

DOI 10.18699/vjgb-24-79

## Молекулярно-генетическая и морфологическая характеристика *Micractinium thermotolerans* и *M. inermum* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) из пирокластических отложений полуострова Камчатка (Россия)

Р.З. Сущенко  , В.Ю. Никулин , В.Б. Багмет , А.Ю. Никулин 

Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

 allaguvatova@yandex.ru

**Аннотация.** В ходе исследования разнообразия водорослей пирокластических отложений вулканов Шивелуч и Горелый (полуостров Камчатка) были выделены *Chlorella*-подобные штаммы зеленых водорослей VCA-72 и VCA-93 из проб, отобранных вдоль русла р. Байдарная на вулкане Шивелуч и на выходе термальных паров по краю кальдеры на южном склоне вулкана Горелый в 2018 и 2020 гг. соответственно. Идентификация штаммов выполнялась в рамках комплексного подхода микроскопическими и молекулярно-генетическими методами, включающими предварительную идентификацию, получение нуклеотидных последовательностей малой субъединицы и внутреннего транскрибируемого спейсера рРНК, построение филогенетических деревьев и вторичных структур участков ITS1 и ITS2 рРНК. На филогенетическом древе штамм VCA-93 кластеризовался в видовой кладе *Micractinium thermotolerans*. При сравнении моделей спиральных доменов ITS1 и ITS2 у *M. thermotolerans* различий не выявлено. Штамм VCA-72 занимал базальное положение в кладе *M. inermum*. Модели вторичной структуры спиралей штамма VCA-72 в целом были сходны с моделями для *M. inermum*, однако отмечена внутривидовая вариативность, обусловленная в основном заменами в верхушечных и боковых петлях. В спиральных участках исследуемых штаммов *M. inermum* обнаружено пять замен hCBC, тогда как замен CBC обнаружено не было. Детальный анализ морфологии и жизненного цикла позволил выявить в стареющих культурах клетки, которые по размеру значительно превышают вегетативные и имеют грушевидную, овальную и эллипсоидную формы с неглубоким широким сужением в центре. Также в стареющих культурах обоих видов были выявлены клетки с бесцветными липидными каплями. Способность синтезировать и накапливать липиды говорит о большом потенциале штаммов для производства биодизельного топлива. Обзор местобитаний предыдущих и новых находок позволяет сделать вывод об экологической пластичности исследуемых видов. Полученные результаты дополняют сведения о биогеографии видов: *M. inermum* обнаружен впервые на территории России, а *M. thermotolerans* – на полуострове Камчатка.

**Ключевые слова:** микроводоросли; флористические находки; комплексный подход; морфология; филогения; вторичная структура ITS рРНК.

**Для цитирования:** Сущенко Р.З., Никулин В.Ю., Багмет В.Б., Никулин А.Ю. Молекулярно-генетическая и морфологическая характеристика *Micractinium thermotolerans* и *M. inermum* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) из пирокластических отложений полуострова Камчатка (Россия). *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(7):706-715. DOI 10.18699/vjgb-24-79


**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 124012400285-7).

**Благодарности.** Авторы выражают признательность коллегам из ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, Владивосток: С.Ю. Гришину – за предоставленные пробы с вулкана Шивелуч, А.А. Гончарову – за ценные замечания при подготовке рукописи.

## Molecular genetic and morphological characteristics of *Micractinium thermotolerans* and *M. inermum* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) from pyroclastic deposits of the Kamchatka Peninsula (Russia)

R.Z. Sushchenko  , V.Yu. Nikulin , V.B. Bagmet , A.Yu. Nikulin 

Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

 allaguvatova@yandex.ru

**Abstract.** During the study of algal diversity in pyroclastic deposits of the Kamchatka Peninsula, *Chlorella*-like green algae strains VCA-72 and VCA-93 were isolated from samples collected from along the Baydarnaya river bed on the Shiveluch volcano in 2018 and at the outlet of thermal vapors along the edge of the caldera on the southern slope of the Gorely volcano in 2020. Identification of the strains was carried out within the framework of an integrative approach using microscopic and molecular genetic methods, including preliminary taxon identification, obtaining nucleotide sequences of the small subunit and the internal transcribed spacer rRNA, reconstruction of phylogenetic trees and secondary structures of the ITS1 and ITS2 rRNA regions. On the phylogenetic tree, strain VCA-93 was clustered in the *Micractinium thermotolerans* species clade. No differences were found when comparing the helical domain models of ITS1 and ITS2 in *M. thermotolerans*. Strain VCA-72 occupied a basal position in the *M. inermum* clade. The secondary structure patterns of the helices of strain VCA-72 were generally similar to those of *M. inermum*, but intraspecific variability was noted, mainly due to substitutions in the apical and lateral loops. Five hCBC substitutions were found in the helical regions of the studied *M. inermum* strains, while no CBC substitutions were found. A detailed analysis of morphology and life cycle allowed us to identify the characteristics of the cells in aging cultures: their size was significantly higher than in vegetative ones and they were pear-shaped, oval, and ellipsoidal with a shallow, wide constriction in the center. In addition, cells with colorless lipid droplets were detected in aging cultures of both species. The ability to synthesize and accumulate lipids indicates the great potential of the strains for the production of biodiesel fuel. A review of the habitats of previous and new findings allowed us to note the ecological plasticity of the studied species. The results obtained complement the information on the biogeography of the species: this is the first record of *M. inermum* for the territory of Russia, and that of *M. thermotolerans*, for the Kamchatka Peninsula.

**Key words:** microalgae; floristic findings; integrative approach; morphology; phylogeny; secondary structure of ITS rRNA.

**For citation:** Sushchenko R.Z., Nikulin V.Yu., Bagmet V.B., Nikulin A.Yu. Molecular genetic and morphological characteristics of *Micractinium thermotolerans* and *M. inermum* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) from pyroclastic deposits of the Kamchatka Peninsula (Russia). *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(7): 706-715. DOI 10.18699/vjgb-24-79

## Введение

Род *Micractinium* Fresenius (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) включает в себя *Chlorella*-подобные зеленые водоросли, среди которых встречаются симбиотические (*M. conductrix* (Brandt) Pröschold et Darienko, *M. tetrahymenae* Pröschold, Pitsch et Darienko) и свободноживущие организмы. В настоящее время в составе рода насчитывается 24 вида (Guiry M.D., Guiry G.M., 2024). Типовым видом является *M. pusillum* Fresenius, характеризующийся коккоидной организацией и образующий колонии из 2–4 клеток и щетинок (Fresenius, 1858). Предполагалось, что способность образовывать колонии и наличие щетинок – отличительные признаки вида (Komárek, Fott, 1983), однако было показано, что эти свойства проявлялись как защитный механизм только в ответ на совместное культивирование с коловраткой *Brachionus calyciflorus* Pallas, в отсутствие же альгофагов признаки не возникали (Luo et al., 2005, 2006). Кроме того, присутствие зоопланктона не всегда приводило к образованию щетинок и колоний у представителей *Micractinium* (Pröschold et al., 2011). Например, *M. conductrix*, *M. inermum* Hoshina et Fujiwara и другие виды рода не имеют щетинок и морфологически напоминают водоросли рода *Chlorella* (Pröschold et al., 2011; Hoshina, Fujiwara, 2013; Hong et al., 2015).

Гомопластичные признаки, приводящие к сходству между родами *Chlorella* и *Micractinium*, вызывают трудности при идентификации таксонов с использованием только морфологических данных. Применение комплексного подхода, объединяющего традиционные методы микроскопии и молекулярно-филогенетический анализ, позволяет различить не только таксоны, бедные на диагностические признаки, но и криптические виды (Komárek et al., 2014; Darienko, Pröschold, 2019).

Представители рода *Micractinium* являются известными объектами биотехнологических исследований. Ф. Кинтас-Нуньес с соавторами (Quintas-Nunes et al., 2023) по-

казали ростостимулирующее влияние экссудатов *Micractinium* sp. NFX-FRZ на растения томата, которое могло быть обусловлено фитогормонами, синтезированными водорослями. Выявлена способность *M. inermum* F014 очищать радиоактивные сточные воды (Kim et al., 2019). Л. Буараб с коллегами (Ououarab et al., 2004) обнаружили, что *M. pusillum* способен расти в миксотрофных условиях; это может обеспечить возможность для промышленного культивирования микроводорослей с достижением высокой плотности культуры. В ряде публикаций подтверждена пригодность *Micractinium* sp. для производства биотоплива (Abou-Shanab et al., 2014; Onay et al., 2014).

В ходе изучения разнообразия водорослей пирокластических отложений вулканов Шивелуч и Горелый (полуостров Камчатка) выделены *Chlorella*-подобные клональные культуры зеленых водорослей, которые были предварительно определены как виды рода *Micractinium*. Целью работы была видовая идентификация представителей рода *Micractinium* с помощью комплексного подхода.

## Материалы и методы

**Отбор проб, выделение штаммов, культивирование.** Материалом для работы послужили *Chlorella*-подобные клональные культуры зеленых водорослей VCA-72 и VCA-93. Штамм VCA-72 был выделен из пробы пирокластических отложений, отобранной вдоль русла р. Байдарная на вулкане Шивелуч (56°33.98' N, 161°8.41' E) в 2018 г. Штамм VCA-93 выявлен из пробы, отобранной на выходе термальных паров по краю кальдеры на южном склоне вулкана Горелый (52°33.306' N, 158°01.742' E), где температура отложений составляла ~32 °C, в 2020 г. (рис. 1). На вулкане Горелый биотоп характеризовался отсутствием растительности, а при отборе проб наблюдалось таяние близлежащих снежников и испарение влаги. Отбор проб проводился с использованием классических микробиологических методов (Голлербах, Штина, 1969).



Рис. 1. Карта региона исследования и места отбора проб: 1 – вулкан Шивелуч, 2 – вулкан Горелый.

Для получения накопительных культур на чашки Петри со стерильной жидкой модифицированной средой Waris-H (McFadden, Melkonian, 1986; Andersen, 2005) (Приложение 1)<sup>1</sup> и жидкой модифицированной средой Болда с утроенным содержанием азота и добавлением витаминов (Starr, Zeikus, 1993; Schlösser, 1997; Andersen, 2005) (см. Приложение 1) помещали почвенную пробу массой не более 1 г и осуществляли культивирование. Накопительные культуры регулярно проверяли на рост водорослей с использованием инвертированного микроскопа Olympus СК30 (Olympus, Япония) с максимальным увеличением  $\times 400$ .

Чистые культуры выделяли микропипеточным способом (Andersen, 2005) и культивировали в модифицированной жидкой среде Waris-H. Культуры водорослей хранили при освещенности 117–120 люкс, температуре 24.9 °C, влажности 16 % и при чередовании световой и темновой фаз 16:8 ч.

**Световая микроскопия, изучение морфологии.** Морфологию водорослей исследовали с использованием микроскопа Olympus BX 53 (Olympus, Япония), с реализацией дифференциально-интерференционного контраста. Микрофотографии выполняли при помощи фотокамеры Olympus DP 27 (Olympus) при увеличении  $\times 1000$ . Для выявления границ варьирования морфологических признаков для каждого штамма были проанализированы параметры 50 вегетативных клеток.

<sup>1</sup> Приложения 1 и 2 см. по адресу:  
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx24.pdf>

**Молекулярно-генетический анализ.** Идентификация штаммов выполнялась молекулярно-генетическими методами, включающими получение нуклеотидных последовательностей малой субъединицы и внутреннего транскрибируемого спейсера рРНК (18S+ITS рРНК; согласно протоколу (Nikulin et al., 2023)), построение филогенетических деревьев и вторичных структур участков ITS1 и ITS2 рРНК.

Для выделения ДНК клеточную биомассу отбирали во время экспоненциальной фазы роста и концентрировали центрифугированием. Общую геномную ДНК выделяли согласно методу Ц.С. Эхта с соавторами (Echt et al., 1992), с некоторыми модификациями (Abdullin et al., 2021). Амплификацию проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) с набором Encyclo Plus («Евроген», Россия), праймерами 82F (5'-GA AACTGCGAATGGCTC-3') (López-García et al., 2003) и ITS4R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). Параметры ПЦР: начальная денатурация при 96 °C в течение 3 мин, затем 30 циклов, включающих денатурацию при 96 °C – 1 мин, отжиг при 55 °C – 2 мин, элонгацию при 68 °C – 3 мин. Далее следовала финальная элонгация при 68 °C – 7 мин (Mikhailyuk et al., 2018).

Секвенирование производилось с помощью оборудования ЦКП «Биотехнология и генетическая инженерия» ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, генетического анализатора ABI 3500 (Applied Biosystems, США). Продукты ПЦР секвенировали в обоих направлениях с набором для секвенирования BigDye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems) и теми же праймерами, которые использовались для ПЦР. Дополнительно применяли праймеры SSU528F-800 (5'-CGGTAATTCCAGCTCC-3') (Hoef-Emden, Melkonian, 2003), 920F (5'-GAAACTTAAAKGAATTG-3') (Marin et al., 1998), n1400R (5'-GGTAGGAGCGACGGGCGGTGTGTAC-3') (Marin et al., 2003) и Bd18SF1 (5'-TTTGTACA CACCGCCCGTTCGC-3') (Goka et al., 2009). Последовательности собирали в пакете программ Staden v.1.4 (Bonfield et al., 1995) и сравнивали с другими штаммами, доступными в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI, США), с помощью поиска BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Выбор репрезентативных последовательностей для филогенетического анализа осуществлялся на основании набора данных зеленых водорослей рода *Micractinium* (Krivina et al., 2023), который включал 48 последовательностей 18S+ITS рРНК (2418 выровненных позиций). В качестве внешней группы в набор данных добавлена последовательность таксона *Chlorella vulgaris* Beijerinck, представляющая филогенетически отдаленную линию. Последовательности выравнивались в программе SeaView (Galtier et al., 1996) с коррекцией выравнивания вручную. Наиболее подходящая модель нуклеотидных замен для нашего набора данных определялась на основе информационного критерия Акаике (AIC) (Akaike, 1974) в программе jModelTest 2.1.1 (Darriba et al., 2012).

Построение филогенетических деревьев осуществлялось методом максимального правдоподобия (ML) и байесовским подходом (BI). Анализ методом ML проводился с использованием сервера RAxML v. 7.7.1 (<http://embnet>).

vital-it.ch/raxml-bb/) (Kozlov et al., 2019), BI – программы MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck, Ronquist, 2001). При BI анализе создавали 5 млн генераций цепей Маркова, отбирая пробы каждые 100 генераций, т.е. 50000 проб. Первые 25 % проб (до выхода значений  $-\ln L$  на плато) исключались из анализа как “burn-in”. Конвергенция Марковских цепей Монте-Карло (МСМС) к стационарному распределению была оценена визуально с помощью программы Tracer 1.7.1 (Rambaut et al., 2018) по диаграмме апостериорных вероятностей. Все значения ESS были больше 200. Устойчивость узлов филогенетических деревьев, полученных методом ML, рассчитана с помощью сервера RAxML методом бутстрэпа (bootstrap percentage, BP) (Stamatakis et al., 2008) и определением апостериорных вероятностей (posterior probabilities, PP) в BI. Значения BP менее 50 % и PP менее 0.95 не рассматривались. Филогенетические деревья визуализировали с помощью программы FigTree v. 1.4.4 (Rambaut, 2018).

Для подтверждения идентификации штаммов сравнивались вторичные структуры участков ITS1 и ITS2 рРНК между филогенетически родственными (близкими) последовательностями. Построение вторичных структур осуществляли на основе моделей, разработанных для представителей рода *Micractinium* (Chae et al., 2019; Krivina et al., 2023), с помощью веб-сервера UNAFold (<http://www.unafold.org/mfold/applications/rna-folding-form.php>) (Zuker, 2003) и визуализировали в программе VARNA (Darty et al., 2009). Далее производили поиск компенсаторных и полукompенсаторных замен оснований (CBC, hCBC) (Caisová et al., 2013) и других молекулярных признаков, отличающих штаммы.

## Результаты и обсуждение

### Молекулярно-генетический анализ

Последовательности участка, включающего 18S–ITS1–5.8S–ITS2 рРНК штаммов VCA-93 и VCA-72, депонированы в базу данных GenBank под номерами доступа PP501334 и PP501335 соответственно. BLAST-поиск позволил установить их высокое сходство с последовательностями *Micractinium* sp. (*M. thermotolerans*) (Krivina et al., 2023) ACSSI 332 MT784118 (99.91 %) и *M. inermum* NLP-F014 KF597304 (99.29 %).

На филогенетическом древе штамм VCA-93 кластеризовался в установленной только топологически видовой кладе *M. thermotolerans* со штаммами ACSSI 332 (голотип) и IC-76 (рис. 2). Все три штамма обнаружены на территории РФ: п-ов Камчатка, Чукотский полуостров (Krivina et al., 2023) и Западно-Сибирская равнина (Piligaev et al., 2018) соответственно. Родственной им является кллада с умеренной статистической поддержкой (73/0.98, BP/PP), включающая штаммы *Micractinium* sp. из Африки – TvV (выделенный из горячих источников Тивериады), SH (из карстовой воронки рядом с Эйн-Геди), CCAP 211/92 (почвенная проба с Сейшельских островов).

Как отмечалось ранее, в отличие от «африканских» штаммов, для всех представителей *M. thermotolerans* характерно отсутствие интрона во второй четверти гена 18S (Krivina et al., 2023). Это справедливо и для штамма

VCA-93. Сестринским видом оказался *M. tetrahymenae* SAG 2587.

Штамм VCA-72 занимал базальное положение в умеренно поддержанной кладе *M. inermum* (81/0.98) (см. рис. 2). В сестринском положении к нему находилась кллада (89/0.99), составленная из близкородственных штаммов, обнаруженных в Северной Америке, Европе и Азии: HS26 (пустыня Сонора в Аризоне, США) (Ganuza et al., 2016), NLP-F014 (р. Накдонг, Южная Корея) (Park et al., 2015), KM114868 (Уэстон-Парк-Понд, Великобритания) (Smith et al., 2015) и NIES-2171 (Ботанический сад Сендай, Япония) (Hoshina, Fujiwara, 2013). Таким образом, географическая структурированность в кладе *M. inermum* отсутствовала. Наиболее близкими к кладе *M. inermum* оказались видоые клады *M. lacustre*, *M. variabile*, *M. simplicissimum* и один образец *M. singularis*.

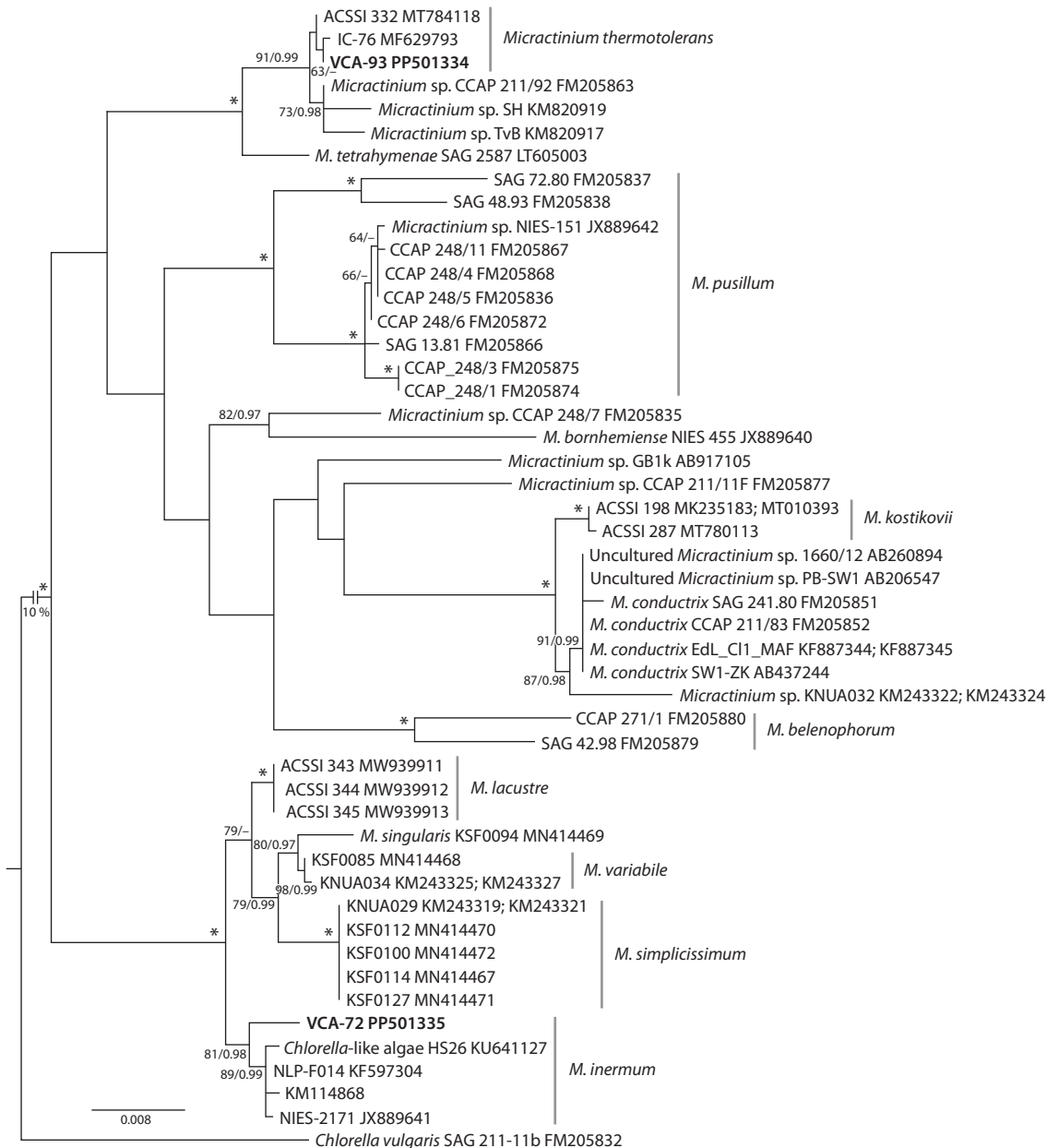
### Вторичные структуры ITS1 и ITS2 рРНК

Вторичные структуры участков ITS1 и ITS2 изученных штаммов соответствовали общепринятым моделям, разработанным для эукариотических организмов, в частности зеленых водорослей (Coleman, 2000, 2015). Модели спиральных доменов ITS1 и ITS2 штамма VCA-93 и штаммов *M. thermotolerans* ACSSI 332 и IC-76 (Приложение 2) характеризовались отсутствием замен между собой.

Представленные модели вторичной структуры спиралей штамма VCA-72 в целом были сходны с моделями для *M. inermum* (рис. 3).

Спираль I в ITS1 и спирали I, II в ITS2 были мономорфны, однако во всех других спиралях ITS у сравниваемых штаммов *M. inermum* отмечена внутривидовая вариабельность. Несмотря на это, консервативность структуры обусловлена преимущественной локализацией замен в верхушечных либо боковых петлях и наличием hCBC, сохраняющих парность оснований. По числу нуклеотидных отличий участки ITS1 ожидаемо оказались менее консервативными по сравнению с ITS2 (десять отличий против четырех). Большинство замен нуклеотидов в обоих спейсерах (десять замен) отличали наш штамм от остальных четырех, однако встречались замены и делеции (четыре), характеризующие конкретные штаммы (см. рис. 3). В спиралях обнаружено пять замен hCBC (три hCBC в ITS1: U→C в поз. 12 и 34 спирали III, A→G в поз. 17 спирали IV; две hCBC в ITS2: C→U в поз. 29 спирали III, U→C в поз. 26 спирали IV), в то время как замен CBC обнаружено не было. Топология основания спирали IV ITS2 штамма KM114868 отличалась от остальных (см. рис. 3).

Согласно CBC-концепции вида (Wolf et al., 2013), отсутствие CBC в ITS2 свидетельствует о принадлежности сравниваемых штаммов к одному виду. Таким образом, на основании результатов филогенетического анализа и моделирования вторичных структур нами достоверно идентифицированы исследуемые штаммы: VCA-93 принадлежит виду *M. thermotolerans* Krivina, Sinetova, Savchenko, Degtyarev, Tebina et Temraleeva, а VCA-72 – к *M. inermum*. Исследованный генотип последнего, ввиду наличия уникальных нуклеотидных замен, позволил добавить новые данные в пул молекулярного разнообразия участка ITS рРНК вида *M. inermum*.



**Рис. 2.** ML-дерево, иллюстрирующее филогенетическое положение штаммов VCA-93 и VCA-72 (выделены жирным шрифтом) среди представителей рода *Micractinium* на основании сравнения последовательностей 18S+ITS рПНК (2418 выровненных позиций; GTR+I+G модель).

Указаны поддержки узлов в анализах ML/BI (BP  $\geq 50\%$  и PP  $\geq 0.95$ ). Узлы с максимальной поддержкой (100/1.00) обозначены звездочками. Ветвь, относящаяся к внешней группе, укорочена (показано только 10% длины). Масштабная линейка – число нуклеотидных замен на позицию.

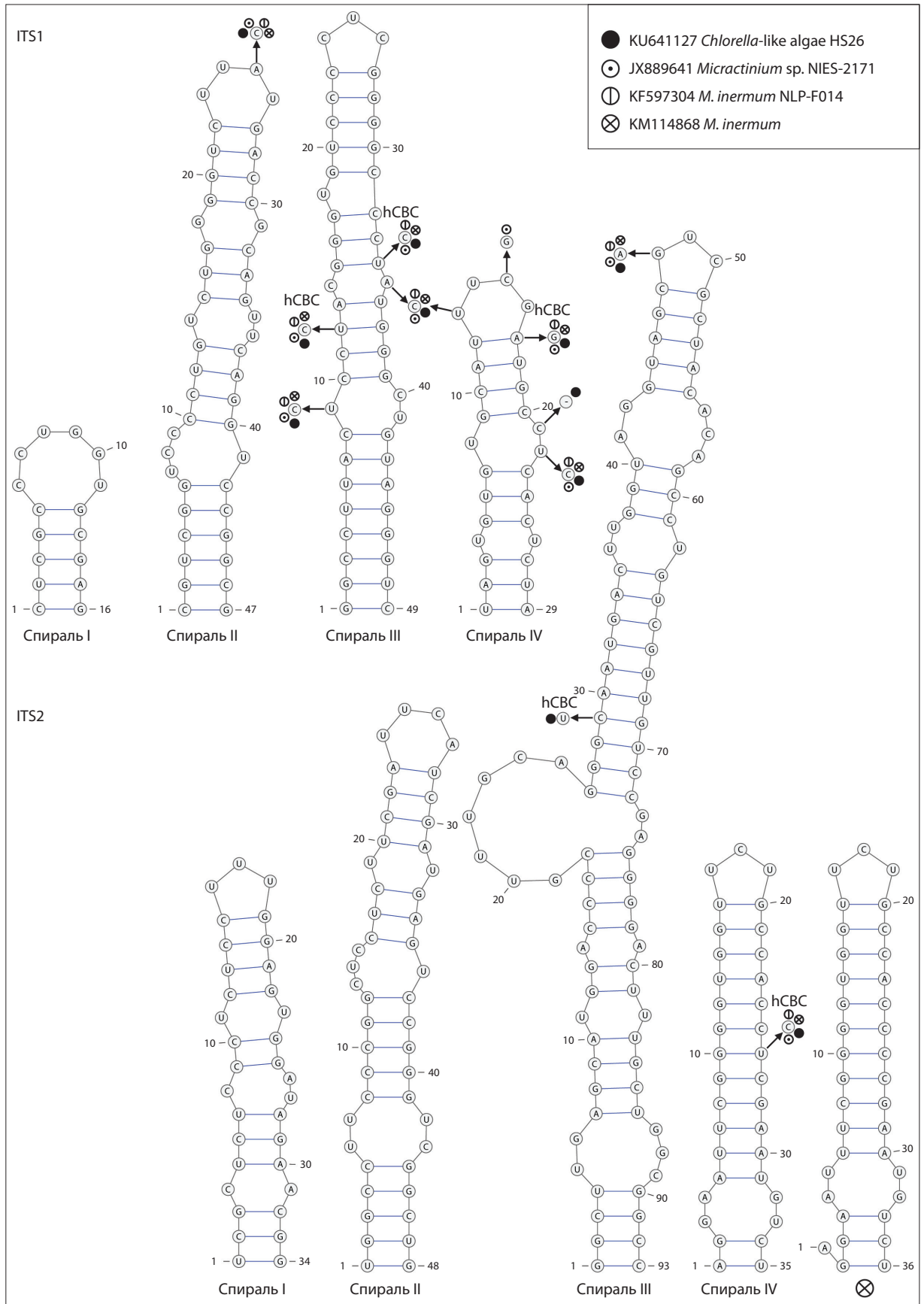
### Морфология, размножение и экология

***Micractinium thermotolerans* Krivina, Sinetova, Savchenko, Degtyarev, Tebina et Temraleeva** (рис. 4, а–е). Клетки сферической формы, диаметром 3.2–6.5 мкм, без щетинок (см. рис. 4, а, б). Молодые клетки имеют треугольную, эллипсоидную (3.0–5.6  $\times$  3.3–5.9 мкм) или неправильную формы. Хлоропласт пристенный, чашевидный со сферическим пиреноидом, имеющим крахмальную обертку. Размножение 2–4 автоспорами (см. рис. 4, в–д). Размер спорангия 4.4–6.7 мкм в диаметре. Равноразмерные автоспоры треугольной или неправильной формы диаметром до 2 мкм освобождаются путем разрыва материнской

оболочки. Клеточные оболочки остаются заметными в культуре после высвобождения автоспор.

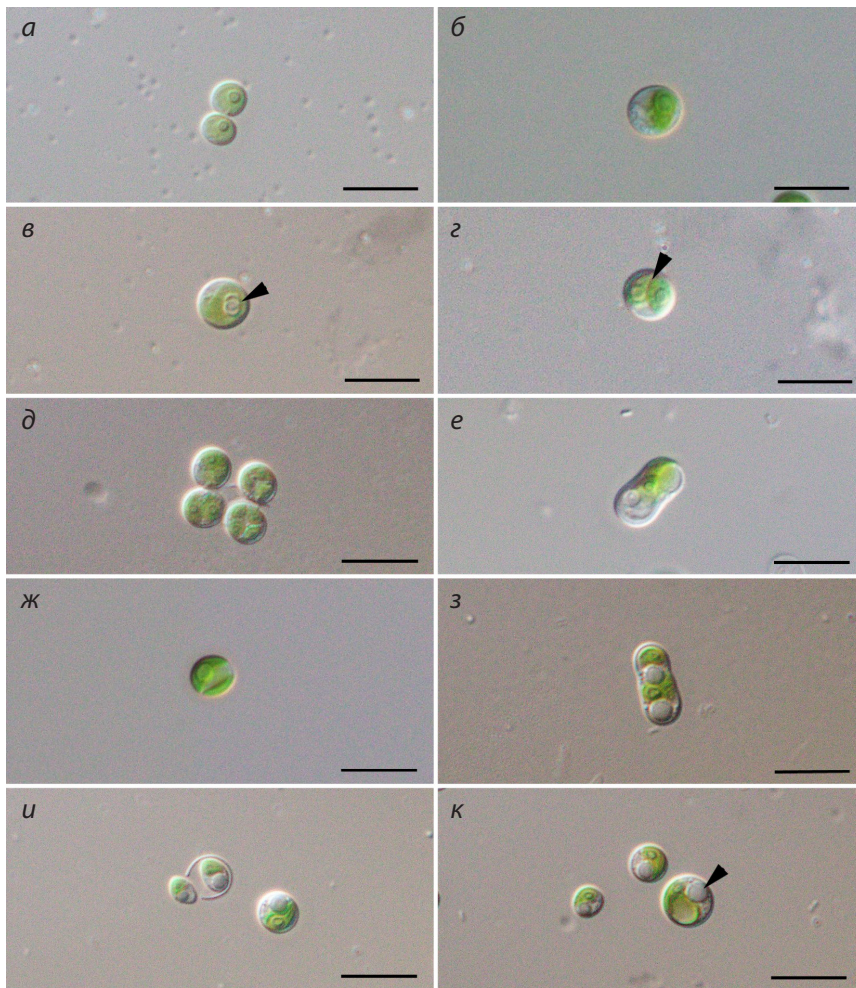
Клеточная стенка тонкая, в стареющих культурах заметно ее равномерное утолщение. В 6-месячных культурах встречаются грушевидные, овальные и эллипсоидные клетки с неглубоким широким сужением в центре, достигающие в длину 7.3–10.5 мкм (см. рис. 4, е).

Обнаружение клеток, значительно превышающих размеры зрелых вегетативных, согласуется с наблюдениями Е. Кривиной с коллегами (Krivina et al., 2023). Ими показано, что инкубация при повышенной нелетальной температуре приводит к появлению в культуре одиночных или



**Рис. 3.** Модели вторичной структуры спиральных доменов ITS1 и ITS2 штамма VCA-72.

Различия в нуклеотидных последовательностях со штаммами *M. inermum* HS26, NLP-F014, KM114868 и NIES-2171 указаны выносками в соответствии с легендой. Спираль IV ITS2 штамма KM114868 показана отдельно (справа внизу) ввиду топологических отличий.



**Рис. 4.** Микрофотографии штаммов *M. thermotolerans* VCA-93 (а–е) и *M. inermum* VCA-72 (ж–к). а, б – вегетативные клетки; в – преспорангиальная клетка (стрелкой показано удвоение пиреноида); з – преспорангиальная клетка (стрелкой показано удвоение протопласта); д – автоспорангии; е – эллипсоидная клетка с неглубоким широким сужением в центре с вакуолями; ж – вегетативная клетка; з – спорангий в стареющей культуре; и – высвобождение автоспор; к – клетка в стареющей культуре с липидной каплей и вакуолью (липидная капля указана стрелкой). Шкала 10 мкм.

аномально делящихся гигантских клеток диаметром 10.8–19.3 мкм. В нашем случае культивирование штамма *M. thermotolerans* VCA-93 осуществлялось при 24.9 °С, и, вероятно, по мере старения происходило истощение культуры, что способствовало появлению аномальных клеток с липидными каплями, сходных с данными по *M. thermotolerans* ACSSI 332 в условиях азотного голодания.

Для *M. thermotolerans* получены предварительные данные о составе жирных кислот (Krivina et al., 2023). Так, при описании вида был выявлен состав метиловых эфиров жирных кислот штамма ACSSI 332 (гексадекановая, 7,10,13-гексадекатриеновая, 9,12,15-октадекатриеновая, пентадекановая кислоты и др.), который отличался от жирнокислотного состава других видов рода *Micractinium* большей сложностью и разнообразием (Krivina et al., 2023). Авторами отмечен биотехнологический потенциал этого вида.

Два из трех известных штаммов *M. thermotolerans* были выделены из экстремальных местообитаний: VCA-93 – из тейфры, отобранной на выходе термальных паров по краю кальдеры вулкана Горелый (п-ов Камчатка), а ACSSI 332 – из горячего источника, расположенного на Чукотском полуострове (Krivina et al., 2023). При этом штамм IC-76 был выделен из речного песка с побережья р. Обь, Новосибирская область (Piligaev et al., 2018), что, возможно, свидетельствует об экологической пластичности вида.

***Micractinium inermum* Hoshina et Fujiwara** (см. рис. 4, ж–к). Одиночные клетки сферической (4.3–5.0 мкм) (см. рис. 4, ж), каплевидной или эллипсоидной формы (2.2–4.7 × 3.0–5.0 мкм), без щетинок. Хлоропласт одиночный, чашевидный, с выраженным пиреноидом. Бесполое размножение двумя автоспорами. Клетки в стареющих культурах сферические (5.7–7.9 мкм) или эллипсоидные, с неглубоким широким сужением в центре (см. рис. 4, з), достигают в длину 8.4–10.7 мкм и характеризуются наличием липидных капель соразмерно их величине (см. рис. 4, и, к).

В цитоплазме стареющих и покоящихся клеток происходит накопление в виде отдельных мелких или одной большой липидной капли, бесцветной или окрашенной в желтый, оранжевый, красный цвета (Андреева, 1998). Вероятно, цвет каплям липидов придают каротиноиды и их производные, которые накапливаются в липидных глобулах. Их можно обнаружить с помощью световой микроскопии в виде сферических цветных тел на стадиях покоя многих видов зеленых водорослей (Weiss, 1983). Например, для *Haematococcus pluvialis* Flotow было показано, что липидные капли имели красноватый цвет из-за присутствия жирорастворимого каротиноида – астаксантина (Ota et al., 2018). Согласно нашим наблюдениям, для стареющих клеток *M. inermum* VCA-72 характерно наличие бесцветных липидных капель (см. рис. 4, з–к).

Обнаружение липидных капель в клетках является также признаком истощения культуры, в том числе азотного голодания. Так, в работе (Zhan et al., 2016) отмечены значительные изменения в содержании липидов у *Chlorella* sp. в условиях обеднения культуры азотом. Дефицит питательных веществ наряду с такими факторами, как высокая интенсивность освещения и высокая концентрация солей, считается стрессовым фактором окружающей среды и вызывает накопление липидов или углеводов (Ho et al., 2012; Fernandes et al., 2013; Roleda et al., 2013; Park et al., 2015).

Известно, что исследуемые нами виды *Micractinium* характеризуются высокими темпами роста и способ-

ностью синтезировать и накапливать липиды (Park et al., 2015; Shi et al., 2019; Krivina et al., 2023). Данный аспект свидетельствует об их большом потенциале для производства биодизельного топлива (Wijffels, Barbosa, 2010). Имеется ряд работ, посвященных выявлению оптимальных условий культивирования *M. inermum*, позволяющих увеличивать его биологическую продуктивность и снижать расходы на поддержание культур. Так, показано, что максимальная продуктивность синтеза липидов штамма JL1 достигается при добавлении глюкозы в гетеротрофную культуру (Shi et al., 2019). При производстве биодизеля большое значение имеет профиль жирных кислот водорослей, поскольку он определяет ключевые свойства топлива (Knothe, 2009). Например, чем выше процентное содержание олеиновой кислоты, тем выше оценивается качество топлива (Knothe, 2009). А. Банскота с соавторами (Banskota et al., 2024) в биомассе *M. inermum* выявили олеиновую, линолеовую и пальмитиновую кислоты.

С. Парк с коллегами (Park et al., 2015) предложили культивировать *M. inermum* NLP-F014 в среде из смеси сточных вод. В их эксперименте содержание липидов достигло 40 % в условиях истощения культуры. Данный способ позволяет снизить потребности в воде и питательных веществах, а значит, и затраты на культивирование. Авторы другого исследования (Sydney et al., 2018) обрабатывали культуру *M. inermum* ультрафиолетом В (UVB) для уменьшения энергозатрат, требующихся для разрушения клеточной стенки и экстракции липидов, что способствовало увеличению выхода метиловых эфиров жирных кислот. Таким образом, штаммы этого вида являются кандидатами для производства биотоплива.

В большинстве публикаций (Park et al., 2015; Smith et al., 2015; Dickinson et al., 2019; Shi et al., 2019; Banskota et al., 2024) указаны пресноводные местообитания *M. inermum*. Мелкие размеры и быстрые темпы воспроизводства, вероятно, позволяют представителям этого вида не только вести планктонный образ жизни в водоемах, но и выживать в наземных местообитаниях, в том числе в таких экстремальных биотопах, как вулканические отложения Камчатки (пирокластические отложения вдоль русла р. Байдарная на вулкане Шивелуч).

## Заключение

В результате исследования разнообразия водорослей пирокластических отложений вулканов Шивелуч и Горелый (п-ов Камчатка) с помощью комплексного подхода были выявлены представители рода *Micractinium*. Полученные данные дополняют сведения о вторичной структуре участков ITS1 и ITS2 рРНК, морфологии (морфология клеток в стареющих культурах *M. inermum* и *M. thermotolerans*), жизненном цикле (более подробно рассмотрен жизненный цикл *M. inermum*), экологии (виды входят в число первичных колонизаторов безжизненного субстрата на п-ове Камчатка; жизнедеятельность *M. thermotolerans* при температуре отложений ~32 °C) и биогеографии (*M. inermum* впервые отмечен на территории России, а *M. thermotolerans* является первой находкой для п-ова Камчатка) обнаруженных видов.

## Список литературы / References

- Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). СПб.: Наука, 1998  
[Andreyeva V.M. Soil and Aerophilic Green Algae (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). St. Petersburg: Nauka Publ., 1998 (in Russian)]
- Голлербах М.М., Штина Э.А. Почвенные водоросли. Л.: Наука, 1969  
[Gollerbah M.M., Shtina E.A. Soil Algae. St. Petersburg: Nauka Publ., 1969 (in Russian)]
- Abdullin Sh.R., Nikulin A.Yu., Bagmet V.B., Nikulin V.Yu., Goncharov A.A. New cyanobacterium *Aliterella vladivostkensis* sp. nov. (Aliterellaceae, Chroococcidiopsidales), isolated from temperate monsoon climate zone (Vladivostok, Russia). *Phytotaxa*. 2021;517: 221-233. DOI 10.11646/phytotaxa.527.3.7
- Abou-Shanab R.A.I., El-Dalatony M.M., El-Sheekh M.M. Cultivation of a new microalga, *Micractinium reisseri*, in municipal wastewater for nutrient removal, biomass, lipid, and fatty acid production. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2014;19:510-518. DOI 10.1007/s12257-013-0485-z
- Akaike H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Control*. 1974;19:716-723. DOI 10.1109/TAC.1974.1100705
- Andersen R.A. Algal Culturing Techniques. New York: Elsevier Acad. Press, 2005
- Banskota A.H., Hui J.P.M., Jones A., McGinn P.J. Characterization of neutral lipids of the oleaginous alga *Micractinium inermum*. *Molecules*. 2024;29:359. DOI 10.3390/molecules29020359
- Bonfield J.K., Smith K.F., Staden R. A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Res.* 1995;23(24):4992-4999. DOI 10.1093/nar/23.24.4992
- Bouarab L., Dauta A., Loudiki M. Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum* Fresenius in the presence of acetate and glucose: effect of light and acetate gradient concentration. *Water Res.* 2004;38(11):2706-2712. DOI 10.1016/j.watres.2004.03.021
- Caisová L., Marin B., Melkonian M. A consensus secondary structure of ITS2 in the Chlorophyta identified by phylogenetic reconstruction. *Protist*. 2013;164(4):482-496. DOI 10.1016/j.protis.2013.04.005
- Chae H., Lim S., Kim H.S., Choi H.G., Kim J.H. Morphology and phylogenetic relationships of *Micractinium* (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae) taxa, including three new species from Antarctica. *Algae*. 2019;34(4):267-275. DOI 10.4490/algae.2019.34.10.15
- Coleman A.W. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. *Protist*. 2000;151(1):1-9. DOI 10.1078/1434-4610-00002
- Coleman A.W. Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure. *Trends Genet.* 2015;31(3):157-163. DOI 10.1016/j.tig.2015.01.002
- Darienko T., Pröschold T. Reevaluation and discovery of new species of the rare genus *Watanabea* and establishment of *Massjukichlorella* gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using an integrative approach. *J. Phycol.* 2019;55:493-499. DOI 10.1111/jpy.12830
- Darriba D., Taboada G., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*. 2012;9: 772. DOI 10.1038/nmeth.2109
- Darty K., Denise A., Ponty Y. VARNA: interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics*. 2009;25:1974-1975. DOI 10.1093/bioinformatics/btp250
- Dickinson K.E., Lalonde C.G., McGinn P.J. Effects of spectral light quality and carbon dioxide on the physiology of *Micractinium inermum*: growth, photosynthesis, and biochemical composition. *J. Appl. Phycol.* 2019;31:3385-3396. DOI 10.1007/s10811-019-01880-z
- Echt C.S., Erdahl L.A., McCoy T.J. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome*. 1992;35(1):84-87. DOI 10.1139/g92-014



- Fernandes B., Teixeira J., Dragone G., Vicente A.A., Kawano S., Bišová K., Vítová M. Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*. *Bioresour. Technol.* 2013;144:268-274. DOI 10.1016/j.biortech.2013.06.096
- Fresenius G. Beiträge zur Kenntniss mikroskopischer Organismen. *Abh. Senckenberg. Naturforsch. Ges.* 1858;2(2):211-242. DOI 10.5962/bhl.title.2137
- Galtier N., Gouy M., Gautier C. Seaview and phylo-win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* 1996;12:543-548. DOI 10.1093/bioinformatics/12.6.543
- Ganuza E., Sellers C.E., Bennett B.W., Carney L.T. A novel treatment protects *Chlorella* at commercial scale from the predatory bacterium *Vampirovibrio chlorellavorus*. *Front. Microbiol.* 2016;7:188348. DOI 10.3389/fmicb.2016.00848
- Goka K., Yokoyama J., Une Y., Kuroki T., Suzuki K., Nakahara M., Kobayashi A., Inaba S., Mizutani T., Hyatt A.D. Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. *Mol. Ecol.* 2009;18(23):4757-4774. DOI 10.1111/j.1365-294X.2009.04384.x
- Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. (Cited on April 15, 2024). Available from: <http://www.algaebase.org>
- Ho S.H., Chen C.Y., Chang J.S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO<sub>2</sub> fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresour. Technol.* 2012;113:244-252. DOI 10.1016/j.biortech.2011.11.133
- Hoef-Emden K., Melkonian M. Revision of the genus *Cryptomonas* (Cryptophyceae): a combination of molecular phylogeny and morphology provides insights into a long-hidden dimorphism. *Protist.* 2003;154:371-409. DOI 10.1078/143446103322454130
- Hong J.W., Jo S.-W., Cho H.-W., Nam S.W., Shin W., Park K.M., Lee K.I., Yoon H.-S. Phylogeny, morphology, and physiology of *Micractinium* strains isolated from shallow ephemeral freshwater in Antarctica. *Phycol. Res.* 2015;63:212-218. DOI 10.1111/pre.12097
- Hoshina R., Fujiwara Y. Molecular characterization of *Chlorella* cultures of the National Institute for Environmental Studies culture collection with description of *Micractinium inermum* sp. nov., *Didymogenes sphaerica* sp. nov., and *Didymogenes soliella* sp. nov. (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *Phycol. Res.* 2013;31:124-132. DOI 10.1111/pre.12010
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 2001;17:754-755. DOI 10.1093/bioinformatics/17.8.754
- Kim I., Yang H.-M., Park C.W., Yoon I.-H., Seo B.-K., Kim E.-K., Ryu B.-G. Removal of radioactive cesium from an aqueous solution via bioaccumulation by microalgae and magnetic separation. *Sci. Rep.* 2019;9:10149. DOI 10.1038/s41598-019-46586-x
- Knothe G. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition. *Energy Environ. Sci.* 2009;2:2759-2766. DOI 10.1039/B903941D
- Komárek J., Fott B. Chlorophyceae (Grünalgen). Ordnung Chlorococcales. In: Huber-Pestalozzi G. (Ed.) Das Phytoplankton des Süßwassers. 7. Teil. 1. Stuttgart: Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, 1983;1-1044
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J., Johansen J.R. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera), using a polyphasic approach. *Preslia.* 2014;86(4):295-335
- Kozlov A.M., Darriba D., Flouri T., Morel B., Stamatakis A. RAXML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics.* 2019;35:4453-4455. DOI 10.1093/bioinformatics/bt2305
- Krivina E., Sinetova M., Savchenko T., Degtyaryov E., Tebina E., Temraleeva A. *Micractinium lacustre* and *M. thermotolerans* spp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta): taxonomy, temperature-dependent growth, photosynthetic characteristics and fatty acid composition. *Algal Res.* 2023;71:103042. DOI 10.1016/j.algal.2023.103042
- López-García P., Philippe H., Gail F., Moreira D. Autochthonous eukaryotic diversity in hydrothermal sediment and experimental microcolonizers at the Mid-Atlantic Ridge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100:697-702. DOI 10.1073/pnas.0235779100
- Luo W., Krienitz L., Pflugmacher S., Walz N. Genus and species concept in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Chlorellaceae): genotype versus phenotypical variability under ecosystem conditions. *SIL Proceedings.* 2005;29(1):170-173. DOI 10.1080/03680770.2005.11901988
- Luo W., Pflugmacher S., Pröschold T., Walz N., Krienitz L. Genotype versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Protist.* 2006;157:315-333. DOI 10.1016/j.protis.2006.05.006
- Marin B., Klingberg M., Melkonian M. Phylogenetic relationships among the Cryptophyta: analyses of nuclear-encoded SSU rRNA sequences support the monophyly of extant plastid-containing lineages. *Protist.* 1998;149:265-276. DOI 10.1016/S1434-4610(98)70033-1
- Marin B., Palm A., Klingberg M., Melkonian M. Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist.* 2003;154:99-145. DOI 10.1078/143446103764928521
- McFadden G.I., Melkonian M. Use of Hepes buffer for microalgal culture media and fixation for electron microscopy. *Phycologia.* 1986;25:551-557. DOI 10.2216/i0031-8884-25-4-551.1
- Mikhailyuk T., Lukešová A., Glaser K., Holzinger A., Obwegeser S., Nyporko S., Friedl T., Karsten U. New taxa of streptophyte algae (Streptophyta) from terrestrial habitats revealed using an integrative approach. *Protist.* 2018;169:406-431. DOI 10.1016/j.protis.2018.03.002
- Nikulin V.Yu., Nikulin A.Yu., Gontcharov A.A., Bagmet V.B., Abdullin Sh.R. *Oogamochlamys kurilensis* sp. nov. (Chlorophyta, Volvocales) from the soils of Iturup Island (Sakhalin Region, Russia). *Plants.* 2023;12:3350. DOI 10.3390/plants12193350
- Onay M., Sonmez C.A., Oktem H., Yücel M. Thermo-resistant green microalgae for effective biodiesel production: isolation and characterization of unialgal species from geothermal flora of Central Anatolia. *Bioresour. Technol.* 2014;169:62-71. DOI 10.1016/j.biortech.2014.06.078
- Ota S., Morita A., Ohnuki S., Hirata A., Sekida S., Okuda K., Ohya Y., Kawano S. Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Sci. Rep.* 2018;8:5617. DOI 10.1038/s41598-018-23854-w
- Park S., Kim J., Yoon Y., Park Y., Lee T. Blending water-and nutrient-source wastewaters for cost-effective cultivation of high lipid content microalgal species *Micractinium inermum* NLP-F014. *Bioresour. Technol.* 2015;198:388-394. DOI 10.1016/j.biortech.2015.09.038
- Piligaev A.V., Sorokina K.N., Shashkov M.V., Parmon V.N. Screening and comparative metabolic profiling of high lipid content microalgal strains for application in wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 2018;250:538-547. DOI 10.1016/j.biortech.2017.11.063
- Pröschold T., Darienko T., Silva P.C., Reisser W., Krienitz L. The systematics of "Zoochlorella" revisited employing an integrative approach. *Environ. Microbiol.* 2011;13:350-364. DOI 10.1111/j.1462-2920.2010.02333.x
- Quintas-Nunes F., Brandão P.R., Barreto Crespo M.T., Glick B.R., Nascimento F.X. Plant growth promotion, phytohormone production and genomics of the rhizosphere-associated microalga, *Micractinium rhizosphaerae* sp. nov. *Plants.* 2023;12:651. DOI 10.3390/plants12030651
- Rambaut A. *FigTree v.1.4.4*. 2018. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (Access date: 01.03.2024)
- Rambaut A., Drummond A.J., Xie D., Baele G., Suchard M.A. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* 2018;67:901-904. DOI 10.1093/sysbio/syy032
- Roleda M.Y., Slocombe S.P., Leakey R.J., Day J.G., Bell E.M., Stanley M.S. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and

- lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresour. Technol.* 2013; 129:439-449. DOI 10.1016/j.biortech.2012.11.043
- Schlösser U.G. Additions to the Culture collection of algae since 1994. *Bot. Acta.* 1997;110:424-429. DOI 10.1111/j.1438-8677.1997.tb00659.x
- Shi M., Wei H., Chen Q., Wang X., Zhou W., Liu J. Exploring an isolate of the oleaginous alga *Micractinium inermum* for lipid production: molecular characterization and physicochemical analysis under multiple growth conditions. *J. Appl. Phycol.* 2019;31:1035-1046. DOI 10.1007/s10811-018-1653-5
- Smith R.T., Bangert K., Wilkinson S.J., Gilmour D.J. Synergistic carbon metabolism in a fast growing mixotrophic freshwater microalgal species *Micractinium inermum*. *Biomass Bioenergy.* 2015;82:73-86. DOI 10.1016/j.biombioe.2015.04.023
- Stamatakis A., Hoover P., Rougemont J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Syst. Biol.* 2008;57:758-771. DOI 10.1080/10635150802429642
- Starr R.C., Zeikus J.A. UTEX – the culture collection of algae at the University of Texas at Austin. 1993 list of cultures. *J. Phycol.* 1993;29:1-106. DOI 10.1111/j.0022-3646.1993.00001.x
- Sydney T., Marshall-Thompson J.-A., Kapoore R.V., Vaidyanathan S., Pandhal J., Fairclough J.P.A. The effect of high-intensity ultraviolet light to elicit microalgal cell lysis and enhance lipid extraction. *Metabolites.* 2018;8:65. DOI 10.3390/metabo8040065
- Weiss R.L. Fine structure of the snow alga (*Chlamydomonas nivalis*) and associated bacteria. *J. Phycol.* 1983;19:200-204. DOI 10.1111/j.0022-3646.1983.00200.x
- White T.J., Bruns T.D., Lee S.B., Taylor J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols – A Guide to Methods and Application. San Diego, CA, USA: Acad. Press, 1990;315-322
- Wijffels R.H., Barbosa M.J. An outlook on microalgal biofuels. *Science.* 2010;329:796-799. DOI 10.1126/science.1189003
- Wolf M., Chen S., Song J., Ankenbrand M., Müller T. Compensatory base changes in ITS2 secondary structures correlate with the biological species concept despite intragenomic variability in ITS2 sequences – a proof of concept. *PLoS One.* 2013;8(6):e66726. DOI 10.1371/journal.pone.0066726
- Zhan J., Hong Y., Hu H. Effects of nitrogen sources and C/N ratios on the lipid producing potential of *Chlorella* sp. HQ. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016;26:1290-1302. DOI 10.4014/jmb.1512.12074
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3406-3415. DOI 10.1093/nar/gkg595

---

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 18.04.2024. После доработки 04.06.2024. Принята к публикации 13.06.2024.