

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ СОЛЕННОСТИ СРЕДЫ НА РАЗМНОЖЕНИЕ И ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ МИКРОВОДОРОСЛИ *NITZSCHIA CF. THERMALOIDES*

© 2024 г. Н. С. Репкина^{1,*}, В. П. Воронин¹, О. И. Давидович²,
Н. А. Давидович², С. А. Мурзина^{1,**}

Представлено академиком РАН Н.Н. Немовой

Поступило 19.09.2023 г.

После доработки 05.10.2023 г.

Принято к публикации 06.10.2023 г.

Вид *Nitzschia cf. thermaloides* обнаружен в водоемах грязевых вулканов восточного Крыма. Установлено, что данный вид имеет широкие границы галотолерантности, в частности он способен к вегетативному размножению в пределах 0–110‰ солености среды. Впервые проанализировано влияние солености среды на жирнокислотный состав микроводоросли *Nitzschia cf. thermaloides*. Вне зависимости от солености, количественное и качественное содержание жирных кислот не изменялось, что свидетельствует о способности поддерживать стабильную уплотненную структуру мембраны, что, вероятно, отчасти обуславливает адаптацию данного вида к засолению. Состав жирных кислот преимущественно представлен насыщенными жирными кислотами, что позволяет рассматривать данный вид в качестве потенциально «полезного» объекта для биотехнологии в качестве источника насыщенных жирных кислот или альтернативного сырья для биотоплива.

Ключевые слова: микроводоросли, липиды, жирные кислоты, засоление, устойчивость

DOI: 10.31857/S2686738924010029, **EDN:** LATNFG

ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли способны синтезировать целый набор различных ценных макромолекул, таких как белки, липиды и другие биоактивные компоненты. В клетках микроводорослей идентифицирован широкий спектр полярных и нейтральных липидов [1]. Кроме того, в структуру их липидов

входят разнообразные жирнокислотные компоненты с насыщенными и ненасыщенными, линейными и разветвленными углеводородными цепями [2]. Повышенное внимание исследователей уже долгое время удерживают именно полиненасыщенные жирные кислоты (ЖК) с длинной цепью (C_n , где n более 20) ввиду их особой физиологической роли в организме, однако последние годы широко реализуются подходы анализа полного спектра ЖК и их соотношений, обсуждения их значимости и потенциала, в том числе в реализации адаптивных реакций живых систем. Учитывая возможность поддержания микроводорослей в культуре, синтез целевых компонентов, в том числе липидной природы, можно регулировать — усиливать/снижать за счет модификаций условий среды. Микроводоросли широко применяются в пищевой промышленности, фармакологии, косметологии, одним из отдельных направлений рассматриваются манипуляции с составом липидов и ЖК, как возможность получения требуемых композиций. Фундаментальная значимость изучения липидов и ЖК микроводорослей состоит в получении новых и дополнительных сведений о реализации эколого-биохимических меха-

¹ Институт биологии — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», Петрозаводск, Россия

² Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского — природный заповедник Российской академии наук — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского Российской академии наук», Феодосия, Россия

*E-mail: nrt9@yandex.ru

**E-mail: murzina.svetlana@gmail.com

низмов адаптации живых систем в изменяющихся условиях среды.

Одноклеточные водоросли представлены шестью отделами, включая отдел Диатомовые (Bacillariophyta), отличительной особенностью которых является наличие кремнеземного панциря. Представители диатомовых водорослей доминируют в фитопланктоне количественно и по видовому разнообразию, являясь ключевым звеном пищевой цепи в водных экосистемах, а благодаря способности к фиксации CO_2 являются первичными продуцентами примерно 20% всего органического вещества планеты, играют значительную роль в биосфере, участвуя в биогеохимических циклах круговорота веществ [3]. Диатомовые водоросли в целом – космополиты, они обитают в соленых и пресных водоемах, почвах, а также во льду и термальных источниках [3, 4]. Учитывая их высокую адаптивную резистентность к широкому спектру изменяющихся условий, они представляют особый интерес для изучения механизмов адаптации не только водорослей, но и других живых организмов.

Работ, посвященных роли липидов и жирных кислот в механизмах и стратегиях адаптации диатомовых к изменениям разных факторов среды, крайне мало, и эти исследования проводились в периоды с широким временным разрывом. Большая часть исследований состава липидов и ЖК ограничивается определением содержания триацилглицеринов (ТАГ), депо среднецепочечных жирных кислот, и оценкой их структуры и состава, так как именно это показатель значим среди таковых при анализе сырья для производства биотоплива; высокое содержание ТАГ такой структуры делает биотопливо менее вязким [4].

Несмотря на то что диатомовые водоросли представлены огромным количеством видов и интерес к ним только растет, особенно последнее десятилетие, в настоящее время достаточно хорошо изучены (используются в качестве модельных объектов) всего лишь несколько видов, среди них центрическая *Thalassiosira pseudonana* Hasle & Heimdal и пеннатная *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin.

Целью данной работы явилось изучение влияния солености среды на воспроизводство и жирнокислотный состав микроводоросли *Nitzschia cf. thermaloides*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор проб проведен в районе грязевых вулканов Булганакского сопочного поля, Республика Крым. Выделенные клоновые культуры содержали в модифицированной питательной среде ESAW [5] с разным уровнем солености (0–110‰). Скорость размножения (делений в сутки) оценивали соглас-

но модели экспоненциального роста численности [6]. Далее 5 мл среды, содержащей клетки микроводоросли, осаждали центрифугированием при 3500 об/мин в течение 5 мин и сразу фиксировали в 10 мл смеси хлороформ–метанол (1:1). В работе были использованы материалы Научно-образовательного центра коллективного пользования ФИЦ ИнБЮМ «Коллекция диатомовых водорослей Мирового океана».

Экстракты общих липидов подвергали кислотному метилированию для придания свойств летучести жирным кислотам. Для определения состава полученной смеси метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) проводили их разделение на ГХ с моноквадрупольным масс-селективным детектором «Маэстро- α МС» (Сайтегра, Россия). Фракционирование осуществлялось в течение 32 мин при градиентном термостатировании ($t_{\text{нач}} = 140^\circ\text{C}$ – удержание 5 мин; увеличение t со 140°C до 240°C со скоростью $4^\circ\text{C}/\text{мин}$; $t_{\text{кон}} = 240^\circ\text{C}$ – удержание 2 мин) на капиллярной колонке HP-88 $60\text{ м} \times 0.25\text{ мм} \times 0,20\text{ мкм}$ (Agilent Technologies, США) с использованием гелия в качестве подвижной фазы. Детектирование МЭЖК осуществлялось в режиме SIM/SCAN: режим SIM – для регистрации ЖК, входящих в состав аналитических стандартов (Supelco 37, Sigma-Aldrich, США) по заданным значениям m/z ; режим SCAN – для поиска и идентификации уникальных ЖК компонентов в диапазоне 50–400 m/z . Полученные данные анализировались с использованием ПО «Маэстро Аналитик v. 1.025» и библиотекой NIST. Количественный расчет ЖК проводили методом внешнего стандарта (градуировки) с использованием аналитической смеси Supelco 37 (Sigma-Aldrich, США) для построения калибровочной кривой. Аналитические исследования проведены на базе лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН и с использованием оборудования ЦКП КарНЦ РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что *N. cf. thermaloides* выживает в широком диапазоне солености от 0 до 110‰. В частности, клоны *N. cf. thermaloides* продемонстрировали широкую толерантность в отношении солености. Клетки водоросли были способны вегетативно размножаться в среде с соленостью от 0 до 110‰. Процесс полового воспроизводства происходил в более узком диапазоне от 6 до 54‰ и оптимальная соленость для полового воспроизводства и вегетативного роста составляла 30‰ (табл. 1).

Так, например, в экспериментах показано, что *Nitzschia palea* (Kützinger) W. Smith [7], встречающаяся преимущественно в пресных водах, сохраняла жиз-

неспособность при заметном осолонении. В данном случае диапазон солёности, в котором поддерживалась репродуктивная способность, был уже (0–17‰), при этом наблюдали 100% гибель клеток в среде с солёностью 36‰, иными словами, можно ожидать, что *N. palea* выживет, например, при попадании в Чёрное море, однако океаническая солёность окажется для нее губительной. Аналогичные результаты были получены в экспериментах с клонами этого вида, выделенными из европейской популяции [8].

Процессы деления водоросли *N. cf. thermaloides*, как в оптимальных условиях, так и при действии разной солёности среды, описаны впервые. Однако стоит отметить, что полученные данные свидетельствуют о достаточно широком диапазоне толерантности данного вида к изменению солёности.

Анализ жирных кислот, показал, что *N. cf. thermaloides* преимущественно содержит насыщенные жирные кислоты (НЖК) (табл. 2). Профиль НЖК в порядке убывания: 16:0, 18:0, 22:0, 20:0, 14:0, 15:0. При изменении солёности среды их качественный состав не меняется, а их количественное содержание слабо варьирует. Известно, что высокое содержание НЖК также характерно для некоторых видов диатомовых, в частности *Nitzschia* sp., *Nanofrustulum shiloi* (J.J. Lee, Reimer & McEnery) Round, Hallsteinsen & Paasche [9], *Phaeodactylum tricornutum* [10] и др.

Установлено, что у *N. cf. thermaloides* среди НЖК доминирует пальмитиновая кислота, 16:0, содержание которой в клетках наибольшее при солёности 110‰ и 50‰ и наименьшее при солёности в 20‰ (табл. 2). Наибольшее содержание 16:0 среди НЖК

Таблица 1. Темп деления (дел.·сут⁻¹) *Nitzschia cf. thermaloides* при разной солёности среды

Солёность, ‰	0	4	10	18	30	48	68	96	110
Темп делений, дел.·сут ⁻¹	0.10 ± 0.07	0.27 ± 0.16	0.14 ± 0.57	0.38 ± 0.15	0.72 ± 0.14	0.35 ± 0.07	0.12 ± 0.18	0.18 ± 0.28	0,30±0,25

В таблице представлены средние арифметические значения ± стандартные ошибки среднего

Таблица 2. Качественный и количественный профиль (мкг/мл) *Nitzschia cf. thermaloides*, при разной солёности среды (0–110‰)

Жирные кислоты и другие идентифицированные компоненты	Солёность среды, ‰				
	0	20	30	50	110
Миристиновая кислота, 14:0	6.54	6.23	6.47	6.61	6.65
Пентадекановая кислота, 15:0	3.5	3.46	3.49	3.49	3.49
Пальмитиновая кислота, 16:0	36.87	25.06	31.85	38.84	38.96
Стеариновая кислота, 18:0	21.78	15.8	19.48	22.94	22.94
Арахидоновая кислота, 20:0	8.67	8.6	8.65	8.66	8.66
Бегеновая кислота, 22:0	9.69	9.62	9.64	9.66	9.65
Олеиновая кислота, cis 18:1(n-9)	8.55	LPQ	8.27	8.47	LPQ
Пальмитоолеиновая кислота, cis16:1(n-9)	+		+	+	+
Эйкозеновая кислота, cis20:1(n-9)	LPQ	LPQ	LPQ	LPQ	LPQ
11-Эйкозеновая кислота, cis20:1(n-11)					+
Цитоолеиновая кислота, cis22:1(n-11)	+			+	+
Нервоновая кислота, cis24:1(n-9)	LPQ	LPQ	LPQ	LPQ	LPQ
2,4-ди-трет-бутилфенол 2,4-DTBP	+	+	+	+	+
2-этоксиэтанол (этилцеллозолов) 2-ENMIP	+	+	+	+	+

“+” — идентифицированный компонент не рассчитан количественно в связи с его отсутствием в смеси Supelco37.

LPQ — концентрация ниже предела количественного определения

отмечено и у других видов *Nitzschia*, таких как *N. lecontei* Van Heurck [11] и *Nitzschia sp.* [12]. Известно также, что повышение содержания 16:0 у некоторых видов микроводорослей связывают с изменением концентрации металлов в среде [13]. На основании этого предполагается, что 16:0 участвует в процессах формирования рафтов в биомембране, а также в «заякоривании» мембраносвязанных белков в стресс-индуцированных условиях. Однако для подтверждения работы данного механизма адаптации необходимо проведение дальнейших исследований. Второй по количественному содержанию НЖК была стеариновая кислота, 18:0, динамика содержания которой в клетках была сходной с 16:0, а именно наименьшее содержание отмечено при солености 20‰, а ее повышение при 0, 50‰ и 110‰ (табл. 2). Доминирование этих двух ЖК отмечено и у *Nitzschia sp.* [12].

Сведения о влиянии солености на жирнокислотный состав представителей рода *Nitzschia* практически отсутствуют. Известно, что у *N. lecontei* при изменении солености среды состав жирных кислот изменяется незначительно и преимущественно представлен НЖК [11], что согласуется с полученными нами данными. Поддержание НЖК на высоком уровне отмечено у диатомовых при изменении минерального питания [9,10]. Известно, что реакция разных видов микроводорослей на засоление неоднозначна, однако преимущественно в этих условиях вне оптимальных значений, происходит увеличение содержания НЖК, что также обсуждается в обзоре Sajjadi et al 2018 [13]. Вероятно, компенсаторные перестройки в условиях стресса заключаются в повышении количества НЖК преимущественно за счет 16:0. Можно предположить, что поддержание «уплотненной» (ригидной) структуры биомембраны является одной из адаптивных реакций ввиду обеспечения избирательной проницаемости клетки и ее компартментов, поддерживающих их устойчивость к засолению и широкие границы толерантности.

Установлены следовые количества 2,4-ди-трет-бутилфенола (2,4-DTBP) и 2-этоксизанола (2-ENMP) (табл. 2), вторичных метаболитов, обладающих аутоксичными свойствами. Регистрируемая детектором интенсивность этих веществ у исследуемого вида стабильно выше в некоторых образцах при 110‰, 50‰ и 20‰. Полученный результат может иметь особое значение для отслеживания реакции отдельных компонентов экосистемы в ответ на изменение условий среды (в частности солености).

В рамках настоящей работы установлено, что *N. cf. thermaloides* выживает в широком диапазоне солености от 0 до 110‰, при котором клетки водоросли способны вегетативно размножаться. При

этом половое воспроизведение наблюдалось в диапазоне от 6 до 54‰, а оптимальная соленость для полового размножения и вегетативного роста составляла 30‰. В ходе работы впервые был проанализирован состав жирных кислот микроводоросли *N. cf. thermaloides*. В исследуемом диапазоне солености среды жирнокислотный профиль представлен преимущественно насыщенными жирными кислотами. Наибольший процент от общего количества насыщенных жирных кислот приходится на пальмитиновую кислоту. Вероятно, низкая вариабельность жирнокислотного состава обеспечивает стабильное поддержание структуры мембраны в изменяющихся условиях и успешную адаптацию данного вида. Более того, *N. cf. thermaloides* может быть рекомендована для использования в биотехнологии в качестве источника насыщенных жирных кислот и потенциального кандидата для производства биотоплива, а учитывая следовые содержания соединений, обладающих аутоксичным действием, важен контроль ее распространения с точки зрения экотоксикологии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания FMEN-2022-0006, FMEN-2023-0010, а также № 121032300019-0.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lu Q., Li H., Xiao Y. et al. A state-of-the-art review on the synthetic mechanisms, production technologies, and practical application of polyunsaturated fatty acids from microalgae // *Algal Research*. 2021. V. 55. P. 102281.
2. Lopez P.J., Deslès J., Allen A.E., Bowler C. Prospects in diatom research. 2005. *Current Opinion in Biotechnology*. V. 16. P. 180–186.
3. Bhattacharjya R., Tiwari A., Marella T.K. et al. New paradigm in diatom omics and genetic manipulation // *Biores. Tech.* 2021. V. 325. P. 124708.
4. Jaramillo-Madrid A.C., Ashworth J., Fabris M., Ralph, P.J. Phytosterol biosynthesis and production by diatoms (*Bacillariophyceae*) // *Phytochem.* 2019. V. 163. P. 46–57.
5. Полякова С.Л., Давидович О.И., Подунай Ю.А., Давидович Н.А. Модификация среды ESAW, используемой для культивирования морских диатомовых водорослей // *Морской биологический журнал*. 2018. Т. 3 (2). С. 73–78.
6. Wood A.M., Everroad R.C., Wingard L.M. Measuring growth rates in microalgal cultures In: *Algal culturing techniques* / ed. by R.A. Andersen. Elsevier Academic Press, New York. 2005. P. 269–286.

7. Bagmet V.B., Abdullin Sh.R., Kuluev B.R. et al. The effect of salinity on the reproduction rate of *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith (Bacillariophyta) // Clones. 2017. V. 48. P. 223–225.
8. Trobajo R., Rovira L., Mann D.G., Cox E.J. Effects of salinity on growth and on valve morphology of five estuarine diatoms // Phycol. Res. 2011. V. 59. P. 83–90.
9. Sahin M.S., Khazi M.I., Demirel Z., Dalay M.C. Variation in growth, fucoxanthin, fatty acids profile and lipid content of marine diatoms *Nitzschia* sp. and *Nanofrustulum shiloi* in response to nitrogen and iron // Biocat. Agric. Biotech. 2019. V. 17. P. 390–398.
10. Yodsuwan N., Sawayama S., Sirisansaneeyakul S. Effect of nitrogen concentration on growth, lipid production and fatty acid profiles of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* // Agriculture and Natural Resources. 2017. V. 51. P. 190–197.
11. Tortensson A., Jiménez C., Nilsson A.K., Wulff A. Elevated temperature and decreased salinity both affect the biochemical composition of the Antarctic sea-ice diatom *Nitzschia leicointei*, but not increased pCO₂ // Polar Biol. 2019. V. 42. P. 2149–2164.
12. Al-Naimi S., Al-Muftan A., Das P. et al. Biocrude oil and high-value metabolite production potential of the *Nitzschia* sp. // Biomass Conver. Bioref. 2021.
13. Sajjadi B., Chen W.-Y., Raman A.A.A. et al. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition // Renew. Sustain. Energy Rev. 2018. V. 97. P. 200–232.

THE EFFECT OF SALINITY ON REPRODUCTION AND FATTY ACIDS PROFILE OF THE DIATOM MICROALGAE *NITZSCHIA* CF. *THERMALOIDES*

N. S. Repkina^{a,*}, V. P. Voronin^a, O. I. Davidovich^b, N. A. Davidovich^b, S. A. Murzina^{a,##}

^aInstitute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
Petrozavodsk, Russian Federation

^bT.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station — Nature Reserve of the Russian Academy of Sciences —
Branch of A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the Russian Academy of Sciences,
Feodosiya, Russian Federation

^{*}E-mail: nrt9@yandex.ru

^{##}E-mail: murzina.svetlana@gmail.com

Presented by Academician of the RAS N.N. Nemova

The *Nitzschia* cf. *thermaloides* was found in reservoirs of mud volcanoes in eastern Crimea. It was determined that this species has wide spectrum of halotolerance; in particular, it is capable of vegetative reproduction within the range of 0–110‰ salinity of the substrate. For the first time, the effect of salinity on the fatty acid composition of the microalga *Nitzschia* cf. *thermaloides* was studied. Regardless of salinity, the quantitative and qualitative content of fatty acids did not change, which indicates the ability to maintain a stable compacted membrane structure, which probably partly determines the adaptation of this species to salinity. The composition of fatty acids is mainly represented by saturated fatty acids, which allows us to consider this species as a potentially “useful” object for biotechnology as a source of saturated fatty acids or an alternative raw material for biofuel.

Keywords: microalgae, lipids, fatty acids, salinity, tolerance