

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И АЗОТНОГО ГОЛОДАНИЯ НА МОРФО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДВУХ ШТАММОВ ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ РОДА *Lobosphaera* sp. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae)

© 2023 г. К. А. Шибзухова^a, *, О. Б. Чивкунова^a, Е. С. Лобакова^a

^aМосковский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: shibzuhovaKA@my.msu.ru

Поступила в редакцию 19.12.2022 г.

После доработки 22.12.2022 г.

Принята к публикации 22.12.2022 г.

Впервые изучено одновременное воздействие азотного голодания и температурного шока на физиологию и ультраструктуру клеток двух штаммов микроводорослей рода *Lobosphaera* — NAMSU 924/2 и NAMSU (CALU) 1497. Дефицит азота у обоих штаммов приводил к снижению содержания хлорофилла в 3 раза и увеличению доли каротиноидов в 2 раза. При температуре +10°C наблюдалось снижение содержания как хлорофилла, так и каротиноидов. Одновременное воздействие двух факторов проявлялось в снижении содержания хлорофилла в 3 раза у NAMSU 924/2, и в 6 раз — у NAMSU (CALU) 1497, доля каротиноидов у обоих штаммов уменьшалась в 1.5–2 раза. Получены данные по ультраструктурным изменениям клеток микроводорослей рода *Lobosphaera* при воздействии стрессовых факторов. Отмечен сходный характер ответа у обоих штаммов на стрессовые условия. Дефицит азота приводил к накоплению в цитоплазме клеток вдоль клеточной стенки многочисленных липидных глобул. Длительная инкубация на безазотной среде приводила к заполнению всего объема клеток липидными глобулами, разборке мембранной системы хлоропластов, их уменьшению в размерах, располагаясь между плотно лежащими липидными глобулами. При низкой температуре уменьшалось число тилакоидов, увеличивались межтилакоидное пространство и размеры хлоропластов. При одновременном воздействии азотного голодания и низкой температуры накапливались многочисленные липидные глобулы, уменьшалось число тилакоидов, увеличивались межтилакоидное пространство и размер хлоропластов, отмеченные при отдельном воздействии стрессовых факторов. Пиреноид у обоих штаммов во всех случаях не претерпевал существенных изменений.

Ключевые слова: *Lobosphaera*, азотное голодание, жирные кислоты, микроводоросли, низкие температуры, пигменты, стрессовые факторы, ультраструктура, физиология

DOI: 10.31857/S0015330322600772, EDN: IBUSDD

ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли (МВ) в стрессовых условиях характеризуются способностью к накоплению в значительных количествах ценных для человека метаболитов — белков, углеводов, полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), минералов, витаминов, антиоксидантов и микоспорин-подобных аминокислот [1–3]. К стрессовым факторам, как правило, относятся свет высокой интенсивности, дефицит элементов минерального питания, а также осмотический и температурный шок. Синтез и накопление в клетках метаболитов представляют собой адаптивный ответ на воздействие неблагоприятных условий [4–7]. Интерес к таким МВ обусловлен возможностью их использования для производства пищевых добавок, красите-

лей, антиоксидантов, ПНЖК, токсинов, удобрений и мн. др. [8–10].

Почвенные зеленые МВ рода *Lobosphaera* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) характеризуются высокой адаптационной пластичностью. В процессе адаптации к стрессовым условиям МВ накапливают длинноцепочечную ω-6-полиненасыщенную арахидоновую жирную кислоту (С20:4), а также в меньших количествах эйкозапентаеновую (ЭПК, С20:5) и докозагексаеновую (ДГК, С22:6) кислоты. Рядом исследователей отмечено накопление ПНЖК в рекордных количествах, что позволяет рассматривать данные МВ как природные растительные источники отмеченных ПНЖК. В то же время отмечено, что содержание жирных кислот (ЖК) варьируется как среди видов внутри рода, так и среди изолятов и штаммов одного вида [11, 12].

На сегодняшний день ведется поиск условий культивирования для увеличения содержания ПНЖК в клетках МВ, а также штаммов МВ, характеризующихся максимальным содержанием ЖК, и как следствие, для повышения выхода целевого продукта.

Предлагаемая статья посвящена сравнительной характеристике морфологических и физиологических особенностей двух коллекционных штаммов *Lobosphaera* sp., продуцентов ценных для человека ПНЖК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Для исследований были выбраны штаммы МВ *Lobosphaera* sp. NAMSU 924/2 и NAMSU (CALU) 1497. В исходных образцах было отмечено появление колоний с разной морфологией, которые были пересеяны в отдельные чашки и велась как отдельные линии. Полученные штаммы альгологически чистых культур были депонированы в “Коллекцию биотехнологически значимых микроводорослей Национального банка-депозитария живых систем “Ноев Ковчег” (NAMSU)” с присвоением соответствующих идентификационных номеров.

Условия культивирования

Культивирование штаммов МВ проводили в конических колбах Эрленмейера при температуре +23°C, постоянном освещении белым светом 40 мкмоль квантов ФАР м⁻² с⁻¹ на модифицированной минеральной среде BG-11 [13] с добавлением KNO₃ (BG-11_K): NaNO₃ — 1.5 г/л; KNO₃ — 1.78 г/л; K₂HPO₄ — 0.04 г/л; MgSO₄·7H₂O — 0.075 г/л; CaCl₂·2H₂O — 0.036 г/л; лимонная кислота — 0.006 г/л; FeNH₄-citr — 0.006 г/л; Na₂EDTA — 0.001 г/л; Na₂CO₃ — 0.02 г/л. Раствор микроэлементов (1 мл/л): H₃BO₃ — 1.43 г/500 мл; MnCl₂·4H₂O — 0.905 г/500 мл; ZnSO₄·7H₂O — 0.11 г/500 мл; Na₂MoO₄·2H₂O — 0.195 г/500 мл; CuSO₄·5H₂O — 0.0395 г/500 мл; Co(NO₃)₂·6H₂O — 0.0247 г/500 мл.

Стрессовые условия (дефицит азота в среде культивирования, низкие температуры) моделировали путем культивирования МВ на минеральной среде BG-11_K без добавления азота и при снижении температуры до +10°C.

Методы исследования

Изучение морфологии, описание жизненного цикла и оценку состояния культур МВ проводили с применением методов светопольной микроскопии при использовании светового микроскопа Leica DM-2500 LED (Leica, Германия), оснащенного фотокамерой DFC-7000T (Leica, Германия).

Изучение микроморфологии поверхности клеточной стенки проводили с применением сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (JEOL Ltd., Япония) с ускоряющим напряжением 15 кВ Межкафедральной Лаборатории Электронной Микроскопии биологического факультета Центра коллективного пользования МГУ им. М.В. Ломоносова. Биомассу клеток фиксировали в 2% глутаровом альдегиде на 0.1 М какодилатном буфере (pH 7.4) с последующим обезвоживанием в градиенте этанола, высушиванием и напылением образцов, согласно методике Gorelova et al. [14].

Исследование ультраструктурных особенностей клеток штаммов проводили с использованием трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL Ltd., Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и цифровой фотокамерой ORIUS SC1000W (Gatan, США) в Межкафедральной Лаборатории Электронной Микроскопии биологического факультета Центра коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова. Биомассу клеток фиксировали в 2% глутаровом альдегиде на 0.1 М какодилатном буфере (pH 7.4) с последующей дофиксацией в 1% растворе OsO₄ [14]. Для дальнейшей заливки была использована смесь эпоксидной смолы Araldite (Sigma-Aldrich, Германия). Серийные ультратонкие срезы были получены на ультрамикротоме LKB-4800 (Broma, Швеция), которые дополнительно контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу [15].

Определение профиля жирных кислот суммарных липидов биомассы микроводорослей

Для оценки профиля жирных кислот (ЖК) суммарных липидов был применен метод газожидкостной хроматографии с использованием газового хроматографа Agilent 7890A (Agilent Technologies, США), оборудованного 30-метровой капиллярной колонкой HP-5MS UI (30 м × 0.25 мм × 0.25 мкм) (Agilent, США) и соединенного с квадрупольным масс-спектрометром Agilent 5975C (Agilent Technologies, США). В качестве газа-носителя использовался гелий со скоростью потока 1 мл/мин. Экстракция липидов проводилась по методу Фолча [14, 16]. В качестве внутреннего стандарта была выбрана маргариновая кислота (C17:0). Для идентификации ЖК был использован набор стандартов (Sigma, США). Относительное содержание ЖК определяли в весовых процентах от суммарного содержания в пробе. Коэффициент ненасыщенности ЖК определяли как описано ранее [17] и рассчитывали по формуле:

$$K = \Sigma UFA / \Sigma SFA,$$

где K — коэффициент ненасыщенности, ΣUFA — суммарное содержание ненасыщенных жирных

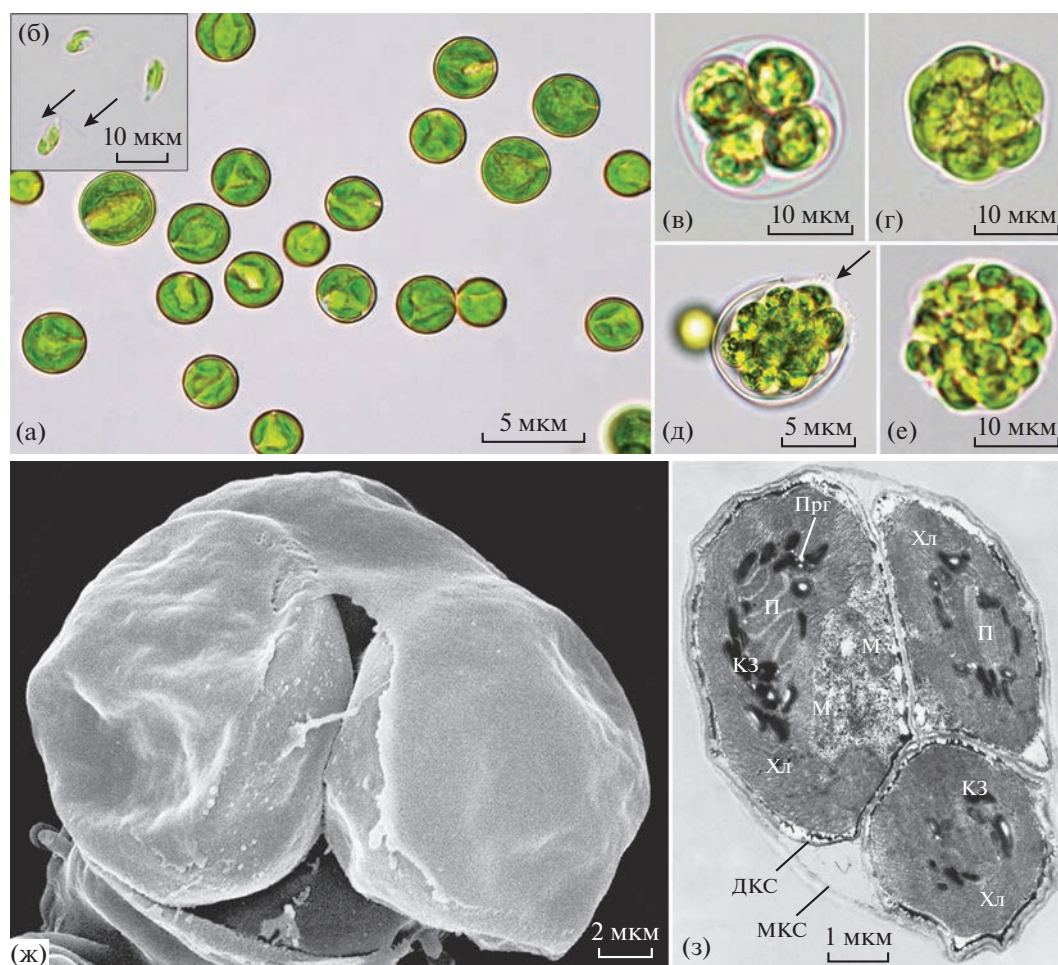


Рис. 1. Жизненные стадии исследованных МВ (микрографии СвМ): (а) – вегетативные клетки на примере NAMSU 924/2, (б) – зооспоры с двумя жгутиками (указаны стрелками) на примере NAMSU 924/2, (в) – автоспорангий с автоспорами на примере NAMSU (CALU) 1497, (г) – зооспорангий с зооспорами на примере NAMSU 924/2, (д) – высвобождение автоспор на примере NAMSU (CALU) 1497, (е) – апланоспорангий с апланоспорами на примере NAMSU (CALU) 1497. Ультраструктурная организация спорангиев изученных штаммов МВ: (ж) – автоспорангий на примере штамма NAMSU (CALU) 1497 (микрография СЭМ), (з) – автоспорангий на примере NAMSU (CALU) 1497 (микрография ТЭМ). ДКС – клеточная стенка дочерних клеток, КЗ – крахмальные зерна, М – митохондрия, МКС – клеточная стенка материнской клетки-спорангия, П – пиреноид, Прг – пиреноглобулы, Хл – хлоропласт.

кислот (вес. %), ΣSFA – суммарное содержание насыщенных жирных кислот (вес. %) в пробе.

В ходе экстракции ЖК был также проведен анализ содержания пигментов с применением спектрофотометрического метода. Расчет пигментов в хлороформной фракции проводили согласно Wellburn [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

На всех стадиях роста в культурах *Lobosphaera* sp. 924/2 и *Lobosphaera* sp. 1497 доминирующей жизненной формой являлись неподвижные одиночные сферические вегетативные клетки, диаметр клеток достигал 4–20 мкм у *Lobosphaera* sp. 924/2 и 7–20 мкм у *Lobosphaera* sp. 1497 (рис. 1а). В жизненном цикле штаммов были отмечены подвиж-

ные зооспоры грушевидной, яйцевидной и шаровидной формы с двумя изоконтными жгутиками на апикальном конце клетки, достигающими в длину 10 мкм (рис. 1б). Половое размножение не было отмечено. Помимо зооспор присутствовали вегетативные клетки, автоспорангии с 4–8 автоспорами и апланоспорангии с 32–64 апланоспорами (рис. 1в, е). Высвобождение автоспор и апланоспор происходило путем разрыва материнской оболочки спорангия (рис. 1г).

В культурах *Lobosphaera* sp. 924/2 и *Lobosphaera* sp. 1497 методом сканирующей электронной микроскопии были обнаружены клетки с двумя типами клеточной поверхности – войлочной и гладкой. Для первой было характерно наличие фибрилл до 50 нм толщиной, которые переплетаясь формировали так называемый “войлоч-

Таблица 1. Состав жирных кислот суммарных липидов штаммов MB *Lobosphaera* sp. NAMSU 924/2 и *Lobosphaera* sp. NAMSU (CALU) 1497

ЖК, вес. %	NAMSU 924/2	NAMSU (CALU) 1497
C16:0	18.4	18.4
C18:0	4.5	1.9
C18:1 Δ^9	7.4	19.5
C18:1 Δ^{11}	5.4	7.6
C18:2 $\Delta^{9,12}$	7.9	15.5
C18:3 $\Delta^{9,12,15}$	8.4	7.6
C18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$	0.5	5.3
C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$	24.1	18.9
C20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$	8.8	2.5

Примечание. Приведены преобладающие жирные кислоты, содержание которых превышало 4.5 вес. % хотя бы в одном из изученных штаммов, по истечении 7 сут. культивирования при +23°C и постоянном освещении.

ный” слой [19], для второй — гладкая, без выростов и фибрилл (рис. 1ж, 2а).

По результатам исследований ультратонких срезов (ТЭМ) клеточная стенка обоих штаммов микроводорослей состояла из двух слоев. К внешнему осмифильному слою клеточной стенки прикреплялись тонкие разветвленные переплетенные гликопротеиновые фибриллы. Внешний слой клеточной стенки обладал кистевидной структурой с многочисленными канал-образными участками низкой электронной плотности и достигал в толщину 20–40 нм у штамма *Lobosphaera* sp. 924/2 и 40–70 нм у *Lobosphaera* sp. 1497. Внутренний слой клеточной стенки характеризовался низкой электронной плотностью и толщиной 40–190 нм у *Lobosphaera* sp. 924/2 и 100–150 нм у *Lobosphaera* sp. 1497 (рис. 2б).

Пластидом вегетативных клеток штаммов был представлен одним крупным париетальным чашевидным двухмембранным хлоропластом с двумя долями, занимающим большую часть объема клетки (рис. 2в). Тилакоиды в строме собраны в протяженные граны. В строме хлоропласта выявлялся один пиреноид диаметром 1–3 мкм, пронизанный параллельными интрапиреноидными тилакоидами (рис. 2г). Вокруг пиреноида между интрапиреноидными тилакоидами располагались крахмальные зерна, образуя фрагментированную крахмальную обкладку (рис. 2г). Кроме того, крахмал откладывался в виде одиночных стромальных зерен между стромальными ламеллами. Вокруг пиреноида располагались отдельные пиреноглобулы, связанные с тилакоидными мембранами пиреноидного матрикса (рис. 2г). Хондриом вегетативных клеток обоих штаммов микроводорослей был представлен митохондриями с пластинчатыми кристами (рис. 2в). Клетки обоих штаммов содержали одно округлое или эллиптическое (на поперечном срезе) ядро с одним ядрышком (рис. 2в).

В цитоплазме клеток были рассеяны единичные мелкие вакуоли, в которых встречались электронно-плотные включения. По периферии вдоль клеточной стенки были отмечены мелкие одиночные, иногда сливающиеся крупные липидные глобулы (рис. 2б).

Изученные штаммы MB характеризовались, типичным для отдела Chlorophyta, пигментным составом [20–22]. На основании спектров поглощения экстрактов биомассы, были выявлены максимумы хлорофиллов *Хл а* (666 нм и 433 нм) и *б* (плечо около 650 нм), а также плечо в диапазоне 460–490 нм, присущие каротиноидам (рис. 3).

Исследованные штаммы характеризовались способностью к синтезу в значительных количествах кислоты-биомаркера — ω -6-полиненасыщенной арахидоновой кислоты (C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$). Ее содержание достигало 23–25 вес. % у *Lobosphaera* sp. 924/2 и 15–18 вес. % у штамма *Lobosphaera* sp. 1497 (табл. 1).

Особенности воздействия стрессовых условий на микроводоросли

Изменения пигментного состава клеток

При культивировании клеток штамма *Lobosphaera* sp. 924/2 на безазотной среде при температуре +23°C отмечалось значительное (в 3 раза) снижение содержания в клетках хлорофилла (*Хл*) (рис. 4а), увеличение доли каротиноидов (*Кар*) — в 2 раза (рис. 4б), при этом соотношение каротиноидов к хлорофиллу (*Кар/Хл*) увеличивалось в 1.5 раза (рис. 4в). Культивирование при температуре +10°C на полной среде приводило к снижению содержания как *Хл*, так и *Кар* (в 2 раза). При одновременном воздействии дефицита азота и снижения температуры на клетки микроводорослей количество *Хл* в биомассе снижалось в

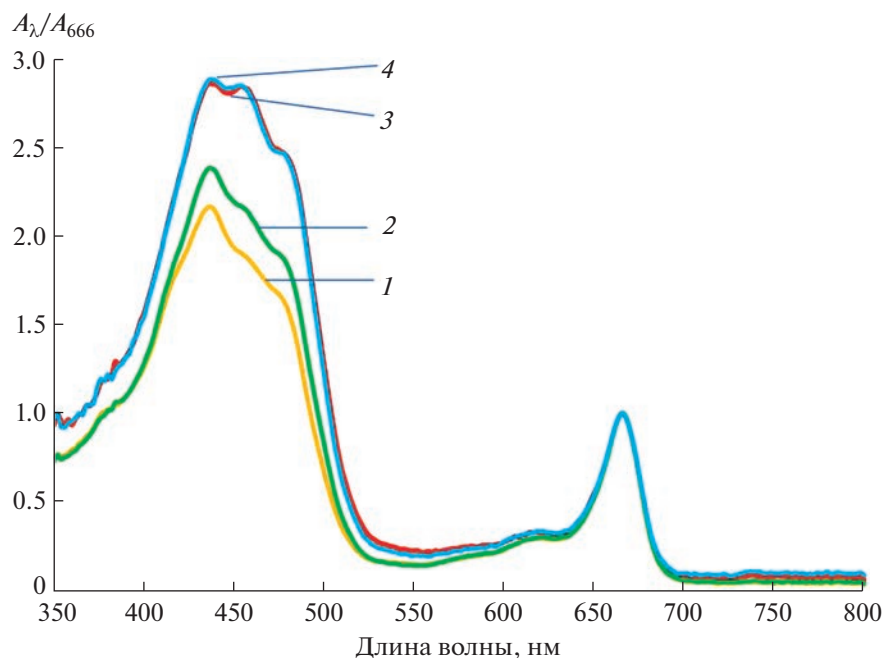


Рис. 3. Спектры поглощения (нормированные на 666 нм) пигментов клеток на примере *Lobosphaera* sp. NAMSU 924/2 при культивировании: (1) на полной среде при +23°C, (2) при снижении температуры до +10°C, (3) на безазотной среде при +23°C и (4) на безазотной среде при +10°C.

арахидоновой кислоты, тогда как выращивание при температуре +10°C не приводило к существенным изменениям ее содержания. Культивирование в условиях одновременного воздействия двух факторов (дефицита азота и низкой температуры +10°C) приводило к большему накоплению маркерной кислоты ω -6-полиненасыщенной арахидоновой кислоты (C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$) в суммарной фракции липидов клеток до 35 вес. %.

Морфологические изменения клеток микроводорослей при воздействии стрессовых факторов

В ходе инкубации микроводорослей на безазотной среде клетки штаммов *Lobosphaera* sp. 924/2 и *Lobosphaera* sp. 1497 меняли окраску на светло-желтую, а при воздействии низкой температуры изменение окраски их клеток не происходило. Однако при температуре +10°C у обоих штаммов наблюдалось массовое формирование зооспорангиев и зооспор с двумя изоконтными жгутиками.

Ультраструктурные изменения клеток обоих штаммов микроводорослей при инкубации в условиях дефицита азота в среде имели сходный характер. В течение первых 14 сут. не отмечено изменение формы и размеров хлоропласта. Однако выявлено накопление вокруг пиреноида пиреноглобул, в строме хлоропластов — многочисленных пластоглобул и крахмальных зерен. В цитоплазме клеток отмечено накопление вдоль клеточной стенки

многочисленных липидных глобул разной формы и размеров (рис. 5а).

Длительная инкубация (более 14 сут.) на безазотной среде приводила к постепенному заполнению всего объема клеток липидными глобулами (рис. 5б). При этом в результате разборки большей части мембранной системы, хлоропласты уменьшались в размерах, располагаясь между плотно лежащими липидными глобулами (рис. 5б). Пиреноид у штаммов в условиях дефицита азота не претерпевал существенных изменений. Даже при длительной инкубации клеток на безазотной среде четко выявлялась ультраструктура пиреноида с многочисленными интрапиреноидными тилакоидами, фрагментированной крахмальной обкладкой и пиреноглобулами.

Инкубация при низкой температуре приводила к значительным изменениям в структуре хлоропластов: отмечено уменьшение числа тилакоидов в гранах в результате разборки мембранной системы, увеличение межтилакоидного пространства, и, как следствие, увеличение размеров хлоропластов (рис. 5в, г). При этом клеточная стенка и пиреноид, как и в случае инкубации микроводорослей в условиях дефицита азота, не претерпевали структурных изменений (рис. 5в, г).

В ходе инкубации микроводорослей *Lobosphaera* sp. 924/2 и *Lobosphaera* sp. 1497 на безазотной среде при низкой температуре отмечались ультраструктурные изменения пластидома и накопление липидных глобул. В клетках выявлялись

многочисленные разнообразные по форме и размеру, иногда сливающиеся крупные липидные глобулы, занимающие большую площадь среза клетки (рис. 5д). Как и в случае действия низкой температуры, в хлоропластах отмечено уменьшение числа тилакоидов, увеличение межтилакоидного пространства (рис. 5д). Пиреноид не претерпевал ультраструктурных изменений (рис. 5д).

ОБСУЖДЕНИЕ

Интерес к МВ обусловлен их уникальным составом и высоким потенциалом в качестве природных источников-продуцентов для пищевой, фармацевтической, химической, косметической промышленности и сельского хозяйства [2, 3, 23].

Липиды некоторых штаммов МВ особенно богаты ценными для человека ПНЖК такими, как линолевая (C18:2), α -линоленовая (C18:3), арахидоновая (C20:4), эйкозапентаеновая (C20:5) и докозагексаеновая (C22:6) [24].

Исследованные штаммы МВ рода *Lobosphaera* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) характеризуются способностью к синтезу в значительных количествах кислоты-биомаркера — ω -6-полиненасыщенной арахидоновой кислоты. Однако качественный и количественный состав ПНЖК является штамм-специфичным, а также зависит от условий культивирования. Накопление ПНЖК рассматривается как адаптивный ответ и защитная реакция клеток МВ на воздействие стрессовых факторов. В оптимальных для роста условиях МВ характеризуются активным ростом числа клеток, синтезом мембранных и хлоропластных липидов. Тогда как, в стрессовых условиях наступает, так называемая липогенная фаза, сопровождающаяся редукцией фотосинтетического аппарата, разборкой мембранных систем хлоропластов, снижением скорости деления клеток, а в некоторых случаях остановкой клеточных делений. Как следствие, в клетках увеличивается содержание ЖК, накапливаются триацилглицериды и неполярные липиды, а также каротиноиды [4, 25–28]. Синтезированные *de novo* ПНЖК откладываются в виде липидных глобул в цитоплазме. Кроме того, отмечаются случаи формирования глобул, так называемых пластоглобул, между тилакоидами хлоропластов [4, 29].

Стрессовые условия культивирования МВ существенно влияют на ультраструктуру клеток. При этом воздействие стрессовых факторов по отдельности и совместно является штамм-специфичным. Ранее было показано, что при инкубации клеток *Parietochloris incisa* (*Lobosphaera incisa*) в условиях дефицита азота наблюдается уменьшение размеров хлоропласта и накопление липидных глобул в цитоплазме [30]. В проведенных нами исследованиях для штаммов *Lobosphaera* sp. NAMSU 924/2 и *Lobosphaera* sp. NAMSU (CALU) 1497 были пока-

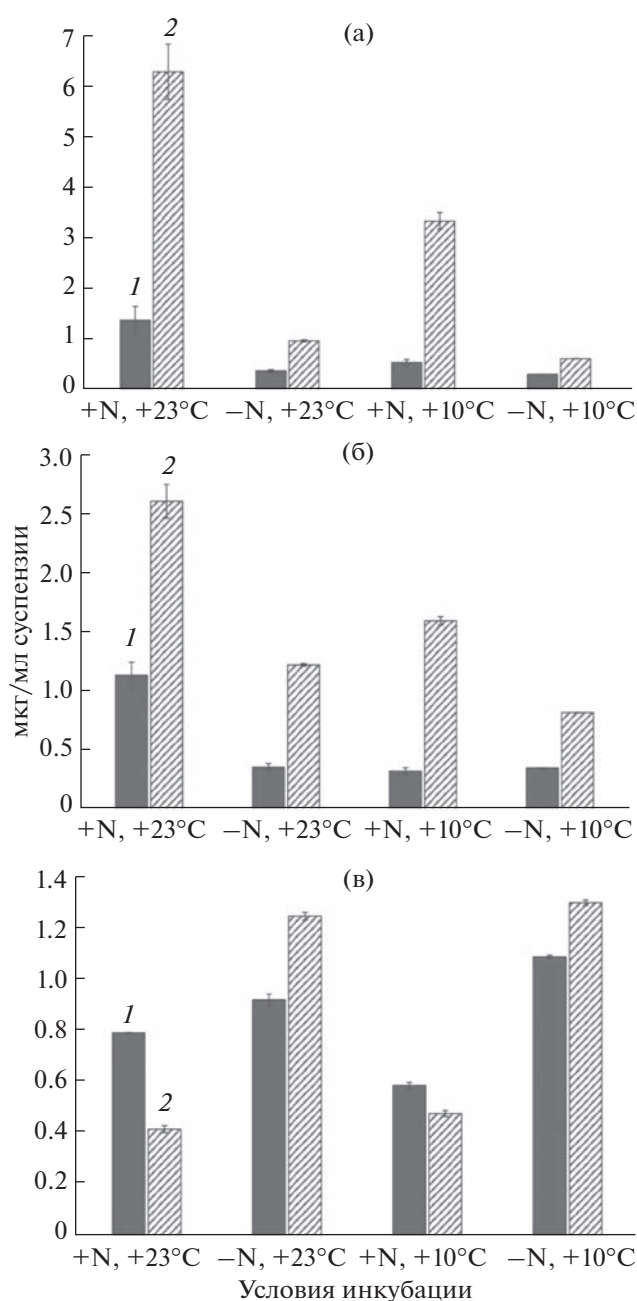


Рис. 4. Динамика изменения содержания (а) хлорофилла, (б) каротиноидов и (в) соотношения каротиноидов к хлорофиллу в клетках исследованных штаммов (1) NAMSU 924/2 и (2) NAMSU (CALU) 1497 при воздействии стрессовых факторов.

заны сходные ультраструктурные изменения при дефиците азота. Тогда как при низкой температуре отмечалась редукция мембранных систем хлоропластов, увеличивалось межтилакоидное пространство, что приводило к “набуханию” хлоропласта, что проявлялось в увеличении размеров хлоропласта. Это также соответствует изменениям морфологии клеток. В частности, при инкуба-

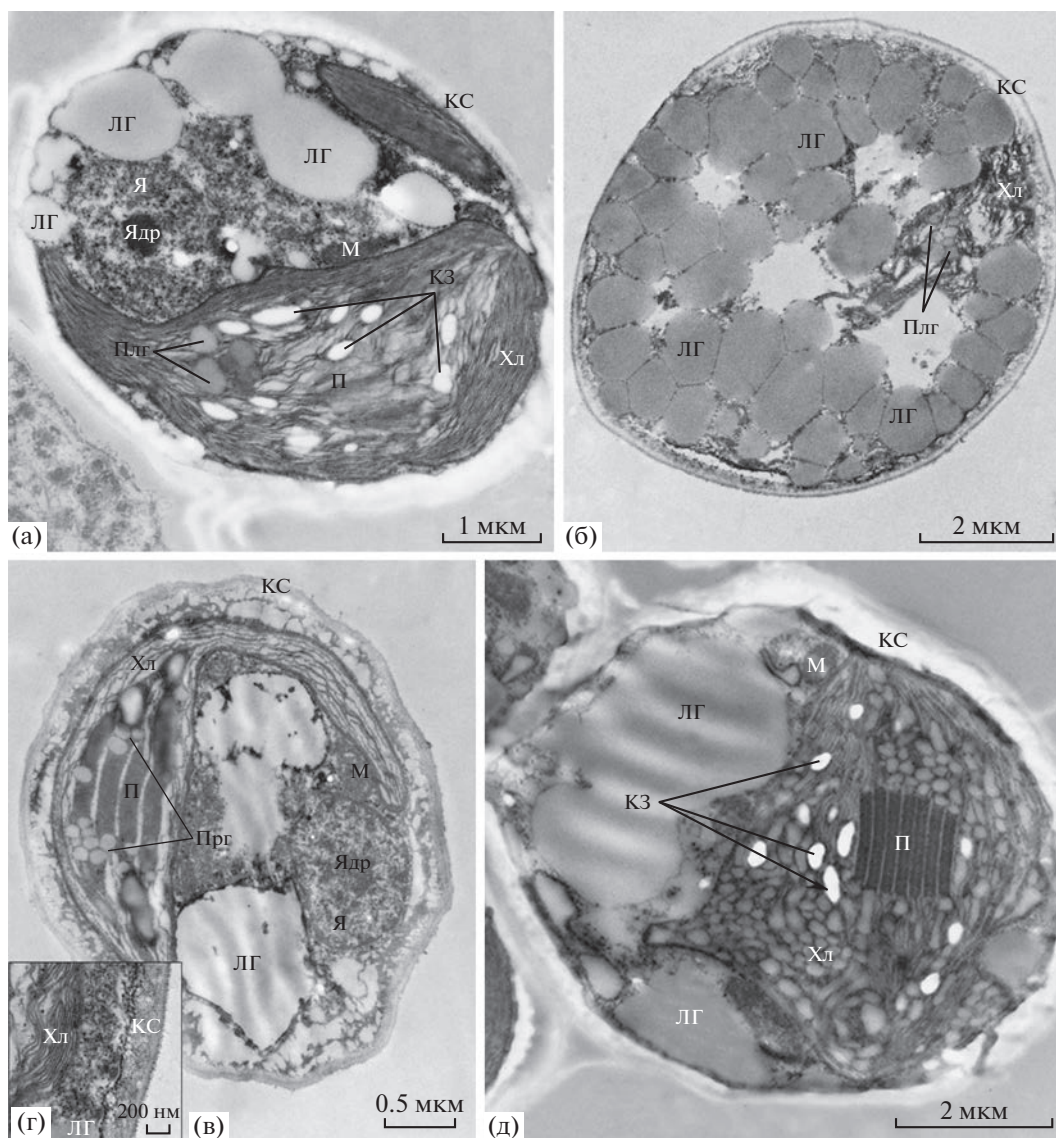


Рис. 5. Особенности ультраструктурной организации клеток штаммов при воздействии стрессовых факторов (микрo-
 графии ТЭМ): (а) общий вид вегетативной клетки при инкубации на безазотной среде BG-11_к и температуре +23°C
 на примере NAMSU (CALU) 1497; (б) общий вид вегетативной клетки при длительной (более 14 сут.) инкубации на
 безазотной среде BG-11_к и температуре +23°C на примере NAMSU 924/2; (в) общий вид вегетативной клетки на
 примере NAMSU (CALU) 1497 и (г) фрагмент клеточной стенки на примере NAMSU 924/2 при снижении температуры до +10°C;
 (д) общий вид вегетативной клетки при инкубации на безазотной среде BG-11_к и температуре +10°C. КЗ — крахмаль-
 ные зерна, КС — клеточная стенка, ЛГ — липидная глобула, М — митохондрия, П — пиреноид, Прг — пиреноглобулы,
 Плг — пластоглобулы, Хл — хлоропласт, ПМ — плазматическая мембрана, Я — ядро, Ядр — ядрышко.

ции в условиях дефицита азота клетки меняли окраску, что связано было со снижением содержания хлорофилла и увеличение доли каротиноидов в клетках.

Для *Parietochloris incisa* (*Lobosphaera incisa*) исследовано влияние азотного голодания и света высокой интенсивности на состав пигментов, ЖК и ультраструктуру [30–32]. Тогда как, данные по воздействию низких температур и сочетанного воздействия низких температур и азотного голо-

дания на МВ рода *Lobosphaera* в доступной литературе отсутствуют.

Исследование новых штаммов рода *Lobosphaera* показало гетерогенность штаммов как по морфологическим, так и физиологическим признакам. Одновременно в популяции исследованных штаммов были отмечены клетки разных стадий жизненного цикла. По всей видимости, многообразие морфотипов зооспор (от грушевидных до сферических) связано с наличием их переходных форм в ходе развития до вегетативных клеток [33].

Различия в структуре клеточной поверхности также связаны со стадиями жизненного цикла. Отмечено, что клеточная стенка “молодых” клеток (размером 3–6 мкм) отличалась наличием войлочного слоя, тогда как “зрелые” клетки (размером 20–30 мкм) имели гладкую поверхность. В тоже время поверхность автоспорангиев и апланоспорангиев была гладкой и лишенной фибрилл и бородавок. Тогда как для всех дочерних клеток (спор), в том числе и не освобожденных, были отмечены поверхностные структуры. При этом, ультраструктура клеток МВ обоих штаммов имела типичное строение для представителей рода *Lobosphaera* [30, 34].

Ультраструктурные и физиологические изменения клеток МВ *Parietochloris incisa* (*Lobosphaera incisa*) в условиях стресса (азотного голодания и высокой интенсивности света) было описано ранее [30]. Однако влияние низких температур на физиологию и ультраструктуру клеток МВ данного рода ранее не описывалось.

Отмеченные нами ультраструктурные изменения при инкубации в условиях азота соответствуют ранее описанным для *Lobosphaera incisa* (*Parietochloris*) [30, 35]. Характер ультраструктурных изменений при воздействии низких температур отличался от таковых при влиянии азотного голодания, что проявлялось в существенных изменениях в структуре хлоропластов: разборка тилакоидов, увеличение межтилакоидного пространства и, как следствие, наблюдалось “губчатое набухание” хлоропластов. Отмеченные морфологические и ультраструктурные изменения были характерны не только для свободных клеток, но и для дочерних еще не освободившихся клеток, находящихся в авто- и апланоспорангиях.

Отмеченные ультраструктурные изменения согласуются с данными по изменению содержанию пигментов и их соотношению, а также накоплением жирных кислот, в частности к большему накоплению маркерной кислоты ω -6-полиненасыщенной арахидоновой кислоты ($C_{20:4\Delta^{5,8,11,14}}$) в суммарной фракции липидов клеток до 35 вес. %.

Ценность ПНЖК, как и в целом МВ-продуктов ПНЖК, неуклонно растет. Основные исследования в данной области направлены на изучение особенностей синтеза и накопления ЖК клетками МВ, влияния стрессовых факторов на синтез ПНЖК, а также поиск и подбор условий культивирования для повышения выхода целевого продукта – ЖК.

Исследованные штаммы представляют интерес для биотехнологии в качестве экологически чистого сырья жирных кислот, в особенности арахидоновой, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот. Полученные результаты показывают, что оптимизация условий культивирова-

ния может влиять на накопление целевых продуктов – ПНЖК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 20–74–10028 и в рамках Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета “Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология”.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Borowitzka M.A. Microalgae for aquaculture: opportunities and constraints // J. Appl. Phycol. 1997. V. 9. P. 393. <https://doi.org/10.1023/A:1007921728300>
2. Michalak I., Chojnacka K. Algal extracts: technology and advances // Eng. Life Sci. 2014. V. 14. P. 581. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400139>
3. Chojnacka K., Wieczorek P., Schroeder G., Michalak I. Algae biomass: characteristics and applications: towards algae-based products // Springer. 2018. V. 8. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-74703-3>
4. Соловченко А.Е. Физиологическая роль накопления нейтральных липидов эукариотическими микроводорослями при стрессах // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 192.
5. Guschina I.A., Harwood J.L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae // Prog. Lipid Res. 2006. V. 45. P. 160. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.001>
6. Morgan-Kiss R.M., Priscu J., Pocock T., Gudynaite-Savitch L., Norman P.A. Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2006. V. 70. P. 222. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.222-252.2006>
7. Cohen Z., Khozin-Goldberg I., Adlerstein D., Bigogno C. The role of triacylglycerol as a reservoir of polyunsaturated fatty acids for the rapid production of chloroplastic lipids in certain microalgae // Biochem. Soc. Trans. 2000. V. 28. P. 740. <https://doi.org/10.1042/bst0280740>
8. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. and Isambert A. Commercial applications of microalgae // J. Biosci. Bioeng. 2006. V. 101. P. 87. <https://doi.org/10.1042/bst0280740>
9. Ibañez E., Cifuentes A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients // J. Sci. Food Agric. 2013. V. 93. P. 703. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6023>
10. Ścieszka S., Klewicka E. Algae in food: A general review // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2019. V. 59. P. 3538. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1496319>
11. Mudimu O., Koopmann I.K., Rybalka N., Friedl T., Schulz R., Bilger W. Screening of microalgae and cyanobacteria strains for α -tocopherol content at different growth phases and the influence of nitrate reduction on

- α -tocopherol production // J. Appl. Phycol. 2017. V. 29. P. 2867.
https://doi.org/10.1007/s10811-017-1188-1
12. Мальцев Е.И., Мальцева И.А., Мальцева С.Ю., Куликовский М.С. Биотехнологический потенциал нового штамма *Bracteacoccus bullatus* (Sphaeropleales, Chlorophyta), перспективного продуцента омега-6 полиненасыщенных жирных кислот // Физиология растений. 2020. Т. 67. С. 96.
https://doi.org/10.31857/S0015330320010121
 13. Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales) // Bacteriolog. Rev. 1971. V. 35. P. 171.
https://doi.org/10.1128/br.35.2.171-205.1971
 14. Gorelova O.A., Baulina O.I., Solovchenko A.E., Chekanov K.A., Chivkunova O.B., Fedorenko T.A., Lobakova E.S. Similarity and diversity of the *Desmodesmus* spp. microalgae isolated from associations with White Sea invertebrates // Protoplasma. 2015. V. 252. P. 489.
https://doi.org/10.1007/s00709-014-0694-0
 15. Reynolds E.S. The use of lead citrate of high pH as an electron opaque strain in electron microscopy // J. Cell. Biol. 1963. V. 17. P. 208.
https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208
 16. Folch J., Lees M., Stanley G.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497.
https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5
 17. Kates M. Lipid extraction procedures. In Burden, R.H. and van Knippenberg, P.H. [Eds.] Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids. 2nd edn. Elsevier Science, Amsterdam. 1986. P. 106.
 18. Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution // J. Plant Physiol. 1994. V. 144. P. 307.
https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2
 19. Steward F.C., Mühlethaler K. The structure and development of the cell-wall in the *Valoniaceae* as revealed by the electron microscope // Ann. Bot. 1953. V. 17. P. 295.
https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083351
 20. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Meth. Enzym. 1987. V. 148. P. 350.
https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1
 21. Cunningham Jr.F.X., Gantt E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants // Annu. Rev. Plant Biol. 1998. V. 49. P. 557.
https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.557
 22. Takaichi S. Carotenoids in algae: distributions, biosynthesis and functions // Marine drugs. 2011. V. 9. P. 1101.
https://doi.org/10.3390/md9061101
 23. Borowitzka M. Algal biotechnology products and processes — matching science and economics // J. Appl. Phycol. 1992. V. 4. P. 267.
https://doi.org/10.1007/BF02161212
 24. Bigogno C., Khozin-Goldberg I., Boussiba S., Vonshak A., Cohen Z. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous alga *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid // Phytochem. 2002. V. 60. P. 497.
https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00100-0
 25. Leman J. Oleaginous microorganisms: an assessment of the potential // Adv. Appl. Microbiol. 1997. V. 43. P. 195.
https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70226-0
 26. Goodson C.R.R., Wang Z.T., Goodenough U. Structural correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost // Eukaryotic cell. 2011. V. 10. P. 1592.
https://doi.org/10.1128/EC.05242-11
 27. Fan J., Andre C., Xu C. A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii* // FEBS Letters. 2011. V. 585. P. 1985.
https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.018
 28. Schüller L.M., Schulze P.S., Pereira H., Barreira L., León R., Varela J. Trends and strategies to enhance triacylglycerols and high-value compounds in microalgae // Algal Res. 2017. V. 25. P. 263.
https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.025
 29. Kugler A., Zorin B., Didi-Cohen S., Sibiryak M., Gorelova O., Ismagulova T., Kokabi K., Kumari P., Lukyanov A., Boussiba S., Solovchenko A., Khozin-Goldberg I. Long-chain polyunsaturated fatty acids in the green microalga *Lobosphaera incisa* contribute to tolerance to abiotic stresses // Plant Cell Physiol. 2019. V. 60. P. 1205.
https://doi.org/10.1093/pcp/pcz013
 30. Merzlyak M.N., Chivkunova O.B., Gorelova O.A., Reshetnikova I.V., Solovchenko A.E., Khozin-Goldberg I., Cohen Z. Effect of nitrogen starvation on optical properties, pigments, and arachidonic acid content of the unicellular green alga *Parietochloris incisa* (Trebouxio-phyceae, Chlorophyta) // J. Phycol. 2007. V. 43. P. 833.
https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00375.x
 31. Соловченко А.Е., Хозина-Голдберг И., Диди-Коэн Ш., Коэн Ц., Мерзляк М.Н. Влияние света и азотного голодания на содержание и состав каротиноидов зеленой водоросли *Parietochloris incisa* // Физиология растений. 2008. Т. 55. С. 507.
 32. Соловченко А.Е., Мерзляк М.Н., Чивкунова О.Б., Решетникова И.В., Хозина-Голдберг И., Диди-Коэн Ш., Коэн Ц. Влияние освещенности и азотного голодания на рост и накопление арахидоновой кислоты у одноклеточной водоросли *Parietochloris incisa* // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. 2008b. № 1. С. 49.
 33. Темралеева А.Д. Новые для почвенной альгофлоры России виды зеленых водорослей *Bracteacoccus bullatus* и *B. occidentalis* (Sphaeropleales, Chlorophyta) // Вопросы современной альгологии. 2018. № 1. С. 14.
 34. Watanabe S., Hirabayashi S., Boussiba S., Cohen Z., Vonshak A., Richmond A. *Parietochloris incisa* comb. nov. (Trebouxio-phyceae, Chlorophyta) // Phycolog. Res. 1996. V. 44. P. 107.
https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.1996.tb00383.x
 35. Khozin-Goldberg I., Shrestha P., Cohen Z. Mobilization of arachidonoyl moieties from triacylglycerols into chloroplastic lipids following recovery from nitrogen starvation of the microalga *Parietochloris incisa* // BBA — Mol. Cell Biol. Lipids. 2005. V. 1738. P. 63.
https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.09.005