

МАКІН Б. (<https://orcid.org/0000-0001-5086-7065>)

Варта Парк, 2, Хелстон, Корнуол, TR13 0FN, Велика Британія
drbenjaminmakin@gmail.com

РОЛЬ РОСТУ ВОДОРОСТЕВОГО СИМБІОНТА В КЕРУВАННІ ТЕМПЕРАТУРНИМИ РЕАКЦІЯМИ ШИРОКО ПОШИРЕНИХ ФОТОСИМБІОТИЧНИХ ІНФУЗОРІЙ

Реферат. Досліджена роль росту водоростевого симбіонта в керуванні температурними реакціями фотосимбіотичних інфузорій. Фотосимбіоз, у випадку якого одноклітинні автотрофи проживають у гетеротрофних господарях, є критично важливим прикладом екологічної взаємодії з точки зору глобальної біомаси, видового різноманіття та первинної продукції. Таким асоціаціям загрожує потепління навколишнього середовища. Хоча конкретні взаємодії, зокрема між коралами і зооксантелами, ретельно задокументовані, екологам бракує загальної теоретичної основи, яка б описувала вплив зміни температури на фотосимбіотичні взаємодії. У роботі застосовано принципи метаболічної теорії екології (МТЕ) для оцінки метаболічної основи індукованого температурою порушення фотосимбіозу *Paramecium bursaria* — *Chlorella* spp. На відміну від загального прогнозу МТЕ, згідно з яким з підвищенням температури чиста автотрофія повинна зменшуватися, у дослідженому фотосимбіозі господар при потеплінні містив більшу популяцію водоростей-симбіонтів і споживав менше бактеріальної здобичі, що свідчить про збільшення чистої автотрофії. Ця модель спостерігалася для штабів, ізольованих з трьох різних континентів. Вірогідно, це було простим наслідком реакції швидкості росту симбіонтів. Показано, що у контексті фотосимбіозу відносний баланс автотрофів (тобто симбіонтів) і гетеротрофів (господарів) є простим екологічним пристосуванням, яке, мабуть, протидіє термодинамічній тенденції потепління сприяти гетеротрофії. Зроблено висновок, що для оцінки метаболічної основи індукованого температурою порушення фотосимбіозу важливо розглядати її в тандемі з екологічною динамікою асоціацій.

Ключові слова: потепління, вуглець, міксотрофія, симбіоз, метаболізм, мутуалізм, температура, фотосимбіоз, *Paramecium bursaria*, *Chlorella* spp.

Надійшла до редакції 26.02.2024. Після доопрацювання 05.03.2024. Підписана до друку 26.03.2024.
Опублікована 10.12.2024

Цитування. Макін Б. 2024. Роль росту водоростевого симбіонта в керуванні температурними реакціями широко поширених фотосимбіотичних інфузорій. *Альгологія*. 34(4): 312–332.
<https://doi.org/10.15407/alg34.04.312>

This is open access article under the CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Вступ

На тлі появи численних відомостей про вплив триваючих змін клімату на фізіологію, життєві цикли та просторовий розподіл організмів різного ступеню організації, зростає занепокоєння тим, що глобальне потепління вплине на екологічну взаємодію між видами (Walther et al., 2002; Tylianakis et al., 2008; Walther, 2010), потенційно дестабілізуючи харчові мережі та порушуючи функціонування екосистеми у великих масштабах. Примітно, що особливо негативно зміна температури буде впливати на взаємодію видів, залучених до високорозвинених мутуалізмів. Багато з них (наприклад, фотосимбіози, симбіози рослин з мікоризними грибами та бобових з азотфіксуючими бактеріями) підтримують критичні функції екосистеми (Kiers et al., 2010). Архетиповим прикладом руйнування мутуалізму, викликаного потеплінням, є симбіоз коралів і зооксантел, який лежить в основі екосистем коралових рифів, де підвищення температури може призвести до пов'язаного зі стресом вигнання симбіонтів з їхніх господарів (Weis, 2008).

Ця асоціація є представником ширшої групи симбіотичних систем, у яких фотосинтезуючі водорості живуть у гетеротрофних господарях (тобто фотосимбіози). Багато таких асоціацій включають одноклітинні водорості, що мешкають в одноклітинних господарях. Вони відносно погано вивчені, але наразі визнано, що вони дуже поширені та різноманітні у водних екосистемах (Sanders, 1991, 2011; Summerer et al., 2008; Sonntag et al., 2011; Decelle et al., 2015). Крім того, фотосимбіози відповідають за майже половину всієї океанічної первинної продукції (Baldauf, 2008). І якщо розглядати їх поряд із фотоміксотрофами, то вони часто можуть домінувати в екосистемі завдяки бактеріофагії (Berninger et al., 1992; Unrein et al., 2007; Zubkov, Tarran, 2008; Hartmann et al., 2012).

Хоча в численних дослідженнях описано безліч специфічних фізіологічних та екологічних впливів потепління на фотосимбіоз, особливо в коралах (Lesser, 2004, 2011, 2013; Weis, 2008, 2010; Correa, Baker, 2011), екологам бракує загальної прогнозовної основи щодо впливу температури на фотосимбіотичні асоціації (Bailly et al., 2014). У цьому контексті може бути корисною метаболічна теорія екології (МТЕ), яка стверджує, що швидкість метаболізму є фундаментальною для формування широкого набору моделей в екології (Brown et al., 2004). Наприклад, ця теорія стверджує, що дихання більш чутливе до температури, ніж фотосинтез (Allen et al., 2005; López-Urrutia et al., 2006; Yvon-Durocher et al., 2010, 2012; Anderson-Teixeira et al., 2011), і що з потеплінням екологічні системи, ймовірно, стануть «більш гетеротрофними» (Wilken et al., 2013). Для фото-

синтезуючих автотрофів загалом очікується, що при вищих температурах у процесі дихання вони використовують більшу частку фіксованого вуглецю, зменшуючи його фракцію, доступну для росту (так звана ефективність використання вуглецю або CUE). Це очікування було підтверджено емпіричними вимірюваннями у вільноживучих водоростях (Padfield et al., 2016). Однак дане теоретичне положення ще не було досліджено в контексті оцінки реакції фотосимбіозів на зміни навколишнього середовища.

У фотосимбіозах, які, як правило, базуються на обміні фотосинтетичними та респіраторними метаболітами (Johnson, 2011), на динаміку росту та екологічну функцію, ймовірно, значно впливає диференціальна теплова чутливість дихання та фотосинтезу, передбачена цією точкою зору (Padfield et al., 2016). Наприклад, зменшення CUE симбіонтів при підвищенні температури, мабуть, зменшить можливості для їхніх хазяїв. Оскільки стане менше доступних для них продуктів фотосинтезу, це, вірогідно, буде підштовхувати асоціацію до чистої гетеротрофії. Однак такі передбачення потенційно можуть сильно змінюватися через дію таких механізмів, як взаємовідносини в системі господар-симбіонт та здатність господаря регулювати свій режим харчування. Наприклад, якщо ріст хазяїна та симбіонта тісно пов'язаний (тобто щільність симбіонтів фіксована), потепління має зрушити асоціацію в бік чистої гетеротрофії, як це спостерігалось в міксотрофних організмах, які не несуть фотосинтетичних симбіонтів (Wilken et al., 2013). Такий зсув буде більшим, якщо господарі підвищуватимуть швидкість гетеротрофного живлення і ще більшим, якщо вони послаблюватимуть регуляцію симбіонтів (Lowe et al., 2016), оскільки ті стануть менш корисними. Отже, виходячи із положень МТЕ, при підвищенні температури навколишнього середовища у фотосимбіозі має відбутися зсув у бік гетеротрофії і цей ефект може посилюватися динамікою господар-симбіонт. Така зміна матиме серйозні наслідки для екологічної функції цих важливих асоціацій (Baldauf, 2008).

Метою дослідження було перевірити цю перспективу МТЕ, вивчаючи реакцію фотосимбіотичної асоціації на зміну температури через температурну залежність метаболізму, щільність симбіонтів і бактеріоїдність (бактеріофагію) господаря. Об'єктом дослідження було обрано фотосимбіоз *Paramecium bursaria* — *Chlorella* spp. — широко поширену асоціацію прісноводних інфузорій та одноклітинних водоростей (Minter et al., 2018). Відомо, що в цій асоціації господар здатен регулювати щільність симбіонтів у відповідь на абіотичні зміни (Lowe et al., 2016). У роботі обговорюються очевидні розбіжності між

прогнозами, заснованими на метаболічній теорії, та висувається гіпотеза, що МТЕ може виявитися сильним інструментом у вивченні реакції фотосимбіозу та потепління, але лише якщо відповідну екологічну динаміку досліджувати в тандемі.

Матеріали та методи

Культуральні умови

Paramecium bursaria є широко поширеною прісноводною інфузорією, яка містить симбіотичні водорості *Chlorella* spp. Штам НА1g (Національний проект біоресурсів, 2019), використаний у цьому дослідженні, був виділений у Японії та зберігався в нашій лабораторії при 25 °С протягом приблизно 2 років. *Paramecium bursaria* зберігали в 100 мл пляшках із середовищем Волвіч для безхребетних. За 48 г до використання середовище інокулювали культурою *Serratia marcescens*, щоб забезпечити велику кількість бактеріальної здобичі. Що два тижні культури переносили на свіже бактеризоване середовище та зберігали в умовах світло/темрява 12:12 год (~100 мкмоль PAR м⁻² с⁻¹). Ці самі умови культивування також використовувалися для двох інших штамів (1660/18, виділений у Великобританії, та 1660/21, ізольований у Південній Америці), які вивчалися в частині даного дослідження про мінливість штамів.

Ізольовані культури симбіонтів одержували наступним шляхом: спочатку популяцію *P. bursaria* промивали на фільтрувальному папері з коміркою 10 мкм у приблизно 50 мл середовища Волвіч для видалення бактерій, а далі отримані культури обробляли ультразвуком (використовуючи 3 імпульси по 10 с з амплітудою 90% над льодом), щоб розірвати клітинні мембрани господаря і вивільнити симбіотичні водорості. Потім водорості вносили на середовище Болда (BBM), доповнене бактопептоном у кількості 1 г/л. Перед використанням в експериментах водорості вирощували, тричі переносячи на свіже середовище, і зберігали за тих самих умов температури й освітлення, що й *P. bursaria*. Для температурного експерименту культури *P. bursaria* та *Chlorella* зберігали при температурах 15, 20, 25, 27,5 і 30 °С. Для подальшого вивчення з культур господаря та симбіонтів кожного температурного варіанта відбирали по три зразки.

Вимірювання щільності симбіонтів

Щільність симбіонтів у культурах *P. bursaria*, які зберігалися при різних температурах (15, 20, 25, 27,5 і 30 °С) оцінювали шляхом обробки ультразвуком протягом середньої фази росту (з використанням 3 імпульсів по 10 с з амплітудою 90% над льодом). Матеріал розподіляли на 3 зразка

тестових культур (кожна по 10 мл), щоб розірвати мембрани клітин-господарів, а потім підрахувати отримані вивільнені симбіотичні клітини водоростей за допомогою проточної цитометрії (BD Accuri C6; BD). Підрахунок клітин водоростей контролювався щодо щільності *P. bursaria* шляхом ділення кількості підрахованих водоростей на кількість хазяїв (перерахованих за допомогою аналізу imageJ з використанням «розмиття», а потім базових функцій «Знайти Максиму» (Schindelin et al., 2012) зображень флуоресцентної мікроскопії при 10-кратному збільшенні (Leica TCS SP8; Leica Microsystems; Wetzlar, Німеччина). Водоростеве навантаження на одного господаря також було поділено на середні значення об'єму клітини, щоб контролювати будь-які зміни розміру клітини хазяїна з температурою (рис. 1). Вимірювання об'єму клітин *P. bursaria* (мкм³) проводили вручну на зображеннях у світлому полі мікроскопа за допомогою наданого виробником програмного забезпечення (LAS X; Leica Microsystems). Проводилися вимірювання довжини та ширини клітин і розраховувався об'єм, припускаючи, що клітини є витягнутими сфероїдами (об'єм = $4/3\pi a^2 c$; де a і c – полярні радіуси). Дані про навантаження симбіонтів (мкм³ симбіонтів) були адаптовані до загальної адитивної моделі (GAM), щоб забезпечити нелінійну відповідь за допомогою функції «gam» у пакеті «mgcv» (Вуд, 2006) в статистичному програмному забезпеченні R (версія 3.2.0) (R Core Team, 2014), де температура була пояснювальною змінною, а симбіонтне навантаження – залежною змінною (рис. 2, B). Кількість «вузлів», пов'язаних з GAM, було обрано шляхом порівняння відповідності моделі-кандидата з даними графічно та за допомогою інформаційного критерію Akaike (AIC) і скоригованих значень R-квадрат.

Вимірювання швидкості росту та бактеріодності

Тестові зразки культур господаря та симбіонтів у трьох повторностях (див. вище) інкубували протягом 4 днів. Зразки фіксували в 3%-му глутаровому альдегіді та 0,3%-му формальдегіді на початку та в кінці інкубаційного періоду. Клітини підраховували за допомогою аналізу зображень (Schindelin et al., 2012) у флуоресцентному мікроскопі при 10-кратному збільшенні, як описано вище (для господарів), або за допомогою проточної цитометрії (для симбіонтів). Швидкість росту розраховували з використанням декадного логарифму кількості клітин і припущення експоненційного зростання за допомогою функції «lmList» у пакеті «lme4» (Bates et al., 2015) у R. Темпи росту потім були пристосовані до GAM, як описано раніше. Температура була пояснювальною змінною, а швидкість росту — залежною змінною (рис. 2, A).

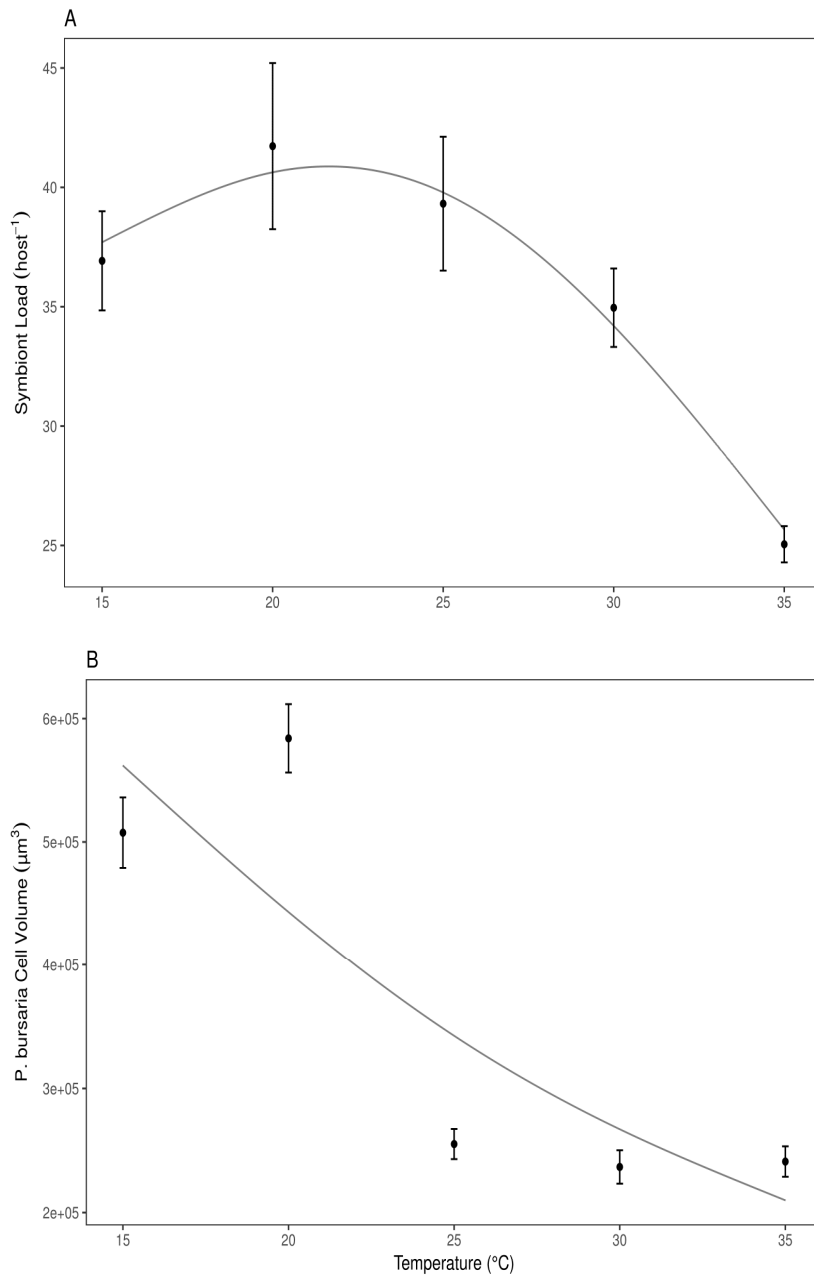


Рис. 1. Температурні реакції симбіонного навантаження, виражені через господаря та об'єм господаря. Відображені лінії представляють узагальнені адитивні моделі (GAM), підігнані до даних. *A* — симбіонне навантаження (симбіонти на господаря; *B* — об'єм клітини-господаря (мкм³))

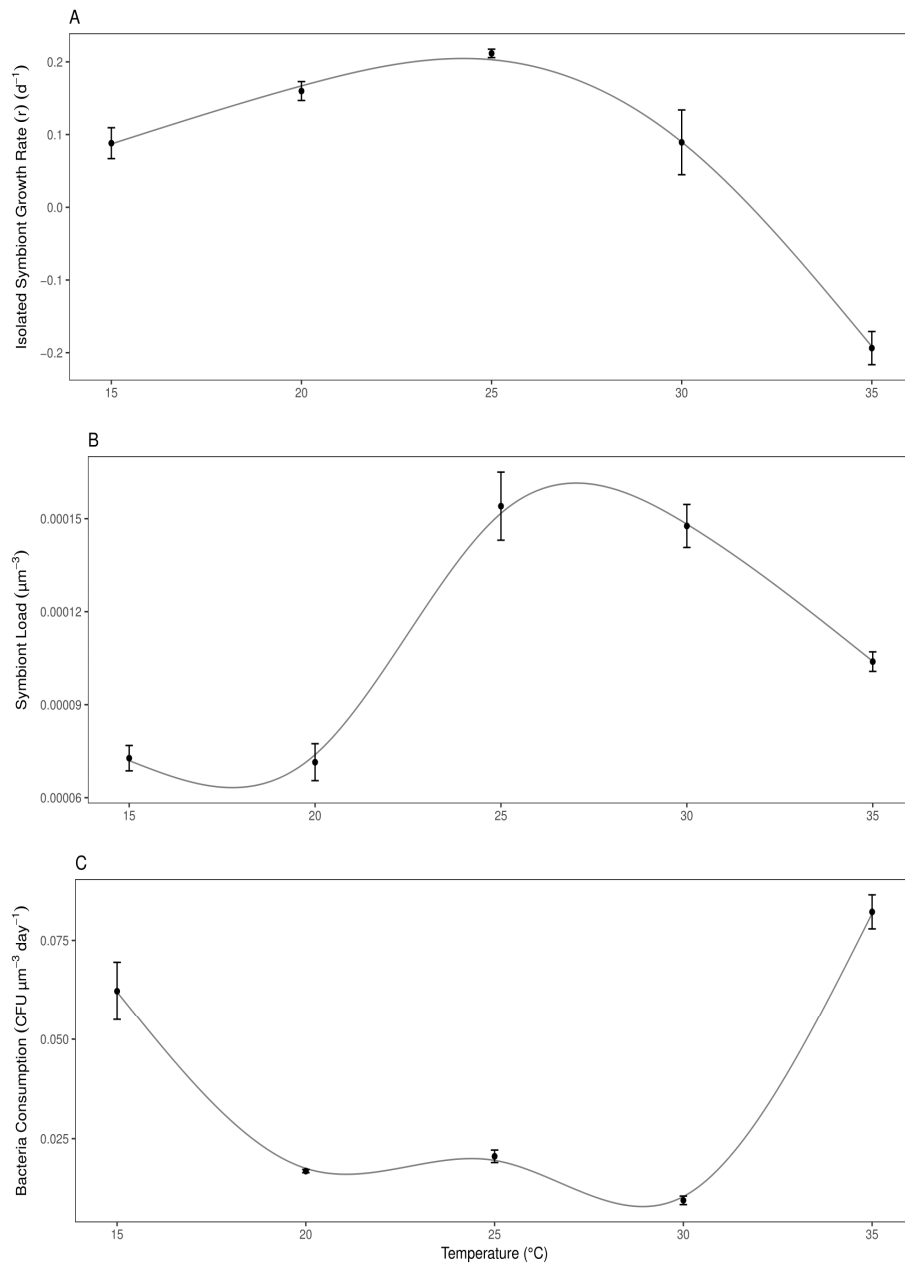


Рис. 2. Температурні реакції швидкості росту, симбіонтного навантаження та бактеріодності (3 повтори при кожній температурі для кожної ознаки). Відображені лінії представляють підігнані GAM до даних. *A* — швидкість росту ізолюваних симбіонтів (r , d^{-1}); *B* — симбіонтне навантаження господаря (симбіонти на μm^3 господаря); *C* — бактеріодність господаря (колонієутворюючі одиниці, спожиті на μm^3 господаря на день)

Для оцінки бактеріодності господаря культури *P. bursaria*, описані вище, висівали на агар Лурія-Бертані (LB) – типове поживне середовище, яке зазвичай використовується для підрахунку бактерій. Кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) на мл подраховували через 0 і 7 днів. Кількість спожитих бактерій на господаря при кожній температурі оцінювали шляхом розрахунку зменшення КУО на 1 мл^{-1} протягом однотижневого періоду (де середнє змінєння КУО на мл^{-1} розраховувалося за допомогою трьох біологічних повторних контрольних обробок при кожній температурі, для яких бактерії вирощувалися незалежно від *P. bursaria* на тому самому поживному середовищі та в тих самих умовах культивування, щоб контролювати «дрейф» розміру популяції бактерій). Значєння спожитих КУО на мл^{-1} потім ділили на середню кількість клітин *P. bursaria* на мл^{-1} і на середній об'єм клітин *P. bursaria* при кожній температурі, щоб контролювати різницю в бактеріодності як результат коливань розмірів популяцій та клітин. Насамкінець, оцінки за тижневий період були виражені як кількість за день шляхом ділення на 7 днів. Потім ці дані були пристосовані до GAM, як описано раніше; температура була пояснювальною змінною, а КУО, спожиті $\text{мкм}^{-3} \text{ день}^{-1}$, — як залежна змінна (рис. 2, С).

Метаболічні теплові реакції та CUE

Для того, щоб охарактеризувати метаболічні теплові реакції *P. bursaria* при різкій зміні температури, вимірювали фотосинтез (NPP) (через виділення кисню за різної інтенсивності світла) і дихання (R) (через виділення кисню у темряві) в 1 мл культур, які попередньо промивали через фільтри 10 мкм за допомогою середовища Волвіч для видалєння бактерій і вільноживучих водоростей та акліматизували до потрібної температури протягом 30 хв у темряві в широкому діапазоні температур аналізу (10–43 °C). Вимірювання виділення кисню проводили з використанням трьох технічних повторів (тобто три вимірювання при кожній температурі на тій самій біологічній вихідній культурі) з використанням кисневого електрода типу Кларка (Hansatech Ltd; King's Lynn, UK; Chlorolab2). NPP вимірювали при зростанні інтенсивності світла в інтервалах 50–200 $\text{мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, потім в інтервалах 100–1000 і, нарешті, в 1200, 1500 і 1800 $\text{мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. У результаті отримано криву випромінєння фотосинтезу (PI) при кожній температурі аналізу. Ці криві були підігнані до моделі фотоінгібування (Platt et al., 1990) за допомогою нелінійної регресії найменших квадратів (дотримуючись статистичних методів, описаних раніше в роботі Padfield et al., 2016). Хоча виділення кисню в темряві представляло R, максимальне виділення кисню на світлі

(тобто при оптимальній інтенсивності світла) було прийнято як максимальне NPP (P_{\max}). Його використовували, щоб контролювати будь-яку потенційну взаємодію між інтенсивністю світла й температурою при вимірюванні теплового відгуку NPP. Валовий фотосинтез (GPP) був оцінений як: $GPP = P_{\max} + R$ (абсолютний).

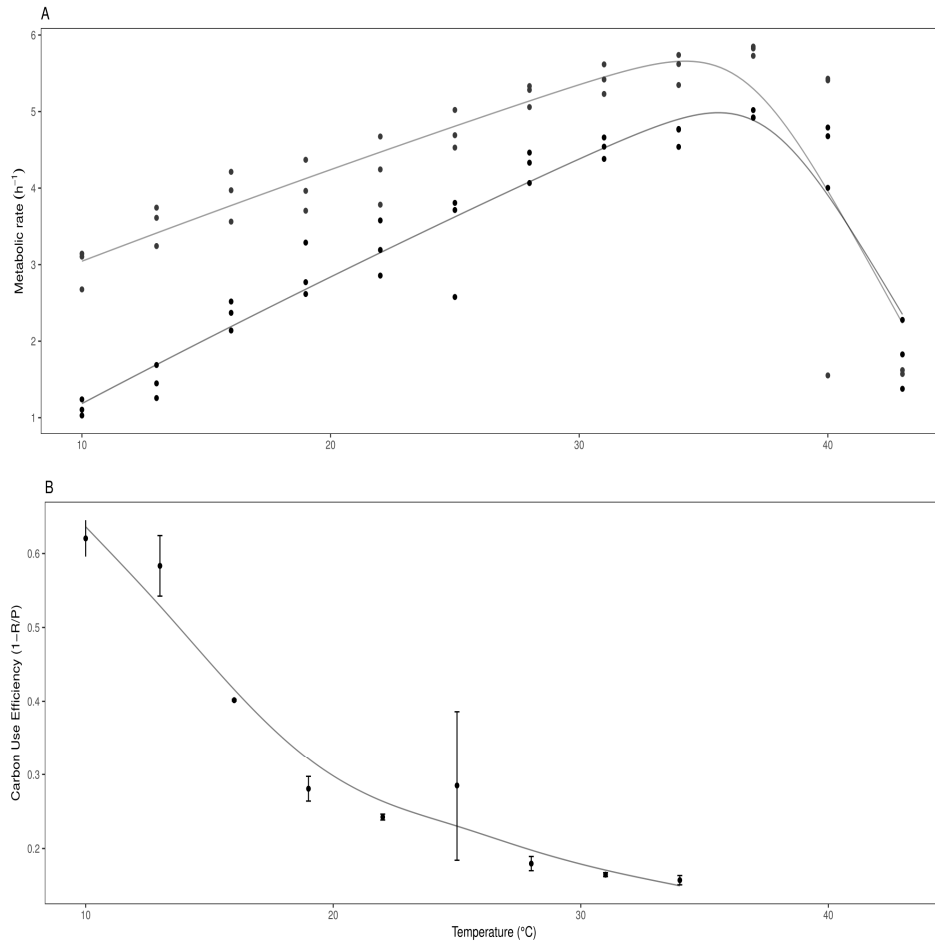


Рис. 3. Метаболічний потік та ефективність використання вуглецю: *A* — метаболічний потік ($O_2 \text{ год}^{-1}$). Зелені лінії/точки вказують на валову первинну продукцію, чорні лінії/точки представляють дихання. Лінії представляють підігнані модифіковані рівняння Шарпа-Скулфілда (див. статистичні процедури, викладені в Методах); *B* — ефективність використання вуглецю в результаті метаболічних потоків протягом періодів на світлі (оцінюється як $1-R/GPP$). Лінія представляє підігнаний GAM до даних

Гострі відповіді GPP і R на температуру потім були підігнані до модифікованого рівняння Шарпа-Скулфілда для високотемпературної

інактивації з використанням нелінійної регресії найменших квадратів (рис. 3, *A*). Відповідності були визначені за допомогою функції «nls_multstart» у пакеті «nls.multstart» (Padfield, Matheson, 2018) статистичного програмного забезпечення R. Цей пакет порівнює значення АІС, щоб визначити набір параметрів, взятий із рівномірного розподілу, який найкраще характеризує дані. Відповідність вибраних моделей перевіряли графічно та за допомогою оцінки значень псевдо- R^2 . Ці набори параметрів дали енергії активації (E ; передоптимальні градієнти, які характеризують температурну чутливість метаболізму; Padfield et al., 2016) як для дихання, так і фотосинтезу (GPP), які можна було порівняти (див. таблицю). CUE (у світлі) оцінювався як $CUE = 1 - R/GPP$.

Таблиця. Енергія активації дихання холобіонта (тобто неушкодженого хазяїна і симбіонтів) та валової первинної продукції (eV)

Показник	Оцінка (eV)	Стандартна похибка	Тестова статистика	p -значення
R	1.183497	0.07865236	15.04718	4.55127E-16
GPP	0.8555996	0.1323035	6.466945	3.27335E-07

Примітка. Цей параметр був оцінений шляхом підгонки модифікованих рівнянь Шарпа-Скулфілда до відповідної кривої відповіді температури метаболічного потоку (див. статистичні процедури, викладені в Методах).

Результати та обговорення

Метаболічний вплив температури

Для дослідження впливу зміни температури на метаболізм мікробного фотосимбіозу культури *P. bursaria* витримували при температурі від 13 до 43 °C та кількісно визначали його результуючу швидкість GPP і R . Ці потоки слідували за унімодальними відповідями, де швидкість збільшувалася з температурою до оптимуму і швидко знижувалася з подальшим потеплінням. Згідно з попередньою роботою (Allen et al., 2005; Yvon-Durocher et al., 2010), передоптимальні градієнти (E) були різними, причому вищий E був пов'язаний з R (рис. 3, *A*; таблиця). Через різницю в чутливості до температури цих ключових метаболічних потоків частка автотрофного вуглецю, доступного для росту (CUE), зменшувалася зі зміною температури ($F = 41,06$, $edf = 3,021$, $p < 0,000001$; рис. 3, *B*), як було експериментально продемонстровано раніше на вільноживучих водоростях *Chlorella* (Padfield et al., 2016).

Контроль за регулюванням вмісту симбіонтів господарем

Раніше було показано, що *P. bursaria* здатний регулювати вміст симбіонтів у відповідь на зміну освітлення (Lowe et al., 2016). У цьому дослідженні, щоб перевірити, чи змінюється навантаження симбіонтів залежно від температури, вимірювали кількість симбіонтів, пов'язаних із господарями, при температурі від 15 до 35 °C. Симбіонтне навантаження, виражене на одиницю об'єму клітини-господаря (для врахування змін об'єму клітини, який зменшувався залежно від температури; $F = 84,94$, $\text{edf} = 1,798$, $p < 0,0001$; рис. 1), змінювалося зі зміною температури ($F = 32,07$, $\text{edf} = 3,828$, $p < 0,0001$). Навантаження симбіонтів було найнижчим при низькій температурі та спостерігалось його збільшення приблизно вдвічі до максимуму $1,6 \times 10^{-4} \pm 5,8 \times 10^{-6}$ симбіонтів у мкм^{-3} при 27,0 °C і воно швидко знижувалось при більш високих температурах (рис. 2, B). Щоб визначити, чи є зміни в симбіонтному навантаженні результатом регуляції господаря чи просто функцією реакції росту симбіонта залежно від температури, фотосимбіонт було ізольовано з клітин хазяїна та створено вільноживучі популяції *Chlorella* в умовах, насичених поживними речовинами. Ріст вільноживучих симбіонтів, виміряний через той самий температурний градієнт, також змінювався залежно від температури ($F = 55,25$, $\text{edf} = 2,867$, $p < 0,00001$) і в цілому демонстрував подібну реакцію щільності симбіонтів, виражену на одиницю об'єму клітини та на клітину-господаря (рис. 1 та 2, A, B), при цьому швидкість росту залежала від температури та зростала максимально при ~24 °C. Примітно, що температура для симбіонтів виявилася летальною (тобто їхня швидкість росту впала нижче нуля) вище ~32 °C, віддзеркалюючи температуру, при якій навантаження на симбіонти швидко знижувалось у фотосимбіотичних хазяїв. Отже, щільність симбіонтів виявилася простою функцією росту симбіонтів. Таким чином, не було чітких доказів регуляції господаря.

Бактеріодність господаря

Оскільки господарі фотосимбіонтів (включаючи *P. bursaria*) зазвичай є гетеротрофами-бактеріофагами, проведено дослідження, до якої межі їхня бактеріодність змінюється у відповідь на температуру. Бактеріофагію *P. bursaria* досліджували шляхом оцінки кількості бактеріальних клітин, спожитих на господаря, за температурного градієнта 15–35 °C протягом однотижневого інкубаційного періоду (з використанням відповідних заходів контролю для врахування змін у кількості бактерій, не спричинених споживанням, тобто їх зростанням або загибеллю). Кількість колонієутворюючих одиниць (КУО), спожитих клітиною *P. bursaria* протягом тижня (з поправкою на об'єм клітини *P. bursaria* для врахування

відмінностей у споживанні, пов'язаних з різним розміром клітин), змінювалася залежно від температури ($F = 19,83$, $edf = 2,796$, $p < 0,0001$). Загалом, бактеріодність, виражена як КУО мкм^{-3} день $^{-1}$, виявила зворотню відповідь на зростання та симбіонтне навантаження ($F = 67,71$, $edf = 3,906$, $p < 0,0001$; рис. 2, С). При підвищенні температури спочатку спостерігалось приблизно десятикратне зниження бактеріофагії: від споживання $0,0620 \pm 0,00387$ КУО мкм^{-3} день $^{-1}$ при 15 °С до $0,00797 \pm 0,00352$ при $28,9$ °С. Примітно, що при найвищих температурах швидкість споживання знову зросла (одночасно зі зменшенням навантаження симбіонтів), досягши максимуму $0,0818 \pm 0,00387$ КУО мкм^{-3} день $^{-1}$ при 35 °С.

Експеримент із різними штамами

Щоб перевірити, чи змінювалось навантаження симбіонтів залежно від температури у різних штаммах із географічно віддалених локацій, три штамми, ізолювані у Японії, Південній Америці та Великобританії, було досліджено за методологією, що обговорювалася вище, у температурному градієнті від 15 до $32,5$ °С. Показники симбіонтного навантаження змінювалися залежно від температури для всіх штамів ($F = 8,554$, $edf = 4,6578$, $p < 0,0001$; рис. 4, А). Загалом симбіонтне навантаження залишалось відносно постійним перед тим, як швидко підвищитись при температурі вище ~ 25 °С. У двох з трьох штамів симбіонтне навантаження потім зменшилось при високій температурі.

Кількість бактерій, що споживалася клітиною *P. bursaria*, змінювалася залежно від температури ($F = 8,578$, $edf = 4,403$, $p < 0,0001$; рис. 4, В). Загалом бактеріодність зменшувалася з потеплінням, перш ніж збільшитися або вирівнятися при екстремальних температурах. Слід звернути увагу на потенційний виняток із цього між ~ 15 і ~ 20 °С у штамі з Великобританії, де бактеріофагія зросла перед тим, як знизитися при температурі вище ~ 20 °С. Також спостерігалися потенційні «сплески», коли бактеріодність при ~ 25 °С зростала у штамів, виділених у Японії та Південній Америці.

Швидкість росту голобіонтів, оцінена через той самий градієнт температури, змінювалась у трьох штамів залежно від температури ($F = 26,989$, $df = 1$, $p < 0,0001$; рис. 4, С). Швидкість росту продемонструвала відповідь, типову для автотрофних мікроорганізмів (напр., Padfield et al., 2016): вона збільшувалася до оптимуму та згодом знижувалася з подальшим нагріванням.

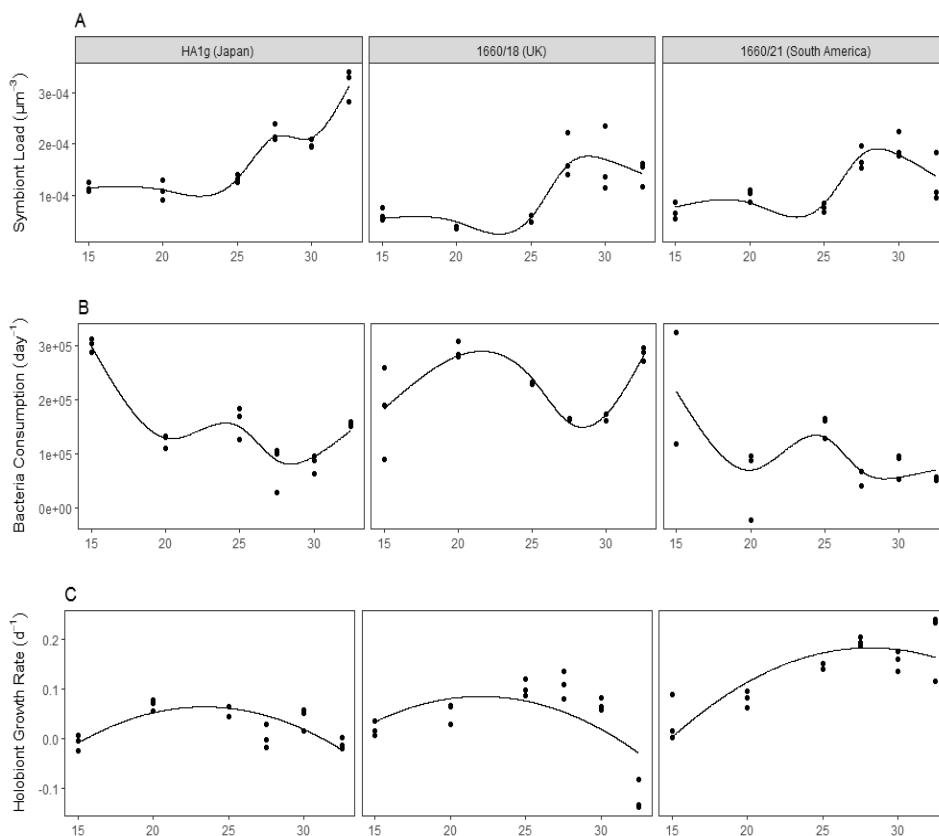


Рис. 4. Реакція різних ознак голобіонтів на температуру у трьох штамів: *A* — симбіонтне навантаження; *B* — бактеріоїдність; *C* — швидкість росту. Лінії представляють підігнані GAM до даних

Використовуючи принципи МТЕ, було зроблено припущення, що різниця температурної чутливості R і GPP зменшить «цінність» симбіонтів для господарів через зниження КУО. Цей процес може спонукати господарів збільшити гетеротрофне харчування та знизити популяцію симбіонтів. Така зміна функцій, викликана температурою, буде мати чіткі наслідки в контексті потепління навколишнього середовища, враховуючи, що фотосимбіози є основою значної частини глобальної біомаси, видового різноманіття та первинної продукції (Sanders, 1991, 2011; Baldauf, 2008; Summerer et al., 2008; Sonntag et al., 2011; Decelle et al., 2015). Однак, на відміну від цього прогнозу, було виявлено, що із субпатологічним потеплінням господарі мали більшу популяцію симбіонтів і споживали менше бактерій (що свідчить про перехід до автотрофії, а не до

гетеротрофії). Цей результат виявився простою функцією швидкості росту симбіонта та подальшого обмеження бактеріодності господаря.

Згідно з попередніми дослідженнями, частка фіксованого вуглецю, доступного для росту (і транслокації), зменшувалася з потеплінням (Padfield et al., 2016), оскільки R був більш чутливим до температури, ніж GPP (Allen et al., 2005; Lopez-Urrutia et al., 2006; Yvon-Durocher et al., 2010, 2012; Anderson-Teixeira et al., 2011). Ми теж припускали, що з підвищенням температури господарі можуть стати відносно більш гетеротрофними та потенційно видалити симбіонти у результаті цього обмеження. Однак отримані результати, за якими навантаження симбіонтів зростає з температурою, свідчать про те, що асоціація стає більш автотрофною, а не гетеротрофною. Примітно, що ця реакція в основному повторювала реакцію росту ізольованих симбіонтів, що свідчить про те, що величина популяції симбіонтів у господарях може бути простою функцією швидкості росту симбіонтів. Дійсно, чіткий зв'язок між швидкістю росту симбіонтів і щільністю симбіонтів свідчить про те, що господарі не сильно регулювали щільність своїх симбіонтів у відповідь на абіотичні зміни, на відміну від попередніх досліджень (Lowe et al., 2016).

Цікаво, що дане відкриття узгоджується з недавнім експериментом, у якому асоціація *P. bursaria* — *Chlorella* spp. протягом ~300 поколінь зазнавала впливу в умовах потепління. Це дослідження показало, що популяції симбіонтів не були пригнічені, незважаючи на те, що це, ймовірно, дорого обійшлося господарю в умовах потепління (Salsbery, DeLong, 2021). Ці результати, ймовірно, вказують на перехід від мутуалістичної до паразитичної взаємодії у цьому фотосимбіозі з потеплінням, тобто взаємодія стала дорогою для господаря. Це викликає занепокоєння щодо довгострокового збереження даного симбіотичного мутуалізму у теплішому світі.

Бактеріодність у тому самому градієнті температури демонструвала зворотню до симбіонтного навантаження реакцію, тому можна припустити, що виїдання, можливо, є простою функцією щільності симбіонтів. Незрозуміло, чи знаходиться швидкість виїдання під активним контролем господаря, чи вона може залежати, наприклад, від фізичних обмежень, пов'язаних з розміщенням симбіонтів. Висока щільність симбіонтів потенційно пригнічує внутрішньоклітинну обробку харчових вакуолей, оскільки обидва види активності займають простір у цитоплазмі. Крім того, симбіонти розміщені в похідних травних вакуолях господаря (Fujishima, 2009). Незалежно від механізмів, ці результати свідчать про те, що господарі обмежені стратегією харчування, за якої

вони вторинно виїдають їжу у відповідь на зміни в популяції їхніх симбіонтів.

Попередні дослідження (Wilken et al., 2013) показали, що потепління може сприяти гетеротрофії в міксотрофних організмах, оскільки гетеротрофний метаболізм обмежений R_i , отже, більш чутливий до температури, ніж автотрофний метаболізм (який обмежений GPP; Allen et al., 2005; Lopez-Urrutia et al., 2006; Rose, Caron, 2007). Примітно, що спостережуване збільшення щільності симбіонтів і зменшення бактеріодності свідчать про те, що з підвищенням субпатологічної температури асоціація *P. bursaria* — *Chlorella* spp. стає все більш автотрофною, а не гетеротрофною. Проте фотосимбіози за участі як автотрофів, так і гетеротрофів, можуть дозволити різний ступінь пластичності порівняно з міксотрофними вільноживучими організмами, про які йшла мова вище. Дійсно, пластичність з будь-якої низки ознак, таких як розмір і відносний внесок у фотосинтетичні та гетеротрофні механізми, може звести нанівець результат загального прогнозу про те, що потепління має сприяти гетеротрофному способу життя навіть в окремих організмів (Wilken et al., 2014).

У нашому дослідженні показано, що у контексті фотосимбіозу відносний баланс автотрофів (тобто симбіонтів) і гетеротрофів (тобто господарів) є простим екологічним пристосуванням, яке, мабуть, протидіє термодинамічній тенденції потепління сприяти гетеротрофії. Це узгоджується з іншими дослідженнями, які показують, що шляхом коригування біомаси вдалося підтримувати виробництво (тобто автотрофію), незважаючи на спричинене температурою зниження КУО в угрупованнях вільноживучого фітопланктону (Padfield et al., 2018). Багато досліджень показали, що вплив метаболічних обмежень (породжених диференціальною чутливістю R_i і GPP) може бути зведений нанівець низкою короткострокових екологічних змін, таких як зміна видів (Karhu et al., 2014), фенотипічна пластичність (Luo et al., 2007) та виснаження ресурсів (Melillo et al., 2002).

Також було досліджено, чи існують відмінності у реакції на зміну температури у штамів *P. bursaria*, виділених з різних континентів, щоб з'ясувати, чи існує загальна широко поширена реакція цього мікрофотосимбіозу на температурний фактор. Отримані результати свідчать про відсутність розходжень у такій реакції (див. рис. 3): із потеплінням цей фотосимбіоз стає відносно більш автотрофним. Це означає, що ця короткочасна та несподівана реакція на температуру, ймовірно, є загальною ознакою асоціації *P. bursaria* — *Chlorella* spp. Цікаво, що у південноамериканського штаму бактеріодність знизилась, а

швидкість росту зросла із загальним потеплінням. Тому можливо, що гетеротрофія безпосередньо не підтримує (через забезпечення вуглецем та/або АТФ) процеси росту в цьому фотосимбіозі. Справжні міксотрофи за визначенням повинні отримувати вуглець та/або енергію для росту як автотрофними, так і гетеротрофними шляхами. Наші ж дані свідчать про те, що симбіоз *P. bursaria* — *Chlorella* spp. іноді може функціонувати переважно як фототроф. Ця відмінність важлива й вимагає подальшого вивчення: якщо, наприклад, швидкість зростання більше залежить від симбіонтів, ніж від бактеріофагії, то температурна реакція цієї явно міксотрофної асоціації може бути значно обмежена порівняно з іншими потенційно більш гнучкими міксотрофами, такими як вільноживучий організм, вивчений раніше (Wilken et al., 2013).

У даній роботі є деякі ключові обмеження. Головним чином, роль еволюції у формуванні реакції цього фотосимбіозу інфузорій та водоростей на потепління залишається невивченою. Дійсно, довгострокові зміни, викликані адаптацією, можуть пом'якшити прямий вплив температури на метаболізм і, таким чином, вплив потепління на екологічний результат у вільноживучих організмах (Bradford et al., 2010; Padfield et al., 2016, 2018; Шаум et al., 2017). У контексті фотосимбіозу можлива низка сценаріїв протягом еволюційного часу, включаючи «виселення» симбіонтів з низьким КУО із господарів або подальше збільшення відносної автотрофії (наприклад, спричинене еволюцією метаболічних ознак у симбіонтів, які функціонують для відновлення КУО, як це спостерігалось у вільноживучих водоростей *Chlorella* (Padfield et al., 2016). Крім того, зрозуміло, що ця робота являє собою спрощене лабораторне середовище; реальні реакції залежатимуть від безлічі інших факторів, які можуть впливати на відповіді, наприклад продуктивність фотосинтезу. Примітно, що останні дослідження показали, що мікропластикове забруднення може зменшити чистий фотосинтез асоціації *P. bursaria* — *Chlorella* spp. (Makin, 2023), що є лише одним із прикладів відповідних екологічних факторів, які визначатимуть реакцію в природних умовах. Незважаючи на це, проведене дослідження є першим кроком до встановлення метаболічної основи спричиненого температурою порушення фотосимбіозу, виявивши, що при потеплінні швидкі короточасні реакції можуть різко змінити кінцеві екологічні результати (тобто автотрофну або гетеротрофну поведінку) фотосимбіотичних асоціацій, із чіткими наслідками для потоку вуглецю та водних харчових мереж, оскільки фотосимбіози є ключовими джерелами продуцентів, бактеріофагії та видового різноманіття (Sanders, 1991, 2011; Berninger et al., 1992; Unrein et al., 2007; Baldauf, 2008; Summerer et al.,

2008; Zubkov, Tarran, 2008; Sonntag et al., 2011; Hartmann et al., 2012; Decelle et al., 2015).

Висновки

Застосування принципів метаболічної теорії екології (МТЕ) для оцінки метаболічної основи індукованого температурою порушення фотосимбіозу в мікроасоціації *P. bursaria* – *Chlorella* spp. показало, що на відміну від прогнозу МТЕ (тобто, що чиста автотрофія повинна зменшуватися з температурою), досліджений фотосимбіоз містив більші популяції водоростей-симбіонтів і споживав менше здобичі з потеплінням, що, вірогідно, було простим наслідком реакції швидкості росту симбіонтів. Це явище спостерігалось у штамів, виділених на різних континентах, що говорить про те, що це загальна реакція цього фотосимбіозу інфузорій і водоростей. В цілому, ці дані свідчать про те, що метаболічна основа фотосимбіозу може бути важливою лише тоді, коли розглядати її поряд з екологічною динамікою асоціацій. Дійсно, якщо фотосимбіози мікроорганізмів, такі як ця асоціація інфузорій і водоростей, імовірно, стануть «більш автотрофними» з потеплінням, спроби моделювання, спрямовані на імітацію наслідків переходу в більш теплий світ, було б доцільно переглянути, щоб включити велику кількість водоростей, які живуть у господарях в природних фотосимбіозах.

Список літератури

- Allen A.P., Gillooly J.F., Brown J.H. 2005. Linking the global carbon cycle to individual metabolism. *Funct. Ecol.* 19(2): 202–213.
- Anderson-Teixeira K.J., Delong J.P., Fox A.M., Brese D.A., Litvak M.E. 2011. Differential responses of production and respiration to temperature and moisture drive the carbon balance across a climatic gradient in New Mexico. *Glob. Chang. Biol.* 17(1): 410–424.
- Bailly X., Laguerre L., Correc G., Dupont S., Kurth T., Pfannkuchen A., Entzeroth R., Probert I., Vinogradov S., Lechaue C., Garet-Delmas Marie-José, Reichert H., Yartenstein V. 2014. The chimerical and multifaceted marine acoel *Symsagittifera roscoffensis*: from photosymbiosis to brain regeneration. *Front. Microbiol.* 5: 498.
- Baldauf S.L. 2008. An overview of the phylogeny and diversity of eukaryotes. *J. Syst. Evol.* 46(3): 263–273.
- Bates D., Maechler M., Bolker B., Walker S. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J. Stat. Soft.* 67(1): 1–48.
- Berninger U.G., Caron D.A., Sanders R.W. 1992. Mixotrophic algae in three ice-covered lakes of the Pocano Mountains, USA. *Freshwat. Biol.* (28): 263–272.

- Bradford M.A., Watts B.W., Davies C.A. 2010. Thermal adaptation of heterotrophic soil respiration in laboratory microcosms. *Glob. Change Biol.* 16(5): 1576–1588.
- Brown J., Gillooly J., Allen A., Savage V., West G. 2004. Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology*. 85(7): 1771–1789.
- Correa A.M., Baker A.C. 2011. Disaster taxa in microbially mediated metazoans: how endosymbionts and environmental catastrophes influence the adaptive capacity of reef corals. *Glob. Change Biol.* 17: 68–75.
- Decelle J., Colin S., Foster R.A. 2015. In: *Marine Protists*. Tokyo: Springer. Pp. 465–500.
- Fujishima M. 2009. *Endosymbionts in Paramecium*. Berlin: Springer-Verlag. 252 p.
- Hartmann M., Grob C., Tarran G.A., Martin A.P., Burkill P.H., Scanlan D.J., Zubkov M.V. 2012. Mixotrophic basis of Atlantic oligotrophic ecosystems. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 109(15): 5756–5760.
- Johnson M.D. 2011. The acquisition of phototrophy: adaptive strategies of hosting endosymbionts and organelles. *Photosyn. Res.* 107: 117–132.
- Karhu K., Auffret M.D., Dungait J.A., Hopkins D.W., Prosser J.I., Singh B.K., Subke J.-A., Wookey P.A., Agren G., Sebastia M.-T., Gouriveau F., Bergkvist G., Meir P., Nottingham A., Salinas N., Hartley I.P. 2014. Temperature sensitivity of soil respiration rates enhanced by microbial community response. *Nature*. 513(7516): 81–84.
- Kiers E.T., Palmer T.M., Ives A.R., Bruno J.F., Bronstein J.L. 2010. Mutualisms in a changing world: an evolutionary perspective. *Ecol. Lett.* 13(12): 1459–1474.
- Lesser M.P. 2004. Experimental biology of coral reef ecosystems. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 300: 217–252.
- Lesser M.P. 2011. In: *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*. Dordrecht: Springer. Pp. 405–419.
- Lesser M.P. 2013. Using energetic budgets to assess the effects of environmental stress on corals: are we measuring the right things? *Coral Reefs*. 32(1): 25–33.
- Lopez-Urrutia A., San Martin E., Harris R.P., Irigoien X. 2006. Scaling the metabolic balance of the oceans. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 103(23): 8739–8744.
- Lowe C.D., Minter E., Cameron D., Brockhurst M. 2016. Shining a Light on Exploitative Host Control in a Photosynthetic Endosymbiosis. *Curr. Biol.* 26(2): 207–211.
- Luo Y. 2007. Terrestrial carbon-cycle feedback to climate warming. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38: 683–712.
- Makin B. 2023. Microplastic contamination reduces productivity in a widespread freshwater photosymbiosis. *Aquat. Biol.* 32: 13–19.
- Melillo J.M. 2002. Soil Warming and Carbon-Cycle Feedbacks to the Climate System. *Science*. 298(5601): 2173–2176.
- Minter E., Lowe C.D., Sørensen M., Wood A.J., Cameron D.D., Brockhurst M.A. 2018. Variation and asymmetry in host-symbiont dependence in a microbial symbiosis. *BMC Evol. Biol.* 18(1): 108.
- National BioResource Project. 2019. Available at: <http://nbrpcms.nig.ac.jp/paramecium/strain/?lang=en>

- Padfield D., Matheson G. 2018. *Robust Non-Linear Regression using AIC Scores*. R package version 1.0.0. <https://CRAN.R-project.org/package=nls.multstart>
- Padfield D., Yvon-Durocher G., Buckling A., Jennings S., Yvon-Durocher G. 2016. Rapid evolution of metabolic traits explains thermal adaptation in phytoplankton. *Ecol. Lett.* 19(2): 133–142.
- Padfield D., Buckling A., Warfield R., Lowe C., Yvon-Durocher G. 2018. Linking phytoplankton community metabolism to the individual size distribution. *Ecol. Lett.* 21(8): 1152–1161.
- Platt T., Sathyendranath S., Ravindran P. 1990. Primary production by phytoplankton: analytic solutions for daily rates per unit area of water surface. *Proc. Biol. Sci.* 241: 101–111.
- R Core Team. 2016. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
- Rose J.M., Caron D.A. 2007. Does low temperature constrain the growth rates of heterotrophic protists? Evidence and implications for algal blooms in cold waters. *Limnol. Oceanogr.* 52(2): 886–895.
- Salsbery M.E., DeLong J.P. 2021. Thermal adaptation in a holobiont accompanied by phenotypic changes in an endosymbiont. *Evolution.* 75(8): 2074–2084.
- Sanders R.W. 1991. Mixotrophic Protists in Marine and Freshwater Ecosystems. *J. Eukaryot. Microbiol.* 38: 76–81.
- Sanders R.W. 2011. Alternative Nutritional Strategies in Protists: Symposium Introduction and a Review of Freshwater Protists that Combine Photosynthesis and Heterotrophy. *J. Eukaryot. Microbiol.* 58(3): 181–184.
- Schaum C.E., Barton S., Bestion E., Buckling A., Garcia-Carreras B., Lopez P., Lowe C., Pawar S., Smirnov N., Trimmer M., Yvon-Durocher G. 2017. Adaptation of phytoplankton to a decade of experimental warming linked to increased photosynthesis. *Nat. Ecol. Evol.* 1(4): 94.
- Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.-Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods.* 9(7): 676–682.
- Sonntag B., Summerer M., Sommaruga R. 2011. Are Freshwater Mixotrophic Ciliates Less Sensitive to Solar Ultraviolet Radiation than Heterotrophic Ones? *J. Eukaryot. Microbiol.* 58(3): 196–202.
- Summerer M., Sonntag B., Sommaruga R. 2008. Ciliate-symbiont specificity of freshwater endosymbiotic *Chlorella* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*). *J. Phycol.* 44(1): 77–84.
- Tylianakis J.M., Didham R.K., Bascompte J., Wardle D.A. 2008. Global change and species interactions in terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 11(12): 1351–1363.
- Unrein F., Massana R., Alonso-Saez L., Gasol J.M. 2007. Significant year-round effect of small mixotrophic flagellates on bacterioplankton in an oligotrophic coastal system. *Limnol. Oceanogr.* 52(1): 456–469.

- Walther G.R. 2010. Community and ecosystem responses to recent climate change. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 365: 2019–2024.
- Walther G.R., Post E., Convey P., Menzel A., Parmesan C., Trevor J.C., Fromentin J.M., Hoegh-Guldberg O., Bairlein F. 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature.* 416(6879): 389–395.
- Weis V.M. 2008. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J. Exp. Biol.* 211(19): 3059–3066.
- Weis V.M. 2010. The susceptibility and resilience of corals to thermal stress: adaptation, acclimatization or both? *Mol. Ecol.* 19(8): 1515–1517.
- Wilken S., Huisman J., Naus-Wiezer S., Van Donk E. 2013. Mixotrophic organisms become more heterotrophic with rising temperature. *Ecol. Lett.* 16: 225–233.
- Wilken S., Schuurmans J.M., Matthijs H.C. 2014. Do mixotrophs grow as photoheterotrophs? Photophysiological acclimation of the chrysophyte *Ochromonas danica* after feeding. *New Phytol.* 204(4): 882–889.
- Wood S.N. 2006. *Generalized Additive Models: An Introduction with R.* 2nd ed. New York: Chapman and Hall/CRC. 496 p.
- Yvon-Durocher G., Jones J.I., Trimmer M., Woodward G., Montoya J.M. 2010. Warming alters the metabolic balance of ecosystems. *Philos. Trans. Roy. Soc. B.* 365(1549): 2117–2126.
- Yvon-Durocher G., Caffrey J.M., Cescatti A., Dossena M., del Giorgio P., Gasol J.M., Pumpanen J., Staehr P., Trimmer M., Woodward F., Allen A. 2012. Reconciling the temperature dependence of respiration across timescales and ecosystem types. *Nature.* 487(7408): 472–476.
- Yvon-Durocher G., Hulatt J.C., Woodward G., Trimmer M. 2017. Long-term warming amplifies shifts in the carbon cycle of experimental ponds. *Nat. Climate Change.* 7: 209–213.
- Zubkov M.V., Tarran G.A. 2008. High bacterivory by the smallest phytoplankton in the North Atlantic Ocean. *Nature.* 455(7210): 224–226.

Makin B. (<https://orcid ID: 0000-0001-5086-7065>)

2 Park Wartha, Helston, Cornwall, TR13 0FN, United Kingdom

The role of algal symbiont growth in driving the thermal responses of a widespread photosymbiotic ciliate

Photosymbioses, in which unicellular autotrophs reside within heterotrophic hosts, are critical ecological interactions in terms of global biomass, species diversity and primary production. Such associations are under threat from environmental warming; while specific impacts, particularly in the coral-zooxanthellae interaction, are thoroughly documented, ecologists lack a general theoretical framework describing the impacts of temperature change on photo-symbiotic

interactions. Here, I apply principles of the metabolic theory of ecology (MTE) to assess the metabolic basis of the temperature-induced disruption of photosymbiosis in the microbial *Paramecium bursaria* — *Chlorella* spp. association. In contrast to the general prediction that net autotrophy should decrease with temperature, this microbial photosymbiosis harboured larger algal symbiont populations and consumed fewer prey with warming, suggestive of increased net autotrophy with warming — a pattern that held across strains isolated from three different continents. This observation appeared to be a simple consequence of the response of symbiont growth rate. I conclude that a metabolic framework for photosymbiosis may prove insightful, but the ecological dynamics of the associations (e.g. mixotrophic strategy) must be considered in tandem.

Key words: warming, carbon, mixotrophy, symbiosis, metabolism, mutualism, temperature, photosymbiosis

Citation. Makin B. 2024. The role of algal symbiont growth in driving the thermal responses of a widespread photosymbiotic ciliate. *Algologia*. 34(4): 312–332. <https://doi.org/10.15407/alg34.04.312>