

УДК 581.1

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ САРЦИНОИДНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *Chlorosarcinopsis eremi* (Chlorophyceae, Chlorophyta)¹

© 2024 г. Н. В. Данцюк^{a, *}, И. Н. Чубчикова^a, А. Д. Темралеева^b,
Г. С. Минюк^a, И. В. Дробецкая^a

^aФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии южных морей
им. А. О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

^bВсероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г. К. Скрыбина РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

*e-mail: nterent@mail.ru

Поступила в редакцию 09.04.2024 г.

После доработки 30.05.2024 г.

Принята к публикации 30.05.2024 г.

Исследован штамм VKM AI-132 зеленой сарциноидной микроводоросли, изолированный из каштановой почвы зоны сухих степей (Волгоградская область, Россия). По результатам световой и сканирующей электронной микроскопии, а также молекулярно-филогенетического анализа гена 18S рРНК и спейсера ITS2 штамм был идентифицирован как *Chlorosarcinopsis eremi*. Изучены особенности его роста и вторичного каротиногенеза в условиях двухстадийной питательной культуры. Средняя продуктивность по сухой биомассе за 21 сут. эксперимента составляла 0.12 г/л·сут., а по суммарным каротиноидам — 0.2 мг/л·сут. В конце стадии вторичного каротиногенеза при доле суммарных каротиноидов в сухой биомассе около 0.25% доминирующими фракциями были кантаксантин и диэфиры астаксантина, причем сумма эфиров астаксантина достигала 36% от суммарных каротиноидов. Показано, что штамм VKM AI-132 может служить потенциально перспективным объектом дальнейших экспериментальных работ, направленных на оптимизацию условий для интенсификации процесса биосинтеза кетокаротиноидов.

Ключевые слова: кетокаротиноиды, морфология, молекулярно-генетический анализ, продуктивность, хлорофитовые водоросли

DOI: 10.31857/S0015330324060159, EDN: LVWNNM

ВВЕДЕНИЕ

Зеленые сарциноидные водоросли повсеместно распространены в наземных, пресноводных и морских экосистемах и характеризуются способностью к особому типу вегетативного деления — десмосхизису, которое происходит в различных плоскостях, в результате чего образуются двух- и трехмерные комплексы клеток. Все три класса зеленых водорослей — Ulvophyceae, Trebouxiophyceae и Chlorophyceae (UTC-клада), которые составляют ядро отдела Chlorophyta, включают роды с сарциноидной организацией таллома. Однако наиболее представлены сарциноидные микроводоросли в классе

Chlorophyceae, которые ранее были объединены по этому признаку в порядок Chlorosarcinales [1]. В порядок были включены водоросли с “жесткими” (*Spongiococcum*, *Tetracystis*, *Fasciculochloris*, *Heterotetracystis*, *Borodinellopsis*, *Axilosphaera*) и “голыми” (*Borodinella*, *Friedmannia*, *Pseudotetracystis*, *Ignatius*, *Chlorosarcina*, *Desmotetra*, *Planophila*, *Neochlorosarcina*, *Chlorosarcinopsis*, *Chlorosphaeropsis*, *Chloroplana*) зооспорами, что и явилось признаком для разделения их на семейства Tetracystidaceae и Chlorosarcinaceae, соответственно [2]. Однако с развитием молекулярно-филогенетического анализа было неоднократно показано, что порядок Chlorosarcinales является искусственным и, согласно последнему таксономическому пересмотру, микроводоросли с “голыми” зооспорами входят в порядок Chlamydomonadales (=Volvocales) [3–5].

Интерес к сарциноидным микроводорослям обусловлен способностью некоторых из них

¹ Дополнительные материалы размещены в электронном виде по DOI статьи: 10.31857/S0015330324060159

Сокращения: ВКГ — вторичный каротиногенез, ККар — кетокаротиноиды, СБ — сухая биомасса, СЭМ — сканирующая электронная микроскопия, ТСХ — тонкослойная хроматография, Хл а — хлорофилл а, Хл b — хлорофилл b.

в неблагоприятных условиях (дефицит влаги и биогенных элементов, высокая освещенность, температура и т.д.) накапливать большое количество специфических вторичных экстрактивных кетокаротиноидов (ККар), структурно и функционально не связанных с фотосинтетическим аппаратом клетки и выполняющих защитную функцию в условиях абиотического стресса [6]. Это астаксантин и близкие ему по структуре и биологической активности метаболитические предшественники (кантаксантин, адониксантин, адонирубин) [7, 8]. В качестве мощных антиоксидантов и иммуномодуляторов ККар представляют ценность для пищевой и косметической промышленности, фармакологии, сельского хозяйства.

Зеленые микроводоросли (Chlorophyta) – самая многочисленная группа микроорганизмов, обладающая способностью синтезировать и накапливать ККар. Процесс вторичного каротиногенеза (ВКГ) характерен преимущественно для представителей порядков Sphaeropleales и Chlamydomonadales, среди которых наиболее изучены роды *Haematococcus*, *Neochloris*, *Chromochloris* и *Coelastrella* [9]. Тем не менее удешевление и активное введение в практику полногеномного секвенирования позволило во многих микроводорослевых геномах обнаружить ортологи β-каротин кетазазы – фермента, обеспечивающего синтез ККар из β-каротина [7]. Это свидетельствует о том, что число видов каротиногенных микроводорослей гораздо больше, чем принято считать.

Род *Chlorosarcinopsis* (Chlamydomonadales), представители которого являются обитателями почвенных и песчаных (часто засушливых) местообитаний и колонии которых в неблагоприятных условиях приобретают ярко-оранжевый цвет за счет аккумуляции ККар [2, 9], изучен недостаточно. По немногочисленным литературным данным во фракционном составе его ККар доминирует кантаксантин [8, 9]. Перспективность изучения рода была подтверждена несколькими исследованиями по секвенированию пластидного и митохондриального геномов [10, 11].

Цель данной работы заключалась в изучении морфологических и молекулярно-генетических характеристик штамма VKM AI-132, исследовании особенностей его роста в условиях двухстадийной накопительной культуры и анализе фракционного состава кетокаротиноидов на стадии вторичного каротиногенеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Объектом исследования являлся штамм сарциноидной зеленой микроводоросли VKM AI-132 (ранее ACSSI 132) из Всероссийской кол-

лекции микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Штамм был изолирован в 2014 г. из верхнего горизонта каштановой солонцеватой почвы около с. Перегрузное Волгоградской области (47°53'21" с.ш., 44°0'50" в.д.) путем посева почвенной суспензии на твердую питательную среду BG11 с азотом (1% агар, pH = 7.0) и многократного пересева отдельных колоний микроводорослей методом истощающего штриха.

Световая и электронная микроскопия

Изучение морфологии и жизненного цикла штамма проводили методами световой микроскопии с помощью микроскопа Leica DM750 ("Leica", Германия). Результаты наблюдений документированы фотографиями, снятыми с помощью цифровой камеры Leica Flexacam C3 ("Leica", Германия). Сроки наблюдения составляли от 2 нед. до 6 мес. При морфологической идентификации учитывали форму, структуру и размеры пакетов; форму и размеры отдельных вегетативных клеток; тип хлоропласта; наличие, количество пиреноидов и тип крахмальной обкладки; особенности размножения и другие характеристики [2]. Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) 0.5 мл культуры фиксировали 2% глутаровым альдегидом в 6.67 mM Na-K-фосфатном буфере (ФБ) с постфиксацией 0.005% раствором Люголя в ФБ и дегидратировали в серии возрастающих концентраций этанола [12]. СЭМ-изображения клеток получали с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi SU3500 ("Hitachi", Япония).

Молекулярно-генетический анализ

Тотальную ДНК из штамма выделяли с помощью колоночного набора DNeasy Plant Mini Kit ("Qiagen", США), следуя протоколу производителя. Для амплификации использовали готовую смесь Screen Mix-HS ("Евроген", Россия).

Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) гена 18S рРНК и спейсера ITS2 были использованы праймеры, рекомендованные в статьях Katana [13] и White [14], соответственно (Дополнительные материалы, табл. S1).

Детекцию целевых ПЦР-продуктов проводили электрофоретически в 1% агарозном геле. Для дальнейшей очистки ампликонов из геля применяли набор Cleanup Mini ("Евроген", Россия). Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли на базе ЗАО Синтол, ("Синтол", Россия).

Далее осуществлялась сборка гена 18S рРНК и поиск гомологии по алгоритму BLASTn в GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Для выбора модели нуклеотидных замен использовали программу jModelTest. Реконструкцию

филогенетических взаимосвязей осуществляли методом максимального правдоподобия (ML) в программе PhyML. Статистическая поддержка топологии дерева была оценена с помощью бутстрэп-анализа (1000 повторностей) и указана в узлах ветвей в виде процентов. За основу была принята филогенетическая реконструкция из статьи Т. Nakada [15, 16], но с более расширенной кладой *Arenicolinia*. Генетические различия между нуклеотидными последовательностями гомологичных генов охарактеризовали с помощью генетических дистанций. Мерой генетических различий являлся процент несовпадений нуклеотидов при попарном сравнении выравненных последовательностей, вычисление которого проводили в программе MEGA 6.0 с использованием двухпараметрической модели Кимуры (K2P). Филогенетические связи визуализировали с помощью программы FigTree v1.3.1. Полученные нуклеотидные последовательности были депонированы в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) под номерами KY086471 (18S рРНК) и MG523292 (ITS2).

Условия культивирования

Водоросли выращивали методом двухстадийной накопительной культуры [17], который позволяет в рамках одного эксперимента получить данные, характеризующие рост и метаболизм каротиногенных микроводорослей на стадиях активного роста культуры (“зеленая” стадия) и вторичного каротиногенеза как защитной реакции клеток на абиотический стресс (“красная” стадия). В качестве питательной среды использовали среду BBM [18], в 1 л которой содержится: NaNO_3 – 241 мг; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 75 мг; NaCl – 25 мг; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 75 мг; KH_2PO_4 – 175 мг; (Na_2 -ЭДТА) – 50 мг; KOH – 31 мг; H_3BO_3 – 11 мг; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 8.82 мг; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 44 мг; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 2.42 мг; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 1.57 мг; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.49 мг; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 4.98 мг; H_2SO_4 конц. – 1 мкл; CaCl_2 – 18.9 мг.

Инокулят выращивали на среде BBM при одностороннем боковом освещении светодиодными лампами Feron DL 20W T4 6400K (“Feron”, Россия) в течение 7 сут. Плотность потока ФАР составляла 52 мкмоль/(м²·с) с фотопериодом, приближенным к природному и рекомендованном для выращивания каротиногенных микроводорослей – 15 ч свет/9 ч темнота [19], и температуре 24°C.

В эксперименте штамм культивировали в пластиковых флаконах Tissue Culture Flasks (“Falcon”, США) объемом 0.75 л, исходный объем культур с начальным содержанием сухой биомассы (СБ) 0.3 г/л составлял 0.6 л.

На “зеленой” стадии штамм VKM Al-132 рос при естественном освещении на подокон-

нике окна, ориентированного на юго-запад. Культуру барботировали атмосферным воздухом при помощи аквариумного компрессора Resun ACO-9630 при скорости 0.44 л/(мин·л). Продолжительность “зеленой” стадии составляла 9 сут.

При переводе культуры на “красную” стадию, принимая во внимание недостаточность литературных сведений о характере реакции штамма на абиотический стресс, для индукции ВКГ был использован “облегченный” вариант стрессирования. Культура была переведена на двустороннее круглосуточное освещение светодиодными лампами Feron DL 20W T4 6400K (“Feron”, Россия) с плотностью потока ФАР 130 мкмоль/(м²·с) с каждой стороны. Температура в культуре составляла 28–29°C. На протяжении светового периода уровень pH 7.0 ± 0.5 поддерживали путем дозированной подачи углекислого газа (объемная доля CO_2 – 99.8% по ГОСТ 8050–85) при помощи электромагнитного клапана Camozzi A7E (“Camozzi”, Италия) и цифрового pH-контроллера Aqua Medic pH 2001C (“Aqua Medic”, Германия). Для дополнительной стимуляции ВКГ во флаконах 3% объема культуры заменили на 1% раствор NaCl до конечной концентрации в среде 5 мМ. Продолжительность “красной” стадии составляла 12 сут.

Определение сухой биомассы и пигментный анализ

Содержание сухой биомассы (СБ) измеряли гравиметрически [20] на мембранных нитроцеллюлозных фильтрах с размером пор 3.0 мкм (“Владисарт”, Россия).

Содержание хлорофиллов и суммарных каротиноидов (Кар) в биомассе микроводорослей определяли спектрофотометрически на СФ-2000 (ОКБ “Спектр”, Россия) в диметилсульфоксидных [21] и в ацетоновых [22] экстрактах. Пигментный состав в конце “красной” стадии исследовали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) ацетоновых экстрактов на пластинах “Silica gel 60” (“Merck”, Германия) с использованием последовательно двух систем растворителей: I – гексан-ацетон 9:1; II – гексан-бензол-ацетон 5:3.75:0.8. Идентификацию доминирующих фракций проводили путем сравнения со стандартами при совместной хроматографии, а также по спектрам поглощения в различных растворителях. Стандарт кантаксантина получали из цист ракообразного *Artemia* sp., эфиров астаксантина – из зрелых апланоспор микроводоросли *Haematococcus pluvialis* [23].

Измерения проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях. На рисунках и в тексте приведены средние значения ($\bar{x}$) и их стандартная ошибка (m).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Микроскопический анализ

Результаты наблюдений с помощью световой и сканирующей электронной микроскопии позволили предположить принадлежность штамма VKM AI-132 к роду *Chlorosarcinopsis*, для которого характерно наличие клеточных пакетов, голых зооспор, пристенного хлоропласта и одного пиреноида с прерывистой крахмальной обкладкой. Молодые вегетативные клетки имели шаровидную форму до 8 мкм в диаметре, далее образовывали диады, тетрады и более сложные комплексы в результате десмосхизиса (рис. 1). Псевдонитчатых скоплений клеток не наблюдали. У стареющих культур (после 6 мес. хранения) отмечалось изменение цвета биомассы с зеленой на красно-коричневую, что может свидетельствовать о синтезе ККар при дефиците азота в истощенной среде. Именно это послужило основой интереса к данному штамму.

Культура была переведена на жидкую минеральную среду ВВМ после 9 лет хранения на твердой агаризованной (1%) среде BG-11 при температуре +15°C с ежегодным пересевом. Возможно, столь продолжительный срок стал причиной длительной адаптации штамма к условиям автотрофного роста: процесс получения генерации вегетативных делящихся клеток занял около 4 мес. с еженедельным пересевом. В начале адаптационного периода вегетативные клетки имели размер 3–5 мкм. Также было отмечено (преимущественно в первой половине дня) наличие подвижных зооспор, которые затем замедляли движение, останавливались и округлялись. Возможно, небольшие размеры в период адаптации объясняются тем, что мы наблюдали

клетки, только вышедшие из клеточных пакетов, либо остановившиеся зооспоры. Заданные стабильные внешние условия (освещенность и температура) и многократные частые пересевы жидкой культуры на подготовительном этапе позволили получить к началу эксперимента синхронизированную культуру.

Молекулярно-генетический анализ

По данным 18S рРНК анализа изучаемый штамм VKM AI-132 со 100% статистической поддержкой вошел в кладу *Arenicolinia* (рис. 2). Однако внутри клады не наблюдалось хорошо поддерживаемых групп из-за консервативности выбранного молекулярного маркера. Генетические различия изучаемого штамма с аутентичным штаммом *C. arenicola* UTEX 1697, штаммом *C. variabilis* UTEX 1600 и аутентичным штаммом *C. eremi* UTEX 1186 составили 0.9, 0.4 и 0.1% соответственно.

Сравнение более варибельного спейсера ITS2 исследуемого штамма VKM AI-132 (MG523292) с единственной последовательностью ITS2 для перечисленных трех видов *Chlorosarcinopsis* – *C. eremi* UTEX 1186 (HQ246438) показало их 100% сходство. Таким образом, штамм VKM AI-132 был идентифицирован как *C. eremi*.

Ростовые характеристики штамма в условиях двухстадийной культуры

При заданных внешних условиях на “зеленой” стадии в первые двое сут. биомасса *C. eremi* увеличилась в два раза (рис. 3). К концу “зеленой” стадии средняя продуктивность штамма VKM AI-132 составила 0.11 ± 0.00 г/л·сут. Сопоставимые результаты были получены нами

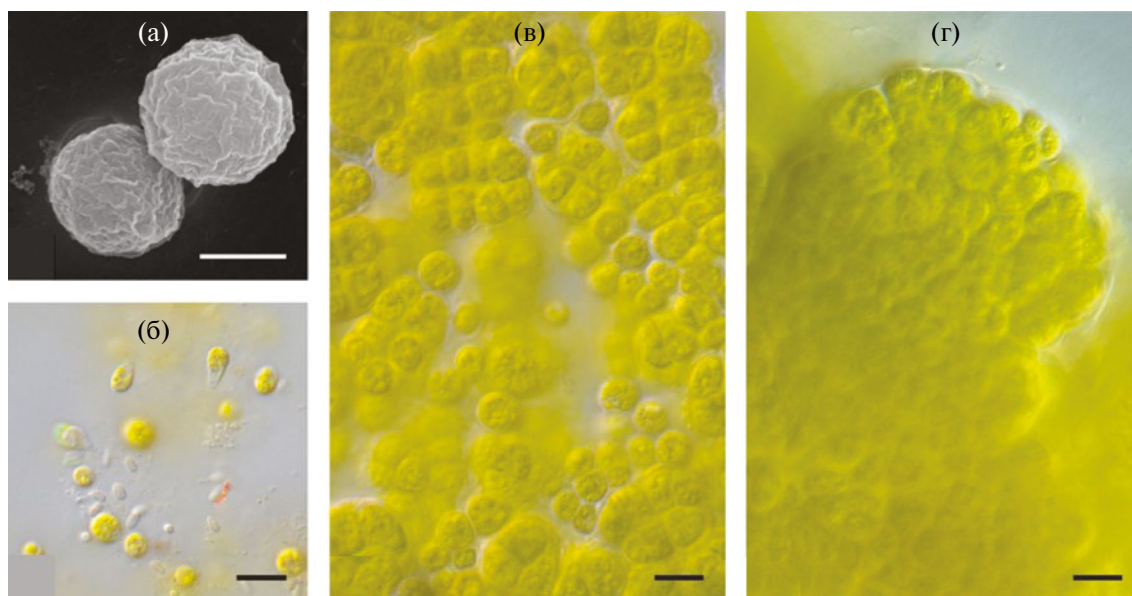


Рис. 1. Штамм *C. eremi* VKM AI-132. а – молодые вегетативные клетки (СЭМ). Световая микроскопия: б – “голые” зооспоры, в – сарциноидные пакеты, г – слизистые сложные комплексы клеток. Шкала: а – 2 мкм, б, в, г – 10 мкм.

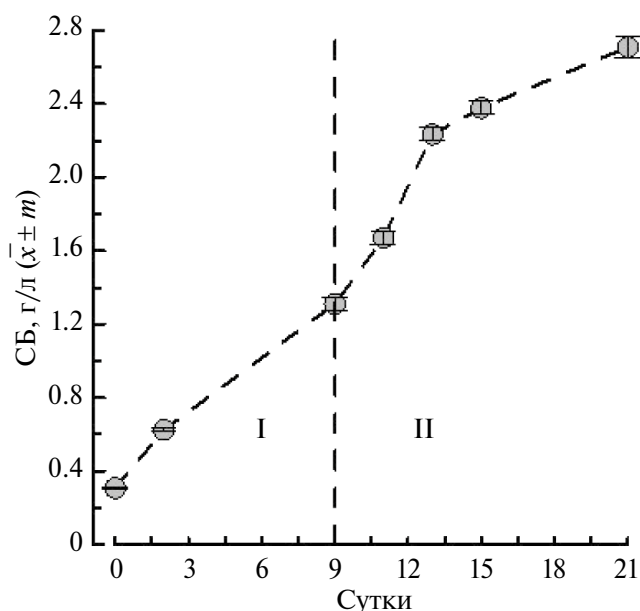


Рис. 3. Динамика биомассы (СБ) штамма *C. eremi* VKM AI-132, на “зеленой” (I) и “красной” (II) стадиях эксперимента ($\bar{X} \pm m$).

ранее для микроводорослей порядка Sphaero-pleales: *Bracteacoccus minor*, *Coelastrella rubescens*, *Chromochloris zofingiensis*, и порядка Chlamydomonadales: *Pseudosporogococcus protococcoides* (0.08–0.09 г/л·сут.) [24].

После стресс-воздействия на “красной” стадии биомасса продолжала увеличиваться за счет активного накопления клетками запасных веществ (рис. 3), что является характерной особенностью каротиногенных микроводорослей [25, 26], и средняя за весь эксперимент продуктивность по СБ составила 0.12 ± 0.00 г/л·сут.

Пигментный состав клеток штамма на разных стадиях культивирования

На “зеленой” стадии содержание хлорофиллов в культуре *C. eremi* резко увеличивалось в первые двое сут. (рис. 4а, б). Далее уровень хлорофиллов возрастал вплоть до перевода культур на стадию ВКГ, тогда как в биомассе снижался в течение всего эксперимента (рис. 4г, д).

Визуально наблюдаемое изменение цвета культур от зеленого до болотно-желтого послужило оценочным критерием готовности культур

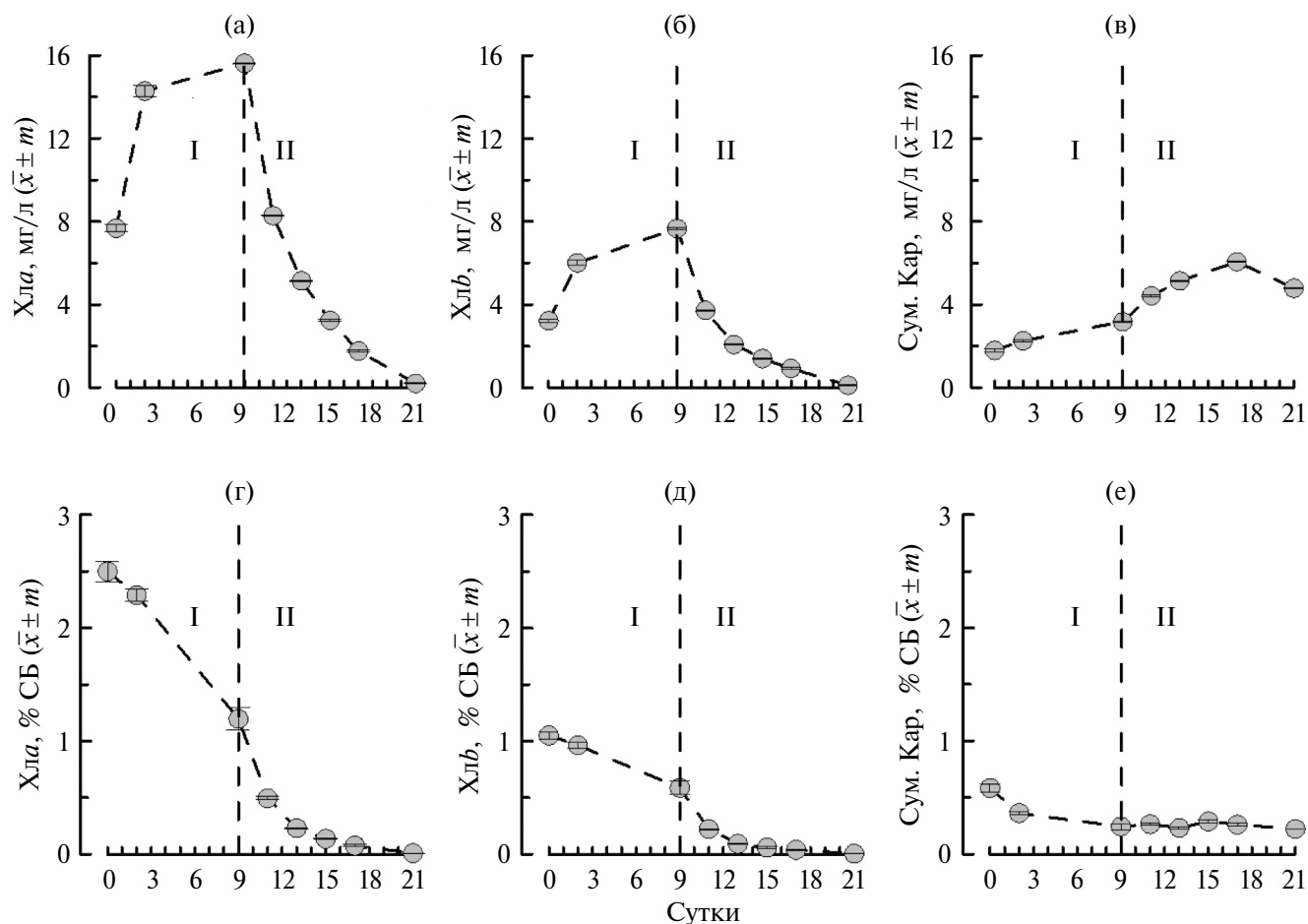


Рис. 4. Динамика пигментного состава в культуре и биомассе штамма *C. eremi* VKM AI-132, на “зеленой” (I) и “красной” (II) стадиях эксперимента: а, г – Хл а, б, д – Хл б, в, е – суммарные Кар ($\bar{X} \pm m$).

к переводу на стадию ВКГ. В течение “красной” стадии содержание Хл *a* и Хл *b* в культуре и биомассе снизилось почти до нуля. Содержание суммарных Кар в культуре на 8 сут. ВКГ увеличилось в 1.9 раза, тогда как их массовая доля в СБ изменялась незначительно на протяжении всей стадии ВКГ и составляла около 0.25% (рис. 4в, е). Это согласуется с опубликованными нами ранее данными для зеленых водорослей *P. protococcoides*, *B. minor*, *C. rubescens* и *C. zofingiensis*: массовая доля Кар в их биомассе составляла 0.23–0.39% [22], а также с работами других авторов: у *Botryococcus braunii* доля Кар в СБ варьирует в пределах

0.25–0.55% [8], у *Chromochloris zofingiensis* составляет 0.31% [27]. Тем не менее подчеркнем, что сравнение данных, приведенных различными авторами для каротиногенных Chlorophyta, часто затруднено из-за несходства условий стрессирования (природа стресс-агента, температурный и световой режимы).

К концу “красной” стадии культура приобрела темно-оранжевый цвет в результате деструкции фотосинтетических пигментов и накопления ККар (рис. 5, 6а). Продуктивность по суммарным Кар (за весь эксперимент) составила 0.19 ± 0.01 мг/л·сут., что сравнимо с этим по-

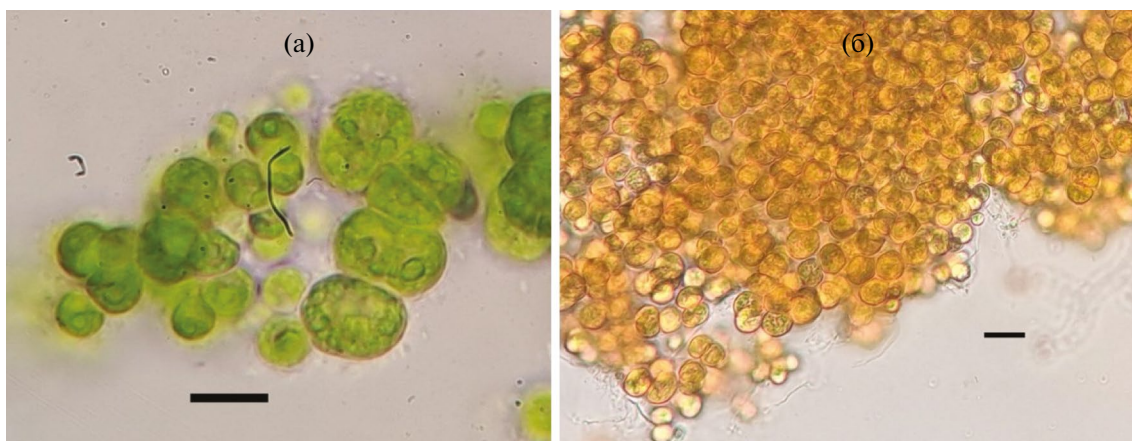


Рис. 5. Штамм VKM Al-132 на разных стадиях эксперимента: (а) – “зеленой”, (б) – “красной”. Шкала 15 мкм.

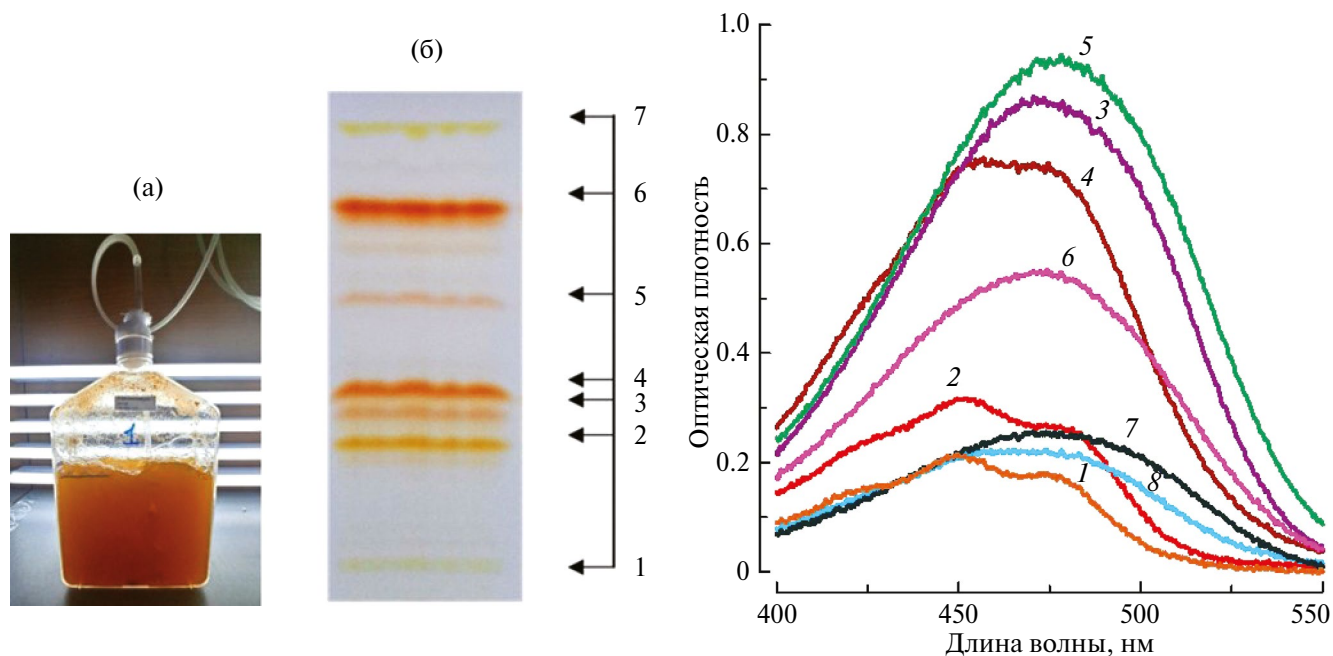


Рис. 6. Культура *C. eremi* VKM Al-132 (а) и хроматограмма каротиноидов (б) в конце “красной” стадии. 1 – лютеин, 2 – адониксантин (моноэфиры), 3 – астаксантин (моноэфиры), 4 – кантаксантин, 5 – адонирубин (эфиры), 6 – астаксантин (диэфиры), 7 – β-каротин.

Рис. 7. Спектры ацетоновых экстрактов каротиноидов штамма *C. eremi* VKM Al-132 в конце “красной” стадии эксперимента. 1 – лютеин, 2 – β-каротин, 3 – кантаксантин, 4 – адониксантин (моноэфиры), 5 – астаксантин (диэфиры), 6 – астаксантин (моноэфиры), 7 – адонирубин (моноэфиры), 8 – эхиненон.

Таблица 1. Состав каротиноидов штамма *C. eremi* VKM AI-132 в конце “красной” стадии эксперимента ($x \pm m$).

Фракции каротиноидов	Массовая доля фракции в суммарных Кар, %	Содержание фракции в культуре, мг/л
	Окончание “красной” стадии	
Астаксантин (диэфиры)	28.50 ± 3.08	1.70 ± 0.05
Кантаксантин	28.33 ± 2.28	1.69 ± 0.01
Адониксантин (моноэфиры)	15.75 ± 2.05	0.96 ± 0.20
Астаксантин (моноэфиры)	7.88 ± 1.37	0.47 ± 0.04
Адонирубин (моноэфиры)	4.88 ± 0.14	0.29 ± 0.02
Лютеин	2.55 ± 0.28	0.15 ± 0.01
Эхиненон	1.80 ± 0.13	0.11 ± 0.02
β-каротин	1.74 ± 0.11	0.11 ± 0.01

казателем у представителей порядка Sphaeropleales: *C. zofingiensis* и *Neochloris wimmeri* 0.21 и 0.22 мг/л·сут., соответственно [28].

Пигментный состав клеток определяли в конце “красной” стадий. По данным хроматографического анализа в красных культурах *C. eremi* доминировали диэфиры астаксантина и кантаксантин при значительной доле моноэфиров адониксантина (рис. 6б, 7, табл. 1). В совокупности ККар составляли $87.12 \pm 0.36\%$ от суммарных Кар (табл. 1), причем доля эфиров астаксантина в них превышала 36%.

ОБСУЖДЕНИЕ

По данным морфологического анализа изученный штамм был идентифицирован как член рода *Chlorosarcinopsis*. Однако отсутствие в культуре псевдонитчатых скоплений клеток не позволило установить его принадлежность к виду *C. eremi*. Использование консервативного маркера — гена 18S рРНК — выявило филогенетическое родство штамма VKM AI-132 с видами *C. eremi*, *C. arenicola* и *C. variabilis*. И только варибельный маркер ITS2 однозначно определил штамм как *C. eremi*. Род требует ревизии, т.к. его представители принадлежат как минимум четырем различным филогенетическим группам, относящимся к трем кладам Arenicolinia, Stephanosphaerinia и Dunaliellinia [5, 15]. Однако это выходит за рамки данного исследования.

Продукционные характеристики исследованного штамма VKM AI-132 оказались сопоставимы с полученными нами ранее для других видов порядка Sphaeropleales: у *C. rubescens* и *C. zofingiensis* доля ККар в суммарных Кар достигала 42–68% и 92–95% соответственно. Доля эфиров астаксантина в суммарных Кар

достигала 19–28% у *C. rubescens* и 43–47% у *C. zofingiensis*, а кантаксантина — 8–19% и 25–31% соответственно [26, 29]. Отличительной чертой *C. eremi* оказалось значительное содержание лютеина (около 2.5% от суммарных Кар) в красных клетках, чего не наблюдали у ранее исследованных видов. Характерной оказалась относительно невысокая массовая доля всех форм астаксантина (немногим более 36%), а в каротиноидном спектре явно преобладали кантаксантин и диэфиры астаксантина. Сходство каротиноидного состава *C. eremi* с таковым у микроводорослей порядка Sphaeropleales (представители родов *Chromochloris*, *Bracteacoccus*, *Coelastrella*) и Chlamydomonadales (*Pseudospongiococcum*) может свидетельствовать о сходстве путей биосинтеза астаксантина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам микроскопирования и молекулярно-генетического анализа гена 18S рРНК была установлена таксономическая принадлежность штамма VKM AI-132 к роду *Chlorosarcinopsis* клады Arenicolinia (Chlamydomonadales, Chlorophyta). Использование более варибельного маркера ITS2 позволило идентифицировать штамм как *C. eremi*. Его физиолого-биохимические показатели в условиях двухстадийной накопительной культуры хорошо сопоставимы с результатами, полученными ранее для каротиногенных зеленых микроводорослей порядка Sphaeropleales. В каротиноидном спектре *C. eremi* преобладали высокоценные ККар (кантаксантин и эфиры адониксантина и астаксантина). Исследуемый штамм может быть потенциально перспективным объектом дальнейших исследований, направленных на подбор оптимальных

условий культивирования на обеих стадиях (температурный и световой режим, обеспеченность культур питательными веществами, характер стресс-воздействия и пр.) для интенсификации процесса биосинтеза кетокаротиноидов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-15-2021-1051) и в рамках государственного задания “Комплексное исследование механизмов функционирования морских биотехнологических комплексов с целью получения биологически активных веществ из гидробионтов” (№ 124022400152-1).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Groover R.D., Bold H.C. The taxonomy and comparative physiology of the Chlorosarcinales and certain other edaphic algae // Phycological studies VIII / Austin, Texas, USA. Univ. Texas Publications. 1969. № 6907. P. 1.
2. Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales) / СПб.: Наука, 1998. 351 с.
3. Friedl T., O’Kelly C.J. Phylogenetic relationships of green algae assigned to the genus *Planophila* (Chlorophyta): evidence from 18S rDNA sequence data and ultrastructure // Eur. J. Phycol. 2002. V. 37. P. 373. <https://doi.org/10.1017/S0967026202003712>
4. Friedl T. Evolution of the polyphyletic genus *Pleurasium* (Chlorophyta): inferences from nuclear-encoded ribosomal DNA sequences and motile cell ultrastructure // Phycol. 1996. V. 35. P. 456. <https://doi.org/10.2216/i0031-8884-35-5-456.1>
5. Watanabe S., Mitsui K., Nakayama T., Inouye I. Phylogenetic relationships and taxonomy of sarcinoid green algae: *Chlorosarcinopsis*, *Desmotetra*, *Sarcinochlamys* gen. nov., *Neochlorosarcina*, and *Chlorosphaeropsis* (Chlorophyceae, Chlorophyta) // J. Phycol. 2006. V. 42. P. 679. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00196.x>
6. Соловченко А.Е. Физиология и адаптивное значение вторичного каротиногенеза у зеленых микроводорослей // Физиология растений. 2013. Т. 60. С. 3. <https://doi.org/10.7868/S0015330313010089>
7. Jeffers T.L., Roth M.S. Revealing mechanisms of algal astaxanthin production and bioengineering potential using multiomics // Global Perspectives on Astaxanthin: From Industrial Production to Food, Health, and Pharmaceutical Applications / Eds. G.A. Ravishanker, R.R. Ambati. 2021. P. 181. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823304-7.00010-6>
8. Chekanov K. Diversity and distribution of carotenogenic algae in Europe: A review // Mar. Drugs. 2023. V. 21. P. 108. <https://doi.org/10.3390/md21020108>
9. Cherdchukeattisak P., Fraser P.D., Purton S., Brocklehurst T.W. Detection and enhancement of ketocarotenoid accumulation in the newly isolated sarcinoid green microalga *Chlorosarcinopsis* PY02 // Biology. 2018. V. 7. P. 1. <http://dx.doi.org/10.3390/biology7010017>
10. Fučíková K., Lewis P.O., Neupane S., Karol K.G., Lewis L.A. Order, please! Uncertainty in the ordinal-level classification of Chlorophyceae // Peer J. 2019. V. 7 e6899. <https://doi.org/10.7717/peerj.6899>
11. Khani-Juyabad F., Mohammadi P., Zarrabi M. Comparative analysis of *Chlorosarcinopsis eremi* mitochondrial genome with some Chlamydomonadales algae // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2019. V. 25. P. 1301. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00696-y>
12. Чубчикова И.Н., Дробецкая И.В., Данцюк Н.В., Челебиева Э.С. Оптимизация метода фиксации пресноводных микроводорослей (Scenedesmales, Chlorophyta) для первичной идентификации с использованием сканирующей электронной микроскопии // Вопросы современной альгологии. 2022. № 1. С. 102. [https://doi.org/10.33624/2311-0147-2022-1\(28\)-102-109](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2022-1(28)-102-109)
13. Katana A., Kwiatowski J., Spalik K., Zakrys B., Szalach E., Szymanska H. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA // J. Phycol. 2001. V. 37. P. 443.
14. White T.J., Bruns T.D., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols, a guide to methods and applications / Eds. M.A. Innis et al. Academic Press. San Diego. 1990. P. 315. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
15. Nakada T., Misawa K., Nozaki H. Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses // Mol. Phylogenet. Evol. 2008. V. 48. P. 281. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.03.016>
16. Nakada T., Soga T., Tomita M., Nozaki H. *Chlorogonium complexum* sp. nov. (Volvocales, Chlorophyceae), and morphological evolution of *Chlorogonium* // Eur. J. Phycol. 2010. V. 45. P. 97. <https://doi.org/10.1080/09670260903383263>
17. Минюк Г.С., Челебиева Э.С., Чубчикова И.Н. Особенности вторичного каротиногенеза у *Bracteacoccus minor* (Chlorophyta) в условиях двухстадийной культуры // Альгология. 2015. Т. 25. С. 21. <http://dx.doi.org/10.15407/alg25.01.02>
18. Bischoff H.W., Bold H.C. Some soil algae from enchanted rock and related algal species // Phycol. Stud. 1963. V. 4. P. 1.

19. Минюк Г.С., Чубчикова И.Н., Дробецкая И.В., Данцук Н.В., Челебиева Э.С. РФ Патент 2661086, 2018.
20. Vonshak A. Microalgae: Laboratory growth techniques and outdoor biomass production // Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis / Eds. J. Coombs et al. Pergamon Press. Oxford. 1985. P. 188.
21. Solovchenko A., Merzlyak M., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Boussiba S. Coordinated carotenoid and lipid syntheses induced in *Parietochloris incisa* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) mutant deficient in $\Delta 5$ desaturase by nitrogen starvation and high light // J. Phycol. 2010. V. 46. P. 763.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00849.x>
22. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes // Meth. Enzym. 1987. V. 148. P. 350.
23. Дробецкая И.В., Минюк Г.С., Чубчикова И.Н., Боровков А.Б. Определение содержания астаксантина и кантаксантина у зеленых микроводорослей методом тонкослойной хроматографии // Экология моря. 2009. Спец. вып. 79. Биотехнология водорослей. С. 50.
24. Чубчикова И.Н., Дробецкая И.В. Оценка антирадикальной активности вторичных каротиноидов у четырех видов зеленых микроводорослей порядка Sphaeropleales в системе in vitro // Труды Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского – природного заповедника РАН. 2020. Вып. 2. С. 66.
<https://doi.org/10.21072/eco.2021.14.07>
25. Чубчикова И.Н., Дробецкая И.В., Минюк Г.С., Данцук Н.В., Челебиева Э.С. Скрининг одноклеточных зеленых водорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. 2. Особенности роста и вторичного каротиногенеза у представителей рода *Bracteacoccus* (Chlorophyceae) // Морск. экол. журн. 2011. Т. 10. С. 91.
26. Minyuk G., Chelebieva E., Chubchikova I., Dantsyuk N., Drobetskaya I., Sakhon E., Chekanov K., Solovchenko A. Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrella rubescens*, a producer of value-added keto-carotenoids // Algae. 2017. V. 32. P. 245.
<https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.8.6>
27. Ali H.E.A., Vorisek F., Dowd S.E., Kesner S., Song Y., Qian D., Crocker M. Formation of lutein, β -carotene and astaxanthin in a *Coelastrella* sp. isolate // Molecules. 2022. V. 27. P. 6950.
<https://doi.org/10.3390/molecules27206950>
28. Orosa M., Torres E., Fidalgo P., Abalde J. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae // J. Appl. Phycol. 2000. V. 12. P. 553.
29. Minyuk G., Sidorov R., Solovchenko A. Effect of nitrogen source on the growth, lipid, and valuable carotenoid production in the green microalga *Chromochloris zofingiensis* // J. Appl. Phycol. 2020. V. 32. P. 923.
<https://doi.org/10.1007/s10811-020-02060-0>