

**Использование профиля жирных кислот
в качестве хемотаксономического маркера для диатомовых водорослей
из рода *Nitzschia* Hassall соленых озер Монголии**

**Use of the fatty acid profile as a chemotaxonomic marker for diatoms from
the genus *Nitzschia* Hassall of the salt lakes of Mongolia**

Мальцев Е. И., Кривова З. В., Мальцева С. Ю., Куликовский М. С.

Maltsev Y. I., Krivova Z. V., Maltseva S. Y., Kulikovskiy M. S.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, г. Москва, Россия. E-mail: maltsev.ye@yandex.ru
K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia

Реферат. Новые штаммы диатомовых водорослей рода *Nitzschia* выделены из проб фитопланктона и бентоса солоноводных озер Монголии. Штаммы идентифицированы на основании морфологических характеристик и филогенетического анализа с использованием гена 18S рДНК. Новые штаммы с высокой статистической поддержкой вошли в состав клады Bacillariales. Анализ жирнокислотного состава исследованных штаммов показал, что доминантными были 16:0 пальмитиновая, 18:0 стеариновая и 16:1 пальмитолеиновая кислоты – на их долю приходилось до 97,5 % от суммы всех жирных кислот. По сравнению с другими штаммами *Nitzschia*, выделенные из монгольских озер, показали минимальное содержание полиненасыщенных жирных кислот, в том числе омега-3 и омега-6. Учитывая особенности профилей жирных кислот, а в первую очередь количество насыщенных и мононенасыщенных кислот, новые штаммы *Nitzschia* могут рассматриваться для биотехнологического применения как потенциальное сырье при производстве биотоплива.

Ключевые слова. Биотехнология, диатомовые водоросли, жирные кислоты, Монголия, *Nitzschia*.

Summary. New diatom strains of *Nitzschia* were isolated from phytoplankton and benthos of saltwater lakes in Mongolia. The strains were identified based on morphological characteristics and phylogenetic analysis using the 18S rDNA gene. The new strains have been included into the Bacillariales clade with a high statistical support. Analysis of the fatty acid composition of the studied strains showed that 16:0 palmitic, 18:0 stearic, and 16:1 palmitoleic acids were dominant – they accounted for up to 97.5 % of the total fatty acids. New strains of *Nitzschia* from Mongolian lakes showed the minimum content of polyunsaturated fatty acids, including omega-3 and omega-6. Taking into account the peculiarities of the profiles of fatty acids, and primarily the amount of saturated and monounsaturated acids, new strains of *Nitzschia* can be considered for biotechnological use as a potential raw material for the production of biofuel.

Key words. Biotechnology, diatoms, fatty acids, Mongolia, *Nitzschia*.

Переход к высокопродуктивному и экологически чистому аквахозяйству является одной из первостепенных задач для достижения высокого качества питания населения. Именно характер продовольствия как базового показателя жизнедеятельности человека выступает основным индикатором социально-экономического развития страны, определяет здоровье и продолжительность жизни каждого отдельного человека. Современная теория питания фокусируется на многочисленных преимуществах достаточного количества полиненасыщенных жирных кислот в рационе человека (Patil, Gislerød, 2006). Наиболее ценными в этой группе клеточных метаболитов являются омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты.

Обильно накапливающие омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты водоросли встречаются среди разных таксономических групп. Например, наибольшее количество 20:5 эйкозапентаеновой кислоты отмечено у диатомовых водорослей *Navicula* sp. (13 мг/г), *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (28,4 мг/г) и *Nitzschia frustulum* (Kützing) Grunow (32 мг/г), несколько меньше – у эустигматофитовой

водоросли *Nannochloropsis oceanica* Suda et Miyashita (23,4 мг/г) (Renaud et al., 1994; Patil et al., 2007). В сумме установлено, что представители диатомовых водорослей способны накапливать до 46,8–49,4 % полиненасыщенных кислот в общем спектре, а учитывая высокое содержание липидов в клетках, к водорослям, которые могут использоваться в биотехнологии, относятся, в первую очередь, солоноводные виды *Nitzschia* Hassall (Мальцев и др., 2019).

Для поиска биотехнологически ценных штаммов немаловажным является возможность предсказания способности видов водорослей к высокой аккумуляции липидов на основе анализа их филогении (Fields, Kocielek, 2015). Как показывают исследования, для таксонов различного ранга может проследиваться определенная зависимость на уровне преобладания в профиле тех или иных групп жирных кислот (Shukla et al., 2012). Это открывает возможность как целенаправленного поиска новых высокопроизводительных штаммов среди определённых групп водорослей, так и использование данных о профиле жирных кислот для идентификации таксонов, определения особенностей трофических цепей в экосистемах (Kühn et al., 2019). В целом для диатомовых водорослей характерно большое содержание С16 жирных кислот, особенно омега-7 16:1. На уровне таких классов, как *Coscinodiscophyceae* и *Bacillariophyceae*, отличия состоят в содержании 16:3 полиненасыщенных жирных кислот, где омега-3 16:3 и омега-6 16:3 присутствуют у *Coscinodiscophyceae*, а не у *Bacillariophyceae* (Maltsev, Maltseva, 2021).

Во время изучения разнообразия диатомовых водорослей Монголии было выделено 4 новых штамма *Nitzschia* из планктона и бентоса солоноводных озер Тельмен (штаммы *Nitzschia* sp. mns7 и *Nitzschia* sp. mns27), Тахилт (штамм *Nitzschia* sp. mns74) и Цеген (штамм *Nitzschia* sp. mns86). Данные озера характеризовались близкими значениями pH (в диапазоне 9,02–9,24) и отличались солёностью (5 ‰ в озере Тахилт, 12 ‰ – Тельмен и 17 ‰ – Цеген). Моноклональные штаммы диатомовых водорослей выделяли микропипетированием отдельных клеток, используя инвертированный микроскоп Zeiss Scope A1. Штаммы культивировали в жидкой среде ESAW (Полякова и др., 2018) с заданной солёностью на осветительной установке с постоянным освещением 100 мкмоль фотонов м⁻² м⁻¹. Культуры анализировались после достижения стационарной фазы роста. Для световой и сканирующей микроскопии штаммы подготавливали стандартной обработкой с применением 10 % HCl и концентрированной перекиси водорода. Постоянные препараты диатомовых готовились с помощью смолы Naphrax®. Изучение морфологии клеток проводили на микроскопе Zeiss Axiovert, оснащенного масляным иммерсионным объективом (x100/n.a. 1.4, DIC). Ультраструктуру створок исследовали с помощью сканирующего электронного микроскопа JSM-6510LV. ДНК штаммов диатомей экстрагировали набором InstaGene™ Matrix в соответствии с протоколом производителя. Амплификацию баркодингового участка V4 ядерного гена 18S рДНК длиной 382–420 п.н. проводили с помощью пары праймеров D512 и D978 (Zimmermann et al., 2011). Состав жирных кислот в липидном экстракте определяли на газожидкостном хроматографе Agilent 7890A (Agilent Technologies, США) с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5975С.

Анализ морфологических особенностей новых штаммов показал их тесную связь с видами *Nitzschia*. Общие черты включали: симметричную, ланцетную форму створок с клювовидными или головчатыми концами, расположение канала-шва на краю створки в киле, плохо различимые штрихи; наличие двух хлоропластов, расположенных на концах клеток. Филогенетический анализ методами максимального правдоподобия и байесовского подхода с использованием гена 18S рДНК показал, что штаммы mns7, mns27, mns74 и mns86 тесно связаны с другими штаммами *Nitzschia*, в том числе *Nitzschia filiformis* UTEX FD267, *Nitzschia lorenziana* TCC516 и *Nitzschia palea* TCC139-2.

Анализ жирнокислотного состава исследованных штаммов *Nitzschia* во время стационарной фазы роста показал, что в составе суммарных липидов клеток главными жирными кислотами были 16:0 пальмитиновая, 18:0 стеариновая и 16:1 пальмитолеиновая. Сухая биомасса диатомовых водорослей включала 15,9–18,9 % пальмитиновой кислоты от общего количества жирных кислот. Содержание стеариновой кислоты было в диапазоне 35,2–58,5 % у разных штаммов, при этом максимальный показатель отмечен у штамма *Nitzschia* sp. mns86. Мононенасыщенная пальмитолеиновая кислота была обнаружена в количестве 18,1–39,6 % с наибольшим значением в биомассе штамма *Nitzschia* sp. mns7. В меньших количествах содержались 14:0 миристиновая, 20:0 арахидиновая, 18:1 олеиновая и 18:3 γ-линоленовая жирные кислоты. С точки зрения использования биомассы водорослей в хозяйстве в качестве подкормки наиболее ценной является группа омега-3 полиненасыщенных жирных кислот. Так, содержание 20:5 эйкозапентаеновой кислоты было в диапазоне 1,3–2,4 % с максимальным значением у *Nitzschia* sp. mns7. Также следует отметить незначительное присутствие омега-6 полиненасыщенной арахидоновой кислоты до 2,8 %, при этом наивысший процент этой незаменимой для некоторых жи-

вотных жирной кислоты обнаружен в биомассе штамма *Nitzschia* sp. mns27. В целом, изученные штаммы характеризовались способностью накапливать в большей части насыщенные (64,6–79,6 %) и мононенасыщенные (18,3–41,2 %) жирные кислоты. Наибольшее количество насыщенных жирных кислот отмечено в биомассе штамма *Nitzschia* sp. mns86, а мононенасыщенных – *Nitzschia* sp. mns7. Содержание омега-3 и омега-6 кислот от общей суммы жирных кислот составило: штамм *Nitzschia* sp. mns7 – 2,6 и 2,5 %; *Nitzschia* sp. mns27 – 0,7 и 0,4 %; *Nitzschia* sp. mns74 – 0,3 % и 0,2%; *Nitzschia* sp. Mns86 – 1,6 и 0,6 % соответственно.

В целом, проведенный анализ показал низкое содержание омега-3 полиненасыщенных жирных кислот в биомассе *Nitzschia* из соленых озер Монголии, однако общее количество насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот составило от 94,5 до 99,6 %, что значительно превышает аналогичные значения в растительных маслах, которые используются в качестве исходного сырья для производства биодизеля. Например, рапсовое масло содержит до 64 % мононенасыщенных жирных кислот, соевое – до 21,8 %, а масло ятрофы – в диапазоне 34–45 % (Kumar et al., 2003). В связи с этим жирнокислотные профили исследованных штаммов *Nitzschia* позволяют рассматривать их биомассу пригодной для производства биодизеля.

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 20-74-10076).

ЛИТЕРАТУРА

Мальцев Е. И., Шкурина Н. А., Куликовский М. С. Использование диатомовых водорослей при повышении эффективности кормов для аквакультуры // Вопросы современной альгологии, 2019. – Т. 20, № 2. – С. 303–307.

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. 73–80.

Fields F. J., Kociolek J. P. An evolutionary perspective on selecting high-lipid-content diatoms (Bacillariophyta) // Journal of Applied Phycology, 2015. – Vol. 27. – P. 2209–2220.

Kühn J., Schweitzer K., Ruess L. Diversity and specificity of lipid patterns in basal soil food web resources // PLoS ONE, 2019. – Vol. 14, iss. 8. – e0221102.

Kumar M. S., Ramesh A., Nagalingam B. An experimental comparison of methods to use methanol and Jatropha oil in a compression ignition engine // Biomass Bioenergy, 2003. – Vol. 25. – P. 309–318.

Maltsev Y., Maltseva K. Fatty acids of microalgae: diversity and applications // Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2021. – Vol. 20. – P. 515–547.

Patil V., Gislerød H. R. The importance of omega-3 fatty acids in diet // Current Science, 2006. – Vol. 90, iss. 7. – P. 908–909.

Patil V., Källqvist T., Olsen E., Vogt G., Gislerød H. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed // Aquaculture International, 2007. – Vol. 15. – P. 1–9.

Renaud S. M., Parry D. L., Tinh L. Microalgae for use in tropical aquaculture: I. Gross chemical and fatty acid compositions of twelve species of microalgae from Northern Territory, Australia // Journal of Applied Phycology, 1994. – Vol. 6. – P. 337–345.

Shukla E., Singh S. S., Singh P., Mishra A. K. Chemotaxonomy of heterocystous cyanobacteria using FAME profiling as species markers // Protoplasma, 2012. – Vol. 249. – P. 651–661.

Zimmermann J., Jahn R., Gemeinholzer B. Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols // Organisms Diversity & Evolution, 2011. – Vol. 11. – P. 173–192.