

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МИКРОВОДОРОСЛЕЙ РОДА *DUNALIELLA* ИЗ ГИПЕРСОЛЕННЫХ ОЗЕР КРЫМА

Шаповалова В.Е., Евстигнеев В.П., Гаджи А.В., Лантушенко А.О.

Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, 299053, Севастополь, РФ; e-mail: veshapovalova@sevsu.ru

Поступила в редакцию 15.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0579

**Аннотация.** В роде микроводорослей *Dunaliella* существует большое количество видов, сильно отличающихся по продукционным характеристикам, но схожих по внешнему виду. Разные виды *Dunaliella* имеют разные формы и размеры. Клетка водоросли может быть эллипсоидной, яйцевидной, почти сферической, грушевидной или веретенообразной. Размер клеток даже внутри вида изменчив, и различия связаны с условиями роста, например, количеством питательных веществ, интенсивностью света и концентрацией соли. Для идентификации таксономического статуса разных видов микроводорослей рода *Dunaliella* необходимы морфометрический и филогенетический анализы. Целью работы является морфометрический анализ диких штаммов микроводорослей рода *Dunaliella* из гиперсоленых озер Крыма: Сасык-Сиваш, Сакского, Мойнакского и Аджиголь. С помощью визуализирующего проточного цитометра FlowCam 8400 был проведено исследование четырех популяций, в каждой анализировалось около 10 тысяч клеток, оценивалось 8 морфологических параметров. Обработка результатов проводилась с помощью программы для статистической обработки данных R. Для оценки степени делимости клеток *D. salina* и для построения соответствующей дискриминирующей функции использовался метод линейного дискриминантного анализа. Применяя пошаговый алгоритм построения дискриминантной функции, был установлен оптимальный набор наиболее показательных морфометрических характеристик достаточных для разделения совокупности клеток на группы по принадлежности их к тому или иному водоему.

**Ключевые слова:** *Dunaliella*, морфологический анализ, FlowCam, дискриминантный анализ.

### ВВЕДЕНИЕ

*Dunaliella* – род зеленых одноклеточных микроводорослей, представляющих практическую ценность их использования в качестве перспективного промышленного источника β-каротина, глицерола и других натуральных биологически активных веществ. Физиологическое состояние клеток этого организма тесно связано с абиотическими факторами. Клетки микроводоросли могут иметь окрас от зеленого до буро-красного. *Dunaliella salina* – галофильный вид микроводоросли, который отличается повышенной толерантностью к экстремальным условиям солености, температуры и освещенности [1]. В условиях сильного стресса представители этого вида могут накапливать более 5% β-каротина в сухой биомассе [2]. Существуют разные виды микроводорослей рода *Dunaliella*, обладающих разным биотехнологическим потенциалом. В частности, *D. tertiolecta* – зеленая жгутиковая водоросль с высоким содержанием липидов.

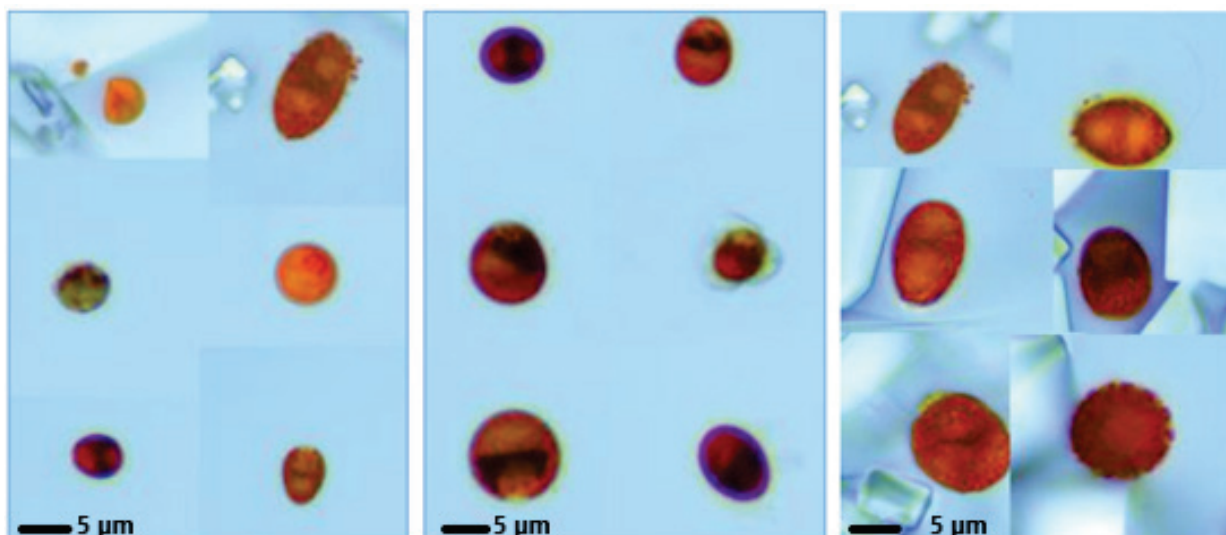
Водоросли рода *Dunaliella* не имеют клеточной стенки, ее заменяет тонкая эластичная мембрана, поэтому клетки могут менять свой внешний вид в ответ на изменяющиеся факторы окружающей среды. Например, после осмотического шока клетки кратковременно приобретают сферическую форму. В связи с этим внутривидовая изменчивость морфометрических характеристик клеток велика и может превосходить межвидовую, что создает ограничение в использовании морфометрических характеристик для определения принадлежности водоросли к тому или иному виду [3].

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах были исследованы дикие штаммы микроводоросли рода *Dunaliella*, отобранные из озер Сасык-Сиваш, Аджиголь, Сакского озера, а также из водоемов близ Мойнакского озера и Сасык-Сиваша. Полевые изоляты были отобраны в августе 2021 года. Предварительный микроскопический анализ проводился на световом микроскопе Leica DM4B с увеличением ×1000.

На рисунке 1 представлены микрофотографии микроводорослей из озер в условиях высокой солености (до 240 г/л) и температуры (около 30°C), которые являются стрессовыми для данной культуры. В условиях стресса микроводоросль выделяет каротиноиды, приобретая окраску от желтого до бордового цвета. В пробах из озер Сасык-Сиваш, Саки и водоема у озера Мойнаки преобладали клетки насыщенного бордового цвета, что может быть использовано в качестве классификационного признака принадлежности к *D. salina* [4].

Для получения альгологически чистой культуры, около 100 клеток из каждой пробы пересаживали на агар. Далее колония клеток, выращенных на агаре, пересаживалась в стерильные колбы со средой Ben-Amotz с соленостью 120 г/л. С помощью микроскопа Leica DM4 были оценены форма и размеры клеток микроводорослей (рис. 2).



**Рисунок 1.** Микрофотографии водоросли из Сакского озера, озера Сасык-Сиваш и Мойнакского озера в условиях высокой концентрации соли и температуры (увеличение  $\times 1000$ )



**Рисунок 2.** Фотографии микроводоросли, выращенной на агаре (увеличение  $\times 1000$ ): 1 – Аджиголь (12,31 мкм), 2 – Мойнакское (14,65 мкм), 3 – Сакское (5,77 мкм), 4 – Сасык-Сиваш (10,87 мкм)

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Анализ размерных характеристик проводился с помощью проточного цитометра с возможностью визуализации FlowCam 8400. С помощью программного обеспечения VisualSpreadsheet5 были получены до 40 морфометрических параметров отдельных клеток, анализ которых в совокупности теоретически позволит дать количественную оценку сходства и различия между таксонами разного порядка, а также строить классификаторы для их автоматического разделения в будущем. Количество исследованных объектов в каждой пробе составило порядка 5 тысяч клеток. Было показано, что наиболее мелкоклеточные формы микроводоросли характерны для Сакского озера (средняя площадь  $37,5 \pm 12,4 \text{ мкм}^2$ ), тогда как крупноклеточные формы в основном содержались в пробах из озера Мойнаки ( $124,1 \pm 24,6 \text{ мкм}^2$ ). Для озера Аджиголь характерны клетки, сильно отличающиеся по своей форме и размерам ( $87,8 \pm 46,1 \text{ мкм}^2$ ) (на основе цифровой библиотеки изображений) (табл. 1).

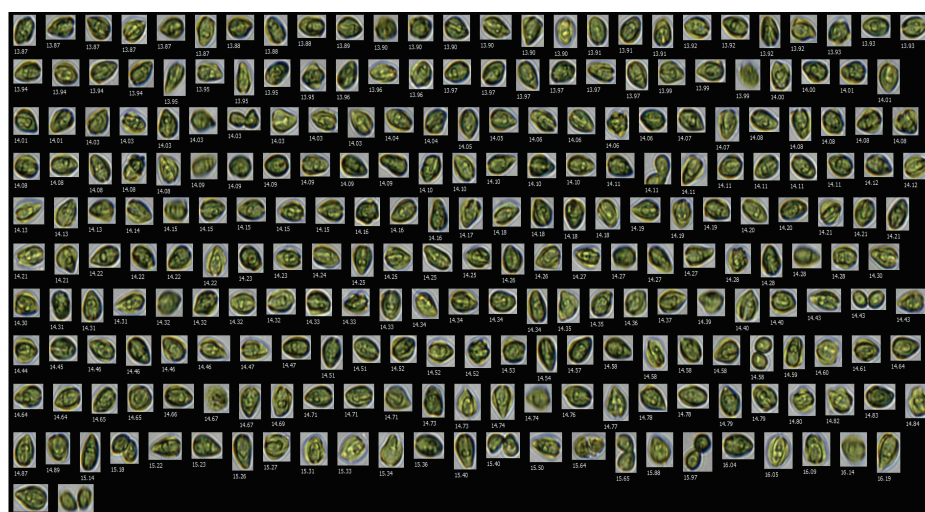
**Таблица 1.** Морфологические характеристики микроводорослей из гиперсоленых озер, полученные с помощью цитометра FlowCam

Озеро	Средняя площадь, мкм <sup>2</sup>	Средний диаметр, мкм	Средняя длина, мкм	Средняя ширина, мкм	Средний объем, мкм <sup>3</sup>
Сасык-Сиваш	56,4 ± 25,3	8 ± 1,7	9,6 ± 1,8	8,1 ± 1,9	322,3 ± 259,6
Саки	37,5 ± 12,3	6,8 ± 1,1	7,9 ± 1,3	7,2 ± 1,2	167,2 ± 91,8
Мойнаки	124,1 ± 24,6	12,3 ± 1,2	15,7 ± 2,3	13 ± 1,9	878,8 ± 259,3
Адзиголь	87,8 ± 46,1	10 ± 3	12,5 ± 4,1	10,12 ± 3,3	590,6 ± 407,1

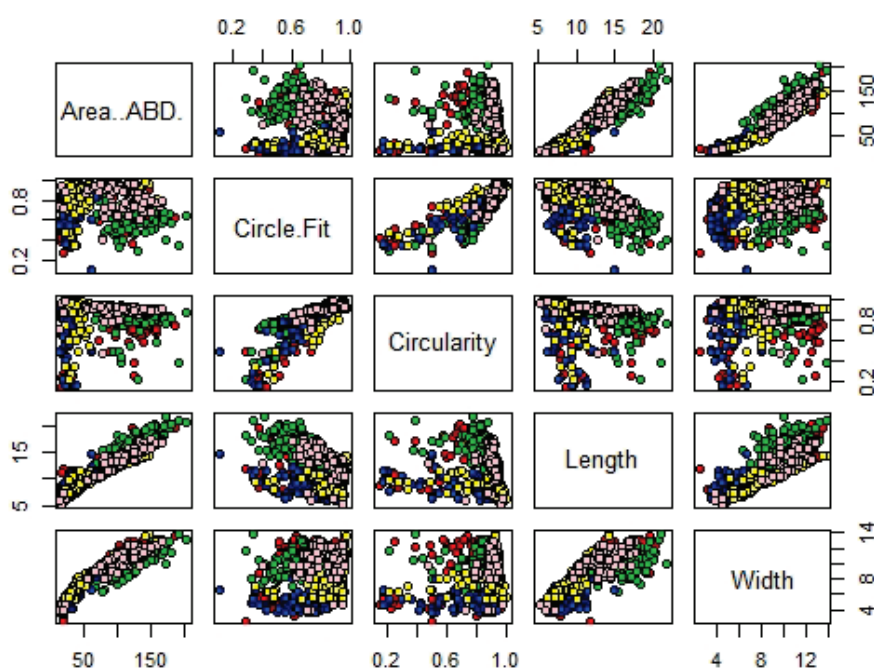
На рисунке 3 представлен скриншот из программы VisualSpreadsheet5, на котором изображены микрофотографии культуры из озера Адзиголь, сделанные с помощью цитометра FlowCam. Данные были отсортированы по размеру и на скриншоте показана выборка самых крупных клеток.

Далее проводился объективный статистический анализ совокупности наиболее показательных морфометрических параметров в среде R (<https://www.r-project.org>). К наиболее показательным были отнесены параметры с высоким уровнем изменчивости (коэффициент вариации  $C_v$ ) их значений в пробах - длина, ширина, площадь, объем, округлость, биообъем (рис. 4).

Для оценки степени разделимости клеток *D. salina* и для построения соответствующей дискриминирующей функции использовался метод линейного дискриминантного анализа (пакет *lda*, <https://cran.r-project.org/web/packages/lda/index.html>). Применяя пошаговый алгоритм построения дискриминантной функции,



**Рисунок 3.** Фотографии культуры микроводорослей озера Адзиголь, полученные с использованием FlowCam.



**Рисунок 4.** Графики рассеяния отдельных морфометрических характеристик клеток *D. Salina*

```
> importance(foo.rf, type=1)
              MeanDecreaseAccuracy
Area..ABD.          21.02687
Biovolume..Sphere. 20.58160
Circle.Fit          31.54215
Circularity         43.37620
Diameter..ABD.     21.33530
Length             24.98147
Volume..ABD.       21.21909
Width              35.04624
```

**Рисунок 5.** Наиболее показательные морфометрические характеристики, выделенные по результатам расчетов в среде R

был установлен оптимальный набор наиболее показательных морфометрических характеристик («importance» (рис. 5)) – признак округлости и площади (Circularity+Area), - достаточных для разделения (улучшение точности модели менее чем на 1%) совокупности клеток на группы по принадлежности их к тому или иному водоему.

Таким образом, использование линейного дискриминантного анализа позволило определить морфометрические признаки, с помощью которых можно установить принадлежность клеток к разным водным объектам. Сравнение результатов, полученных в данной работе, с классификацией, предложенной в [4], позволяет сделать заключение, что в озерах Саки, Сасык-Сиваш и в водоеме у озера Мойнаки обитают микроводоросли вида *D salina*, а в озере Аджиголь присутствуют другие виды зеленых одноклеточных микроводорослей. Важно отметить, что для современной идентификации культур микроводорослей необходимо использовать, как морфометрический, так и молекулярно-генетический подход, который планируется реализовать в последующих исследованиях.

**Список литературы / References:**

1. Масюк Н.П. *Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода Dunaliella Teod.* К.: Наукова думка, 1973, 244 с. [Masyuk N.P. *Morfologiya, sistematika, ekologiya, geograficheskoe rasprostranenie roda Dunaliella Teod.* K.: Naukova dumka, 1973, 244 c. (In Russ.)]
2. Ben-Amotz A., Avron M. On those factors which determine the massive  $\beta$ -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiology*, 1983, vol. 72, pp. 593-595.
3. Highfield A., Ward A., Pipe R., Schroeder D. Molecular and phylogenetic analysis reveals new diversity of *Dunaliella salina* from hypersaline environments. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2021, vol. 101, no. 1, pp. 27-37.
4. Borowitzka M.A., Siva C.J. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *J Appl Phycol.*, 2007, vol. 19, pp. 567-590.

**COMPARATIVE STUDY ON MORPHOMETRICS OF MICROALGAE OF THE GENUS *DUNALIELLA* FROM HYPERSALTED LAKES OF CRIMEA**

**Shapovalova V.E., Evstigneev V.P., Gadzhi A.V., Lantushenko A.O.**

Sevastopol State University

33 University St., Sevastopol 299053, Russia, e-mail: veshapovalova@sevsu.ru

Received 15.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0579

**Abstract.** Genus of microalgae *Dunaliella* includes a large number of species greatly differing by its product potential, but being similar by general physical appearance. In fact, different *Dunaliella* species differ much by cell shape and size. The algae cell can be ellipsoid, ovoid, almost spherical, pear-shaped or fusiform. Cell size is variable even within a species, and differences are related to growth conditions, such as the amount of nutrients, light intensity, and salt concentration. Morphometric and phylogenetic analyses are necessary to identify the taxonomic status of different species of microalgae of the genus *Dunaliella*. The aim of the work is a morphometric analysis of wild strains of microalgae of the genus *Dunaliella* from hypersalted lakes of the Crimea: Sasyk-Sivash, Saki, Moynak and Ajigol. With the help of the FlowCam 8400 visualizing flow cytometer, four populations were studied, about 10 thousand cells were analyzed in each, 8 morphological parameters were evaluated. The results were processed using a program for statistical data processing R. To assess the degree of separability of *D. salina* cells and to construct the corresponding discriminating function, the method of linear discriminant analysis was used. Applying a step-by-step algorithm for constructing a discriminant function, an optimal set of the most indicative morphometric characteristics sufficient to divide a set of cells into groups according to their belonging to a particular reservoir was established.

**Key words:** *Dunaliella*, morphological analysis, FlowCam, discriminant analysis.