

Зоологический институт РАН

На правах рукописи

СМУРОВ
Алексей Олегович

СОЛЕНОСТНЫЕ АДАПТАЦИИ ИНФУЗОРИЙ
РОДА *PARAMESCIUM* (CILIOPHORA, PENICULIA)

03.00.33 - Протистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2006

Работа выполнена в Лаборатории солоноватоводной гидробиологии ЗИН РАН и Лаборатории зоологии беспозвоночных БНИИ Биолого-почвенного факультета СПбГУ, г. Санкт-Петербург

Научные руководители:

доктор биологических наук Фокин Сергей Иванович
доктор биологических наук Аладин Николай Васильевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Скарлато Сергей Орестович
доктор биологических наук, профессор Бергер Виктор Яковлевич

Ведущее учреждение:

Педагогический университет им. А.И. Герцена

Защита диссертации состоится « _____ » _____ 2007 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.223.01 по защите диссертаций при Зоологическом институте РАН по адресу:

199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. д. 1, актовый зал.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Зоологического института РАН

Автореферат разослан « _____ » _____ 2007 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Н.А.Петрова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы:

Проблема отношений между индивидуумами, популяциями и средой их обитания является одной из основных проблем биологии. Известным способом изучения этих отношений являются экспериментальные исследования.

Для разработки теоретических положений и получения практических результатов при изучении адаптаций организмов исключительное значение имеет феномен акклимации, который заключается в реагировании организма на изменения только одного какого-либо фактора среды. Очевидно, что исследование акклимации можно провести в "чистом" виде только в лабораторных условиях. В настоящее время явление акклимации, которое первоначально рассматривалось как лабораторный феномен, подтверждено многочисленными исследованиями и для естественных популяций организмов, относящихся ко многим систематическим группам (Хлебович, 1981). Наибольшее количество работ к настоящему времени посвящено изучению температурных акклимаций организмов. Акклимации к другим факторам среды, в том числе и к изменению солености, изучены менее полно.

Несмотря на значительные методические сложности исследования адаптаций одноклеточных организмов, протисты как экспериментальные объекты обладают по сравнению с многоклеточными гидробионтами рядом преимуществ, а именно возможностью: а) вырастить в короткий срок большое количество экспериментальных клеток; б) работать с генетически однородным материалом. Кроме того, простейших в силу своей двойственной природы, т.е. сочетания в своей организации одноклеточности и полноценного организма можно рассматривать как более простой экспериментальный объект по сравнению с многоклеточными организмами, при изучении которого не нужно учитывать специфику функционирования клеток различных тканей.

Успех экспериментальных исследований в значительной мере предопределяется выбором объекта, который должен соответствовать нескольким критериям. Кроме легкости и быстроты проведения экспериментов, значение имеет также накопленный в литературе большой объем информации об этом организме. Этим условиям удовлетворяют инфузории, принадлежащие к родам *Paramecium* и *Tetrahymena*, о чем свидетельствует имеющееся к настоящему времени огромное количество публикаций по различным аспектам биологии и физиологии этих простейших.

Большинство экспериментальных исследований отношения инфузорий к солености среды выполнено на парамециях, - представители рода *Tetrahymena* в этом отношении исследованы значительно хуже. Важное значение для настоящего исследования имеет то, что все виды рода *Paramecium* способны существовать в пресноводных биотопах. Кроме того, парамеции регулярно встречаются в олигогалинных участках эстуариев, и иногда одни и те же виды были обнаружены одновременно как в полигалинных, так и в пресных водах.

В недавнее время впервые был проведен многоуровневый анализ данных, полученных для большинства известных видов парамеций, по единой схеме с использованием максимально стандартизированных оценок, позволивший выявить филогенетические связи и разработать систематику рода *Paramecium* (Фокин, 2001, 2002; Fokin et al., 2004). Такое исследование оказалось возможным благодаря собранной С.И. Фокиным уникальной коллекции живых культур парамеций, включающей почти все валидные морфологические виды. Соответственно, появилась возможность провести исследование соленостных реакций нескольких видов рода *Paramecium* по стандартным схемам. Полученные в результате экспериментов данные с учетом уже имеющихся сведений о филогенетическом положении видов дают возможность увидеть, как менялись соленостные реакции парамеций в процессе эволюции. В свою очередь, это позволило обосновать новую методологию анализа данных по экологическим реакциям видов для использования их в филогенетических и систематических построениях.

Феномен соленостных адаптаций можно изучать на разных уровнях, - от молекулярного до уровня экологии популяций. Действительно, в литературе имеются факты, показывающие существование феномена адаптации к солености у *Paramecium* как на указанных, так и на промежуточных уровнях (Плеханов и др., 2006; Ax, Ax, 1960; Cronkite et al., 1991; Tominaga et al., 1998; Stock et al., 2001). Так как было невозможно охватить в нашем исследовании весь спектр проблем, касающихся соленостных адаптаций парамеций, мы ограничили поле исследований. Главное внимание было уделено изучению соленостной толерантности и резистентности различных видов инфузорий рода *Paramecium*.

В настоящей работе мы использовали два взаимосвязанных подхода, которые позволили, как нам кажется, успешно сравнивать экологические характеристики видов: толерантный полигон и потенциальную толерантность. Эти характеристики

остаются практически неизменными для каждого вида, если в качестве среды при их оценке используется вода с постоянными соотношениями ионов.

Для континентальных водоемов характерны иные, чем в океане, пропорции ионов, которые изменяют соленостные реакции гидробионтов. Исследователями давно было замечено, что в континентальных соленых озерах при той же солености, что и в море, многие виды имеют более широкие соленостные толерантные диапазоны (Хлебович, 1974; Аладин, 1995; Williams, 1998). Однако этот результат получен только для многоклеточных гидробионтов: одноклеточные организмы отсутствуют в списке тестированных видов. Поэтому мы решили изучить также влияние воды с другими, чем в океане, ионными пропорциями (аральской) на толерантные полигоны и потенциальную толерантность парамеций.

Среди реакций организма на изменение солености среды, кроме резистентности и толерантности, перспективно изучение изменения уровня белков теплового шока, что также может отражать эволюционные тенденции видов, различающихся по своему отношению к солености среды.

Цель и задачи исследования:

Основной целью работы была проверка высказанной нами гипотезы о соответствии между филогенетической позицией различных видов рода *Paramecium* и их соленостными реакциями.

В соответствии с этим были поставлены следующие задачи:

1. Разработать методы оценки соленостной толерантности у инфузорий.
2. Выявить потенциальные соленостные толерантные диапазоны и построить соленостные толерантные полигоны для 13 видов инфузорий рода *Paramecium*, различающихся по своему отношению к солености среды.
3. Сопоставить полученные данные по потенциальной соленостной толерантности и соленостным толерантным полигонам видов рода *Paramecium* с филогенетическими построениями, сделанными ранее на основе морфологических, морфометрических и молекулярно-биологических данных для тех же самых видов парамеций.
4. Оценить различия в толерантности разных парамеций к изменению солености воды с аральским и океаническим составом солей во всем диапазоне потенциальной соленостной толерантности видов.

5. Получить данные об изменении уровня белков теплового шока семейства 70 кДа в клетках пресноводных парамеций при изменении солёности среды их обитания.

Научная новизна работы:

1. Разработан новый метод определения толерантных границ у одноклеточных организмов.
2. Выяснено, что род *Paramecium* пресноводного происхождения.
3. Впервые установлено, что одноклеточные организмы могут реагировать на изменение солёности среды изменением уровня содержания белков теплового шока семейства 70 кДа.
4. Изменения толерантных границ одноклеточных организмов при их адаптации к воде с составом солей, отличающимся от океанического, происходят так же, как и у многоклеточных организмов.

Теоретическая и практическая значимость работы:

В настоящей работе установлена возможность применения разработанных ранее методов изучения температурных адаптаций многоклеточных гидробионтов в исследованиях по солёностным адаптациям одноклеточных организмов. Показана возможность использования данных по солёностной потенциальной толерантности организмов в исследованиях по их систематике. Материалы диссертации могут быть использованы при чтении курсов по протистологии и экологии беспозвоночных.

Апробация работы:

Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на VI, VII и VIII конференциях по теме "Проблемы изучения, рационального использования и охраны природных ресурсов Белого моря" в 1995, 1998 и 2001 гг., на Беломорской конференции СПбГУ в 2001 г., на Отчетных сессиях Зоологического института РАН в 1997, 1998, 2000, 2003 и 2005 гг., на семинарах лаборатории солоноватоводной гидробиологии ЗИН РАН.

Публикации:

По теме диссертации опубликовано 9 статей, 1 глава в коллективной монографии и 7 тезисов докладов.

Структура и объем работы:

Диссертация состоит из введения, 7 глав, заключения, выводов

и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 111 страницах, содержит 40 рисунков и 7 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Материал и методика.

Экспериментальные исследования выполнены в лаборатории солоноватоводной гидробиологии Зоологического института РАН, Беломорской Биологической станции Зоологического института РАН и лаборатории Зоологии беспозвоночных БиНИИ Санкт-Петербургского государственного университета в 1995-2005 гг.

Всего в работе было использованы 20 клонов 13 видов парамеций из коллекции живых культур лаборатории беспозвоночных БНИИ Санкт-Петербургского университета: *P. caudatum* (KAR98-1), *P. multimicronucleatum* (YIA3-3, GL-5), *P. jenningsi* (IA, SA1-10), *P. bursaria* (PK-60), *P. putrinum* (PG-5), *P. primaurelia* (HV15-2), *P. biaurelia* (T10-5), *P. sexaurelia* (Psex-3), *P. polycaryum* (Sh2-4, K-2, Pp-5), *P. calkinsi* (OCE4-1), *P. duboscqui* (AHV3-3, BB2-3), *P. nephridiatum* (I1-5-4, SR98-1, SR98-2), *P. woodruffi* (BB-5).

Инфузорий культивировали на салатной среде инокулированной *Klebsiella aerogenes* (Sonneborn, 1970). Необходимую солёность создавали добавлением в среду раствора искусственной морской соли, приготовленной по рецепту Шубравого (1983) на дистиллированной воде или разведением дистиллированной водой концентрата беломорской морской воды. Инфузорий кормили 1-2 раза в неделю.

Устойчивость инфузорий к действию солёности была определена для *P. caudatum*, *P. jenningsi*, *P. polycaryum*, *P. putrinum*, *P. sexaurelia*, *P. bursaria*, *P. calkinsi* и *P. nephridiatum*.

Во время "острых" опытов клетки переносили из среды, в которой их содержали, в ряд тестовых солёностей в диапазоне 5-15 ‰. Если клетки какого-либо клона выживали в данной солёности, то опыт повторяли в ряду более высоких солёностей (15-60 ‰).

В каждом опыте, который проводили в одной повторности для каждого значения солёности, тестировали смертность 25-70 клеток (как правило, 30-40), а в контроле, - 25-30 клеток.

Для полученных в фиксированные промежутки времени данных по смертности рассчитывали логиты, для которых затем находили коэффициенты уравнения линейной регрессии. Полученные уравнения использовали для расчета времени 10% (LT_{10}), 50% (LT_{50}) и 90% (LT_{90}) смертности клеток в тестовой солёности.

В ходе выполнения этой работы применяли два способа определения толерантных границ. В первом из них за толерантную границу принимали асимптоту, перпендикулярную оси тестовой солености, полученную с помощью расчета дробно-линейной регрессии. Для расчета дробно-линейной регрессии была создана оригинальная программа, в которой реализовано несколько алгоритмов ее расчета (Smurov et al., 1999).

Второй способ основан на предложенной нами методике (Smurov, Fokin, 1998), которая учитывает особенности биологии протистов. Мы предложили считать толерантной границей не летальное значение солености для отдельных клеток, а таковое значение для клеточной популяции. При этом учитывается, что отдельные клетки, подвергнутые действию солености могут выживать и существовать в течение длительного времени, но при этом не способны дать потомство, которое, выжив, в свою очередь тоже даст потомство.

Потенциальная соленостная толерантность инфузорий, акклимированных к различным соленостям, и толерантные соленостные полигоны были получены для 15 клонов, относящихся к 13 видам парамеций.

Примененный нами метод получения данных, необходимых для построения толерантного полигона, заключается в акклимации к нескольким соленостным концентрациям внутри толерантного диапазона. После завершения срока, необходимого для полной акклимации (около 1.5-2 месяцев), для всех значений солености акклимации определяли толерантные границы. Для вновь полученных культур снова определяли толерантные границы. Процедура повторялась до достижения потенциальных толерантных границ. В результате был построен подробный график зависимости значений толерантных границ от солености акклимации.

Сходство толерантных полигонов оценивалось по формуле: $2C/(A+B)$, где C - величина общей площади толерантных полигонов, A - площадь первого полигона, B - площадь второго полигона. Матрица сходства была кластеризована при помощи взвешенного парно-группового метода.

Белки теплового шока определяли у пресноводной инфузории *Paramecium jenningsi* (клон SA1-10). Для проведения опытов инфузории были акклимированы к пресной среде и к воде соленостью 2 ‰. Срок акклимации клеток составлял не менее 2 месяцев при комнатной температуре (18-20 °С). Для простейших стрессовым соленостным воздействием считался перекрестный перенос клеток из одной солености акклимации в другую.

Глава 2. Систематика и филогения парамеций.

Род *Paramecium* относится к подклассу *Peniculia* класса *Oligohyumenophorea*. Пеникулины были впервые указаны как таксон высокого ранга в работе Корлисса (Corliss, 1956). Группа получила название благодаря присутствию у клеток пеникулюса, который был впервые описан в работе Гелеи (Gelei, 1934) и позднее использован в целях таксономии (Faure-Fremiet, 1950).

Вудруф (Woodruff, 1921) ввел подразделение рода *Paramecium* на две группы не таксономического характера: "aurelia" и "bursaria". К этой группе относят виды комплекса "*P. aurelia*", а также *P. caudatum*, *P. multimicronucleatum*, *P. jenningsi* и *P. wichtermani* (Wichterman, 1986). Группа видов "bursaria" включает *P. bursaria*, *P. calkinsi*, *P. polycaryum* и *P. putrinum*.

Изучение морфологических особенностей видов этих групп (строения и числа ядер, топографии кинет и кинетосом, способа стомаатогенеза при делении, особенностей конъюгации и т.п.) в дополнение к форме тела позволило Янковскому предложить деление рода на 3 группы, имеющие статус подрода: *Helianter*, *Cypreostoma* и *Paramecium* (Янковский, 1969; Jankowski, 1972). Янковским была также предложена схема эволюции рода, которая, по его мнению, происходила следующим образом: *Helianter* → *Cypreostoma* → *Paramecium*.

К настоящему времени накопилось значительное количество данных не только по классической морфологии парамеций, но и по ультраструктуре переходной зоны ресничек (Фокин, 1995), видовому составу эндобионтов (Фокин, 1989а, 1989б, 1989с; Fokin, Sabaneeva, 1993; Fokin et al., 1996, 1999а, 1999б), морфологии и функциональным особенностям макро- и микронуклеусов (Фокин, 1979, 1989а; Fokin, 1997; Fokin, Chivilev, 1999; Fokin, Ossipov, 1981), морфологии сократительных вакуолей (Фокин, 1986), сравнительному анализу гена рибосомальной РНК малой субъединицы (Struder-Kypke et al., 2000; Fokin et al., 2004, 2006), морфометрическому анализу клонов (Fokin, Chivilev, 1999, 2000).

Основные результаты по исследованию сходств и различий разных видов рода *Paramecium*, полученные с использованием разных методов, оказываются схожими и приводят к следующим обобщениям (Фокин, 2001):

1. Самыми древними видами оказываются *P. bursaria*, *P. putrinum* и *P. duboscqui*. Они располагаются в основании родового древа и значительно отличаются от других видов парамеций по ряду морфологических и биологических признаков.

2. Недостаточно ясной представляется позиция *P. polycaryum*.

Морфологические и биологические особенности этого вида имеют сходство с аналогичными особенностями видов, относящимися к разным группам.

3. Выделяются 2 кластера видов: кластер *P. woodruffi*, *P. nephridiatum*, *P. calkinsi* и кластер в составе *P. jenningsi*, *P. caudatum*, *P. multimicronucleatum* и комплекса видов *P. aurelia*.

По результатам комплексного анализа данных, полученных разными методами С.И. Фокиным (Fokin et al., 2004) была предложена следующая система рода, которая использована в настоящем исследовании: Subgenus *Chloroparamecium* Fokin et al., 2004 в составе *Paramecium (Chloroparamecium) bursaria* Focke, 1836; Subgenus *Helianter* Jankowski, 1969 в составе *P. putrinum* Claparede et Lachman, 1858; *P. duboscqui* Chatton et Brachon, 1933; Subgenus *Cyriostomum* Fokin et al., 2004 в составе *P. calkinsi* Woodruff, 1921; *P. polycaryum* Woodruff et Spencer, 1923; *P. nephridiatum* Gelei, 1925; *P. woodruffi* Wenrich, 1928; *P. pseudoputrinum* Dragesco, 1970; Subgenus *Paramecium* Jankowski, 1969 в составе *P. caudatum* Ehrenberg, 1833; Комплекс *P. aurelia* (15 видов) (Sonneborn 1975; Aufderheide et al., 1983), *P. multimicronucleatum* Powers et Mitchel, 1910; *P. jenningsi* Diller et Earl, 1958; *P. wichtermani* Mohammed et Nashed, 1968-1969; *P. africanum* Dragesco, 1970; *P. jankowskii* Dragesco, 1972; *P. ugandae* Dragesco, 1972; *P. schewiaffii* Fokin et al., 2001.

Глава 3. Физиологические механизмы и органеллы, обеспечивающие адаптацию инфузорий к солености среды.

На основе литературных данных для инфузорий нами выделены несколько коррелированных процессов, ответственных за адаптацию клетки к солености среды: осмотическая регуляция, ионная регуляция, работа сократительной вакуоли, изменение содержания свободных аминокислот в клетке, формирование поверхностных пузырьков, формирование пищеварительных вакуолей. В главе подробно описана динамика этих процессов и их связь. Показано, что инфузории (как пресноводные так и морские) поддерживают гиперосмотичность цитоплазмы по отношению к осмотичности внешней среды.

Глава 4. Изменение уровня БТШ70 при адаптации инфузорий к солености среды.

Методом иммуноблоттинга в тотальном белковом экстракте инфузории *P. jenningsi*, акклимированной к пресной среде, нами выявлен полипептидный антиген, который перекрестно реагирует

с антителами к БТШ70 крупного рогатого скота (рис. 1). Молекулярная масса выявленного белка одинакова, как для клеток, акклимированных к пресной и соленой салатной среде, так и для клеток, подвергнутых тепловому и соленостному шоку.

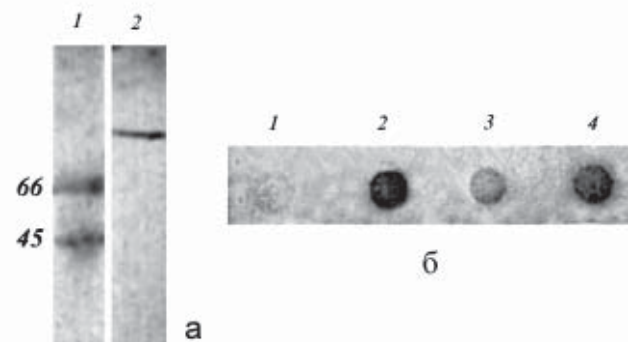


Рис. 1. а - БТШ70 *P. jenningsi*, акклимированных к пресной среде. Данные иммуноблоттинга после электрофореза в 13% - ном полиакриламидном геле. 1 - реперы молекулярной массы: 66 кДа (бычий сывороточный альбумин) и 45 кДа (яичный альбумин), окраска понсо S; 2 - тотальный белковый экстракт *P. jenningsi*, иммуноферментная реакция с антителами против БТШ-70 быка, проявление методом ЕСЛ. б - Повышение уровня БТШ70 в клетках *P. jenningsi* в результате "соленостного" шока. Дот-блоттинг тотального белкового экстракта *P. jenningsi*. Иммунохимическое окрашивание с применением антител против БТШ-70 быка. Проявление бензидином. 1 - инфузории, акклимированные к пресной среде; 2 - инфузории, акклимированные к 2‰; 3 - "соленостный" шок: инфузории перенесены в среду с соленостью 2‰ из пресной среды; 4 - "соленостный" шок: инфузории перенесены в пресную среду из среды с соленостью 2‰.

У инфузорий *P. jenningsi*, акклимированных к пресной среде, БТШ70 обнаружен в незначительной концентрации, тогда как у клеток, акклимированных к солености 2‰, - в значительной. Уровень экспрессии БТШ70 у клеток, подвергнутых соленостному стрессу (стрессовым соленостным воздействием считался перенос клеток из пресной среды в воду соленостью 2‰, и наоборот), также был выше, чем у инфузорий, акклимированных к пресной

среде. У инфузорий, перенесенных из пресной среды в воду соленостью 2 ‰, белок, очевидно, частично синтезируется de novo так же, как и в ответ на понижение солености.

Глава 5. Соленостная резистентность и соленостные толерантные границы парамеций.

В главе рассмотрены теоретические воззрения на понятия резистентной и толерантной зон действия фактора в связи с методами определения их границ. Приведен обзор методов оценки устойчивости и толерантных границ у многоклеточных и одноклеточных организмов. На основании анализа литературных и собственных данных, приведенных в этой главе, показано, что величины соленостных толерантных границ, полученные при использовании метода сохранения клона, очень сходны с результатами, полученными при математической обработке кривых смертности. Проверка на сходство результатов, полученных обоими методами, выявила отсутствие достоверных различий на 95 %-ном уровне значимости.

В главе также приведены собственные данные по оценке соленостной устойчивости 8 видов парамеций, акклимированных к пресной среде. Полученные данные по зависимости медианного времени 50 %-ной гибели от тестовой солености для всех исследованных видов оказалось удобно описывать при помощи гиперболических кривых. Кривая 50 %-ной смертности имеет типичную гиперболическую форму для всех полученных нами экспериментальных данных. Показано, что график смертности акклимированных к среде соленостью 6 ‰ *P. jenningsi* и к среде соленостью 5 ‰ *P. caudatum* расположен в обоих случаях выше, чем для неакклимированных.

Анализ кривых 50 %-ной смертности для инфузорий подрода *Paramecium* показывает, что, несмотря на значительное увеличение (в результате акклимации) продолжительности жизни в соленостях, близких к критической, верхний порог выживаемости изменяется незначительно. Соленость 8-9 ‰ остается непреодолимой.

Другая картина была получена нами для инфузорий, относящихся к подроду *Cypræostomum*. Все изученные виды легко акклимируются к соленостям, значительно превышающим критическую соленость (5-8 ‰), которая может служить надежным маркером для разделения пресноводной и морской фаун (Хлебович, 1974).

Наименьшую устойчивость к воздействию солености демонстрируют виды, относящиеся к подродам *Helianter* и

Chloroparamecium. Верхняя толерантная граница для обоих видов (*P. putrinum*, *P. bursaria*), акклимированных к пресной среде, расположена в области 3 ‰, а время выживания в средах соленостью 5-7 ‰ также заметно меньше, чем у всех других изученных видов.

Глава 6. Соленостные толерантные полигоны и соленостные потенциальные толерантные диапазоны парамеций.

Концепция температурного толерантного полигона впервые была предложена канадским ихтиологом Фраем (Fry, 1947; Fry et al., 1942, 1946). Если определить толерантные границы к повышению и понижению тестовых значений температурного фактора для всего диапазона значений фактора, при которых возможна акклимация организма, то можно построить толерантный полигон. Он представляет собою график зависимости верхней и нижней толерантных границ от акклимационных значений фактора. Фактически толерантный полигон отражает не только зависимость толерантности от условий акклимации, но и зону потенциальной толерантности. Так как потенциальный толерантный диапазон представляет проекцию толерантного полигона на ось акклимационных значений фактора, или на ось тестовых значений фактора, его можно рассматривать как "линейный" образ толерантного полигона. Эти проекции равны.

Температурный толерантный полигон имеет, как правило, форму многоугольника. Сходную форму имеют полученные нами для парамеций соленостные толерантные полигоны (рис. 2).

Форма полигона исследованных нами видов варьирует от четырехугольной у *P. putrinum*, до пятиугольной у *P. bursaria*, *P. caudatum*, *P. jenningsi*, *P. multimicronucleatum*, *P. nephridiatum*, *P. calkinsi*, *P. woodruffi*, *P. dubosqui* и шестиугольной у *P. polycaryum*, *P. primaurelia*, *P. biaurelia*, *P. sexaurelia*.

Наиболее важными характеристиками при описании полигонов мы считали: значение верхней толерантной границы при акклимации к пресной салатной среде (начальная ордината); существование нижней толерантной границы, отличающейся по значению от 0 (ноль соответствует пресной минерализации); ширину зоны потенциальной толерантности; площадь толерантного полигона; ширину зоны, в которой возрастает значение верхней толерантной границы при изменении солености акклимации.

P. putrinum и *P. bursaria* демонстрируют наименьшую площадь толерантных полигонов. Эти виды не могут приспособиваться к солености более чем 2-3 ‰. *P. putrinum* не может аккли-

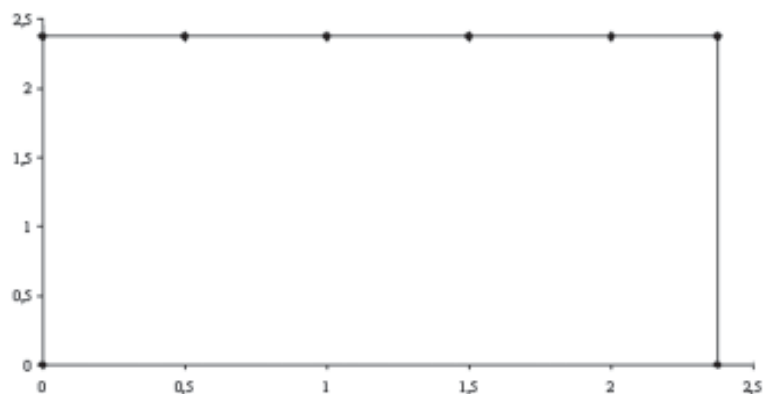


Рис. 2а. Соленостный толерантный полигон *P. putrinum*. По оси абсцисс - соленость акклимации, ‰; по оси ординат - тестовая соленость.

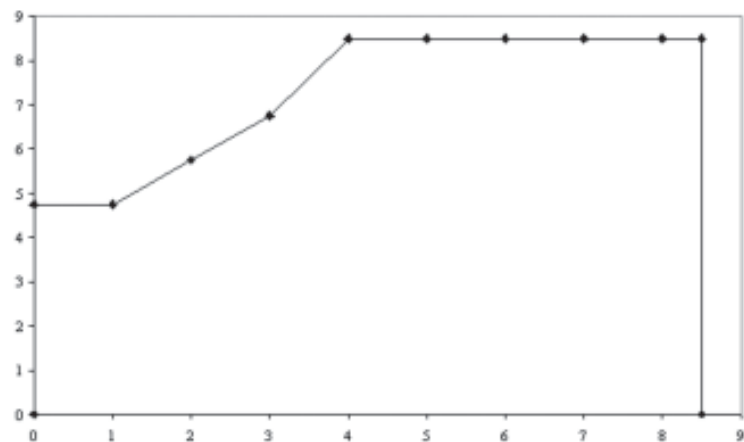


Рис. 2б. Соленостный толерантный полигон *P. multimicronucleatum*. По оси абсцисс - соленость акклимации, ‰; по оси ординат - тестовая соленость.

мироваться вообще. Для *P. bursaria* возможна акклимация в диапазоне от пресной воды до солености среды 0.5 ‰.

P. caudatum, *P. multimicronucleatum* и *P. jenningsi* имеют большую площадь толерантных полигонов, чем *P. putrinum* и *P. bursaria*. Соленостные толерантные границы клонов этих видов,

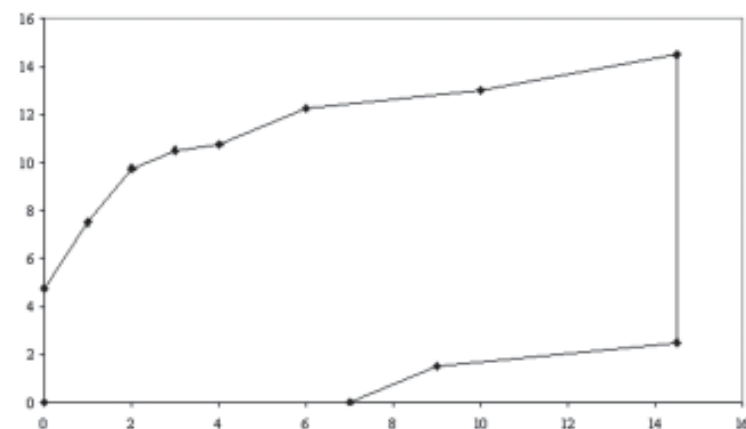


Рис. 2в. Соленостный толерантный полигон *P. primaurelia*. По оси абсцисс - соленость акклимации, ‰; по оси ординат - тестовая соленость.

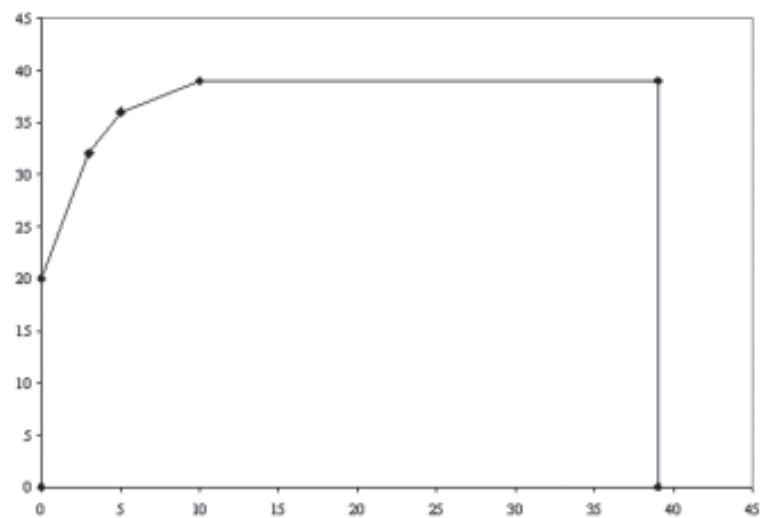


Рис. 2г. Соленостный толерантный полигон *P. woodruffi*. По оси абсцисс - соленость акклимации, ‰; по оси ординат - тестовая соленость.

акклиматизированных к пресной среде, имеют значения в пределах 3-4.5 ‰. *P. caudatum*, *P. multimicronucleatum* и *P. jenningsi* могут быть акклиматизированы к солености 6.5-8.5 ‰.

Виды комплекса *P. aurelia*, имеют большую площадь толерантных полигонов, чем вышеупомянутые 3 вида. Они могут акклиматизироваться к солености 12-15 ‰. Полигон толерантности *P. polycaryum* имеет почти те же особенности, что полигоны видов комплекса *P. aurelia*.

Эвригалинные виды парамеций *P. calkinsi*, *P. duboscqui*, *P. nephridiatum* и *P. woodruffi* имеют наибольшие площади толерантных полигонов. Соленостные толерантные границы клонов этих видов, акклиматизированных к пресной среде, значительно превышают величину критической солености (5-8 ‰). Ширина зоны, в которой возрастает значение верхней толерантной границы, при изменении солености акклиматизации, почти та же, что и для других видов парамеций.

Для того чтобы выявить наиболее важные характеристики толерантных полигонов парамеций, мы описали 14 их признаков и провели анализ главных компонент. Согласно проведенному анализу первые два фактора исчерпывают более 93 % общей дисперсии (71.2 % - для первого фактора и 22.5 % - для второго). На основании распределения значений факторов 13 видов парамеций в пространстве первого и второго факторов можно выявить сходные полигоны. Всего этим методом нами выделены три группы. В первую входят такие виды, как *P. caudatum*, *P. multimicronucleatum*, *P. jenningsi*, *P. bursaria* и *P. putrinum*, во вторую - *P. primaurelia*, *P. biaurelia*, *P. sexaurelia* и *P. polycaryum*, в третью - *P. calkinsi*, *P. duboscqui*, *P. nephridiatum* и *P. woodruffi*.

Для оценки сходства толерантных полигонов нами был предложен другой метод, основанный на выявлении доли общей площади двух сравниваемых полигонов. В матрице сходства толерантных полигонов, полученной для 13 видов парамеций взвешенным парно-групповым методом, выделяются три кластера аналогичных выделенным на основании метода главных компонент (рис. 3).

Глава 7. Влияние химического состава растворенных в воде солей на соленостные толерантные границы инфузорий.

Для экспериментов были выбраны виды, изначально имеющие разную потенциальную соленостную толерантность. Она была наименьшей у *P. caudatum* и наибольшей - у *P. primaurelia*. Различия в потенциальной толерантности парамеций в аральской и

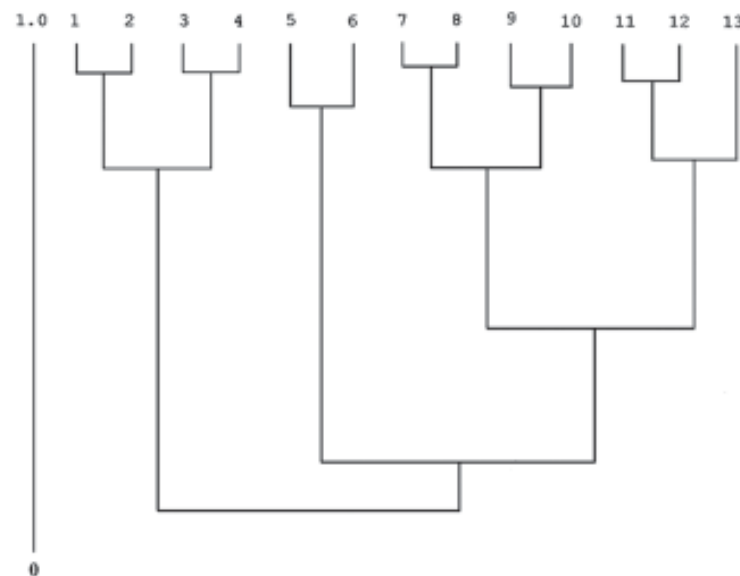


Рис. 3. Диаграмма сходства толерантных полигонов парамеций. 1 - *P. nephridiatum*, 2 - *P. duboscqui*, 3 - *P. woodruffi*, 4 - *P. calkinsi*, 5 - *P. putrinum*, 6 - *P. bursaria*, 7 - *P. primaurelia*, 8 - *P. biaurelia*, 9 - *P. sexaurelia*, 10 - *P. polycaryum*, 11 - *P. caudatum*, 12 - *P. multimicronucleatum*, 13 - *P. jenningsi*.

морской воде были тем больше, чем выше было значение потенциальной толерантной границы для морской воды.

Соленостный толерантный полигон *P. caudatum* в аральской воде имел большую площадь, чем в воде с океаническим составом солей (рис. 4). Это относится и к остальным двум полигонам исследованных видов. Кроме того, несколько менялась форма полигонов.

Если заменить значения солености соответствующими им хлорностями, то различия в величине толерантных границ сглаживались: в меньшей степени - у *P. caudatum* и заметно - для двух других видов.

Мы проверили гипотезу о том, что замена величин верхней границы соленостной толерантности соответствующими им хлорностями сводит на нет различия между экспериментальными данными, полученными для морской и аральской воды.

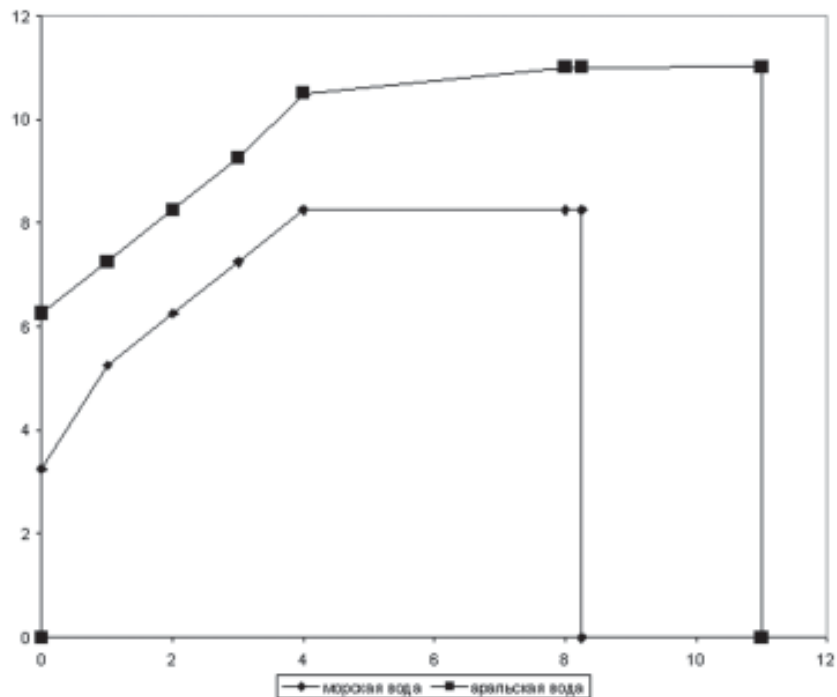


Рис. 4а. Соленостный толерантный полигон *P. jenningsi* в воде океанического и аральского состава солей. По оси абсцисс - соленость акклимации, ‰; по оси ординат - тестовая соленость, ‰.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что различия между величинами толерантных границ инфузорий в морской и аральской воде объясняются количественными различиями концентраций ионов ($P < 0.01$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методы, применяемые для оценки толерантных границ инфузорий, акклимированных к пресной и соленой среде, как методом сохранения клона, так и при помощи дробно-линейной регрессии зависимости времени 50 %-ной смертности от тестовой солености, дают достоверно не различающиеся результаты.

Оценки толерантных границ, полученные главным образом при помощи метода сохранения клона, были применены для построения толерантных полигонов.

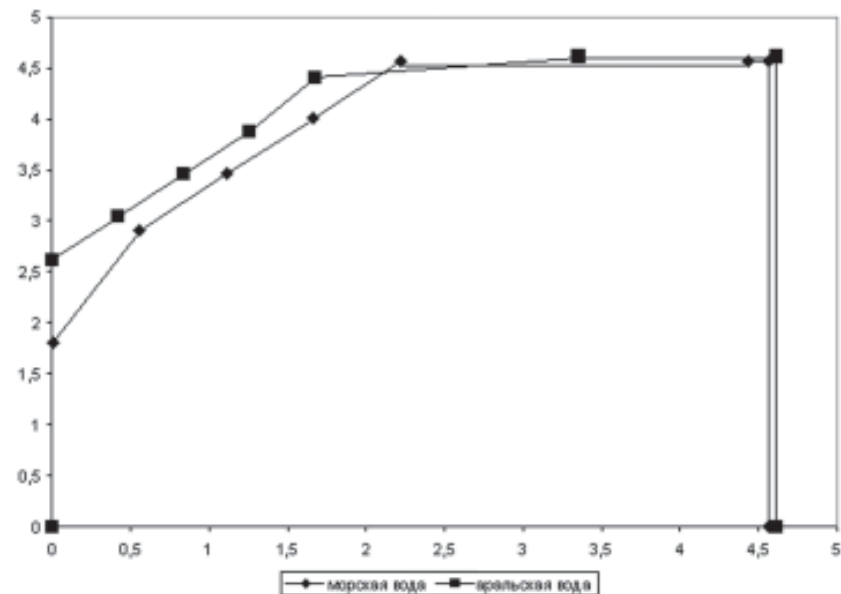


Рис. 4б. Соленостный толерантный полигон *P. jenningsi* в воде океанического и аральского состава солей. По оси абсцисс - соленость акклимации, ‰ Cl⁻; по оси ординат - тестовая соленость, ‰ Cl⁻.

Выделенные нами группы в значительной степени совпадают с установленными ранее другими методами: морфометрическим анализом и анализом последовательности гена малой субъединицы рибосомальной РНК.

С учетом последней классификации рода *Paramecium* (Fokin et al., 2004), выделенные на основании анализа соленостных толерантных полигонов и потенциальных соленостных толерантных диапазонов группы в значительной степени совпадают с подродами *Paramecium* и *Cypriostoma*.

Наши данные показали сходство с данными, полученными другими методами, и подтверждают возможность использования соленостных толерантных полигонов в исследованиях по систематике водных организмов, по крайней мере, для таксонов низшего ранга.

С учетом того, что в основании филогенетического дерева располагаются пресноводные виды, а также того, что верхние толерантные границы меняются почти исключительно в области солености

акклимации от пресной воды до величины 5-6 ‰, можно заключить, что род *Paramecium* - пресноводного происхождения.

Результаты, полученные нами, позволяют видеть некоторые экологические группировки видов, способных существовать в пресных водах. Пути возникновения экологических групп, выделенных по отношению к солености среды, позволяют проследить данные по филогенетическим позициям видов *Paramecium*.

Таких экологических групп может быть не менее 4. **Первая группа** включает виды, способные существовать в пределах от пресной воды до солености 6-8 ‰. **Вторая группа**, которую мы назвали "истинно пресноводными видами", происходит от вышеупомянутой группы. Эти виды способны существовать при соленостях не превышающих 2.5-3 ‰, и, соответственно, могут регулировать внутреннюю осмолярность в этих пределах. **Третью группу** формируют многочисленные виды комплекса *P. aurelia* и *P. polycaryum*. Эти виды могут существовать в более соленой воде - до 12-16 ‰. Левая часть их толерантных полигонов, в отличие от правой приблизительно соответствует толерантным полигонам центральной группы. Эти виды в соленостях выше 8-9 ‰ фактически могут только выживать, так как темп деления сильно уменьшается. Мы назвали эту группу "метапресноводной". **Последняя (четвертая) группа** включает формы, которые можно назвать "истинно эвригалинными" (термин вводится нами). Они могут выдерживать прямой перенос от верхней потенциальной соленостной границы непосредственно в пресную воду. Верхняя граница потенциальной соленостной толерантности приблизительно равна океанической солености.

У парамеций в воде с аральским составом солей происходит смещение соленостных толерантных диапазонов в сторону их увеличения. Так же, как это было показано ранее другими исследователями, для многоклеточных животных, наблюдается совпадение соленостных толерантных диапазонов по хлорности.

Обитание парамеций в условиях повышенной солености для них можно оценить как неблагоприятное, что маркируется повышенным (по сравнению с пресной средой) содержанием белка теплового шока. При переносе в иную соленость уже накопленный в клетке БТШ70 расходуется, и одновременно идет синтез нового белка.

ВЫВОДЫ

1. Соленостные толерантные границы для инфузорий можно оценивать двумя методами: а) оценка верхней пороговой соле-

ности, основанная на анализе кривых "соленость-медианное летальное время" и б) метод сохранения клона, основанный на способности клеточной популяции сохранять жизнеспособность после изменения солености среды. Оба метода приводят к идентичным результатам и могут быть использованы для получения данных, необходимых для построения толерантного полигона.

2. На основании анализа потенциальной соленостной толерантности и видовых соленостных толерантных полигонов выделены 4 группы видов:

- а) стеногалинные пресноводные: *P. putrinum* и *P. bursaria*;
- б) пресноводные: *P. caudatum*, *P. jenningsi*, *P. multimicronucleatum*;
- в) метапресноводные: виды группы *P. aurelia* и *P. polycaryum*;
- г) эвригалинные: *P. duboscqui*, *P. nephridiatum*, *P. woodruffi* и *P. calkinsi*.

3. Сопоставление имеющихся в литературе представлений о филогении рода *Paramecium* с полученными в настоящей работе данными по соленостным реакциям парамеций позволяет заключить, что этот род пресноводного происхождения.

4. Соленостные толерантные границы парамеций, адаптированных к воде с аральским составом солей, отличаются от определенных для тех же видов в воде с океаническим составом солей.

5. Уровень содержания белков теплового шока семейства 70 кДа в клетках пресноводных парамеций увеличивается при их адаптации к повышению солености среды.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Смуров А.О., Фокин С.И.* Адаптационные возможности различных парамеций к фактору солености // Проблемы изучения, рационального использования и охраны природных ресурсов Белого моря. Материалы VI Международной конференции. - Кандалакша, 1995. С. 93.

2. *Смуров А.О., Фокин С.И.* Новая методика определения потенциальных толерантных соленостных границ у простейших // Проблемы изучения, рационального использования и охраны природных ресурсов Белого моря. Материалы VII Международной конференции. - Архангельск, 1998. С. 194-196.

3. *Фокин С.И., Смуров А.О.* Влияние заражения *Paramecium caudatum* макронуклеарным симбионтом *Holospira obtusa* на устойчивость к действию солености // Проблемы изучения, рационального использования и охраны природных ресурсов Белого моря.

Материалы VII Международной конференции. - Архангельск, 1998. С. 134-136.

4. *Смулов А.О., Фокин С.И.* Роль макронуклеарных симбионтов парамеций при адаптации клеток к неблагоприятной солености / Отчетная научная сессия по итогам работ 1997 г. Тезисы докладов. - СПб., 1998. С. 39.

5. *Смулов А.О., Плотников И.С., Фокин С.И.* Использование данных по смертности парамеций для оценки их толерантных диапазонов // Отчетная научная сессия по итогам работ 1998 г. Тезисы докладов. - СПб., 1999. С. 46-47.

6. *Smurov A.O., Fokin S.I.* Resistance of *Paramecium caudatum* infected with endonuclear bacteria *Holospora* against salinity impact // Proceed. Zool. Inst. Russ. Acad. Sci. 1998. Vol. 276. P. 175-178.

7. *Smurov A.O., Fokin S.I.* Resistance of various *Paramecium* species (Ciliophora, Peniculina) to salinity of environment // Protistology, 1999. V. 1, № 1. P. 53-63.

8. *Smurov A.O., Plotnikov I.S., Fokin S.I.* Using the data of *Paramecium* mortality for estimation of their tolerant ranges // Proceed. Zool. Inst. Russ. Acad. Sci. 1999. Vol. 281. P. 135-140.

9. *Smurov A.O.* On the methods for estimation on salinity tolerance of ciliates // Protistology, 2000. Vol. 1. № 3. P. 123-131.

10. *Смулов А.О., Фокин С.И.* Использование данных по соленостной толерантности парамеций для таксономических исследований // Вестн. СПбГУ. 2001. Вып. 4, № 27, сер. 3. С. 16-19.

11. *Смулов А.О. Фокин С.И.* Соленостная толерантность *Paramecium* (Ciliophora, Peniclia) // Филогенетический аспект. Отчетная научная сессия по итогам работ 2000 г. 2001. - СПб., ЗИН РАН, С. 43-44.

12. *Фокин С.И., Смулов А.О.* Способы использования соленостных толерантных полигонов в исследованиях по систематике водных организмов // Материалы VIII региональной научно-практической конференции "Проблемы изучения, рационального использования и охраны природных ресурсов Белого моря". 2001. С. 53-54.

13. *Fokin S.I., Smurov A.O.* Salinity tolerance of *Paramecium* (Ciliophora, Peniculia): phylogenetical aspect // Proceed. Zool. Inst. Russ. Acad. Sci. 2001. Vol. 289. P. 83-88.

14. *Смулов А.О.* Планктонные инфузории солоноватоводных карстовых озер // Уникальные экосистемы солоноватоводных карстовых озер Среднего Поволжья (ред. А.Ф. Алимов, Н.М. Мингазова). - Казань: Издательство Казанского ун-та. 2001. С. 141-148.

15. *Smurov A.O., Fokin S.I.* Use of salinity tolerance data for investigation of systematic of *Paramecium* (Ciliophora, Peniculia) // Protistology, 2001. Vol. 2. № 2. P. 130-138.

16. *Plekhanov A.Yu., Smurov A.O., Ivanova L.O., Goodkov A.V.* Change in Hsp70 level in freshwater ciliates and amoebae during adaptation to environmental salinity change // Proceed. Zool. Inst. Russ. Acad. Sci. 2005. Vol. 308. P. 63-70.

17. *Плеханов А.Ю., Смулов А.О., Подлипаева Ю.И., Иванова Л.О., Гудков А.В.* Белок теплового шока пресноводных простейших и его участие в адаптации к изменению солености среды обитания // Цитология. 2006. Т. 8. Вып. 6. С. 530-534.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность своим руководителям, д.б.н. С.И. Фокину и д.б.н. Н.В. Аладину - за руководство и консультации по теме работы; своим коллегам из лаборатории солоноватоводной гидробиологии ЗИН РАН и лаборатории зоологии беспозвоночных БНИИ СПбГУ за помощь в работе над диссертацией, сотрудникам ББС ЗИН РАН им. О.А. Скарлато за неформальное обсуждение проблем теории адаптаций. Выражаю особую благодарность проф., д.б.н. В.В. Хлебовичу и к.б.н. А.В. Гудкову за ценные советы.

Подписано к печати 20.12.2006
Формат 60x84 1/16
Печать ризограф. Бумага офсетная.
Тираж 100 экз. Объем 1 п.л.

Зоологический институт РАН
199034, СПб., Университетская наб., 1.