

3
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Оренбургская область

Букобайские яры

Валиева Ж.А.



2023

УЧРЕДИТЕЛЬ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

© Е.А. Селиванова, О.А. Тынников, 2023

УДК 582.251.6

Е.А. Селиванова, О.А. Тынников

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ШТАММА ГАЛОТОЛЕРАНТНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *ASTEROMONAS GRACILIS* ICIS8, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ГИПЕРГАЛИННОЙ РЕКИ МАЛАЯ САМОРОДА

Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН (Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН), Оренбург, Россия

Цель. Анализ морфологических, физиологических и молекулярно-генетических особенностей нового штамма *Asteromonas gracilis*, выделенного из гипергалинной реки Малая Саморода.

Материалы и методы. Культура микроводорослей *A. gracilis* была выделена в 2019 г. методом клеточного клонирования, культивировалась на минеральной среде с соленостью 100 г/л в люминостате. Морфологию изучали при помощи фазово-контрастной микроскопии, выделение ДНК из чистых культур проводили с использованием набора NucleoSpin® gDNA Clean-up, сборку последовательности гена 18S рРНК осуществляли с помощью программы MEGA11. Диапазон галотолерантности оценивали полуколичественным методом в условиях минерализации от 0 до 260 г/л. Оптимальный уровень солености оценивали по динамике роста культуры микроводоросли в градиенте концентраций от 100 до 200 г/л.

Результаты. На основании морфологических особенностей и последовательности гена 18S рРНК новый штамм микроводоросли отнесен к виду *Asteromonas gracilis* Artari 1913. Показана возможность роста культуры при солености от 51 до 260 г/л и сохранения при солености не ниже 40 г/л. Определен оптимальный уровень солености для роста – 175 г/л. Продемонстрирована морфологическая изменчивость, связанная с увеличением соотношения длины и ширины клеток при повышении солености среды.

Заключение. В статье описываются морфологические, молекулярно-генетические и физиологические особенности нового штамма галотолерантной микроводоросли *Asteromonas gracilis* ICIS8, выделенного из гипергалинной реки Малая Саморода (Приэльтонье, Волгоградская область) с соленостью 85 г/л.

Ключевые слова: *Asteromonas gracilis*, ген 18S рРНК, морфологическая изменчивость, галотолерантность, галофильные микроводоросли.

E.A. Selivanova, O.A. Tynnikov

CHARACTERISTICS OF A NEW STRAIN OF HALOTOLERANT MICROALGAE *ASTEROMONAS GRACILIS* ICIS8 ISOLATED FROM THE HYPERSALINE RIVER MALAYA SAMORODA

Orenburg Federal Research Center, UB RAS (Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, UB RAS), Orenburg, Russia

Aim. Analysis of the morphological, physiological and molecular genetic characteristics of a new strain of *Asteromonas gracilis* isolated from the hypersaline river Malaya Samoroda.

Materials and methods. The culture of the microalgae was isolated in 2019 by cell cloning and cultivated on a mineral medium with a salinity of 100 g/L in a luminostat. Morphology was studied using the phase contrast microscopy, DNA from pure cultures was extracted using the NucleoSpin® gDNA Clean-up kit, and the 18S rRNA gene sequence was assembled using

the MEGA11 program. The halotolerance range was assessed using a semi-quantitative method under salinity range from 0 to 260 g/L. The optimal salinity level was assessed by the growth dynamics of a microalgae culture in a salinity range from 100 to 200 g/L.

Results. Based on the morphological features and the 18S rRNA gene sequence, the new strain of microalgae was assigned to species *Asteromonas gracilis* Artari 1913. The culture growth was observed at salinity from 51 to 260 g/L and survival at salinity not lower than 40 g/L was shown. The optimal salinity level for growth was determined to be 175 g/L. Morphological variability, namely an increase of the cell length and width ratio was demonstrated along with the environment salinity growth.

Conclusion. The article describes the morphological, physiological and molecular genetics characteristics of a new strain of halotolerant microalga *Asteromonas gracilis* ICIS8, isolated from the hypersaline river Malaya Samoroda (Elton Lake, Volgograd region) with a salinity of 85 g/L.

Key words: *Asteromonas gracilis*, 18S rRNA gene, morphological variability, halotolerance, halophilic microalgae.

Введение

Asteromonas gracilis Artari 1913 является галотолерантным представителем класса *Chlorophyceae*, одним из трех валидных видов рода *Asteromonas* в AlgaeBase [8]. В базе данных NCBI содержится всего 12 нуклеотидных последовательностей *A. gracilis*, что свидетельствует о его слабой изученности. Данные о распространении *A. gracilis* по земному шару и сравнительной характеристике разных штаммов в российской и зарубежной литературе мало представлены [2, 11]. Микроводоросли этого вида обнаруживались в соленых водоемах как морского происхождения [4], так и аталассогалинных [1, 2], однако данные по диапазону галотолерантности и оптимальным условиям культивирования скудны [2]. В то же время в последние годы некоторые авторы рассматривают этот вид как потенциальный источник биотоплива [7, 9], поскольку содержание липидов в клетках может достигать 37% [7]. Кроме того, показано наличие у *A. gracilis* антибактериальной активности по отношению к патогенам рыб [3], что делает его перспективным для аквакультуры. Все вышеизложенное демонстрирует необходимость дальнейшего исследования новых штаммов *A. gracilis*.

Цель настоящего исследования – анализ морфологических, физиологических и молекулярно-генетических особенностей нового штамма *Asteromonas gracilis*, выделенного из гипергалинной реки Малая Саморода.

Материалы и методы

Культура микроводорослей *A. gracilis* была выделена в 2019 г. из об-

разцов воды реки Малая Саморода (Приэльтонье, Волгоградская область) с соленостью 85 г/л. Альгологически чистая культура была получена методом клеточного клонирования пипеткой Пастера с тонко оттянутым кончиком с использованием инвертированного микроскопа Eclipse Ts2 (Nikon, Япония). Культивирование осуществляли в люминостате (5000 лк, 25°C) на минеральной среде следующего состава (г/л): NaCl – 82,6; MgSO₄×7H₂O – 17; KNO₃ – 2,5; K₂HPO₄ – 0,2; NaHCO₃ – 1. Минерализацию среды определяли портативным рефрактометром Master S-28α («Atago», Япония).

Особенности морфологии микроводорослей определяли при помощи фазово-контрастной микроскопии с масляной иммерсией на микроскопе AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия), фоторегистрация осуществлялась цифровой фотокамерой AxioCam 105 color (Carl Zeiss, Германия) с программным обеспечением ZEN.

Выделение ДНК из чистых культур проводили с использованием набора NucleoSpin® gDNA Clean-up (Macherey-Nagel, Germany). Секвенирование гена 18S рРНК проводили в компании Евроген с помощью двух пар праймеров:

внешних EukA 5'- GGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTA-3' и

FAD4 5'- GTTTCAGCCTTGCGACCATACT-3';

и внутренних 18SintF 5'- GGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTA -3',

и 18SintR 5'- GTTTCAGCCTTGCGACCATACT -3'.

Сборка последовательности гена 18S рРНК осуществлялась с помощью программы MEGA11. Поиск гомологичных последовательностей проводился с использованием базы данных NCBI GeneBank при помощи алгоритма BLAST.

Диапазон галотолерантности оценивали полуколичественным методом, регистрируя при микроскопии гибель, сохранение или наличие роста микроводоросли в условиях различной минерализации от 0 до 260 г/л при культивировании в 24-луночных планшетах (NEST, Китай) при 25°C в условиях люминостата.

Оптимальный уровень солености оценивали по динамике роста культуры микроводоросли в градиенте концентраций от 100 до 200 г/л. Культуры инкубировали в плоскодонных колбах объема 250 мл при постоянной инсоляции при 25°C. Подсчет численности водоросли проводили в камере Нажотта объемом 0.01 мм³ под световым микроскопом марки NIKON (Japan).

Результаты и обсуждение

Выделенный из гипергалинной реки Малая Саморода новый штамм *A. gracilis* депонирован в Сетевую коллекцию симбионтных микроорганиз-

мов ИКВС УрО РАН под номером ICIS8 (URL: <https://ikvs.info/biobank>).

Морфологическая характеристика микроводоросли

Морфология клеток нового штамма согласуется с описанием вида [4, 11] и штамма *Asteromonas gracilis*, выделенного из озера Тузлучное [2]. Благодаря отсутствию ригидной клеточной стенки внешний вид клеток изменчив, но чаще всего клетки веретеновидной формы с шестью выступающими вдоль клетки гребнями (рис. 1А), за счет наличия которых в поперечном сечении имеют вид шестиконечной звезды (рис. 1Б). Хлоропласт единичный, чашевидный и пристеночный, хорошо заметная овальная стигма (рис. 1А). Длина клеток исследуемого штамма варьировала от 9,6 до 23,9 мкм, в среднем – $18,0 \pm 0,4$ мкм, а ширина от 7,1 до 19,2 мкм, в среднем – $12,6 \pm 0,4$ мкм. Длина двух апикальных изоконтных жгутиков в среднем составляла $21,2 \pm 1,2$ мкм. Наряду с вегетативными клетками в культуре присутствуют цисты округлой формы, покрытые толстой оболочкой, диаметром от 7,1–10,5 мкм, в среднем – $12,3 \pm 0,3$ мкм (рис. 1В).

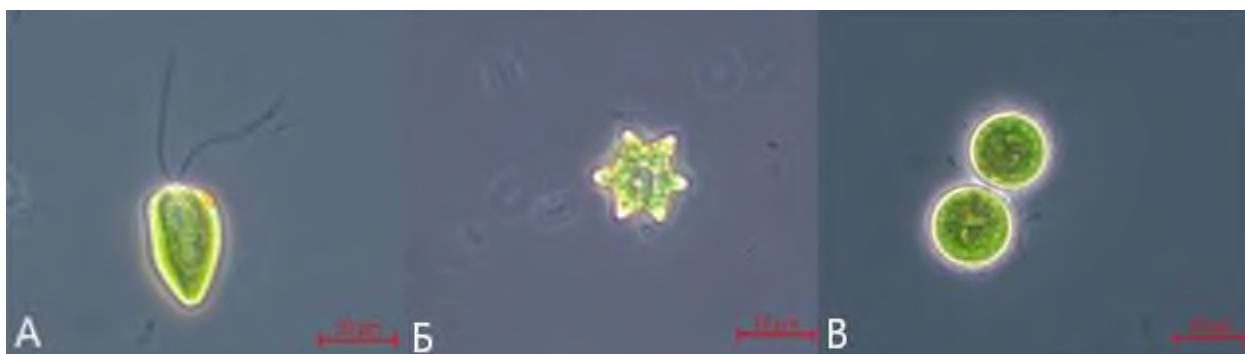


Рис. 1. Морфология клеток *Asteromonas gracilis*, штамм ICIS8: А, Б – вегетативные клетки, В – цисты, световая иммерсионная микроскопия, фазовый контраст 1000×.

Молекулярно-генетический анализ последовательности гена 18S рРНК

В результате секвенирования по Сэнгеру были получены нуклеотидные последовательности длиной около 800 п.н., которые были собраны в последовательность гена 18S рРНК (1704 п.н.). Сравнение ее с тремя имеющимися гомологичными последовательностями в международной базе данных GenBank NCBI продемонстрировало высокий процент сходства (до 100% при покрытии 99,9%) (таблица). Нуклеотидная последовательность гена 18S рРНК штамма *A. gracilis* ICIS8 депонирована в базе данных GenBank под номером OR842209.

Таблица. Сравнение полученных последовательностей с данными базы NCBI

| Ближайший гомолог (номер в GeneBank) | Покрытие | Сходство | Место выделения | Ссылка |
|--|----------|----------|--------------------|--------|
| <i>Asteromonas gracilis</i> (M95614.1) | 100% | 99.6% | Флорида | [13] |
| <i>Asteromonas gracilis</i> CCMP 813 (DQ009744.1) | 99% | 100% | Оклахома | - |
| <i>Asteromonas gracilis</i> CCMP 140 (DQ009743.1) | 99% | 99.94% | Оклахома | - |

Ростовые и физиологические характеристики

Вегетативные клетки *A. gracilis*, штамм ICIS8 сохраняли жизнеспособность в диапазоне солености от 40 до 260 г/л (рис. 2). Размножение клеток регистрировали в диапазоне от 51 до 260 г/л.

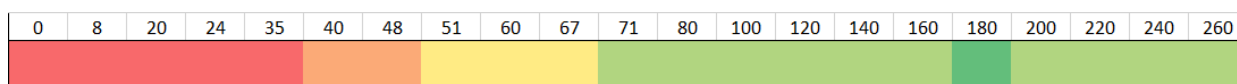


Рис. 2. Диапазон галотолерантности штамма ICIS8 *A. gracilis*, выделенного из реки Малая Саморода (цифрами указана соленость в г/л).

Обозначения: красным обозначена гибель культуры; оранжевым - сохранение вегетативных клеток; желтым - слабый рост; светло-зеленым – рост; темно-зеленым - активный рост.

Длительное наблюдение за культивированием исследуемого штамма ICIS8 *A. gracilis* в средах с различной соленостью позволило изучить динамику его роста (рис. 3). Независимо от солености, культура находилась в лаг-фазе с первого по третий день. Фаза логарифмического роста начиналась с третьего дня и продолжалась до 23-26 дня. На 17-й день наблюдалась значительная разница в численности клеток при разных соленостях: численность при 175 г/л была в четыре раза выше, чем при 100 г/л. Также при 100 г/л наблюдался более ранний переход на стационарную фазу роста (23 сутки), по сравнению с более высокими соленостями (26 сутки). Таким образом, оптимальная соленость для роста штамма *A. gracilis* ICIS8 равнялась 175 ‰.

При проведении эксперимента было замечено, что уровень минерализации среды влияет на форму *A. gracilis* ICIS8. Морфометрический анализ продемонстрировал прямую корреляцию ($K = 0,97$) между длиной клеток и уровнем солености среды. Несмотря на значительные колебания ширины клеток и отсутствие достоверной зависимости размера клеток от солености среды, выявлена прямая корреляция между соотношением длины, ширины

клетки и соленостью среды ($K = 0,98$) (рис. 4).

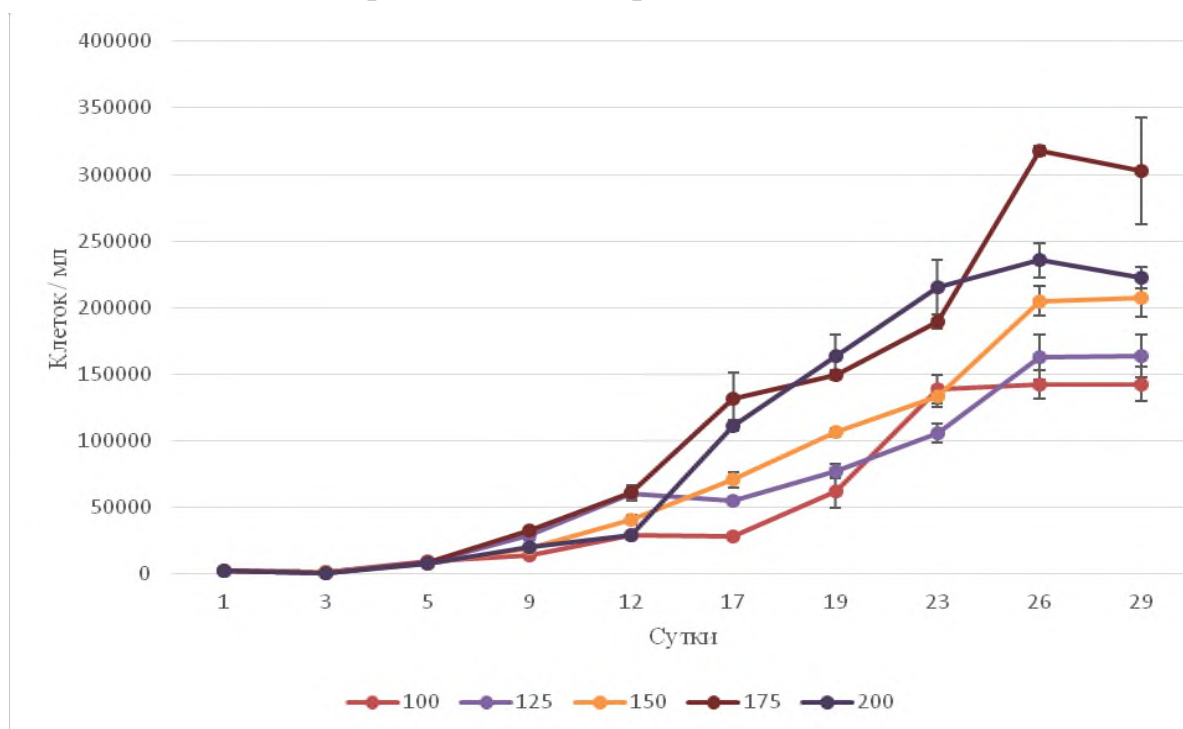


Рис. 3. Динамика численности клеток *A. gracilis* ICIS8 в зависимости от солености среды (‰).

Благодаря вытягиванию клеток при повышении солености они приобретают свою характерную веретеновидную форму, что отмечали ранее и у других представителей этого вида.

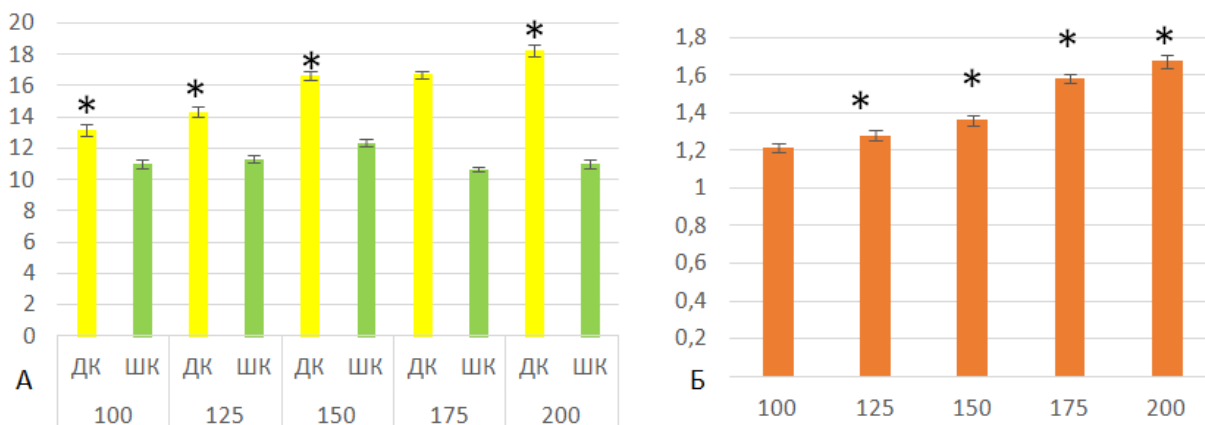


Рис. 4. Влияние минерализации среды на размер *A. gracilis* ICIS8 (мкм).
 Обозначения: Влияние изменения солености среды (г/л) на средние показатели длины (ДК) и ширины (ШК) клеток (А) и на соотношение длины и ширины клеток (Б).

Заключение

Из гипергалинной реки Малая Саморода (Приэльтонье, Волгоградская область) выделен новый штамм *A. gracilis* ICIS8. Видовая принадлежность

установлена на основании морфологических характеристик и нуклеотидной последовательности гена 18S рРНК. Исследуемый штамм имел более крупные размеры по сравнению с описанным ранее штаммом из озера Тузлучное (Соль-Илецк, Оренбургская область), средние размеры которого составляли 15.26 ± 0.29 мкм \times 11.12 ± 0.25 мкм [2].

Для нового штамма *A. gracilis* ICIS8 оптимальным уровнем солености является 175 г/л, что значительно выше оптимальных значений солености, определенных ранее для штамма *A. gracilis* из озера Тузлучное [2]. В литературных источниках говорится о галотолерантности вида *A. gracilis* [6, 9, 10], но штамм *A. gracilis* ICIS8 не развивался при значениях солености ниже 51 г/л, что позволяет считать его галофильным.

Выявлена прямая корреляция между повышением солености среды и соотношением длины и ширины клеток, за счет увеличения длины. Полученные морфометрические данные согласуются с имеющимися в литературе сведениями о «большой веретеновидности» клеток *A. gracilis* при повышении солености в результате адаптации к условиям среды [2, 6, 11].

Таким образом, полученные данные расширяют представления о распространении, особенностях экологии и морфологической изменчивости вида *A. gracilis*.

(Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-10062, <https://rscf.ru/project/23-24-10062/>)

Благодарности:

Авторы выражают благодарность к.м.н., доц. А.О. Плотникову, В.Я. Катаеву и А.С. Балкину (Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН) за предоставленные для работы пробы воды.

Исследование выполнено на базе ЦКП «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Макеева Е.Г. Распространение зеленых водорослей в некоторых соленых озерах Республики Хакасия. Вопросы современной альгологии. 2021. №2. С. 92-101.
2. Немцева Н.В., Игнатенко М.Е. О находке галотолерантной водоросли *Asteromonas gracilis* Artari в Оренбургской области. Поволжский экологический журнал. 2012. № 1. С. 99-104.
3. Androutsopoulou C., Makridis P. Antibacterial Activity against Four Fish Pathogenic Bacteria of Twelve Microalgae Species Isolated from Lagoons in Western Greece. Microorganisms. 2023. № 11. P. 1-20.
4. Artari A. Zur physiologie der Chlamydomonaden. Versuche und Beobachtungen an Chlamydomonas Ehrenbergii Gorosch. und verwandten Formen. Jahrbücher auf für Wissenschaftliche Botanik. 1913. Bd. 52. S. 410–416.
5. Fawzy M.A., Hifney A., Issa A.A., Mahmoud S.A. *Asteromonas gracilis* (Prasionphyceae)

- as a model for production of β -carotene and total lipids. Journal for advanced research in applied science. 2014. № 1. P. 51-62.
6. Ben-Amotz A., Grunwald T. Osmoregulation in the halotolerant alga *Asteromonas gracilis*. Plant Physiol. 1981. Vol. 67, № 4. P. 613-616.
 7. Fawzy M.A. Fatty acid characterization and biodiesel production by the marine microalga *Asteromonas gracilis*: statistical optimization of medium for biomass and lipid enhancement. Marine Biotechnology. 2017. № 19. P. 219-231.
 8. Guiry M.D., Guiry G.M., Morison L., Rindi F. AlgaeBase: An On-line Resource for Algae. National University of Ireland, Galway. 2012. № 35. P. 105-115.
 9. Hotos G.N.A. Short Review on the Halotolerant Green Microalga *Asteromonas gracilis* Artari with Emphasis on Its Uses. Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research. 2019. № 4. P. 1-8.
 10. Hotos G.N.A. The halotolerant green alga *Asteromonas gracilis*, an ideal tool for research, education and mass culture. A preliminary report. Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research. 2016. № 1. P. 1-4.
 11. Peterfi L.S., Manton I. Observations with the electron microscope on *Asteromonas gracilis* Artari emend. (*Stephanoptera gracilis* (Artari) wisl.), with some comparative observations on *Dunaliella* sp. British Phycological Bulletin. 1968. № 3 P. 423-440.
 12. Wilcox L.W., Fuerst P.A., Floyd G.L. Phylogenetic relationships of four charophycean green algae inferred from complete nuclear-encoded small subunit rRNA gene sequences. American journal of botany. 1993. № 80. P. 1028-1033.

Поступила 22 сентября 2023 г.

(Контактная информация: Селиванова Елена Александровна – кандидат медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник ЦКП «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000 г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел.: 8 (3532) 775417; E-mail: selivanova-81@mail.ru)

REFERENCES

1. Makeeva E.G. Distribution of green algae in some saline lakes of the Republic of Khakassia. Issues of modern algology. 2021. №2. P. 92-101.
2. Nemtseva N.V., Ignatenko M.E. On the discovery of the halotolerant algae *Asteromonas gracilis* Artari in the Orenburg region. Volga Ecological Journal. 2012. № 1. P. 99-104.
3. Androutsopoulou C., Makridis P. Antibacterial Activity against Four Fish Pathogenic Bacteria of Twelve Microalgae Species Isolated from Lagoons in Western Greece. Microorganisms. 2023. № 11. P. 1-20.
4. Artari A. Zur physiologie der Chlamydomonaden. Versuche und Beobachtungen an Chlamydomonas Ehrenbergii Gorosch. und verwandten Formen. Jahrbücher auf für Wissenschaftliche Botanik. 1913. Bd. 52. S. 410-416.
5. Fawzy M.A., Hifney A., Issa A.A., Mahmoud S.A. *Asteromonas gracilis* (Prasionphyceae) as a model for production of β -carotene and total lipids. Journal for advanced research in applied science. 2014. № 1. P. 51-62.
6. Ben-Amotz A., Grunwald T. Osmoregulation in the halotolerant alga *Asteromonas gracilis*. Plant Physiol. 1981. Vol. 67, № 4. P. 613-616.
7. Fawzy M.A. Fatty acid characterization and biodiesel production by the marine microalga *Asteromonas gracilis*: statistical optimization of medium for biomass and lipid enhancement. Marine Biotechnology. 2017. № 19. P. 219-231.
8. Guiry M.D., Guiry G.M., Morison L., Rindi F. AlgaeBase: An On-line Resource for Algae. National University of Ireland, Galway. 2012. № 35. P. 105-115.
9. Hotos G.N.A. Short Review on the Halotolerant Green Microalga *Asteromonas gracilis* Ar-

- tari with Emphasis on Its Uses. Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research. 2019. № 4. P. 1-8.
10. Hotos G.N.A. The halotolerant green alga *Asteromonas gracilis*, an ideal tool for research, education and mass culture. A preliminary report. Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research. 2016. № 1. P. 1-4.
 11. Peterfi L.S., Manton I. Observations with the electron microscope on *Asteromonas gracilis* Artari emend. (*Stephanoptera gracilis* (Artari) wisl.), with some comparative observations on *Dunaliella* sp. British Phycological Bulletin. 1968. № 3 P. 423-440.
 12. Wilcox L.W., Fuerst P.A., Floyd G.L. Phylogenetic relationships of four charophycean green algae inferred from complete nuclear-encoded small subunit rRNA gene sequences. American journal of botany. 1993. № 80. P. 1028-1033.

Образец ссылки на статью:

Селиванова Е.А., Тынников О.А. Характеристика нового штамма галотолерантной микроводоросли *Asteromonas gracilis* ICIS8, выделенного из гипергалинной реки Малая Саморода. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2023. 3: 9 с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2023-3/Articles/EAS-2023-3.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2023-13009