

ЗАМЕТКИ

УДК 582.261.1:58.035.7

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДИАТОМОВОЙ ВОДОРΟΣЛИ
CYLINDROTHECA CLOSTERIUM (EHRENBERG) REIMANN ET LEWIN, 1964**

© 2019 г. А. И. Акимов, Н. Ю. Шоман, Е. С. Соломонова

Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
Севастополь, Российская Федерация
E-mail: n-zaichencko@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.09.2019; после доработки 15.11.2019;
принята к публикации 25.12.2019; опубликована онлайн 30.12.2019.

Исследованы флуоресцентные характеристики диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*, предварительно выращиваемой при интенсивности света 17, 200 и 800 мкЭ·м⁻²·с⁻¹. Показана возможность применения флуоресцентных параметров для экспресс-оценки общего функционального состояния водорослей и для выявления диапазона оптимальных для их роста освещённостей. Параметр Fv/Fm позволяет в экспресс-режиме оценивать функциональное состояние водорослей в условиях их интенсивного культивирования. Показано, что максимальный коэффициент переменной флуоресценции (Fv/Fm) составлял 0,65–0,7 для водорослей, растущих при освещённости 17 и 200 мкЭ·м⁻²·с⁻¹, и снижался до 0,48–0,57 для водорослей, адаптированных к интенсивности света 800 мкЭ·м⁻²·с⁻¹. Получены световые зависимости скорости электронного транспорта и фотохимического и нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла, а также значения коэффициента Fv'/Fm'. Эти параметры показывают степень устойчивости водорослей к уровню светового фактора. Показано, что оптимальной для роста *C. closterium* является насыщающая освещённость около 200 мкЭ·м⁻²·с⁻¹. Высокие значения флуоресценции на единицу хлорофилла при экстремальной освещённости (800 мкЭ·м⁻²·с⁻¹) могут указывать на степень инактивации части реакционных центров фотосистемы II.

Ключевые слова: диатомовые водоросли, флуоресценция, биоиндикация

Cylindrotheca closterium характеризуется высокой продуктивностью (до 1,5 г сух·л⁻¹·сут⁻¹) [1] и является перспективным источником получения каротиноида фукоксантина, содержание которого в клетках водорослей достигает 2 % от сухой массы [8]. Ввиду этого целесообразно проведение комплексного исследования по определению оптимальных условий роста *C. closterium* для её интенсивного культивирования. Одно из направлений такого анализа — оценка флуоресцентных характеристик вида, так как использование флуоресцентных параметров позволяет в экспресс-режиме (без проведения длительных и трудоёмких экспериментов) оценить условия роста и степень светолюбивости водорослей. Известно, что световые оптимумы скорости фотосинтеза и роста у разных представителей фитопланктона не совпадают, а выявление их границ является довольно сложной задачей. К примеру, диатомовая водоросль *Phaeodactylum tricornutum* относится к числу светолюбивых; оптимальные для её роста световые условия находятся в диапазоне от 150 до 850 мкЭ·м⁻²·с⁻¹ [3]. *Skeletonema costatum*, наоборот, является тенелюбивым видом с границами светового оптимума от 35 до 200–250 мкЭ·м⁻²·с⁻¹ [4].

Другой важный аспект исследования — оценка возможности применения флуоресцентных параметров в качестве индикаторов для контроля функционального состояния водорослей во время их интенсивного культивирования.

Исследуемые параметры:

1. Максимальный коэффициент переменной флуоресценции хлорофилла (Fv/Fm), характеризующий потенциальную скорость утилизации поглощённой световой энергии. Изменение значения параметра Fv/Fm считается наиболее чувствительным индикатором фотоингибирования или иного повреждения фотосистемы II [6].
2. Коэффициент переменной флуоресценции после 10-минутной адаптации к постоянному свету интенсивностью 50 и 250 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ (Fv'/Fm'), имитирующей реальную эффективность использования световых квантов в естественных условиях.
3. Величины фотосинтетического (qP) и нефотосинтетического (NPQ) тушений возбуждённых состояний хлорофилла [7]. В этой публикации использован метод быстрого измерения световых зависимостей параметров флуоресценции (реализуется программным алгоритмом работы прибора), отражающих развитие qP и NPQ на свету, что позволяет регистрировать ранние изменения в функционировании фотосинтетического аппарата [5].
4. Световые зависимости (значения I от 2 до 500 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) скорости электронного транспорта (ETR), характеризующие реальную скорость электронного транспорта по цепи переносчиков электронного заряда.

Эти параметры определяли для водорослей, выращиваемых при трёх интенсивностях света — лимитирующей (17 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$), насыщающей (200 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) и ингибирующей (800 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) рост клеток. Все измерения проводили на флуориметре «Мега-25м».

Максимальный коэффициент переменной флуоресценции (Fv/Fm) для культур, растущих при освещённости 17 и 200 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, имел высокие значения — 0,65–0,7 (наибольшая величина этого параметра равна 0,83 [2]). Для водорослей, вегетирующих при ингибирующей интенсивности света 800 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, коэффициент Fv/Fm был закономерно ниже и составлял 0,48–0,57.

На фоне непрерывного освещения, когда часть реакционных центров закрыта, коэффициенты переменной флуоресценции снижались пропорционально повышению плотности светового потока. При этом для светоадаптированных клеток значения параметра были более устойчивыми. Так, при постоянной освещённости 50 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ для водорослей, адаптированных к 17 и 200 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, коэффициент Fv'/Fm' составил 0,41 и 0,48. Соответствующие значения при засветке интенсивностью 250 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ — 0,13 и 0,23.

Световой порог фотохимического тушения у *C. closterium* для тене- и светоадаптированных клеток был равен 5 и 16 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ соответственно. Нефотохимическое тушение при низких освещённостях было незначительным или отсутствовало; оно начинало возрастать с 64 и 125 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ для тене- и светоадаптированных водорослей соответственно. Максимальные абсолютные значения нефотохимического тушения у светоадаптированных водорослей (200 и 800 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$) были значительно выше, чем у клеток, растущих при интенсивности света 17 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, и составляли 2,6 и 0,3 соответственно (рис. 1). Высокие значения нефотохимического тушения у светоадаптированных клеток обеспечивают им большую устойчивость к повреждающему действию ингибирующих значений светового фактора.

Световые кривые скорости электронного транспорта выходили на плато при интенсивности света около 70–100 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$ и сохраняли постоянные значения до освещённости 500 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$.

В клетках водорослей, адаптированных к 800, 200 и 17 $\text{мкЭ}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$, содержание хлорофилла находилось в соотношении 1 : 2,5 : 10. Выход флуоресценции на единицу хлорофилла при этом имел обратную зависимость, что связано с фотодеструкцией реакционных центров фотосистемы II и уменьшением фотохимического тушения при высокой освещённости.

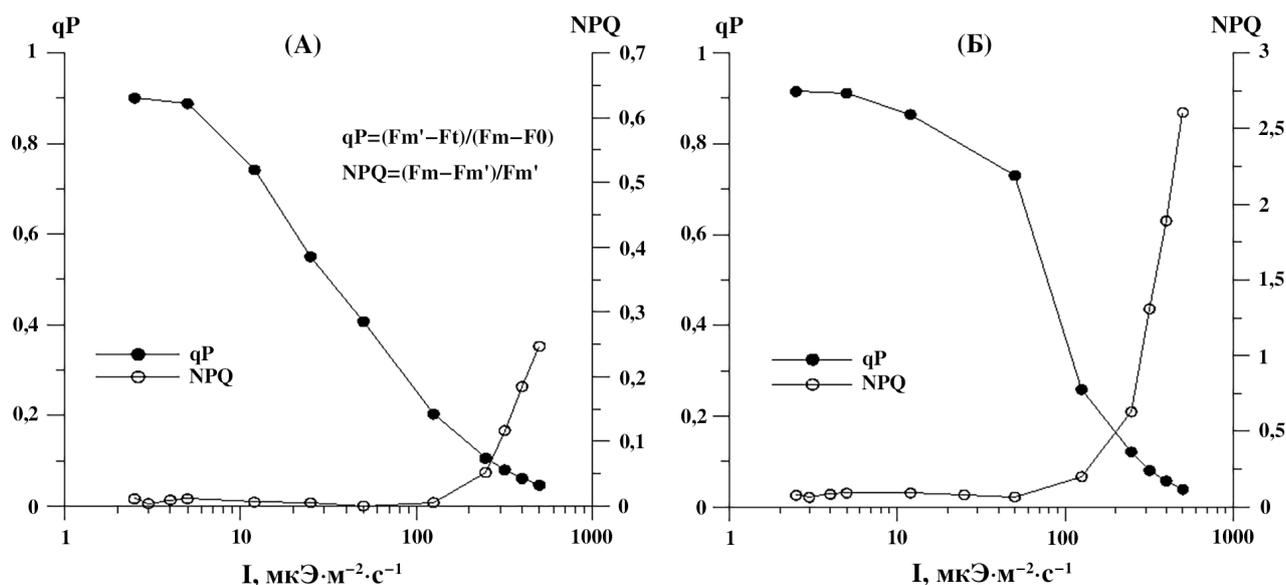


Рис. 1. Световые зависимости фотохимического (qP) и нефотохимического (NPQ) тушений флуоресценции хлорофилла диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium*, предварительно адаптированной к интенсивности света 50 (А) и 200 (Б) $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Fig. 1. Light response curves of photochemical (qP) and non-photochemical (NPQ) quenching of chlorophyll fluorescence of the diatom *Cylindrotheca closterium*, previously adapted to light intensities of 50 (A) and 200 (B) $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Заключение. *C. closterium* является перспективным объектом биотехнологии как потенциальный источник получения ценного каротиноида фукоксантина. Работы по интенсивному культивированию этого вида активно развиваются на базе ФИЦ ИнБЮМ. В представленной работе на примере *C. closterium* показана возможность применения флуоресцентных параметров для оценки условий роста водорослей. Основное преимущество описываемого подхода — его экспрессность, позволяющая существенно упростить выбор оптимальных условий выращивания видов. Результаты проведенного исследования демонстрируют заметные различия в значениях флуоресцентных параметров у водорослей, выращиваемых в разных условиях освещенности. Оптимальной для роста *C. closterium* является насыщающая освещенность около $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. При этой интенсивности света уровень фотохимического тушения сохранял высокие значения в более широком световом диапазоне, чем в других вариантах эксперимента; значения нефотохимического тушения как защитного механизма (при фотоингибировании) были примерно на порядок выше, чем у тенеадаптированных водорослей; значения параметра F_v'/F_m' также были закономерно выше, чем при других освещенностях. Культивирование *C. closterium* при интенсивности света $800 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ вызывало необратимые изменения в фотосинтетическом аппарате водорослей (на это указывают низкие значения F_v/F_m , F_v'/F_m' и ETR) и впоследствии приводило к деградации культуры. Отметим, что из исследуемого ряда флуоресцентных параметров наиболее подходящим для экспресс-оценки функционального состояния *C. closterium* в условиях её интенсивного (полупромышленного) культивирования является показатель F_v/F_m ; значения параметра должны быть выше 0,6.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Функциональные, метаболические и токсикологические аспекты существования гидробионтов и их популяций в биотопах с различным физико-химическим режимом» (№ гос. регистрации АААА-А18-118021490093-4) и при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-34-00672.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Железнова С. Н., Геворгиз Р. Г. Интенсивная культура диатомовой водоросли *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin // *Вопросы современной альгологии*. 2014. № 1 (5). [Zheleznova S. N., Gevorgiz R. G. Intensive culture of diatoms *Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reimann et Lewin. *Voprosy sovremennoi al'gologii*, 2014, no. 1 (5). (in Russ.)]. <http://algology.ru/474>
2. Маторин Д. Н., Осипов В. А., Яковлева О. В., Погосян С. И. *Определение состояния растений и водорослей по флуоресценции хлорофилла* : учеб.-метод. пособие. Москва : Изд-во Макс Пресс, 2010. 116 с. [Matorin D. N., Osipov V. A., Yakovleva O. V., Pogosyan S. I. *Opredele-nie sostoyaniya rastenii i vodoroslei po fluorestsentsii khlorofilla* : ucheb.-metod. posobie. Moscow: Izd-vo Maks Press, 2010, 116 p. (in Russ.)]
3. Шоман Н. Ю., Акимов А. И. Действие света и температуры на удельную скорость роста диатомовых водорослей *Phaeodactylum tricor-nutum* и *Nitzschia* sp. № 3 // *Морской экологический журнал*. 2013. Т. 12, № 1. С. 85–91. [Shoman N. Yu., Akimov A. I. Effect of irradiance and temperature on specific growth rate of diatoms *Phaeodactylum tricor-nutum* and *Nitzschia* sp. № 3. *Morskoi ekolo-gicheskij zhurnal*, 2013, vol. 12, iss. 1, pp. 85–91. (in Russ.)]
4. Шоман Н. Ю., Акимов А. И. Совместное действие света и температуры на удельную скорость роста диатомовой водоросли *Skeletonema costatum* // Сучасні проблеми біології, екології та хімії : зб. матеріалів III Міжнар. конф., Запоріжжя, 29 березня – 1 квітня 2012 р. Запоріжжя, 2012. С. 61–62. [Shoman N. Yu., Akimov A. I. Combined effect of light and temperature on specific growth rate of diatom *Skeletonema costatum*. In: *Suchasni problemy biologii, ekologii ta khimii* : zb. materialiv III Mizh-nar. konf., Zaporizhzhia, 29 March – 1 April, 2012. Zaporizhzhia, 2012, pp. 61–62. (in Russ.)]
5. Herlory O., Richard P., Blanchard G. F. Methodology of light response curves: Application of chlorophyll fluorescence to microphytobenthic biofilms. *Marine Biology*, 2007, vol. 153, iss. 1, pp. 91–101. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0787-9>
6. Krause G. H., Weis E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annual Review of Plant Biology*, 1991, vol. 42, pp. 313–349. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001525>
7. Maxwell K., Johnson G. N. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 2000, vol. 51, iss. 345, pp. 659–668. <https://doi.org/10.1093/jxb/51.345.659>
8. Peng J., Yuan J.-P., Wu C.-F., Wang J.-H. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: Metabolism and bioactivities relevant to human health. *Marine Drugs*, 2011, vol. 9, iss. 10, pp. 1806–1828. <http://doi.org/10.3390/md9101806>

**FLUORESCENCE CHARACTERISTICS OF THE DIATOM
CYLINDROTHECA CLOSTERIUM (EHRENBERG) REIMANN ET LEWIN, 1964**

A. I. Akimov, N. Yu. Shoman, and E. S. Solomonova

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: n-zaichencko@yandex.ru

Fluorescence characteristics of the diatom *Cylindrotheca closterium* previously adapted to light intensities of 17, 200, and 800 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ were investigated. Possibility of using fluorescence parameters for express score of both the algae functional state and the identification of a range of optimal light intensities for their growth was shown. The variable fluorescence coefficient (Fv/Fm) allows to evaluate in express mode the algae functional state in intensive cultivation conditions. It was shown that the maximum of Fv/Fm was of 0.65–0.7 for algae grown at light intensities of 17 and 200 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; it decreased to 0.48–0.57 for algae adapted to light intensities of 800 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Light response curves of the electron transport rate, photochemical and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence, and the Fv'/Fm' coefficient values were obtained. These parameters indicate the degree of algae resistance to the light factor level. It was shown that saturating light intensity of about 200 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ is optimal for the growth of *C. closterium*. The high values of yield of fluorescence per chlorophyll unit under extreme light intensity (800 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) may indicate the degree of inactivation of part of photosystem II reaction centers.

Keywords: diatoms, fluorescence, bioindication