

УДК 581.1

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ГАЛОТОЛЕРАНТНОГО АРКТИЧЕСКОГО ШТАММА КАРОТИНОГЕННОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *Halochlorella rubescens* NAMSU SBB-20

© 2023 г. А. А. Зайцева^а*, Д. А. Бахарева^а, П. А. Зайцев^а, Е. С. Лобакова^а

^аФедеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Москва, Россия

*e-mail: annakublanovskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 09.12.2022 г.

После доработки 12.12.2022 г.

Принята к публикации 12.12.2022 г.

Зеленые микроводоросли, способные к накоплению вторичных каротиноидов, являются важнейшими объектами биотехнологии, а поиск новых штаммов с уникальными свойствами, в частности, приспособленных к росту при низких температурах и повышенной солености в среде – актуальной задачей. Штамм микроводоросли NAMSU SBB-20 выделен из альго-бактериальной биопленки, обнаруженной на побережье Белого моря в зоне литорали на Соловецком архипелаге. Идентификация штамма показала его принадлежность к виду *Halochlorella rubescens* P.J.L. Dangeard. Вид *H. rubescens* впервые описан для акватории Белого моря. В условиях высокой интенсивности света показаны ультраструктурные изменения клеток, среди которых отмечены деструкция фотосинтетического аппарата, формирование цитоплазматических и хлоропластных липидных включений. Показано, что в неблагоприятных для роста условиях культура штамма NAMSU SBB-20 способна приобретать оранжевую окраску. Проведена оценка влияния состава среды и интенсивности освещения на пигментный состав водоросли. Наибольшие абсолютные значения накопления каротиноидов отмечены при культивировании на свету интенсивностью 150 мкмоль квантов ФАР/м²/с на средах BG-11, не содержащих источника фосфора (15.66 ± 0.18 мг/л) или азота (15.95 ± 0.56 мг/л). Описанный штамм обладает биотехнологическим потенциалом ввиду изначальной галотолерантности и накопления высоких значений вторичных каротиноидов в биомассе.

Ключевые слова: *Halochlorella rubescens*, арктический регион, каротиногенные микроводоросли, липидные включения, пигменты, электронная микроскопия

DOI: 10.31857/S0015330322600735, EDN: IBRXKH

ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли (оксигенные фототрофные микроорганизмы) широко применяются в различных областях биотехнологии. В первую очередь они являются продуцентами ряда эссенциальных для человека и животных веществ, например, каротиноидов и длинноцепочечных полиненасыщенных жирных кислот [1–3]. На данный момент в промышленности применяются в основном такие виды каротиногенных микроводорослей, как *Haematococcus lacustris* (Girod-Chantrons) Rostafinski [2] и *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco [1], используемые для получения астаксантина и β-каротина, соответственно. Для штаммов, применяемых в биотехнологии, известны сниженная продуктивность и склонность к контаминации, что указывает на необходимость поиска новых штаммов продуцентов кето-каротиноидов и/или ксантофиллов и подходов к оптимизации процессов их

культивирования (в частности, приводящих к увеличению продукции каротиноидов) [3]. Технология промышленного культивирования оксигенных фотоавтотрофных микроорганизмов в открытых системах культивирования (прудах высокой интенсивности культивирования, high rate algal ponds (HRAPs)) налажена, в основном, в странах с теплым климатом, таких как Израиль, США (южные штаты), Индия, Австралия и др. [1]. Температурные режимы средних и северных широт России не подходят для культивирования известных на данный момент штаммов микроводорослей в открытых системах, несмотря на достаточное количество естественного освещения в северных регионах в течение полярного дня. Разработка технологий культивирования штаммов, выделенных из арктических регионов, в частности с побережья Белого моря [4] позволит выращивать высокопродуктивные штаммы оксигенных фототрофных

микроорганизмов в условиях пониженных температур и использовать в качестве среды культивирования морскую воду. Микроводоросль штамма NAMSU SBB-20 была выделена из зоны литорали побережья Белого моря бухты Благополучия (о. Большой Соловецкий, Архангельская обл., Россия) в 2020 году. Соловецкие острова относятся к Арктическому региону России, средняя годовая температура воздуха на них составляет 1.1°C.

Ранее из Арктического региона (Кандалакшский залив Белого моря) были выделены штаммы каротиногенных микроводорослей, среди которых представители рр. *Haematococcus*, *Bracteacoccus* и *Coelastrella*. Показано, что данные штаммы способны к накоплению как исключительно астаксантина (р. *Haematococcus*), так и смеси данного пигмента с β-каротином (рр. *Bracteacoccus* и *Coelastrella*) [4]. Однако представители вида *Halochlorella rubescens* P.J.L. Dangeard ранее не были обнаружены в данном регионе.

Важным элементом биотехнологии получения пигментов из микроводорослей является индукция в клетках вторичного каротиногенеза. У оксигенных фототрофных микроорганизмов для этого традиционно применяют культивирование под действием стрессовых факторов, таких как высокая интенсивность света, недостаток элементов минерального питания, изменение температуры или pH среды, как по отдельности, так и в различных сочетаниях [3].

Целью данной работы является характеристика нового арктического штамма микроводоросли NAMSU SBB-20 и оценка параметров накопления им каротиноидов в условиях дефицита минерального питания (по азоту и по фосфору) и воздействия света высокой интенсивности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение культуры нового штамма микроводоросли NAMSU SBB-20 из природы

Штамм микроводоросли NAMSU SBB-20 получен в 2020 г. из альго-бактериальной биопленки, содержащейся в водно-грунтовой пробе, отобранной на Большом Соловецком острове в бухте Благополучия (65°1'24" с.ш. 35°42'21" в.д.). Отбор пробы проводили из зоны средней литорали во время отлива, рядом с трубой, осуществляющей слив сточных вод из поселка Соловецкий (рис. 2а, б). Выделение штамма осуществляли на среде BG-11 [5], согласно ранее описанной методике [4]. Получение аксеничной культуры проводили по методикам, описанным в работе [6]. Штамм был депонирован в коллекцию NAMSU МГУ имени М.В. Ломоносова.

Таксономическая идентификация штамма NAMSU SBB-20

Таксономическую принадлежность микроводоросли штамма SBB-20 определяли с помощью мультилокусного анализа фрагментов генов рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (*rbcL*), гена 18S рРНК (*18SrRNA*) и ядерного рибосомального кластера генов, включающего внутренние транскрибируемые спейсеры (internal transcribed spacer, ITS) 1 и 2, а также ген 5,8S рРНК (фрагмент ITS1-5.8SрРНК-ITS2). Для выделения геномной ДНК осадок клеток микроводоросли замораживали в жидком азоте в пробирке объемом 1.5 мл (Eppendorf, Германия) с последующей гомогенизацией с помощью пестика для данных пробирок. Выделение ДНК из полученного гомогената проводили с помощью набора DNeasy Plant Pro Kit (QIAGEN, Германия) по протоколу производителя. Последовательности праймеров и протоколы ПЦР были использованы из ранее опубликованных работ [7–9]. Постановку ПЦР, очистку ПЦР-продуктов и их секвенирование проводили в соответствии с процедурой, описанной ранее [8].

Поиск гомологичных последовательностей проводили в базе данных NCBI GenBank при помощи алгоритма парных локальных выравниваний BLAST [10]. Множественное выравнивание проводили при помощи алгоритма Muscle [11]. Все позиции в нуклеотидной последовательности, содержащие пропуски, не учитывались. Филогенетические деревья строили в программе MEGA X [12] с использованием алгоритма максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) [13] и K2+G по модели (2-параметрическая модель Кимуры с допущением о том, что частоты нуклеотидных замен подчиняются распределению Пуассона с параметром формы 5) [14]. Построение исходного дерева проводили с помощью алгоритма “ближайших соседей” (Neighbor-Joining), затем методом обрезки-прививки [15] проводили эвристический поиск. Достоверность топологии деревьев проверяли при помощи метода bootstrap [16] с 1000 повторностей.

Светлопольная микроскопия

Морфологический анализ культуры микроводоросли проводили при помощи световой микроскопии в светлопольном режиме на микроскопе Leica DM2500 (LEICA Microsystems, Германия), снабженном фотокамерой DFC 7000T того же производителя.

Просвечивающая электронная микроскопия

Ультраструктуру клеток изучали методами просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Фиксация и обезвоживание клеток были выпол-

Таблица 1. Условия культивирования, применимые в работе для оценки накопления в клетках микроводоросли вторичных каротиноидов

Обозначение	Среда культивирования	Интенсивность освещения, мкмоль квантов ФАР/м ² /с
LL	BG-11*	50
LL,-P	BG-11 без источника фосфора**	50
LL,-N	BG-11 ₀ без источника азота***	50
HL	BG-11	150
HL,-P	BG-11 без источника фосфора	150
HL,-N	BG-11 ₀ без источника азота	150

Примечание: * NaNO₃ (1.5 г/л), K₂HPO₄ (0.04 г/л), MgSO₄·7H₂O (0.075 г/л), CaCl₂·2H₂O (0.036 г/л), лимонная кислота (6 мг/л), цитрат аммонийного железа (6 мг/л), этилендиаминтетраацетат натрия двузамещенный (1 мг/л), Na₂CO₃ (20 мг/л), H₃BO₃ (2.86 мг/л), MnSO₄ (1.37 мг/л), ZnSO₄·7H₂O (0.222 мг/л), (NH₄)₂MoO₄ (0.032 мг/л), CuSO₄·5H₂O (0.079 мг/л), Co(NO₃)₂·6H₂O (0.0494 мг/л), dH₂O (1 л), pH 7.5.

** среда, не содержащая K₂HPO₄.

*** среда, не содержащая NaNO₃.

нены согласно протоколу, описанному в статье Gorelova с соавт. [17]. Сначала клетки были зафиксированы в 2% (масса : объем) растворе глутарового альдегида, приготовленного на 0.1 М буфере какодилата натрия (pH 7.4), при комнатной температуре в течение получаса. Далее была проведена пост-фиксация клеток в 1% (по массе) растворе тетраоксида осмия, приготовленного на том же буфере, в течение 4 ч. Образцы были заключены в эпоксидную смесь Araldite (Sigma-Aldrich, США). Приготовление полутонких срезов проводили на ультратоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Германия). Срезы были смонтированы на медные сеточки для электронной микроскопии с ультратонкой подложкой из формвара (Ted Pella, США). Для изучения ультраструктуры методом ПЭМ срезы дополнительно были контрастированы раствором цитрата свинца [18]. Изображения были получены на электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония).

Сканирующая электронная микроскопия

Клеточную поверхность микроводоросли изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для этого зафиксированные и обезвоженные образцы клеток переносили в ацетон и высушивали в критической точке CO₂ [19] в сушильной установке HCP-2 (Hitachi, Япония). Затем поверхность образцов напыляли золотом с палладием на ионно-напылительной установке IB Ion Coater (Eiko, Япония) и исследовали в микроскопе JSM-6380LA (JEOL, Япония) при инструментальном увеличении 60-20000х и ускоряющем напряжении 15 кВ [17], в межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ.

Оценка влияния факторов стресса на пигментный состав

Для оценки влияния состава среды и интенсивности освещения на пигментный состав биомассы культуры проводили культивирование микроводоросли штамма SBV-20 в шести вариантах комбинации факторов (табл. 1). Были использованы как стандартная среда BG-11, так и ее модификации: безазотная среда BG-11₀ [20] и среда BG_p, не содержащая источника фосфора, а также освещение низкой (50 мкмоль квантов ФАР/м²/с) и высокой (150 мкмоль квантов ФАР/м²/с) интенсивности. Инкубирование клеток микроводорослей в указанных условиях (табл. 1) проводили в пластиковых чашках Петри диаметром 10 см, в которые помещали по 10 мл периодической культуры штамма SBV-20 на 18 суток роста. Предварительное культивирование микроводоросли проводили в колбе объемом 750 мл, содержащей 300 мл среды BG-11, при перемешивании 85 об./мин в шейкере-инкубаторе New Brunswick Innova 44 (Eppendorf, Германия) и освещении 40 мкмоль фотонов/(м² с) ФАР.

Анализ содержания пигментов во всех пробах проводили в экстрактах, полученных путем инкубирования клеток с диметилсульфоксидом (ДМСО). Для этого отбирали аликвоты культуры объемом 1.5 мл. Далее центрифугировали в течение трех минут на скорости 14200 об./мин на центрифуге Minispin (Eppendorf, Германия), удаляли супернатант и добавляли к осадку 1.5 мл ДМСО. Затем проводили инкубирование суспензии при 70°C в течение 5 мин при перемешивании на орбитальном термощейкере (800 об./мин), после центрифугирования (3 мин при максимальной скорости вращения) удаляли осадок. Далее к раствору добавляли еще 1.5 мл ДМСО и повторяли

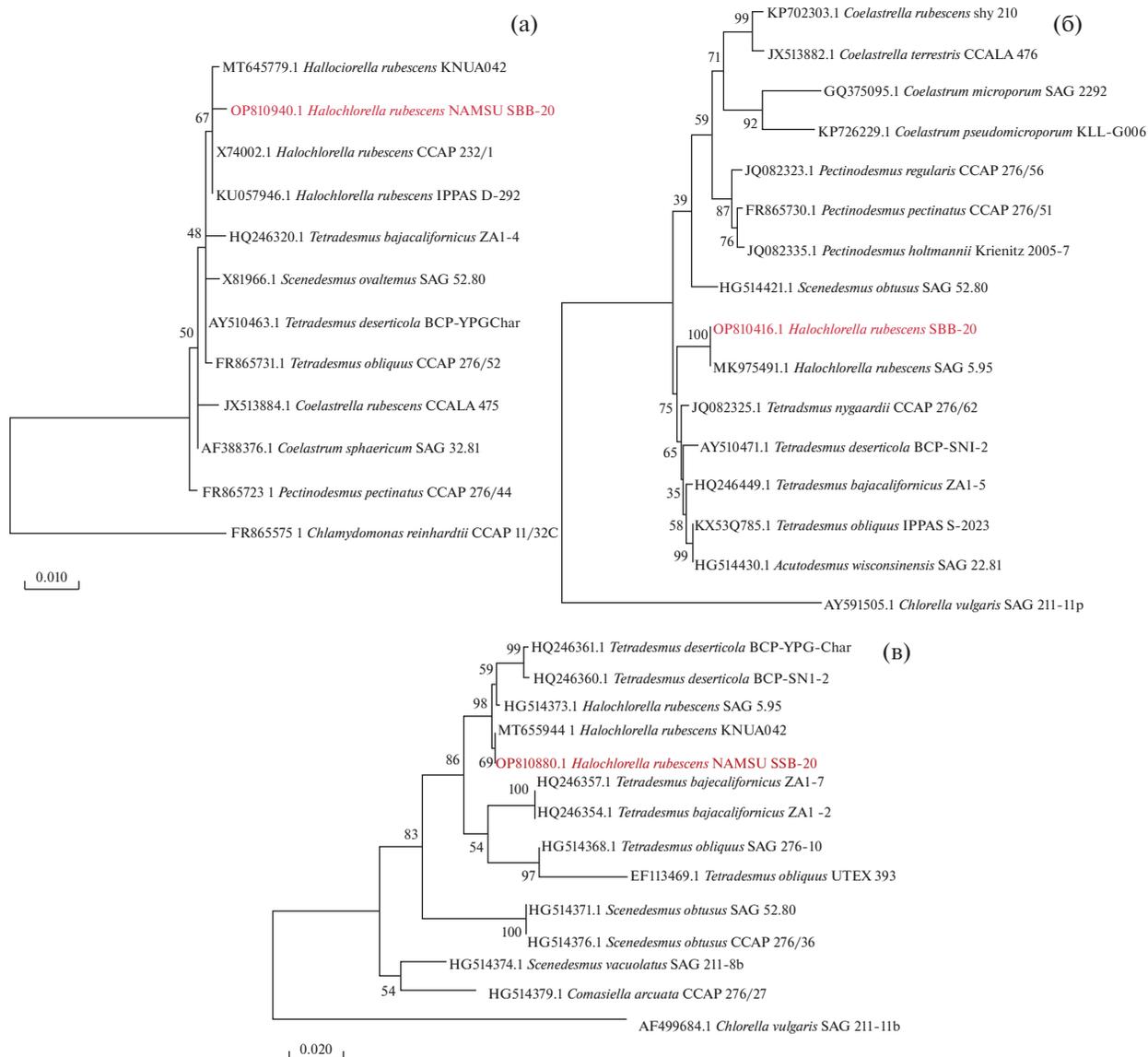


Рис. 1. Филогенетические деревья исследуемого штамма микроводоросли по локусам: *18SpPHK* (а), *ITS1-5.8S pPHK-ITS2* (б) и *rbcL* (в), полученные с помощью алгоритма максимального правдоподобия (Maximum likelihood). Полу жирным шрифтом выделен исследуемый штамм. Натуральный логарифм функции правдоподобия дерева с наиболее оптимальной топологией составил: -1368.91 (а); -2582.99 (б); -1907.41 (в). Длина анализируемых последовательностей: 749 (а); 512 (б); 620 (в) нуклеотидов. Перед названием таксона указан идентификатор в базе данных NCBI GenBank. Числа около узлов показывают, в каком проценте повторностей присутствовал данный элемент топологии при bootstrapping-проверке. Шкала масштаба отражает количество замен, деленное на общее число позиций в выравнивании.

инкубирование при тех же условиях. Концентрации хлорофиллов *a* и *b*, а также суммарную концентрацию каротиноидов в полученных экстрактах определяли спектрофотометрически в стандартных кварцевых кюветках с длиной оптического пути, равной 1 см. Спектры поглощения в видимой и ближней ИК-области ($\lambda = 450-800$ нм) регистрировали на спектрофотометре Agilent Cary 300 UV-Vis (Agilent Technologies, США). Расчеты концентраций хлорофиллов *a* и *b* и суммарной концентрации каротиноидов в полученных экстрактах проводили по уравнениям из работы [21].

Построение графиков, расчет значений стандартных отклонений проводили в программе Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Таксономическая идентификация штамма микроводоросли

Филогенетический анализ полученного штамма микроводоросли проводили по трем локусам: *18SpPHK* (рис. 1а), *ITS1-5.8S pPHK-ITS2* (рис. 1б) и *rbcL* (рис. 1в). Полученные последовательности ис-

следуемого штамма по всем локусам кластеризовались с последовательностями, ассоциированными с видом *Halochlorella rubescens* (штаммы SAG 5.95, KNUA042, CCAP 232/1), что позволило отнести исследуемый штамм к данному виду. Полученные последовательности ДНК были депонированы в базу данных NCBI GenBank с присвоением идентификаторов OP810940.1 (*18SpPHK*), OP810416.1 (ITS1-5.8S *pPHK*-ITS2), OP819880 (*rbcL*).

Характеристика стадий жизненного цикла штамма и особенностей клеточной организации H. rubescens NAMSU SBB-20

В условиях, благоприятных для вегетативного роста (среда BG-11, интенсивность света 40 мкмоль ФАР/м²/с), суспензия клеток микроводоросли имела зеленый цвет. Культура была представлена, в основном, одиночными сферическими одноядерными клетками диаметром 5–8 мкм (рис. 2в). Наряду с одиночными клетками встречались скопления клеток, не объединенных общей поверхностной структурой, и немногочисленные митотически делящиеся одиночные клетки (рис. 2в, г). Отмечено формирование автоспорангиев с 4–8 автоспорами. Подвижные клетки – зооспоры – не обнаружены.

Поверхность одиночных клеток микроводоросли при исследовании методом СЭМ характеризовалась наличием четких борозд, которые сходятся в единую точку на полюсах клетки (рис. 2г). Вскрытие спорангиев и выход автоспор происходит за счет растворения части материнской оболочки спорангия.

Клетки *H. rubescens*, культивируемые на свету низкой интенсивности, на ультратонких срезах имели сравнительно развитый фотосинтетический аппарат, представленный пристенным хлоропластом, в котором выявлялись крахмальные зерна и, как правило, пиреноид, разделенный пиреноидальными тилакоидами на 2 – 4 скорлупки. В цитоплазме клеток присутствовало одно ядро, многочисленные митохондрии и вакуоли с различными включениями (рис. 2д, е).

Характеристика культуры при росте в неблагоприятных условиях

Клетки культуры штамма *H. rubescens*, выращиваемые в условиях высокой интенсивности света (HL, см. табл. 1), имели оранжевый оттенок (рис. 3а). Спектр экстракта пигментов, выделенных с помощью ДМСО из биомассы микроводоросли, культивируемой на свету высокой интенсивности и стандартной среде BG-11, представлен на рис. 3б; в качестве контроля приведен спектр пигментов из культуры, выращиваемой на среде BG-11 при освещении низкой интенсивности. Данный спектр показывает увеличение значений оптической плотности в сине-зеленой области

спектра для клеток, культивируемых в условиях повышенной интенсивности света, по сравнению со спектрами контрольной пробы. Максимумы на спектре экстрактов пигментов располагались в области поглощения каротиноидов и приблизительно соответствовали максимумам поглощения β-каротина (466 нм) и астаксантина (492 нм).

Анализ ультратонких срезов клеток, выращенных в условиях высокой интенсивности света (HL, см. табл. 1), показал существенные перестройки. Практически всю площадь среза клеток занимают липидные включения (олеосомы) пониженной электронной плотности (рис. 3в). Редко выявлялись крахмальные зерна и пластоглобулы, различимые на срезе как округлые включения более высокой электронной плотности, расположенные в клетке, по-видимому, в области деградировавшего фотосинтетического аппарата (рис. 3г). Интактные хлоропласты отсутствовали.

На 14 сутки культивирования *H. rubescens* в чашках Петри в условиях высокой интенсивности света и недостатка элементов минерального питания, азота (HL, -N, табл. 1) или фосфора (HL, -P, табл. 1), отмечено наибольшее значимое изменение цвета культуры среди шести вариантов условий культивирования (табл. 1) (рис. 4а–е). При продолжении выращивания микроводоросли в тех же чашках Петри при шести комбинациях факторов состава среды и интенсивности света, биомасса клеток всех вариантов культивирования, кроме контроля (LL), характеризовалась приобретением оранжевого цвета разной степени интенсивности (рис. 4ж–м). Оценка количественных параметров накопления каротиноидов, выделенных из биомассы клеток после 21 суток культивирования на свету высокой интенсивности и дефицита азота и фосфора представлена на рис. 5. Показано увеличение абсолютного (Кар, мг/л) и относительного (Кар/Хл, мг/мг) содержания каротиноидов при культивировании на свету высокой интенсивности. При этом максимальные значения 15.66 ± 0.18 и 15.95 ± 0.56 были отмечены для образцов, находящихся в условиях дефицита фосфора (HL, -P) и азота (HL, -N), соответственно. Относительное содержание каротиноидов, нормированных на концентрацию общего хлорофилла ($C_{\text{хл}a} + C_{\text{хл}b}$), имело наибольшие значения 0.98 ± 0.03 на полной среде (HL) и 1.00 ± 0.00 на среде, модифицированной по содержанию фосфора (HL, -P).

ОБСУЖДЕНИЕ

Описанный штамм согласно филогенетическому анализу имеет наибольшую гомологию с видом *Halochlorella rubescens* P.J.L.Dangeard (штамм SAG 5.95) (рис. 1). Данный вид также описан как *Scenedemus rubescens* (P.J.L.Dangeard) E.Kessler, M.Schafer, C.Hummer, A.Kloboucek & V.A.R.Huss,

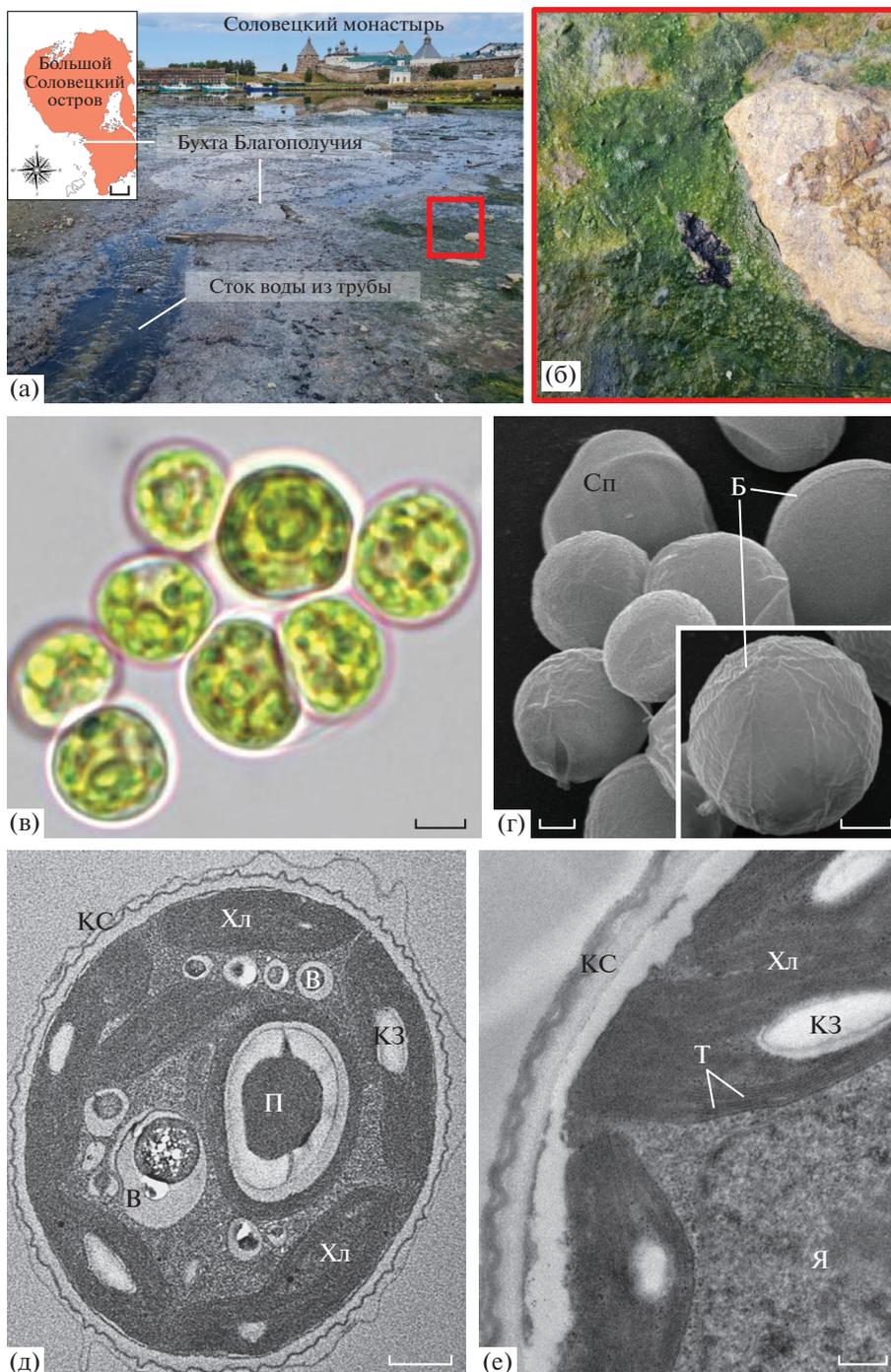


Рис. 2. Характеристика штамма *H. rubescens* NAMSU SBB-20: а, б – место выделения штамма и внешний вид альго-бактериальной биопленки, из которой был выделен штамм; в – морфологические особенности вегетативных “зеленых” клеток; г – поверхность одиночных вегетативных клеток и спорангиев, исследованная с помощью СЭМ; д, е – ультраструктурные особенности вегетативных клеток. Масштабные отрезки: 3 мкм (а); 2 мкм (в, г); 1 мкм (д); 200 нм (е). Обозначения: Б – борозда, В – вакуоль, КЗ – крахмальное зерно, КС – клеточная стенка, П – пиреноид, Сп – спорангий с автоспорами, Т – тилакоиды хлоропласта, Хл – хлоропласт, Я – ядро.

однако, согласно современной точке зрения и онлайн базе данных AlgaeBase [22], *S. rubescens* признан синонимом *H. rubescens*. Виды рода *Scenedesmus* являются в основном пресноводными представителями, в то время как, штамм, описанный

как *Halochlorella rubescens* CCAC 0126, был выделен, как и штамм SBB-20 с морского побережья, из зоны супралиторали (www.ccac.uni-koeln.de).

По-видимому, наиболее ранним описанным штаммом данного вида является *Scenedesmus*

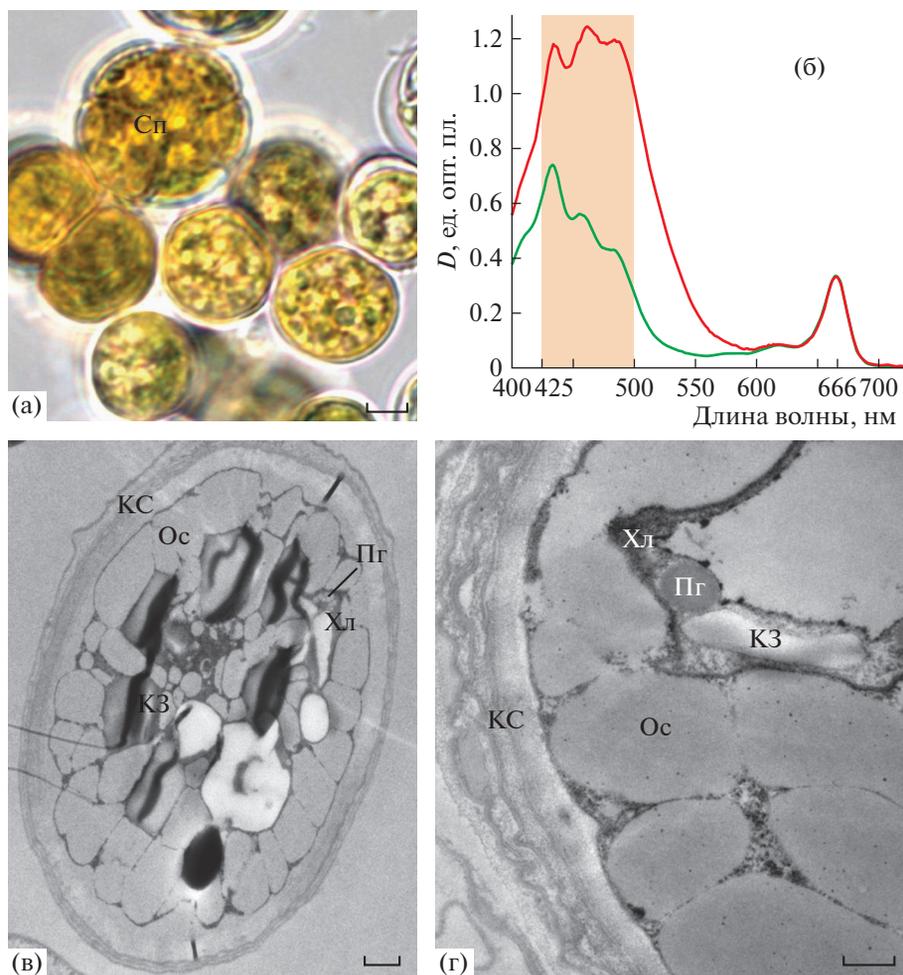


Рис. 3. Характеристика клеток штамма *H. rubescens* NAMSU SBB-20 после индукции каротиногенеза: а – морфологические особенности “оранжевых” клеток; б – спектр поглощения экстрактов пигментов в ДМСО “зеленых” (спектр зеленого цвета) и “оранжевых” (спектр красного цвета) клеток, нормированных по поглощению при $\lambda = 666$ нм; ультраструктурные особенности “оранжевых” клетки (в) и фрагмента автоспоры в автоспорангии (г). Обозначения: КЗ – крахмальное зерно, КС – клеточная стенка, Пг – пластоглобулы, Ос – олеосомы, Хл – хлоропласт.

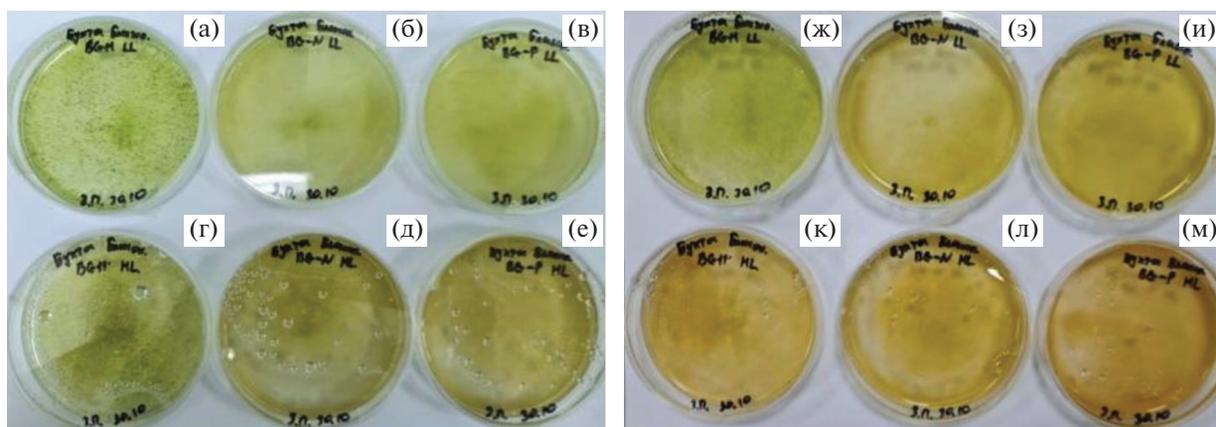


Рис. 4. Внешний вид чашек Петри, содержащих биомассу культуры микроводоросли штамма *H. rubescens* NAMSU SBB-20 после 14 (а–е) и 21 (ж–м) суток культивирования в стрессовых условиях: а, ж – неяркий свет (50 мкмоль квантов ФАР/м²/с), полная среда BG-11 (LL); б, з – неяркий свет, среда BG-11 без источника N (LL,-N); в, и – неяркий свет, среда BG-11 без источника P (LL,-P); г, к – яркий свет (150 мкмоль квантов ФАР/м²/с), полная среда BG-11 (HL); д, л – яркий свет, среда BG-11 без источника N (HL,-N); е, м – яркий свет, среда BG-11 без источника P (HL,-P).

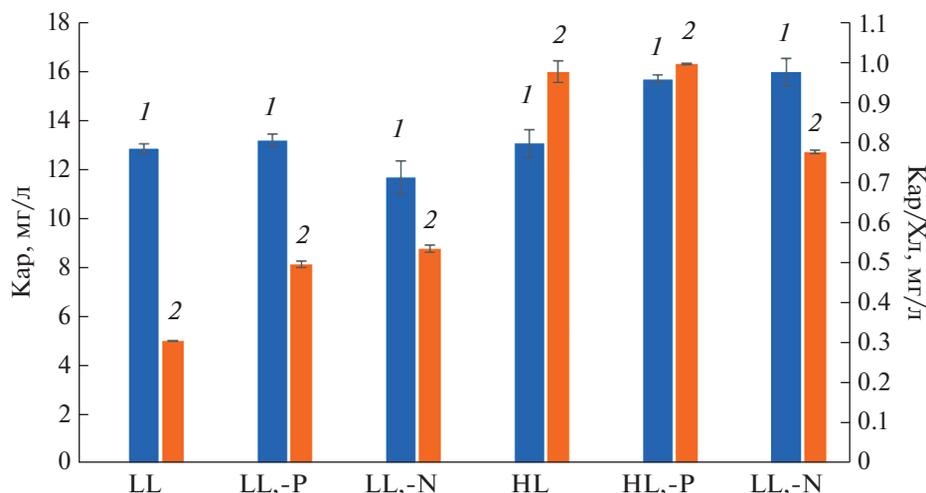


Рис. 5. Параметры накопления каротиноидов клетками штамма *H. rubescens* SBB-20 при различных условиях культивирования. 1 – абсолютные значения (Кар, мг/л); 2 – относительные значения (Кар/Хл, мг/мг). LL – культивирование на свету низкой интенсивности (50 мкмоль квантов ФАР/м²/с); LL,-N – неяркий свет, среда BG-11 без источника N; LL,-P – неяркий свет, среда BG-11 без источника P; HL – культивирование на свету высокой интенсивности (150 мкмоль квантов ФАР/м²/с); HL,-N – яркий свет, среда BG-11 без источника N; HL,-P – яркий свет, среда BG-11 без источника P. Указаны стандартные отклонения, рассчитанные по двум повторностям.

rubescens ССАР 232/1, который первоначально (до проведения филогенетического анализа [23]) относился к виду *Chlorella fusca* var. *rubescens* [24]. Данный таксон также является синонимом *H. rubescens* согласно онлайн базе данных AlgaeBase. Штамм *S. rubescens* ССАР 232/1, как и исследованный в настоящей работе штамм *H. rubescens* SBB-20, имеет сеть тонких ребер и полярных утолщений на поверхности клетки [25], является одноклеточной водорослью с пиреноидом в хлоропласте и характеризуется способностью к накоплению вторичных каротиноидов [26]. Помимо филогенетического анализа (рис. 1), сходство в экологической приуроченности и морфологических и физиологических признаках подтверждают принадлежность исследуемого штамма SBB-20 к виду *Halochlorella rubescens*. Согласно доступным информационным источникам, данный вид был обнаружен в биоте Белого моря впервые [27].

Штаммы вида *H. rubescens* (*S. rubescens*) являются объектом ряда исследований, в которых рассматривалась возможность его применение для биоизъятия азота и фосфора из сточных вод [28], продукции биотоплива [29, 30], в качестве источника смеси вторичных каротиноидов [29].

Согласно анализу пигментного состава экстрактов биомассы *H. rubescens* NAMSU SBB-20, наибольшие показатели накопления каротиноидов отмечены для условий культивирования при высокой интенсивности света и в отсутствии источника азота (HL,-N, табл. 1) или фосфора (HL,-P, табл. 1) (рис. 5). В связи с тем, что штамм *H. rubescens* NAMSU SBB-20 был выделен из точки, расположенной в непосредственной близости от стока

бытовых отходов (см. раздел Материалы и методы), для которых показано повышенное содержание фосфора и азота [28], недостаток данных элементов в среде культивирования может являться стрессовым фактором и индуцировать вторичный каротиногенез. Количественные данные по накоплению каротиноидов в биомассе штамма SBB-20 в условиях стресса соответствуют данным литературы по накоплению пигментов пресноводным штаммом *Scenedesmus (Halochlorella) rubescens* KNUA042 [29]. Наибольшее относительное количество каротиноидов в условиях стресса в данной работе превышало таковые значения для штамма SBB-20 (1.50 ± 0.01 против 1.00 ± 0.00 для штаммов KNUA042 и SBB-20, соответственно). Однако абсолютные значения концентрации каротиноидов в экстрактах, полученных из биомассы клеток штамма *H. rubescens* NAMSU SBB-20, культивируемых в неблагоприятных условиях, были выше, чем содержание тех же пигментов в экстрактах клеток штамма KNUA042 после индукции каротиногенеза (15.95 ± 0.56 мг/л против 6.94 ± 0.06 мг/л для штаммов SBB-20 и KNUA042, соответственно).

Ультраструктурные изменения в клетках микроводоросли *H. rubescens* при культивировании на свету высокой интенсивности, типичны для клеток зеленых каротиногенных микроводорослей [31]. В условиях стресса происходит разборка фотосинтетического аппарата клетки, необходимая для защиты от избыточного света, и накопление образований при этом триацилглицеринов в олеосомах цитоплазмы [32, 33], занимающих практически весь объем клетки [31]. Описанные изменения ультраструктурной организации характерны и для кле-

ток *H. rubescens* NAMSU SBB-20. Известно, что в цитоплазматических глобулах у каротиногенных микроводорослей может происходить накопление астаксантина [34], при этом β -каротин преимущественно накапливается в пластоглобулах [33]. Формирование в клетках *H. rubescens* NAMSU SBB-20, культивируемых в условиях стресса, липидных включений обоих типов (рис. 3в, г), а также характерные пики двух данных каротиноидов на спектрах экстрактов пигментов клеток (рис. 3б), позволяют предположить накопление данной микроводорослью смеси каротиноидов, среди которых присутствуют астаксантин и β -каротин, что встречается у штаммов родственных видов [31, 35], а также других штаммов *H. rubescens* [29].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе охарактеризован новый перспективный для биотехнологии штамм микроводоросли *H. rubescens* NAMSU SBB-20, описаны ультраструктурные изменения под действием стресса, вызванного светом высокой интенсивности, а также изменение пигментного состава (увеличение содержания каротиноидов). В связи с тем, что данный штамм был выделен из морской среды обитания, он, по-видимому, обладает устойчивостью к повышенной солености и может быть использован для культивирования на морской воде, что требует дальнейших исследований.

Авторы выражают благодарность профессору кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, д.б.н. А.Е. Соловченко за помощь в интерпретации некоторых результатов. Электронно-микроскопические исследования были проведены с использованием оборудования Центра коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации (№ МК-1952.2021.1.4), а также Научно-образовательной школы МГУ “Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология”.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Borowitzka M.A.* Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters // *J. Biotechnol.* 1999. V. 70. № 1-3. P. 313. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00083-8)
2. *Guerin M., Huntley M., Olaizola M.* Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition // *Trends Biotechnol.* 2003. V. 21. № 5. P. 210. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00078-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00078-7)
3. *Solovchenko A., Chekanov K.* Production of carotenoids using microalgae cultivated in photobioreactors // Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology / Eds. Paek K.Y., Murthy H., Zhong J. Dordrecht: Springer. 2014. P. 63. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9223-3_4
4. *Chekanov K., Fedorenko T., Kublanovskaya A., Litvinov D., Lobakova E.* Diversity of carotenogenic microalgae in the White Sea polar region // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2020. V. 96. P. 183. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiz183/5632105>
5. *Stanier R., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G.* Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales) // *Bacteriol. Rev.* 1971. V. 35. P. 171. <https://doi.org/10.1128/br.35.2.171-205.1971>
6. *Темралева А.Д., Минчева Е.В., Букин Ю.С., Андреева А.М.* Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (Chlorophyta). Кострома: Костромской печатный дом, 2014. 215 с.
7. *Wang Y., Tian R.M., Gao Z.M., Bougouffa S., Qian P.Y.* Optimal eukaryotic 18S and universal 16S/18S ribosomal RNA primers and their application in a study of symbiosis // *PloS one.* 2014. V. 9. № 3. e90053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090053>
8. *Ismagulova T., Chekanov K., Gorelova O., Baulina O., Semenova L., Selyakh, I., Chivkunova O., Lobakova E., Karpova O., Solovchenko A.* A new subarctic strain of *Tetradismus obliquus* – part I: identification and fatty acid profiling // *J. Appl. Phycol.* 2018. V. 30. № 5. P. 2737. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1313-1>
9. *Maltsev Y., Gusev E., Maltseva I., Kulikovskiy M., Namsaraev Z., Petrushkina M., Filimonova A., Sorokin B., Golubeva A., Butaeva G., Khrushchev A., Zotko N., Kuzmin D.* Description of a new species of soil algae, *Parietochloris grandis* sp. nov., and study of its fatty acid profiles under different culturing conditions // *Algal Res.* 2018. V. 33. P. 358. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.008>
10. *Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. № 17. P. 3389. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
11. *Edgar G.J., Stuart-Smith R.D., Willis T.J., Kininmonth S., Baker S.C., Banks S., Thomson R.J.* Global conservation outcomes depend on marine protected areas with five key features // *Nature.* 2014. V. 506. № 7487. P. 216.
12. *Kumar S., Stecher G., Tamura K.* MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. № 7. P. 1870. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
13. *Aldrich J.* RA Fisher and the making of maximum likelihood 1912-1922 // *Stat Sci.* 1997. V. 12. № 3. P. 162. <https://doi.org/10.1214/ss/1030037906>
14. *Kimura M.* A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // *J. Mol. Evol.* 1980. V. 16. № 2. P. 111. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>

15. *Nei M., Kumar S.* Molecular evolution and phylogenetics. Oxford: Oxford University Press, 2000. 348 p.
16. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Evolution*. 1985. V. 39. № 4. P. 783.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>
17. *Gorelova O., Baulina O., Solovchenko A., Selyakh I., Chivkunova O., Semenova L., Scherbakov P., Burakova O., Lobakova E.* Coordinated rearrangements of assimilatory and storage cell compartments in a nitrogen-starving symbiotic chlorophyte cultivated under high light // *Arch. Microbiol.* 2015. V. 197. P. 181.
<https://doi.org/10.1007/s00203-014-1036-5>
18. *Reynolds E.* The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // *J. Cell Biol.* 1963. V. 17. № 1. P. 208.
<https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
19. *Anderson T.F.* Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope // *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 1951. V. 13. № 4. P. 130.
<https://doi.org/10.1111/j.2164-0947.1951.tb01007.x>
20. *Rippka R., Deruelles J., Waterbury J.B., Herdman M., Stanier R.Y.* Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria // *Microbiology*. 1979. V. 111. № 1. P. 1.
<https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>
21. *Solovchenko A., Merzlyak M.N., 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. № 4. P. 763.
<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00849.x>
22. *Guiry M.D., Guiry G.M.* AlgaeBase. World-wide electronic publication. National University of Ireland, Galway; <https://www.algaebase.org>; searched on 26 November 2022
23. *Kessler E., Schäfer M., Hümmer C., Kloboucek A., Huss V.A.R.* Physiological, biochemical, and molecular characters for taxonomy of the subgenera of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta) // *Bot. Acta*. 1997. V. 110. P. 244.
<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1997.tb00636.x>
24. *Kessler E., Czygan F.C., Fott B., Nováková M.* Über *Halochlorella rubescens* Dangeard // *Protistenk.* 1968. V. 110 P. 462.
25. *Kalina T., Puncochárová M.* Taxonomy of the subfamily Scotielloccystoideae Fott 1976 (Chlorellaceae, Chlorophyceae) // *Archiv für Hydrobiologie. Supplementband. Monographische Beiträge*. 1987. V. 73. № 4. P. 473.
26. *Huss V.A., Frank C., Hartmann E.C., Hirmer M., Kloboucek A., Seidel B.M., Wenzeler P., Kessler E.* Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta) // *J. Phycol.* 1999. V. 35. № 3. P. 587.
<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3530587.x>
27. *Чесунов А.В., Калякина Н.М., Бубнова Е.Н.* Каталог биоты Беломорской биологической станции МГУ. Москва: Товарищество научных изданий КМК. 2008. 384 с.
28. *Shi J., Podola B., Melkonian M.* Application of a prototype-scale Twin-Layer photobioreactor for effective N and P removal from different process stages of municipal wastewater by immobilized microalgae // *Biores. Technol.* 2014. V. 154. P. 260.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.100>
29. *Jo S.W., Hong J.W., Do J.M., Na H., Kim J.J., Park S.I., Kim Y.S., Kim I.S., Yoon H.S.* Nitrogen deficiency-dependent abiotic stress enhances carotenoid production in indigenous green microalga *Scenedesmus rubescens* KNUA042, for use as a potential resource of high value products // *Sustainability*. 2020. V. 12. № 13. P. 5445.
<https://doi.org/10.3390/su12135445>
30. *Tsavatopoulou V.D., Aravantinou A.F., Vakros J., Manariotis I.D.* Conversion of *Scenedesmus rubescens* lipid into biodiesel by biochar of different origin // *Catalysts*. 2021. V. 11. № 9. P. 1116.
<https://doi.org/10.3390/catal11091116>
31. *Zaytseva A., Chekanov K., Zaytsev P., Bakhareva D., Gorelova O., Kochkin D., Lobakova E.* Sunscreen effect exerted by secondary carotenoids and mycosporine-like amino acids in the aeroterrestrial chlorophyte *Coelastrella rubescens* under high light and UV-A irradiation // *Plants*. 2021. V. 10. № 12. P. 2601.
<https://doi.org/10.3390/plants10122601>
32. *Solovchenko A.E.* Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses // *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. V. 59. № 2. P. 167.
<https://doi.org/10.1134/S1021443712020161>
33. *Davidi L., Shimoni E., Khozin-Goldberg I., Zamir A., Pick U.* Origin of β -carotene-rich plastoglobuli in *Dunaliella bardawil* // *Plant Physiol.* 2014. V. 164. № 4. P. 2139.
<https://doi.org/10.1104/pp.113.235119>
34. *Ota S., Morita A., Ohnuki S., Hirata A., Sekida S., Okuda K., Ohya Y., Kawano S.* Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis* // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 1.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-23854-w>
35. *Chekanov K., Litvinov D., Fedorenko T., Chivkunova O., Lobakova E.* Combined production of astaxanthin and β -carotene in a new strain of the microalga *Bracteacoccus aggregatus* BM5/15 (IPPAS C-2045) cultivated in photobioreactor // *Biology*. 2021. V. 10. № 7. P. 643.
<https://doi.org/10.3390/biology10070643>