# \_ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ \_\_ СТАТЬИ

УДК 581.1

# БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ НОВОГО ШТАММА Bracteacoccus bullatus (Sphaeropleales, Chlorophyta), ПЕРСПЕКТИВНОГО ПРОДУЦЕНТА ОМЕГА-6 ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 2020 г. Е. И. Мальцев<sup>а,</sup> \*, И. А. Мальцева<sup>b</sup>, С. Ю. Мальцева<sup>a</sup>, М. С. Куликовский<sup>a</sup>

<sup>а</sup>Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия <sup>b</sup>Мелитопольский государственный педагогический университет им. Б. Хмельницкого, Мелитополь, Украина

> \*e-mail: ye.maltsev@gmail.com Поступила в редакцию 05.05.2019 г. После доработки 22.05.2019 г. Принята к публикации 22.05.2019 г.

Новый штамм зеленой водоросли Bracteacoccus bullatus Fuciková, Flechtner et L.A. Lewis выделен из лесной подстилки белоакациевого насаждения, расположенного в степной зоне Украины. Штамм идентифицирован на основании морфологических характеристик и филогенетического анализа с использованием гена 18S рДНК и участка ITS1-5.8S рДНК-ITS2. Новый штамм с высокой статистической поддержкой вошел в состав монофилетической клады *B. bullatus*. Исследование характеристик темпов роста и накопления липидов позволило получить сухую биомассу с концентрацией 2.31 г/л и содержанием липидов 55.84% в течение пятнадцатидневного периода культивирования на среде 3N BBM. Анализ жирнокислотного состава исследованного штамма показал, что доминантными были пальмитиновая 16:0, гексадекадиеновая 16:2(7Z,10Z), олеиновая 18:1(9Z) и линолевая 18:2(9Z,12Z) кислоты – на их долю приходилось 91.9% от суммы всех жирных кислот. По сравнению с другими штаммами Bracteacoccus штамм MZ-Ch32 показал максимальное содержание омега-6 полиненасыщенных жирных кислот. Учитывая характеристики роста и профиль жирных кислот, новый штамм Bracteacoccus bullatus может рассматриваться для биотехнологического применения как потенциальный продуцент незаменимой линолевой или олеиновой кислот. Сбалансированное соотношение омега-3 и омега-6 полиненасыщенных жирных кислот в биомассе позволяют использовать новый штамм как компонент кормов и подкормок для сельского хозяйства.

**Ключевые слова:** *Bracteacoccus*, коккоидные водоросли, общие липиды, состав жирных кислот, омега-6 полиненасыщенные жирные кислоты

**DOI:** 10.31857/S0015330320010121

# **ВВЕДЕНИЕ**

Водоросли из рода *Bracteacoccus* Tereg (Sphaeropleales, Chlorophyta) относятся к числу недостаточно изученных и трудно определяемых в связи с особенностями их морфологии и ультраструктуры. Наличие водорослей с *Bracteacoccus*-подобной морфологией среди родов *Dictyococcus* Gerneck, *Muriella* J.B. Petersen и *Pseudomuriella* Hanagata еще более усложняет процедуру видовой идентификации [1, 2]. Зачастую только привлечение молекулярно-генетических методов позволяет определить таксономический статус водорослей, имеющих *Bracteacoccus*-подобную морфологию, с высокой точностью. В почвенной альгофлоре Восточной Европы насчитывается более 10 видов рода *Bracteacoccus*, статус которых в большинстве случаев установлен исключительно на основе световой микроскопии [3, 4]. Представители рода *Bracteacoccus* характеризуются такой важной чертой, как способность накапливать в большом количестве масла. Это увеличивает интерес изучения их не только с позиции познания биоразнообразия, но и как возможных продуцентов ценных с биотехнологической точки зрения веществ.

На сегодняшний день известно, что зеленые микроводоросли могут с успехом использоваться в биотехнологическом производстве из-за быстрого роста в фотоавтотрофных условиях, способности продуцировать большое количество триглицеридов, высокого содержания насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот, а иногда и полиненасыщенных [5, 6]. По сравнению с сельскохозяйственными культурами и сырьем живот-

Сокращения: ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; ВІ – Байесовский подход (от Bayesian inference); LB – значение бутстрэп для ML (от likelihood bootstrap); ML – метод максимального правдоподобия (от maximum likelihood); PP – апостериорная вероятность (от posterior probability).

ного происхождения, перспективность использования микроводорослей в качестве источника липидов во многом определяется их высокой производительностью и широкой экологической устойчивостью [7]. При этом переработка биомассы водорослей не представляет угрозы для продовольственной безопасности. В зависимости от состава ЖК, накапливаемых водорослями, они могут быть использованы для получения биотоплива, диетических и фармакологических продуктов, добавок к кормам сельскохозяйственных животных и др. [6]. Одними из ценных компонентов биомассы водорослей являются полиненасыщенные жирные кислоты. Особое внимание среди них уделяют омега-3 и омега-6 ПНЖК, которые, характеризуясь различными свойствами, играют важную роль в обеспечении нормальной жизнедеятельности человека и животных [8]. При этом важным является не только их достаточное употребление, но и оптимальное соотношение [9. 10]. Традиционно основными источниками этих ЖК считаются растительные масла и морепродукты. Первостепенную роль в обогащении морепродуктов ПНЖК через пищевую цепочку имеют микроводоросли, накапливающие в том числе и омега-3 ПНЖК [11]. Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют с одной стороны о значительных перспективах использования микроводорослей для получения ЖК, в том числе и полиненасыщенных, а с другой – о необходимости поиска наиболее продуктивных штаммов.

В 2012 г. из почвы с высоким содержанием тяжелых металлов, отобранной с промышленного отвала возле гор Гарц (Германия), был описан новый вид Bracteacoccus bullatus Fuciková, Flechtner et L.A. Lewis [1]. В ходе экспериментов, связанных с подбором наиболее эффективных условий культивирования, для этого вида было показано высокое содержание в сухой биомассе олеиновой и линолевой жирных кислот и предложено рассматривать его перспективным для производства биотоплива [12]. В тоже время биохимические параметры, как было установлено при поиске биотехнологически перспективных продуцентов α-токоферола среди 130 представителей порядка Sphaeropleales, могут значительно варьировать среди разных изолятов одного и того же вида [13].

Исследуя разнообразие водорослей лесной подстилки насаждений белой акации Старо-Бердянского лесного массива, нами был выделен штамм водоросли, морфологические признаки которой соответствовали *Bracteacoccus bullatus*. Данная статья посвящена описанию нового штамма, определению его таксономического положения и видовой принадлежности методами световой микроскопии и молекулярной филогении, характеристике темпов роста и накопления липидов в условиях культуры, анализу профиля жирных кислот с целью выяснения биотехнологического потенциала.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### Выделение штамма и культивирование

Материалом для исследований послужил штамм зеленых водорослей MZ–Ch32, выделенный микропипетированием из культуры со стеклами обрастания с помощью инвертированного микроскопа Zeiss Axio Vert A1 (Германия). Субстратом для культуры послужил образец нижнего подгоризонта (O2) лесной подстилки, отобранный в белоакациевом насаждении Старо-Бердянского лесного массива (Запорожская обл., Украина) [14].

Микроскопические исследования и фотографирование проводили с помощью светового микроскопа Zeiss Scope A1 (Германия), снабженного масляным иммерсионным объективом. Клетки окрашивали 0.1% раствором метиленового синего и 1.0% раствором туши для определения структуры слизи. Исследование культуры началось в возрасте 7 дней и продолжалось до 12 месяцев.

Культура поддерживалась на среде 3N BBM [15]. 1 л среды 3N BBM содержал 8.82 мМ NaNO<sub>3</sub>; 0.43 мМ  $K_2$ HPO<sub>4</sub>; 1.29 мМ  $KH_2$ PO<sub>4</sub>; 0.03 мМ MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0.17 мМ CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O; 0.43 Мм NaCl; щелочной раствор ЭДТА (17.1 мМ ЭДТА); подкисленный раствор железа (0.179 мМ FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O); раствор бора (0.185 мМ NaBO<sub>3</sub> · 4H<sub>2</sub>O) и раствор микроэлементов (0.031 мМ ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0.007 мМ MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O; 0.005 мМ MoO<sub>3</sub>; 0.006 мМ CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O; 0.002 мМ Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O).

Исследуемый штамм выращивали в колбах объемом 250 мл с 200 мл среды и 10 мл инокулята с концентрацией клеток  $0.5 \pm 0.06 \times 10^{6}$  шт./мл. Концентрацию клеток измеряли с помощью автоматического счетчика клеток Bio-Rad TC20<sup>тм</sup> (США). Микроводоросли культивировали с помощью орбитального шейкера ELMI Sky Line Shaker S-3L (США) с постоянным перемешиванием при 150 об/мин в течение 15 дней. Интенсивность света составляла 70 мкмоль фотонов/(с м) с режимом 16:8. Для определения показателей сухой биомассы использовали сухожаровой шкаф ШС-80-01МК СПУ (Россия). Все измерения проводились в трех повторностях, числа показывают среднюю величину и ошибку средней. Статистические данные получены в программе Microsoft Excel (v. 1903).

#### Молекулярно-генетический анализ

ДНК исследуемого штамма MZ–Ch32 экстрагировали с помощью набора Helix<sup>TM</sup> в соответствии с протоколом производителя. Амплификацию баркодингового участка V4 ядерного гена 18S рДНК длинной 486 п.н. проводили с помощью пары праймеров D512 и D978 [16]. Условия амплификации: начальная денатурация – 5 мин при 95°С, последующие 35 циклов: денатурация при 94°С – 30 с, отжиг праймеров – 40 с при 52°С, элонгация – 50 с при 72°С; окончательное удлинение – 5 мин при 72°С. Амплификацию участка ITS1–5.8S рДНК–ITS2 длиной 629 п.н. проводили с помощью пары праймеров ITS1 и ITS4 [17]. Условия амплификации: начальная денатурация – 5 мин при 95°С, последующие 35 циклов: денатурация – 5 мин при 95°С, последующие 35 циклов: денатурация при 94°С – 30 с, отжиг праймеров – 30 с при 60°С, элонгация – 1 мин при 72°С; окончательное удлинение – 5 мин при 72°С.

Полученные ПЦР-продукты визуализировали методом горизонтального электрофореза в агарозном геле (1%) и окрашивали SYBR® Safe ("Life Technologies", США). Очистку ПЦР-продуктов проводили смесью FastAP, 10× FastAP Buffer, Exonuclease I ("Thermo Fisher Scientific", США) и воды. Расшифровку последовательностей V4 18S рДНК осуществляли при помощи прямых и обратных праймеров, указанных для ПЦР, системы Big Dye ("Applied Biosystems", США) с использованием секвенатора Genetic Analyzer 3500 ("Applied Biosystems", США).

Редактирование и сборку полученных консенсусных последовательностей проводили путем сопоставления прямых и обратных хроматограмм при помощи программ Ridom TraceEdit (ver. 1.1.0) и Mega6. Для построения филогенетического дерева в анализ из GenBank были добавлены нуклеотидные последовательности гена 18S рДНК и участка ITS1-5.8S рДНК-ITS2 24 представителей Sphaeropleales из клад Bracteacoccaceae и Pseudomuriellacae [2]. В качестве внешней группы использованы последовательности Ankvra judavi (G.M. Smith) Fott u Sphaeroplea robusta Buchheim et Hoffman из клады Sphaeropleaceae. Нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы Mafft v7, используя модель E-INS-i [18]. Далее проводили окончательное выравнивание — визуально определяли и удаляли неспаренные участки в начале и в конце полученных матриц, а также участки гена 18S рДНК, которые не были секвенированы для штамма MZ-Ch32. Реконструкцию филогенетических связей осуществляли методами максимального правдоподобия (ML) и Байеса (BI) с применением модели GTR + G. Для выбора модели нуклеотидных замен использовали программу Mega6. Деревья ML строили в онлайн программе RA×ML [19] с проверкой их устойчивости 1000 бутстреп-репликами. ВІ анализ проводили с помощью программы MrBaves-3.2.5 [20] со следующими параметрами: случайное начальное дерево, количество запусков – 2, число параллельных цепочек — 4, количество поколений —  $1 \times 10^{6}$ , запись параметров каждого сотого поколения и параметр отжига – 25%. Просмотр и редактирование дерева осуществляли в программах FigTree (ver. 1.4.2) и Adobe Photoshop CC (19.0).

#### Определение состава жирных кислот

Для определения состава жирных кислот клетки водорослей отмывали от среды дистиллированной водой, осаждали центрифугированием (4000 об./мин, 10 мин) и удаляли жидкость над осадком, операцию повторяли три раза. После отмывания биомассу водорослей фиксировали 10 мл горячего *изо*-пропанола, содержащего 20 мг/л ионола, и выдерживали 20 мин при 70°С. Зафиксированные таким образом пробы до анализа хранили при –20°С.

Липидные экстракты для определения жирнокислотного состава получали по методу Bligh и Dyer [21] с рекомендациями Palmer [22]. Состав ЖК определяли в липидном экстракте методом газожидкостной хроматографии с помощью хроматографа Carlo Erba (Италия) со стеклянными набивными колонками ( $2.5 \times 3$  мм). В качестве носителя использовали Chromosorb W/DP с нанесенной 10% фазой Silar 5CP ("Serva", Германия) в условиях программируемой температуры от 140 до 250°C с шагом 2°C/мин (температура инжектора 210°C, температура детектора 240°C).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Классификация, морфология и депонирование Bracteacoccus bullatus

Bracteacoccus bullatus MZ–Ch32 (рис. 1) относится к отделу Chlorophyta, классу Chlorophyceae, порядку Sphaeropleales, семейству Bracteacoccaceae, роду Bracteacoccus.

Вегетативные клетки шаровидные, иногда яйцевидные, 10–23 мкм в диаметре. Клеточная стенка тонкая, иногда слегка утолщается после 6 месяцев роста до 1.5 мкм. Клеточная стенка зрелых клеток может образовывать пузыревидные выросты. Молодые клетки имеют 3–4 больших хлоропласта. Хлоропласты в зрелых клетках пластинчатые, круглые, иногда неправильной формы, многочисленные и мелкие, без пиреноидов. С возрастом культуры хлоропласты могут перемещаться внутрь клеток, а сами клетки обильно накапливают включения желто-оранжевого цвета. Бесполое размножение не наблюдалось.

Исследуемый штамм поддерживается в Коллекции культур водорослей лаборатории Молекулярной систематики водных растений Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева под номером MZ–Ch32.

Нуклеотидные последовательности в Gen-Bank: участок V4 18S рДНК – номер доступа



**Рис. 1.** *Bracteacoccus bullatus*, штамм MZ–Ch32: (а) – молодая вегетативная клетка, возраст 2 недели; (б) – зрелая вегетативная клетка с множественными хлоропластами, возраст 4 недели; (в) – зрелая вегетативная клетка с пузыревидным выростом; (г) – зрелая вегетативная клетка с накопленными включениями желто-оранжевого цвета, возраст 3 месяца; (д) – апланоспорангий; (е) – старая вегетативная клетка, возраст 12 месяцев. Шкала – 10 мкм.

МК843972, участок ITS1–5.8S рДНК–ITS2 – номер доступа МК852162.

#### Экология и местообитание Bracteacoccus bullatus

Штамм MZ—Ch32 выделен из образца нижнего подгоризонта подстилки, отобранной в насаждении белой акации (*Robinia pseudoacacia* L.) Старо-Бердянского лесного массива (46°56'10.12" с.ш., 35°29'28.68" в.д.), Запорожская обл., Украина, 10.11.2012. Почва темно-каштановая, pH<sub>(водн.)</sub> подстилки 6.4; влажность подстилки – 52.83%; зольность подстилки – 70.29%.

## Молекулярно-филогенетический анализ Bracteacoccus bullatus

Традиционно таксономические исследования и определение филогенетических отношений у зеленых водорослей проводятся с использованием в качестве молекулярного маркера ядерного гена 18S рДНК. Однако не всегда применение такого высоко консервативного гена дает возможность решить поставленные задачи. Низкая вариабельность гена иногда не позволяет определить таксономическое положение близкородственных видов [23]. В тоже время, второй внутренний транскрибируемый спейсер ITS2, как быстро эволюционирующая часть ядерного оперона, успешно применяется для решения вопросов филогенетического статуса критических в систематическом отношении таксонов на уровне вида и даже ниже. Поэтому для более полного и достоверного анализа филогенетического положения штамма MZ–Ch32 были получены нуклеотидные последовательности вариабельного участка V4 гена 18S рДНК и ITS1–5.8S рДНК–ITS2.

Реконструкция филогенетических связей методами максимального правдоподобия (ML, где LB – значение бутстрепа) и Байеса (BI, где PP – апостериорная вероятность) показала, как и в предыдущих исследованиях, касающихся вопросов филогении штаммов Bracteacoccus [1, 12], что все включенные в анализ последовательности B. bullatus образовали единую кладу с высокой статистической поддержкой (LB 99, PP 99) (рис. 2). В состав этой клады вошел как штамм MZ-Ch32, так и тип вида – штамм SAG 2032. Остальные виды Bracteacoccus, содержащиеся в выборке, разбились на клады, соответствующие современному пониманию филогении рода [1]. В роли ближайшей к B. bullatus клады выступил B. pseudominor H.W. Bischoff et Bold, что также ранее отмечалось [12]. Этот вид отличается от *B. bullatus* меньшими размерами клеток и отсутствием пузыревидных выростов на клеточной стенке.

Сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей штамма MZ–Ch32 с другими штаммами *B. bullatus* позволил выявить ряд эволюционных событий, произошедших в этой группе. От типового штамма SAG 2032 и штамма UTEX 345 в участке V4 исследуемый *B. bullatus* 

## МАЛЬЦЕВ и др.



**Рис. 2.** Байесовское филогенетическое дерево для штамма *Bracteacoccus bullatus* MZ–Ch32, сконструированное на основе совместного анализа нуклеотидных последовательностей участков V4 18S рДНК и ITS1–5.8S рДНК–ITS2 для 27 представителей порядка Sphaeropleales. В качестве внешней группы выбраны представители клады Sphaeropleaceae. Общая длина выравнивания 1100 п.н. Исследуемый штамм выделен жирным шрифтом. Для всех представителей указан номер штамма и номера доступа к последовательностям в GenBank. Над горизонтальными линиями показаны значения бутстрепа для ML-анализа (<50 не указаны), под горизонтальными линиями – значения Байесовских апостериорных вероятностей (<75 не указаны). Модель нуклеотидных замен GTR + G. Стрелками указано содержание оленновой ЖК (темно-серый цвет), омега-3 (светло-серый цвет) и омега-6 (серый цвет) ПНЖК в % от общей суммы ЖК при культивировании без стрессирования. Показатели представлены из данного исследования и опубликованных работ [12, 29].

MZ–Ch32 отличался одной транзицией – заменой А $\rightarrow$ G. Участок ITS1–5.8S рДНК–ITS2 штамма MZ–Ch32 характеризовался наличием одной трансверсии А $\rightarrow$ T и одной транзиции T $\rightarrow$ C по сравнению с SAG 2032. От UTEX 345 наш штамм отличали одна трансверсия А $\rightarrow$ T и две транзиции: T $\rightarrow$ C и G $\rightarrow$ A. Сопоставление нуклеотидных последовательностей штамма MZ–Ch32 с ближайшей географической находкой *B. bullatus*, штаммом MZ–Ch11, позволило выделить только одну транзицию С $\rightarrow$ T. Следовательно, наибольшую эволюционную удаленность в исследованной группе имеет штамм UTEX 345, а MZ–Ch32 располагается между штаммами SAG 2032 и MZ–Ch11.

## Исследование характеристик роста и состава жирных кислот

Увеличение численности клеток и их биомассы является важным фактором при оценке потенциала микроводорослей для использования в биотехнологическом производстве [6]. Отслеживание темпов роста культуры *B. bullatus* MZ–Ch32 осуществляли с помощью ежедневного измерения концентрации клеток водорослей в суспензии. За время культивирования нами отмечено три фазы роста: лаг-фаза, экспоненциального роста и стационарная. Лаг-фаза, сопровождающаяся адаптацией клеток к условиям культивирования, закончилась увеличением численности

100

клеток с  $0.5 \pm 0.06 \times 10^{6}$  шт./мл на момент внесения инокулята до  $3.44 \pm 0.24 \times 10^{6}$  шт./мл на пятый день. С шестого дня культура вступила в экспоненциальную фазу, во время которой клетки растут и интенсивно размножаются. Во время этой фазы наблюдалось резкое увеличение количества клеток и на тринадцатый день оно достигло  $19.38 \pm 0.97 \times 10^{6}$  шт./мл. В дальнейшем культура замедлила рост и перешла в стационарную фазу, во время которой количество клеток остается почти постоянными. На пятнадцатый день культивирования численность клеток *B. bullatus* MZ-Ch32 составляла 19.74  $\pm$  1.13  $\times$  10<sup>6</sup> шт./мл. Интенсивность накопления сухой массы соответствовала увеличению численности клеток (коэффициент корреляции 0.97) и сухая биомасса с  $0.12 \pm 0.01$  г/л в первый день к концу культивирования увеличилась до  $2.31 \pm 0.12$  г/л.

Анализ жирнокислотного состава биомассы штамма B. bullatus MZ-Ch32 во время стационарной фазы роста (на пятнадцатый день культивирования) показал, что в составе суммарных липидов клеток главными ЖК были пальмитиновая 16:0, гексадекадиеновая 16:2(7Z,10Z), олеиновая 18:1(9Z) и линолевая 18:2(9Z,12Z) - на их долю приходилось 91.9 ± 3.02% от суммы ЖК (рис. 3). В значительно меньших количествах отмечены гексадекатриеновая 16:3(7Z,10Z,13Z), тетраеновая 16:4 и стеариновая 18:0 кислоты — в сумме  $8.10 \pm 0.32\%$ . Содержание суммарных липидов в пересчете на этерифицированные жирные кислоты составило 1.29 ± 0.11 г/л. Общее содержание насыщенных ЖК было на уровне  $12.91 \pm 0.39\%$  от суммы ЖК, тогда как мононенасыщенных  $-43.20 \pm 1.52$ , а полиненасыщенных  $-43.89 \pm 1.47\%$ .

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на сложности, связанные с морфологическим определением, представители рода Bracteacoccus представляют собой богатый растительный источник липидов и вторичных кетокаротиноидов с доминированием в их составе астаксантина [12, 24, 25]. Значительный интерес вызывает состав жирных кислот у разных видов Bracteacoccus, особенно содержание олеиновой жирной кислоты, а также омега-3 и омега-6 ПНЖК [12]. Доминирование в профиле ЖК мононенасыщенных и полиненасыщенных значительно увеличивает ценность сырья для производства биолизельного топлива [6]. Высокое содержание омега-3 ПНЖК, включающих ряд незаменимых для метаболизма человека и животных соединений, предполагает успешное использование биомассы водорослей в качестве наиболее важного компонента кормов в сельском хозяйстве и аквакультуре. Достаточная концентрация омега-6 ПНЖК, особенно линолевой, предшественника арахидоно-



Рис. 3. Фрагмент ГЖХ-МС хроматограммы метиловых эфиров жирных кислот из суммарных липидов клеток штамма *Bracteacoccus bullatus* MZ–Ch32 (суммарный ионный ток). Над пиком указано обозначение жирной кислоты и её содержание в % от общей суммы ЖК (средняя величина  $\pm$  ошибка средней, n = 3).

вой кислоты, также ценится при скрининге потенциальных компонентов кормов и подкормок. Все вышеперечисленное стимулирует изучение представителей рода *Bracteacoccus* для использования в биотехнологии в качестве потенциального сырья.

Во время наших исследований разнообразия почвенных водорослей лесных биогеоценозов степной зоны мы обнаружили штамм, обладающий *Bracteacoccus*-подобной морфологией, который после видовой идентификации использовали для экспериментальных работ по выяснению особенностей его культивирования и анализа состава ЖК.

Анализ морфологических особенностей штамма MZ—Ch32 показал его тесную связь с видами рода *Bracteacoccus*. Общими чертами были: шаровидные вегетативные клетки с несколькими париетальными хлоропластами без пиреноидов, клеточные включения желто-оранжевого цвета. Образование пузыревидных выростов на клеточной стенке подчеркивало родство нашего штамма с *B. bullatus*. В тоже время, в отличии от имеющихся описаний, нами не было отмечено образование зооспор [1]. Филогенетический анализ методами ML и BI с использованием участков V4 18S рДНК и ITS1–5.8S рДНК–ITS2 показал, что штамм MZ–Ch32 тесно связан с высокой статистической поддержкой (LB 99, PP 99) с другими штаммами *B. bullatus*, включая тип вида – штамм SAG 2032 (рис. 2).

В целом виды Bracteacoccus в почвах Восточной Европы широко распространены: повсеместно представлен *B. minor* (Schmidle ex Chodat) Petrová, часто отмечаются *B. giganteus* H.W. Bischoff et Bold и B. grandis H.W. Bischoff et Bold. Эти виды населяют почвы различных природных и урбоэкосистем, а также субстраты техногенных экотопов [3, 4]. Для B. bullatus это уже вторая находка на территории Украины: штамм MZ-Ch11 был выделен из почвы белоакациевого насаждения, расположенного в Самарском лесу – самом южном природном лесном массиве на территории степной зоны Украины [12]. Видовая принадлежность этого штамма была установлена с помощью СВСподхода при построении вторичной структуры ITS2. Насаждение Robinia pseudoacacia, из подстилки которого выделен исследуемый штамм MZ-Ch32. располагается на 250 км южнее Самарского леса. Обе популяции B. bullatus найдены в насаждениях белой акации. Белая акация, как древесная порода с ажурной кроной, плохо затеняет почву и не способна создать под пологом микроклимат, полностью соответствующий лесному. Среди специфических характеристик белоакациевого опада можно выделить его труховидную и рассыпчатую структуру, близкую к нейтральной реакцию рН, а также низкие показатели запаса сухого органического вещества в условиях степной зоны [26]. На территории европейской части России *B. bullatus* отмечен один раз в Волгоградской области [27]. Из проб каштановой почвы было выделено четыре штамма: ACSSI 095, 097, 108, 134. Также из Сибири выделен штамм B. bullatus KF72 [1]. Учитывая экологические особенности и географию мест как наших находок, так и уже известных, где отмечены популяции B. bullatus (Антарктика, Арктика, Германия, Италия, Канада, США, Чехия, Швеция и т.д.), можно судить о его экстремофильных качествах, что очень важно при рассмотрении B. bullatus как биотехнологического объекта.

При отборе штаммов водорослей для использования в качестве биотехнологических объектов одним из основных критериев является их способность производить достаточное количество биомассы с высоким содержанием липидов в ней. В целом для штаммов *Bracteacoccus* отмечены достаточно большие показатели накопления сухого веса при интенсивном культивировании. Для штамма *B. minor* ACKU 506-06 (=SAG 221-1) установлена способность накапливать до 2.5 г/л сухой биомассы с содержанием липидов на уровне 53-63% при выращивании на среде 3N BBM в течение 16 дней [25]. В тоже время штамм Bracteacoccus sp. MIC-G16 оказался значительно менее продуктивным — 18 дней культивирования на модифицированной среде BBM (с добавлением глюкозы в концентрации 20 г/л) позволило достичь 0.89 г/л сухой биомассы с содержанием липидов 11.06% [24]. При выращивании штамма *B. bullatus* MZ–Ch11 на среде WC в течение 14 дней было получено значение накопления сухой биомассы на уровне 2.1 г/л, при этом десятикратное увеличение концентрации питательных веществ в среде позволило довести сухую массу до 2.4 г/л [12]. Однако манипуляции с составом среды не дали положительного эффекта в содержании липидов – в условиях стандартной среды WC доля липидов в сухой биомассе была 59%, тогда как обогащение среды привело к снижению этого значения до 17%. Культивирование исследуемого штамма B. bullatus MZ-Ch32 на среде 3N BBM позволило достичь показателя 2.31 г/л сухой биомассы с содержанием липидов 55.84%. Такие показатели близки к ранее полученным результатам исследования штаммов Bracteacoccus и позволяют сопоставлять продуктивность штамма MZ-Ch32 с другими высокоэффективными штаммами микроводорослей, например, Nannochloropsis oceanica Suda et Miyashita, содержание липидов у которого наблюдается на уровне 64.3% [28].

Состав жирных кислот у штаммов Bracteacoccus [12, 29] очень похож при стандартных условиях культивирования (рис. 3). У большинства штаммов доминирующими являются пальмитиновая (9.4-12.6%), олеиновая (13.9-63.8%), линолевая (13.9-25.4%) и α-линоленовая (13.7-21.4%) жирные кислоты. По сравнению с другими видами, профиль жирных кислот B. bullatus MZ-Ch11 содержал значительно больше олеиновой ЖК (до 63.8%). До этого максимальные значения были у штамма *B. minor* SAG 221-1 – 23.5% [29]. Биомасса штамма MZ-Ch32 также богата олеиновой ЖК (43.2%), однако этот показатель ниже в 1.48 раз, чем у MZ-Ch11 (рис. 3). Специфической чертой исследуемого штамма является высокое содержание гексадекадиеновой (12.5%) и линолевой ЖК (23.8%), что в 2.45 и 1.72 раза больше, чем y B. bullatus MZ–Ch11.

В целом виды *Bracteacoccus* характеризуются высоким содержанием омега-3 и омега-6 ПНЖК (рис. 3). Наибольшее содержание омега-3 кислот, и в первую очередь –  $\alpha$ -линоленовой, характерно для штамма *B. minor* var. *desertorum* SAG 61.80 – 26.1% [29]. Этот же штамм является лидером и по количеству омега-6 кислот – 30%. Для эволюционно близкой к Bracteacoccaceae клады Pseudomuriellaceae также свойственно накопление больших объемов как омега-3 ЖК (до 24.7% у штамма *Pseudomuriella engadinensis* SAG 221-4), так и омега-6 ЖК (до 28.1% у штамма Pseudomuriella engadinensis MZ-Ch33) наравне с высоким содержанием олеиновой ЖК (рис. 3) [2, 29]. В тоже время у более отдаленных клад соотношение основных групп ЖК имеет больше отличий. Например, у представителя клады Sphaeropleaceae штамма Ankyra judavi SAG В 17.84 значительно выше содержание омега-3 ЖК (34.3% от общей суммы ЖК), а количество омега-6 и олеиновой ЖК не превышают 4.1 и 7.9% соответственно. В связи с этим очень специфическим представляется профиль ЖК у штаммов B. bullatus. У штамма MZ-Ch11 во время культивирования на среде WC омега-3 ЖК обнаружить не удалось, а содержание омега-6 составило 19%. Манипуляции с концентрацией соелинений азота и фосфора в среде привели к появлению омега-3 на уровне 0.42% и увеличению количества омега-6 ЖК до 34.5%. Штамм MZ-Ch32 также отличался низким содержанием омега-3 ЖК -5.4%, однако по количеству омега-6 ЖК он превзошел все известные штаммы *Bracteacoccus* – 36.3% (рис. 3). Обнаруженное соотношение омега-3 и омега-6 ПНЖК (1:6.7) является близким к тому, что считается наиболее сбалансированным, например, для обеспечения нормальной жизнедеятельности человека (1:4) [9, 10].

Общее количество насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот в биомассе B. bullatus MZ-Ch32 составило 56.11%, что близко к значениям растительных масел, которые используются в качестве исходного сырья для производства биодизеля. Одной из ценных жирных кислот при производстве топлива из растительного сырья является олеиновая кислота, которая улучшает его текучесть при понижении температуры [30]. Например, рапсовое масло содержит до 64% олеиновой кислоты, соевое – до 21.8%, а масло ятрофы — в диапазоне 34—45% [30]. В связи с этим жирнокислотный профиль штамма MZ-Ch32 позволяет рассматривать его биомассу пригодной для производства биодизеля. С другой стороны, большая доля омега-6 ПНЖК, особенно линолевой, в общем спектре ЖК актуализирует дальнейшие исследования возможности создания на основе штамма B. bullatus MZ-Ch32 высокоэффективных пищевых добавок и препаратов, кормов и подкормок для аквакультуры и животноводства.

# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение разнообразия водорослей в подстилке белоакациевого насаждения Старо-Бердянского леса позволило выделить в культуру штамм зеленой водоросли *Bracteacoccus bullatus* MZ–Ch32 (Sphaeropleales, Chlorophyta). Таксономическое положение штамма подтверждено с помощью молекулярно-филогенетического анализа на основе ядерного гена 18S рДНК и участка ITS1– 5.8S рДНК–ITS2. Проведенное исследование ха-

рактеристик темпов роста и накопления липидов позволило получить сухую биомассу с концентрацией 2.31 г/л и содержанием липидов 55.84% в течение пятнадцатидневного периода культивирования на среде 3N BBM. Анализ жирнокислотного состава клеток исследованного штамма МZ-Ch32 показал увеличенное содержание олеиновой кислоты по сравнению с другими штаммами Bracteacoccus, а относительно штаммов Bracteacoccus bullatus – повышенную концентрацию гексадекадиеновой и линолевой жирных кислот. Количество насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот в биомассе исследуемого штамма позволяют его рассматривать как перспективное сырье для производства биотоплива. Сбалансированное соотношение омега-3 и омега-6 ПНЖК. большая доля линолевой кислоты дают возможность использовать биомассу штамма Bracteacoccus bullatus MZ-Ch32 как компонент высокоэффективных пищевых добавок и препаратов, кормов и подкормок для аквакультуры и животноводства.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-74-00095).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит какихлибо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. *Fučíková K., Flechtner V.R., Lewis L.A.* Revision of the genus *Bracteacoccus* Tereg (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on a phylogenetic approach // Nova Hedwigia. 2012. V. 96. P. 15.
  - https://doi.org/10.1127/0029-5035/2012/0067
- Maltsev Y.I., Maltseva I.A., Kulikovskiy M.S., Maltseva S. Yu., Sidorov R.A. Analysis of a new strain of Pseudomuriella engadinensis (Sphaeropleales, Chlorophyta) for possible use in biotechnology // Russ. J. Plant Physiol. V. 66. P. 609. https://doi.org/10.1134/S1021443719040083
- Мальцева И.А. Грунтові водорості лісів степової зони України. Мелітополь: Люкс, 2009. 312 с.
- Tsarenko P.M., Wasser S., Nevo E. Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography. Vol. 3. Chlorophyta. Ruggell: A. R. G. Gantner Verlag, 2011. 515 p.
- Goncalves E.C., Wilkie A.C., Kirst M., Rathinasabapathi B. Metabolic regulation of triacylglycerol accumulation in the green algae: identification of potential targets for engineering to improve oil yield // Plant. Biotechnol. J. 2016. V. 14. P. 1649. https://doi.org/10.1111/pbi.12523
- Maltsev Y.I., Konovalenko T.V., Barantsova I.A., Maltseva I.A., Maltseva K.I. Prospects of using algae in biofuel production // Regul. Mech. Biosyst. 2017. V. 8. P. 455. https://doi.org/10.15421/021770
- Chisti Y. Biodiesel from microalgae // Biotechnol. Advances. 2007. V. 25. P. 294. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001

- Lloyd A. Horrocks L.A., Yeo Y. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA) // Pharmacol. Res. 1999. V. 40. P. 211.
- Santos J.E., Bilby T.R., Thatcher W.W., Staples C.R., Silvestre F.T. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle // Reprod. Domest. Anim. 2008. V. 2. P. 23. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01139.x
- Soydan E., Şen U., Şirin E. Relationship between dietary fatty acids and reproductive functions in dairy cattle // Turkish Journal of Agriculture – Food Science and Technology. 2017. V. 5. P. 1575.
- Patil V., Kallqvist T., Olsen E., Vogt G., Gislerød H.R. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed // Aquacult. Int. 2007. V. 15. P. 1. https://doi.org/10.1007/s10499-006-9060-3
- Mamaeva A., Petrushkina M., Maltsev Y., Gusev E., Kulikovskiy M., Filimonova A., Sorokin B., Zotko N., Vinokurov V., Kopitsyn D., Petrova D., Novikov A., Namsaraev Z., Kuzmin D. Simultaneous increase in cellular content and volumetric concentration of lipids in Bracteacoccus bullatus cultivated at reduced nitrogen and phosphorus concentrations // J. Appl. Phycol. 2018. V. 30. P. 2237.

https://doi.org/10.1007/s10811-018-1471-9

- 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. https://doi.org/10.1007/s10811-017-1188-1
- Maltsev Y.I., Didovich S.V., Maltseva I.A. Seasonal changes in the communities of microorganisms and algae in the litters of tree plantations in the Steppe zone // Eurasian Soil Science. 2017. V. 50. P. 935. https://doi.org/10.1134/S1064229317060059
- 15. *Bischoff H.W., Bold H.C.* Phycological studies IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. University of Texas Publication 6318, 1963. 95 p.
- Zimmermann J., Jahn R., Gemeinholzer B. Barcoding diatoms: evaluation of the V4 subregion on the 18S rRNA gene, including new primers and protocols // Org. Divers. Evol. 2011. V. 11. P. 173.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications / Eds. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. White T.J. New York: Academic Press Inc., 1990. P. 315.

- Katoh K., Toh H. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program // Bioinformatics. 2010. V. P. 1899.
- Stamatakis A., Hoover P., Rougemont J. A rapid bootstrap algorithm for the RA×ML web-servers // Syst. Biol. 2008. V. 75. P. 758.
- Ronquist F, Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. V. 19. P. 1572.
- Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // J. Biochem. Physiol. 1959. V. 37. P. 911.
- 22. *Palmer F.B.S.-C.* The extraction of acidic phosphollpids in organic solvent mixtures containing water // Biochim. Biophys Acta. 1971. 134.
- Neustupa J.I., Elias M., Skaloud P., Nemcova Y., Sejnohova L. Xylochlorisir regularis gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga // Phycologia. 2011. V. 50, P. 57. https://doi.org/10.2216/08–64.1
- Ratha S.K., Babu S., Renuka N., Prasanna R., Prasad R.B.N., Saxena A.K. Exploring nutritional modes of cultivation for enhancing lipid accumulation in microalgae // J. Basic Microbiol. 2012. V. 53. P. 440.
- Minyuk G.S., Chelebieva E.S., Chubchikova I.N. Secondary carotenogenesis of the green microalga Bracteacoccus minor (Chlorophyta) in a two-stage culture // Int. J. Algae. 2015. V. 25. P. 21.
- 26. *Maltsev Y., Maltseva I.* The influence of forest-forming tree species on diversity and spatial distribution of algae in forest litter // Folia Oecologica. 2018. V. 45. P. 72. https://doi.org/10.2478/foecol-2018-0008
- Темралеева А.Д. Новые для почвенной альгофлоры России виды зеленых водорослей Bracteacoccus bullatus и B. occidentalis (Sphaeropleales, Chlorophyta) // Вопросы современной альгологии. 2018. V. 16.
- Wan C., Zhao X.Q., Guo S.L., Asraful Alam M., Bai F.W. Bioflocculant production from Solibacillus silvestris W01 and its application in cost-effective harvest of marine microalga Nannochloropsis oceanica by flocculation // Bioresour. Technol. 2013. V. 135. P. 207. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.004
- 29. Lang I., Hodac L., Friedl T., Feussner I. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection // BMC Pl. Biol. 2011. V. 11. https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-124
- Kumar M.S., Ramesh A., Nagalingam B. An experimental comparison of methods to use methanol and Jatropha oil in a compression ignition engine // Biomass Bioenergy. 2003. V. 25. P. 309.