

ЭКЗОПОЛИСАХАРИДЫ *BACILLARIOPHYTA*. ОБЗОР

Приведены результаты исследований экзополисахаридов диатомовых микроводорослей, выделяемых в окружающую среду и являющихся биоактивными компонентами. Приведены данные, указывающие на важную роль экзополисахаридов диатомей в глобальном круговороте углерода. Представлена информация об основных типах внеклеточных углеводов, моносахаридном составе экзополисахаридов, зависимости их продуцирования от темпов роста водорослей, содержания минеральных элементов в среде обитания и уровня освещенности.

Ключевые слова: *Bacillariophyta*, экзополисахариды, свойства, химический состав, условия продуцирования.

Введение

Диатомовые водоросли (*Bacillariophyta*) — одноклеточные и колониальные фотоавтотрофы, принадлежат к широкой группе гетероконтных или разножгутиковых организмов. Предполагается, что диатомовые водоросли возникли в результате вторичного эндосимбиоза с участием гетеротрофного эвкариотического хозяина и эндосимбионта красной водоросли (Kirchman, 2008).

Bacillariophyta делятся на две группы — пеннатные, обладающие билатеральной симметрией, и центрические, с радиальной симметрией. Они широко распространены во всех водных биотопах, в воздухе, почве; богатые их сообщества найдены во льдах Арктики и Антарктики. Являясь важнейшей составляющей морского фитопланктона, *Bacillariophyta* производят до четверти годового первичного органического продукта.

Диатомеи микрофитобентоса отличаются большим разнообразием и связаны с субстратом, по которому перемещаются или прикрепляются к нему с помощью слизистых ножек, трубок, подушечек. В зависимости от подвижности водорослей и условий окружающей среды морские донные *Bacillariophyta* продуцируют различное количество внеклеточных полимерных веществ, в основном углеводной природы.

Экзополисахариды (ЭПС) морских диатомей образуются в результате фотосинтетической фиксации неорганического углерода и входят в трофическую цепь морских ценозов в качестве источника органического вещества для донных и планктонных консументов (Decho, 1990). Диатомовые экссудаты имеют первостепенное значение для формирования

углеводных фракций донных отложений (Wustman et al., 1997; Underwood et al., 2004; Bellinger et al., 2005).

Экзогенные полимерные углеводы способны осуществлять различные функции. Они образуют слизистые влагища, чехлы водорослей, биопленки, формирующие вокруг клеток диатомовых собственное микроокружение, которое защищает их от внезапного неблагоприятного изменения условий (Ordain et al., 2003). Благодаря наличию карбоксильных и сульфогрупп ЭПС обеспечивают связывание ионов тяжелых металлов, иммобилизацию токсических веществ. Обводненные полимерные цепи ЭПС препятствуют высыханию клеток водорослей при отливах.

Роль ЭПС в подвижности прикрепленных диатомовых водорослей

Свет способен проникать сквозь верхнюю часть донных отложений лишь на 100–300 мкм (Smith, Underwood, 2000), поэтому клетки, не имеющие возможности изменять свое положение в этой зоне после взмучивания осадка или осаждения новых порций ила, не могут фотосинтезировать. Способность перемещаться имеет большое значение для жизнедеятельности донных *Bacillariophyta*, поскольку позволяет их клеткам мигрировать в узкой световой зоне в верхних нескольких миллиметрах субстрата (Hoagland et al., 1993; Lind et al., 1997). Моторика диатомей зависит от продуцирования ЭПС (Underwood, Paterson, 2003). У многих клеток вдоль каждой половины панциря (фрустулы) имеется щелевидное отверстие (т.н. шов), через которое выделяется слизь, облегчающая движение по субстрату. (Edgar, Pickett-Heaps, 1984; Underwood, Paterson, 2003).

Для объяснения способности диатомовых к перемещению предложено две различные теории. Согласно теории гидратации (Gordon, 1987), энергия, освобождающаяся при сольватации выделяемой диатомовыми клейкой слизи, обеспечивает движущую силу для перемещения клеток. Вторая теория, более широко принятая в настоящее время, (Edgar, Pickett-Heaps, 1984), основывается на экспериментальных исследованиях, показавших наличие пучков клеточного актина в области фрустулы, и данных электронной микроскопии, продемонстрировавших выделение клейких заряженных полисахаридов из шва подвижных диатомей. Согласно этой модели, выделяющаяся через шов и многочисленные отверстия в панцире слизь увлажняется и набухает, обеспечивая прилипание к субстрату. Передвижение клеток прекращается после обработки специфическими ингибиторами актина и миозина (Edgar, Pickett-Heaps, 1982; Underwood, Paterson, 2003).

С использованием комбинации иммуноцитохимических методов и электронной микроскопии высокого разрешения показано сходство состава ЭПС, секретируемых движущимися *Achnanthes longipes* Agardh, и полимеров, облегчающих подвижность клеток этих водорослей. С использованием метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) показано (Underwood, Paterson, 2003), что двухшовные *Craspedostauros australis* E.J. Cox вырабатывают мягкую слизь, которая покрывает клетку, выде-

ляясь из отверстия в фрустеле. Из шва экскретируются также отдельные нити очень клейкой слизи.

Результаты работ с использованием антител указывают на ключевую роль протеогликанов и гликопротеинов как функциональных компонентов механизма подвижности диатомовых. Протеогликаны в ЭПС диатомей присутствуют в очень небольших количествах, состоят в основном из полисахаридов при значительном содержании остатков урновых кислот и сульфатов. Значение этих различных компонентов для функциональных свойств ЭПС остается предметом дискуссии.

Типы полисахаридов, продуцируемых диатомовыми водорослями

Химическая характеристика внеклеточных полимерных веществ, выделенных из лабораторных культур диатомовых водорослей, подтвердили их преимущественно гетерополисахаридную природу при значительном содержании остатков урновой кислоты и сульфатов (Myklestad, 1995; Magaletti et al., 2004; Urbani et al., 2005).

Помимо указанных, имеются и другие компоненты, которые освобождаются при повреждении или разрушении клеток водорослей. Эти соединения, как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные, присутствуют в основном в виде растворенных или твердых частиц. Электронная и атомно-силовая микроскопия, ЯМР-исследования показали, что большая часть океанических растворенных веществ представлена фибриллярными полисахаридами (Santschi et al., 1998).

Эксперименты по распределению радиоактивной метки с ^{14}C -бикарбонатом показали, что от 30 до 60 % фотоассимилятов аксенических культур пяти видов бентосных устьевых диатомовых водорослей (*Cylindrotheca closterium* (Ehrenb.) Reim. et Lewin, *Navicula perminuta* (Grün.) in Van Heurck, *Nitzschia frustulum* (Kütz.) Grunow, *N. sigma* (Kütz.) Grunow и *Surirella ovata* (Kütz.) Grunow) были продуцированы в виде коллоидных (водорастворимых) углеводов и ЭПС. Последние составляли приблизительно 16 % этой коллоидной фракции (Smith, Underwood, 2000).

Физическое состояние, химический состав, адгезия, реологические характеристики, растворимость, общий заряд и связанная с ним степень набухания в солевых растворах, способность к связыванию тяжелых металлов и адсорбционные свойства различных фракций полисахаридов диатомовых водорослей различаются в широких пределах. Типизация различных групп полимерных углеводов затруднена из-за имеющейся путаницы в терминологии и недостаточности критериев, позволяющих отнести конкретный полисахарид к тому или иному классу.

Ундервуд и Паттерсон (Underwood, Paterson, 2003) предложили классифицировать полисахариды диатомовых водорослей, исходя из их растворимости в воде. Нерастворимые даже в горячей воде, локализованные на внешней и внутренней поверхности створок полисахариды образуют различные выросты, выпуклости, шипы и др., выполняя структурную роль. Они объединяют клетки в колонии, участвуют в их при-

креплении к субстрату, увеличивают поверхность панциря у планктонных видов, обеспечивая плавучесть клетки в воде и т. д.

Термин "коллоидный" объединяет материалы углеводной природы, экскретирующиеся клетками микроводорослей в питательную среду или извлекаемые из них с использованием воды или солевых растворов (рис. 1). Компоненты этих экстрактов разделяют на низкомолекулярную и высокомолекулярную (полимерную) фракции, осаждая последнюю из коллоидных растворов с помощью этанола. Количество извлекаемых коллоидных углеводов зависит от того, какой материал используется для экстракции (свежий или лиофилизированный). Выход коллоидных полисахаридов в ходе их экстракции из клеток диатомовых микроводорослей обычно возрастает при продолжительной инкубации, повышении температуры, увеличении ионной силы и рН раствора, а также в присутствии комплексообразователей (ЭДТА и т.п.). После извлечения фракции коллоидных углеводов из образцов клеток или донных осадков (Staats et al., 1999, 2000; Smith, Underwood, 2000) оставшийся материал содержит связанные ЭПС.

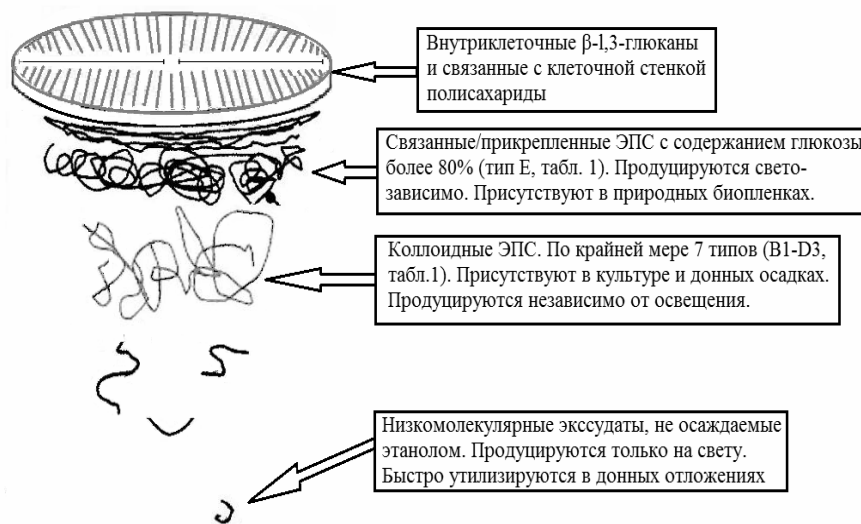


Рис. 1. Различные типы полисахаридов, продуцируемые донными *Bacillariophyta*

В зависимости от природы исходных образцов, особенно природных образцов ила, осадок, содержащий ЭПС, после удаления примесей и солей может быть разделен на ряд фракций, диапазон молекулярных масс которых можно оценить с помощью молекулярных фильтров. Другим подходом к оценке размера полисахаридных цепей является их осаждение с использованием серии водных растворов спирта различной концентрации. Отношения между этими фракциями ЭПС не выяснены. Потенциально они имеют различное происхождение и выполняют разные функции в окружающей среде.

Сравнительные исследования структурных и биохимических свойств полисахаридов сталкиваются с огромными трудностями. Простейший подход – сравнение моносахаридного состава ЭПС. Относительное содержание различных групп моносахаридов само по себе не несет никакой информации о биохимических свойствах рассматриваемых соединений. Тем не менее, очевидно, что существует несколько основных различий в моносахаридном составе, которые должны обеспечить основу для сравнения, а также содействовать дальнейшим исследованиям.

Главными компонентами моносахаридных композиций у низкомолекулярных углеводов, экстрагируемых горячим раствором бикарбоната как из биомассы биопленок, так и из образцов культур водорослей, оказались монозы, формирующие два различных кластера. При этом фракции низкомолекулярных углеводов, экстрагируемых горячей водой, группировались вдоль вектора глюкозы, а коллоидные ЭПС – вдоль векторов галактозы и арабинозы. В различных углеводных фракциях выявлены существенные отличия в составе моносахаридов и удельном содержании уроновой кислоты. Простое соотношение между концентрацией коллоидных углеводов и биомассой биопленок в микрофитобентосе лишь маскирует высокую степень потенциальной сложности пула углеводов при различном содержании полимерного и неполимерного материала в различных биопленках (Rainer, Fitznar, 2001).

Моносахаридный состав полисахаридов у различных типов *Bacillariophyta* неоднороден. Методом кластерного анализа проанализированы имеющиеся литературные данные о мономерном составе полисахаридов диатомовых водорослей и на основе 60 % подобия сформировано шесть групп (табл. 1) (Underwood, Paterson, 2003), внутри которых выделены основные компоненты 1 и 2, объясняющие 45 % имеющихся вариаций. Состав основных компонентов 1 положительно коррелирует с содержанием рамнозы, фукозы, маннозы/ксилозы, и отрицательно – с содержанием глюкозы и уроновых кислот. Основные компоненты 2 связаны с содержанием арабинозы и маннозы/ксилозы, а также сахаров неизвестной природы. Кластер А включает 2 образца ЭПС *Coscinodiscus nobilis* и *Chaetoceros decipien*; кластер В1 – 10 образцов, выделенных из диатомовых рода *Chaetoceros*, *Stauraphora amphioxys*; кластер В2 – 26 образцов коллоидных углеводов, экстрагированных физиологическим раствором или с помощью ЭДТА; кластер С1 – 7 образцов из *Cylindrotheca fusiformis*; кластер С2 – 12 образцов ЭПС *C. closterium* и диатомовых рода *Nitzschia*; кластер D2 – 7 образцов из *C. closterium*; кластер D3 – 3 образца несвязанных ЭПС из *C. closterium*, а также связанного материала осадка; кластер Е – 12 образцов прикрепленных, капсульных или связанных ЭПС, коллоидные углеводы природных источников и верхних биопленок; кластер F – 4 образца ЭПС с высоким содержанием неизвестных углеводов и рамнозы.

Таблица 1

Среднее содержание моносахаридных остатков в кластерах (%), выделенных при 60 %-ном сходстве в основных группах и 70 %-ном сходстве в подгруппах (Underwood, Paterson, 2003)

Моносахаридный остаток	Тип кластера								
	A	B1	B2	C1	C2	D2	D3	E	F
Фукоза	33,0	13,1	9,3	2,5	1,7	0,4	3,3	0,6	9
Арабиноза	1,5	6,9	6,7	0,8	4,8	0	0,5	0	2,0
Рамноза	24,5	11,3	16,2	9	6,5	6,9	7	2,7	36,8
Галактоза	8,5	21,7	22,6	18,2	13,6	23,3	15,3	3,8	8,3
Глюкоза	10,5	5,4	13	24,5	12,8	46,1	34	83,1	0
Манноза/ Ксилоза	13	12,2	20,4	9,5	15,3	4,7	8	3,9	14,5
Уроновая кислота	4,5	12,5	11,5	22	42	6,6	0	3,4	0
Не известны	0	0	0	0	0,1	0	0	1,3	25,5

Образцы групп А, В и С были объединены в кластеры при 55 %-ном сходстве. Группа А состоит из внеклеточных углеводов двух планктонных видов диатомовых водорослей – *Coscinodiscus nobilis* Grunow и *Chaetoceros decipiens* Cleve, имеющих более высокое содержание фукозы и рамнозы, чем в других кластерах (см. табл. 1). В кластере В сгруппированы коллоидные углеводы из культур планктонных видов *Chaetoceros* Ehrenb., слизь донных диатомовых *Staurophora amphioxys* (Greg.) D.G. Mann (McConville et al., 1999) и материал, извлеченный из природных отложений. Подгруппа В1 состоит из коллоидных ЭПС, материала из клеток культур и образцов коллоидных углеводов, экстрагированных ЭДТА из илистых осадков. Эти экстракты содержали значительно больше фукозы и галактозы, чем другие кластеры.

В подгруппу В2 включены 26 образцов коллоидных углеводов, полученных путем экстракции физиологическим раствором или с помощью ЭДТА и имеющих более высокое содержание фукозы, арабинозы, рамнозы, галактозы, маннозы / ксилозы, чем большинство образцов, включенных в кластеры С, D, группы F (см. табл. 1). ЭПС в образцах культур водорослей, объединенных в эту подгруппу, по составу значительно отличаются друг от друга.

Подгруппа С1 кластера С включает коллоидные фракции с молекулярной массой > 10 кДа, извлеченные ЭДТА, а также углеводы, выделенные из отложений конца приливного периода (de Brouwer, Stal, 2001), ЭПС *Cylindrotheca fusiformis* Reim. et J.C. Lewin – коллоидные углеводы, извлеченные из культур *C. fusiformis* и ЭПС из культур

C. closterium в логарифмической и стационарной фазах роста (Underwood, Paterson, 2003). В образцах, объединенных в подгруппе С1, содержание глюкозы и галактозы было невысоким при значительном содержании уроновых кислот, кроме одного образца *C. fusiformis*, извлеченного из Адриатического моря, который не содержал уроновых кислот. Подгруппа С2 состоит из ЭПС *C. closterium* и диатомовых рода *Nitzschia* (de Brouwer, Stal, 2002; Underwood, Paterson, 2003), а также ЭПС с молекулярной массой > 10 кДа, экстрагированных из отложений в начале периода приливного всплытия. Эти фракции богаты уроновыми кислотами. Содержание фукозы и арабинозы было низким во всех образцах С-кластера, что и являлось признаком, по которым эту группу отделяли от кластеров А и В (см. табл. 1).

Кластеры D и В более тесно связаны друг с другом, чем другие группы. Кластер D содержит образцы донных осадков и материал, полученный при культивировании диатомовых. Как правило, осадочные образцы состоят из полимеров с молекулярной массой < 0,10 кДа, экстрагируемых физиологическим раствором или ЭДТА. Подгруппа D2 состоит, в основном, из углеводов коллоидных фракций, связанных ЭПС из *C. closterium*, а к подгруппе D3 отнесены несвязанные ЭПС из *C. closterium* и материал, связанный с осадком. Образцы кластера D имели низкое содержание фукозы, арабинозы и рамнозы (по сравнению с кластерами В), низкий уровень маннозы/ксилозы и уроновых кислот (кластеры С1 и С2), а также большое количество галактозы и глюкозы (см. табл. 1).

В кластере E сгруппированы прикрепленные, капсульные или связанные с донным осадком ЭПС культур диатомовых, коллоидные углеводы биопленок (de Brouwer, Stal, 2001). Этот кластер характеризуется очень высоким содержанием глюкозы (в среднем 83,1 %). Кроме того, в эту группу был включен внутриклеточный глюкан из *C. closterium* (Underwood, Paterson, 2003). Последний кластер (F) объединяет образцы, содержащие значительно большее количество неизвестных углеводов и рамнозы, чем другие кластеры.

Кластерный анализ является лишь простейшей попыткой типизации углеводов и не дает информации о биохимических и структурных свойствах полисахаридов, которая может быть получена только с помощью современных аналитических методов, таких как ядерный магнитный резонанс (ЯМР) и атомно-силовая микроскопия (АСМ). Такие исследования в отношении донных морских таксонов или природных биопленок проводятся редко.

Разнообразие типов внеклеточных полисахаридов, продуцируемых донными диатомовыми водорослями, представлено на рис. 1. Кремниевая фрустула этих клеток имеет слизистое покрытие, состав которого отличается от состава экзополисахаридов, выделяющихся для облегчения передвижения клеток (Higgins et al., 2002). Этот тип полисахаридов остается наименее изученным. Эксперименты с диатомовыми водорослями родов *Chaetoceros* Ehrenb., *Cylindrotheca* Rabenh., *Closterium*

Nitzsch., *Nitzschia* sp. и *Navicula salinarum* Grunow показали, что продуцируемые ими ЭПС отличаются от компонентов слизистой капсулы (Myklestad, Haug, 1972; de Brouwer, Stal, 2002).

Образование богатых глюкозными остатками связанных или прикрепленных внеклеточных углеводов в высокой степени зависит от освещения. Эти связанные ЭПС существенно отличаются по составу от более лабильных коллоидных ЭПС и других коллоидных углеводов, присутствующих в культурах и отложениях. Идентифицировано по меньшей мере семь основных типов экзополисахаридов. Именно в этом пуле объединены самые разнообразные по моносахаридному составу и происхождению образцы. Продуцирование этих ЭПС зависит от условий окружающей среды и физиологического состояния клеток (Staats et al., 1999; Smith, Underwood, 2000). Различия в составе моносахаридов этих углеводов являются важными, так как от них зависят физические свойства и потенциал взаимодействия с окружающей средой (Decho et al., 1990). Последний пул внеклеточных полисахаридов составляют низкомолекулярные экссудаты. Их продуцирование зависит от света. Эти соединения изучены недостаточно, хотя они, вероятно, наиболее биологически активны в плане переноса органического углерода к другим трофическим группам. Каким образом распределяется внеклеточный углеводный экссудат между различными группами полисахаридов, не известно. Необходимы подробные биохимические анализы, экологические и физиологические исследования для выяснения функциональной связи между различными типами ЭПС.

Пути образования экзополисахаридов в клетках *Bacillariophyta*

Обычными запасными высокомолекулярными углеводами пресноводных и морских диатомовых водорослей являются β -1,3-глюканы, лейкозан и хризоламинарин (Myklestad, Haug, 1972; Underwood, Paterson, 2003). В неосвещенных клетках эти резервные глюканы быстро гидролизуются с помощью фермента экзо-(β -1,3)-D-глюканазы. В темноте клетки диатомей продолжают выделять ЭПС пропорционально использованию глюканов, что свидетельствует об участии внутриклеточных резервов органического углерода в образовании внеклеточных полисахаридов.

ЭПС синтезируются из фотосинтетических ассимилятов по меньшей мере двумя путями (рис. 2). Внутриклеточные глюканы образуются в фотосинтезирующих клетках с участием низкооборотных ферментов. В катаболизм глюканов, напротив, вовлечены ферменты с высокими скоростями оборота. Радиоактивная ^{14}C -метка, введенная в молекулы глюканов, уже через 3 ч количественно переходит во фракцию внеклеточных ЭПС (Smith, Underwood, 2000). Если этот путь синтеза ЭПС заблокировать, общее продуцирование ЭПС снижается, но не ингибируется полностью, что свидетельствует о существовании альтернативного пути их биосинтеза (см. рис. 2).

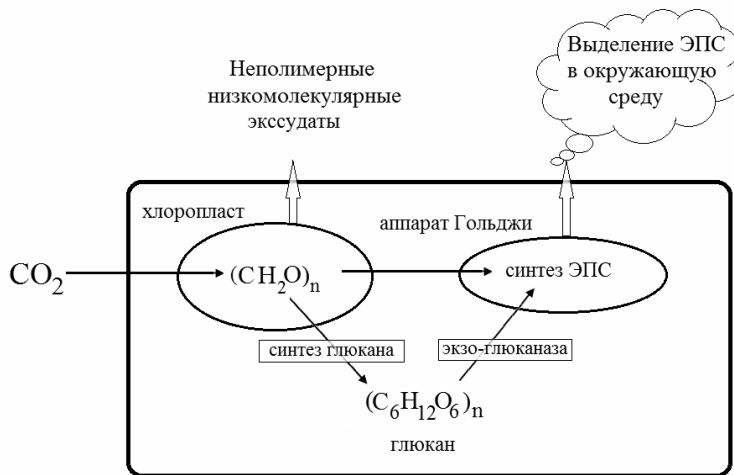


Рис. 2. Предполагаемые пути ассимиляции углерода и синтеза внеклеточных низкомолекулярных веществ и экзополисахаридов. ЭПС в донных *Bacillariophyta* могут синтезироваться непосредственно в хлоропласте из фотоассимилатов и/или из глиокана с участием экзоглиоканазы

В присутствии ингибитора синтеза глиокана 2,6-дихлоробензонитрила пул ^{14}C -коллоидных углеводов и ^{14}C -экзополисахаридов значительно снижается. Циклогексими́д, ингибирующий синтез белка, прерывает процесс трансляции на 80S рибосомах в цитоплазме, но не влияет на функционирование хлоропластов и митохондрий. С помощью циклогексимида удалось показать, что образование ЭПС и глиокана у диатомей не зависит от синтеза белка *de novo*. В то же время в присутствии этого ингибитора подавляется катаболизм глиокана (Underwood et al., 2004).

Обработка клеток ингибитором синтеза глиоканаз паранитрофенил- β -D-гликопиранозидом приводит к накоплению запасного глиокана и снижению темпов продуцирования ^{14}C -коллоидных и экзополисахаридов. Существует также несоответствие между моносакхаридным составом глиокана, состоящего из $> 90\%$ глюкозы, и многими типами ЭПС, содержащими остатки других углеводов и уроновые кислоты, хотя некоторые фракции внеклеточных полисахаридов богаты глюкозой. Это показывает, что в то время как глюкоза из глиокана может быть непосредственно включена в ЭПС, другие сахара, входящие в состав некоторых типов ЭПС донных диатомовых водорослей, должны быть синтезированы *de novo*. Глиокан в этом случае может быть источником энергии и углерода для их биосинтеза, особенно в темноте.

Исследования показали, что ЭПС у диатомовых синтезируются в тельцах Гольджи и транспортируются в везикулах к клеточной мембране. Эти везикулы затем сливаются с плазматической мембраной и ЭПС выдавливается через шов, трещины или другие поры во фрустуле (Wang et al., 2000).

Клетки в темноте могут синтезировать оба типа углеводов, используя внутриклеточный резервный пул глюканов. Эти исследования показывают, что глюканы могут быть либо предшественниками ЭПС, либо используются как запасной пул фотоассимилятов, энергетически обеспечивающих синтез ЭПС в темноте.

Продуцируемые фитопланктоном растворимые углеводы являются основным источником органического углерода на начальных звеньях морских трофических цепей (Nikolaou, Lekkas, 2001). До 50 % углерода, зафиксированного в фитопланктоне при фотосинтезе, может переходить в водную среду (Fogg, 1997). Согласно расчетам, ежегодная первичная продукция *Bacillariophyta* составляет приблизительно 20 млрд т углерода, что эквивалентно 40 % морской и 20 % общей глобальной первичной продукции. Взаимосвязи между структурой и составом различных ЭПС диатомовых и их экологическими функциями еще предстоит установить.

Влияние минеральных элементов на продуцирование углеводных биополимеров диатомовыми водорослями

Условия роста, в т.ч. наличие необходимых минеральных элементов в среде обитания *Bacillariophyta*, существенно влияют на характер их развития, биохимический состав и способность продуцировать экзо-метаболиты.

В различных экспериментальных условиях, имитирующих вариацию параметров природной среды, изучалось поведение трех представителей морских донных диатомовых водорослей — *Cylindrotheca closterium*, *Navicula perminuta* и *Amphora exigua* Greg. Во всех опытных вариантах регистрировалось выделение большого количества богатых углеводами биополимеров, играющих важную роль в экологии клеток, живущих на морских отложениях. Общее содержание углеводных полимеров (коллоидных, ЭПС, внутриклеточных запасных глюканов) возрастало при полном обеспечении питательными веществами и снижалось при их дефиците, ограничивающем рост всех трех видов водорослей. Относительное содержание ЭПС (до 44 % – 69 %) во внеклеточном пуле углеводов возрастало (до 44 %–69 %) при лимитировании питания *C. closterium*. Эта водоросль продуцировала два типа ЭПС, отличающихся количеством и углеводным составом (Underwood et al., 2004).

Результаты лабораторных исследований зависимости экзогенного выделения углеводов, темпов роста и химических характеристик биомассы культур диатомовых морских водорослей *C. closterium*, *Thalassiosira pseudonana* Hasle et Heimdal и *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve от условий фосфорного обеспечения показали, что при снижении содержания неорганического фосфора в питательной среде у всех исследованных видов активизируется продуцирование полисахаридов. Максимальное их количество в клетке при дефиците фосфора в среде отмечено у *Th. pseudonana* – 28,4 мкмоль растворенного органического углерода на 10^6 клеток. Значительно меньшим этот показатель оказался у *C. closterium* –

2,56 мкмоль и наименьшим у *S. costatum* – 1,18 мкмоль растворенного органического углерода на 10^6 клеток (Muklestad et al., 1989; Underwood et al., 2004).

Возрастание количества полисахаридных экссудатов при лимитировании питательной среды по фосфору подтверждено многими исследованиями, проведенными с разными видами *Bacillariophyta* как пелагическими, обитающими в толще воды и на ее поверхности, так и донными (Muklestad, 1995; Alcoverro et al., 2000; Guerrini et al., 2000; Magaletti et al., 2004; Urbani et al., 2005).

При ограничении содержания в культуральной среде двух компонентов – азота и фосфора показатели роста эпипелических диатомовых водорослей *C. closterium*, изолированных из Адриатического моря (Alcoverro et al., 2000), снижались. Для характеристики состояния биомассы изучаемых водорослей использовали ряд параметров, а именно: общее количество клеток, интенсивность фотосинтеза при плотности светового потока $695 \text{ мкмоль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, интенсивность дыхания, общий пул углеводных компонентов и растворимых углеводов, содержание хлорофиллов ($a + c$) и внеклеточных полимерных веществ (ЭПС). В течение переходного периода к стационарной фазе роста количество клеток снижалось при ограничении азотного и фосфорного питания по сравнению с контролем. В этот же период при дефиците питательных элементов скорость фотосинтеза многократно снижалась: при ограничении азотного питания она была в 3 раза ниже, чем при недостатке фосфора и в 4 раза ниже, чем в контроле.

Таким образом, эффективность фотосинтеза в условиях фосфорного голодания оказалась существенно выше, чем при недостатке азота. Этим, возможно, объясняются значительные различия в интенсивности дыхания и содержании хлорофиллов ($a + c$). В то же время во всех вариантах опытов количество растворимых углеводов мало изменялось. При этом продуцирование ЭПС при недостатке фосфора было тесно связано с периодами ассимиляции углерода, переходом между фазами роста и возрастало на этапе наступления стационарной фазы. Эти результаты подтверждают сделанный ранее вывод о стимуляции продуцирования внеклеточных полисахаридов донными или эпипелическими диатомеями в условиях дисбаланса по питательным веществам (в частности, по азоту или фосфору) (Alcoverro et al., 2000).

Ограничение условий питания отражается также на моносахаридном составе ЭПС диатомовых водорослей. Это обнаружено в опытах с культурами *Cylindrotheca closterium*, *Navicula perminta* и *Amphora exigua* Greg. В условиях насыщения питательными веществами их клетки продуцируют комплекс ЭПС, содержащий рамнозу, фукозу, ксилозу, маннозу, галактозу, глюкозу и уроновые кислоты. При недостатке питания в клетках дополнительно синтезируются ЭПС, включающие маннозу, галактозу, глюкозу и уроновые кислоты. Оба типа ЭПС образуются как при освещении, так и при инкубации культур в темноте (Underwood et al., 2004).

Анализ моносахаридного состава и растворимых ЭПС *Cylindrotheca fusiformis* показал, что дефицит азота приводит к снижению удельного содержания галактозы и маннозы (Magaletti et al., 2004), тогда как содержание фукозы и рамнозы возрастает (табл. 2). В условиях недостаточного фосфорного питания процентное содержание глюкозы и маннозы снижается, а фукозы, рамнозы и галактозы – возрастает. Значительное уменьшение количества сульфогрупп при незначительном изменении содержания уроновых кислот в полисахаридной цепи отмечено в лабораторных условиях при ограничении как азотного, так фосфорного питания (Magaletti et al., 2004).

Таблица 2

Содержание моносахаридов, сульфатов ($-\text{SO}_3\text{H}$) и уроновых кислот ($-\text{COOH}$) в растворимых экзополисахаридах *Cylindrotheca fusiformis* при различных условиях питания и в природных образцах слизи ($n = 9$) из северной части Адриатического моря (Magaletti et al., 2004)

Образец	Гал	Глю	Ман	Кси	Рам	Фук	Ара	– SO ₃ H	– COOH
	(% , масса:масса)							(% , моль: моль моносахаридных остатков)	
Контроль	37,7	26,5	13,0	12,9	4,4	5,4	–	31,1	7,4
1/3 N	33,2	26,7	3,9	11,8	17,6	6,8	–	8,7	7,1
1/3 P	41,1	17,4	5,5	13,1	14,2	8,7	1,2	12,8	10,0
1/6 P	42,3	18,2	4,0	15,1	15,7	4,9	–	н/о	н/о
Адриатическое море	42,0 ±7,1	16,5 ±4,6	11,3 ±2,2	9,5 ±1,3	5,5 ±2,7	7,0 ±2,5	–	7,0 ±5,1	2,7±1,2

Обозначения: Гал – галактоза; Глю – глюкоза; Ман – манноза; Кси – ксилоза; Рам – рамноза; Фук – фукоза; Ара – арабиноза; н/о – не определено.

Сравнение моносахаридного состава слизи *C. fusiformis*, собранной в акватории северной части Адриатического моря, с экспериментальными показателями культуры, насыщенной по биогенам, позволяет предположить, что в этих конкретных природных условиях углеводный комплекс сформирован при разбалансировании минерального питания (см. табл. 2).

Основным моносахаридом растворимой фракции полимерных углеводов культур *C. closterium*, *Th. pseudonana* и *S. costatum* в экспоненциальной фазе роста при насыщении питательной среды фосфором оставалась глюкоза. Ее удельное содержание во фракции растворимых полисахаридов при дефиците фосфора в культуральной среде у *C. closterium* снижалось, но незначительно изменялось у *Th. pseudonana* и *S. costatum* (Urbani et al., 2005).

Детальный анализ условий продуцирования внутриклеточных, экзогенных углеводов и активности ряда ферментов углеводного обмена другой диатомовой водоросли — *Achnanthes brevipes* C. Agardh при ее культивировании в условиях дефицита азота и фосфора показал, что рост *A. brevipes* в пересчете на конечный выход биомассы в большей степени ограничен нехваткой азота, чем фосфора. Недостаточное количество азота в культуральной среде отрицательно сказывается на накоплении белка и хлорофилла. В то же время пул углеводов при недостатке обоих компонентов возрастает, хотя эффекты лимитирования по азоту и фосфору оказались различными. В частности, количество внеклеточных полисахаридов увеличивалось при голодании по неорганическому фосфору, тогда как образование внутриклеточных углеводов стимулировалось как при дефиците азота, так и при дефиците фосфора (Guerrini et al., 2000).

В ходе исследований выявлены также метаболические изменения, происходящие в клетках *A. brevipes*. Так, при ограничении по фосфору у исследованных водорослей неактивным оказался ряд ферментов, обнаруженных ранее у некоторых высших растений, зеленой водоросли *Selenastrum minutum* (Ndgeli) Collins, и участвующих в альтернативных реакциях углеводного обмена. При дефиците фосфора снижалась активность пируваткиназы, фосфорилирующей НАД-зависимый глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы и 3-фосфоглицерат киназы, что указывает на замедление катаболизма глюкозы у *A. brevipes*. В этих же условиях частично ингибировалась активность уридин дифосфатглюкозопирофосфорилазы, ключевого фермента биосинтеза запасного полисахарида хризоламинарина. Это свидетельствует о том, что при дефиците неорганического фосфора в среде культивирования катаболизм углеводов у *A. brevipes* ограничен при возрастании экстрезии внеклеточных углеводов (Guerrini et al., 2000).

Видоспецифичные вариации в количестве и наборе альдоз в составе продуцируемых диатомовыми водорослями полисахаридов в зависимости от доступности питательных веществ и условий роста могут предоставлять полезную информацию о выделении и сохранении этих органических соединений в толще воды (Urbani et al., 2005).

Влияние освещения на формирование экзополисахаридов

Существенное влияние на формирование углеводного комплекса водорослей оказывают условия освещения. Были проведены исследования действия естественной (100 %-ной), и более низкой освещенности (до 50 %) на первичную продукцию, вертикальную миграцию и распределение фотоассимилированного углерода во внеклеточных углеводах микрофитобентосных биопленок. В целом, первичная продукция биопленок была значительно выше при 100 %-ном освещении в полдень, чем при затенении или в конце периода всплытия. Однако несмотря на различные условия освещения, усредненные скорости накопления первичных продуктов за весь период всплытия не зависели от световых условий. Процентное содержание низкомолекулярных внеклеточных углеводов за-

висело от фотосинтетической активности водорослей и при 100 %-ном освещении составляло $35 \pm 4,5$ % по сравнению с $13 \pm 3,8$ % при сниженной освещенности. В то же время при затенении значительно, до 2,5 раз, возрастала скорость образования внеклеточных полимерных веществ (ЭПС) от $0,4 \text{ мг С м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$ при полном освещении до $1,0 \text{ мг С м}^{-2} \cdot \text{ч}^{-1}$ при затенении. Концентрации всех фракций внеклеточных углеводов в незатененных биопленках были невысокими или не увеличивались до приливного погружения. Общее продуцирование коллоидных ЭПС, тесно связанное с уровнем первичной продукции, было максимальным в полдень, однако значительной разницы в накоплении коллоидных ЭПС между затененными и незатененными биопленками к концу периода всплытия не наблюдалось (Perkins et al., 2001).

На свету большинство *Bacillariophyta* присутствовали в верхней зоне (0,2 мм), в то время как в темноте они равномерно распределялись в верхних 2 мм от осадка. Однако если плотность светового потока превышает $1200 \text{ мкмоль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, наблюдается их нисходящая миграция (Perkins et al., 2004).

Анализ водо- и ЭДТА-экстрагируемых фракций ЭПС, полученных из приливной биопленки илистых зон двух станций Западной Европы и культур *Bacillariophyta*, свидетельствует о возрастании продуцирования внеклеточных углеводов микрофитобентосом при освещении (de Brouwer et al., 2003).

Заслуживают внимания детальные исследования зависимости секреции полисахаридов аксенической культурой морской бентосной диатомовой водоросли *C. closterium* от освещенности и уровня фотосинтеза. Клетки были инкубированы на свету, в темноте, или на свету с добавлением диурана (DCMU) – ингибитора фотосистемы II. Эти опыты были проведены также с популяцией бентосных диатомовых водорослей на приливной литорали в Вестершелде (Нидерланды). В условиях невысокой освещенности ($60 \text{ мкмоль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) у *C. closterium* отмечены высокие темпы продуцирования полисахаридов, однако в темноте или в присутствии диурана их секреция подавлялась. Ни в темноте, ни на свету с добавкой диурана внутриклеточные углеводы не трансформировались в ЭПС. Высокие темпы их накопления природной популяцией *C. closterium* наблюдались днем при ее всплытии, но не при затенении или при обработке осадка диуроном. При культивировании аксенических культур *C. closterium* в переменном режиме (12 ч свет, 12 ч темнота) концентрация ЭПС в темноте снижалась. Их деградация наблюдалась также в природной популяции на литорали во время ночного всплытия. Это указывает на то, что секреция ЭПС зависит от оксигенного фотосинтеза. Авторы пришли также к заключению, что вертикальная миграция не является основным фактором, определяющим наблюдаемое накопление ЭПС на свету. Поскольку в аксенических культурах *C. closterium* отсутствовали бактерии (Nagai et al., 1998), деградация ЭПС в этих условиях

может быть связана с активностью только тех гидролитических ферментов, которые секретируются клетками этих водорослей (Staats et al., 2000).

Эксперименты по распределению радиоактивной метки, введенной в форме ^{14}C -бикарбоната, подтвердили, что при освещении аксенические культуры бентосных устьевых диатомовых водорослей *C. closterium*, *Navicula perminuta*, *Nitzschia frustulum*, *N. sigma* и *Surirella ovata* активно продуцируют коллоидные полисахариды. Они составляют от 30 до 60 % фотоассимилятов, а ЭПС – около 16 % этой коллоидной фракции.

В условиях недостаточной освещенности клетки указанных диатомовых водорослей продолжают (до 3 дней) выделять ЭПС за счет клеточных резервов. Однако в темноте продуцирование низкомолекулярных углеводов быстро прекращается, а количество ЭПС увеличивается до 85–99 % общей массы внеклеточных полимерных углеводов. При этом у *N. perminuta* и *S. ovata* наблюдается значительная отрицательная корреляция между резервными глюканами и экзополисахаридами (Smith, Underwood, 2000).

Таким образом, продуцирование экзополисахаридов диатомовыми водорослями зависит от освещенности и размеры их пула определяются интенсивностью действующего света. Экзополисахариды не образуются при ингибировании фотосинтеза. Все эти факты свидетельствуют о ведущей роли фотосинтеза в процессе образования ЭПС.

Заключение

Возрастающий спрос на биомассу микроводорослей для потребностей быстро развивающихся биотехнологических и биомедицинских производств требует интенсификации процесса их выращивания (Witvrouw, De Clercq, 1997; Guzmán-Murillo et al., 2007). В связи с этим ведутся поиски способов активизации роста, модифицируются условия выращивания, обеспечивающие эффективное продуцирование полезных метаболитов, в т.ч. экзополисахаридов. Это направление исследований представляет интерес также в связи с глобальной ролью *Bacillariophyta* как продуцентов углеводных соединений – первичного звена в трофических сетях морей и океанов. Высказано предположение, что внеклеточное продуцирование экзополисахаридов происходит в результате «переполнения» клеток фотоассимилятами, когда фотосинтез осуществляется быстрее, чем требуется для обеспечения роста (Fogg, 1983). Несмотря на то, что этот процесс может рассматриваться как нерациональное использование внутриклеточных метаболитов, водоросли, продуцирующие ЭПС, получают существенные преимущества благодаря интеграции в долгосрочные симбиотические планктонные сообщества (Williams, 1990).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alcoverro T., Conte E., Mazzella L.* The production of mucilage by the epipellic diatom *Cylindrotheca closterium* from the Adriatic Sea under nutrient limitation // J. Phycol. – 2000. – **36**(6). – P. 1087–1095.
- Bellinger J., Abdullahi A.S., Gretz M.R., Underwood G.J.C.* Biofilm polymers: relationship between carbohydrate biopolymers from estuarine mudflats and unialgal cultures of benthic diatoms // Aquat. Microbiol. Ecol. – 2005. – **38**. – P. 169–180.
- de Brouwer, de Deckere, Stal L.J.* Distribution of extracellular carbohydrates in three intertidal mudflats in Western Europe // Estuar., Coast. and Shelf. – 2003. – **56**(2). – P. 313–324.
- de Brouwer J.F.C., Stal L.J.* Short-term dynamics in microphytobenthos distribution and associated extracellular carbohydrates in surface sediments of an intertidal mudflat // Mar. Ecol. Progr. Ser. – 2001. – **218**(1). – P. 33–44.
- de Brouwer J.F.C., Stal L.J.* Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia* sp. (*Bacillariophyceae*) // J. Phycol. – 2002. – **38**. – P. 464–472.
- Decho A.W.* Microbial exopolymer secretions in ocean environments. Their role(s) in food webs and marine processes // Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev. – 1990. – **28**. – P. 73–153.
- Edgar L.A., Pickett-Heaps I.D.* Ultrastructural localisation of polysaccharides in the motile diatom *Navicula cuspidate* // Protoplasma. – 1982. – **113**. – P. 10–22.
- Edgar L.A., Pickett-Heaps I.D.* Diatom locomotion // Progr. Phycol. Res. – 1984. – **3**. – P. 47–88.
- Fogg G.E.* The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis // Bot. Mar. – 1983. – **6**(1). – P. 3–14.
- Fogg G.E.* Excretion of organic matter by phytoplankton // Limnol. Oceanogr. – 1997. – **22**(3). – P. 576–577.
- Gordon R.* A retaliatory role for algal projectiles, with implications for the mechanochemistry of diatom gliding motility // J. Theor. Biol. – 1987. – **126**(4). – P. 419–436.
- Guerrini F., Cangini M., Boni L., Trost P., Pistocchi R.* Metabolic responses of the diatom *Achnanthes brevipes* (*Bacillariophyceae*) to nutrient limitation // J. Phycol. – 2000. – **36**(5). – P. 882–890.
- Guzmán-Murillo M.A., López-Bolaños C.C., Ledesma-Verdejo T., Roldan-Libenson G., Cadena-Roa M.A., Ascencio F.* Effects of fertilizer-based culture media on the production of exocellular polysaccharides and cellular superoxide dismutase by *Phaeodactylum tricorutum* (Bohlin) // J. Appl. Phycol. – 2007. – **19**(1). – P. 33–41.
- Higgins M.J., Crawford S.A., Mulvaney P., Wetherbee R.* Characterization of the adhesive mucilages secreted by live diatom cells using atomic force microscopy // Protistologia. – 2002. – **153**. – P. 25–28.
- Hoagland K.D., Rosowski J.R., Gretz M.R., Roemer S.C.* Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology // J. Phycol. – 1993. – **29**. – P. 537–566.
- Kirchman D.L.* Microbial Ecology of the Oceans. The 2nd ed. – New York: John Wiley & Sons, 2008. – 512 p.

- Lind J.L., Heimann K., Miller E.A. et al. Substratum adhesion and gliding in a diatom are mediated by extracellular proteoglycans // *Planta*. – 1997. – **203**. – P. 213–221.
- Magaletti E., Urbani R., Sist P., Ferrari C.R., Cicero A.M. Abundance and Chemical Characterization of Extracellular Carbohydrates Produced by the Marine Diatom *Cylindrotheca fusiformis* // *Eur. J. Phycol.* – 2004. – **39**(2). – P. 133–142.
- McConville M.J., Wetherbee R., Bacic A. Subcellular location and composition of the wall and secreted extracellular sulphated polysaccharides/proteoglycans of the diatom *Stauroneis amphioxys* Gregory // *Protoplasma*. – 1999. – **206**. – P. 188–200.
- Myklestad S.M. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides // *Sci. Total Environ.* – 1995. – **165**(1–3). – P. 155–164.
- Myklestad S.M., Haug A. Production of carbohydrate by the marine diatom *Chaetoceros affinis*: I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* – 1972. – **9**. – P. 125–136.
- Myklestad S., Holm-Hansen O., Verum K.M., Volcani B.E. Rate of release of extracellular amino acids and carbohydrates from the marine diatom *Chaetoceros affinis* // *J. Plankt. Res.* – 1989. – **11**. – P. 763–774.
- Nagai S., Imai I., Hori Y., Manabe T. A simple and quick technique for establishing axenic cultures of the centric diatom *Coscinodiscus wailesii* Gran // *Ibid.* – 1998. – **20**(7). – P. 1417–1420.
- Nikolaou A.D., Lekkas T.D. The role of natural organic matter during formation of chlorination by-products // *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* – 2001. – **29**(2–3). – P. 63–77.
- Ordain F., Galois R., Barnard C. et al. Carbohydrate production in relation to microphytobenthic biofilm development: an integrated approach in a tidal mesocosm // *Microbiol. Ecol.* – 2003. – **45**(3) – P. 237–251.
- Perkins R.G., Underwood G.J.C., Brotas V. et al. Responses of microphytobenthos to light: primary production and carbohydrate allocation over an emrsion period // *Mar. Ecol. Progr. Ser.* – 2001. – **28**. – P. 101–112.
- Perkins R.G., Paterso D.M., Sun H. et al. Extracellular polymeric substances: quantification and use in erosion experiments // *Cont. Shelf Res.* – 2004. – **24**(15). – P. 1623–1635.
- Rainer M.W.A., Fitznar H.P. Linkages among the bioreactivity, chemical composition, and diagenetic state of marine dissolved organic matter // *Limnol. Oceanogr.* – 2001. – **46**(2). – P. 287–297.
- Santschi P.H., Balnois E., Wilkinson K. J. et al.. Fibrillar polysaccharides in marine macromolecular organic matter as imaged by atomic force microscopy and transmission electron microscopy // *Ibid.* – 1998. – **43**(5).– P. 896–908.
- Smith D.J., Underwood G.J.C. The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: the effects of growth phase and light and dark treatment // *J. Phycol.* – 2000. – **36**(2). – P. 321–333.
- Staats N., De Winder B., Stal L.J., Mur L.R. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipellic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum* // *Eur. J. Phycol.* – 1999. – **34**(2). – P. 161–169.
- Staats N., Stal L.J., De Winder B., Mur L.R. Oxygenic photosynthesis as driving process in exopolysaccharide production of benthic diatoms // *Mar. Ecol. Progr. Ser.* – 2000. – **193**. – P. 261–269.
- Underwood G.J.C., Paterson D.M. The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipellic diatoms // *Adv. Bot. Res.* – 2003. – **40**. – P. 184–240.

- Underwood G.J.C., Boulcot M., Raines C.A., Waldron K. Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms – dynamics, changes in composition and pathways of production // J. Phycol. – 2004. – **40**. – P. 293–304.
- Urbani R., Magaletti E., Sisti P., Cicero A.M. Extracellular Carbohydrates Released by the Marine Diatoms *Cylindrotheca closterium*, *Thalassiosira pseudonana* and *Skeletonema costatum*: effect of P-depletion and growth status // Sci. Total Environ. – 2005. – **353**(1–3). – P. 300–306.
- Wang Y., Chert Y., Lavin C., Gretz M. R. Extracellular matrix assembly in diatoms (*Bacillariophyceae*). IV. Ultrastructure of *Achnanthes longipes* and *Cymbella cistula* as revealed by high-pressure freezing/freeze substitution and cryo-field emission scanning electron microscopy // J. Phycol. – 2000. – **3**. – P. 367–378.
- Williams P.J.L. The importance of losses during microbial growth: commentary on the physiology, measurement and ecology of the release of dissolved organic material // Mar. Microbiol. Food Webs. – 1990. – **4**. – P. 175–206.
- Witvrouw M., De Clercq E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs // Gen. Pharm. – 1997. – **29**. – P. 497–511.
- Wustman B.A., Gretz M.R., Hoagland R.D. Extracellular matrix assembly in diatoms (*Bacillariophyceae*). I. A model of adhesives based on chemical characterization and localization of polysaccharides from the marine diatom *Achnanthes iongipes* and other diatoms // Plant Physiol. – 1997. – **113**(4). – P. 1059–1069.

Поступила 9 декабря 2013 г.
Подписал в печать А.И. Божков

ISSN 0868-8540. *Algologia*. 2015, 25(1): 3–20 <http://dx.doi.org/10.15407/alg25.01.003>

E.I. Shniukova & E.K. Zolotareva

N.G. Kholodny Institute of Botany, NAS of Ukraine,

2, Tereshchenkivska St., Kiev 01601, Ukraine

e-mail: membrana@ukr.net

DIATOM EXOPOLYSACCHARIDES. A REVIEW

Diatom exopolysaccharides (EPS) are bioactive components released into the environment. As an important component of marine phytoplankton, diatoms produce up to a quarter of the annual primary organic matter. The results of EPS studies highlighting the important role of diatom EPS in the global carbon cycle are analyzed. The main types of extracellular carbohydrates, monosaccharide composition of EPS, and dependence of their production on algal growth rate, light conditions and nutrient content in the environment are discussed.

Key words: *Bacillariophyta*, exopolysaccharides, ecological role, chemical composition, production conditions.