiarczonych wodach z okolic uzdrowiska w Swoszowicach (Kraków) (Pado, Bator 2001). Pozostaje to w niejkiej sprzeczności z aktualnym stanem wiedzy na temat ekologii orzęska *Paramecium bursaria* (por. rozdz. 2). Organizm ten jest bowiem uznawany za gatunek stosunkowo rzadki (Loefer 1937; Pado 1978), a jego naturalne środowisko życia jest zwykle opisywane jako wody o wysokim stopniu czystości (Pado 1978; Kosaka 1991, 1994). Jak dotąd brak w literaturze światowej doniesień na temat występowania tego pierwotniaka w wodach zanieczyszczonych.

Stwierdzenie obecności *Paramecium bursaria* w zaskakująco nietypowych warunkach może wskazywać na niebywale wręcz możliwości przystosowawcze tego kompleksu symbiotycznego do opanowywania ekstremalnych środowisk. Interesującym jest też fakt, że podczas badań prowadzonych przez autora, w wodach z okolic uzdrowiska w Swoszowicach udało się stwierdzić również obecność innego wyjątkowo rzadkiego gatunku symbiotycznego pierwotniaka – *Euplotes daidaleos*. Dane te pozwoliły na wysunięcie hipotezy o wysoko rozwiniętych zdolnościach adaptacyjnych kompleksów symbiotycznych tworzonych przez organizmy autotroficzne i heterotroficzne. Jest to obecnie problem stosunkowo mało poznany, ponieważ, jak już wspomniano, w światowej literaturze dane na ten temat są nieliczne (por. rozdz. 1).

Udowodnienie tak sformułowanej hipotezy na przykładzie orzęska *Paramecium bursaria* wymagało dokładnego zbadania możliwości adaptacyjnych tego organizmu oraz roli jaką w procesie przystosowania odgrywają autotroficzne endosymbionty. W tym celu podjęto próbę określenia wpływu różnorodnych czynników biologicznych i chemicznych na rozwój i fizjologię omawianego kompleksu symbiotycznego.

W związku z przypuszczeniem, iż bakterie występujące w naturalnym środowisku życia *Paramecium bursaria* należą do grupy denitryfikatorów (Pado, Bator 2001) w pierwszej kolejności przebadano możliwość rozwoju tego orzęska w obecności bankowych szczepów bakterii denitryfikacyjnych.

Stwierdzenie obecności *Paramecium bursaria* w wodzie z okolic Swoszowic, w której zawartość siarkowodoru wynosi 72,25 mg/dm³, a zawartość jonów siarczanowych (VI) – 1275,2 mg/dm³ (Urząd Miasta Krakowa 1997), pozwala przypuszczać, iż organizm ten łatwo adaptuje się do środowiska bogatego w związki siarki oraz w drobnoustroje biorące udział w obiegu tego pierwiastka. Dlatego też zbadano możliwość koegzystencji pierwotniaka z bankowymi szczepami bakterii desulfurykacyjnych, a także wpływ naturalnych produktów metabolizmu tych drobnoustrojów na rozwój *Paramecium bursaria*.

Na podstawie analizy wyników badań Muscatine'a i wsp. (1967) dotyczących produkcji fotosyntetycznej glonów z rodzaju *Chlorella* mogących wchodzić w układ symbiotyczny z *Paramecium bursaria*, jako czynnik oddziałujący na komórkę pierwotniaka zastosowano również kwas glikolowy, stanowiący jeden z produktów procesu fotosyntezy.

Z uwagi na wyniki badań prowadzonych w Zakładzie Mikrobiologii AP w Krakowie przez Pawłowską-Cwięk (dane niepublikowane), podczas których stwierdzono obecność kwasów fenolowych w zewnątrzkomórkowych strukturach komórek bakterii desulfurykacyjnych przebadano także wpływ różnych kwasów aromatycznych na rozwój orzęska *Paramecium bursaria*. Zastosowano kwas cynamonowy, ferulowy, *p*-aminobenzoesowy (PABA) i *p*-hydroksybenzoesowy (PHBA). Kwas ferulowy oraz cynamonowy (stanowiący prekursor kwasu ferulowego) zostały wybrane również ze względu na światłoczuły charakter kwasu ferulowego (Kolb i wsp. 2001), co wiąże się z faktem, iż w komórce *Paramecium bursaria* szereg funkcji uzależnionych jest od działania światła (por. rozdz. 2).

W celu określenia roli endosymbiotycznych glonów w procesie adaptacji orzęska *Paramecium bursaria* do zmieniających się warunków, badanie wpływu wszystkich wymienionych czynników prowadzono równolegle w warunkach świetlnych oraz w warunkach ciemniowych, w których następuje znaczne zmniejszenie udziału *Chlorella sp.* w metabolizmie całego układu na skutek zahamowania procesu fotosyntezy i związanego z tym zredukowania liczby komórek symbiotycznych glonów.

W badaniach wykorzystano orzęski *Paramecium bursaria* pochodzące z hodowli prowadzonej w Zakładzie Mikrobiologii Akademii Pedagogicznej w Krakowie. Hodowlę tę uzyskano w toku wcześniejszych badań (Pado, Bator 2001) poprzez zaadaptowanie do warunków laboratoryjnych dzikiego szczepu *Paramecium bursaria* odłowionego w 1998 roku w naturalnym zbiorniku wodnym w miejscowości Marcówka w okolicach Suchej Beskidzkiej w województwie małopolskim.

Bakterie występujące w naturalnym środowisku życia orzęska *Paramecium bursaria* pochodziły również z hodowli utrzymywanej w Zakładzie Mikrobiologii AP. Zostały one wyizolowane z prób wody i zaadaptowane do warunków laboratoryjnych podczas wcześniej prowadzonych badań (Pado, Bator 2001).

Bankowe szczepy bakterii denitryfikacyjnych (*Paracoccus denitrificans* DSM 65, *Thiobacillus denitrificans* DSM 807) oraz bakterii desulfurykacyjnych (*Desulfovibrio gigas* DSM 1382, *Desulfovibrio sulfodismutans* DSM 3696, *Desulfococcus multivorans* DSM 2059, *Desulfosarcina variabilis* DSM 2060, *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684, *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771) uzyskano z banku szczepów Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Germany). Naturalne produkty metabolizmu bakterii desulfurykacyjnych otrzymano z laboratoryjnych hodowli wyżej wymienionych szczepów.

Zastosowane w badaniach kwasy organiczne pochodziły od następujących producentów odczynników chemicznych:

- kwas glikolowy (hydroksyoctowy) $C_2H_3O_3$ cz.d.a. – producent: FLUKA, Switzerland, nr kat. 50590;
- kwas *trans*-cynamonowy (3-fenylopropenowy) $C_9H_8O_2$ cz.d.a. – producent: SIGMA Chemical Co., USA, nr kat. C-6004;
- kwas ferulowy (4-hydroksy-3-metoksycynamonowy) $C_{10}H_{10}O_4$ cz.d.a. – producent: SIGMA Chemical Co., USA, nr kat. F-3500;
- kwas *p*-aminobenzoesowy (PABA) $C_7H_7NO_2$ cz. – producent: MERCK, Germany, nr kat. 8.22312.0250;
- kwas *p*-hydroksybenzoesowy (PHBA) $C_7H_6O_3$ cz. – producent: MERCK, Germany, nr kat. 8.21814.0250.

Laboratoryjne hodowle orzęsków *Paramecium bursaria* prowadzono według procedury opracowanej podczas wcześniejszych badań dotyczących adaptacji dzikich szczepów *Paramecium bursaria* do warunków laboratoryjnych (Pado, Bator 2001).

Zastosowano pożywkę sałatową sporządzaną według receptury Sonneborna (1950) zmodyfikowanej w Zakładzie Mikrobiologii Akademii Pedagogicznej w Krakowie (Pado, Bator 2001). Wykorzystano suszone liście sałaty siewnej *Lactuca sativa* wyhodowanej w dwóch różnych miejscach: w miejscowości Bochnia (1998 r.) oraz w miejscowości Brody k. Kalwarii Zebrzydowskiej (1999 r.). Wcześniejsze badania pozwoliły stwierdzić, iż sałata pochodząca z tych dwóch upraw daje najlepsze, a jednocześnie wysoce porównywalne wyniki w laboratoryjnej hodowli *Paramecium bursaria* (Pado, Bator 2001). W obydwu przypadkach sałatę hodowano wyłącznie przy użyciu nawozów naturalnych, gdyż zastosowanie sałaty pochodzącej z upraw wzbogaconych nawozami mineralnymi nie daje dobrych efektów w hodowli orzęsków (Pado 1978).

W celu przygotowania pożywki sałatowej odważano 1,5 g suszonych i rozdrobnionych liści sałaty, a następnie gotowano je przez 5 minut w 1 dm³ naturalnej wody mineralnej o następującym składzie jonowym: Ca²⁺ – 56,7 mg/dm³; Mg²⁺ – 7,1 mg/dm³; Na⁺ – 1,7 mg/dm³; K⁺ – 0,85 mg/dm³; HCO₃⁻ – 202,6 mg/dm³; SO₄²⁻ – 7,0 mg/dm³; Cl⁻ – 4,4 mg/dm³; F⁻ – 0,1 mg/dm³. Otrzymany ekstrakt przesączało przez bibułę filtracyjną, a następnie, po ochłodzeniu do temperatury

pokojoyej, ustalano jego pH w przedziale 6,7–6,8 metodą potencjometryczną przy użyciu elektrody zespolonej ERH-11A (producent: HYDROMET, Gliwice), mikrokomputerowego pH-metru CX-315 (producent: ELMETRON, Zabrze) oraz wodnych roztworów HCl i NaOH. Po ustaleniu pH pożywkę ponownie gotowano i chłodzono do temperatury pokojowej. Do tak przygotowanej sterylnej pożywki wprowadzano za pomocą ezy niewielką ilość bakterii pochodzących z naturalnego środowiska życia pierwotniaka *Paramecium bursaria*. Miało to na celu zapewnienie orzęskom możliwości heterotroficznego odżywiania się. Bakterie poddawano uprzednio pasażowaniu poprzez kilkakrotne przeniesienie na świeże podłoże MPA (mięśne podłoże agarowe) w celu odmłodzenia kultury.

Pożywkę zaszczepioną bakteriami umieszczano w termostacie w temperaturze 37°C na okres 24 godzin, aby zapewnić bakteriom właściwe warunki rozwoju. Bezpośrednio przed zastosowaniem do hodowli *Paramecium bursaria* pożywkę rozcieńczano naturalną wodą mineralną w stosunku 1:1.

W celu założenia laboratoryjnej hodowli orzęsków odławiano przy pomocy szklanej mikropipety 3–5 komórek pierwotniaków i przenoszono je na szkiełko zegarkowe. Ilość odławianych komórek kontrolowano przy użyciu mikroskopu stereoskopowego KONDA XTL-3400 D. Następnie wprowadzano na szkiełko zegarkowe 4 cm³ pożywki sałatowej rozcieńczonej naturalną wodą mineralną w stosunku 1:1. Szkiełko zegarkowe zamykano w komorze wilgotnej, którą stanowiła szalka Petriego z umieszczonym na dnie krążkiem bibuły filtracyjnej nasączonej wodą. Zabieg ten umożliwiał zachowanie stałej wilgotności poprzez ograniczenie parowania wody z pożywki. Hodowle prowadzono w temperaturze pokojowej w warunkach ciągłego oświetlenia światłem białym o natężeniu około 700 lux oraz w warunkach całkowitej ciemności w komorach ciemniowych.

W trakcie badań prowadzono również masowe hodowle *Paramecium bursaria*. Zakładano je poprzez wprowadzenie kilkudziesięciu lub kilkuset komórek pierwotniaków do plastikowych naczyń o pojemnościach 25 cm³ lub 100 cm³. Następnie do naczyń tych dodawano pożywkę sałatową w objętości 10–50 cm³. Naczynia przykrywano szkiełkami zegarkowymi.

Zależnie od zastosowanego czynnika oddziałującego na populację pierwotniaków, wprowadzano różnorodne modyfikacje do opisanej wyżej procedury hodowli orzęsków, umożliwiające podanie wybranego czynnika do medium.

Bankowe szczepy bakterii denitryfikacyjnych *Thiobacillus denitrificans* DSM 807 i *Paracoccus denitrificans* DSM 65 namnażano wstępnie na podłożu płynnym przygotowanym według receptury bankowej, uzyskanej z banku szczepów Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

Sterylnie podłoże przenoszono do kolb stożkowych o pojemności 100 cm³ po czym wprowadzano do nich bankowe szczepy bakterii denitryfikacyjnych. Na powierzchnię hodowli nanoszono kilkumilimetrową warstwę oleju parafi-

nowego w celu uzyskania warunków bezwzględnie beztlenowych. Inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej (Grabińska-Loniewska 1997). Po upływie 7 dni bakterie przeszczepiano na pożywkę Giltaya, stanowiącą typowe podłoże dla rozwoju większości bakterii denitryfikacyjnych (Barabasz 1985). Sterylne podłoże Giltaya przenoszono do kolb stożkowych o pojemności 50 cm³, a następnie wprowadzono do nich po 10 cm³ hodowli *Thiobacillus denitrificans* DSM 807 i *Paracoccus denitrificans* DSM 65 prowadzonych wcześniej na podłożu bankowym. Hodowle prowadzono w temperaturze pokojowej. Warunki beztlenowe zapewniono poprzez naniesienie na powierzchnię hodowli warstwy oleju parafinowego.

Do oznaczania liczebności bakterii w prowadzonych hodowlach zastosowano metodę nefelometryczną polegającą na pomiarze natężenia światła rozproszonego przez zawiesinę pod kątem różnym od 180° w stosunku do wiązki padającej na badany roztwór. Wiązka światła o określonej długości fali padając na zawiesinę zawierającą żywe komórki bakterii ulega rozproszeniu, a natężenie promieniowania rozproszonego jest zależne między innymi od ilości występujących w zawieszynie komórek. W pomiarach nefelometrycznych wyznacza się procentowy współczynnik zmętnienia (τ) określający stosunek natężenia promieniowania rozproszonego przez badaną próbkę do natężenia promieniowania rozproszonego przez próbkę odniesienia (Sobczyk, Kiszka 1977). Przy ustalonych warunkach wartość ta jest wprost proporcjonalna do ilości komórek bakteryjnych w roztworze. Ze względu na rozmiary komórek bakteryjnych mieszczące się w granicach 0,4–1 μm bardzo istotne jest dobranie odpowiedniej długości fali dla danej grupy bakterii.

W prowadzonych badaniach, liczebność kultur bakteryjnych oznaczano przy użyciu spektrofotometru SPEKOL 11 firmy Carl Zeiss–Jena, wyposażonego w przystawkę nefelometryczną typu TK. Przed wykonaniem pomiaru kolby z kulturami bakteryjnymi lekko wstrząsano, a następnie pobierano sterylną strzykawką spod warstwy oleju parafinowego około 2 cm³ medium i przenoszono do kuwet nefelometrycznych. Współczynnik zmętnienia oznaczano przy długości fali $\lambda = 580$ nm dla *Thiobacillus denitrificans* DSM 807 oraz $\lambda = 590$ nm dla *Paracoccus denitrificans* DSM 65. Wartości te wyznaczono doświadczalnie, ponieważ przy zastosowaniu zalecanych w literaturze długości fal $\lambda = 600$ nm (Błaszczak 1992) lub $\lambda = 625$ nm (Wee, Wilkinson 1988)) nie stwierdzono wyraźnej korelacji między uzyskiwanymi odczytami a faktycznym zmętnieniem roztworu. Próbę odniesienia stanowiła sterylna pożywka Giltaya.

W celu określenia wpływu bakterii denitryfikacyjnych na rozwój populacji pierwotniaków, do 100 cm³ sterylnej pożywki sałatowej wprowadzono inokulum uzyskane z hodowli *Thiobacillus denitrificans* DSM 807 i *Paracoccus denitrificans* DSM 65 prowadzonych na podłożu Giltaya. Objętość wprowadzanego inokulum ustalano na podstawie pomiarów współczynnika zmętnienia w hodowlach bakteryjnych po 7 dniach inkubacji. Dzięki temu we wszyst-

kich próbach uzyskiwano możliwie zbliżoną liczebność wprowadzonych bakterii. Posłużono się następującym wzorem:

$$V_a = \frac{\tau_{min}}{\tau_a} \times 100 \text{ (cm}^3\text{)}$$

gdzie: V_a – objętość inokulum dla danego szczepu bakterii

τ_{min} – wartość współczynnika zmętnienia dla szczepu o najniższej liczebności

τ_a – wartość współczynnika zmętnienia dla danego szczepu bakterii

Pożywkę sałatową zaszczipioną bankowymi szczepami bakterii denitryfikacyjnych pozostawiano na 48 godzin w temperaturze pokojowej i bezpośrednio przed zastosowaniem do hodowli orzęsków rozcieńczano naturalną wodą mineralną w stosunku 1:1.

Hodowle *Paramecium bursaria* w obecności bakterii denitryfikacyjnych przeprowadzono w 4 seriach eksperymentalnych trwających po 21 dni. W każdej serii zakładano po 3 równoległe hodowle dla danego szczepu bakterii. Jednocześnie prowadzono hodowle kontrolne, w których zastosowano pożywkę sałatową zaszczipioną bakteriami pochodzącymi z naturalnego środowiska życia pierwotniaka *Paramecium bursaria*. Hodowle inkubowano w warunkach ciągłego oświetlenia oraz w warunkach ciemniowych. Podczas inkubacji określano zmiany liczebności orzęsków we wszystkich próbach.

Dodatkowo przeprowadzono 3 serie eksperymentalne z zastosowaniem masowych hodowli *Paramecium bursaria*. W tym celu do plastikowych naczyń o pojemności 25 cm³ wprowadzano 10 komórek orzęsków, a następnie dodawano 10 cm³ pożywki sałatowej, zawierającej bankowe szczepy denitryfikatorów, oraz bakterie pochodzące z naturalnego środowiska życia orzęska (hodowle kontrolne). Próby inkubowano w warunkach ciągłego oświetlenia i w ciemności. Podczas inkubacji prowadzono oznaczenia koncentracji jonów azotanowych (III) i azotanowych (V) metodą kolorymetryczną.

Bankowe szczepy bakterii desulfurykacyjnych *Desulfovibrio gigas* DSM 1382, *Desulfovibrio sulfodismutans* DSM 3696, *Desulfococcus multivorans* DSM 2059, *Desulfosarcina variabilis* DSM 2060, *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684 oraz *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771 namnażano na standardowej pożywce mleczanowej (Postgate 1984). Sterylne podłoże przenoszono do kolb stożkowych o pojemności 250 cm³ po czym wprowadzano do nich zawiesinę bankowych szczepów bakterii desulfurykacyjnych. Na powierzchnię hodowli nanoszono kilkumilimetrową warstwę oleju parafinowego w celu uzyskania warunków bezwzględnie beztlenowych. Inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej przez 4 doby.

Inokulum uzyskane po 4 dobach hodowli bakterii desulfurykacyjnych wprowadzano do 100 cm³ sterylnej pożywki sałatowej. Objętość wprowadzanego inokulum ustalano na podstawie pomiarów współczynnika zmętnienia

nienia w prowadzonych hodowlach bakteryjnych, analogicznie jak w przypadku wprowadzania bakterii denitryfikacyjnych. Nefelometryczne pomiary dla bankowych szczepów bakterii desulfurykacyjnych prowadzono przy następujących długościach fali:

- *Desulfovibrio gigas* DSM 1382 – 580 nm (wyznaczono doświadczalnie),
- *Desulfovibrio sulfodismutans* DSM 3696 – 690 nm (wyznaczono doświadczalnie),
- *Desulfococcus multivorans* DSM 2059 – 775 nm (wyznaczono doświadczalnie),
- *Desulfosarcina variabilis* DSM 2060 – 580 nm (Stahlman i wsp. 1991),
- *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684 – 580 nm (Stahlman i wsp. 1991),
- *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771 – 436 nm (Gorny, Schink 1994).

Jako próbę odniesienia zastosowano wodę destylowaną. Pożywkę sałatową zaszczepioną bankowymi szczepami bakterii desulfurykacyjnych pozostawiano na 48 godzin w temperaturze pokojowej i bezpośrednio przed zastosowaniem do hodowli orzęsków rozcieńczano naturalną wodą mineralną w stosunku 1:1.

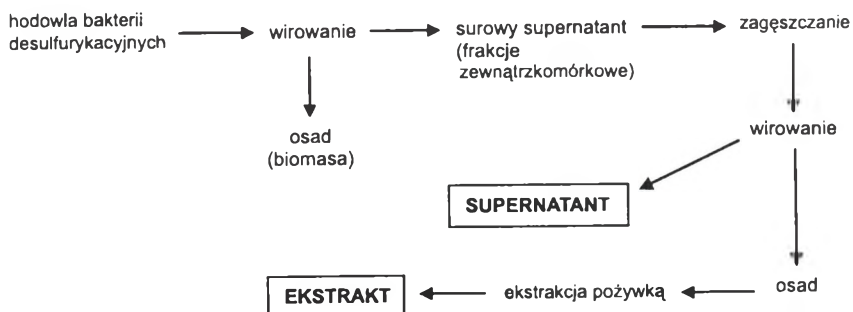
Badania dotyczące możliwości rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności bakterii desulfurykacyjnych prowadzono w 4 seriach trwających po 21 dni. Dla każdego szczepu desulfurykatorów zastosowano po 3 równoległe próby, które inkubowano w warunkach ciągłego oświetlenia oraz w ciemności. Próby kontrolne stanowiły hodowle *Paramecium bursaria* prowadzone na pożywce sałatowej zaszczepionej bakteriami pochodzącymi z naturalnego środowiska życia pierwotniaka. Podczas inkubacji określano zmiany liczebności orzęsków we wszystkich próbach.

Ponadto przeprowadzono analogiczne badania w masowych hodowlach *Paramecium bursaria*. Hodowle te były prowadzone w naczyniach o pojemności 25 cm³. Dla szczepów *Desulfovibrio gigas* DSM 1382, *Desulfovibrio sulfodismutans* DSM 3696 oraz *Desulfococcus multivorans* DSM 2059 hodowle masowe zakładano przez wprowadzenie do naczyń hodowlanych 10 komórek pierwotniaków, a następnie dodanie 10 cm³ pożywki sałatowej zaszczepionej odpowiednim gatunkiem bakterii. W przypadku szczepów *Desulfosarcina variabilis* DSM 2060, *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684 i *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771 ilość wprowadzanych komórek orzęsków zwiększono do 15, a objętość do 15 cm³. Próby inkubowano w warunkach ciągłego oświetlenia i w ciemności. Równoległe zakładano hodowle masowe kontrolne, które prowadzono na pożywce sałatowej zaszczepionej bakteriami pochodzącymi z naturalnego środowiska życia *Paramecium bursaria*. We wszystkich hodowlach masowych oznaczano intensywność rozwoju pierwotniaków, intensywność rozwoju bakterii oraz zmiany koncentracji jonów siarczanowych metodą spektrofotometryczną.

Przeprowadzono także 4 serie eksperymentów mających na celu określenie wpływu bakterii desulfurykacyjnych na liczebność endosymbiontów *Chlorella sp.* w komórkach *Paramecium bursaria*. Badania prowadzono w hodowlach maso-

wych, w naczyniach o pojemności 100 cm³. Do naczyń wprowadzano mikropipetą po 30 komórek pierwotniaków, a następnie dodawano po 30 cm³ pożywki sałatowej zawierającej odpowiedni szczep bakterii desulfurykacyjnych. Hodowle inkubowano w warunkach ciągłego oświetlenia oraz w ciemności. Materiał eksponowany na światło hodowano przez 21 dni, natomiast materiał przetrzymywany w ciemności przenoszono po 11 dniach do warunków ciągłego oświetlenia w celu określenia możliwości odnowienia populacji endosymbiontów. Równolegle prowadzono hodowle kontrolne zawierające pożywkę sałatową zaszczeploną bakteriami pochodzącymi z naturalnego środowiska życia *Paramecium bursaria*. W kolejnych dniach inkubacji oznaczano liczebność endosymbiontów *Chlorella sp.* w komórkach pierwotniaków. Okresowo wykonywano także pomiary liczebności bakterii w prowadzonych hodowlach oraz w pozostałej ilości zaszczeplonej pożywki sałatowej nie zawierającej pierwotniaków.

Naturalne produkty metabolizmu bakterii desulfurykacyjnych uzyskano z laboratoryjnych hodowli bankowych szczepów desulfurykatorów: *Desulfotribrio gigas* DSM 1382, *Desulfotribrio sulfodismutans* DSM 3696, *Desulfococcus multivorans* DSM 2059, *Desulfosarcina variabilis* DSM 2060, *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684, *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771. Hodowle prowadzono na standardowej pożywce mleczanowej w warunkach bezwzględnie beztlenowych w kolbach o pojemności 1000 cm³. Po 14 dniach inkubacji pobierano 250 cm³ hodowli i poddawano wirowaniu w wirówce laboratoryjnej MPW-6 przy szybkości 3500 r.p.m. przez 20 minut w celu oddzielenia frakcji zewnątrzkomórkowych od biomasy komórek bakteryjnych (Hancock, Poxton 1988). Uzyskany surowy supernatant (zawierający frakcje zewnątrzkomórkowe) przenoszono do krystalizatorów o pojemności 300 cm³ i umieszczano w chłodziarce w celu zagęszczenia. Następnie zagęszczony supernatant uzupełniano wodą redestylowaną do wyjściowej objętości i wirowano w wirówce laboratoryjnej MPW-210 przy szybkości 10 000 r.p.m. przez 15 minut. Uzyskiwano w efekcie supernatant, który stosowano bezpośrednio do dalszych doświadczeń



Ryc. 2. Schemat procedury preparatywnej stosowanej przy uzyskiwaniu naturalnych produktów metabolizmu bakterii desulfurykacyjnych

oraz osad, który poddawano ekstrakcji sterylną pożywką sałatową w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Następnie oddzielano zawiesinę poprzez odwirowanie przy szybkości 10 000 r.p.m. przez 15 minut i tym sposobem uzyskiwano ekstrakt stosowany w dalszych badaniach (ryc. 2).

Opisaną procedurę zastosowano w odniesieniu do wszystkich szczepów bakterii desulfurykacyjnych. Uzyskane supernatanty i ekstrakty wprowadzono do sterylnej pożywki sałatowej (w ilości 50 μ l na 4 ml pożywki) po wcześniejszym rozcieńczeniu jej wodą mineralną w stosunku 1:1. Pożywki nie zaszczepiano bakteriami zakładając, że wprowadzone supernatanty i ekstrakty powinny zastąpić orzęskom pokarm bakteryjny. Przeprowadzono 3 serie eksperymentów, w których pierwotniki inkubowano w pożywce zawierającej supernatanty oraz 3 serie z zastosowaniem ekstraktów. Hodowle prowadzono w warunkach ciągłego oświetlenia i w ciemności. Próby kontrolne stanowiły hodowle *Paramecium bursaria* na pożywce sałatowej zaszczepionej bakteriami pochodzącymi z naturalnego środowiska życia orzęsków i nie zawierającej żadnych dodatkowych składników. We wszystkich próbach określano zmiany liczebności orzęsków podczas 21-dniowej inkubacji.

W dalszej części badań jako czynniki oddziałujące na populację *Paramecium bursaria* zastosowano następujące kwasy organiczne: kwas glikolowy, cynamonowy, ferulowy, *p*-aminobenzoesowy (PABA) i *p*-hydroksybenzoesowy (PHBA).

Wyjściowy roztwór kwasu glikolowego o stężeniu 0,1 M uzyskano przez rozpuszczenie 0,7605 g krystalicznego kwasu glikolowego w 100 cm³ naturalnej wody mineralnej stosowanej do sporządzania pożywki sałatowej. Następnie metodą rozcieńczeń, wykorzystując jako rozpuszczalnik naturalną wodę mineralną, uzyskano roztwory kwasu glikolowego o niższych stężeniach, które stosowano do rozcieńczania pożywki sałatowej w stosunku 1:1 bezpośrednio przed jej użyciem do hodowli *Paramecium bursaria*. Zastosowano następujące koncentracje kwasu glikolowego w pożywce sałatowej: 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 5 mM; 50 mM. Równoległe prowadzone były hodowle kontrolne nie zawierające kwasu glikolowego. W pierwszym etapie badań przeprowadzono 3 serie eksperymentów dotyczących wpływu kwasu glikolowego na rozwój *Paramecium bursaria*, przy czym wszystkie próby inkubowano tylko w warunkach ciągłego oświetlenia. W celu uzyskania bliższych danych na temat możliwości wykorzystywania kwasu glikolowego przez badany układ symbiotyczny, w kolejnych 3 seriach zastosowano równoległe hodowle prowadzone na świetle i w warunkach ciemniowych. We wszystkich próbach określano zmiany liczebności pierwotników podczas 21-dniowej inkubacji. Przeprowadzono również analizę spektrofotometryczną pożywki sałatowej zawierającej kwas glikolowy – zarówno przed rozpoczęciem hodowli orzęsków, jak i po jej zakończeniu.

Kwas cynamonowy charakteryzuje się słabą rozpuszczalnością w wodzie. Dlatego też, aby uzyskać roztwór wyjściowy, przeprowadzono próby zobojętniania kwasu cynamonowego wodorotlenkami. Zastosowano wodorotlenek

żelaza (III), wodorotlenek miedzi (II) oraz wodorotlenek sodu. Najlepsze efekty uzyskano w przypadku wodorotlenku sodu, z którym kwas cyjanonowy tworzy dobrze rozpuszczalną w wodzie sól. W celu otrzymania wyjściowego roztworu kwasu cyjanonowego rozpuszczono 0,0741 g tego związku w 500 cm³ 1-molowego roztworu wodorotlenku sodu, uzyskując stężenie 1mM. Z roztworu wyjściowego wykonano rozcieńczenia w naturalnej wodzie mineralnej stosowanej do przygotowywania pożywki sałatowej. Sporządzone roztwory wykorzystano do rozcieńczania pożywki sałatowej bezpośrednio przed jej zastosowaniem do hodowli orzęsków *Paramecium bursaria*. Tym sposobem wprowadzono kwas cyjanonowy do medium, uzyskując następujące koncentracje w pożywce sałatowej: 0,25 μM; 0,5 μM; 1 μM; 2 μM; 3 μM; 4 μM; 5 μM; 10 μM. Początkowo przeprowadzono 5 serii badawczych, podczas których pierwotniaki hodowano w obecności różnych koncentracji kwasu cyjanonowego w warunkach ciągłego oświetlenia. W kolejnych 4 seriach wprowadzono zróżnicowane warunki świetlne – ciągłe oświetlenie i ciemność. W każdej serii prowadzono równoległe hodowle kontrolne nie zawierające kwasu cyjanonowego. W kolejnych dniach inkubacji określano liczebność orzęsków. Przeprowadzono również próbę spektrofotometrycznego oznaczania zmian koncentracji kwasu cyjanonowego w prowadzonych hodowlach.

Wyjściowy roztwór kwasu ferulowego o koncentracji 1 mM sporządzono przez rozpuszczenie 0,0194 g kwasu ferulowego w 100 cm³ naturalnej wody mineralnej stosowanej do sporządzania pożywki sałatowej. Roztwory o niższych stężeniach uzyskano metodą rozcieńczeń, stosując jako rozpuszczalnik naturalną wodę mineralną. Roztwory te użyto następnie do rozcieńczania pożywki sałatowej w stosunku 1:1 bezpośrednio przed jej wykorzystaniem do hodowli *Paramecium bursaria*. Zastosowano następujące koncentracje kwasu ferulowego w pożywce sałatowej: 0,5 μM; 1 μM; 1,25 μM; 1,5 μM. Przeprowadzono 4 serie eksperymentalne, w których hodowano pierwotniaki *Paramecium bursaria* w obecności kwasu ferulowego w warunkach ciągłego oświetlenia oraz w warunkach ciemniowych. Równoległe prowadzone były próby kontrolne, w których orzęski hodowano na pożywce sałatowej nie zawierającej kwasu ferulowego. Podczas inkubacji prowadzono pomiary liczebności pierwotniaków we wszystkich próbach.

Kwas *p*-aminobenzoesowy w ilości 0,1371 g rozpuszczano w 100 cm³ naturalnej wody mineralnej stosowanej do sporządzania pożywki sałatowej. Uzyskiwano tym sposobem roztwór o stężeniu 10 mM. Niższe koncentracje kwasu *p*-aminobenzoesowego otrzymywano metodą rozcieńczeń. Sporządzone roztwory stosowano do rozcieńczania pożywki sałatowej w stosunku 1:1 bezpośrednio przed jej wykorzystaniem do hodowli *Paramecium bursaria*. Przeprowadzono 5 serii badawczych, podczas których określano możliwość rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności następujących koncentracji kwasu *p*-aminobenzoesowego: 0,1 μM; 1 μM; 10 μM; 100 μM; 1mM; 5 mM. W każdej serii prowadzono po 3 równoległe próby dla danego stężenia, zarówno w wa-

runkach ciągłego oświetlenia, jak i w ciemności. Jednocześnie prowadzono kontrolne hodowle *Paramecium bursaria*, w których stosowano standardową pożywkę sałatową bez dodatku kwasu *p*-aminobenzoowego. Podczas inkubacji określano zmiany liczebności pierwotniaków we wszystkich próbach oraz liczebność endosymbiontów *Chlorella sp.* w wybranych hodowlach, prowadzonych w warunkach ciągłego oświetlenia.

Wyjściowy roztwór kwasu *p*-hydroksybenzoowego o koncentracji 10 mM sporządzono przez rozpuszczenie 0,1381 g tego związku w 100 cm³ naturalnej wody mineralnej stosowanej do sporządzania pożywki sałatowej. Następnie wykorzystując metodę rozcieńczeń uzyskiwano roztwory o niższych stężeniach (2 mM; 200 μM; 20 μM; 10 μM; 2 μM). Jako rozpuszczalnik stosowano naturalną wodę mineralną. Sporządzone roztwory wykorzystywano do rozcieńczania pożywki sałatowej przed jej zastosowaniem do hodowli orzęsków *Paramecium bursaria*. Uzyskano następujące koncentracje kwasu *p*-hydroksybenzoowego w pożywce sałatowej: 1 μM; 5 μM; 10 μM; 100 μM; 1 mM; 5 mM. Wpływ kwasu *p*-hydroksybenzoowego na rozwój *Paramecium bursaria* określano w 5 seriach eksperymentalnych. Materiał inkubowano w warunkach ciągłego oświetlenia oraz w warunkach ciemniowych. Równolegle prowadzono hodowle kontrolne, w których orzęski inkubowano na pożywce sałatowej rozcieńczonej naturalną wodą mineralną bez dodatku kwasu *p*-hydroksybenzoowego. W kolejnych dniach inkubacji określano liczebność pierwotniaków. Kontrolowano też wrywkowo ilość endosymbiontów w komórkach *Paramecium bursaria* w wybranych próbach, inkubowanych na świetle.

We wszystkich prowadzonych seriach eksperymentalnych określano w kolejnych dniach inkubacji liczebność pierwotniaków *Paramecium bursaria*. Dokonywano tego metodą bezpośredniego liczenia komórek z wykorzystaniem mikroskopu stereoskopowego KONDA XTL-3400 D w świetle przechodzącym przy powiększeniu 15x. Pomiaru wykonywano o stałej porze dnia pomiędzy godziną 12.00 a 14.00. Miało to na celu wyeliminowanie ewentualnych różnic w metabolizmie orzęsków, jakie mogłyby wynikać z dobowej rytmiki tego organizmu (Miwa i wsp. 1987; Kosaka 1991, 1994). Aby zminimalizować błąd pomiaru, naczynia hodowlane umieszczano na szkiełku zegarkowym z wyznaczonymi sektorami o szerokości 7 mm, a następnie określano ilość komórek pierwotniaków w kolejnych sektorach. Na podstawie uzyskanych danych obliczano wartość współczynnika podziałów komórkowych *Paramecium bursaria* (*k*) według wzoru (Meyers 1953; Pado 1978):

$$k = \frac{x_n}{x_0}$$

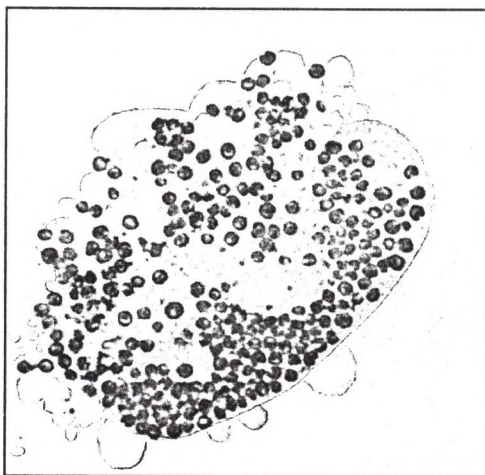
gdzie: *k* – współczynnik podziałów komórkowych *Paramecium bursaria*

x_n – ilość pierwotniaków w danym dniu inkubacji

x₀ – wyjściowa ilość pierwotniaków w badanej próbce

W przypadku pomiarów prowadzonych w próbach inkubowanych w ciemności procedurę przeprowadzano w taki sposób, aby ograniczyć do minimum czas oddziaływania światła na hodowle podczas wykonywania pomiaru.

W czasie badań dotyczących rozwoju orzęska *Paramecium bursaria* w obecności bakterii desulfurykacyjnych oraz kwasu *p*-aminobenzoesowego i *p*-hydroksybenzoesowego, prowadzono pomiary liczebności endosymbiotycznych glonów *Chlorella sp.* w komórkach *Paramecium bursaria*. W tym celu za pomocą mikropipety odławiano z prowadzonych hodowli po 5 komórek orzęsków i umieszczano je w kropli wody na szkiełku podstawowym. Operację kontrolowano przy użyciu mikroskopu stereoskopowego KONDA XTL-3400 D. Następnie próbkę przykrywano szkiełkiem nakrywkowym, tak aby uniknąć gromadzenia się pęcherzyków powietrza. Przygotowany w ten sposób preparat pozostawiano na kilka minut w temperaturze pokojowej w celu częściowego odparowania wody, a następnie obserwowano pod mikroskopem świetlnym Carl Zeiss-Jena przy powiększeniu 500× (fot. 3).



Fot. 3. Mikroskopowy obraz preparatu służącego do określania liczebności endosymbiontów w komórkach *Paramecium bursaria* (pow. 500× fot. autor)

Unieruchomione pod naciskiem szkiełka nakrywkowego pierwotniaki ulegały stopniowo rozgnieceniu, a obecne w ich wnętrzu komórki endosymbiontów uwalniane były poza obręb błony komórkowej, co pozwalało na dokładne określenie ich liczby.

W masowych hodowlach orzęsków *Paramecium bursaria* inkubowanych w obecności bakterii desulfurykacyjnych prowadzono oznaczanie liczebności bakterii metodą nefelometryczną. Z hodowli pobierano mikropipetą 2,5 cm³

medium i przenoszono do kuwet nefelometrycznych. Proces kontrolowano przy użyciu mikroskopu stereoskopowego KONDA XTL-3400 D, tak aby w pobieranej objętości medium nie znajdowały się komórki pierwotniaków. Pomiar współczynnika zmętnienia prowadzono za pomocą spektrofotometru SPEKOL 11 firmy Carl Zeiss–Jena, wyposażonego w przystawkę nefelometryczną typu TK.

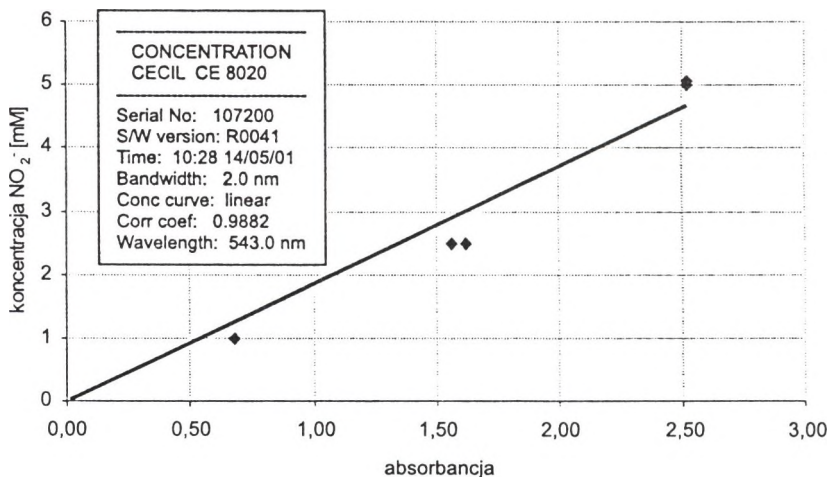
Analogiczne oznaczenia prowadzono dla hodowli kontrolnych zawierających bakterie pochodzące z naturalnego środowiska życia pierwotniaka. W tym przypadku pomiary wykonywano przy długości fali $\lambda = 580$ nm, wyznaczonej doświadczalnie. Dla wszystkich pomiarów jako próbę odniesienia zastosowano sterylną pożywkę sałatową rozcieńczoną naturalną wodą mineralną w stosunku 1:1. Dodatkowo, podczas badań dotyczących wpływu bakterii desulfurykacyjnych na ilość endosymbiontów w komórkach *Paramecium bursaria*, prowadzono także pomiary liczebności bakterii desulfurykacyjnych w pożywce sałatowej nie zawierającej komórek pierwotniaków. Badania te pozwalały określić, czy obecność orzęsków wpływa w istotny sposób na zmiany liczebności bakterii. Pomiary prowadzono w opisany wyżej sposób, przy czym jako próbę odniesienia zastosowano sterylną, nierozcieńczoną pożywkę sałatową. Na podstawie uzyskanych wartości współczynnika zmętnienia (τ) określano współczynnik podziałów komórkowych bakterii (L) wyrażający się wzorem:

$$L = \frac{\tau_n}{\tau_0}$$

gdzie: L – współczynnik podziałów komórkowych bakterii
 τ_n – procentowy współczynnik zmętnienia w danym dniu inkubacji
 τ_0 – wyjściowa wartość współczynnika zmętnienia dla badanej próby

Podczas hodowli *Paramecium bursaria* w obecności bakterii denitryfikacyjnych oznaczano koncentrację jonów azotanowych (III) i azotanowych (V) kolorymetryczną metodą Griessa-Ilosvaya (Williams 1985). W metodzie tej jony azotanowe (III) poddaje się reakcji diazowania z sulfanilamidem w obecności kwasu chlorowodorowego. W środowisku kwaśnym jony azotanowe (III) ulegają przekształceniu w nietrwały kwas azotowy (III) – HNO_2 , który rozpada się na tritlenek azotu (III) – N_2O_3 i cząsteczkę wody. W reakcji tritlenku azotu (III) z sulfanilamidem powstaje kation N-nitrozoamoniowy, który ulega przegrupowaniu z odłączeniem cząsteczki wody, w wyniku czego tworzy się kation diazoniowy. Następnie przeprowadza się reakcję sprzęgania powstałego kationu diazoniowego z N-(1-naftylo)-etylenodiaminą. Produktem zachodzącej reakcji jest związek azowy o silnym zabarwieniu czerwonofioletowym. Absorbancja używanego roztworu mierzona przy długości fali $\lambda = 543$ nm jest wprost proporcjonalna do stężenia jonów azotanowych (III). W celu wykonania oznaczeń metodą Griessa-Ilosvaya pobierano z prowadzonych hodowli $0,5 \text{ cm}^3$ medium, dodawano 1 cm^3 odczynnika sulfanilamidowego (przygotowanego poprzez roz-

puszczenie 1 g sulfanilamidu w 100 cm³ 2,5 M kwasu chlorowodorowego), a po upływie 8 minut – 1 cm³ wodnego roztworu chlorowodoru N-(1-naftylo)-etylenodiaminy o stężeniu 0,02%. Próbkę pozostawiano w temperaturze pokojowej na 30 minut, po czym wykonywano pomiar absorpcji przy długości fali $\lambda = 543 \text{ nm}$ za pomocą spektrofotometru UV-VIS Cecil CE-8020. Koncentrację jonów azotanowych (III) odczytywano bezpośrednio ze spektrofotometru, po wcześniejszym zaprogramowaniu krzywej kalibracyjnej, sporządzonej na podstawie pomiarów absorpcji dla serii wzorcowych roztworów azotanu (III) sodu (ryc. 3).

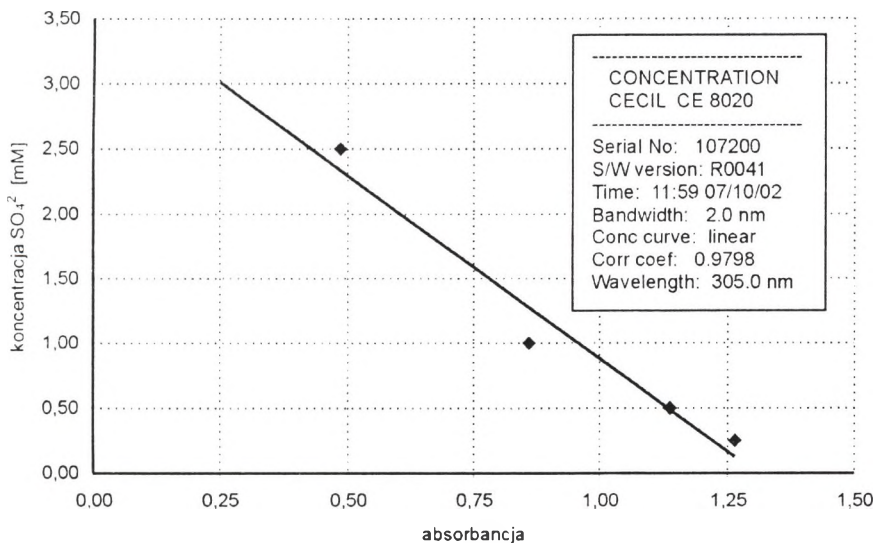


Ryc. 3. Krzywa kalibracyjna do kolorymetrycznego oznaczania koncentracji jonów azotanowych (III) metodą Griessa-Ilosvaya (spektrofotometr Cecil CE-8020)

Koncentrację jonów azotanowych (V) oznaczano kolorymetryczną metodą redukcijną (Hermanowicz i wsp. 1999). W metodzie tej przeprowadza się redukcję jonów azotanowych (V) do jonów azotanowych (III) w reakcji z metalicznym cynkiem. Dla przeprowadzenia redukcji pobierano 3 cm³ hodowli, dodawano niewielką ilość pyłu cynkowego oraz kroplę 0,1 M kwasu chlorowodorowego. Próbkę poddawano wytrząsaniu przez 5 minut w wytrząsarce laboratoryjnej. Po upływie 24 godzin oznaczano koncentrację jonów azotanowych (III) opisaną wyżej metodą Griessa-Ilosvaya. Koncentrację jonów azotanowych (V) obliczano jako różnicę między stężeniem jonów azotanowych (III) uzyskanym przed redukcją i po redukcji.

Podczas prowadzenia masowych hodowli *Paramecium bursaria* w obecności bakterii desulfurykacyjnych oznaczano zmiany koncentracji jonów siarcza-

nowych (VI) metodą spektrofotometryczną z zastosowaniem 2-aminoperimidyny (Williams 1985). Odczynnik ten wykazuje silną absorpcję w zakresie promieniowania ultrafioletowego z charakterystycznym maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda = 305 \text{ nm}$. Po dodaniu znanej ilości 2-aminoperimidyny do roztworu zawierającego jony siarczanowe (VI) i oddzieleniu powstałej zawiesiny przeprowadza się pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda = 305 \text{ nm}$. Uzyskane wyniki wskazują na zawartość 2-aminoperimidyny pozostałą po przereagowaniu z jonami siarczanowymi. W ustalonych warunkach wartość absorbancji jest odwrotnie proporcjonalna do koncentracji jonów siarczanowych (VI) w roztworze (ryc. 4).



Ryc. 4. Krzywa kalibracyjna do spektrofotometrycznego oznaczania koncentracji jonów siarczanowych (VI) w zakresie promieniowania ultrafioletowego (spektrofotometr Cecil CE-8020)

W celu wykonania oznaczenia pobierano z hodowli *Paramecium bursaria* 1 cm³ medium i dodawano 0,5 cm³ roztworu bromowodorku 2-aminoiperimidyny. Próbkę pozostawiano na 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie prowadzono wirowanie w wirówce laboratoryjnej MPW-210 przy szybkości 15 000 r.p.m. przez 15 minut w celu oddzielenia powstałej zawiesiny. Otrzymany supernatant rozcieńczano 20-krotnie wodą destylowaną. Absorbancję uzyskanego roztworu mierzono za pomocą spektrofotometru UV-VIS Cecil CE-8020 przy długości fali $\lambda = 305 \text{ nm}$. Wykorzystano kuwety kwarcowe, nie pochłaniające promieniowania ultrafioletowego. Jako próbkę odniesienia stosowano wodę

destylowaną. Koncentrację jonów siarczanowych (VI) odczytywano bezpośrednio ze spektrofotometru, po wcześniejszym zaprogramowaniu krzywej kalibracyjnej, sporządzonej na podstawie pomiarów absorbancji dla serii roztworów siarczanu (VI) sodu w pożywce sałatowej.

Analizę spektrofotometryczną zawartości kwasów organicznych wprowadzanych do hodowli *Paramecium bursaria* przeprowadzono dla kwasu glikolowego i kwasu cynamonowego. Przy użyciu spektrofotometru UV-VIS Cecil CE-8020 sporządzono widma absorpcyjne pożywki sałatowej, zawierającej różne koncentracje kwasu glikolowego (0,1 mM; 2 mM) i cynamonowego (2 μ M; 3 μ M; 6 μ M). Przed wykonaniem widm pożywkę przesączaano przez bibułę filtracyjną, a następnie rozcieńczano 2-krotnie wodą destylowaną, którą stosowano również jako próbę odniesienia. W analogiczny sposób sporządzono widma absorpcyjne pożywki sałatowej nie zawierającej sztucznie wprowadzonych kwasów organicznych. Wykonano również analizę spektrofotometryczną medium uzyskanego po zakończeniu hodowli *Paramecium bursaria* w obecności różnych koncentracji kwasu glikolowego (0,1 mM; 2 mM). W tym celu objętość medium uzupełniano do 4 cm³ świeżą pożywką sałatową nie zawierającą kwasu glikolowego. Następnie próbkę przesączaano i rozcieńczano 2-krotnie wodą destylowaną, po czym sporządzano widma absorpcyjne stosując wodę destylowaną jako próbę odniesienia. Analizę porównawczą wykonanych widm absorpcyjnych przeprowadzono stosując programy Hyper Access v. 8.32 (Copyright©2000 Hilgraeve, Inc.) oraz Data Stream Plus v. 2.01 (Cecil Instruments Ltd), umożliwiające przeniesienie danych ze spektrofotometru Cecil CE-8020 do komputera, gdzie poddano je obróbce za pomocą programu Microsoft Excel 97 (Copyright©1985–1997 Microsoft Corporation).

Większość wyników uzyskanych w niniejszych badaniach obrazuje tempo wzrostu populacji pierwotniaków *Paramecium bursaria*. Dane otrzymane dla każdej z prób stanowią ciągi wartości odzwierciedlających przebieg zmian liczebności orzęsków w czasie (szeregi dynamiczne). Fakt ten uniemożliwia czytelne zestawienie wyników uzyskanych w wielu próbach. W celu porównania tempa rozwoju *Paramecium bursaria* w przeprowadzonych eksperymentach, dla każdej próby obliczono przeciętny współczynnik podziałów komórkowych, wyrażający się wzorem:

$$K = \frac{\sum k_n}{n}$$

gdzie: K – przeciętny współczynnik podziałów komórkowych *Paramecium bursaria*

k_n – wartości współczynnika podziałów komórkowych *Paramecium bursaria* uzyskane podczas kolejnych pomiarów w trakcie inkubacji

n – ilość pomiarów wykonanych podczas inkubacji

W poszczególnych seriach eksperymentalnych stwierdzono bardzo duże różnice w bezwzględnej liczebności orzęsków. Różnice te dotyczyły nawet prób kontrolnych, nie poddanych działaniu jakiegokolwiek czynnika. Analogiczną sytuację stwierdzono również przy porównaniu wyników otrzymanych w warunkach ciągłego oświetlenia oraz w ciemności. Dlatego też, aby możliwe było zestawianie wyników uzyskanych w kolejnych seriach i w różnych warunkach hodowli, dla każdej serii obliczono relację między przeciętnym współczynnikiem podziałów stwierdzonym w poszczególnych próbach badanych i przeciętnym współczynnikiem podziałów otrzymanym w równolegle prowadzonej hodowli kontrolnej. Zależność tę wyrażono w procentach kontroli, przyjmując przeciętny współczynnik podziałów stwierdzony w próbie kontrolnej jako 100%. Uzyskano dzięki temu wartość charakteryzującą w sposób bezwzględny intensywność rozwoju pierwotniaka *Paramecium bursaria* w obecności dowolnego czynnika, w dowolnych warunkach inkubacji. Dla potrzeb niniejszej pracy wartość tę określono jako procentowy współczynnik podziałów komórkowych wyrażony wzorem:

$$K_{\%} = \frac{K_{\text{bad}}}{K_{\text{kontr}}} \times 100\%$$

gdzie: $K_{\%}$ – procentowy współczynnik podziałów komórkowych *Paramecium bursaria*

K_{bad} – przeciętny współczynnik podziałów komórkowych *Paramecium bursaria* stwierdzony w badanej próbie

K_{kontr} – przeciętny współczynnik podziałów komórkowych *Paramecium bursaria* stwierdzony w równoległej hodowli kontrolnej

Z wartości $K_{\%}$ uzyskanych dla tego samego czynnika w kolejnych seriach badawczych obliczano średnią arytmetyczną oraz średnie odchylenie. Jeżeli bezwzględna wartość różnicy między średnią wartością $K_{\%}$ i wartością 100% przekraczała średnie odchylenie przyjmowano, że uzyskana średnia wartość $K_{\%}$ jest statystycznie istotna, a zatem dany czynnik wpływa stymulująco (przy $K_{\%} > 100\%$) lub hamująco (przy $K_{\%} < 100\%$) na rozwój orzęska *Paramecium bursaria*.

Analizując wyniki badań dotyczących zmian liczebności endosymbiontów *Chlorella sp.* w komórkach *Paramecium bursaria* w obecności bakterii desulfurykacyjnych, obliczano procentowy współczynnik zmian liczebności endosymbiontów wyrażony wzorem:

$$N_{\%} = \frac{N_n}{N_0} \times 100\%$$

- gdzie: $N_{\%}$ – procentowy współczynnik zmian liczebności endosymbiontów
 N_n – przeciętna ilość endosymbiontów w jednej komórce *Paramecium bursaria* w danym dniu inkubacji
 N_0 – przeciętna ilość endosymbiontów w jednej komórce *Paramecium bursaria* przed rozpoczęciem eksperymentu

Wartości $N_{\%}$ wyznaczono w każdej serii dla 11 i 21 dnia inkubacji, a następnie obliczono wartości średnie ze wszystkich przeprowadzonych serii. Dane otrzymane dla poszczególnych szczepów bakterii desulfurykacyjnych porównano z danymi uzyskanymi dla szczepu kontrolnego stosując test *t* Studenta dla par wiązanych.

W przypadku pomiarów liczebności endosymbiontów, prowadzonych wrywkowo podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w obecności PABA i PHBA, nie obliczano współczynnika $N_{\%}$ ze względu na stosunkowo niewielką ilość danych. Z przeprowadzonych w określonym dniu inkubacji pięciu pomiarów w próbach badanych obliczano średnią, którą następnie porównywano z wartością średnią uzyskaną z pięciu pomiarów przeprowadzonych w próbce kontrolnej. Dla stwierdzenia statystycznej istotności wyników zastosowano test *t* Studenta dla prób niezależnych.

Wyniki dotyczące zmian liczebności bakterii desulfurykacyjnych w hodowli *Paramecium bursaria* poddano analizie statystycznej poprzez porównanie przeciętnych wartości współczynnika podziału bakterii (L) uzyskanych dla szczepów rozwijających się w obecności orzęsków z wartościami stwierdzonymi w próbach nie zawierających pierwotniaków. Wyniki zweryfikowano za pomocą testu *t* Studenta dla par wiązanych.

4. Możliwości rozwoju *Paramecium bursaria* w różnych warunkach środowiska

W celu określenia możliwości rozwoju orzęska *Paramecium bursaria* w obecności bakterii denitryfikacyjnych przeprowadzono cztery serie hodowli eksperymentalnych. Stwierdzono, że średnie wartości procentowego współczynnika podziałów komórkowych ($K_{0.5}$) pierwotniaka rozwijającego się na świetle w obecności bankowych szczepów denitryfikatorów wynoszą: 66,28% w przypadku szczepu *Thiobacillus denitrificans* DSM 807 oraz 56,48% dla szczepu *Paracoccus denitrificans* DSM 65. W obydwu przypadkach wartości te są statystycznie istotne (ryc. 5). Można zatem przyjąć, że w warunkach ciągłego oświetlenia bakterie denitryfikacyjne osłabiają intensywność rozwoju pierwotniaka.

W warunkach ciemniowych nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w rozwoju orzęska *Paramecium bursaria* hodowanego w obecności bakterii denitryfikacyjnych oraz w obecności szczepu kontrolnego. Dla szczepu *Thiobacillus denitrificans* DSM 807 średnia wartość $K_{0.5}$ wyniosła 98,56%, natomiast dla *Paracoccus denitrificans* DSM 65 – 101,88% (ryc. 24). Wynika z tego, że w warunkach ciemniowych obecność bankowych szczepów bakterii denitryfikacyjnych umożliwia rozwój pierwotniaka *Paramecium bursaria* w takim samym stopniu, jak obecność bakterii występujących w naturalnym środowisku życia tego orzęska.

Analizując wyniki dotyczące zmian koncentracji jonów azotanowych (V) podczas hodowli *Paramecium bursaria* w obecności bakterii denitryfikacyjnych (ryc. 6), stwierdzono we wszystkich próbach zdecydowaną tendencję spadkową. Jedynie w przypadku szczepu *Thiobacillus denitrificans* DSM 807, w hodowli prowadzonej na świetle zanotowano nieznaczny wzrost stężenia azotanów (V) w pierwszej połowie okresu inkubacji. W kolejnych dniach koncentracja jonów NO_3^- obniżyła się wyraźnie we wszystkich prowadzonych hodowlach. Na uwagę zasługuje fakt, że praktycznie przez cały okres inkubacji stężenie azotanów (V) w hodowlach zawierających bankowe szczepy denitryfikatorów było kilkukrotnie niższe niż w hodowlach kontrolnych. Z kolei w wszystkich hodowlach prowadzonych w warunkach ciągłego oświetlenia, uzyskane wyniki przekraczały wartości otrzymane dla hodowli ciemniowych. Podobnie przedstawiały się zmiany koncentracji jonów azotanowych (III) w prowadzonych hodowlach (ryc. 7). W kolejnych dniach inkubacji następowało obniżanie się koncentracji azotanów (III), zdecydowanie bardziej gwał-

towne w przypadku szczepów bankowych niż w próbach kontrolnych, w których początkowo doszło nawet do nieznaczego wzrostu stężenia. Podobnie jak w przypadku jonów azotanowych (V) wartości uzyskane w warunkach ciągłego oświetlenia były we wszystkich hodowlach wyższe niż wyniki otrzymane w warunkach ciemniowych. Z drugiej strony, we wszystkich hodowlach koncentracja jonów azotanowych (III) znacznie przewyższała koncentrację jonów azotanowych (V) przez większą część okresu inkubacji.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że obecność bakterii desulfurykacyjnych wpływa w istotny sposób na intensywność rozwoju orzęska *Paramecium bursaria*, przy czym wpływ ten jest wyraźnie zależny od warunków oświetlenia (ryc. 8). W warunkach ciągłego oświetlenia tylko dwa szczepy: *Desulfovibrio gigas* DSM 1382 i *Desulfovibrio sulfodismutans* DSM 3696 umożliwiały rozwój *Paramecium bursaria* na poziomie porównywalnym statystycznie z wynikami z prób kontrolnych. Obecność pozostałych szczepów wyraźnie obniżała tempo rozmnażania się orzęsków. Najsilniejsze hamowanie wzrostu populacji pierwotniaków w warunkach ciągłego oświetlenia miało miejsce w przypadku szczepu *Desulfosarcina variabilis* DSM 2060, dla którego średnia wartość procentowego współczynnika podziałów komórkowych orzęska wyniosła 36,58%.

Zupełnie inne wyniki uzyskano w próbach inkubowanych w warunkach ciemniowych. Statystycznie istotne obniżenie średniej wartości współczynnika K_{∞} stwierdzono w ciemności tylko dla szczepu *Desulfosarcina variabilis* DSM 2060 (70,68%). W hodowlach zawierających szczepy: *Desulfococcus multivorans* DSM 2059 i *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684 nie stwierdzono statystycznie istotnych zmian w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Obecność trzech pozostałych szczepów bakterii desulfurykacyjnych w hodowlach prowadzonych w ciemności spowodowała silne zwiększenie tempa wzrostu populacji *Paramecium bursaria*. Uzyskane wartości współczynnika K_{∞} wyniosły: 182,76% dla *Desulfovibrio gigas* DSM 1382; 161,26% dla *Desulfovibrio sulfodismutans* DSM 3696 oraz 200,92% dla *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771.

W prowadzonych równolegle masowych hodowlach *Paramecium bursaria*, w których określano dodatkowo liczebność bakterii oraz koncentrację jonów siarczanowych (VI), stwierdzono odwrotnie proporcjonalną zależność pomiędzy liczebnością pierwotniaków a liczebnością bakterii (ryc. 9–15). W większości prób w pierwszej połowie okresu inkubacji zanotowano wzrost współczynnika podziałów *Paramecium bursaria*, pokrywający się ze spadkiem liczebności bakterii. W dalszym przebiegu inkubacji zwykle stwierdzano obniżenie tempa rozwoju pierwotniaków przy jednoczesnym zwiększeniu się ilości bakterii. Zależności te wystąpiły zarówno w przypadku bankowych szczepów bakterii desulfurykacyjnych, jak i szczepu kontrolnego, pochodzącego z naturalnego środowiska życia *Paramecium bursaria*. W hodowli kontrolnej (ryc. 9) nie stwierdzono zmian koncentracji jonów siarczanowych (VI),

natomiast we wszystkich próbach zawierających bakterie desulfurykacyjne zanotowano wyraźny wzrost stężenia siarczanów (VI) zwłaszcza pod koniec okresu inkubacji (ryc. 10–15).

Interesujące wyniki uzyskano badając zmiany ilości endosymbiotycznych glonów *Chlorella sp.* w komórkach orzęsków *Paramecium bursaria*, inkubowanych w obecności bakterii desulfurykacyjnych. Stwierdzono, że w warunkach ciągłego oświetlenia bakterie redukujące siarczan wywierają wyraźny wpływ na liczebność endosymbiontów (ryc. 16). W pierwszej połowie okresu inkubacji odnotowano nieznaczny wzrost ilości endosymbiontów w komórkach orzęsków hodowanych w obecności szczepów *Desulfovibrio gigas* DSM 1382 i *Desulfovibrio sulfodismutans* DSM 3696 w porównaniu z hodowlami kontrolnymi. Nie stwierdzono jednak statystycznej istotności tych różnic. Natomiast po 21 dniach inkubacji wykazano statystycznie istotny spadek liczebności glonów w komórkach pierwotniaków inkubowanych w obecności czterech szczepów: *Desulfococcus multivorans* DSM 2059 (69,18% ilości początkowej), *Desulfosarcina variabilis* DSM 2060 (62,23%), *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684 (55,02%) i *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771 (57,33%). Stwierdzona w tym samym dniu średnia ilość endosymbiontów w komórkach orzęsków w hodowlach kontrolnych nie odbiegała w istotny sposób od ilości początkowej – wartość procentowego współczynnika zmian liczebności endosymbiontów ($N_{\%}$) wyniosła w tym przypadku 100,14%. Uzyskane wyniki są wysoce wiarygodne, gdyż statystyczną istotność wykazano przy stosunkowo niskim prawdopodobieństwie błędu I rodzaju: $0,01 > P > 0,02$ dla *Desulfococcus multivorans* DSM 2059; $0,02 > P > 0,05$ dla *Desulfosarcina variabilis* DSM 2060; $0,01 > P > 0,02$ dla *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684 i $0,001 > P > 0,01$ dla *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771.

W materiale inkubowanym w warunkach ciemniowych, po 11 dobach inkubacji stwierdzono wyraźny spadek liczebności endosymbiotycznych glonów we wszystkich próbach (ryc. 17). W hodowlach kontrolnych średnia wartość współczynnika $N_{\%}$ wyniosła 27,85% ilości początkowej, natomiast w hodowlach zawierających bakterie desulfurykacyjne – od 13,46% do 32,08% ilości początkowej. W przypadku szczepów: *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684 ($N_{\%} = 16,07\%$) i *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771 ($N_{\%} = 13,46\%$) zanotowane wartości były w sposób statystycznie istotny niższe od średniej wartości uzyskanej dla hodowli kontrolnych (przy poziomie istotności 0,05). Po przeniesieniu hodowli do warunków ciągłego oświetlenia stwierdzono intensywne zwiększanie się ilości endosymbiotycznych glonów we wszystkich próbach (ryc. 17). Pomiary wykonane w 21 dniu inkubacji wykazały, że w hodowlach kontrolnych liczebność endosymbiontów w komórkach *Paramecium bursaria* wzrosła do 87,30% ilości początkowej. Z kolei w próbach zawierających bakterie desulfurykacyjne odnotowano wartości $N_{\%}$ w zakresie od 86,04% (dla *Desulfovibrio sulfodismutans* DSM 3696) do 92,74% (dla *Desulfuromonas*

acetoxidans DSM 684). Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy pomiędzy wynikami uzyskanymi dla prób kontrolnych i dla hodowli zawierających poszczególne szczepy bakterii redukujących siarczan.

Pomiary liczebności bakterii desulfurykacyjnych w prowadzonych hodowlach wykazały, że w przypadku szczepów: *Desulfococcus multivorans* DSM 2059, *Desulfosarcina variabilis* DSM 2060, *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684 i *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771, obecność pierwotniaków wpływała na obniżenie ilości komórek bakteryjnych. Przeciętne wartości współczynnika podziałów komórkowych (L) wymienionych bakterii były wyraźnie niższe w hodowli orzęska *Paramecium bursaria* niż w pożywce sałatowej nie zawierającej pierwotniaków (ryc. 18). Statystyczną istotność tych różnic stwierdzono przy poziomie istotności 0,05. Rozwój bakterii *Desulfovibrio gigas* DSM 1382 i *Desulfovibrio sulfodismutans* DSM 3696 w pożywce sałatowej oraz w hodowli *Paramecium bursaria* przebiegał porównywalnie, nie wykazując statystycznie istotnych odchyżeń. We wszystkich próbach intensywność rozwoju bakterii desulfurykacyjnych w hodowlach *Paramecium bursaria* prowadzonych w warunkach ciągłego oświetlenia praktycznie pokrywała się z wynikami uzyskanymi dla ciemniowych hodowli orzęsków.

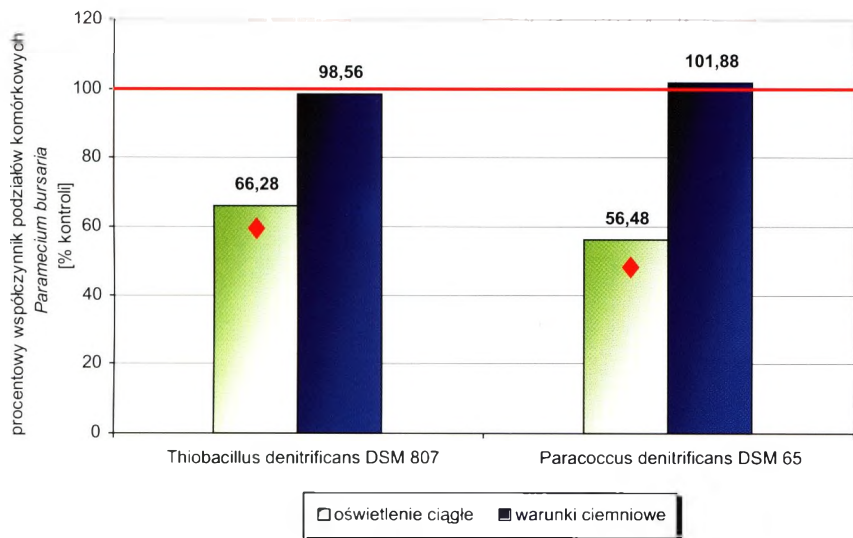
Stwierdzono, że naturalne produkty metabolizmu bakterii desulfurykacyjnych, wprowadzone do medium w postaci supernatantów uzyskanych z laboratoryjnych hodowli, wpływają na rozwój *Paramecium bursaria* w dość zróżnicowany sposób (ryc. 19).

Hamujące działanie supernatantów wykazano dla szczepów: *Desulfovibrio gigas* DSM 1382 i *Desulfococcus multivorans* DSM 2059 – zarówno w warunkach ciągłego oświetlenia, jak i w ciemności; *Desulfosarcina variabilis* DSM 2060 i *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684 – w warunkach ciągłego oświetlenia; *Desulfovibrio sulfodismutans* DSM 3696 – w warunkach ciemniowych.

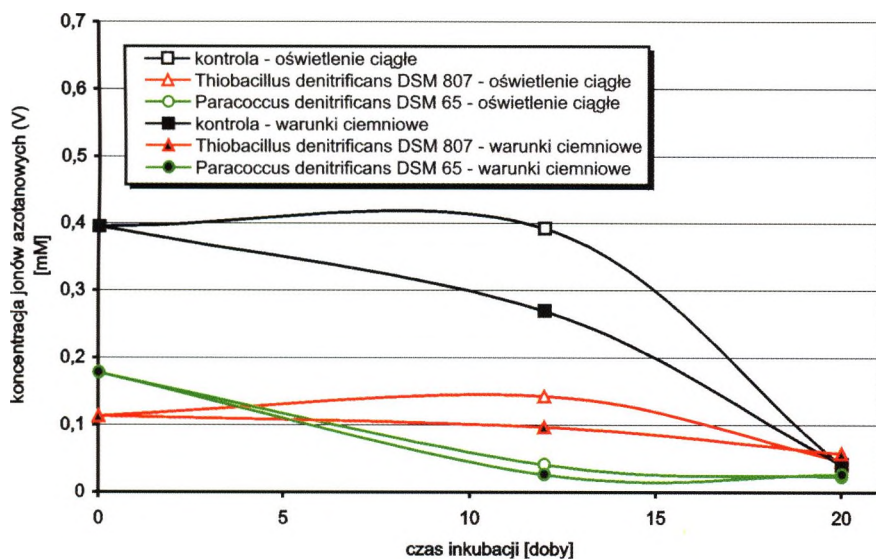
W warunkach ciągłego oświetlenia, w przypadku supernatantów uzyskanych z hodowli *Desulfovibrio sulfodismutans* DSM 3696 i *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771, otrzymane wartości współczynnika K_{∞} nie różniły się w sposób statystycznie istotny od wyników z hodowli kontrolnych. Analogiczna sytuacja miała miejsce w próbach inkubowanych w ciemności i zawierających supernatanty pochodzące z kultur *Desulfosarcina variabilis* DSM 2060 i *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684. Działanie wyraźnie stymulujące wykazano tylko w przypadku szczepu *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771, w warunkach ciemniowych ($K_{\infty} = 127,49\%$).

Inaczej przedstawiają się wyniki dotyczące możliwości rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności produktów metabolizmu bakterii desulfurykacyjnych, uzyskanych z laboratoryjnych hodowli na drodze ekstrakcji (ryc. 20).

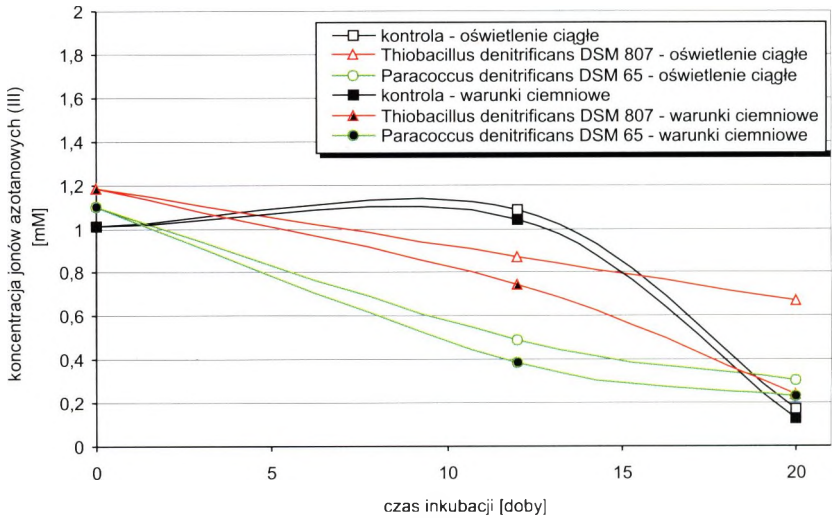
W warunkach ciągłego oświetlenia obecność ekstraktów zawierających naturalne metabolity większości zastosowanych szczepów bakteryjnych umożliwiła



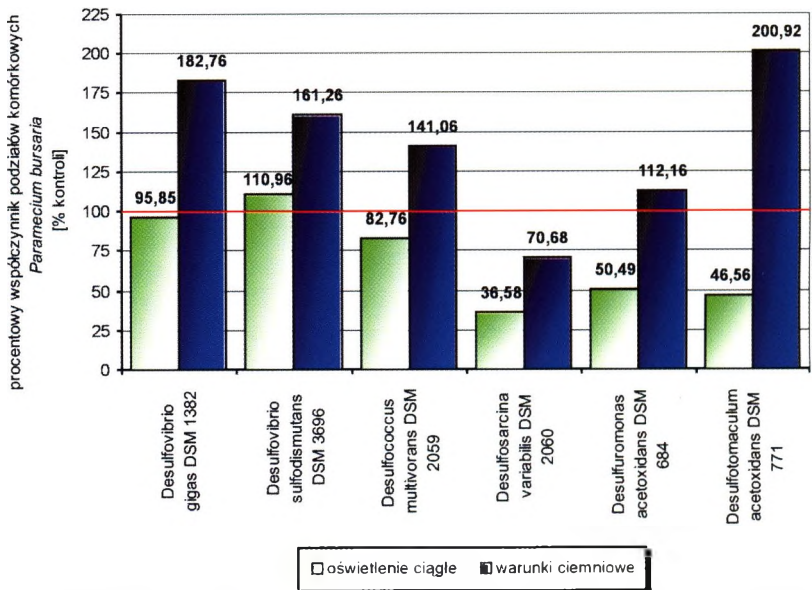
Ryc. 5. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności bakterii denitryfikacyjnych (♦ – wartości statystycznie istotne)



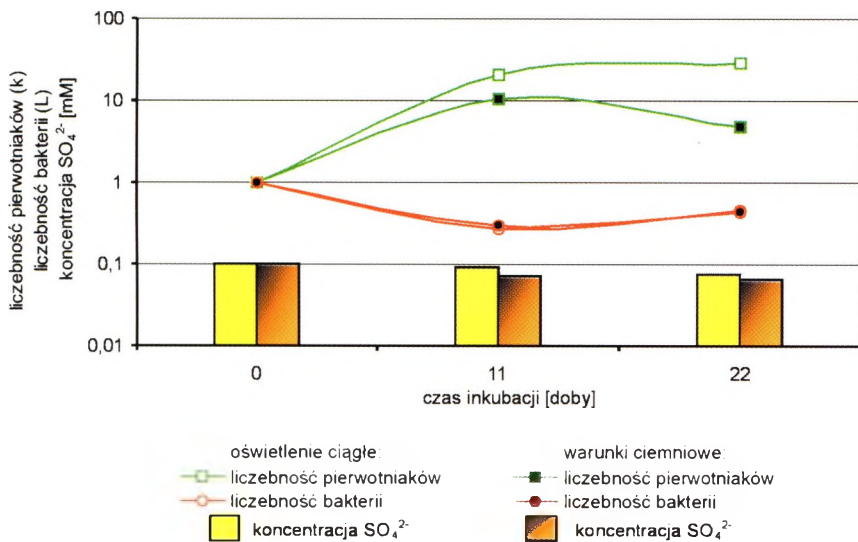
Ryc. 6. Zmiany koncentracji jonów azotanowych (V) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w obecności bakterii denitryfikacyjnych



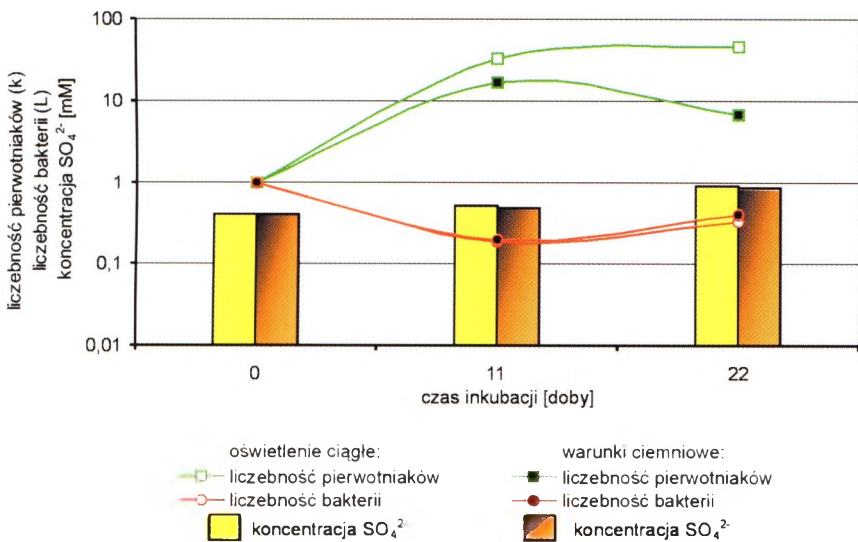
Ryc. 7. Zmiany koncentracji jonów azotanowych (III) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w obecności bakterii denitryfikacyjnych



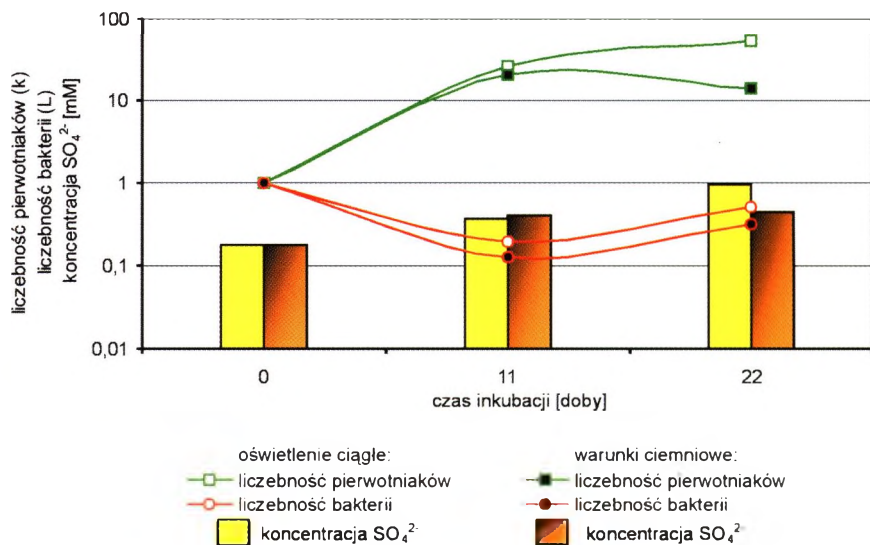
Ryc. 8. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności bakterii desulfurykacyjnych (♦ – wartości statystycznie istotne)



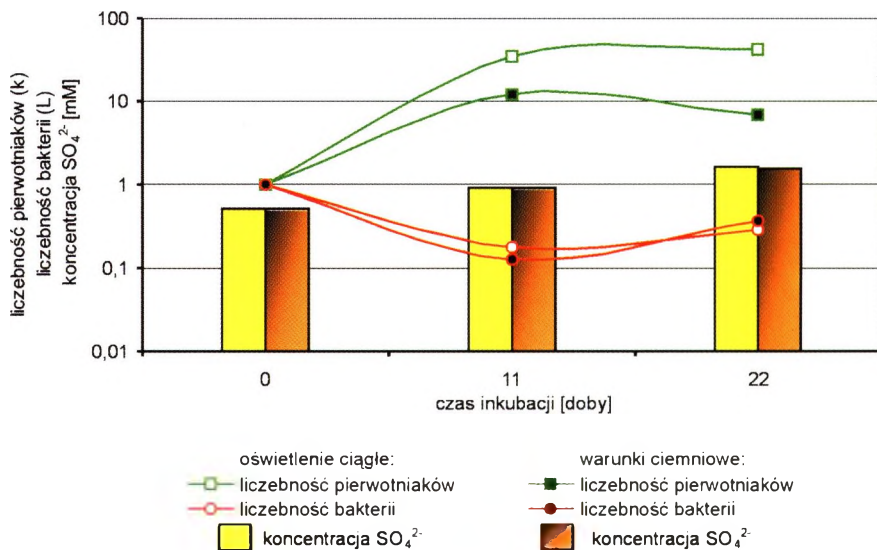
Ryc. 9. Zmiany liczebności pierwotniaków, liczebności bakterii i koncentracji jonów siarczanowych (VI) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w hodowli masowej, w obecności kontrolnego szczepu bakterii



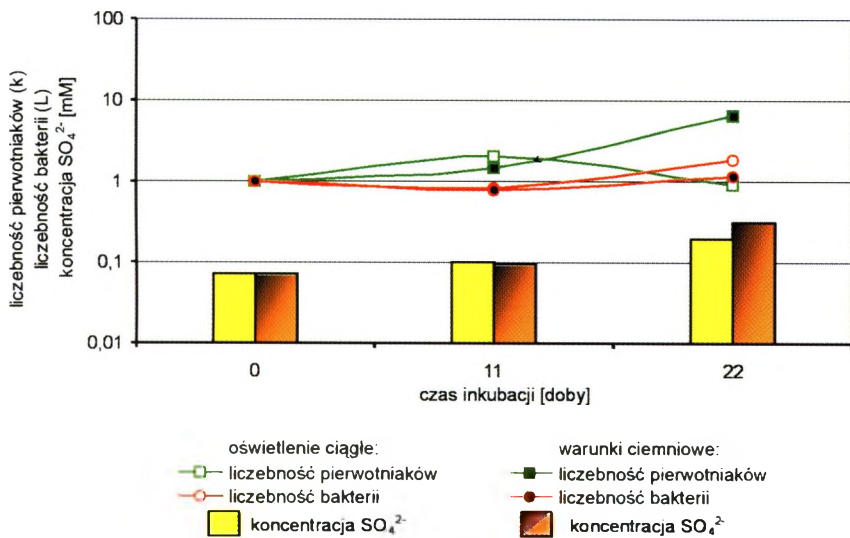
Ryc. 10. Zmiany liczebności pierwotniaków, liczebności bakterii i koncentracji jonów siarczanowych (VI) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w hodowli masowej, w obecności *Desultovibrio gigas* DSM 1382



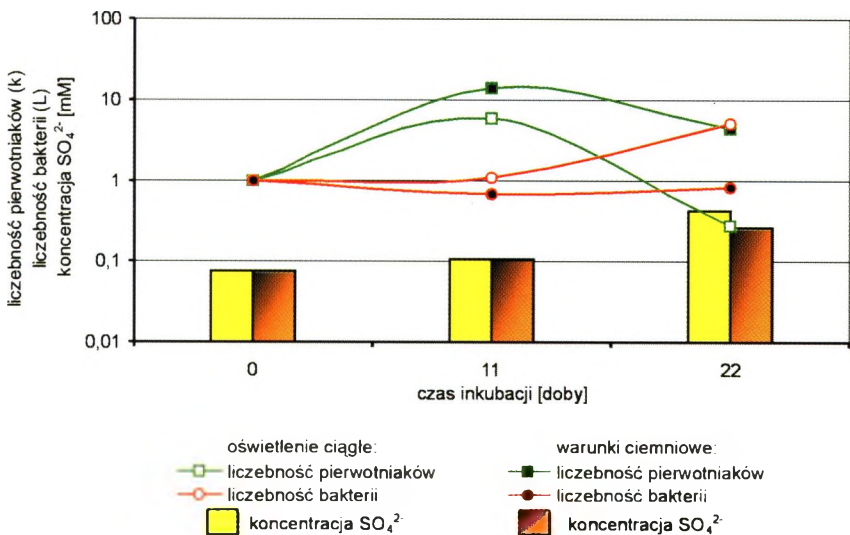
Ryc. 11. Zmiany liczebności pierwotniaków, liczebności bakterii i koncentracji jonów siarczanowych (VI) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w hodowli masowej, w obecności *Desulfovibrio sultodismutans* DSM 3696



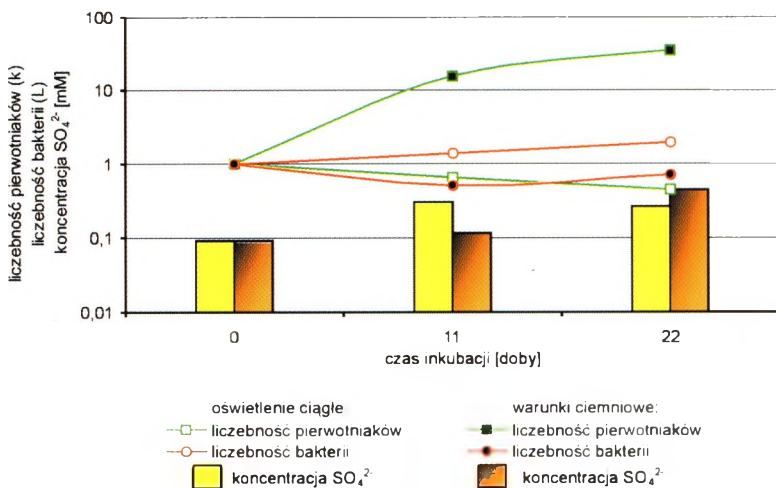
Ryc. 12. Zmiany liczebności pierwotniaków, liczebności bakterii i koncentracji jonów siarczanowych (VI) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w hodowli masowej, w obecności *Desulfococcus multivorans* DSM 2059



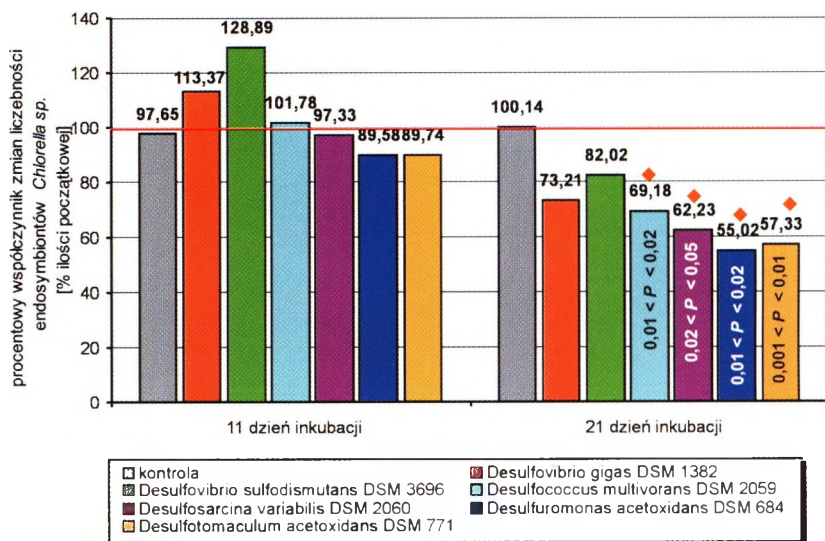
Ryc. 13. Zmiany liczebności pierwotniaków, liczebności bakterii i koncentracji jonów siarczanowych (VI) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w hodowli masowej, w obecności *Desulfosarcina variabilis* DSM 2060



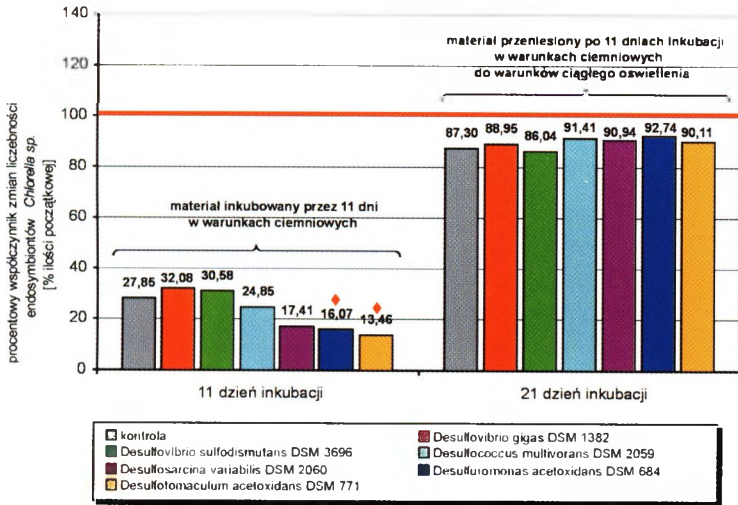
Ryc. 14. Zmiany liczebności pierwotniaków, liczebności bakterii i koncentracji jonów siarczanowych (VI) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w hodowli masowej, w obecności *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684



Ryc. 15. Zmiany liczebności pierwotniaków, liczebności bakterii i koncentracji jonów siarczanowych (VI) podczas inkubacji *Parametium bursaria* w hodowli masowej, w obecności *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771

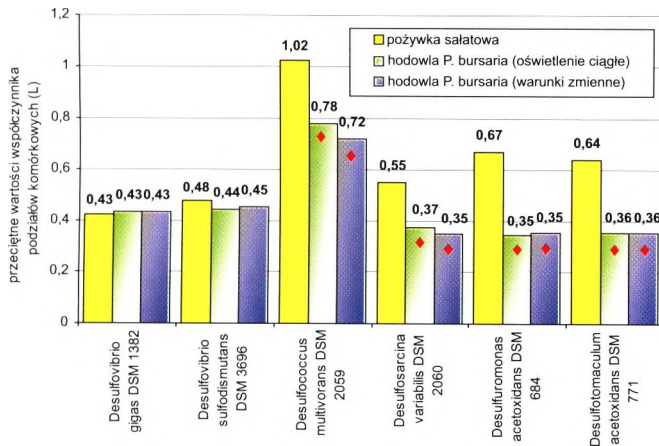


Ryc. 16. Zmiany liczebności endosymbiontów *Chlorella sp.* w komórkach *Parametium bursaria* po 11 i 21 dniach inkubacji pierwotniaków w obecności bakterii desulfurykacyjnych w oświetleniu ciągłym (♦ – wartości statystycznie istotne, poziomy istotności podane na wykresie)



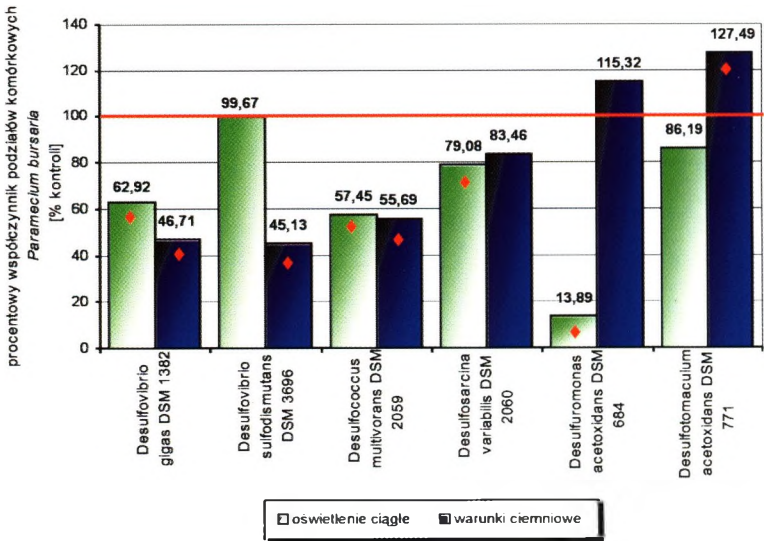
Ryc. 17. Zmiany liczebności endosymbiontów *Chlorella sp.* w komórkach *Paramecium bursaria* po 11 i 21 dniach inkubacji pierwotniaków w obecności bakterii desulfurykacyjnych w zmiennych warunkach oświetlenia

(♦ – wartości statystycznie istotne przy poziomie istotności 0,05; błąd I rodzaju: $0,02 < P < 0,05$)

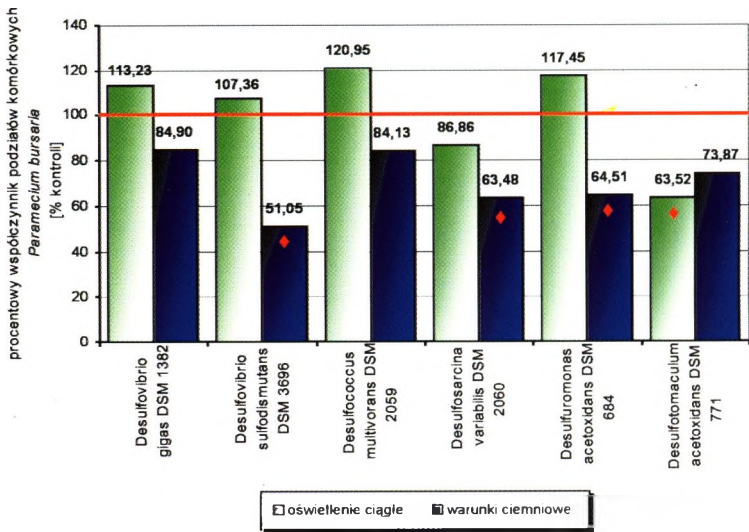


Ryc. 18. Przeciętne wartości współczynnika podziałów komórkowych bakterii desulfurykacyjnych podczas 21-dniowej inkubacji na pożywce sałatowej oraz w masowej hodowli orzęska *Paramecium bursaria*, prowadzonej w warunkach ciągłego oświetlenia oraz w warunkach zmiennych – do 11 dnia w ciemności, następnie w oświetleniu ciągłym

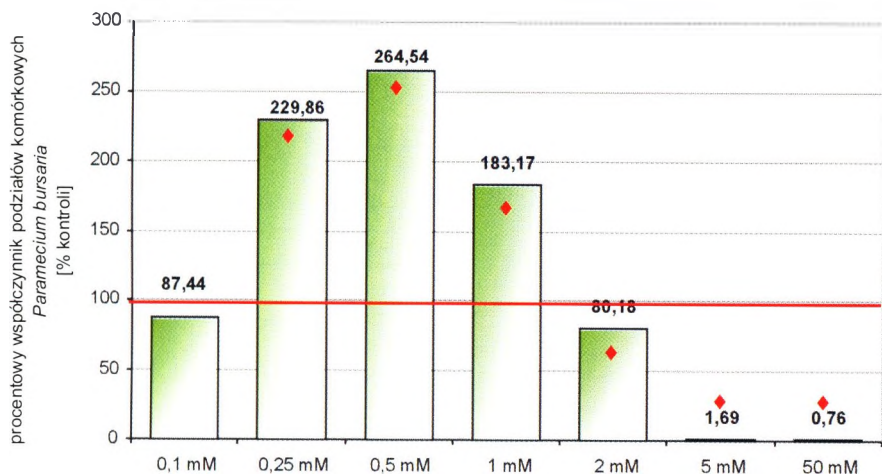
(♦ – wartości statystycznie istotne przy poziomie istotności 0,05; błąd I rodzaju: $0,02 < P < 0,05$)



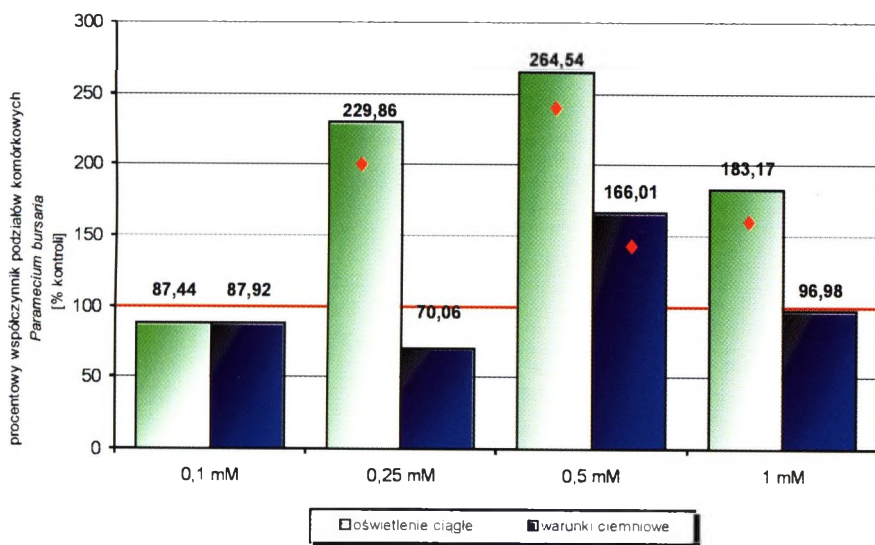
Ryc. 19. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności supernatantów uzyskanych z hodowli bakterii desulfurykacyjnych (♦ – wartości statystycznie istotne)



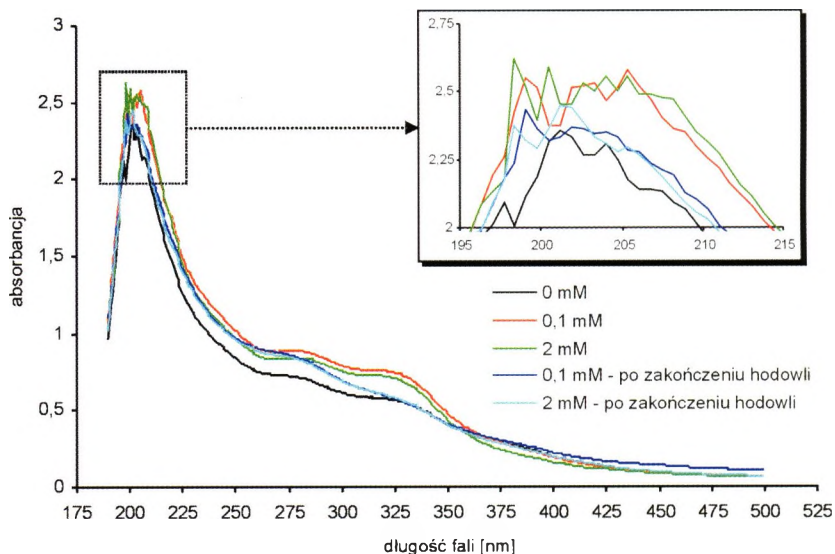
Ryc. 20. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności ekstraktów uzyskanych z hodowli bakterii desulfurykacyjnych (♦ – wartości statystycznie istotne)



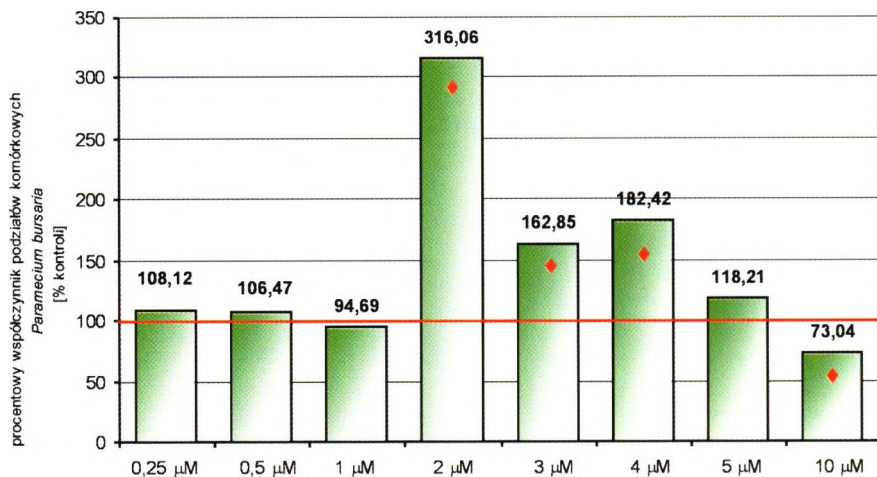
Ryc. 21. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności różnych stężeń kwasu glikolowego w warunkach ciągłego oświetlenia (♦ – wartości statystycznie istotne)



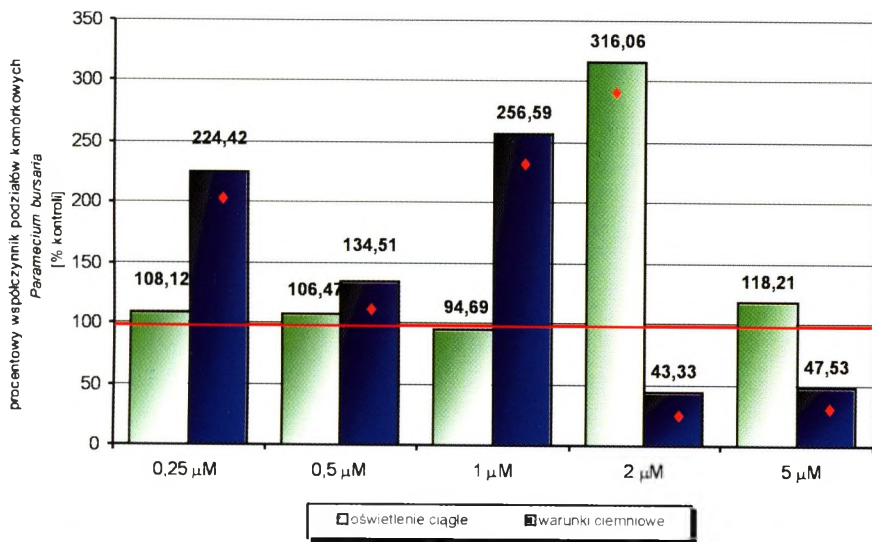
Ryc. 22. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności różnych stężeń kwasu glikolowego w zróżnicowanych warunkach oświetlenia (♦ – wartości statystycznie istotne)



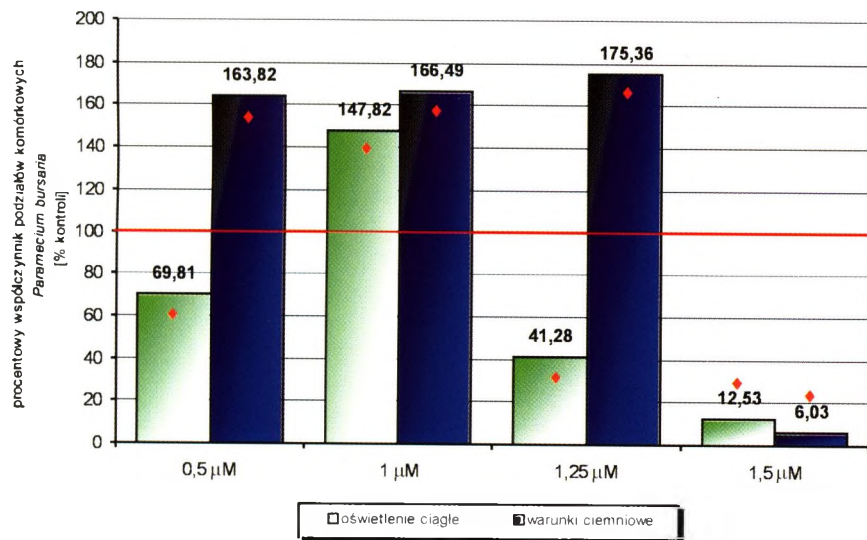
Ryc. 23. Widma absorpcyjne pożywki sałatowej zawierającej różne koncentracje kwasu glikolowego, wykonane przed rozpoczęciem hodowli *Paramecium bursaria* i po jej zakończeniu (spektrofotometr Cecil CE-8020)



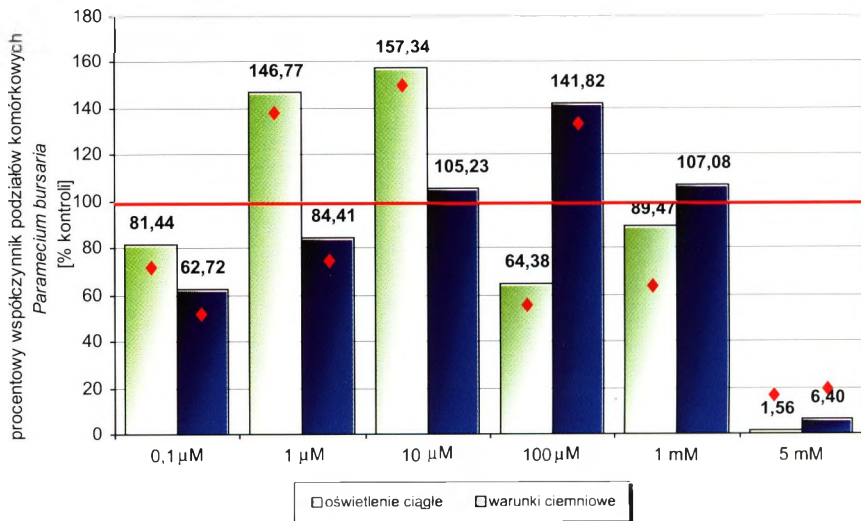
Ryc. 24. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności różnych stężeń kwasu cynamonowego w warunkach ciągłego oświetlenia (♦ – wartości statystycznie istotne)



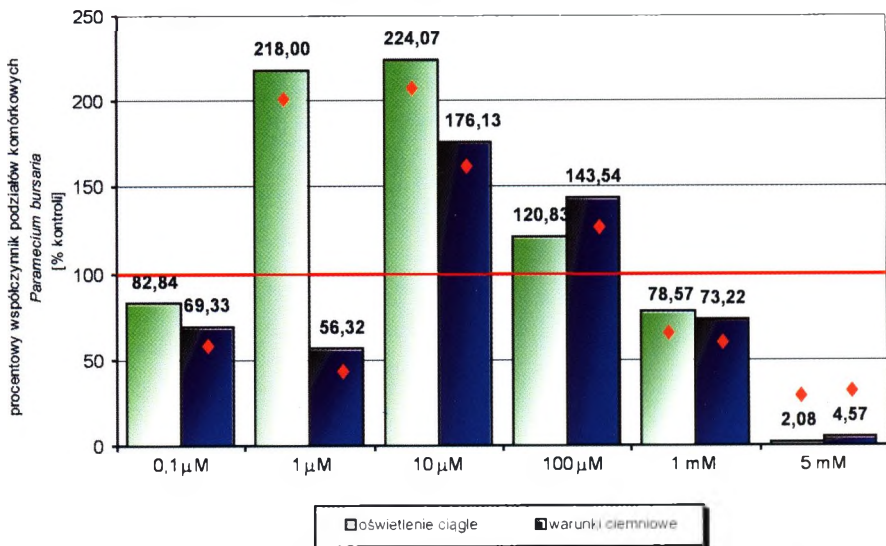
Ryc. 25. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności różnych stężeń kwasu cyjanowego w zróżnicowanych warunkach oświetlenia (♦ – wartości statystycznie istotne)



Ryc. 26. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności różnych stężeń kwasu ferulowego (♦ – wartości statystycznie istotne)



Ryc. 27. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności różnych stężeń kwasu *p*-aminobenzoowego (♦ – wartości statystycznie istotne)



Ryc. 28. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności różnych stężeń kwasu *p*-hydroksybenzoowego (♦ – wartości statystycznie istotne)

rozwój pierwotniaków na poziomie nie odbiegającym statystycznie od wyników uzyskanych w próbach kontrolnych. Jedynie w przypadku *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771 stwierdzono wpływ hamujący ($K_{50} = 63,52\%$).

W próbach ciemniowych statystycznie istotne obniżenie intensywności rozwoju orzęska *Paramecium bursaria* stwierdzono w obecności ekstraktów uzyskanych z hodowli *Desulf vibrio sulfodismutans* DSM 3696, *Desulfosarcina variabilis* DSM 2060 i *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684. W przypadku pozostałych szczepów bakterii desulfurykacyjnych rozwój orzęsków w warunkach ciemniowych, w obecności wprowadzonych ekstraktów nie odbiegał statystycznie od wyników z hodowli kontrolnych.

Możliwość rozwoju orzęska *Paramecium bursaria* w medium zawierającym kwas glikolowy przebadano w sześciu seriach eksperymentalnych. Początkowo hodowle prowadzono tylko w warunkach ciągłego oświetlenia przy dużym zróżnicowaniu stężenia zastosowanego związku. Stwierdzono bardzo silną stymulację rozwoju *Paramecium bursaria* przy następujących koncentracjach kwasu glikolowego: 0,25 mM ($K_{50} = 229,86\%$); 0,5 mM ($K_{50} = 264,54\%$); 1 mM ($K_{50} = 183,17\%$). Niższe stężenie nie wywierało statystycznie istotnego wpływu na intensywność rozwoju pierwotniaków, natomiast stężenia wyższe działały hamująco (ryc. 21).

W dalszej części eksperymentu wprowadzono równolegle próby inkubowane w ciemności. W próbach tych statystycznie istotny wzrost intensywności rozwoju orzęsków odnotowano tylko przy zastosowaniu kwasu glikolowego w stężeniu 0,5 mM. Uzyskana wartość współczynnika K_{50} (166,01%) była jednak zdecydowanie niższa niż w równoległych hodowlach prowadzonych na świetle (ryc. 22). Pozostałe stężenia kwasu glikolowego nie powodowały istotnych zmian tempa rozwoju pierwotniaków inkubowanych w ciemności.

W celu uzyskania danych dotyczących zmian koncentracji kwasu glikolowego w prowadzonych hodowlach wykonano spektrofotometryczną analizę pożywki sałatowej zawierającej różne stężenia kwasu glikolowego. Porównanie widm absorpcyjnych uzyskanych przed rozpoczęciem hodowli *Paramecium bursaria* i po jej zakończeniu pozwoliło na stwierdzenie interesujących zależności przy długości fali 195–215 nm (ryc. 23). Wykazano, że wprowadzenie kwasu glikolowego do pożywki sałatowej powoduje niewielki wzrost wartości absorbancji w wymienionym zakresie. Jednak w widmach absorpcyjnych wykonanych po zakończeniu hodowli *Paramecium bursaria* w pożywce zawierającej kwas glikolowy nie stwierdzono takiej tendencji; uzyskana absorbancja w zakresie długości fali 195–215 nm nie odbiegała w sposób istotny od wartości stwierdzonych w pożywce sałatowej nie zawierającej kwasu glikolowego. Można przypuszczać na tej podstawie, że podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w obecności kwasu glikolowego dochodzi do obniżania koncentracji tego związku w medium.

Wpływ kwasu cynamonowego na rozwój orzęska *Paramecium bursaria* określano w pierwszym etapie badań w kulturach eksponowanych na światło (ryc. 24). Stwierdzono statystycznie istotny wzrost intensywności rozwoju pierwotniaków przy zastosowaniu kwasu cynamonowego w koncentracjach: 2 μM ; 3 μM ; 4 μM . Najsilniejszą stymulację ($K_{\%} = 316,06\%$) wykazano w przypadku stężenia 2 μM . Stężenie 5 μM nie wywierało istotnego wpływu na rozwój orzęsków, natomiast przy stężeniu wyższym (10 μM) zanotowano hamowanie wzrostu populacji. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności niskich stężeń kwasu cynamonowego (0,25 μM ; 0,5 μM ; 1 μM) nie odbiegała w sposób statystycznie istotny od wyników uzyskanych w hodowlach kontrolnych. W dalszej części eksperymentu przebadano również wpływ kwasu cynamonowego na pierwotniaki hodowane w ciemności. Uzyskane wyniki różnią się w istotny sposób od danych otrzymanych dla prób inkubowanych przy ciągłym oświetleniu (ryc. 25). W warunkach ciemniowych stwierdzono wyraźną stymulację rozwoju *Paramecium bursaria* w hodowlach zawierających najniższe koncentracje kwasu cynamonowego (0,25 μM ; 0,5 μM ; 1 μM). W przypadku stężeń wyższych niż 1 μM odnotowano statystycznie istotne działanie hamujące.

Nie powiodła się próba spektrofotometrycznego oznaczania zmian koncentracji kwasu cynamonowego w prowadzonych hodowlach *Paramecium bursaria*. Nie stwierdzono bowiem wystarczająco istotnych różnic w widmach absorpcyjnych pożywki sałatowej zawierającej różne koncentracje badanego związku.

Rozwój *Paramecium bursaria* w obecności kwasu ferulowego (pochodnej kwasu cynamonowego) zbadano w czterech seriach hodowlanych, podczas których prowadzono inkubację pierwotniaków równolegle w warunkach ciągłego oświetlenia i w ciemności (ryc. 26).

Stwierdzono, że w próbach eksponowanych na światło oddziaływanie kwasu ferulowego na orzęski jest w bardzo dużym stopniu uzależnione od zastosowanego stężenia. Statystycznie istotny wzrost intensywności rozwoju pierwotniaków zanotowano jedynie przy koncentracji kwasu ferulowego 1 μM . Stosunkowo niewielka zmiana stężenia powodowała wyraźne osłabienie intensywności wzrostu populacji. W warunkach ciągłego oświetlenia efekt taki wykazano dla prób zawierających kwas ferulowy w koncentracji 0,5 μM oraz 1,25 μM . Odmienne wyniki uzyskano dla hodowli prowadzonych w ciemności. W próbach tych stwierdzono silną stymulację rozwoju *Paramecium bursaria* przy stężeniach kwasu ferulowego: 0,5 μM ($K_{\%} = 163,82\%$), 1 μM ($K_{\%} = 166,49\%$), 1,25 μM ($K_{\%} = 175,36\%$). We wszystkich trzech przypadkach uzyskano zbliżone wartości procentowego współczynnika podziałów komórkowych. Przy koncentracji kwasu ferulowego 1,5 μM odnotowano efekt letalny we wszystkich prowadzonych hodowlach niezależnie od warunków oświetlenia.

Przeprowadzone badania wykazały możliwość wzrostu populacji *Paramecium bursaria* w obecności określonych koncentracji kwasu *p*-aminobenzoesowego (PABA). Stwierdzono przy tym istotny wpływ warunków oświetlenia na zdolność wykorzystania tego związku przez badany kompleks symbiotyczny (ryc. 27).

W hodowlach prowadzonych w warunkach ciągłego oświetlenia odnotowano statystycznie istotny wzrost wartości współczynnika K_{∞} w obecności kwasu *p*-aminobenzoowego w stężeniu 1 μM ($K_{\infty} = 146,77\%$) oraz 10 μM ($K_{\infty} = 157,34\%$). Pozostałe stężenia powodowały obniżenie intensywności rozwoju pierwotniaków. Całkowite zahamowanie wzrostu populacji wystąpiło przy koncentracji PABA 5 mM. W warunkach ciemniowych efekt stymulacji stwierdzono przy wyższej koncentracji badanego związku – 100 μM ($K_{\infty} = 141,82\%$). Stężenia: 10 μM i 1 mM nie wywarły statystycznie istotnego wpływu na tempo wzrostu *Paramecium bursaria*. Przy zastosowaniu niższych koncentracji kwasu *p*-aminobenzoowego w hodowlach ciemniowych (1 μM ; 0,1 μM) wykazano działanie lekko hamujące, natomiast stężenie 5 mM okazało się letalne (podobnie jak w warunkach ciągłego oświetlenia). Dla prób inkubowanych w warunkach ciągłego oświetlenia przy koncentracji kwasu *p*-aminobenzoowego 1 μM przeprowadzono dodatkowo pomiary liczebności endosymbiontów w komórkach *Paramecium bursaria*. Miało to na celu wyjaśnienie, czy zastosowany związek może wpływać bezpośrednio na liczebność komórek glonów. Pomiary przeprowadzone w 11 dobie inkubacji wykazały nieznaczny wzrost przeciętnej ilości endosymbiontów w porównaniu z danymi otrzymanymi dla hodowli kontrolnej. Jednak po zweryfikowaniu wyników za pomocą testu *t* Studenta dla prób niezależnych nie stwierdzono statystycznej istotności uzyskanej różnicy.

Wyniki uzyskane po wprowadzeniu kwasu *p*-hydroksybenzoowego (PHBA) do hodowli *Paramecium bursaria* są w dużym stopniu porównywalne z danymi otrzymanymi dla PABA, chociaż wykazano także pewne różnice (ryc. 28). Podobnie jak w przypadku kwasu *p*-aminobenzoowego stwierdzono, że PHBA wpływa stymulująco na rozwój orzęsków w stosunkowo wąskim zakresie stężeń. Ponadto oddziaływanie tego związku jest ściśle związane z warunkami oświetlenia. W kulturach prowadzonych na świetle statystycznie istotny wzrost intensywności rozwoju orzęsków wykazano przy stężeniach niższych (5 μM ; 10 μM) niż w hodowlach ciemniowych (10 μM ; 100 μM). W odróżnieniu od wyników uzyskanych dla PABA kwas *p*-hydroksybenzoowy w koncentracji 1 μM nie wywierał statystycznie istotnego wpływu na wzrost populacji w warunkach ciągłego oświetlenia. Z kolei stężenie 10 μM wywołało efekt stymulujący zarówno w hodowlach eksponowanych na światło, jak i ciemniowych. Stwierdzono także, że kwas *p*-hydroksybenzoowy w stężeniach wyższych niż 100 μM obniżał tempo rozwoju *Paramecium bursaria* niezależnie od warunków oświetlenia, a przy koncentracji 5 mM – tak jak przy zastosowaniu PABA – powodował efekt letalny.

W próbach zawierających PHBA w koncentracji 10 μM , w których stwierdzono najsilniejszą stymulację rozwoju orzęsków, przeprowadzono także pomiary liczebności endosymbiontów *Chlorella sp.* w komórkach *Paramecium bursaria*. Podobnie jak w przypadku kwasu *p*-aminobenzoowego, wyniki uzyskane po 11 dobach inkubacji dla hodowli prowadzonych na świetle nie odbiegały w sposób statystycznie istotny od danych otrzymanych w hodowlach kontrolnych.

5. Metabolizm związku symbiotycznego *Paramecium bursaria* jako wyraz zdolności adaptacyjnych

Symbiotyczny układ, jaki tworzy pierwotniak *Paramecium bursaria* wraz z obecnymi w jego cytoplazmie komórkami glonów *Chlorella sp.* stanowi bardzo specyficzny obiekt badawczy. Jest to bowiem układ złożony z dwóch zasadniczo odmiennych komponentów: pojedynczej komórki heterotroficznej oraz zespołu endosymbiotycznych komórek fotoautotroficznych (Pado 1978). Z drugiej jednak strony kompleks ten stanowi trwały i w dużym stopniu stabilny związek symbiotyczny, którego wszystkie cechy są wynikiem nałożenia się właściwości organizmu heterotroficznego i autotroficznego (Pado 1978; Trench 1979, 1992; Iwatsuki, Naitoh 1981, 1988; Iwatsuki i wsp. 1998; Pado, Bator 2001). Dlatego też interpretowanie wyników jakichkolwiek badań dotyczących orzęska *Paramecium bursaria* jest problemem niezmiernie złożonym i wymaga rozpatrywania bardzo różnorodnych aspektów biologii tego organizmu.

Interpretacja wyników uzyskanych w niniejszych badaniach wymaga ponadto uwzględnienia zróżnicowanych metod, jakie stosowano przy oddziaływaniu na *Paramecium bursaria* dwojakiego rodzaju czynnikami – biologicznymi i chemicznymi. W przypadku czynników biologicznych – bankowych szczepów bakterii denitryfikacyjnych i desulfurykacyjnych oraz naturalnych produktów metabolizmu desulfurykatorów – wprowadzono je do medium w miejsce bakterii występujących w naturalnym środowisku życia pierwotniaka. Rozwój *Paramecium bursaria* w takich hodowlach porównywano z rozwojem w próbach kontrolnych, w których bakterie wyizolowane ze środowiska życia orzęska były obecne. Uzyskanie w takiej sytuacji wyników nie różniących się od siebie w sposób statystycznie istotny należy interpretować jako korzystny wpływ zastosowanego czynnika, ponieważ w jego obecności intensywność rozwoju populacji orzęsków jest taka sama jak w obecności kontrolnego szczepu bakterii. Odmienna sytuacja ma miejsce przy interpretowaniu wyników dotyczących oddziaływania różnych związków chemicznych na rozwój *Paramecium bursaria*. Wszystkie zastosowane związki wprowadzono bowiem do pożywki sałatowej, którą wcześniej zaszczepiano bakteriami pochodzącymi z naturalnego środowiska życia pierwotniaka (procedurę taką przyjęto ze względu na wyniki wcześniejszych badań (Pado, Bator 2001), w których wykazano, że pożywka sałatowa pozbawiona materiału bakteryjnego może działać letalnie na komórki *Paramecium bursaria*). W takim przypadku stwierdzenie braku statystycznie istotnych różnic między danymi uzyskanymi dla badanych prób oraz

dla hodowli kontrolnej należy odczytywać jako brak wpływu danego związku chemicznego na rozwój orzęska.

Wyniki, jakie otrzymano badając możliwość rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności bankowych szczepów bakterii denitryfikacyjnych wskazują, że pierwotniak ten może wykorzystywać komórki denitryfikatorów jako pokarm bakteryjny, zwłaszcza w warunkach ciemniowych. Może to potwierdzać wysuwane już wcześniej przypuszczenie, że w naturalnych warunkach *Paramecium bursaria* odżywia się bakteriami należącymi do tej właśnie grupy (Pado, Bator 2001). Jednak osłabienie intensywności rozwoju badanego orzęska, jakie stwierdzono w warunkach ciągłego oświetlenia w obecności bakterii denitryfikacyjnych nie pozwala na ostateczne przyjęcie takiej hipotezy. Można przypuszczać, że w naturalnym środowisku życia pierwotniak *Paramecium bursaria* odżywia się zróżnicowanym pokarmem bakteryjnym, w skład którego wchodzi między innymi bakterie denitryfikacyjne, nie są to jednak jedyne drobnoustroje wykorzystywane przez tego orzęska. Nie można także wykluczyć, że bakterie wyizolowane ze środowiska życia *Paramecium bursaria* i stosowane w niniejszych badaniach jako szczep kontrolny stanowią kulturę niejednorodną pod względem gatunkowym. Nie udało się bowiem dotychczas jednoznacznie zidentyfikować tych drobnoustrojów. Stwierdzono, co prawda, że bakterie te bardzo dobrze rozwijają się na podłożu Giltaya, które stanowi typowe podłoże dla denitryfikatorów (Pado, Bator 2001), jednak uzyskane w niniejszych badaniach wyniki wskazują na istotne różnice pomiędzy bakteriami występującymi w naturalnym środowisku życia *Paramecium bursaria* a bankowymi szczepami bakterii denitryfikacyjnych. Różnice te dotyczą również koncentracji jonów azotanowych (V) i azotanowych (III) w medium. Koncentracja ta w przypadku szczepu kontrolnego jest znacznie wyższa, co oznacza mniejszą efektywność procesu denitryfikacji.

Stwierdzenie wyższych stężeń jonów azotanowych (V) i azotanowych (III) we wszystkich próbach inkubowanych na świetle w porównaniu z hodowlami ciemniowymi wskazuje na intensywniejsze zachodzenie procesu denitryfikacji w ciemności. W światowej literaturze brak jakichkolwiek danych na temat wpływu warunków oświetlenia na proces redukcji jonów azotanowych (V). Biorąc jednak pod uwagę fakt, że w badanym układzie oddziaływanie światła wiąże się z zachodzeniem procesu fotosyntezy w komórkach endosymbiontów można założyć, że czynnikiem osłabiającym efektywność denitryfikacji jest zwiększona zawartość tlenu, będąca wynikiem fotosyntetycznej aktywności glonów. Obniżenie wydajności procesu denitryfikacji przy zwiększonej zawartości tlenu wykazali między innymi: Pado i wsp. (1995) oraz Satoh i wsp. (2003). Tym także należałoby tłumaczyć niewielki wzrost koncentracji jonów azotanowych (V) jaki zanotowano dla szczepu *Thiobacillus denitrificans* DSM 807 w początkowym okresie inkubacji w warunkach ciągłego oświetlenia.

Porównując koncentrację jonów azotanowych (V) i azotanowych (III) we wszystkich prowadzonych hodowlach stwierdzono znacznie wyższe stężenie

azotanów (III) stanowiących produkt pierwszego etapu procesu denitryfikacji. Pozwala to przypuszczać, że dalsze etapy prowadzące do obniżenia zawartości jonów NO_2^- zachodzą w badanych kulturach ze znacznie mniejszą efektywnością. Niewykluczone, że pożywka салатowa nie zapewnia optymalnych warunków dla rozwoju denitryfikatorów, czego wynikiem jest obniżenie wydajności procesów metabolicznych tych drobnoustrojów.

Badając możliwość koegzystencji pierwotniaka *Paramecium bursaria* z bakteriami redukującymi siarczyn stwierdzono, że mikroorganizmy te również mogą stanowić substancję pokarmową dla orzęska. Potwierdzają to wyniki dotyczące zarówno tempa rozwoju pierwotniaka, jak i zmian liczebności desulfurykatorów. Spadek liczebności bakterii powiązany ze wzrostem ilości orzęsków może bowiem świadczyć o konsumowaniu komórek bakteryjnych przez *Paramecium bursaria*.

Zanotowano istotne różnice w oddziaływaniu poszczególnych gatunków desulfurykatorów na tempo wzrostu populacji pierwotniaków. Wykazano ponadto, że intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności bakterii desulfurykacyjnych jest znacznie wyższa w warunkach ciemniowych niż na świetle. Tylko jeden z sześciu zastosowanych szczepów bakteryjnych (*Desulfosarcina variabilis* DSM 2060) powodował w ciemności nieznaczne osłabienie rozwoju pierwotniaka, podczas gdy w warunkach ciągłego oświetlenia efekt taki zanotowano dla czterech gatunków bakterii. Są to wyniki analogiczne do otrzymanych dla bakterii denitryfikacyjnych. Uzyskanie zbliżonych danych przy zastosowaniu dwóch różnych grup bakterii – denitryfikacyjnych i desulfurykacyjnych – pozwala przypuszczać, że w obydwu przypadkach może działać podobny mechanizm, który powoduje, że pierwotniak *Paramecium bursaria* znacznie łatwiej przystosowuje się do odżywiania nowym rodzajem pokarmu bakteryjnego w warunkach ciemniowych. Każda grupa bakterii może charakteryzować się odmiennym składem chemicznym komórek. Wiąże się to między innymi z gromadzeniem pośrednich i końcowych produktów metabolizmu oraz z obecnością białek enzymatycznych charakterystycznych dla danej grupy bakterii. Przypuszczalnie fakt ten pociąga za sobą konieczność odpowiedniej przebudowy aparatu enzymatycznego w komórce orzęska, w celu uzyskania możliwości trawienia określonych komórek bakteryjnych i wykorzystywania zawartych w nich związków chemicznych. Uzyskane w niniejszych badaniach dane sugerują, że takie przeorganizowanie metabolizmu komórki pierwotniaka prawdopodobnie znacznie łatwiej zachodzi w warunkach ciemniowych.

Odmienne skład chemiczny komórek różnych gatunków bakterii może także stanowić wyjaśnienie zróżnicowanej intensywności rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności poszczególnych szczepów bakteryjnych. Dużą różnorodność związków chemicznych wchodzących w skład zewnętrznych struktur komórkowych u różnych gatunków bakterii desulfurykacyjnych wykazano w licznych badaniach prowadzonych w Zakładzie Mikrobiologii Akademii Pedagogicznej

w Krakowie (Pado i wsp. 1996; Pado, Pawłowska-Ćwiąg 1997a, 1997b; Pawłowska-Ćwiąg, Pado 1996, 1997a, 1997b). Wyniki tych badań wskazują ponadto, że istotnym składnikiem osłon komórkowych u bakterii desulfurykacyjnych są węglowodany. Stanowi to dodatkowe potwierdzenie hipotezy o zależności pomiędzy intensywnością rozwoju *Paramecium bursaria* i składem chemicznym komórek bakteryjnych stanowiących pożywienie orzęska. W ciemności pokarm bakteryjny staje się bowiem dla pierwotniaka jedynym źródłem węglowodanów, ponieważ endosymbionty nie prowadzą w takich warunkach procesu fotosyntezy (Pado 1965; Pado, Bator 2001). Wynika stąd, że możliwość odżywiania się orzęska różnymi gatunkami bakterii może zależeć od zawartości cukrów w strukturach komórkowych drobnoustrojów. Istotną rolę odgrywać może również dostępność tych związków, a więc przede wszystkim sposób ich związania w komórce bakteryjnej. Analizując szczegółowo uzyskane wyniki, stwierdzono jeszcze jedną zależność mogącą potwierdzać powyższe wnioski. Najsilniejszą stymulację rozwoju *Paramecium bursaria* w warunkach ciemniowych wykazano w obecności bakterii *Desulfotomaculum acetoxidans*. Gatunek ten, jako jedyny z zastosowanych, charakteryzuje się obecnością ściany komórkowej o budowie typowej dla bakterii gramododatnich (Holt i wsp. 1994), a więc zawierającej znacznie większą ilość peptydoglikanu (zaliczanego do polisacharydów) w porównaniu z komórkami bakterii gramujemnych.

Zaskakujące okazały się wyniki pomiarów koncentracji jonów siarczanowych (VI) w prowadzonych hodowlach. Ze względu na obecność bakterii redukujących siarczany oczekiwano stopniowego obniżania się stężenia tych jonów, stanowiących substrat metabolizmu dla desulfurykatorów. Stwierdzono jednak, że wprowadzenie bakterii desulfurykacyjnych do hodowli orzęska *Paramecium bursaria* powoduje wyraźny wzrost koncentracji jonów siarczanowych (VI) w medium, zwłaszcza w końcowym okresie inkubacji. Wyniki te są jednoznaczne, gdyż uzyskano je dla wszystkich zastosowanych szczepów desulfurykatorów (niezależnie od warunków oświetlenia), natomiast w hodowlach kontrolnych, zawierających bakterie wyizolowane z naturalnego środowiska życia orzęska *Paramecium bursaria* nie wykazano takiej tendencji. Zjawisko to można wytłumaczyć, opierając się na wynikach badań, jakie w ostatnich latach uzyskano w Zakładzie Mikrobiologii AP w Krakowie (Pawłowska-Ćwiąg, dane niepublikowane). Wyniki te pozwalają przypuszczać, że bakterie redukujące siarczany mogą gromadzić w zewnętrznych strukturach komórkowych jony siarczanowe (VI), siarczanowe (IV), a także tiosiarczanowe jako swoistą rezerwę substratową szlaku redukcji siarczanów. Wiele danych wskazuje na to, że jony te prawdopodobnie występują w formie podstawników sulfonowych w cząsteczkach polisacharydów tworząc mukopolisacharydy. Można zatem założyć, że podczas trawienia komórek SRB przez enzymy komórki *Paramecium bursaria* następuje hydrolizowanie wiązań estrowych pomiędzy sacharydami i resztami sulfonowymi w cząsteczkach mukopolisacharydów. Cukry są następnie wykorzysty-

wane przez komórkę pierwotniaka, natomiast reszty sulfonowe zostają wydalone do medium w postaci jonów siarczanowych (VI).

Bliższych danych na temat relacji metabolicznych między orzęskiem *Paramecium bursaria* i bakteriami desulfurykacyjnymi dostarczyły wyniki badań dotyczących wpływu desulfurykatorów na liczebność endosymbiontów *Chlorella sp.* w komórkach orzęsków. Jak stwierdzono, obecność czterech spośród sześciu zastosowanych szczepów bakteryjnych powoduje statystycznie istotne obniżenie liczby symbiotycznych glonów w komórkach pierwotniaków inkubowanych na świetle. Wyniki te są dosyć nieoczekiwane, ponieważ dotychczas uznawano, że głównym czynnikiem powodującym zmiany liczebności endosymbiontów w komórkach *Paramecium bursaria* jest oddziaływanie światła (Pado 1965, 1978; Pado, Bator 2001). Uzyskane w niniejszych badaniach dane cechują się jednak wysoką wiarygodnością, co stwierdzono przy zastosowaniu odpowiednich testów statystycznych. Nie ulega zatem wątpliwości, że w obecności niektórych gatunków bakterii desulfurykacyjnych orzęsek *Paramecium bursaria* redukuje do pewnego stopnia ilość endosymbiontów, pomimo optymalnych warunków oświetlenia.

Przyczyną tego zjawiska może być konieczność szybkiego uzyskania energii przez komórkę pierwotniaka, w celu przeprowadzenia syntezy i sekrecji odpowiednich enzymów, które – jak wspomniano wcześniej – mogą umożliwić orzęskowi odżywianie się komórkami bakterii redukujących siarczany. Potwierdzają to wyniki pomiarów liczebności bakterii w prowadzonych hodowlach. Wskazują one na konsumowanie komórek bakteryjnych przez pierwotniaki w próbach, w których jednocześnie zanotowano statystycznie istotne obniżenie liczebności endosymbiontów. Należy zatem przypuszczać, że redukcja liczby glonów jest wynikiem trawienia ich przez komórkę gospodarza, która tym sposobem uzyskuje energię potrzebną do przeorganizowania systemu enzymatycznego. Wydaje się, że w takiej sytuacji endosymbiotyczne glony stanowią dla orzęska najłatwiej dostępne źródło pokarmu. Przemawia za tym fakt, że trawienie ich w warunkach ciemniowych odbywa się niezależnie od obecnych w medium bakterii, a zatem komórka *Paramecium bursaria* musi dysponować odpowiednimi enzymami umożliwiającymi zachodzenie takiego procesu (Pado 1965; Karakashian, Karakashian 1973; Trench 1979, 1992; Kuźnicki 1985).

Powstaje jednak pytanie, dlaczego w omawianej sytuacji pierwotniak nie wykorzystuje produkcji fotosyntetycznej endosymbiontów, lecz trawi ich komórki. Nawiązując do teorii seryjnej endosymbiozy (Margulis 1970, 1971, 2000) można założyć, że w ewolucyjnej przeszłości pierwotniak tworzący obecnie kompleks symbiotyczny *Paramecium bursaria* stanowił jednorodny, typowo zwierzęcy organizm. Zatem heterotroficzny sposób odżywiania jest dla tego orzęska bardziej pierwotny i – jak należy sądzić – silniej utrwalony genetycznie. Dlatego też należy przypuszczać, że w sytuacji wywołanej działaniem czynnika stresowego, jakim niewątpliwie jest konieczność przeorgani-

wania systemu enzymatycznego, komórka pierwotniaka ucieka się do odżywiania heterotroficznego jako bardziej pierwotnego sposobu zdobywania energii. Efektem takiej reakcji organizmu jest trawienie endosymbiotycznych komórek *Chlorella sp.* Potwierdzają to wyniki wcześniejszych badań autora, dotyczących adaptacji dzikich szczepów *Paramecium bursaria* do warunków laboratoryjnych (Pado, Bator 2001). W badaniach tych stwierdzono okresowy spadek liczebności endosymbiontów podczas adaptowania orzęsków do nowych warunków hodowli. Podobne zjawisko zaobserwowano w symbiotycznych kompleksach tworzonych przez niektóre gatunki koralowców i endosymbionty *Chlorella sp.* (Buddemeier, Fautin 1993; Kinzie i wsp. 2001; Hoegh-Guldberg i wsp. 2001). Na jego podstawie sformułowano hipotezę adaptatywnego wybielania, według której zmiana warunków środowiskowych może prowadzić do szybkiego zmniejszenia populacji endosymbiotycznych glonów w ciałach koralowców.

Wyniki dotyczące wpływu bakterii desulfurykacyjnych na zmiany liczebności endosymbiontów w komórkach *Paramecium bursaria* inkubowanych w zmiennych warunkach oświetlenia pozostają w całkowitej zgodności z dotychczasowymi doniesieniami. Zarówno stwierdzone w ciemności redukcje liczebności komórek *Chlorella sp.*, jak i odnawianie ich populacji po przeniesieniu materiału na światło zachodzi praktycznie niezależnie od obecności w medium szczepu bakteryjnego. Jest to naturalne zjawisko fizjologiczne, jakie wielokrotnie stwierdzono u badanego pierwotniaka (Pado 1965, 1978; Pado, Bator 2001).

Stwierdzenie możliwości odżywiania się badanego pierwotniaka bakteriami desulfurykacyjnymi skłoniło autora do podjęcia prób zastosowania w hodowli *Paramecium bursaria* naturalnych produktów metabolizmu bakterii redukujących siarczan, które wprowadzono do pożywki w miejsce żywych komórek bakteryjnych. Produkty te otrzymano z laboratoryjnych hodowli desulfurykatorów poprzez odwirowanie materiału, a także na drodze ekstrakcji pożywką sałatową. Zastosowana procedura preparatywna pozwoliła na uzyskanie zewnętrznych frakcji komórkowych, zawierających produkty sekrecji bakterii desulfurykacyjnych oraz składniki ściany komórkowej (Hancock, Poxton 1988; Pado i wsp. 1996; Pawłowska-Ćwiąg, Pado 1996). Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że wprowadzenie do medium zarówno ekstraktów, jak i uzyskanych po odwirowaniu supernatantów umożliwia rozwój pierwotniaka *Paramecium bursaria*. Są to bardzo interesujące wyniki, gdyż liczne uzyskane dotychczas dane wskazywały na konieczność wprowadzania żywych komórek bakteryjnych do hodowli orzęsków (Pringsheim 1928; Siegel, Karakashian 1959; Karakashian 1963; Pado 1965, 1978; Barna, Weis 1973; Pado, Bator 2001). Możliwość rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności supernatantów i ekstraktów otrzymanych z hodowli bakterii desulfurykacyjnych jest potwierdzeniem faktu, że zawartość komórek tych drobnoustrojów może stanowić odpowiednią substancję pokarmową dla badanego pierwotniaka.

Wykazano wyraźną stymulację rozwoju orzęsków w hodowlach ciemniowych, w obecności supernatantu pochodzącego z hodowli szczepu *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771, charakteryzującego się obecnością ściany komórkowej o budowie typowej dla bakterii gramododatnich (Holt i wsp. 1994). Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności supernatantów uzyskanych z hodowli pozostałych szczepów SRB była znacznie niższa. Dane te są zgodne z omawianymi wcześniej wynikami dotyczącymi wzrostu populacji pierwotniaków w obecności żywych bakterii desulfurykacyjnych. Biorąc pod uwagę fakt, że w supernatantach obecne były głównie zewnętrzne frakcje komórek bakteryjnych, potwierdza się hipoteza o wpływie budowy ściany komórkowej bakterii na możliwość ich konsumowania przez *Paramecium bursaria*.

Porównując wyniki uzyskane dla supernatantów i ekstraktów otrzymanych z kultur bakterii redukujących siarczany stwierdzono, że *Paramecium bursaria* znacznie lepiej rozwija się w obecności ekstraktów. W większości hodowli prowadzonych na świetle stwierdzono taką samą intensywność rozwoju pierwotniaków jak w próbach kontrolnych, zawierających żywe bakterie pochodzące z naturalnego środowiska życia orzęska. Prawdopodobnie w procesie ekstrakcji doszło do uwolnienia związków chemicznych, które wcześniej były silnie związane w zewnętrznych strukturach komórek desulfurykatorów. Substancje te najwyraźniej stanowią doskonałe pożywienie dla *Paramecium bursaria*, a poprzez wyekstrahowanie stają się łatwiej dostępne. Dzięki temu komórka pierwotniaka może je wykorzystywać bez konieczności dostosowywania aparatu enzymatycznego, co miało miejsce w przypadku żywych komórek bakterii desulfurykacyjnych. Tym można tłumaczyć lepsze wyniki uzyskane w warunkach ciągłego oświetlenia przy zastosowaniu ekstraktów otrzymanych z hodowli desulfurykatorów niż przy wprowadzeniu żywych bakterii. Stanowi to potwierdzenie wysuniętego wcześniej przypuszczenia, że możliwość odżywiania się pierwotniaka *Paramecium bursaria* określonym rodzajem bakterii może być ściśle uzależniona od sposobu związania w komórce bakteryjnej substancji chemicznych, stanowiących dla orzęska istotne składniki pokarmowe. Zastanawiający jest jednak brak stymulującego działania zastosowanych ekstraktów w kulturach inkubowanych w ciemności. Jak wykazano wcześniej, w warunkach ciemniowych *Paramecium bursaria* bardzo łatwo przystosowuje się do odżywiania komórkami bakterii desulfurykacyjnych, co pociąga za sobą zwiększenie intensywności wzrostu populacji w porównaniu z próbami kontrolnymi. Należałoby zatem oczekiwać podobnego wpływu ekstraktów uzyskanych z hodowli desulfurykatorów. Brak takiego oddziaływania może świadczyć o tym, że w warunkach ciemniowych pierwotniak wykorzystuje w większym stopniu substancje obecne we wnętrzu komórek bakteryjnych. Dlatego też ekstrakty – zawierające tylko frakcje zewnątrzkomórkowe – nie są dla orzęska wystarczającym pożywieniem w ciemności. Wniosek taki wydaje się całkowicie uzasadniony, biorąc pod uwagę fakt, że w warunkach ciemniowych komórki bakterii są dla pierwotniaka jedy-

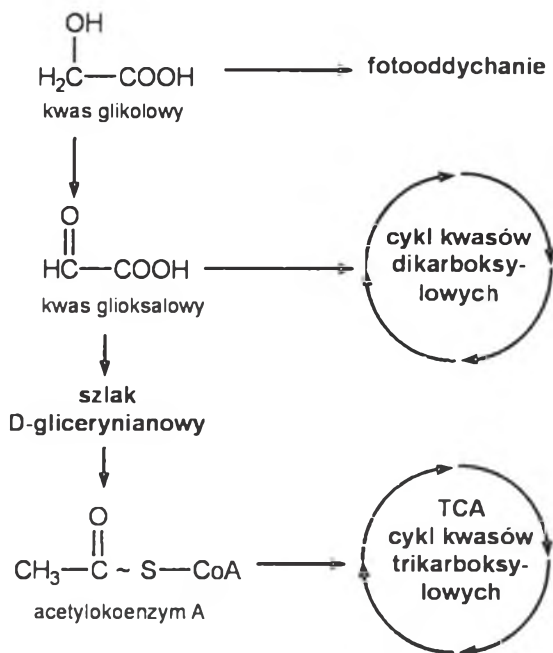
nym źródłem substancji pokarmowych (Pado 1965, 1978; Karakashian 1975; Pado, Bator 2001).

Badania dotyczące możliwości rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności różnych kwasów organicznych wykazały, że oddziaływanie tych związków na pierwotniaka jest w dużym stopniu uzależnione od warunków oświetlenia. Kwas glikolowy, stanowiący jeden z produktów fotosyntezy endosymbiontów *Chlorella sp.* (Muscatine i wsp. 1967) wpływa w warunkach ciągłego oświetlenia silnie stymulując na rozwój orzęska *Paramecium bursaria*. Wpływ ten, stwierdzony dla stosunkowo szerokiego zakresu stężeń (0,25 mM – 1 mM), należy najprawdopodobniej wiązać z procesem fotooddychania, którego występowanie w komórkach różnych gatunków glonów potwierdzają liczne doniesienia (Yokota, Kitaoka 1982; Bozzo i wsp. 2000; Xia, Gao 2002). Utlenianie kwasu glikolowego podczas fotooddychania zapewnia stabilność procesu fotosyntezy i umożliwia ponadto syntezę aminokwasów – glicyny i seryny. Przypuszczalnie obecność kwasu glikolowego w odpowiedniej koncentracji wpływa na zwiększenie produkcji fotosyntetycznej glonów *Chlorella sp.* występujących w komórkach *Paramecium bursaria*. Pociąga to za sobą możliwość intensywniejszego rozwoju populacji orzęsków, które w takiej sytuacji dysponują większą ilością węglowodanów, syntetyzowanych przez endosymbionty. Obniżanie się koncentracji kwasu glikolowego, jakie stwierdzono podczas inkubacji pierwotniaków, może potwierdzać, że związek ten jest wykorzystywany przez badany układ symbiotyczny.

Stymulujące działanie kwasu glikolowego stwierdzono również w warunkach ciemniowych, jednak przy znacznie węższym zakresie stężeń niż miało to miejsce w warunkach ciągłego oświetlenia. Niewykluczone zatem, że oddziaływanie tego związku w ciemności może odbywać się na zupełnie innej drodze. U niektórych organizmów – głównie bakterii – wykształciły się szlaki metaboliczne (ryc. 29) umożliwiające wykorzystywanie kwasu glikolowego jako substratu węglowego po uprzednim utlenieniu go do kwasu glioksalowego – tak jak ma to miejsce w początkowym etapie fotooddychania.

Kwas glioksalowy może być przekształcany w szlaku D-glicerynianowym do acetylokoenzymu A, a następnie utleniany w cyklu kwasów trikarboksylowych (TCA). Innym sposobem wykorzystania kwasu glioksalowego przez komórkę może być także włączenie go do cyklu kwasów dikarboksylowych. Biorąc pod uwagę fakt, iż według najnowszych badań kwas glikolowy może wpływać na wzrost różnorodnych typów komórek (Garric i wsp. 2002) nie można wykluczyć, że wymienione wyżej szlaki metaboliczne mogą zachodzić również w komórce *Paramecium bursaria*, względnie w komórkach endosymbiotycznych glonów *Chlorella sp.*

Analizując wyniki badań dotyczących rozwoju orzęska *Paramecium bursaria* w obecności wybranych kwasów aromatycznych (cynamonowego, ferulowego, *p*-aminobenzoesowego i *p*-hydroksybenzoesowego) stwierdzono, że każdy

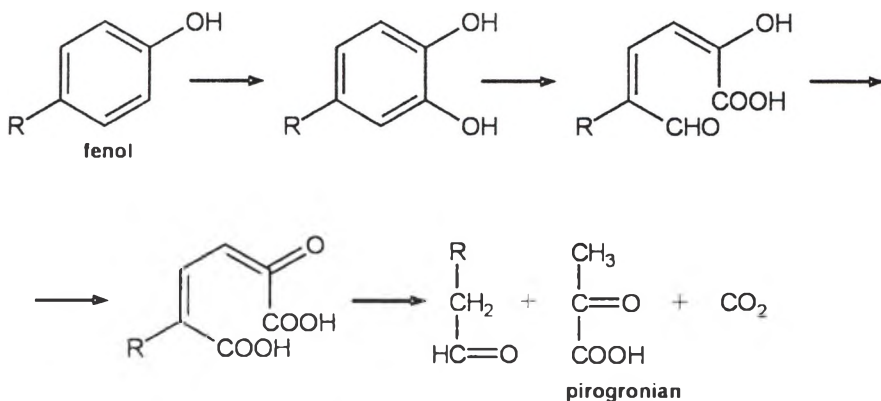


Ryc. 29. Możliwe drogi wykorzystywania kwasu glikolowego w przemianach metabolicznych zachodzących w komórce

z zastosowanych związków w ściśle określonym zakresie stężeń może wpływać stymulująco na wzrost populacji pierwotniaków. Uzyskane dane pozostają w pełnej zgodności z omówionymi wcześniej wynikami, dotyczącymi korzystnego wpływu bakterii desulfurykacyjnych na rozwój *Paramecium bursaria*, ponieważ podczas badań prowadzonych w Zakładzie Mikrobiologii Akademii Pedagogicznej w Krakowie stwierdzono obecność kwasów fenolowych w komórkach desulfurykatorów (Pawłowska-Ćwięk, dane niepublikowane).

Pozostaje jednak niewyjaśnione w jaki sposób przebiega metabolizowanie kwasów fenolowych w badanym układzie symbiotycznym. Jak dotąd możliwość biodegradacji związków aromatycznych stwierdzono głównie u bakterii (Schink i wsp. 1992; Kniemeyer i wsp. 2003; Noh i wsp. 2003) i grzybów (Cerniglia i wsp. 1992). Wśród pierwotniaków podobne zdolności wykazano jedynie u *Tetrahymena pyriformis* (Bamdad i wsp. 1997, 1999). W ostatnich latach pojawia się jednak coraz więcej danych dotyczących możliwości wykorzystywania związków zawierających pierścień benzenowy przez komórki glonów (Semple, Cain 1996; Kirso, Irha 1998; Todd i wsp. 2002; Hook i wsp. 2003). Szczególnie interesujące wyniki w tym zakresie uzyskali Semple i Cain

(1996), którzy stwierdzili zdolność do metabolizowania fenoli u jednokomórkowych glonów z gatunku *Ochromonas danica* (ryc. 30).



Ryc. 30. Wykorzystanie fenolu jako źródła węgla przez komórki glonów *Ochromonas danica* (Semple, Cain 1996)

W proponowanym przebiegu szlaku metabolicznego (ryc. 30) fenol jest rozkładany do pirogronianu, który następnie może być włączany w typowe przemiany metaboliczne zachodzące w komórce. Dane te pozwalają przypuszczać, że układ symbiotyczny jaki stanowi pierwotniak *Paramecium bursaria* wraz z symbiotycznymi komórkami glonów *Chlorella sp.* może wykorzystywać kwasy fenolowe głównie poprzez metabolizm endosymbiontów. Jednak uwzględniając fakt, że stymulujące działanie zastosowanych związków wykazano przy różnych stężeniach w zależności od warunków oświetlenia, nie można wykluczyć bezpośredniego udziału komórki orzęska w zachodzących procesach. Sytuacja taka może mieć miejsce na przykład w warunkach ciemnych, w których następuje zmniejszenie ilości endosymbiontów.

Porównując wyniki uzyskane dla poszczególnych kwasów aromatycznych nie można jednak stwierdzić wyraźnych zależności, które potwierdzałyby, że sposób metabolizowania związków fenolowych przez *Paramecium bursaria* jest jednoznacznie zdeterminowany warunkami oświetlenia. Prawdopodobnie dochodzi tu do wzajemnego uzupełniania się procesów zachodzących w komórkach obydwu symbiotycznych partnerów. Nie można także wykluczyć, że każdy z zastosowanych kwasów fenolowych oddziałuje w odmienny sposób na orzęska *Paramecium bursaria*. Kwas ferulowy jest typowym przykładem przeciwutleniacza (Morales, Babbel 2002), a zatem jego korzystny wpływ można wiązać ze zmniejszeniem ilości wolnych rodników w komórce. Fakt, że stymulujące działanie tego związku jest znacznie silniejsze w ciemności może natomiast wynikać z utraty właściwości antyoksydacyjnych w warunkach ciągłego oświe-

tlenia – kwas ferulowy należy bowiem do substancji światłoczułych (Kolb i wsp. 2001). Zwiększenie intensywności rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności kwasu *p*-aminobenzoowego może być związane z udziałem tego związku w syntezie koenzymu F, który warunkuje prawidłowy przebieg biosyntezy kwasów nukleinowych. Z kolei stymulujący wpływ kwasu *p*-hydroksybenzoowego można tłumaczyć jego wykorzystywaniem do syntezy ubichinonów.

Wszystkie przedstawione wyniki jednoznacznie wskazują, że symbiotyczny pierwotniak *Paramecium bursaria* wykazuje zdolność przystosowywania się do bardzo różnorodnych warunków życia. Może on bowiem rozwijać się zarówno w obecności różnych gatunków bakterii, jak i różnorodnych związków chemicznych wprowadzanych do medium. Wykorzystywanie przez pierwotniaka obecnych w jego środowisku życia komórek bakteryjnych oraz substancji chemicznych może zachodzić różnymi drogami, co wiąże się ściśle z symbiotycznym charakterem omawianego organizmu.

Obecność endosymbiotycznych glonów *Chlorella sp.* w cytoplazmie *Paramecium bursaria* najwyraźniej wzbogaca możliwości metaboliczne całego kompleksu. Komórki *Chlorella sp.* mogą między innymi stanowić swoistą rezerwę pokarmową dla pierwotniaka, który w sytuacji stresowej jest zdolny do przeorganizowania swojego metabolizmu, przy czym energia potrzebna do syntezy i sekrecji odpowiednich enzymów pochodzi z trawienia endosymbiontów. Możliwość stosunkowo łatwego przebudowywania systemu enzymatycznego w komórce *Paramecium bursaria* wydaje się być związana ze zmianami jakie w naturalnych warunkach zachodzą u tego orzęska w cyklu dobowym. W ciągu dnia pierwotniak wykorzystuje głównie produkcję fotosyntetyczną endosymbiontów, natomiast w nocy jedynym sposobem uzyskania energii jest dla niego odżywianie heterotroficzne. Pociąga to za sobą konieczność zachodzenia cyklicznych zmian w fizjologii całej komórki. Dlatego też metabolizm *Paramecium bursaria* charakteryzuje się prawdopodobnie swoistą plastycznością, która umożliwiła dostosowanie się orzęska do odżywiania różnymi rodzajami pokarmu.

Prawdopodobnie proces trawienia endosymbiontów w celu uzyskania energii zachodzi łatwiej w ciemności, gdyż glony, które nie przeprowadzają procesu fotosyntezy, stają się dla komórki gospodarza obciążeniem troficznym. Trawienie ich jest w takich warunkach zjawiskiem naturalnym, stanowiącym jeden z mechanizmów umożliwiających komórce pierwotniaka regulowanie liczebności endosymbiontów. Dlatego też w ciemności *Paramecium bursaria* łatwiej może adaptować się do zmian zachodzących w jego środowisku życia. Należy przypuszczać, że w warunkach naturalnych procesy przystosowawcze wiążące się z przebudową systemu enzymatycznego w komórce orzęska zachodzą głównie nocą, kiedy pierwotniak może w łatwy sposób uzyskać niezbędną ilość energii poprzez trawienie komórek endosymbiontów. Ponadto w procesie tym do cytoplazmy orzęska uwalniane są różne składniki komórek glonów, w tym

także enzymy i kwasy nukleinowe. Niewykluczone, że w takiej sytuacji orzęsek może wykorzystywać białka enzymatyczne pochodzące ze strawionych komórek endosymbiontów względnie syntetyzować nowe związki na podstawie uzyskanego tym sposobem materiału genetycznego (Provorov 2001). Endosymbionty występujące w komórce *Paramecium bursaria* stanowią mimo wszystko osobne genomy. Ich obecność zwiększa zatem stopień zróżnicowania materiału genetycznego, a tym samym powoduje znaczny wzrost zdolności przystosowawczego całego kompleksu symbiotycznego.

Niewątpliwie ważną rolę w procesach adaptacyjnych omawianego układu odgrywają również reakcje biochemiczne zachodzące w żywych komórkach endosymbiontów. Świadczy o tym fakt, że *Paramecium bursaria* stosunkowo łatwo włącza w metabolizm obecne w środowisku różnorodne substancje chemiczne, które mogą być wykorzystywane bezpośrednio przez komórkę pierwotniaka lub przez komórki glonów. Zależy to zarówno od rodzaju danej substancji, jak też od warunków oświetlenia. Przykładem aktywnego udziału endosymbiontów w przemianach związków chemicznych pobieranych przez *Paramecium bursaria* może być omówione wcześniej wykorzystanie kwasu glikolowego w procesie fotooddychania jak również rozkład związków aromatycznych prowadzony najprawdopodobniej przez komórki glonów.

Problem możliwości adaptacyjnych symbiotycznego pierwotniaka *Paramecium bursaria* nie był dotychczas szczegółowo badany. Trudno odnaleźć w światowej literaturze dane wiążące się bezpośrednio z tym zagadnieniem. Jednak wyniki uzyskiwane na przestrzeni lat przez niektórych autorów dowodzą, że organizm ten wykazuje cechy, które mogą świadczyć o wysoko rozwiniętych zdolnościach przystosowawczych. Bomford (1965) stwierdził, że orzęsek *Paramecium bursaria* może tworzyć związki symbiotyczne z różnymi gatunkami glonów (*Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.*). Wyniki te świadczą, że *Paramecium bursaria* łatwo adaptuje się do zmiennych warunków. Mogą też być interpretowane jako wyraz ciągłego dążenia komórki pierwotniaka do nawiązywania symbiotycznych zależności z komórkami fotoautotrofów. Pozwala to przypuszczać, że właśnie tego typu kompleksy są bardzo dobrze przystosowane do zmieniających się warunków środowiska. Do analogicznych wniosków doszedł Karakashian (1975) porównując populację orzęsków zawierających liczne komórki glonów z populacją orzęsków aposymbiotycznych – pozbawionych endosymbiontów w sposób sztuczny. Możliwość wielokrotnego tworzenia przez *Paramecium bursaria* układów symbiotycznych z glonami *Chlorella sp.* potwierdzili Reisser i wsp. (1982), natomiast Görtz (1982) wykazał, że analogiczne związki mogą powstawać między komórką pierwotniaka i niektórymi gatunkami bakterii a nawet drożdży. Z kolei wyniki uzyskane przez Iwatsuki i wsp. (1998) dowiodły, że obecność symbiotycznych komórek *Chlorella sp.* zwiększa zakres tolerancji termicznej orzęska *Paramecium bursaria*, co można interpretować jako zwiększenie możliwości adaptacyjnych wywołane obecnością autotroficznych endo-

symbiontów. Ponadto badania prowadzone w ostatnich latach w Zakładzie Mikrobiologii Akademii Pedagogicznej w Krakowie wykazały naturalną obecność *Paramecium bursaria* w wodach o wysokiej zawartości związków siarki oraz w odpływach ścieków garbarskich (Pado, Bator 2001), co dowodzi, że organizm ten może egzystować nawet w ekstremalnych warunkach środowiska.

Zestawiając wyniki uzyskane w niniejszych badaniach z dotychczasowymi doniesieniami na temat biologii orzęska *Paramecium bursaria* należy uznać, że organizm ten niewątpliwie charakteryzuje się wysoko rozwiniętymi zdolnościami adaptacyjnymi, wynikającymi z jego symbiotycznego charakteru.

Ponieważ pierwotniak *Paramecium bursaria* jest uznawany za modelowy przykład endosymbiozy obligatoryjnej (Pado 1978; Pado, Bator 2001) wyniki badań dotyczących tego orzęska można odnieść również do innych organizmów symbiotycznych. Liczne dane wskazują na to, że wzajemne relacje między partnerami symbiozy są bardzo zbliżone w przypadku większości kompleksów tworzonych przez organizmy autotroficzne i heterotroficzne. Jamochłon *Hydra viridis*, u którego w komórkach endodermy występują endosymbionty *Chlorella sp.*, podobnie jak *Paramecium bursaria* charakteryzuje się możliwością wielokrotnego nawiązywania symbiozy z komórkami glonów (Rahat 1985; Rahat, Reich 1985). Świadczy to o tym, że tworzenie kompleksu symbiotycznego jest dla *Hydra viridis* bardzo korzystne. Podobnymi właściwościami charakteryzują się również niektóre gatunki symbiotycznych koralowców (Buddemeier, Fautin 1993; Kinzie i wsp. 2001). Uwzględniając fakt, że podczas wcześniejszych badań prowadzonych przez autora (Pado, Bator 2001) stwierdzono w nietypowych warunkach środowiska obecność dwóch gatunków symbiotycznych pierwotniaków – *Paramecium bursaria* oraz *Euplotes daidaleos* – należy przyjąć, że wysoko rozwinięte zdolności adaptacyjne są cechą typową dla wszystkich autotroficzno-heterotroficznych kompleksów symbiotycznych. Powstawanie takich układów jest zatem wynikiem dostosowywania się organizmów do zmiennych warunków środowiska. Obecność w układzie symbiotycznym dwóch różnych komponentów – autotroficznego i heterotroficznego – zapewnia wszystkim partnerom tworzącym taki układ znacznie większe szanse na przeżycie, a także ułatwia zajmowanie nowych nisz ekologicznych.

Fakt, że organizmy żyjące w związkach symbiotycznych charakteryzują się zwiększonymi zdolnościami adaptacyjnymi, jest kolejnym potwierdzeniem teorii seryjnej endosymbiozy (SET) przedstawionej przez Margulis (1970, 1971, 2000). Rezultaty niniejszych badań dowodzą, że łączenie się różnych organizmów w symbiotyczne kompleksy jest dla nich zjawiskiem bardzo korzystnym, może zatem stanowić jeden z czynników umożliwiających zachodzenie procesów ewolucyjnych.

Udowodnienie hipotezy o wysoko rozwiniętych zdolnościach adaptacyjnych kompleksów symbiotycznych tworzonych przez organizmy autotroficzne i heterotroficzne pozwala jednocześnie na wskazanie szeregu nowych

problemów badawczych. Istotne wydaje się między innymi wyjaśnienie, czy efekty procesów adaptacyjnych zachodzących u organizmów symbiotycznych zostają utrwalone w materiale genetycznym, a więc czy dochodzi w tym przypadku do adaptacji genotypowej. Odpowiedzi na postawione pytanie należy szukać przede wszystkim poprzez porównanie możliwości adaptacyjnych w kolejnych pokoleniach wybranych organizmów symbiotycznych, a także poprzez określenie zmian w materiale genetycznym, które mogą zachodzić podczas adaptowania się danego układu symbiotycznego do zmieniających się warunków środowiska.

Literatura

- Adoutte A., Germot A., le Guyader H., Philippe H. 1996. *Que savons-nous de l'histoire évolutive des Eucaryotes? 2. De la diversification des protistes à la radiation des multicellulaires.* Soc. Franç. de Gen. Med. et Sci. 12 (2): 1–17
- Andersen R.A. 1998. *What to do with Protists?* Austral. System. Bot. 11: 185–201
- Andersson J.O., Roger A.J. 2002. *A cyanobacterial gene in nonphotosynthetic protists – an early chloroplast acquisition in eukaryotes?* Curr. Biol. 12 (2): 115–119
- Bamdad M., Brousseau P., Denizeau F. 1999. *Identification of multidrug resistance-like system in Tetrahymena pyriformis: evidence for a new detoxification mechanism in freshwater ciliates.* FEBS Lett. 456 (3): 389–393
- Bamdad M., Reader S., Groliere C.A., Bohatier J., Denizeau F. 1997. *Uptake and efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by Tetrahymena pyriformis: evidence for a resistance mechanism.* Cytometry 28 (2): 170–175
- Barabasz W. 1985. *Denitryfikacja w świetle współczesnych badań mikrobiologicznych i ekologicznych.* Post. Mikrobiol. 24: 83–101
- Barna I., Weis D.S. 1973. *The utilization of bacteria as food for Paramecium bursaria.* Trans. Am. Microsc. Soc. 92 (3): 434–440
- Błaszczczyk M. 1992. *Comparison of Denitrification by Paracoccus denitrificans, Pseudomonas stutzeri and Pseudomonas aeruginosa.* Acta Microbiol. Pol. 41: 203–210
- Bohner H.J., Sheveleva E. 1998. *Plant stress adaptations-making metabolism move.* Curr. Opin. Plant Biol. 1 (3): 267–274
- Bojko E.R. 1997. *Metabolical changes induced by adaptation to circumpolar conditions in Spitsbergen.* Int. J. Circumpolar Health. 56 (4): 134–141
- Bomford R. 1965. *Infection of alga-free Paramecium bursaria with strains of Chlorella, Scenedesmus, and yeast.* J. Protozool. 12 (2): 221–224
- Bozzo G.G., Colman B., Matsuda Y. 2000. *Active transport of CO₂ and bicarbonate is induced in response to external CO₂ concentration in the green alga Chlorella kessleri.* J. Exp. Bot. 51 (349): 1341–1348
- Bragg A.N. 1936. *Some morphological variation in Paramecium bursaria (Ehrenberg).* Arch. Protistenk. 88: 69–75
- Bronikowski A.M. 2000. *Experimental evidence for the adaptive evolution of growth rate in the garter snake Thamnophis elegans.* Evolution Int. J. Org. Evolution. 54 (5): 1760–1767
- Brown J.A., Nielsen P.J. 1974. *Transfer of photosynthetically produced carbohydrate from endosymbiotic Chlorellae to Paramecium bursaria.* J. Protozool. 21 (4): 569–570
- Buddemeier R., Fautin D. 1993. *Coral Bleaching as an Adaptive Mechanism: A Testable Hypothesis.* Bioscience 43: 320–326
- Butschli O. 1882. *Protozoa. Klassen und Ordnungen des thier-Reichs in Wort und Bild.* Vol. 1. Winter'sche Verlagshandlung, Leipzig and Heidelberg

- Cain M.L. 1990. *Models of clonal growth in Solidago altissima*. J. Ecol. 78: 27–46
- Cases I., de Lorenzo V., Ouzounis C.A. 2003. *Transcription regulation and environmental adaptation in bacteria*. Trends Microbiol. 11 (6): 248–253
- Cavalier-Smith T. 1998. *A revised six-kingdom system of life*. Biol. Rev. 73: 203–266
- Cavalier-Smith T., Lee J.J. 1985. *Protozoa as hosts for endosymbioses and conversion of symbionts into organelles*. J. Protozool. 32 (3): 376–379
- Cerniglia C.E., Sutherland J.B., Crow S.A. 1992. *Fungal metabolism of aromatic hydrocarbons*. Microbial Degradation of Natural Product. Weinheim, New York, Basel, Cambridge. 193–217
- Corliss J.O. 1998. *Classification of protozoa and protists: the current status*. Evolutionary relationships among Protozoa. Kluwer, Dordrecht. 409–447
- Daubenmire R.F. 1973. *Rośliny i środowisko*. PWN, Warszawa
- Davis A.L., Chown S.L., McGeoch M.A., Scholtz C.H. 2000. *A comparative analysis of metabolic rate in six Scarabaeus species (Coleoptera: Scarabaeidae) from southern Africa: further caveats when inferring adaptation*. J. Insect Physiol. 46 (4): 553–562
- Derzelle S., Hallet B., Ferain T., Delcour J., Hols P. 2003. *Improved adaptation to cold-shock, stationary-phase, and freezing stresses in Lactobacillus plantarum overproducing cold-shock proteins*. Appl. Environ. Microbiol. 69 (7): 4285–4290
- Eldredge N. 2003. *Życie na krawędzi. Rozwój cywilizacji i zagłada gatunków*. Prószyński i S-ka, Warszawa
- Erdal U.G., Erdal Z.K., Randall C.W. 2003. *A thermal adaptation of bacteria to cold temperatures in an enhanced biological phosphorus removal system*. Water Sci. Technol. 47 (11): 123–128
- Futuyma D.J. 1997. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Garric X., Moles J.P., Garreau H., Braud C., Guilhou J.J., Vert M. 2002. *Growth of various cell types in the presence of lactic and glycolic acids: the adverse effect of glycolic acid released from PLAGA copolymer on keratinocyte proliferation*. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 13 (11): 1189–1201
- Gerashchenko B.I., Nishihara N., Ohara T., Tosuji H., Kosaka T., Hosoya H. 2000. *Flow cytometry as a strategy to study the endosymbiosis of algae in Paramecium bursaria*. Cytometry 41 (3): 209–215
- Gerashchenko B.I., Kosaka T., Hosoya H. 2001. *Growth kinetics of algal populations exsymbiotic from Paramecium bursaria by flow cytometry measurements*. Cytometry 44 (3): 257–263
- Gorny N., Schink B. 1994. *Complete anaerobic oxidation of hydroquinone by Desulfococcus sp. strain Hy5: indications of hydroquinone to gentisate*. Arch. Microbiol. 162: 131–135
- Görtz H.D. 1982. *Infection of Paramecium bursaria with bacteria and yeasts*. J. Cell. Sci. 58: 445–453
- Grabińska-Łoniewska A. 1987. *Metody badania procesu denitryfikacji*. Podst. Mikrobiol. 26: 33–53
- Grigorian M.S., Tatevosian L.G. 1991. *The enzymatic chemical mechanisms of adaptation*. Zh. Evol. Biokhim. Fiziol. 27 (1): 7–12

- Hancock I., Poxton I. 1988. *Bacteria cell surface techniques*. John Wiley and Sons, Chichester
- Hashimoto H. 2003. *Plastid division: its origins and evolution*. Int. Rev. Cytol. 222: 63–98
- Hermanowicz W., Dojlido J., Dożańska W., Koziarowski B., Zerbe J. 1999. *Fizyczno-chemiczne badanie wody i ścieków*. Arkady, Warszawa
- Hiwatashi K. 1981. *Sexual interactions of the cell surface in Paramecium*. Sexual Interactions in Eukaryotic Microbes. Academic Press, New York. 351–378
- Hoegh-Guldberg O., Jones R.J., Ward S., Loh W.K. 2001. *Communication arising. Is coral bleaching really adaptive?* Nature 415 (6872): 601–602
- Hoffmann A.A., Hallas R.J., Dean J.A., Schiffer M. 2003. *Low potential for climatic stress adaptation in a rainforest Drosophila species*. Science 301 (5629): 100–102
- Höffmeister M., Martin W. 2003. *Interspecific evolution: microbial symbiosis, endosymbiosis and gene transfer*. Environ. Microbiol. 5 (8): 641–649
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore. 345–346
- Honigberg B.M., Balamuth W., Bovee E.C., Corliss J.O., Gojdic M., Hall R.P., Kudo R.R., Levine N.D., Loeblich A.R. Jr., Weiser J., Wenrich D.H. 1964. *A revised classification of the phylum Protozoa*. J. Protozool. 11: 7–20
- Hook I.L., Ryan S., Sheridan H. 2003. *Biotransformation of aliphatic and aromatic ketones, including several monoterpenoid ketones and their derivatives by five species of marine microalgae*. Phytochem. 63 (1): 31–36
- Iuchi S., Weiner L. 1996. *Cellular and molecular physiology of Escherichia coli in the adaptation to aerobic environments*. J. Biochem. (Tokyo) 120 (6): 1055–1063
- Iwatsuki K., Naitoh Y. 1981. *The role of symbiotic Chlorella in photoresponses of Paramecium bursaria*. Proc. Jpn. Acad. 57 (B): 318–405
- Iwatsuki K., Naitoh Y. 1988. *Behavioural responses to light in Paramecium bursaria in relation to its symbiotic green alga Chlorella*. J. Exp. Biol. 134: 43–60
- Iwatsuki K., Nishidoi M., Suehiro K. 1998. *Symbiotic Chlorella enhances the thermal tolerance in Paramecium bursaria*. Comp. Biochem. Physiol. Part A 121: 405–409
- Johnson C. H., Miwa I., Kondo T., Hastings J.W. 1989. *Circadian rhythm of photoaccumulation in Paramecium bursaria*. J. Biol. Rhythms 4 (4): 405–415
- Kamalaveni K., Gopal V., Sampson U., Aruna D. 2003. *Recycling and utilization of metabolic wastes for energy production is an index of biochemical adaptation of fish under environmental pollution stress*. Environ. Monit. Assess. 86 (3): 255–264
- Karakashian M.W. 1975. *Symbiosis in Paramecium bursaria*. Symp. Soc. Exp. Biol. 29: 145–173
- Karakashian S.J. 1963. *Growth of Paramecium bursaria as influenced by the presence of algal symbionts*. Physiol. Zool. 36: 52–67
- Karakashian S.J., Karakashian M.W. 1965. *Evolution and symbiosis in the genus Chlorella and related algae*. Evolution 19: 368–377
- Karakashian S.J., Karakashian M.W. 1973. *Intracellular digestion and symbiosis in Paramecium bursaria*. Exp. Cell. Res. 81 (1): 111–119

- Karakashian S.J., Karakashian M.W., Rudzińska M.A. 1968. *Electron observation on the symbiosis of Paramecium bursaria and its intracellular algae*. J. Protozool. 15 (1): 113–128
- Karakashian S.J., Rudzińska M.A. 1981. *Inhibition of lysosomal fusion with symbiont-containing vacuoles in Paramecium bursaria*. Exp. Cell. Res. 131 (2): 387–393
- Khromechek E.B., Musonova M.V., Barkhatov Iu.V. 2002. *Effect of symbiotic algae on the photoaccumulation capacity of cells of the ciliate Paramecium bursaria*. Tsitologija 44 (3): 314–317
- Kinzie R.A. 3rd, Takayama M., Santos S.R., Coffroth M.A. 2001. *The adaptive bleaching hypothesis: experimental tests of critical assumptions*. Biol. Bull. 200 (1): 51–58
- Kirso U., Irha N. 1998. *Role of algae in fate of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. Ecotox. Environ. Saf. 41 (1): 83–89
- Kniemeyer O., Fischer T., Wilkes H., Glockner F.O., Widdel F. 2003. *Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium*. Appl. Environ. Microbiol. 69 (2): 760–768
- Kolb C.A., Kaser M.A., Kopecký J., Zotz G., Riederer M., Pfündel E.E. 2001. *Effects of Natural Intensities of Visible and Ultraviolet Radiation on Epidermal Ultraviolet Screening and Photosynthesis in Grape Leaves*. Plant Physiol. 127 (3): 863–875
- Kosaka T. 1991. *Life Cycle of Paramecium bursaria Syngen 1 in Nature*. J. Protozool. 38 (2): 140–148
- Kosaka T. 1994. *Life Cycle of Paramecium bursaria Syngen 1 in a Natural Pond*. Zoological Science 11: 517–526
- Kuźnicki L. 1985. *Czy orzęski zawierające endosymbionty są organizmami wielokomórkowymi?* Wszechświat 86: 233–235
- Larsson F., Winblad B., Mohammed A.H. 2002. *Psychological stress and environmental adaptation in enriched vs. impoverished housed rats*. Pharmacol. Biochem. Behav. 73 (1): 193–207
- Litoshenko A.I. 2002. *Evolution of mitochondria*. Tsitol. Genet. 36 (5): 49–57
- Loeter J. B. 1937. *Effect of hydrogen-ion concentration on the growth and morphology of Paramecium bursaria*. Arch. Protistenk. 90: 185–193
- Lynn D.H., Small E.B. 2000. *Phylum Ciliophora*. The illustrated guide to the Protozoa. Society of Protozoologists. Allen Press Inc., Lawrence, USA. 371–656
- Majsak-Newman G., Dainty J.R., Lewis D.J., Langford N.J., Crews H.M., Fairweather-Tait S.J. 2003. *Adaptive responses in men fed low- and high-copper diets*. Br. J. Nutr. 90 (1): 161–168
- Malinowski A. 2002. *Podstawy ewolucyjnej ekologii człowieka*. [W:] Ekologia. Jej związki z różnymi dziedzinami wiedzy. PWN, Warszawa. 195–214
- Margulis L. 1970. *Origin of Eucaryotic Cells*. Yale University Press
- Margulis L. 1971. *Symbiosis and evolution*. Sci. Am. 225 (2): 48–57
- Margulis L. 2000. *Symbiotyczna planeta*. CiS, Warszawa
- Martin W., Hoffmeister M., Rotte C., Henze K. 2001. *An overview of endosymbiotic models for the origins of eukaryotes, their ATP-producing organelles (mitochondria and hydrogenosomes), and their heterotrophic lifestyle*. Biol. Chem. 382 (11): 1521–1539

- Martin W., Rotte C., Hoffmeister M., Theissen U., Gelius-Dietrich G., Ahr S., Henze K. 2003. *Early cell evolution, eukaryotes, anoxia, sulfide, oxygen, fungi first (?), and a tree of genomes revisited*. IUBMB Life 55 (4–5): 193–204
- Matsuoka K., Nakaoka Y. 1988. *Photoreceptor potential causing phototaxis of Paramecium bursaria*. J. Exp. Biol. 137: 477–485
- McDougald D., Srinivasan S., Rice S.A., Kjelleberg S. 2003. *Signal-mediated cross-talk regulates stress adaptation in Vibrio species*. Microbiology 149 (Pt 7): 1923–1933
- Meier R., Reisser W., Wiessner W., Lefort-Tran M. 1980. *Freeze-fracture evidence of differences between membranes of perialgal nad digestive vacuoles in Paramecium bursaria*. Z. Naturforsch. 35c: 1107–1110
- Meier R., Lefort-Tran M., Pouphe M., Reisser W., Wiessner W. 1984. *Comparative freeze-fracture study of perialgal and digestive vacuoles in Paramecium bursaria*. J. Cell. Sci. 73: 121–140
- Meier R., Wiessner W. 1989. *Infection of alga-free Paramecium bursaria with symbiotic Chlorella sp. isolated from green Paramecia*. J. Cell. Sci. 93: 571–579
- Mereschkovskiy K.S. 1910. *Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenese*. Biol. Centralbl. 30: 278, 321, 353
- Meyers J. 1953. *Growth characteristic of algae in relation to the problem of mass culture*. Carnegie Inst. Washington Publ. 600: 37–54
- Mitrovski P., Hoffmann A.A. 2001. *Postponed reproduction as an adaptation to winter conditions in Drosophila melanogaster: evidence for clinal variation under semi-natural conditions*. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 268 (1481): 2163–2168
- Miwa I., Nagatoshi H., Horie T. 1987. *Circadian rhythmicity within single cells of Paramecium bursaria*. J. Biol. Rhythms 2 (1): 57–64
- Morales F.J., Babel M.B. 2002. *Melanoidins exert a weak antiradical activity in watery fluids*. J. Agric. Food. Chem. 50 (16): 4657–4661
- Moreira D., Lopez-Garcia P. 1998. *Symbiosis Between Methanogenic Archaea and δ -Proteo-bacteria as the Origin of Eukaryotes: The Syntrophic Hypothesis*. Journ. Mol. Evol. 47: 517–530
- Muscatine L., Karakashian S.J., Karakashian M.W. 1967. *Soluble extracellular products of algae symbiotic with a ciliate, a sponge and a mutant hydra*. Comp. Biochem. Physiol. 20: 1–12
- Nakaoka Y. 1989. *Localization of photosensitivity in Paramecium bursaria*. J. Comp. Physiol. A 165: 637–641
- Nishihara N., Horiike S., Oka Y., Takahashi T., Kosaka T., Hosoya H. 1999. *Microtubule dependent movement of symbiotic algae and granules in Paramecium bursaria*. Cell. Motil. Cytoskel. 43 (2): 85–98
- Noh S.L., Choi J.M., An Y.J., Park S.S., Cho K.S. 2003. *Anaerobic biodegradation of toluene coupled to sulfate reduction in oil-contaminated soils: optimum environmental conditions for field applications*. J. Environ. Sci. Health A 38 (6): 1087–1097
- Pado R. 1965. *Mutual relation of protozoans and symbiotic algae in Paramecium bursaria. I. The influence of light on the growth of symbionts*. Fol. Biol. 13: 173–182
- Pado R. 1967. *Mutual relation of protozoans and symbiotic algae in Paramecium bursaria. II. Photosynthesis*. Acta Soc. Bot. Pol. 36: 97–108

- Pado R. 1969. *Mutual relation of protozoans and symbiotic algae in Paramecium bursaria. III. Nutritive requirements of the Chlorella clone occurring as an endosymbiont of Paramecium bursaria.* Acta Soc. Bot. Pol. 38: 39–55
- Pado R. 1972. *Light-induced reaction in Paramecium bursaria.* Fol. Biol. 20: 339–353
- Pado R. 1978. *Fototaksja i fotokineza u Paramecium bursaria.* Wydawnictwo Naukowe WSP, Kraków
- Pado R., Bator T. 2001. *Paramecium bursaria as a typical example of vegetal-animal symbiosis. Adaptation of wild cultures to laboratory conditions.* Polish Journal of Environmental Studies. 10 (suppl. I): 32–37
- Pado R., Paśmionka I., Pawłowska-Ćwiąg L., Starzyk K. 1995. *The effect of oxygen on the length of the denitrification period.* Acta Hydrobiol. 37: 163–170
- Pado R., Pawłowska-Ćwiąg L. 1997a. *Wpływ tlenu na skład frakcji zewnątrzkomórkowej u beztlenowych bakterii Desulfotomaculum acetoxidans DSM 771.* Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organisms. WSP Kraków. 274–275
- Pado R., Pawłowska-Ćwiąg L. 1997b. *Skład frakcji zewnątrzkomórkowej bakterii redukujących siarczyn Desulfotomaculum acetoxidans DSM 771 w zależności od wieku kultury.* Streszczenia XXXIII Zjazdu PTBioch., Katowice. 85
- Pado R., Pawłowska-Ćwiąg L. 1998. *The influence of saccharides present in medium on the growth rate of Paramecium bursaria.* Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organisms. WSP Kraków. 222–223
- Pado R., Pawłowska-Ćwiąg L., Osikowicz M. 1996. *Zróżnicowanie składu frakcji zewnątrzkomórkowej w zależności od katabolicznego substratu węglowego u Desulfotomaculum acetoxidans DSM 771.* Streszczenia XXXII Zjazdu PTBioch., Kraków. 61
- Patterson D.J. 2000. *Changing views of Protistan systematics: The taxonomy of Protozoa – an overview.* The illustrated guide to the Protozoa. Society of Protozoologists. Allen Press Inc., Lawrence, USA. 2–9
- Pawłowska-Ćwiąg L., Pado R. 1996. *Wpływ substratu węglowego na skład frakcji zewnątrzkomórkowej u bakterii z rodzaju Desulfuromonas.* Streszczenia XXXII Zjazdu PTBioch., Kraków. 62
- Pawłowska-Ćwiąg L., Pado R. 1997a. *Zmienność składu frakcji zewnątrzkomórkowej bakterii Desulfuromonas acetoxidans DSM 684 w zależności od czasu inkubacji.* Streszczenia XXXIII Zjazdu PTBioch., Katowice. 85
- Pawłowska-Ćwiąg L., Pado R. 1997b. *Zróżnicowanie składu frakcji zewnątrzkomórkowej u beztlenowych bakterii Desulfuromonas acetoxidans DSM 684 w zależności od poziomu tlenu w środowisku.* Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organisms. WSP Kraków. 280–281
- Piuri M., Sanchez-Rivas C., Ruzal S.M. 2003. *Adaptation to high salt in Lactobacillus: role of peptides and proteolytic enzymes.* J. Appl. Microbiol. 95 (2): 372–379
- Postgate J.R. 1984. *The sulfate reducing bacteria.* 2nd ed. Cambridge University Press, London
- Pringsheim E.G. 1928. *Physiologische Untersuchungen an Paramecium bursaria. Ein Beitrag zur Symbioseforschung.* Arch. Protistenk. 64: 289–418

- Provorov N.A. 2001. *Genetic-evolutionary basis of symbiosis doctrine*. Zh. Obshch. Biol. 62 (6): 472–495
- Querol A., Fernandez-Espinar M.T., del Olmo M., Barrio E. 2003. *Adaptive evolution of wine yeast*. Int. J. Food Microbiol. 86 (1–2): 3–10
- Rahat M. 1985. *Competition between Chlorellae in chimeric infections of Hydra viridis: the evolution of a stable symbiosis*. J. Cell. Sci. 77: 87–92
- Rahat M., Reich V. 1985. *Correlations between characteristics of some free-living Chlorella sp. and their ability to form stable symbioses with Hydra viridis*. J. Cell. Sci. 74: 257–266
- Rahat M., Reich V. 1986. *Algal endosymbiosis in brown hydra: host/symbiont specificity*. J. Cell. Sci. 86: 273–286
- Ramirez G., Bittle P.A., Rosen R., Rabb H., Pineda D. 1999. *High altitude living: genetic and environmental adaptation*. Aviat Space Environ. Med. 70 (1): 73–81
- Rasanen K., Laurila A., Merila J. 2003. *Geographic variation in acid stress tolerance of the moor frog, Rana arvalis. I. Local adaptation*. Evolution Int. J. Org. Evolution 57 (2): 352–362
- Raven J.A., Allen J.F. 2003. *Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants?* Genome Biol. 4 (3): 209
- Reinikainen M., Hietala J., Walls M. 1998. *Adaptations and resistance of zooplankton to stress: effects of genetic, environmental, and physiological factors*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 40 (1–2): 77–80
- Reisser M. 1986. *Endosymbiotic associations of freshwater protozoa and algae*. Progr. Protistol. 1: 195–214
- Reisser W. 1976. *The metabolic interactions between Paramecium bursaria Ehrbg. and Chlorella spec. in the Paramecium bursaria-symbiosis I. The nitrogen and the carbon metabolism*. Arch. Microbiol. 107 (3): 357–360
- Reisser W., Meier R., Görtz H.D., Jeon K.W. 1985. *Establishment, Maintenance and Integration Mechanisms of Endosymbiosis in Protozoa*. J. Protozool. 32 (3): 383–390
- Reisser W., Radunz A., Wiessner W. 1982. *Participation of algal surface structures in the cell recognition process during infection of aposymbiotic Paramecium bursaria with symbiotic chlorellae*. Cytobios. 33 (129): 39–50
- Rotschild L. 1989. *Protozoa, Protista, Protoctista: What's in a name?* J. Hist. Biol. 22: 277–305
- Satoh H., Nakamura Y., Ono H., Okabe S. 2003. *Effect of oxygen concentration on nitrification and denitrification in single activated sludge flocs*. Biotechnol. Bioeng. 83 (5): 604–607
- Schink B., Brune A., Schnell S. 1992. *Anaerobic degradation of aromatic compounds*. Microbial Degradation of Natural Product. Weinheim, New York, Basel, Cambridge. 219–242
- Schnepf E., Brown R.M. 1971. *On relationships between endosymbiosis and the origins of plastids and mitochondria*. Origin and Continuity of Cell Organelles. New York, Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag. 299–322
- Scholes P.B., Smith L. 1968. *Composition and properties of the membrane-bound respiratory chain system of Micrococcus denitrificans*. Biochim. Biophys. Acta 153: 363–375

- Schuster F.L., Prazak B., Ehret C.F. 1967. *Induction of trichocyst discharge in Paramecium bursaria*. J. Protozool. 14 (3): 483–485
- Semple K.T., Cain R.B. 1996. *Biodegradation of phenols by the alga Ochromonas danica*. Appl. Environ. Sat. 62 (4): 1265–1273
- Siegel R.W. 1960. *Hereditary endosymbiosis in Paramecium bursaria*. Exptl. Cell. Res. 19: 239–252
- Siegel W., Karakashian S.J. 1959. *Dissociation and restoration of endocellular symbiosis in Paramecium bursaria*. Anat. Rec. 134: 639
- Sobczyk L., Kiszka A. 1977. *Chemia fizyczna dla przyrodników*. PWN, Warszawa
- Sonneborn T.M. 1950. *Methods in the general biology and genetics of Paramecium aurelia*. J. Exper. Zool. 113: 87–148
- Sonneborn T.M. 1957. *Breeding systems, reproductive methods and species problems in Protozoa*. The species problems. Washington DC, Am. Assoc. Adv. Sci. 155–324
- Stahman J., Warthmann R., Cypionka H. 1991. *Na⁺-dependent accumulation of sulfate and tiosulfate in marine sulfate-reducing bacteria*. Arch. Microbiol. 155: 554–558
- Sukhotnik I., Shiloni E., Krausz M.M., Yakirevich E., Sabo E., Mogilner J., Coran A.G., Harmon C.M. 2003. *Low-fat diet impairs postresection intestinal adaptation in a rat model of short bowel syndrome*. J. Pediatr. Surg. 38 (8): 1182–1187
- Tanaka M., Murata-Hori M., Kadono T., Yamada T., Kawano T., Kosaka T., Hosoya H. 2002. *Complete elimination of endosymbiotic algae from Paramecium bursaria and its confirmation by diagnostic PCR*. Acta Protozool. 41: 255–261
- Thurman H.V. 1993. *Coral reefs*. Essentials of Oceanography, 4th ed. Macmillan Publ. N.Y. 336–341
- Todd S.J., Cain R.B., Schmidt S. 2002. *Biotransformation of naphthalene and diaryl ethers by green microalgae*. Biodegradation 13 (4): 229–238
- Tokushima H., Okamoto K.I., Miwa I., Nakaoka Y. 1994. *Correlation between circadian periods and cellular activities in Paramecium bursaria*. J. Comp. Physiol. A 175 (6): 767–772
- Totskii V.N., Khaustova N.D., Alshibli N.M., Sechniak A.L. 2002. *Genetic and biochemical mechanisms of ontogenetic and phylogenetic adaptation*. Tsitol. Genet. 36 (3): 69–75
- Trench R.K. 1979. *The cell biology of plant-animal symbiosis*. Ann. Rev. Plant Physiol. 30: 485–491
- Trench R.K. 1992. *Microalgal-Invertebrate Symbiosis*. Encyclopedia of Microbiology. Academic Press Inc. Vol. 3: 129–142
- Urząd Miasta Krakowa. 1997. *Swoszowice zdroj*. Strona internetowa Urzędu miasta Krakowa www.um.krakow.pl
- Vellai T., Takacs K., Vida G. 1998. *A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes*. J. Mol. Evol. 46 (5): 499–507
- Wallin I.E. 1927. *Symbioticism and the Origin of the Species*. Williams & Wilkins, Baltimore
- Wee S., Wilkinson B.J. 1988. *Insights into the cell envelope of Paracoccus denitrificans, a member of the α -subdivision of purple bacteria, through studies of its lysozyme susceptibility*. Can. J. Microbiol. 34: 952–959

- Weis D. 1969. *Regulation of host and symbiont population size in Paramecium bursaria*. *Experientia* 25 (6): 664–666
- Weis D.S. 1977. *Synchronous development of symbiotic chlorellae within Paramecium bursaria*. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 96 (1): 82–86
- Weis D.S. 1979. *Correlation of sugar release and Concanavalin A agglutinability with infectivity of symbiotic algae from Paramecium bursaria for aposymbiotic P. bursaria*. *J. Protozool.* 26: 117–119
- Wichterman R. 1953. *The Biology of Paramecium*. The Blakiston Company. New York
- Williams J.W. 1985. *Oznaczanie anionów*. PWN, Warszawa
- Xia J., Gao K. 2002. *Advances in research on CO₂ concentrating mechanism of green algae*. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao.* 13 (11): 1507–1510
- Yokota A., Kitaoka S. 1982. *Photorespiration and glycolate metabolism in algae and euglenoid*. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 27 (3): 475–490
- Ziesenisz E., Reisser W., Wiessner W. 1981. *Evidence of de novo synthesis of maltose excreted by the endosymbiotic Chlorella from Paramecium bursaria*. *Planta.* 153: 481–485
- Zwaan A., Putzer V. 1985. *Metabolic adaptations of intertidal invertebrates to environmental hypoxia (a comparison of environmental anoxia to exercise anoxia)*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 39: 33–62

Spis fotografii i rycin

Fotografie

1. Komórka *Paramecium bursaria* z widocznymi endosymbiontami *Chlorella sp.* (pow. 500× fot. autor) po s. 16
2. Komórka *Paramecium bursaria* hodowana w zróżnicowanych warunkach oświetlenia: a) oświetlenie ciągle, b) warunki ciemniowe (pow. 500× fot. autor) po s. 16
3. Mikroskopowy obraz preparatu służącego do określania liczebności endosymbiontów w komórkach *Paramecium bursaria* (pow. 500× fot. autor) s. 30

Ryciny

1. Schemat relacji troficznych w układzie symbiotycznym *Paramecium bursaria* – *Chlorella sp.* po s. 16
2. Schemat procedury preparatywnej stosowanej przy uzyskiwaniu naturalnych produktów metabolizmu bakterii desulfurykacyjnych s. 26
3. Krzywa kalibracyjna do kolorymetrycznego oznaczania koncentracji jonów azotanowych (III) metodą Griessa-Ilosvaya (spektrofotometr Cecil CE-8020) s. 32
4. Krzywa kalibracyjna do spektrofotometrycznego oznaczania koncentracji jonów siarczanowych (VI) w zakresie promieniowania ultrafioletowego (spektrofotometr Cecil CE-8020) s. 33
5. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności bakterii denitryfikacyjnych po s. 40
6. Zmiany koncentracji jonów azotanowych (V) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w obecności bakterii denitryfikacyjnych po s. 40
7. Zmiany koncentracji jonów azotanowych (III) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w obecności bakterii denitryfikacyjnych po s. 40
8. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności bakterii desulfurykacyjnych po s. 40
9. Zmiany liczebności pierwotniaków, liczebności bakterii i koncentracji jonów siarczanowych (VI) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w hodowli masowej, w obecności kontrolnego szczepu bakterii po s. 40
10. Zmiany liczebności pierwotniaków, liczebności bakterii i koncentracji jonów siarczanowych (VI) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w hodowli masowej, w obecności *Desulfovibrio gigas* DSM 1382 po s. 40
11. Zmiany liczebności pierwotniaków, liczebności bakterii i koncentracji jonów siarczanowych (VI) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w hodowli masowej, w obecności *Desulfovibrio sulfodismutans* DSM 3696 po s. 40

12. Zmiany liczebności pierwotniaków, liczebności bakterii i koncentracji jonów siarczanowych (VI) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w hodowli masowej, w obecności *Desulfococcus multivorans* DSM 2059 po s. 40
13. Zmiany liczebności pierwotniaków, liczebności bakterii i koncentracji jonów siarczanowych (VI) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w hodowli masowej, w obecności *Desulfosarcina variabilis* DSM 2060 po s. 40
14. Zmiany liczebności pierwotniaków, liczebności bakterii i koncentracji jonów siarczanowych (VI) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w hodowli masowej, w obecności *Desulfuromonas acetoxidans* DSM 684 po s. 40
15. Zmiany liczebności pierwotniaków, liczebności bakterii i koncentracji jonów siarczanowych (VI) podczas inkubacji *Paramecium bursaria* w hodowli masowej, w obecności *Desulfotomaculum acetoxidans* DSM 771 po s. 40
16. Zmiany liczebności endosymbiontów *Chlorella sp.* w komórkach *Paramecium bursaria* po 11 i 21 dniach inkubacji pierwotniaków w obecności bakterii desulfurykacyjnych w oświetleniu ciągłym po s. 40
17. Zmiany liczebności endosymbiontów *Chlorella sp.* w komórkach *Paramecium bursaria* po 11 i 21 dniach inkubacji pierwotniaków w obecności bakterii desulfurykacyjnych w zmiennych warunkach oświetlenia po s. 40
18. Przeciętne wartości współczynnika podziałów komórkowych bakterii desulfurykacyjnych podczas 21-dniowej inkubacji na pożywce sałatowej oraz w masowej hodowli orzęska *Paramecium bursaria*, prowadzonej w warunkach ciągłego oświetlenia oraz w warunkach zmiennych – do 11 dnia w ciemności, następnie w oświetleniu ciągłym po s. 40
19. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności supernatantów uzyskanych z hodowli bakterii desulfurykacyjnych po s. 40
20. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności ekstraktów uzyskanych z hodowli bakterii desulfurykacyjnych po s. 40
21. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności różnych stężeń kwasu glikolowego w warunkach ciągłego oświetlenia po s. 40
22. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności różnych stężeń kwasu glikolowego w zróżnicowanych warunkach oświetlenia po s. 40
23. Widma absorpcyjne pożywki sałatowej zawierającej różne koncentracje kwasu glikolowego, wykonane przed rozpoczęciem hodowli *Paramecium bursaria* i po jej zakończeniu (spektrofotometr Cecil CE-8020) po s. 40
24. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności różnych stężeń kwasu cynamonowego w warunkach ciągłego oświetlenia po s. 40
25. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności różnych stężeń kwasu cynamonowego w zróżnicowanych warunkach oświetlenia po s. 40
26. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności różnych stężeń kwasu ferulowego po s. 40
27. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności różnych stężeń kwasu *p*-aminobenzoesowego po s. 40

28. Intensywność rozwoju *Paramecium bursaria* w obecności różnych stężeń kwasu *p*-hydroksybenzoesowego po s. 40
29. Możliwe drogi wykorzystywania kwasu glikolowego w przemianach metabolicznych zachodzących w komórce s. 52
30. Wykorzystanie fenolu jako źródła węgla przez komórki glonów *Ochromonas danica* (Semple, Cain 1996) s. 53

Spis treści

1. Adaptacja organizmów do zmieniających się warunków życia na tle zjawiska symbiozy ♦ 7
 2. Charakterystyka związku symbiotycznego *Paramecium bursaria* ♦ 12
 3. Eksperymentalne warunki określania zdolności adaptacyjnych *Paramecium bursaria* ♦ 19
 4. Możliwości rozwoju *Paramecium bursaria* w różnych warunkach środowiska ♦ 37
 5. Metabolizm związku symbiotycznego *Paramecium bursaria* jako wyraz zdolności adaptacyjnych ♦ 44
- Literatura ♦ 58
- Spis fotografii i rycin ♦ 67

Akademia Pedagogiczna
im. Komisji Edukacji Narodowej
w Krakowie
Prace Monograficzne nr 413

ISSN 0239-6025

ISBN 83-7271-326-X