

RYSZARD PADO*

**Fotosynteza endosymbiontów *Chlorella*
jako czynnik adaptacyjny orzęska
Paramecium bursaria do środowiska**

S t r e s z c z e n i e

Określono rolę zielonych endosymbiontów *Chlorella* dla odżywiania się całego układu symbiotycznego pierwotniak-glon. Aktywność fotosyntezy *Paramecium bursaria* jest różna, zależnie od tego, z jakich warunków światła one pochodzą, pozostaje to w bezpośrednim związku z liczbą glonów przypadających na komórkę pierwotniaka.

Orzęski *Paramecium bursaria* pływają chętnie w ciemności i w słabym świetle, ale też i w pożywce o małej zawartości bakterii. W silnym świetle osiadają na dnie naczyń i bardzo długo pozostają w bezruchu.

Jeżeli przyjmie się założenie, że fotoakumulacja *Paramecium bursaria* zależy od fotosyntetycznej aktywności symbiontów, wówczas fotosynteza jest w jakimś sensie zastępowana ruchem komórki.

Wstęp

Każdy układ symbiotyczny może być rozpatrywany z punktu widzenia wzajemnego dopasowania się obydwu partnerów tego związku. Powszechnie wiadomo, że w porostach (*Lichenes*) stopień wzajemnych po-

* Instytut Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Krakowie.

wiązań jest najdalej posunięty. Uważa się też, że zwierzęta bezkręgowce w połączeniu z glonami tworzą również stabilne związki biologiczne. W takich przypadkach, jak się okazuje, bardzo istotnym problemem jest "transfer" produktów fotosyntezy. Jeżeli fotosynteza jest hamowana, wówczas endosymbionty ograniczają tempo wzrostu gospodarza - co może nawet spowodować jego śmierć. W warunkach laboratoryjnych istnieje możliwość utrzymania przy życiu aposymbiotycznego gospodarza, nie zdarza się to jednak nigdy w naturze.

Na podstawie licznych doniesień z literatury można stwierdzić, że symbioza nie jest stanem odnoszenia pełnych korzyści przez zwierzę i tylko w warunkach laboratoryjnych można tworzyć optymalne warunki dla ich wzrostu i rozwoju (Karakashian 1963, Siegel 1960).

Celem niniejszej pracy było stwierdzenie, czy fotosynteza roślinnych endosymbiontów *Chlorella* w pełni pokrywa potrzeby pokarmowe orzęska *Paramecium bursaria*, jak też i to czy fotosynteza pozostaje w jakimś związku z ruchliwością tego organizmu.

Materiał i metoda

A. Kultury *Paramecium bursaria* z bakteriami:

W badaniach użyte zostały orzęski *Paramecium bursaria*, które od wielu lat są hodowane w Zakładzie Mikrobiologii WSP w Krakowie. Hodowle prowadzone są na pożywkach z sałaty (*Lactuca sativa*), wartość pH 6.5-6.7, wg klasycznej metody Sonneborna (1950). Źródłem pokarmu dla orzęsków w tej pożywce były bakterie *Aerobacter aerogenes* szczep 535c. Na taką pożywkę z bakteriami przenoszono orzęski *Paramecium bursaria* i hodowano je w temp. 25°C, przy świetle białym ciągłym z lamp jarzeniowych, osiągając wartość około 1200 luksów. Okresowo kontrolowano tempo podziałów orzęsków a codziennie pH pożywki, którą wymieniano po 7 dobach.

B. Sterylne kultury orzęsków *Paramecium bursaria*:

Dla realizacji podstawowego celu niniejszej pracy konieczne było uzyskanie zarówno sterylnej pożywki jak i orzęsków w niej żyjących. Ten pozornie prosty zabieg okazał się jednak dość trudny w realizacji, dopiero po licznych próbach uzyskano pożądaną stan aseptyki.

Stosowana często w podobnych eksperymentach metoda wirowania orzęsków w 1^{-1} mM Tris-HCl; CaCl_2 -0.25; MgCl_2 -0.5; KCl-2.0 przy pH 7.2 z dodatkiem antybiotyków (ampicylina, penicylina, chloramphenicol) w dawkach letalnych dla bakterii, obserwowano również negatywny wpływ tych antybiotyków na same orzęski. Tak więc metoda ta nie mogła być w tych eksperymentach stosowana. Z konieczności więc zastosowano uciążliwą niestety metodę Wichtermanna (1953), są to kolejne pasaże-kąpiele orzęsków w sterylnej pożywce, ale bez antybiotyku. Kontrola sterylności prowadzona była na płytkach Petriego z pożywką Loeffera zestaloną 2% agarem oraz na podłożach bakteriologicznych "bulion wzbogacony".

C. Pomiary przemiany gazowej w kompleksie orzęsek-glon:

Fotosyntezę orzęsków *Paramecium bursaria* określano mikrorespirometrem Zurzyckiego (1955) i Starzeckiego (1961), stosując bufor węglanowy nr 10, po 40 μl dla każdej komory. Do pomiarów przemiany gazowej odliczano każdorazowo po 100 komórek *Paramecium bursaria* przenoszonych mikropipetą do "kropli wiszącej" - metodyka opisana przez Pado (1967). Lampa projekcyjna "NARWA 250 W" zasilana była z autotransformatora w układzie ze stabilizatorem zaniżonym napięciem 200 V. Stosowana w układzie optycznym odpowiedniej kombinacji neutralnych filtrów siatkowych daje możliwość uzyskania światła w zakresie 0-12 000 luksów, przy stałej "temperaturze barwy" żarówki. Pomiary gazometryczne przeprowadzano przy stałej temp. 25°C . Intensywność fotosyntezy i oddychania wyrażano w μl tlenu

(O_2) wydzielanego lub pobranego przez 1 komórkę *Paramecium bursaria* na 10 minut w ciągu 40-minutowego okresu pomiarów. Przedstawione wyniki są średnią z 3 powtórzeń.

Wyniki

Na podstawie uzyskanych rezultatów (ryc. 1), można stwierdzić, że w początkowym okresie - do 72 godzin, intensywność fotosyntezy zarówno w kulturach sterylnych (ryc. 1-1A), jak też w kulturach z bakteriami (ryc. 1-1B) jest podobna. Pionowa strzałka na ryc. 1 wskazuje granicę czasową = 72 godziny, kiedy to dokonana została zmiana w natężeniu światła ze 150 luksów do 2 500 luksów. Ten prosty zabieg spowodował, że orzęski od tego momentu znalazły się w znacznie silniejszym świetle, co jak wiadomo wyzwała odpowiednią reakcję aparatu fotosyntetycznego endosymbiotycznych glonów. Z analizy wykresu na ryc. 1-1A widać, że z chwilą zwiększenia natężenia światła w aseptycznych seriach orzęsków wyraźnie rośnie fotosyntetyczna sprawność endosymbiotycznych glonów, podczas gdy w analogicznych warunkach glony zawarte w orzęskach hodowanych na pożywkach z dodatkiem bakterii - fotosyntetyzują prawie z taką samą intensywnością, jak to robiły w początkowym okresie eksperymentu, kiedy eksponowane były słabym natężeniem światła (100-150 luksów).

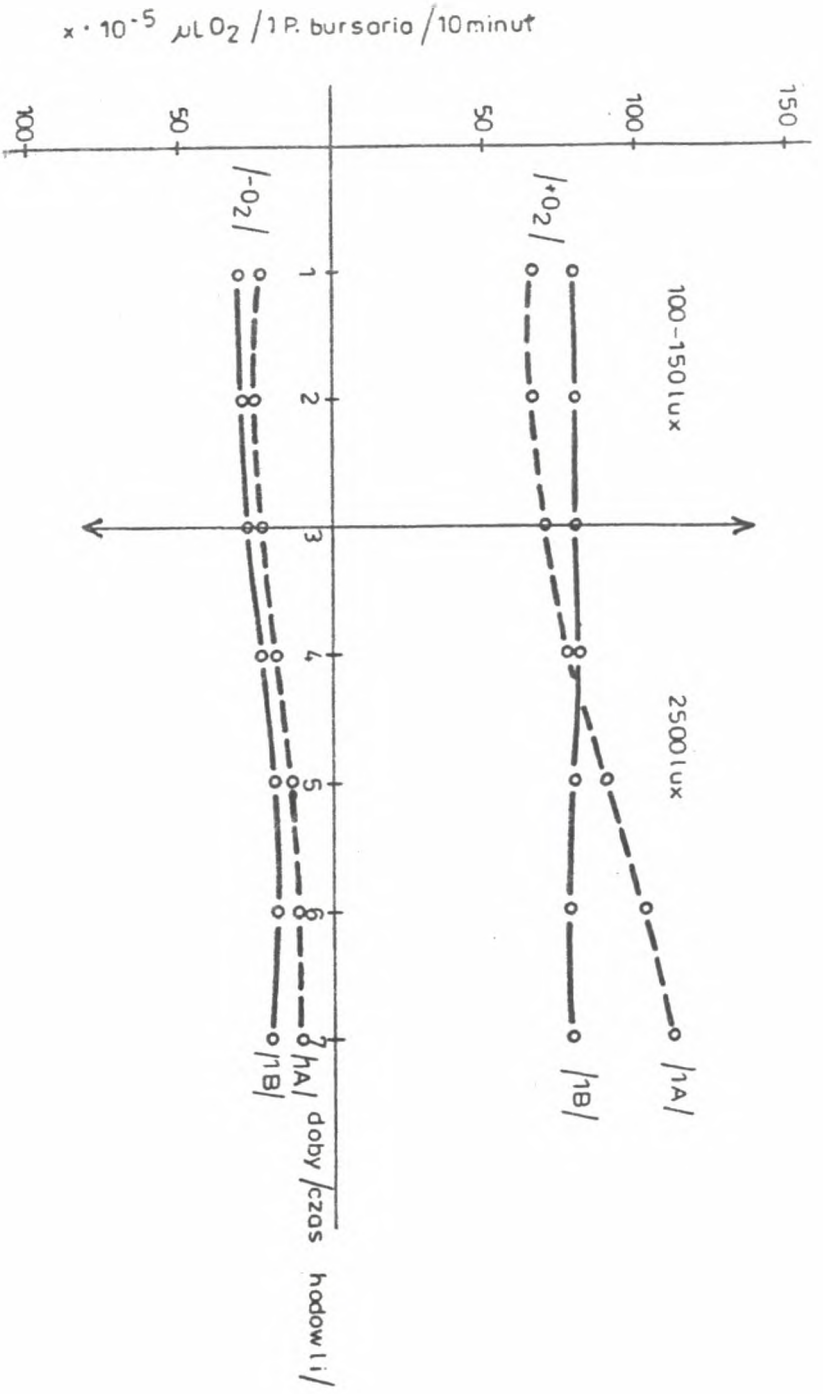
Interesująco również przedstawia się intensywność fotosyntetyczna endosymbiontów po 5 lub 6 dobach przeliczona na jednego orzęska *Paramecium bursaria* i kształtuje się ona następująco. W seriach sterylnych (ryc. 1-1A) wartość ta jest znacznie wyższa i wynosi $110 \mu l O_2$, w przeliczeniu na jednego orzęska w ciągu 10 minut, podczas gdy orzęski w pożywce z bakteriami (ryc. 1-1B) fotosyntetyzują z intensywnością około $75 \mu l O_2$ na jednego orzęska w ciągu 10 minut i to analogicznie dla obydwu serii.

Dane te wskazują, że sprawność fotosyntetyczna endosymbiontów w kulturach aseptycznych jest znacznie wyższa od rejestrowanej dla orzęsków na podłożach z bakteriami. Omawiany powyżej efekt wzrostu sprawności fotosyntetycznej endosymbiontów *Chlorella* w kulturach aseptycznych jest tym lepiej widoczny, jeżeli rozpatrzmy fotosyntezę tych glonów na tle kinetyki podziałów komórki pierwotniaka i wiążącej się z nią zawartości endosymbiontów w takiej komórce.

Na ryc. 2 przedstawiono graficznie kinetykę procesów podziałowych orzęska *Paramecium bursaria*, jak też liczby endosymbiontów *Chlorella* w okresie 7 dni hodowli. Na ryc. 2-1A widać znaczny spadek liczby endosymbiontów przypadających na jedną komórkę orzęska w kulturze aseptycznej.

Na podstawie rezultatów niniejszej pracy, podjęto próbę oszacowania produkcji fotosyntetycznej, mierzonej ilością wydzielonego tlenu (O_2) przez jedną komórkę endosymbiotycznej *Chlorella*. Okazuje się, że w pierwszej fazie eksperymentu wartości te są porównywalne zarówno dla serii aseptycznych, jak też z bakteriami i wynoszą około $0.12 \mu l O_2$ w przeliczeniu na jedną komórkę *Chlorella* na 10 minut, podczas gdy w kulturach 7-dniowych sterylnych jedna komórka endosymbiotycznej *Chlorella* produkuje około $0.16 \mu l$ tlenu (O_2), natomiast 7-dniowe kultury orzęsków w hodowlach niesterylnych w analogicznych warunkach produkują $0.07 \mu l O_2$, w przeliczeniu na jedną komórkę endosymbiotycznej *Chlorella* na 10 minut. Jest to jak widać produkcja fotosyntetyczna relatywnie mniejsza niż u orzęsków na podłożach z bakteriami, a jej bezwzględne wartości należy w tym przypadku wiązać z większą stabilnością liczby endosymbiontów *Chlorella* występujących w komórkach hodowanych na podłożach niesterylnych.

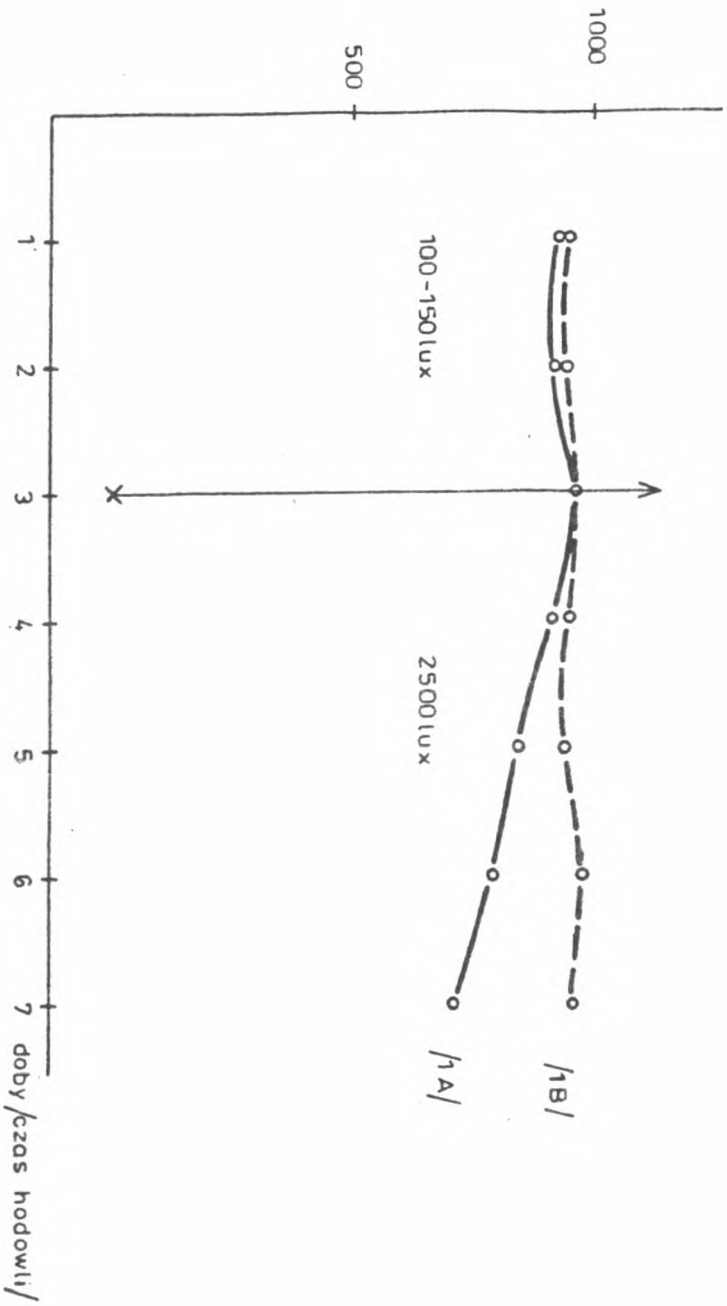
Wyniki uzyskane w tych eksperymentach (ale też i wcześniejsze, Pado 1965) dają podstawę do stwierdzenia, że nie tylko tempo po-



Ryc. 1. Intensywność fotosyntezy (+O₂) i oddychania (-O₂) = X · 10⁻⁵ μl O₂/1 P. bursaria/10 min.

(1A) orzęski z kultury aseptycznej; (1B) orzęski w kulturach z bakteriami.
 Strzałka pionowa oddziela hodowlę w słabym i silnym świetle po 72 godz. (3 doby).

Liczba endosymbiontów *Chlorella* w
1 komórce *Paramecium bursaria*



Ryc. 2. Zawartość glonów *Chlorella* w jednej komórce *Paramecium bursaria* w 7-dniowej hodowli.
Strzałka pionowa oddziela hodowlę po zmianie intensywności światła ze 100-150 luksów na 2500 luksów po 72 godzinach (3 doby).
(1A) pożywka aseptyczna; (1B) pożywka z bakteriami.

działów komórki wiąże się z fotosyntezą, wpływa ona również na mobilność całego kompleksu symbiotycznego, jakim jest pierwotniak *Paramecium bursaria*. Ruch symbiotycznych orzęsków *Paramecium bursaria* jest dość skomplikowany i w tej pracy analiza tego ruchu nie jest głównym celem. Dlatego też zasygnalizowane zostaną jedynie dwa elementy tego ruchu, ściśle wiążące się z pobieraniem pokarmu przez orzęski oraz fotosyntezą endosymbiontów, która wpływa zasadniczo na bilans pokarmowy całego kompleksu symbiotycznego orzęsek-glon.

Okazuje się, że orzęski aktywnie pływają w ciemności (0 luksów). Wprawdzie szybkość pływania w tych warunkach wynosi tylko 150-175 $\mu\text{m}/\text{sek.}$, to jednak są one praktycznie w bezustannym ruchu. Ruch komórki w tym kontekście należy uznać za ważny element w zdobywaniu pokarmu przez orzęski. W ciemności tym pokarmem dla orzęska są bakterie rozproszone w pożywce.

Dynamika ruchu zmienia się natomiast pod wpływem światła i to zarówno w wyniku zmiany długości fali, jak i natężenia działającego światła. W niższych natężeniach światła białego, np. 200 luksów orzęski pływają ze średnią prędkością 145 $\mu\text{m}/\text{sek.}$; przy 2000 luksów odpowiednio 205 $\mu\text{m}/\text{sek.}$; a przy 10 000 luksów 410 $\mu\text{m}/\text{sek.}$ Jest to typowy efekt przyspieszania ruchu fototaktycznie wrażliwych organizmów jako rezultat wzrostu natężenia światła.

Dyskusja

Orzęsek *Paramecium bursaria* jest jedynym gatunkiem z rodzaju *Paramecium*, który żyje w symbiozie z glonami *Chlorella* (Pado 1965, Brown i Nielsen 1974). Wrażliwość na światło u tych organizmów jest bardzo zróżnicowana, obserwuje się tu reakcje o odmiennych mechanizmach. Jedną z takich reakcji, obserwowaną też w niniejszych eksperymentach jest tzw. "reakcja unikowa" ("avoiding reaction"), która daje orzęskom możliwość pewnej orientacji w środowisku. W wy-

niku tego wyszukują one miejsca oświetlone a jednocześnie unikają stref ocienionych, konsekwencją jest u tych organizmów "pozytywna fotoakumulacja" również bardzo istotny element w związku z fotosyntezą zielonych endosymbiontów (Saji i Oosawa 1974). Zależność między fotosyntezą a fototaksją u tych orzęsków stwierdzili: Niess, Reisser i Weissner (1981), którzy zauważają, że inhibitor fotosyntezy 3-(3,4-dichlorophenyl) - 1,1-dimethylurea (DCMU) znosi również fototaksję. Podobnie też, orzęski *Paramecium bursaria* pozbawione *Chlorelli* (aprosymbiotyczne) nie wykazują reakcji fototaktycznych (Iwatsuki i Naitoh 1981, Cronkite i Van Den Brink 1981).

Na uwagę jednak zasługują rezultaty, z których wynika, że odżywanie się pokarmem bakteryjnym, jest dla orzęska *P. bursaria* bardziej atrakcyjne niż fotosynteza. Nawet w warunkach optymalnego światła koniecznego dla przebiegu fotosyntezy, organizmy te, jeżeli tylko znajdują w pożywce obfitość bakterii, "pełzają" po dnie i ścianach naczyń hodowlanych, co ułatwia im "zbieranie" bakterii tam zalegających.

Fotosynteza endosymbiontów natomiast staje się z całą pewnością istotną formą zdobywania pokarmu przez ten organizm, w obliczu niedostatku lub zupełnego braku bakterii w środowisku. Fotosynteza jest jednak tym mechanizmem, który wspomaga odżywanie się całego kompleksu symbiotycznego *Paramecium bursaria* (Pado 1967). Pozwala to orzęskom przeżyć trudne dla nich okresy życiowe. W związku z tym należy traktować fotosyntezę jako bardzo istotny czynnik adaptacyjny do zmieniających się warunków środowiskowych. *Paramecium bursaria* dysponujący "pośrednio" aparatem fotosyntetycznym ma znacznie większe możliwości troficzne niż osobniki aprosymbiotyczne czy też takie jak *Paramecium caudatum*, czy *Paramecium aurelia* - z natury rzeczy orzęski bezglonowe.

Rezultaty niniejszej pracy są w pełni zgodne z doniesieniami Niess, Reisser i Weissner (1981); stwierdzają oni, że fotoakumulacja *Paramecium bursaria* zależy od fotosyntetycznej aktywności endosymbiotycznych glonów. Wpływ światła na fotoakumulację orzęsków w plamie świetlnej oraz połączenie tego faktu z fotosyntezą pozwala widzieć ten proces jako taki, w którym ruch zostaje w pewnym sensie zastąpiony produkcją fotosyntetyczną endosymbiontów.

Matsuoka i Nakaoka (1988) stwierdzili, że te komórki *Paramecium bursaria*, które zbierają się w plamie świetlnej - zmniejszają szybkość pływania, a w końcu stają się zupełnie nieruchome. Doniesienia te w pełni pokrywają się z rezultatami tu przedstawionymi, jak i wcześniejszymi (Pado 1975), nieruchome "zielone" orzęski do złudzenia podobne są w takim układzie do "zielonej rośliny".

Pierwotniaki (Protozoa) chętnie nawiązują symbiozę z różnymi glonami (Taylor 1983). Ścisłość związku symbiotycznego może być bardzo zróżnicowana. W przypadku *P. bursaria*, orzęsek-gospodarz jest tylko częściowo uzależniony od swoich endosymbiontów. Glony *Chlorella* stanowią pewien rodzaj "rezerwy" w łańcuchu troficznym całego kompleksu symbiotycznego, która to rezerwa może być uruchamiana w miarę aktualnych potrzeb pierwotniaka (Pado 1967). Również Cavalier-Smith (1983) dostrzega u licznych gatunków *Protozoa* częściowe, a innym razem niemal totalne uzależnienie pokarmowe od fotosyntezy roślinnych endosymbiontów. W skrajnych przypadkach symbionty roślinne (najczęściej niewielkie glony z rodzaju *Chroococcales*) są tak dalece włączone w wewnętrzną "ekonomię" komórki gospodarza, że stają się autentycznymi organelami komórkowymi. Dodatni efekt światła w procesie rozmnażania symbiotycznych orzęsków został przedstawiony dla *Paramecium bursaria* przez badaczy amerykańskich (Lee, Lee i Weiss 1985), którzy stwierdzili, że orzęski hodowane

przez 7 dni w jasnym świetle były 10x bardziej liczne niż te, które inkubowano w słabym świetle.

Literatura

- Brown J.A. i Nielsen P.J., 1974. Transfer of photosynthetically produced carbohydrate from endosymbiotic *Chlorella* to *Paramecium bursaria*. J. Protozool. 21, 569-570.
- Cavalier-Smith T., 1983. Endosymbiotic origin of the mitochondrial envelope, in Schenk H.E.A. and Schwemmler W., eds., Endocytobiolog. II: Intracellular Space as Ologogenetic Ecosystem Walter de Gruyter, Berlin and New York, 2, 265-279.
- Cronkite D. i Van Den Brink S., 1981. The role of oxygen and light in guiding "photoaccumulation" in the *Paramecium bursaria-Chlorella* symbiosis. J. exp. Zool. 217, 171-177.
- Iwatsuki K. i Naitoh Y., 1981. The role of symbiotic chlorella in photoresponses of *Paramecium bursaria*. Proc. Japan Acad. B 57: 318-325.
- Karakashian S.J., 1963. Growth of *Paramecium bursaria* as influenced by the presence of algal symbionts. Physiol. Zool. 36, 52-68.
- Lee J.J., Lee M.J. i Weiss D., 1985. Possible adaptative value of endosymbionts to their protozoan hosts. J. Protozool. (32) 3 pp. 380-382.
- Matsuoka K. i Nakaoka Y., 1988. Photoreceptor potential causing phototaxis of *Paramecium bursaria*. J. exp. Biol. 137, 477-485.
- Niess D., Reisser W. i Weissner W., 1981. The role of endosymbiotic algae in photoaccumulation of green *Paramecium bursaria*. Planta 152: 268-271.

- Pado R., 1965. Mutual relation of protozoans and symbiotic algae in *Paramecium bursaria*. I./ The influence of light on the growth of symbionts, *Folia Biologica* 13 (2): 173-182.
- Pado R., 1967. Mutual relation of protozoans and symbiotic algae in *Paramecium bursaria*. II./ Photosynthesis. *Acta. Soc. Bot. Polon.* 36: 97-108.
- Pado R., 1975. The effect of white light on kinesis in the protozoans *Paramecium bursaria*. *Acta Protozool.* 14: 83-97.
- Saji M. i Oosawa F., 1974. Mechanism of photoaccumulation in *Paramecium bursaria*. *J. Protozool.* 21: 556-561.
- Siegel R., 1960. Hereditary endosymbiosis in *Paramecium bursaria*. *Exp. Cell Res.* 19: 239-252.
- Sonneborn T.M., 1950. Methods in the general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. *J. Exper. Zool.* 113: 87-148.
- Starzecki W., 1961. An improved microrespirometer and extension of its application over plants with big leaves. *Acta. Soc. Bot. Polon.* 30: 327-343.
- Taylor D.L., 1983. Some eco-evolutionary aspects of intracellular symbiosis. *Int. Rev. Cytol., Suppl.* 14: 1-28.
- Wichterman R., 1953. *The biology of Paramecium*. Blakiston, New York.
- Zurzycki J., 1955. Chloroplast arrangement as a factor in photosynthesis. *Acta Soc. Bot. Polon.* 24: 27-63.

PHOTOSYNTHESIS OF ENDOSYMBIONTS *CHLORELLA*
AS A FACTOR OF ADAPTATION OF
THE INFUSORIAN *PARAMECIUM BURSARIA* TO THE HABITAT

S u m m a r y

The role of green endosymbionts *Chlorella* in the nourishment of the whole symbiotic complex protozoan - alga has been determined. Photosynthetic activity of *Paramecium bursaria* varies depending on the light conditions the protozoa are in this being in direct relation to the number of algae per one protozoan cell.

The infusorian *Paramecium bursaria* swims willingly in - darkness and in weak light but it also does so in a medium of low content of bacteria. In strong light it settles on the bottom of the vessel and remains there motionless for a very long time.

If we assume that the photoaccumulation of *Paramecium bursaria* depends on the photosynthetic activity of the symbionts, then photosynthesis is in a way compensated for by the motion of the cell.

ФОТОСИНТЕЗ ЭНДОСИМБИОНТОВ *CHLORELLA* КАК ФАКТОР,
АДАПТИРУЮЩИЙ ИНФУЗОРИЮ *PARAMECIUM BURSARIA* К СРЕДЕ

Р е з ю м е

В ходе эксперимента была определена роль зелёных эндосимбионтов *Chlorella* в питании всей системы симбиоза: простейшие – водоросли. Активность фотосинтеза *Paramecium bursaria* различна, в зависимости от того, из каких условий света они происходят, что непосредственно связано с числом водорослей, приходящих на одну клетку простейших.

Инфузории *Paramecium bursaria* охотно плавают в темноте и при слабом освещении, но также в питательной среде с незначительным содержанием бактерий. При сильном освещении оседают они на дне посуды и очень долго они остаются в неподвижном состоянии.

Если предположить, что фотоаккумуляция *Paramecium bursaria* зависит от фотосинтетической активности симбионтов, тогда фотосинтез в каком-то смысле заменяет движение клетки.