

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 574.58:[582.263]

# Представители клады *Chlorella* в техногенном озере Отстойник (Самарская область, Россия) в период самовосстановления

Е.С. Кривина 

Всероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г.К. Скрябина, Пущинский научный центр биологических исследований, Российской академии наук, Россия, 142290, Московская область, г. Пущино, проспект Науки, д. 5  
e-mail: pepelisa@yandex.ru

Приведены результаты исследования видового разнообразия представителей клады *Chlorella* в озере Отстойник (город Тольятти, Самарская область). Данный водоем до 1996 г. использовался для утилизации отходов азотно-тукового производства, но в настоящее время находится на этапе самовосстановления. В ходе работы было исследовано 15 штаммов микроводорослей с *Chlorella*-подобной морфологией. По итогам молекулярно-генетического анализа с использованием внутренних транскрибуемых спайсеров ITS1 и ITS2 было установлено, что только три штамма являлись истинными представителями рода *Chlorella*. Также были обнаружены микроводоросли из родов *Brachionococcus*, *Lobosphaeropsis*, *Micractinium*, *Meyerella*. Кроме того, два штамма принадлежали к видам, которые пока формально относят к роду *Chlorella*, но их действительный таксономический статус нуждается в уточнении. Данное исследование еще раз наглядно показало, что валидная идентификация *Chlorella*-подобных микроводорослей невозможна с использованием только методов световой микроскопии. Для исследования истинного видового богатства обязательно должны быть задействованы методы молекулярно-генетического анализа.

**Ключевые слова:** микроводоросли, криптическое разнообразие, альгомониторинг, культуральный подход, фитопланктон, ITS1–5.8S–ITS2

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3-1

## Введение

В настоящее время в свете нарастающего экологического кризиса и дефицита природных ресурсов мониторинг, восстановление и сохранение экосистем урбанизированных территорий становятся все более актуальными. Одной из проблем городских ландшафтов является наличие на их территории техногенных водоемов, подвергавшихся промышленной эксплуатации (озера-отстойники и шламонакопители). С течением времени они перестают быть необходимы предприятиям, и возникает вопрос об очистке и восстановлении таких водоемов. При этом, отмечается недостаток данных о том, как трансформируются их экосистемы после изменения интенсивности и типа антропогенного воздействия (с промышленного на рекреационный и/или аграрный).

Фитопланктон является чутким индикатором состояния окружающей среды, поэтому альгомониторинг широко используется для отслеживания актуального состояния различных водных экоси-

стем. Обычно для определения качественного состава и показателей количественного развития водорослей используются концентрированные пробы, которые были отфильтрованы, например, с помощью насоса Комовского и содержат в своем составе сильные фиксаторы (например, формалин). Однако в процессе такой пробоподготовки некоторые морфологические признаки (щетинки, колонии, слизь) деформируются или утрачиваются. Идентификация видов водорослей и подсчет клеток проводятся с помощью световой микроскопии при увеличении, как правило, не более  $\times 600$ , поэтому виды, имеющие близкие морфотипы, остаются неучтенными. Все это затрудняет изучение истинного видового разнообразия. Между тем точные данные о видовом составе и структуре альгофлоры весьма полезны при проведении анализа общего состояния биогеоценозов малых урбанизированных водоемов, оценки степени их деградации, а также при разработке программ по их восстановлению [1–3].

Представители клады *Chlorella* ввиду простой морфологии характеризуются высоким криптическим разнообразием, и при альгомониторинге с помощью световой микроскопии оценить истинное количество видов этой клады фактически невозможно. Решить данную проблему позволяет использование, например, культурального подхода. Полученные в ходе работы альгологически чистые штаммы представляют не только научный, но и практический интерес. В последние годы отмечается устойчивая тенденция роста внимания к экологически чистым биотехнологическим разработкам. Использование водорослей для очистки загрязненных вод считается одним из перспективных методов, дополнительным преимуществом которого является возможность использования полученной биомассы для производства биотоплива, удобрений и т. д. [4, 5]. Штаммы, полученные из техногенных водоемов или сточных вод, в этом плане являются наиболее привлекательными, поскольку уже адаптированы к выживанию в загрязненных водах. Подобные исследования, как правило, касаются водных объектов в период активной эксплуатации или уже после рекультивации. Между тем, видовое разнообразие фитопланктона в период самовосстановления до сих практически не изучено. Часто работы посвящены анализу видового разнообразия всех таксономических групп водорослей. В связи с крайне скучной морфологией группы *Chlorella*-подобных водорослей в таких исследованиях представлена крайне ограниченным количеством штаммов, что не позволяет оценить истинное видовое богатство видов данной группы [6–8]. Кроме того, часто исследования проводятся только с помощью методов световой микроскопии, без выделения штаммов, что, как уже отмечалось ранее, не позволяет получить достоверные сведения о видовой принадлежности *Chlorella*-подобных водорослей [9, 10].

Целью данной работы является изучение криптического разнообразия представителей *Chlorella*-клады в техногенном озере Отстойник на этапе самовосстановления водоема спустя 20 лет после прекращения промышленной эксплуатации.

### Материалы и методы

**Объекты исследования.** Объектами данного исследования стали штаммы зеленых микроводорослей, выделенные из озера Отстойник (53.5018 с.ш., 49.4940 в.д.), малого техногенного водоема из системы Васильевские озера (город Тольятти, Самарская область). В данный водоем до 1996 г. активно поступали жидкие отходы азотно-тукового производства ОАО «КуйбышевАзот» [3]. Затем его эксплуатация была прекращена, и в настоящее время водоем находится в процессе самовосстановления. 12 штаммов были изолированы непосредственно из пелагической части водоема. Три

штамма были выделены из инфузорий *Paramecia*, выловленных в прибрежных зарослях макрофитов.

**Изолирование и культивирование штаммов.** Для получения культур свободноживущих штаммов каплю воды из исследуемого озера наносили на твердую среду BG-11 с азотом (1%-ный агар, pH = 7,2) и далее многократно пересевали отдельные колонии до получения альгологически чистых культур. Для выделения эндосимбионтов *Paramecia* клетку инфузории промывали последовательно в 6 каплях 0,5%-ного стрептомицина и переносили в жидкую среду BG-11. После голодания и переваривания пищи в течение 72 ч инфузорию снова обрабатывали 0,5%-ным стрептомицином, а затем переносили на среду BG-11 с витаминами и пептоном (2%-ный агар, pH = 7,2). Затем клетку инфузории прокалывали стерильной иглой [11].

Все изоляты культивировали в климатостате в стандартных условиях (температура +20°C, свет 60–75  $\mu$ моль фотонов  $\cdot$  м $^{-2}$   $\cdot$  с $^{-1}$ , фотопериод 12:12 ч). Сроки культивирования штаммов перед последующими этапами анализа варьировали от 4 нед. до 6 мес.

**Световая микроскопия.** Морфологию и жизненные циклы исследуемых штаммов изучали методом световой микроскопии с помощью микроскопа Leica DM750 (Германия). Результаты наблюдений документированы фотографиями, снятыми с помощью цветной цифровой камеры Leica Flexacam C3 (Германия). Сроки наблюдения составляли от 1 нед. до 6 мес. Для морфометрических измерений использовали программу Leica Application Suite X (Германия). Для сравнения размеров измеряли 200 клеток каждого штамма. За основу в данной работе выбрана система микроводорослей, принятая в международной электронной базе данных Algae Base [12].

**Выделение тотальной ДНК, амплификация, очистка и секвенирование ампликонов.** Для молекулярно-генетической идентификации штаммов в качестве ДНК-баркода использовали внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2. Суммарную ДНК из штаммов выделяли с помощью колоночного набора DNeasy Plant Mini Kit («Qiagen», США), следуя протоколу производителя. Для амплификации использовали готовую смесь Screen Mix-HS («Евроген», Россия). Условия и праймеры для амплификации указаны в статье Джонсон с соавт. [13]: ITS-AF 5'-CGTTTCCGTAGGTGAAACCTGC-3', ITS-BR 5'-CATATGCTTAAGTTCAGCGGG-3' (условия амплификации: 95°C, 30 с; 95°C (30 с), 57,6°C (30 с), 72°C (1 мин), 35 циклов; 72°C, 10 мин). Детекцию целевых продуктов полимеразной цепной реакции проводили электрофоретически в 1%-ном агарозном геле. Очистка ампликонов из геля проводилась с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия). Секвенирование проводилось на базе коммерческой компании «Евроген» (Россия).

**Молекулярно-филогенетический анализ.** Для молекулярно-генетической идентификации штаммов микроводорослей был осуществлен поиск гомологии нуклеотидных последовательностей ITS1–ITS2 по алгоритму BLASTn в GenBank NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Отбор последовательностей осуществляли, исходя из критерии максимального родства (сходство  $\geq 95\%$ ), качества прочтения (без вырожденных и неизвестных нуклеотидов), длины прочтения и принадлежности к типовым видам и коллекционным аутентичным штаммам. Множественное выравнивание было выполнено в программе 4SALE [14] с учетом вторичной структуры. При аннотации спайсера ITS1 опирались на общие рекомендации Колеман [15] и другие ранее опубликованные работы [6, 16–19]. Аннотацию спайсера ITS2 осуществляли с использованием сервиса ITS2-DataBase (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>), а также опираясь на вышеупомянутые работы. Фолдинг внутренних спайсеров проводили с помощью веб-сервера RNAfold web server (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) по принципу минимальной энергии. Выбор нуклеотидных замен для построения филогенетического дерева осуществляли с помощью программы IQ-TREE v. 2.2 [20], ориентируясь на минимальное значение критерия BIC (Bayesian information criterion). Оценка топологии ветвей с помощью теста SH-aLRT (тест приблизительного отношения правдоподобия с непараметрической коррекцией на базе алгоритма Шимодайры–Хасегавы) была реализована в блоке построения филогенетического дерева uGENE. Реконструкцию филогенетических взаимосвязей с помощью метода максимального правдоподобия (ML – maximum likelihood) осуществляли в программе IQ-TREE v. 2.2, реконструкцию с использованием метода Байеса – с использованием программного пакета BEAST 2 v. 2.7.5 [21]. В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны значения SH-aLRT-поддержки (SH-aLRT – Shimodaira-Hasegawa-like approximate likelihood ratio test), бутстреп-поддержки ML (BP – bootstrap percentages) и апостериорных вероятностей BI (PP – posterior probabilities). Различия между нуклеотидными последовательностями охарактеризовали с помощью генетических различий, мерой которых являлся процент несовпадений нуклеотидов при попарном сравнении выравненных последовательностей, вычисленный в программе MEGA 11 с помощью 2-параметрической модели Кимуры [22]. Сравнение различий вторичных структур ITS1 и ITS2 между штаммами и поиск компенсаторных замен (CBCs – compensatory base changes) осуществляли между всеми штаммами выборки в программе 4SALE. Более подробно методы описаны в статье Кривина с соавт. [23].

## Результаты и обсуждение

В данной работе представлены результаты изучения 15 штаммов, которые, согласно филогенетическому анализу с использованием фрагмента ITS1–5.8S–ITS2, являлись представителями клады *Chlorella* (рис. 1).

Штаммы O-31 (рис. 2А) и O-2Par (рис. 2Б) имели классический *Chlorella*-подобный морфотип (шаровидные или овальные клетки, одиночные, не продуцирующие щетинки, чашевидный хлоропласт с одним пиреноидом) и кластеризовались с представителями собственно *C. vulgaris* (SH-aLRT – 100%, BP – 100%, PP – 1,00). Генетические дистанции по фрагменту ITS1–5.8S–ITS2 с аутентичным штаммом *C. vulgaris* SAG 211-11b составляли 0–0,2%, что в рамках клады *Chlorella* соответствует внутривидовому уровню. Для сравнения межвидовые дистанции внутри рода *Micractinium* составляли не менее 3,5% (между *M. variabilis* и *M. singularis*). Анализ вторичных структур ITS1 и ITS2 данных штаммов и аутентичного штамма SAG 211-11b не выявил CBCs или существенных различий в строении шпилек. Как известно, представители *C. vulgaris* обладают способностью вступать во временные симбиотические отношения с беспозвоночными, хотя большинство штаммов является все же свободноживущими организмами [6, 24, 25]. Штамм O-31 относится к свободноживущим организмам, тогда как штамм O-2Par – факультативный эндосимбионт одноклеточной инфузории *Paramecium bursaria*. Таким образом, штаммы O-31 и O-2Par были идентифицированы как представители *C. vulgaris*.

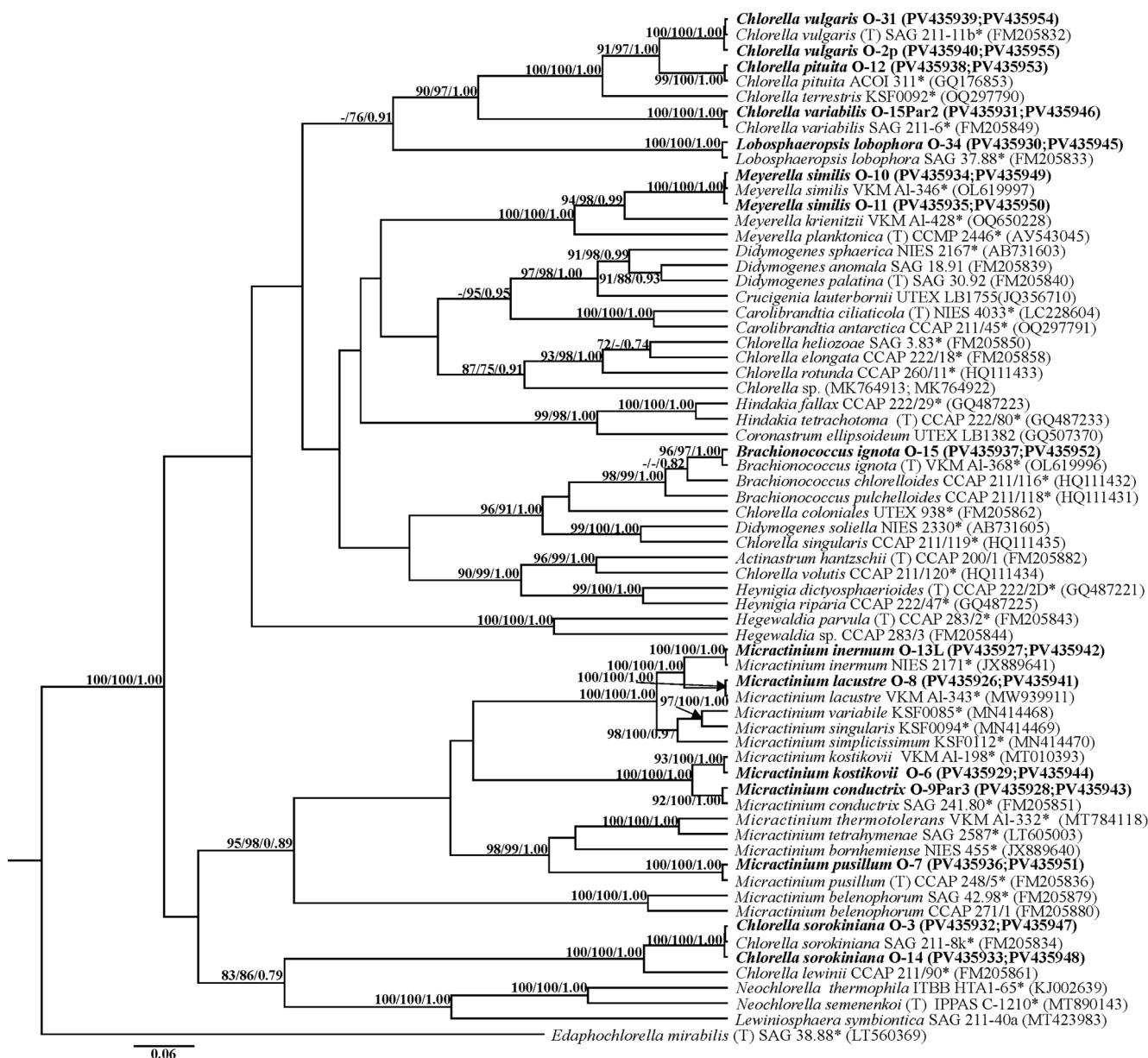
У штамма O-12 (рис. 2В), изолированного из пелагической части водоема, в культуре наряду с одиночными клетками были встречены *Dictyosphaerium*-подобные колонии (овальные и шаровидные клетки соединены гиалиновыми тяжами). Данный штамм кластеризовался с аутентичным штаммом *C. pituita* ACOI 311 (SH-aLRT – 98%, BP – 100%, PP – 1,00) [6]. В отличие от описания аутентичного штамма ACOI 311 в культуре мы отмечали максимум 4-клеточные колонии, что может быть связано с культивированием на агаризованной среде. Уровень генетических различий между штаммами O-12 и ACOI 311 соответствовал внутривидовому (0,2%). CBCs и значимые различия во вторичной структуре ITS1 и ITS2 также отсутствовали. В связи с этим можно сказать, что штамм O-12 относится к виду *C. pituita*.

Штамм O-15Par2 (рис. 2Г), обладающий морфологией типичного «маленького зеленого шарика», группировался с аутентичным штаммом *C. variabilis* SAG 211-6 (SH-aLRT – 100%, BP – 100%, PP – 1,00), при этом генетические дистанции не превышали 0,2% (внутривидовой уровень). Морфология исследуемого штамма соответствовала типовому диагнозу вида. CBCs и различия во вторичной структуре ITS1 и ITS2 не были обнаружены.

ны. Представители вида *C. variabilis* являются исключительно эндосимбионтами. Штамм O-15Par2 также был изолирован из инфузории *Paramecium bursaria*, и, как показала практика, не может поддерживаться на стандартных средах без внесения пептона и витаминов [26]. Таким образом, штамм O-15Par2 был идентифицирован как представитель *C. variabilis*.

Характерная особенность штамма O-34 (рис. 2Д) – наличие лопастного хлоропласта, что в рамках клады *Chlorella* свойственно только представителям *Lobosphaeropsis lobophora*. Филогенетический анализ подтвердил предположения о видовой принадлежности исследуемого штамма,

выдвинутые на основе результатов световой микроскопии. Штамм O-34 кластеризовался с аутентичным штаммом *L. lobophora* SAG 37.88 с максимальными статистическими поддержками. Генетические различия составили 0%, соответственно, различия во вторичной структуре ITS1 и ITS2 исследуемого штамма и SAG 37.88 отсутствовали. Традиционным местом обитания *L. lobophora* считаются почвы [27]. Штамм O-34 был изолирован из пелагиали техногенного озера. Однако, поскольку водоем мелководный, полностью исключать занос из почвы нельзя. Вообще, почва не является типичной средой обитания для представителей *Chlorella*-клады.



**Рис. 1.** Укорененное филогенетическое дерево клады *Chlorella*, построенное методом Байеса (BI), на основе последовательностей генов внутренних транскрибуемых спайсеров ITS1 и ITS2 с учетом вторичной структуры (1086 п.н.). В качестве статистической поддержки узлов дерева указаны значения SH-aLRT (вероятность теста приблизительного отношения правдоподобия с непараметрической коррекцией на базе алгоритма Шимодайры–Хасегавы)/BP (бутстреп-вероятность)/PP (апостериорная вероятность). Значения SH-aLRT и BP менее 70% и PP менее 0,7 не указаны. Модель нуклеотидных замен: TIM2e + I + G4. Обозначения: жирным шрифтом выделены исследуемые штаммы, исследуемые в рамках, \* – аутентичные штаммы; (T) – типовой вид.

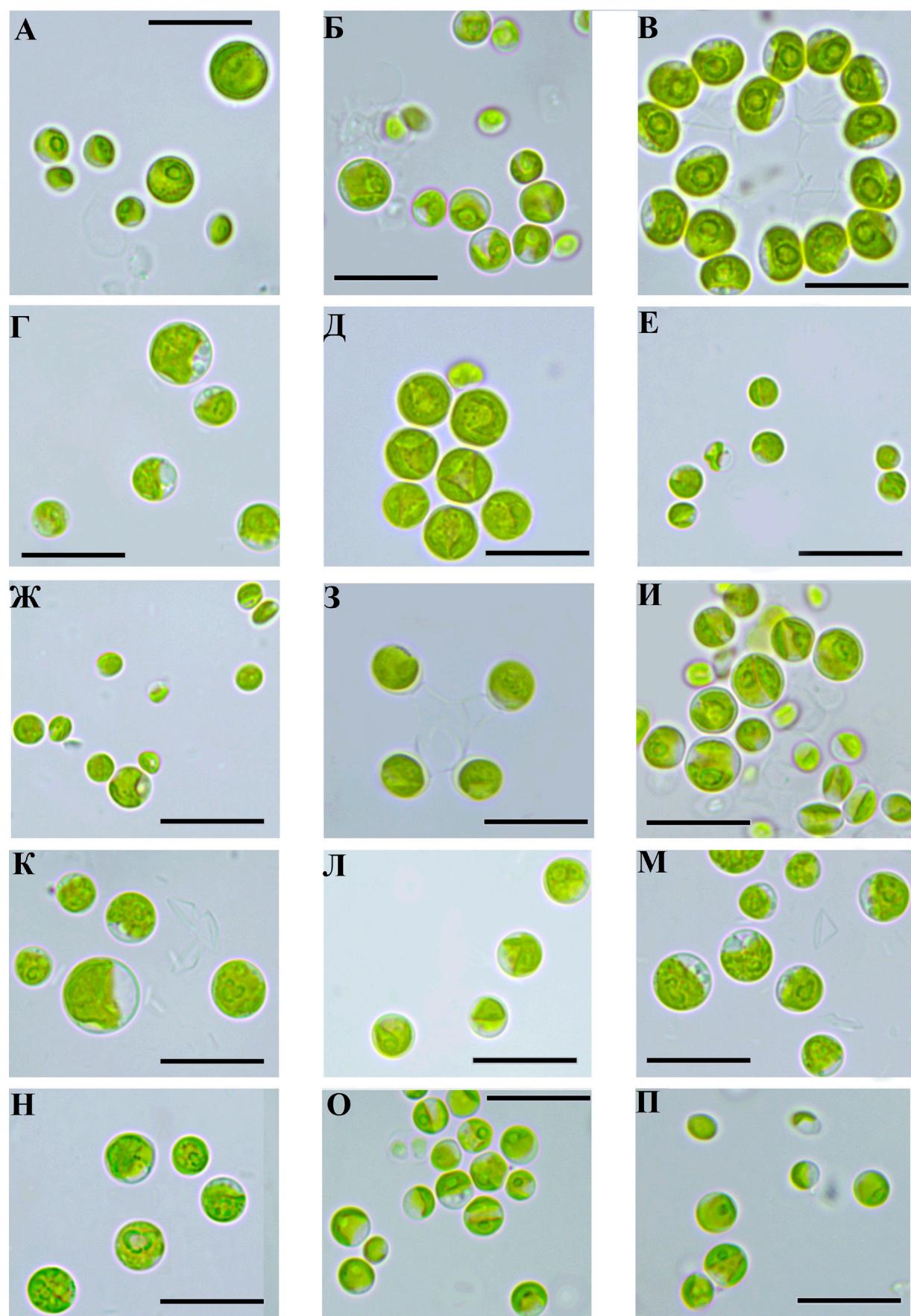


Рис. 2. А – штамм *Chlorella vulgaris* O-31; Б – штамм *C. vulgaris* O-2Par; В – штамм *C. pituita* O-12; Г – штамм *C. variabilis* O-15Par2; Д – штамм *Lobosphaeropsis lobophora* O-34; Е – штамм *Meyerella similis* O-10; Ж – штамм *M. similis* O-11; З – штамм *Brachionococcus ignota* O-15; И – штамм *Micractinium inerme* O-13L; К – штамм *M. lacustre* O-8; Л – штамм *M. kostikovii* O-6; М – штамм *M. conductrix* O-9Par3; Н – штамм *M. pusillum* O-7; О – штамм *C. sorokiniana* O-3; П – штамм *C. sorokiniana* O-14. Шкала – 10 мкм.

Помимо штамма *L. lobophora* SAG 37.88, изолированного В.М. Андреевой из почвы смешанного леса, почвенными обитателями являются *C. lewinii*, *C. volutis* и *M. krienitzii*. Однако штаммы данных видов были выделены либо из почвы вблизи озер в случае *C. Lewinii* или *C. volutis* [28], либо из криогенной трещины, где высокая влажность почвы, как в случае *M. krienitzii* [29]. Информация о том, был ли какой-нибудь водоем вблизи места изоляции штамма SAG 37.88, отсутствует. Тем не менее, обобщая все вышесказанное, не вызывает сомнений, что штамм О-34 относится к виду *L. lobophora*.

Отличительной чертой штаммов О-10 (рис. 2Е) и О-11 (рис. 2Ж) было отсутствие пиреноида, что на этапе предварительной морфологической идентификации позволило предположить их родство с представителями таких родов, как *Meyerella*, *Mychonastes* и *Edaphochloris*. Согласно результатам филогенетического анализа фрагмента ITS1–5.8S–ITS2, они кластеризовались с аутентичным штаммом *Meyerella similis* VKM Al-346 (SH-aLRT – 98%, BP – 100%, PP – 1,00). Генетические дистанции между исследуемыми штаммами составляли менее 0,1% (внутривидовой уровень), CBCs отсутствовали. Пресноводный водоем – типичная среда обитания для представителей *M. similis*. При этом оба исследуемых штамма являлись свободноживущими организмами, хотя среди представителей *M. similis* встречаются и факультативные эндосимбионты [28]. Таким образом, штаммы О-10 и О-11 были идентифицированы как *M. similis*.

Еще одним штаммом, который изначально демонстрировал *Dictyosphaerium*-подобный морфотип, был штамм О-15 (рис. 23). Однако он принадлежал к виду *Brachionococcus ignota*, поскольку кластеризовался с аутентичным штаммом этого вида VKM Al-368 (SH-aLRT – 93%, BP – 99%, PP – 1,00), генетические дистанции между данными штаммами соответствовали внутривидовому уровню (0,4%), а CBCs и иные различия во вторичных структурах ITS1 и ITS2 отсутствовали. Кроме того, как и другие представители рода *Brachionococcus*, штамм О-15 является свободноживущим организмом.

Хотя штаммы О-13L (рис. 2И), О-8 (рис. 2К), О-6 (рис. 2Л), О-9Par3 (рис. 2М) и О-7 (рис. 2Н) имели типичную *Chlorella*-подобную морфологию и не продуцировали щетинки в культуре, филогенетический анализ показал, что они относятся к роду *Micractinium*, представители которого характеризуются морфологической неоднородностью. Исследуемый штамм О-13L кластеризовался с аутентичным штаммом *M. inerum* NIES 2171. Штамм О-8 вошел в одну группу с аутентичным штаммом *M. lacustre* VKM Al-343, штамм О-6 – с аутентичным штаммом *M. kostikovii* VKM Al-198, штамм О-9Par3 – с ау-

тентичным *M. conductrix* SAG 241.80. Штамм О-7 кластеризовался с аутентичным штаммом *M. pusillum*. Во всех случаях статистические поддержки были максимальными. Примечательно, что, в отличие от остальных видов в дикой природе, представители *M. pusillum* способны продуцировать щетинки и формировать колонии, однако при культивировании в отсутствие хищников эти морфологические признаки утрачиваются [29]. Генетические дистанции во всех случаях соответствовали внутривидовому уровню: между О-13L и *M. inerum* NIES 2171 – 0%; между О-8 и *M. lacustre* VKM Al-343 – 0%; между О-6 и *M. kostikovii* VKM Al-198 – 0,2%; между О-9Par3 и *M. conductrix* SAG 241.8 – 0,4%; между штаммом О-7 и *M. pusillum* – 0,4%. CBCs и значимые отличия во вторичной структуре ITS1 и ITS2 не обнаружены. Все штаммы, за исключением О-9Par3, были свободноживущими обитателями планктона. Штамм О-9Par, как и другие представители *M. conductrix*, является obligатным эндосимбионтом инфузорий, так что мог существовать на стандартных средах [6, 24, 26]. Таким образом, штамм О-13L принадлежал к виду *M. inerum*, штамм О-8 – к *M. lacustre*, штамм О-6 – к *M. kostikovii*, штамм О-9Par3 – к *M. conductrix*, штамм О-7 – к *M. pusillum*.

Штаммы О-3 (рис. 2О) и О-14 (рис. 2П) кластеризовались с максимальной статистической поддержкой с аутентичным штаммом *C. sorokiniana* SAG 211-8k. Отличий от классического морфологического описания этого вида не было обнаружено, а генетические дистанции составили 0%. Исследуемые штаммы, как и другие представители *C. sorokiniana*, были свободноживущими обитателями пресноводных водоемов [8, 27]. На основании вышесказанного мы заключили, что штаммы О-3 и О-14 являются представителями *C. sorokiniana*.

## Заключение

Таким образом, с помощью культурального подхода в составе фитопланктона техногенного озера Отстойник, находящегося в процессе самовосстановления после прекращения промышленной эксплуатации, были обнаружены 15 штаммов, относящихся к 12 различным видам клады *Chlorella*. При этом только три штамма являлись истинными представителями рода *Chlorella*. Один штамм относился к роду *Brachionococcus*, один штамм – к роду *Lobosphaeropsis*, шесть штаммов – к роду *Micractinium*, два штамма – к роду *Meyerella*, а два штамма – к видам *C. sorokiniana* и *C. variabilis*. Последние два вида, согласно результатам молекулярно-генетического анализа, на самом деле являются представителями новых родов в рамках клады *Chlorella*, которые пока еще не валидированы [24, 25]. Хотелось бы отметить, что при осуществлении альгомониторинга в 2014 г.

с помощью световой микроскопии в составе фитопланктона данного водоема из «маленьких зеленых шариков» были зафиксированы один вид, отнесенный к роду *Chlorella*, один вид – к роду *Micractinium* и один вид, обладающий *Dictyosphaerium*-подобным морфотипом, на основании чего был причислен к роду *Dictyosphaerium* (клада *Parachlorella*), хотя с определенной долей вероятности это мог быть представитель клады *Chlorella*, например, из рода *Brachionococcus*, что еще раз наглядно демонстрирует необходимость привлечения молекулярных методов для изучения истинного видового богатства фитопланктона. При этом в период активной эксплуатации (до 1996 г.), когда в водоем поступали отходы азотно-тукового производства, водоросли с *Micractinium*-подобным морфотипом не были обнаружены в принципе. Примечательно также, что в период активной техногенной нагрузки общая численность «маленьких зеленых шариков» была крайне низкой и не превышала 96 тыс. кл./л. После прекращения сбросов в 2014 г. их численность существенно возросла и в июне, когда традиционно отмечается пик развития зеленых водорослей в малых водоемах средней полосы России, составляла уже 448 тыс. кл./л [3]. В целом, видовое богатство обнаруженных с помощью молекулярно-генетических методов *Chlorella*-подобных водорослей было весьма высоким. В ходе исследования были обнаружены не только свободноживущие «маленькие зеленые шарики», но и эндосимбионты, в том числе облигатные. Это свидетельствует об усложнении структуры фитопланктона по мере восстановления экосистемы озера и повышения ее устойчивости [30]. При этом общее видовое богатство всех обнаруженных представителей *Chlorella*-клады было выше, чем ранее было показано для сточных вод и иных антропогенно трансформированных водоемов [6–8]. Хотя это является позитивным признаком, не стоит забывать, что подобная ситуация может отчасти быть связана с изначально крайне ограниченным количеством *Chlorella*-подобных штаммов, взятых в анализ в указанных исследованиях. Значительная часть изученных штаммов, за исключением эндосимбионтов, которым необходимо создавать особые условия культивирования, являются перспективными кандидатами для разработки препаратов,

применяемых при биоремедиации водоемов, поскольку изначально адаптированы к выживанию в стрессовых условиях антропогенно трансформированного водоема [8].

Валидная идентификация сложной в морфологическом плане группы *Chlorella*-подобных микроводорослей невозможна с использованием только методов световой микроскопии, так как приводит к занижению фактического биоразнообразия микроводорослей в экосистемах водоемов. Это в свою очередь вносит искажения в результаты при проведении анализа общего состояния биогеоценозов малых урбанизированных водоемов, оценки степени их деградации, а также при разработке программ по их восстановлению. В связи с этим необходимо привлекать современные молекулярно-генетические методы. Главный молекулярно-филогенетический маркер для эукариотических организмов – ядерный ген 18S рРНК – достаточно консервативен и не позволяет успешно разделять близкородственные виды «маленьких зеленых шариков». Гены *rbcL* и *tufA* на данном этапе исследований прочитаны далеко не для всех представителей клады *Chlorella* [24]. В связи с этим, при наличии альгологически чистой культуры наиболее надежным и эффективным методом идентификации может стать амплификация участка ITS1–5.8S–ITS2 или только ITS2 с последующим секвенированием по Сэнгеру. В случае работы непосредственно с природными образцами, чтобы избежать длительного этапа очистки и получения отдельных штаммов, можно использовать амплификацию тех же ДНК-баркодов с последующим высокопроизводительным секвенированием.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Госзадание №ФМРМ-2022-2019, Росрид № 122040100065-3). Также автор выражает признательность Малышевой А.А. и сотрудникам Федерального государственного бюджетного учреждения «Средневолжьвод» за помощь в отборе проб и всестороннюю поддержку. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Автор заявляет об отсутствии конфликтов интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Babanazarova O.V. Northern expansion of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanoprokaryota) observed in shallow highly eutrophic Lake Nero (Russia). *Int. J. Algae.* 2015;17(2):131–141.
2. Korneva L.G. Taxonomic composition and ecology of green algae (Chlorophyta and Streptophyta) in Shaly low Weakly mineralized forest lakes. *Int. J. Algae.* 2012;14(4):331–347.
3. Кривина Е.С., Тарасова Н.Г. Изменения таксономической структуры фитопланктона малых водоемов после прекращения техногенной эксплуатации. *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. естеств. науки.* 2018;160(2):292–307.

4. Blasio M., Balzano S. Fatty acids derivatives from eukaryotic microalgae, pathways and potential applications. *Front. Microbiol.* 2021;12:718933.
5. Sinetova M.A., Sidorov R.A., Starikov A.Y., Voronkov A.S., Medvedeva A.S., Krivova Z.V., Pakholkova M.S., Bachin D.V., Bedbenov V.S., Gabrielyan D.A., Zayadan B.K., Bolatkhhan K., Los D.A. Assessment of biotechnological potential of cyanobacteria and microalgae strains from the IPPAS culture collection. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020;56(7):794–808.
6. Bock C., Krienitz L., Pröschold T. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*. 2011;11(2):293–312.
7. Karpagam R., Preeti R., Jawahar R.K., Saranya S., Ashokkumar B., Varalakshmi P. Fatty acid biosynthesis from a new isolate *Meyerella* sp. N4: molecular characterization, nutrient starvation, and fatty acid profiling for lipid enhancement. *Energ. Fuel.* 2015;29(1):143–149.
8. Suarez-Montes D., Borrell Y.J., Gonzalez J.M., Rico J.M. Isolation and identification of microalgal strains with potential as carotenoids producers from a municipal solid waste landfill. *Sci. Total Environ.* 2022;802:149755.
9. Копырина Л.И. Структура и видовой состав водорослей техногенных водоемов (бассейн р. Анабар, Северо-Западная Якутия). *Совр. пробл. науки образов.* 2016;4:207–213.
10. Мустафаева М.И., Файзиева Ф.А. Преобладающие виды водорослей биологических прудов очистных сооружений. *Нац. ассоц. уч.* 2016;(4–1(20)):100–101.
11. Spanner C., Darienko T., Biebler T., Sonntag B., Pröschold, T. Endosymbiotic green algae in *Paramecium bursaria*: a new isolation method and a simple diagnostic PCR approach for the identification. *Diversity*, 2020;12(6):240.
12. Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. [Электронный ресурс]. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. 2025. URL: <http://www.algaebase.org> (дата обращения: 16.07.2025).
13. Johnson J.L., Fawley M.W., Fawley K.P. The diversity of *Scenedesmus* and *Desmodesmus* (Chlorophyceae) in Itasca State Park, Minnesota, USA. *Phycologia*. 2007;46(2):214–229.
14. Seibel P.N., Müller T., Dandekar T., Schultz J., Wolf M. 4SALE: a tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. *BMC Bioinform.* 2006;7(1):498.
15. Coleman A.W. Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure. *Trends Genet.* 2015;31(3):157–163.
16. Bock C., Proschold T., Krienitz L. Two new *Dityosphaerium*-morphotype lineages of the Chlorellaceae (Trebouxiophyceae): *Heynigia* gen. nov. and *Hindakia* gen. nov. *Eur. J. Phycol.* 2010;45(3):267–277.
17. Hoshina R., Nakada T. *Carolibrandia* nom. nov. as a replacement name for *Brandtia* Hoshina (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *Phycol. Res.* 2018;66(1):82–83.
18. Krivina E.S., 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.* 2023a;71(2):103042.
19. Krivina E.S., Boldina O.N., Bukin Y.S., Bykova S.V., Temraleeva, A.D. Species delimitation polyphasic approach reveals *Meyerella similis* sp. nov.: a new species of “small green balls” within the Chlorella-clade (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Org. Divers. Evol.* 2023;23(1):25–40.
20. Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor, O., Schrempf D., Woodhams M.D., von Haeseler A., Lanfear R. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol. Biol. Evol.* 2020;37(5):1530–1534.
21. Barido-Sottani J., Boskova V., Du Plessis L., Kuhnen D., Magnus C., Mitov V., Muller N.F., Pecerska J., Rasmussen D.A., Zhan, C., Rasmussen D.A., Zhang C., Drummond A.J., Heath T.A., Pybus O.G., Vaughan T.G., Stadler T. Taming the BEAST—A community teaching material resource for BEAST2. *Syst. Biol.* 2018;67(1):170–174.
22. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021;38(7):3022–3027.
23. Krivina E., Portnov A., Temraleeva A. A description of *Aliichlorella ignota* gen. et sp. nov. and a comparison of the efficiency of species delimitation methods in the Chlorella-clade (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Phycol. Res.* 2024;72(3):180–190.
24. Krivina E.S., Temraleeva A.D. Identification problems and cryptic diversity of Chlorella-clade microalgae (Chlorophyta). *Microbiology*. 2020;89(6):720–732.
25. Chae H., Kim E.J., Kim H.S., Choi H.-G., Kim S., Kim J.H. Morphology and phylogenetic relationships of two Antarctic strains within the genera *Carolibrandia* and *Chlorella* (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *Algae*. 2023;38(4):241–252.
26. Pröschold T., Darienko T., Silva P. C., Reisser W., Krienitz L. The systematics of “Zoochlorella” revisited employing an integrative approach. *Environ. Microbiol.* 2011;13(2):350–364.
27. Андеева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). СПб.: Наука; 1998. 351 с.
28. Krivina E.S., Savchenko T.V., Tebina E.M., Shatilovich A.V., Temraleeva A.D. Morphology, phylogeny and fatty acid profiles of *Meyerella similis* from freshwater ponds and *Meyerella krienitzii* sp. nov. from soil (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* 2023;35(5):2295–2307.
29. Luo W., Pflugmacher S., Pröschold T., Walz N., Krienitz L. Genotype versus phenotype variability in *Chlorella* and *Micractinium* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Protist*. 2006;157(3):315–333.
30. Романенко В.Д. *Основы гидроэкологии*. К.: Генеза; 2004. 664 с.

Поступила в редакцию 06.04.2025

После доработки 17.07.2025

Принята в печать 01.09.2025

## RESEARCH ARTICLE

## Representatives of the genus *Chlorella* in a technogenic lake Otstoynik (Samara region, Russia) during the self-healing period

E.S. Krivina 

*All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, 5 Institutskaya St., Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia*  
*e-mail: pepelisa@yandex.ru*

This article presents the results of a study of the species diversity of representatives of the clade *Chlorella* in the lake Otstoynik (Tolyatti, Samara region). This reservoir was used until 1996 for the disposal of nitrogen-tuck production waste but is currently at the stage of self-healing. In the course of the work, 15 strains of microalgae with *Chlorella*-like morphology were studied. Based on the results of molecular genetic analysis using the internal transcribed spacers ITS1 and ITS2, it was found that only 3 strains were true representatives of the genus *Chlorella*. Microalgae from the genera *Brachionococcus*, *Lobosphaeropsis*, *Micractinium*, and *Meyerella* were also found. In addition, 2 strains belonged to species that are still formally classified as *Chlorella*, but their actual taxonomic status needs to be clarified. This study has once again clearly shown that valid identification of *Chlorella*-like microalgae is not possible using only light microscopy methods. Methods of molecular genetic analysis must be used to study the true species' richness.

**Keywords:** *microalgae, cryptic diversity, algomonitoring, cultural approach, phytoplankton, ITS1–5.8S–ITS2*

**Funding:** The work was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (State Assignment no. FMRM-2022-2019, Rosrid no. 122040100065-3). The author also expresses gratitude to Malysheva A.A. and the staff of the FSBI “Srednevolzhryvod” for their assistance in sampling and comprehensive support.

### Сведения об авторе

*Кривина Елена Сергеевна* – канд. биол. наук, науч. сотр. отдела Всероссийской коллекции микроорганизмов ИБФМ РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Тел.: 8-4967-73-86-20; e-mail: pepelisa@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0849-5832>