

## НАУЧНЫЕ СООБЩЕНИЯ

УДК [582.263.1:57.083.1]:582.29

### **НОВЫЙ ШТАММ ЗЕЛЁНОЙ КАРОТИНОГЕННОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *COELASTRELLA RUBESCENS*, ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ ЮГА РОССИИ**

© 2025 г. Н. В. Данцик<sup>1</sup>, О. В. Кривенко<sup>1</sup>,  
И. М. Мансурова<sup>1</sup>, И. В. Дегтяр<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,  
Севастополь, Российская Федерация

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет», Севастополь, Российская Федерация  
E-mail: [krivenko@ibss-ras.ru](mailto:krivenko@ibss-ras.ru)

Поступила в редакцию 10.12.2024; после доработки 24.01.2025;  
принята к публикации 12.08.2025.

Впервые из таллома эпилитного крымского лишайника выделена альгологически чистая культура зелёной каротиногенной микроводоросли рода *Coelastrella* Chodat (Scenedesmaceae, Sphaeropleales), которая характеризуется выраженной способностью к накоплению вторичных каротиноидов в условиях острого абиотического стресса. Детально описаны методы выделения фикобиона из малых навесок образца лишайника, получения альгологически чистой и аксеничной культур, адаптации клеток к условиям лабораторного культивирования и длительного хранения в коллекционном фонде. Выполнена таксономическая идентификация фикобиона с использованием морфологических подходов (световой и сканирующей электронной микроскопии) и молекулярно-генетических методов (анализа фрагмента последовательности региона ITS1 — 5.8S — ITS2 гена 18S rRNA). Полученный штамм внесён в каталог коллекций живых культур каротиногенных микроводорослей ФИЦ ИнБЮМ (<https://algae.ibss-ras.ru>) как IBSS-156 *Coelastrella rubescens* (Vinatzer) Kaufnerová & Eliás, 2013. Проведена оценка ростовых характеристик штамма IBSS-156 в условиях двухстадийной накопительной культуры. Получены данные, свидетельствующие о высоких, до  $(0,62 \pm 0,11)$  сут<sup>-1</sup>, удельных скоростях роста культуры на вегетативной стадии. Динамика пигментного состава водорослей при действии комплексного стресса свидетельствует о накоплении вторичных каротиноидов. Показано, что регистрация спектров поглощения живых культур микроводорослей в видимой области может быть эффективным способом экспресс-оценки их состояния и скорости накопления кетокаротиноидов в биомассе в процессе двухстадийного культивирования. Результаты работы указывают на возможность выделения из крымских лишайников перспективных продуцентов астаксантинина, которые могут быть предложены для массового культивирования в зонах с засушливым и жарким климатом, в том числе в Крыму и прилегающих районах юга России.

**Ключевые слова:** каротиногенные микроводоросли, фикобионты, *Coelastrella*, двухстадийное культивирование

Термин «каротиногенные микроводоросли» подразумевает под собой разнородную по таксономическому составу и экологии группу одноклеточных водорослей с выраженной способностью к вторичному каротиногенезу. Это ключевой механизм адаптации экстремобионтных видов

к резкому ухудшению условий внешней среды, который проявляется в массивном накоплении кетокаротиноидов в липидных включениях цитоплазмы (олеосомах) [Cheng, Shah, 2023; Debnath et al., 2024; Patel et al., 2022; Solovchenko, Minyuk, 2021].

Характерными чертами биологии каротиногенных микроводорослей являются эфемерность вегетации, наличие в жизненном цикле стадии покоя, сопряжённость процессов перехода в стадию покоя с индукцией вторичного каротиногенеза и накоплением нейтральных липидов, а также способность к быстрому переходу из состояния покоя к активной вегетации и наоборот.

Неуклонно растущий интерес к исследованию этой группы микроводорослей определяется важными научными и прикладными аспектами — развитием представлений об общих закономерностях и особенностях адаптационных механизмов у продуцентов кетокаротиноидов различной таксономической и экологической специализации, а также выявлением новых коммерчески перспективных источников C<sub>40</sub>-кетокаротиноидов группы астаксантина и нейтральных липидов, пригодных для производства высококачественного биодизеля [Islam et al., 2013; Karpagam et al., 2015; Patel et al., 2022].

Наиболее изученным и пока единственным продуцентом астаксантина, успешно внедрённым в массовую культуру, является пресноводная микроводорось *Haematococcus lacustris* (Girod-Chantrans) Rostafinski, 1875 (Chlorophyceae, Chlamydomonadales, Haematococcaceae). Содержание астаксантина в её биомассе при двухстадийном регламенте культивирования может достигать 5 % сухого вещества [Han et al., 2013; Mota et al., 2022]. Однако низкая экологическая валентность этого вида ограничивает районы его массового культивирования зонами морского субтропического климата с температурой не выше +28 °C в самое жаркое время дня [Mohanasundaram et al., 2023]. На территории РФ это локальные зоны крымского и кавказского побережья, имеющие важное реакционное значение, поэтому в настоящее время заинтересованные в астаксантине российские предприятия полностью зависят от импорта. Решение проблемы предполагает поиск и введение в культуру новых высокопродуктивных, легко адаптирующихся к местным природным условиям штаммов продуцентов астаксантина, устойчивых к контаминации и характеризующихся толерантностью к действию экстремальных факторов внешней среды [Patel et al., 2022; Solovchenko, Minyuk, 2021]. В литературе имеются сведения о более чем 130 таких видах [Минюк, 2020]. Многие из них распространены в альгофлоре не только субтропической, но и степной и предгорной зон Крыма. В основном это представители двух порядков зелёных микроводорослей — Chlamydomonadales и Sphaeropleales [Данцик и др., 2021]. Между тем ростовые характеристики в культуре, а также особенности механизмов регуляции биосинтеза астаксантина у большинства из них мало изучены, хотя, по данным ряда исследований, выполненных в ФИЦ ИнБЮМ, среди них могут оказаться неприхотливые в производстве и высокопродуктивные источники астаксантина [Данцик и др., 2021; Chelebieva et al., 2018]. Всё вышеперечисленное определяет актуальность всестороннего изучения разнообразия каротиногенной альгофлоры Крыма, оценки её биоресурсного потенциала и поиска новых штаммов, перспективных для массового культивирования в различных природно-климатических зонах Крыма и прилегающих районов юга России.

Особую и малоизученную группу каротиногенных микроводорослей составляют фикобионты накипных и листоватых эпилитных лишайников Крыма, адаптированных к обитанию в условиях экстремально высоких для растительных организмов дневных температур, крайне низкой влажности и высокого уровня солнечной радиации. Такие лишайники образуют на скалах и валунах плотные, трудно отделяемые налёты, окрашенные в яркие оранжево-красные оттенки [Войцехович, 2013; Czeczuga, Osorio, 1989; Voytsekhovich, Beck, 2016]. Фикобионты, приспособленные к выживанию в экстремальных условиях, могут представлять практический интерес как объекты массового культивирования открытым способом в районах Крыма, непригодных для традиционного земледелия.

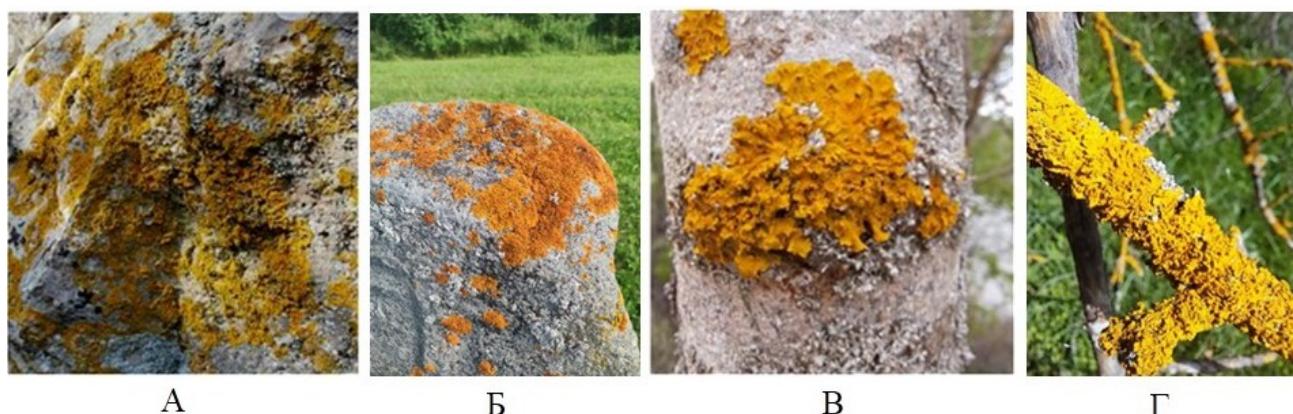
Цель настоящей работы заключалась в выделении из крымских лишайников микроводорослей — перспективных продуцентов астаксантина, адаптированных к местным условиям. Для этого последовательно были решены следующие задачи:

- 1) выделение и получение альгологически чистых культур микроводорослей — фикобионтов крымских лишайников;
- 2) выявление штамма, перспективного с точки зрения способности к накоплению кетокаротиноидов, и его идентификация с использованием интегративного таксономического подхода;
- 3) оценка биотехнологического потенциала штамма на основе определения продукции показателей водоросли на стадии вегетативного роста и динамики содержания пигментов в культуре в условиях комбинированного стресса.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Образцы накипных лишайников в виде корочек ярко-оранжевого цвета, плотно приросших к субстрату (камням, деревьям), и трудно отделяемых наростов на поверхности известняковых валунов собирали в предгорной части Западного Крыма (район Севастополя) в весенне-летний период (рис. 1). Места сбора:

- А — парк Победы (город Севастополь,  $44^{\circ}36'10''\text{N}$ ,  $33^{\circ}27'23''\text{E}$ , изолирован И. В. Дробецкой в марте 2024 г.);
- Б — гора Челеби-Яури-Бели (перевал Байдарские ворота, посёлок Орлиное, Севастополь,  $44^{\circ}24'18''\text{N}$ ,  $33^{\circ}46'49''\text{E}$ , изолирован Н. В. Данциук в апреле 2024 г.);
- В — Свято-Георгиевский монастырь (мыс Фиолент, Севастополь,  $44^{\circ}30'29''\text{N}$ ,  $33^{\circ}30'29''\text{E}$ , изолирован Н. В. Данциук в апреле 2024 г.);
- Г — лесопарк Торопова Дача (Балаклавский муниципальный округ, Севастополь,  $44^{\circ}30'34''\text{N}$ ,  $33^{\circ}41'2''\text{E}$ , изолирован И. М. Мансуровой в мае 2024 г.).



**Рис. 1.** Накипные эпилитные (А, Б) и листоватые эпифитные (В, Г) лишайники

**Fig. 1.** Crustose epilithic (A, B) and foliose epiphytic (B, Г) lichens

Материал отделяли от субстрата при помощи острого шпателя и помещали в маркированные полиэтиленовые пакеты, снабжённые этикетками с указанием номера образца, даты его сбора, GPS-координат места сбора, а также фамилии сотрудника, изолировавшего образец. В лаборатории образцы высушивали при комнатной температуре в течение суток на открытом воздухе и хранили до исследования в бумажных маркированных конвертах при  $+20^{\circ}\text{C}$  в тёмном и сухом месте.

**Выделение чистых культур фикобионтов.** Для выделения клеток микроводорослей в чистую культуру использовали модификацию метода плотностно-градиентного центрифугирования, предложенного [Fontaniella et al., 2000]. Метод основан на поэтапном центрифугировании макерированных образцов лишайников в градиенте плотности растворов: 0,25 М сахарозы — 80%-ный раствор йодида калия — 10 мМ фосфатный буфер. Суть применённой нами модификации заключалась в оптимизации количественных соотношений между массой полевых образцов и объёмами рабочих растворов при использовании образцов лишайников массой 0,1–0,3 г.

Образец сухого таллома лишайника промывали в дистиллированной воде для удаления загрязнений и растирали в ступке с 5 мл дистиллированной  $\text{H}_2\text{O}$ . Гомогенат фильтровали через шесть слоёв марли в полипропиленовую пробирку типа Falcon и центрифугировали при 200 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок ресуспендировали в 4 мл 0,25 М сахарозы. В центрифужную пробирку вносили 3 мл 80%-ного раствора KI, осторожно сверху по стенке насыщали 2,0 мл полученной клеточной суспензии в сахарозе и центрифугировали при 50 g в течение 1 мин. В результате процедуры крупные фрагменты талломов лишайников выпадали в осадок, концентрируясь в нижнем слое KI, а клетки микроводорослей оставались в верхнем слое сахарозы. Этот слой переносили микропипеткой в новую пробирку, содержащую 3 мл 80%-ного раствора KI. Затем вносили туда же 2 мл 10 мМ фосфатного буфера и центрифугировали пробы при 130 g в течение 2 мин. Клетки микроводорослей образовывали промежуточный слой (интерфазу) между фосфатным буфером и раствором KI, а фрагменты гиф гриба переходили в слой раствора KI в виде плотного осадка. Интерфазу, содержащую водорослевые клетки, извлекали микропипеткой и помещали в 3 мл 80%-ного раствора KI. Сверху по стенке приливали 3 мл фосфатного буфера и центрифугировали при 200 g в течение 3 мин. При необходимости последний шаг повторяли. К суспензии клеток микроводорослей, извлечённой из интерфазного слоя, приливали 1 мл дистиллированной  $\text{H}_2\text{O}$ ; снова центрифугировали при 290 g в течение 5 мин. Полученный осадок клеток ресуспендировали в 0,5–1,0 мл питательной среды BBM (Bold's Basal Medium) [Bischoff, Bold, 1963], разбавленной в два раза. Полученный «первичный инокулят» переносили в стеклянную пробирку с ватно-марлевой пробкой и хранили при комнатной температуре и при освещении с плотностью потока фотосинтетически активной радиации (далее — ФАР) не выше 35 мкмоль· $\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  до антисептической обработки.

**Антисептическая обработка.** Для борьбы с микробной контаминацией использовали антибиотики цефотаксим (ОАО «Биохимик») и ампициллин (РУП «Белмедпрепараты») с широким спектром antimикробного действия. В состав смеси антибиотиков входили 500 мкг·мл<sup>-1</sup> ампициллина и 100 мкг·мл<sup>-1</sup> цефотаксима [Kan, Pan, 2010]. В качестве фунгицида применяли препарат «Фундазол» (ООО «Фирма “Зелёная Аптека Садовода”»), который при проникновении в ткани растения блокирует репродуктивную функцию грибков. Для подавления микромицетов использовали его раствор (концентрация 40 мкг·мл<sup>-1</sup>) [Мокросноп, Золотарёва, 2012].

**Получение альгологически чистых культур.** После антисептической обработки водоросли адаптировали к лабораторным условиям, поддерживая культуру клеток на жидкой минеральной среде BBM при оптимальной для фикобионтов лишайников температуре +18...+20 °C и при значениях ФАР не выше 35 мкмоль фотонов· $\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  [Войцехович, 2013]. Для получения альгологически чистых культур использовали стандартный метод истощающего штриха [Гайсина и др., 2008; Темралеева и др., 2014]. Посев микроводорослей проводили на агаризованную (1,5–2 %) питательную среду BBM в чашках Петри. Чашки с водорослями инкубировали в холодильной витрине при температуре +14...+16 °C и плотности потока ФАР 20–26 мкмоль фотонов· $\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$  в режиме 15 ч свет : 9 ч темнота. Проросшие колонии инокулировали с помощью бактериальной петли в отдельные пробирки с небольшим количеством (около 0,3 мл) жидкой минеральной среды BBM для получения активно вегетирующей культуры

клеток. В течение недели водоросли просматривали под микроскопом для оценки степени альгологической чистоты культуры. В случае необходимости процедуру повторяли до получения моноклональной культуры клеток фикобионта. После получения альгологически чистой культуры производили посев на агаровые косяки для длительного хранения в коллекции живых культур каротиногенных микроводорослей ФИЦ ИнБЮМ.

**Условия культивирования клеток фикобионта в двухстадийном режиме.** Клетки фикобионта выращивали в режиме двухстадийной накопительной культуры [Минюк и др., 2016]. Необходимый предварительный этап культивирования — получение синхронизированной культуры клеток в активно вегетирующем состоянии. Для этого к началу эксперимента получали инокулят клеток водоросли, который выращивали на среде ВВМ в течение 7 сут при одностороннем боковом освещении светодиодными лампами JazzWay DL 8W 6500K (Китай) и при непрерывном барботаже воздухом. Плотность потока ФАР на наружной поверхности колб составляла 120 мкмоль фотонов·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup>; фотопериод — 15 ч свет : 9 ч темнота (приближенный к природному и рекомендованный для выращивания каротиногенных микроводорослей). Температуру поддерживали на уровне ( $+23 \pm 1$ ) °С.

На I («зелёной») стадии продолжительностью 11 сут водоросль выращивали в стеклянных конических колбах объёмом 0,5 л. Условия культивирования не отличались от таковых на предварительном этапе. Культуры непрерывно продували воздухом со скоростью 1 л·мин<sup>-1</sup> с помощью аквариумного компрессора Hailea ACO-9620 (Китай). На протяжении светового периода рН среды поддерживали в пределах 7 путём дозированной подачи углекислого газа (объёмная доля СО<sub>2</sub> — 99,8 % по [ГОСТ 8050-85, 2006]) при помощи электромагнитного клапана Samozzi A7E (Италия) и цифрового pH-контроллера Aqua Medic pH 2001 C (Германия). Начальная численность клеток и объём культуры в колбах составляли 1,5·10<sup>6</sup> кл·мл<sup>-1</sup> и 0,45 л соответственно.

Для перевода на следующую, «красную» стадию культуру центрифугированием при 290 g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, а осадок клеток ресусспендировали в 10-кратно редуцированной по азоту и фосфору среде ВВМ. Начальная численность клеток на «красной» стадии составила около 1,5·10<sup>6</sup> кл·мл<sup>-1</sup> при объёме культуры в колбах 0,45 л. Режим освещения изменили на круглосуточный двухсторонний (по 140 мкмоль фотонов·м<sup>-2</sup>·с<sup>-1</sup> с каждой стороны), что в совокупности с 10-кратным уменьшением плотности культуры обеспечивало 20-кратный положительный градиент облучённости клеток [Minyuk et al., 2017]. Подача СО<sub>2</sub> была отрегулирована на уровне, поддерживающем рН среды близко к 7 в круглосуточном режиме.

**Регистрация роста культуры и размеров клеток.** Численность клеток ( $n$ ) анализировали при помощи проточного цитофлуориметра MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, Германия), оборудованного тремя лазерами (405, 488 и 635 нм) в ЦКП «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ. Для обработки данных использовали программное обеспечение FCS Express 7 Research Edition.

Среднюю удельную скорость роста культур ( $\mu$ ) на «зелёной» стадии рассчитывали по среднесуточному приросту  $n$  [Wood et al., 2005]:

$$\mu_n = \frac{\ln \frac{n_i}{n_0}}{(t_i - t_0)},$$

где  $\mu_n$  — удельная скорость роста по  $\Delta n$ , сут<sup>-1</sup>;

$n_0$  — начальная численность клеток, кл·мл<sup>-1</sup>;

$n_i$  — численность клеток на  $i$ -е сутки, кл·мл<sup>-1</sup>;

$t_i - t_0$  — продолжительность периода культивирования, сут.

**Световая и сканирующая электронная микроскопия.** В работе использовали инвертированный световой микроскоп Nikon Eclipse Ts2R. Линейные размеры клеток определяли по микрофотографиям, полученным с помощью камеры Infinity 3 Lumenera, в программе ImageJ (NIH, США).

Для получения изображений поверхности клеток с помощью сканирующей электронной микроскопии (далее — СЭМ) 2,5 мл культуры вегетативных клеток микроводорослей отбирали в экспоненциальной фазе роста (4-е сутки эксперимента) и фиксировали 25%-ным раствором глутарового альдегида, добавляя его в пробу до конечной концентрации 0,5 %. При фиксации необходима нейтральная, слабощелочная среда [Чубчикова и др., 2022], и для её обеспечения непосредственно перед фиксацией pH в среде доводили до 7,3, регулируя подачу CO<sub>2</sub>. Зафиксированные образцы сразу перемешивали с помощью микровортекса (Microspin FV-2400, Biosan, Латвия), помещали в холодильник при +3 °C и перемешивали каждые 10–15 мин на протяжении 1 ч. При необходимости зафиксированные по этому протоколу пробы могут сохраняться в охлаждённом виде две недели [Рылькова и др., 2024]. На следующем этапе суспензию микроводорослей осаждали на поликарбонатные трековые мембранны с диаметром пор 2 мкм (производство Объединённого института ядерных исследований, Россия), помещённые на влажные подложки из фильтровальной бумаги [Рылькова и др., 2024]. Фильтрацию проводили при разрежении не более 0,2 атм. Суспензию на фильтрах отмывали от фиксатора, дважды обрабатывая их 1 мл Na-K-fosфатного буфера (без хлоридов), использование которого предпочтительно для зелёных сценедесмальных водорослей [Чубчикова и др., 2022]; потом их однократно промывали 1 мл деионизированной воды. Затем фильтры с водорослями вместе с подложками помещали в 16-луночный планшет, где осуществляли дегидратацию растворами этилового спирта восходящей концентрации: 20, 30 и 50 % — по 5 мин; 57 и 96 % — по 10 мин; 100 % — дважды по 10 мин. Смену раствора проводили при помощи дозатора. Сушку образцов в критической точке в Leica EM CPD300 (Германия) осуществляли в мягком режиме 2,5 ч. Напыление (Au/Pd, 0,5–1,0 мин) проводили с использованием системы Leica EM ACE200. Для получения СЭМ-изображений клеток использовали сканирующий электронный микроскоп Hitachi SU3500 (Япония) в лаборатории микроскопии ФИЦ ИнБЮМ.

**Молекулярно-генетический анализ.** Геномную ДНК выделяли из концентрированной культуры водорослей с использованием набора «ДНК-Экстран-3» («Синтол», Россия) по протоколу производителя. Качество ДНК оценивали электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием ( $0,2 \text{ мкг}\cdot\text{мл}^{-1}$ ). Амплификацию фрагмента ДНК, кодирующего регион 5.8S и смежные области ITS1 и ITS2 кластера ядерных рибосомальных генов, проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью готовой смеси ScreenMix («Евроген», Россия), используя праймеры ITS1 (TCCGTAGGTGAAACCTGC GG) и ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) [White et al., 1990], по следующему протоколу: предварительная денатурация при +94 °C — 3 мин; 34 цикла амплификации (+94 °C — 30 с; +60 °C — 30 с; +72 °C — 60 с); заключительная стадия при +72 °C — 10 мин. ПЦР-продукт очищали с помощью реагентов Cleanup Standard («Евроген») в соответствии с протоколом производителя и секвенировали с использованием реагентов набора GenSeq («Синтол») на генетическом анализаторе «Нанофор-5» (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия).

Поиск сходства полученной последовательности с имеющейся в базе данных GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) проводили по алгоритму BLASTN [Morgulis et al., 2008; Zhang et al., 2000]. Выравнивание выполняли в программном пакете MAFFT v. 7.48 [Katoh, Toh, 2010] с опцией L-INS-I; неоднозначно выравненные 5'- и 3'-концевые

области обрезали. Для анализа генетических дистанций между нуклеотидными последовательностями рассчитывали двухпараметрические расстояния Кимуры (K2P), применяя программный пакет MEGA 11 [Kimura, 1980; Tamura et al., 2021]. Филогенетический анализ и построение деревьев с использованием алгоритмов максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) проводили в программе IQ-TREE 1.6.12 [Trifinopoulos et al., 2016] с моделью нуклеотидных замен SYM + G4, автоматически выбранной пакетом ModelFinder по байесовскому критерию (Bayesian information criterion, BIC), применяя параметры теста SH-aLRT и сверхбыстрый бутстреп по 10 000 реплик, а также приближенный тест Байеса для оценки поддержки ветвей с параметрами остановки поиска после 1000 итераций и с силой возмущения, установленной на значении 0,1. Точность топологии дерева проверяли бутстреп-анализом с 1000 реплик. Для просмотра и редактирования деревьев использовали сервис <https://phylo.io/index.html>.

**Спектрофотометрия.** Регистрацию спектров поглощения суспензии клеток живых культур микроводорослей на «зелёной» и «красной» стадиях культивирования проводили на двухлучевом спектрофотометре Shimadzu UV-2600i (ЦКП «Спектрометрия и хроматография» ФИЦ ИнБЮМ) в диапазоне длин волн от 380 до 800 нм в 1-см кварцевой кювете. Непосредственно перед измерением каждую пробу тщательно перемешивали для минимизации эффекта оседания; время измерения одного образца — в пределах 30 с. В качестве кюветы сравнения использовали питательную среду ВВМ.

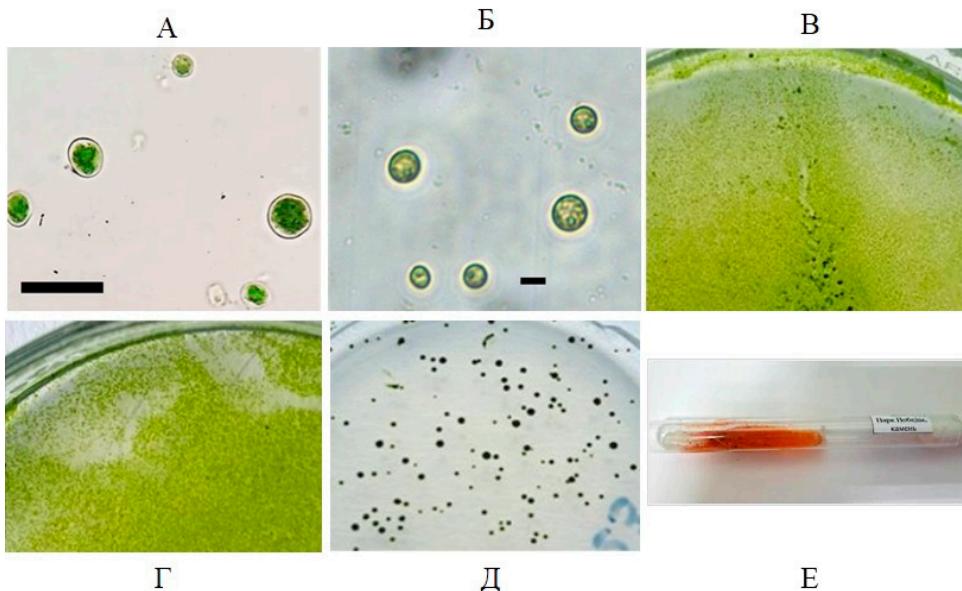
Графики строили с применением программного обеспечения Golden Software Grapher 17.3.454. Измерения проводили в трёх биологических и трёх аналитических повторностях. На рисунках и в тексте приведены средние значения показателей и стандартная ошибка среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из образцов эпилитных и эпифитных лишайников, собранных в предгорных районах Западного Крыма, с использованием адаптированного для малых навесок образца метода плотностно-градиентного центрифугирования были выделены клетки зелёных водорослей — фикобионтов лишайников. Микроскопический анализ показал отсутствие остатков таллома и посторонних примесей в полученных суспензиях клеток (рис. 2А). В течение недели адаптации к лабораторным условиям изолированные клетки приобретали признаки, характерные для свободноживущих популяций, — более однородные размеры, форму и внутреннее содержимое клеток (рис. 2Б).

В процессе получения альгологически чистых культур при выращивании на агаризованной питательной среде в чашках Петри прорастание первых колоний наблюдали через 2–4 недели. Аналогичное время прорастания фикобионтов на агаризованных средах отмечали и другие авторы [Bačkor et al., 1998; Gasulla et al., 2010]. Колонии были различной формы и консистенции: насыпные, гладкие или зернистые; они имели разные оттенки зелёного цвета (рис. 2В–Д). Такие характерные признаки колоний клеток, очевидно, могут быть использованы и в качестве вторичных таксономических критерииев.

Путём многократного пересева методом субкультуры были получены альгологически чистые культуры, пригодные для длительного хранения. Через месяц инкубации в холодильной витрине на агаровых косяках визуально отмечено изменение цвета стареющей культуры с зелёного на красно-оранжевый (рис. 2Е) у штамма, выделенного из таллома накипного эпилитного лишайника, который был собран в парке Победы (город Севастополь) (рис. 1А). Изменение окраски культуры клеток свидетельствует о накоплении в микроводоросли вторичных каротиноидов, что характерно для экстремобионтных видов в условиях абиотического стресса.

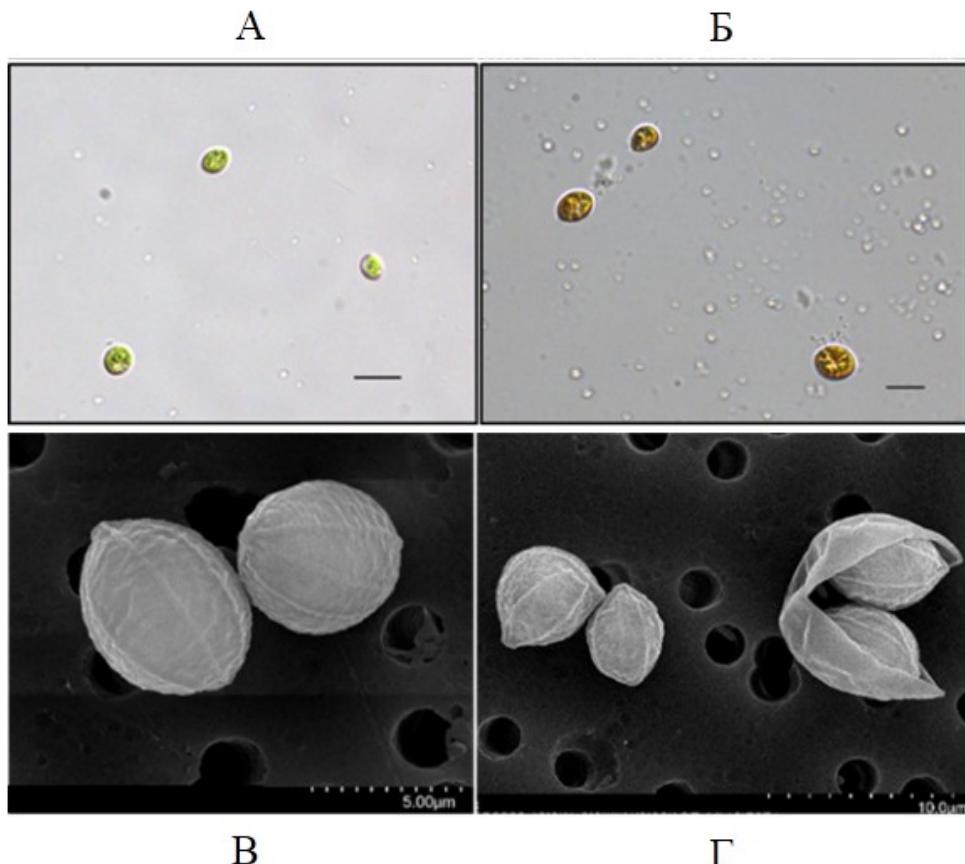


**Рис. 2.** Этапы получения альгологически чистых культур фикобионтов: клетки под световым микроскопом сразу после выделения (А) и через неделю содержания в лабораторной культуре (Б); агаризованные культуры водорослей-фикобионтов, выделенные из эпилитного (В, Г) и эпифитного (Д) лишайников; стареющая культура штамма IBSS-156 на агаровом косяке (Е). Размерная шкала — 10 мкм

**Fig. 2.** The stages of isolating phycobionts into a pure culture: cells under a light microscope immediately after the isolation (A) and after one week of culturing (B); solid media cultures of phycobionts isolated from epilithic (B, Г) and epiphytic (Д) lichens; aging culture of the IBSS-156 strain on agar (E). Scale bars are 10  $\mu$ m

**Таксономическая идентификация штамма на основе морфологических и молекулярных методов.** Для изучения особенностей морфологии клеток и жизненного цикла выделенного штамма использовали световую микроскопию и СЭМ. Под световым микроскопом в активно растущей культуре наблюдали одиночные вегетативные клетки овальной или лимоновидной формы (рис. 3А). Средняя длина клеток — 5–7 мкм, ширина — 3,5–6 мкм. Хлоропласт пристеночный с одним пиреноидом в клетке. Отмечено бесполое размножение водоросли путём образования автоспор. Автоспоры заключены в спорангий шаровидной формы (чаще всего по 2 или 4), они высвобождаются после разрыва его клеточной стенки (рис. 3Г). Половое размножение с образованием гамет не наблюдали. Зрелые клетки на стадии вторичного каротиногенеза приобретали оранжевый цвет; форма клеток сохранялась овальной; средняя длина составляла 8 мкм, ширина — 6,5 мкм (рис. 3Б).

На СЭМ-изображениях вегетативных клеток при общем увеличении системы  $\times 7000$  (рис. 3В) чётко видны 8 меридиональных рёбер, сходящихся у полюсов клетки с образованием утолщения. Такая архитектоника клеточной стенки в сочетании с характерными линейными размерами и другими морфологическими признаками клеток позволяет однозначно отнести выделенный штамм к роду *Coelastrella* Chodat (Scenedesmaceae, Sphaeropleales) [Krivina et al., 2024; Wang et al., 2019]. Водоросли этого рода распространены повсеместно, многие виды являются космополитами и живут в широком диапазоне температур. Как правило, представители *Coelastrella* являются эдафофильтральными видами, встречаются в различных типах почв и водоёмов — от болот до горячих источников. Многие виды относятся к аэрофитам; они поселяются на различных твёрдых субстратах естественного и искусственного происхождения, а также входят в состав биоплёнок [Kawasaki et al., 2020; Mikhailyuk et al., 2019; Wang et al., 2019]. При этом упоминание о *Coelastrella* sp. как фикобионте лишайников ограничивается одной работой [Loureiro et al., 2024], в которой приведены морфологические и молекулярно-генетические признаки трёх штаммов *Coelastrella* sp., выделенных из лишайников на севере Португалии.



**Рис. 3.** Клетки штамма IBSS-156 под световым (А, Б) и электронным (В, Г) микроскопом. Размерная шкала — 10 мкм (А, Б, Г) и 5 мкм (В)

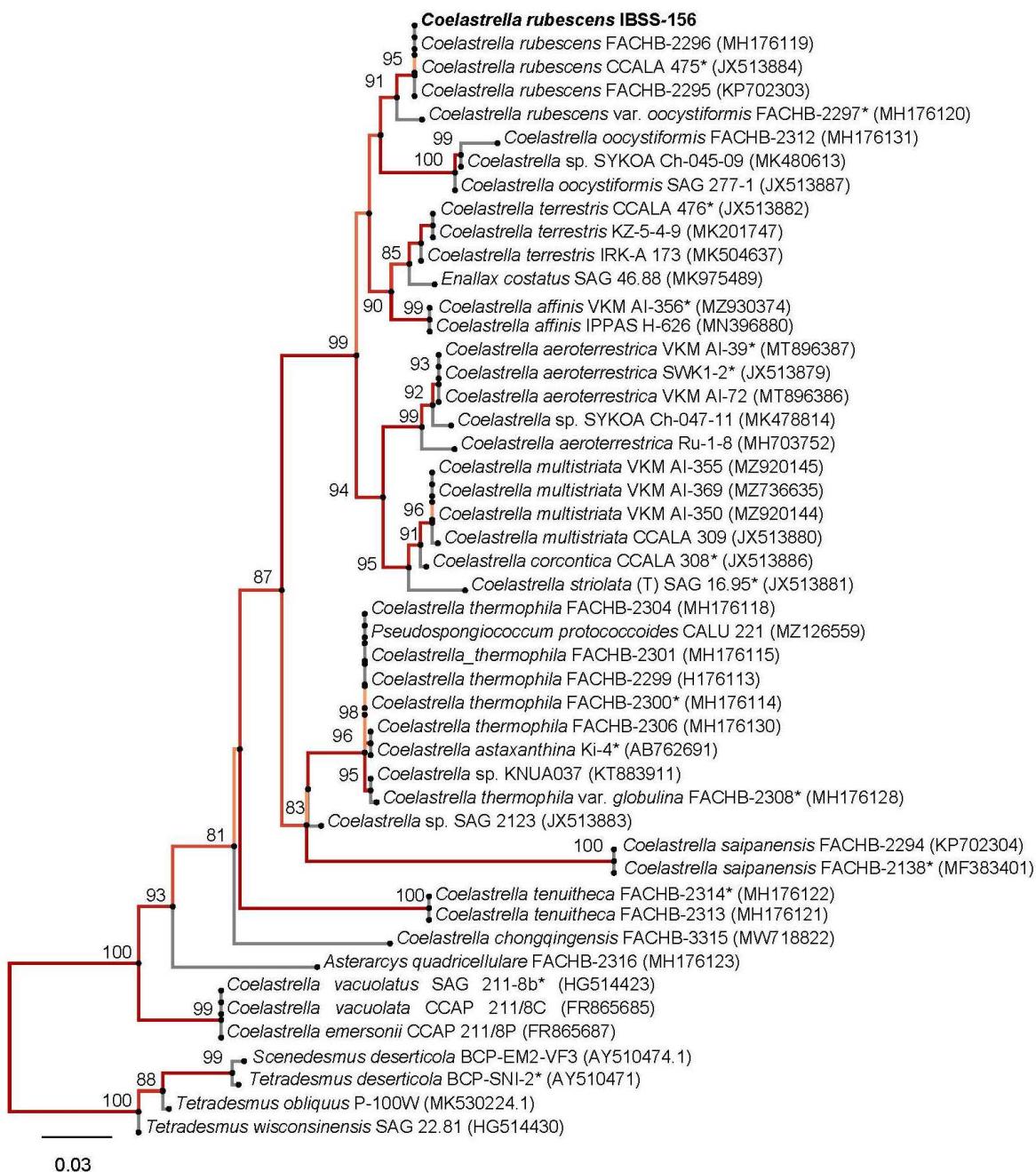
**Fig. 3.** Cells of the IBSS-156 strain under a light (A, B) and electron (B, Г) microscope. Scale bars are 10  $\mu\text{m}$  (A, B, Г) and 5  $\mu\text{m}$  (B)

Известно, что анализ даже ультраструктурных особенностей клеток не позволяет однозначно идентифицировать отдельные виды *Coelastrella* [Krivina et al., 2024], поэтому проведение параллельных молекулярно-генетических исследований является общим стандартом при изучении представителей этого рода, а также близких по фенотипу других зелёных микроводорослей [Kawasaki et al., 2020; Mikhailyuk et al., 2019; Wang et al., 2019]. Вопрос о наиболее подходящих для изучения рода *Coelastrella* участках генома до настоящего времени не решён, но всё больше исследователей используют при описании новых штаммов фрагмент ITS1 — 5.8S — ITS2 кластера ядерных рибосомальных генов 18S RNA [Kawasaki et al., 2020; Krivina et al., 2024; Maltsev et al., 2021]. Из этой области ДНК для выделенного из крымского эпилитного лишайника штамма IBSS-156 зелёной водоросли мы получили нуклеотидную последовательность длиной 411 п. н. (пар нуклеотидов) [номер регистрации в базе GenBank (NCBI) — PV022508].

Филогенетическое дерево (рис. 4), построенное на основе фрагмента рибосомального кластера генов, который включает регион ITS1 (частично) — 5.8S — ITS2 (частично), однозначно указывает на принадлежность изучаемого штамма зелёной водоросли к роду *Coelastrella*.

С высоким уровнем поддержки штамм входит в кладу *Coelastrella rubescens* (Vinatzer) Kaufnerová & Eliás, 2013, которая образует самостоятельную ветку в пределах филогенетического дерева рода. Полученная нами последовательность полностью идентична соответствующему фрагменту аутентичного штамма *C. rubescens* CCALA 475. Вместе они входят в подгруппу, сестринскую штамму *C. rubescens* var. *oocystiformis* Qinghua Wang, Huiyin Song, Xudong Liu, Guoxiang Liu & Zhengyu Hu, 2019 FACHB-2297a, генетическая дистанция K2P с которым составляет 0,017;

это близко к значению минимального видового порога для участка ITS1 — 5.8S — ITS2, рассчитанного по аутентичным штаммам *Coelastrella corcontica* (Kalina & Puncochárová) Hegewald & N. Hanagata, 2002 CCALA 308 и *Coelastrella multistriata* (Trenkwalder) Kalina & Puncochárová, 1987 CCALA 309.



**Рис. 4.** Положение штамма IBSS-156 *Coelastrella* (Scenedesmaceae, Sphaeropleales) на филогенетическом дереве, построенном по алгоритму максимального правдоподобия (ML) на основании частичной последовательности региона ITS1 — 5.8S — ITS2 кластера ядерных рибосомальных генов 18S rRNA. Показаны значения (> 80) бутстреп-поддержки топологии дерева. Аутентичные штаммы отмечены знаком \*, типовой вид — буквой Т

**Fig. 4.** The phylogenetic position of the IBSS-156 *Coelastrella* strain (Scenedesmaceae, Sphaeropleales) based on the maximum likelihood (ML) inference from partial ITS1—5.8S—ITS2 region of the 18S rRNA gene cluster. Bootstrap support values (> 80) are shown at the nodes. Authentic strains are marked with \*; the type species is marked with T

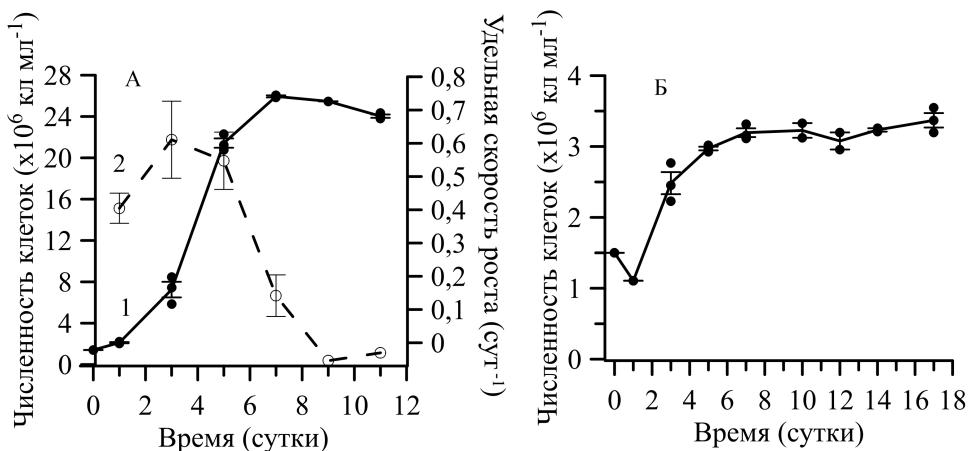
Полученная нами топология дерева, построенного по относительно небольшому фрагменту рибосомальной ДНК, хорошо согласуется с реконструкциями, которые основаны на полных последовательностях гена 18S rRNA [Krivina et al., 2024; Maltsev et al., 2021; Wang et al., 2019]. В частности, линия *C. rubescens* входит в одну подгруппу с видами, которые обычно относят к так называемой основной субкладе. Последняя формирует с высоким уровнем поддержки сестринскую группу по отношению к общей группе видов *Coelastrella thermophila* Qinghua Wang, Huiyin Song, Xudong Liu, Guoxiang Liu & Zhengyu Hu, 2019 и *Coelastrella saipanensis* N. Hanagata, 2001, что полностью соответствует филогении, представленной в работах [Krivina et al., 2024; Maltsev et al., 2021]. Таким образом, с высокой долей вероятности выделенный нами из крымского лишайника штамм может быть отнесен к виду *C. rubescens*. Этот вывод не противоречит результатам морфологических исследований: по максимальным линейным размерам, количеству и расположению рёбер на клеточной стенке, а также по количеству автоспор в спорангии выделенный нами штамм соответствует описанию *C. rubescens* var. *rubescens*, ведущие таксономические признаки которого обобщены в работах [Андреева, 1998; Kaufnerová, Eliás, 2013; Krivina et al., 2024]. Соответственно, выделенный изолят был внесён в общий каталог коллекций живых культур каротиногенных микроводорослей ФИЦ ИнБЮМ (<https://algae.ibss-ras.ru>) как штамм IBSS-156 *Coelastrella rubescens* (Vinatzer) Kaufnerová & Eliás, 2013 (Scenedesmaceae, Sphaeropleales).

**Изучение ростовых характеристик штамма IBSS-156 в накопительной культуре и в условиях стресса.** Двухстадийная схема культивирования является основным подходом при выращивании микроводорослей для получения ценных продуктов вторичного каротиногенеза — кетокаротиноидов группы астаксантина и нейтральных липидов [Solovchenko, Minyuk, 2021]. На I, вегетативной («зелёной») стадии водоросли находятся в оптимальных для роста условиях; основная задача этого этапа — максимальное накопление биомассы вегетативных клеток. При достижении культурами стационарной фазы роста и при развитии дефицита биогенных элементов в среде культуры переводят на II («красную») стадию путём комплексного стресс-воздействия, индуцирующего биосинтез астаксантина и нейтральных липидов. В качестве стресс-факторов наиболее часто используют острое голодание по азоту и фосфору, а также существенное увеличение освещённости и температуры. Для изучения параметров роста штамма IBSS-156 нами была выбрана оптимизированная схема двухстадийной культуры [Минюк и др., 2016]. Такой подход позволяет исследовать морфофизиологические особенности водорослей на «зелёной» стадии, а также оценить их способность к накоплению ценных целевых продуктов в режиме стрессирования.

Динамика роста штамма IBSS-156 в накопительной культуре на вегетативной стадии представлена на рис. 5А. Экспоненциальная фаза роста продолжалась с 1-х суток по 5-е; удельная скорость роста за этот период составила в среднем  $(0,52 \pm 0,11)$  сут $^{-1}$ , а максимальных значений,  $(0,62 \pm 0,11)$  сут $^{-1}$ , она достигла на 3-и сутки. С 7-х суток культура находилась в стационарной фазе роста. Численность клеток за 11 суток вегетативного роста увеличилась в 8 раз. Высокие скорости роста и способность к быстрому накоплению биомассы в целом характерны для водорослей рода *Coelastrella* [Corato et al., 2022; Goecke et al., 2020; Maltsev et al., 2021; Nayana et al., 2022]. Для коллекционного свободноживущего штамма Vinatzer/Innsbruck V 195 (IPPAS H-350 = CCALA 475) *Coelastrella rubescens* (Vinatzer) Kaufnerová & Eliás, 2013 при условиях культивирования, аналогичных нашим, на «зелёной» стадии максимальная удельная скорость роста составляла 0,95 сут $^{-1}$  [Minyuk et al., 2017].

После перевода культуры в режим абиотического стресса, к 3-м суткам «красной» стадии (рис 5Б), наблюдали увеличение численности клеток в 1,6 раза относительно начальной концентрации. Дальнейшего прироста клеток не происходило. Подобная реакция культуры *C. rubescens* в начале «красной» стадии при использовании аналогичной схемы стрессирования была отмечена и ранее [Minyuk et al., 2017]. Наблюдаемый прирост может происходить за счёт по-

требления водорослями биогенных веществ, которые дополнительно поступают при разбавлении концентратка клеток питательной средой, даже редуцированной по азоту и фосфору. Первые признаки вторичного каротиногенеза были выявлены на 3-и сутки после стрессирования: визуально отмечено изменение цвета культуры в колбах с зелёного на коричнево-оранжевый, а при наблюдении под световым микроскопом зарегистрировано увеличение размеров клеток и изменение цвета (см. рис. 3Б).



**Рис. 5.** Динамика численности клеток (1) и среднесуточной удельной скорости роста (2) штамма IBSS-156 *Coelastrella rubescens* на вегетативной стадии (А) и на стадии вторичного каротиногенеза (Б)

**Fig. 5.** Dynamics of the cell abundance (1) and the average daily specific growth rate (2) for the IBSS-156 *Coelastrella rubescens* strain during the vegetative stage (A) and secondary carotenogenesis stage (B)

Изменение пигментного состава является ключевым индикатором развития процессов вторичного каротиногенеза в клетках в ответ на действие абиотического стресса. В частности, это проявляется в снижении удельного содержания хлорофилла и связанных с ним первичных каротиноидов относительно содержания вторичных каротиноидов в клетках [Lemoine, Schoefs, 2010; Shah et al., 2016]. Для количественной оценки динамики этих процессов обычно используют соотношение пиков поглощения экстрактов пигментов на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофилла и вторичных каротиноидов [Solovchenko, Minyuk, 2021]. В качестве экспресс-оценки таких изменений мы проанализировали динамику спектров поглощения живых культур микроводорослей на «зелёной» (рис. 6А) и «красной» (рис. 6Б) стадиях культивирования. Очевидно, что формы спектров поглощения суспензии клеток живой культуры *C. rubescens* существенно отличаются при разных режимах культивирования.

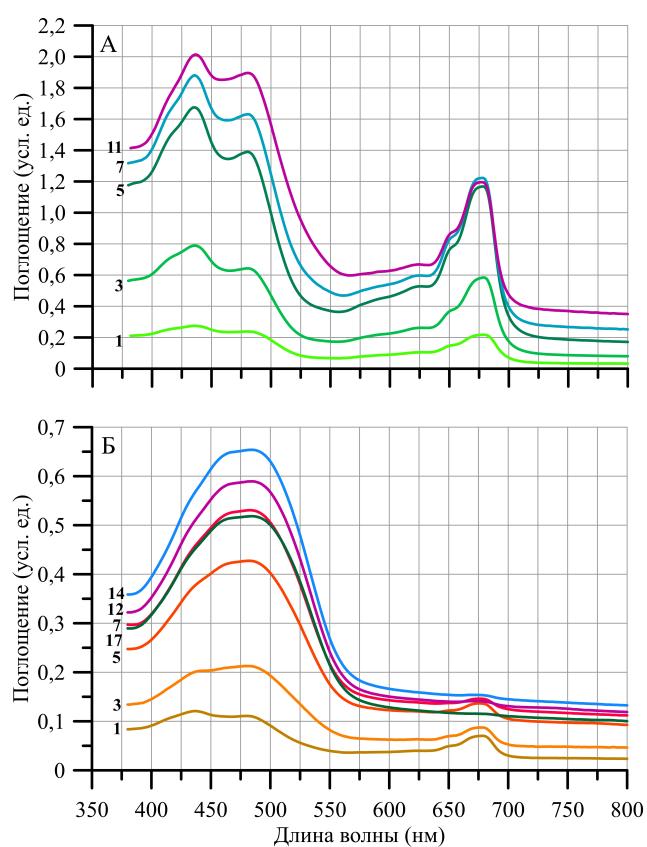
На «зелёной» стадии хорошо выражены максимумы, связанные с поглощением хлорофилла *a* в синей (425 нм) и красной (680 нм) частях спектра. Дополнительное плечо в красной области (на 650 нм) определяется поглощением хлорофилла *b* — вспомогательного фотосинтетического пигмента зелёных водорослей. В синей части спектра этот пигмент вносит свой вклад в формирование пика в области 470–480 нм совместно с первичными каротиноидами. Величины поглощения в экстремумах синей области непрерывно росли на протяжении эксперимента и достигали максимума на 11-е сутки, а в красной части спектра после 5-х суток они изменились уже незначительно (рис. 6А).

На «красной» стадии наблюдали постепенное сглаживание спектра в области максимумов поглощения хлорофиллов, и к 12-м суткам эксперимента он представлял собой унимодальную крипту с широким пиком, сдвинутым в сине-зелёную область. В диапазоне длин волн 480–490 нм в этот период мы наблюдали непрерывное увеличение амплитуды пика, что отражает накопление вторичных каротиноидов в культуре. На 17-е сутки показатели поглощения пигментов резко

снижались без изменения формы спектра. В это же время появлялись первые признаки перехода водоросли в состояние покоя. Полностью прекращался процесс деления клеток, наружная оболочка клетки утолщалась. Полученная динамика спектров поглощения соответствует представлениям о постепенном редуцировании фотосинтетического аппарата микроводорослей в процессе их перехода в состояние покоя и о накоплении в клетках кетокаротиноидов, максимум поглощения которых сдвинут в длинноволновую часть спектра относительно первичных каротиноидов [Lemoine, Schoefs, 2010]. Таким образом, изменение формы спектров поглощения живых культур каротиногенных микроводорослей в процессе культивирования может быть использовано для экспресс-оценки физиологического состояния клеток и для контроля за процессами накопления кетокаротиноидов в культуре.

**Рис. 6.** Динамика изменения оптических спектров поглощения суспензии клеток живой культуры штамма IBSS-156 *Coelastrella rubescens* на «зелёной» (А) и «красной» (Б) стадиях культивирования (цифрами обозначены сутки эксперимента)

**Fig. 6.** Changes in the shape of optical absorption spectra of a cell suspensions of a living culture of the IBSS-156 *Coelastrella rubescens* strain during the ‘green’ (A) and ‘red’ (B) stages of cultivation (digits on curves indicate the experiment duration in days)



### Выводы:

1. Впервые в чистую культуру из таллома крымского эпилитного лишайника выделены клетки зелёной микроводоросли, относящейся к роду *Coelastrella* (Scenedesmaceae, Sphaeropleales). Простота и надёжность использованной нами процедуры позволяют рекомендовать описанную в работе модификацию метода плотностно-градиентного центрифугирования для рутинного выделения клеток фикобионтов лишайников в культуру.
2. Методами молекулярно-генетической идентификации и сканирующей электронной микроскопии подтверждено таксономическое положение выделенного штамма в системе Chlorophyta. По совокупности признаков он отнесен к роду *Coelastrella* семейства Scenedesmaceae в пределах порядка Sphaeropleales. Согласно результатам филогенетического анализа на основе фрагмента ITS1 — 5.8S — ITS2 рибосомального кластера генов, штамм с высокой вероятностью принадлежит к виду *C. rubescens*. Выделенный изолят внесён в каталог коллекции живых культур каротиногенных микроводорослей ФИЦ ИНБЮМ (<https://algae.ibss-ras.ru>) как IBSS-156 *Coelastrella rubescens*.

3. Штамм показал способность к быстрому росту, до  $(0,62 \pm 0,11)$  сут $^{-1}$ , а также к накоплению зелёной биомассы и вторичных каротиноидов в условиях двухстадийного культивирования. Спектры поглощения суспензии клеток на «красной» стадии отражают процессы деградации зелёных фотосинтетических пигментов и биосинтеза вторичных каротиноидов. Регистрация спектров поглощения живых культур микроводорослей может быть использована для экспресс-оценки их физиологического состояния и для контроля за накоплением кетокаротиноидов в процессе культивирования.

Полученные результаты указывают на возможность выделения из крымских лишайников перспективных продуцентов астаксантина, адаптированных к местным условиям. Необходимы дальнейшие исследования биологических свойств и коммерческого потенциала нового штамма IBSS-156 *Coelastrella rubescens* как возможного биотехнологического объекта для массового культивирования в климатических условиях Крыма и юга России с целью получения высокоценных в медицинском и пищевом отношениях кетокаротиноидов группы астаксантина.

*Работа профинансируется Российской научным фондом, грант № 24-26-20121 «Создание биоресурсной коллекции каротиногенных водорослей крымского региона» (№ гос. регистрации 124102900026-9).*

**Благодарность.** Авторы выражают искреннюю благодарность к. б. н. Г. С. Минюк за полезные замечания и советы при подготовке статьи, к. м. н. Е. А. Бочаровой — за получение фотографий клеток водорослей под световым микроскопом и измерение их линейных размеров, начальнику лаборатории микроскопии В. Н. Лишаеву — за получение СЭМ-изображений микроводорослей, к. б. н. О. А. Рыльковой, к. б. н. И. В. Дробецкой и И. Н. Чубчиковой — за консультации по пробоподготовке препаратов для СЭМ, к. б. н. Н. Ю. Шоман и к. б. н. Е. С. Соломоновой — за консультации при работе на спектрофотометре и проточном цитометре.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Андреева В. М. *Почвенные и аэрофильные зелёные водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales)*. Санкт-Петербург : Наука, 1998. 351 с. [Andreyeva V. M. *Terrestrial and Aerophilic Green Algae (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales)*. Saint Petersburg : Nauka, 1998, 351 p. (in Russ.)]
2. Войцехович А. *Фотобионты лишайников: разнообразие, экология и взаимоотношения с мицобионтами*. Саарбрюкken, Германия : LAP LAMBERT Academic Publishing, 2013. 102 с. [Voitsekhovich A. *Fotobionty lishainikov: raznobrazie, ekologiya i vzaimootnosheniya s mikobiontami*. Saarbrücken, Germany : LAP LAMBERT Academic Publishing, 2013, 102 p. (in Russ.)]
3. Гайсина Л. А., Фазлутдинова А. И., Кабиров Р. Р. *Современные методы выделения и культивирования водорослей* : учебное пособие. Уфа : Изд-во БГПУ, 2008. 152 с. [Gaisina L. A., Fazlutdinova A. I., Kabirov R. R. *Sovremennye metody vydeleniya i kul'tivirovaniya vodoroslei* : uchebnoe posobie. Ufa : Izd-vo BGPU, 2008, 152 p. (in Russ.)]. <https://elibrary.ru/qktkil>
4. ГОСТ 8050-85. *Двуокись углерода газообразная и жидккая. Технические условия* = *Gaseous and liquid carbon dioxide. Specifications* : межгосударственный стандарт : издание официальное : утверждён и введён в действие постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 29.07.85 № 2423 : взамен ГОСТ 8050-76 : дата введения 1987-01-01 / подготовлен Государственной ассоциацией «АгроХим». Москва : Стандартинформ, 2006. 25 с. [GOST 8050-85. *Dvuokis' ugleroda gazoobraznaya i zhidkaya. Tekhnicheskie usloviya* = *Gaseous and liquid carbon dioxide. Specifications* : mezhgosudarstvennyi standart : izdanie ofitsial'noe : utverzhden i vveden v deistvie postanovleniem Gosudarstvennogo komiteta SSSR po standartam ot 29.07.85 no. 2423 : vzamen GOST 8050-76 : data vvedeniya 1987-01-01 / podgotovlen Gosudarstvennoi assotsiatsiei “Agrokhim”. Moscow : Standartinform, 2006, 25 p. (in Russ.)]
5. Данцик Н. В., Челебиева Э. С., Минюк Г. С. Рабочая коллекция живых культур каротиногенных микроводорослей Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского

- // Морской биологический журнал. 2021. Т. 6, № 4. С. 3–18. [Dantsyuk N. V., Chelebieva E. S., Minyuk G. S. Working collection of carotenogenic microalgae living cultures of A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas. *Marine Biological Journal*, 2021, vol. 6, no. 4, pp. 3–18. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.21072/mbj.2021.06.4.01>
6. Минюк Г. С. Каротиногенные микроводоросли. База данных. А. с. № 2020621092. Заявка № 2020620921. 10.06.2020, опубл. 30.06.2020. Бюл. № 7. [Minyuk G. S. Karotinogennye mikrovodorosli. Baza dannykh. A. s. no. 2020621092. Zayavka no. 2020620921. 10.06.2020, opubl. 30.06.2020. Byul. no. 7. (in Russ.)]
7. Минюк Г. С., Челебиева Э. С., Чубчикова И. Н., Данцик Н. В., Дробецкая И. В., Сахонь Е. Г., Чивкунова О. Б., Чеканов К. А., Лобакова Е. С., Сидоров Р. А., Соловченко А. Е. Влияние pH и CO<sub>2</sub> на рост и метаболизм микроводоросли *Coelastrella (Scotiellopsis) rubescens* // Физиология растений. 2016. Т. 63, вып. 4. С. 601–610. [Minyuk G. S., Chelebieva E. S., Chubchikova I. N., Dantsyuk N. V., Drobetskaya I. V., Sakhon E. G., Chivkunova O. B., Chekanov K. A., Lobakova E. S., Sidorov R. A., Solovchenko A. E. pH and CO<sub>2</sub> effects on *Coelastrella (Scotiellopsis) rubescens* growth and metabolism. *Fiziologiya rastenii*, 2016, vol. 63, iss. 4, pp. 601–610. (in Russ.)]. <http://doi.org/10.7868/S0015330316040102>
8. Мокросноп В. М., Золотарёва Е. К. Влияние фунгицидов на рост культуры микроводоросли *Euglena gracilis* Klebs (Euglenophyta) // Альгология. 2012. Т. 22, № 4. С. 337–344. [Mokrosnop V. M., Zolotareva E. K. The effect of selected fungicides on growth of *Euglena gracilis* Klebs (Euglenophyta) culture. *Al'gologiya*, 2012, vol. 22, no. 4, pp. 337–344. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v15.i2.60>
9. Рылькова О. А., Боровков А. Б., Ханайченко А. Н., Харчук И. А., Гудвилович И. Н., Лишаев В. Н. Особенности пробоподготовки образцов монадных форм микроводорослей для сканирующей электронной микроскопии // Биоразнообразие и устойчивое развитие. 2024. Т. 8, № 4. С. 62–74. [Rylkova O. A., Borovkov A. B., Khanaychenko A. N., Kharchuk I. A., Gudvilovich I. N., Lishaev V. N. Peculiarities of sample prepara-
- tion of samples of monadic forms of microalgae for scanning electron microscopy. *Bioraznoobrazie i ustoichivoe razvitiye*, 2024, vol. 8, no. 4, pp. 62–74. (in Russ.)]. <https://elibrary.ru/afkodh>
10. Темraleева А. Д., Минчева Е. В., Букин Ю. С., Андреева А. М. Современные методы выделения, культивирования и идентификации зелёных водорослей (*Chlorophyta*). Кострома : Костромской печатный дом, 2014. 215 с. [Temraleeva A. D., Mincheva E. V., Bukin Yu. S., Andreeva A. M. *Modern Methods of Isolation, Cultivation and Identification of Green Algae (Chlorophyta)*. Kostroma : Kostromskoi pechatnyi dom, 2014, 215 p. (in Russ.)]. <https://elibrary.ru/uuyvqt>
11. Чубчикова И. Н., Дробецкая И. В., Данцик Н. В., Челебиева Э. С. Оптимизация метода фиксации пресноводных микроводорослей (Scenedesmaceae, Chlorophyta) для первичной идентификации с использованием сканирующей электронной микроскопии // Вопросы современной альгологии. 2022. № 1 (28). С. 102–109. [Chubchikova I. N., Drobetskaya I. V., Dantsyuk N. V., Chelebieva E. S. Optimization of freshwater microalgae (Scenedesmaceae, Chlorophyta) fixation method for primary taxonomic identification by scanning electron microscopy. *Voprosy sovremennoi al'gologii*, 2022, no. 1 (28), pp. 102–109. (in Russ.)]. [https://doi.org/10.33624/2311-0147-2022-1\(28\)-102-109](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2022-1(28)-102-109)
12. Bačkor M., Hudák J., Ziegler W., Bačkorová M. Methods for isolation and cultivation of the eukaryotic lichen photobionts – looking for a universal method. A review. *Thaiszia – Journal of Botany*, 1998, vol. 8, pp. 1–6.
13. Bischoff H. W., Bold H. C. *Phycological Studies. IV. Some Soil Algae from Enchanted Rock and Related Algal Species*. Austin, TX : University of Texas, 1963, vol. 6318, 95 p.
14. Chelebieva E. S., Dantsyuk N. V., Chekanov K. A., Chubchikova I. N., Drobetskaya I. V., Minyuk G. S., Lobakova E. S., Solovchenko A. E. Identification and morphological-physiological characterization of astaxanthin producer strains of *Haematococcus pluvialis* from the Black Sea region. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2018, vol. 54, no. 6, pp. 639–648. <https://doi.org/10.1134/S0003683818060078>
15. Cheng X., Shah M. Astaxanthin from *Haematococcus*: Production, applications, and advances.

- In: *Handbook of Food and Feed from Microalgae. Production, Application, Regulation, and Sustainability*. London, UK ; San Diego, CA ; Cambridge, MA ; Oxford, UK : Academic Press, 2023, chap. 19, pp. 221–236. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99196-4.00033-4>
16. Corato A., Le T. T., Baurain D., Jacques P., Remacle C., Franck F. A fast-growing oleaginous strain of *Coelastrella* capable of astaxanthin and canthaxanthin accumulation in phototrophy and heterotrophy. *Life*, 2022, vol. 12, iss. 3, art. no. 334 (21 p.). <https://doi.org/10.3390/life12030334>
  17. Czeczuga B., Osorio H. S. Investigations on carotenoids in lichens. XXI. Astaxanthin, the dominant carotenoid in some lichens from Uruguay. *Israel Journal of Plant Sciences*, 1989, vol. 38, iss. 2–3, pp. 115–120.
  18. Debnath T., Bandyopadhyay T. K., Vanitha K., Bobby Md. N., Tiwari O. N., Bhunia B., Muthuraj M. Astaxanthin from microalgae: A review on structure, biosynthesis, production strategies and application. *Food Research International*, 2024, vol. 176, art. no. 113841 (18 p.). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113841>
  19. Fontaniella B., Molina M. C., Vicente C. An improved method for the separation of lichen symbionts. *Phyton (Horn, Austria)*, 2000, vol. 40, fasc. 2, pp. 323–328.
  20. Gasulla F., Guéra A., Barreno E. “A simple and rapid method for isolating lichen photobionts”. *Symbiosis*, 2010, vol. 51, iss. 2, pp. 175–179. <https://doi.org/10.1007/s13199-010-0064-4>
  21. Goecke F., Noda J., Paliocha M., Gislerød H. R. Revision of *Coelastrella* (Scenedesmaceae, Chlorophyta) and first register of this green coccoid microalga for continental Norway. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, vol. 36, iss. 10, art. no. 149 (17 p.). <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02897-0>
  22. Han D., Li Y., Hu Q. Astaxanthin in microalgae: Pathways, functions and biotechnological implications. *Algae*, 2013, vol. 28, no. 2, pp. 131–147. <https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.2.131>
  23. Islam M. A., Magnusson M., Brown R. J., Ayoko G. A., Nabi M. N., Heimann K. Microalgal species selection for biodiesel production based on fuel properties derived from fatty acid profiles. *Energies*, 2013, vol. 6, iss. 11, pp. 5676–5702. <https://doi.org/10.3390/en6115676>
  24. Kan Y., Pan J. A one-shot solution to bacterial and fungal contamination in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* culture by using an antibiotic cocktail. *Journal of Phycology*, 2010, vol. 46, iss. 6, pp. 1356–1358. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00904.x>
  25. Karpagam R., Preeti R., Ashokkumar B., Varalakshmi P. Enhancement of lipid production and fatty acid profiling in *Chlamydomonas reinhardtii*, CC1010 for biodiesel production. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, vol. 121, pp. 253–257. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.015>
  26. Katoh K., Toh H. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics*, 2010, vol. 26, iss. 15, pp. 1899–1900. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq224>
  27. Kaufnerová V., Eliáš M. The demise of the genus *Scotiellopsis* Vinatzer (Chlorophyta). *Nova Hedwigia*, 2013, Bd 97, Heft 3–4, S. 415–428. <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2013/0116>
  28. Kawasaki S., Yoshida R., Ohkoshi K., Toyoshima H. *Coelastrella astaxanthina* sp. nov. (Sphaeropleales, Chlorophyceae), a novel microalga isolated from an asphalt surface in mid-summer in Japan. *Phycological Research*, 2020, vol. 68, iss. 2, pp. 107–114. <https://doi.org/10.1111/pre.12412>
  29. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, vol. 16, iss. 2, pp. 111–120. <https://doi.org/10.1007/bf01731581>
  30. Krivina E., Sinetova M., Zadneprovskaya E., Ivanova M., Starikov A., Shibzukhova K., Lobakova E., Bukin Yu., Portnov A., Temraleeva A. The genus *Coelastrella* (Chlorophyceae, Chlorophyta): Molecular species delimitation, biotechnological potential, and description of a new species *Coelastrella affinis* sp. nov., based on an integrative taxonomic approach. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2024, vol. 117, iss. 1, art. no. 113 (33 p.). <https://doi.org/10.1007/s10482-024-02008-1>
  31. Lemoine Y., Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: A multi-functional response to stress. *Photosynthesis Research*, 2010, vol. 106, iss. 1–2, pp. 155–177. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9583-3>
  32. Loureiro L., Morais J., Silva R., Martins J. T.,

- Geada P., Vasconcelos V., Vicente A. A. Isolation and identification of lichen photobionts collected from different environments in north of Portugal and evaluation of bioactivities of their extracts. *Foods*, 2024, vol. 13, iss. 11, art. no. 1759 (18 p.). <https://doi.org/10.3390/foods13111759>
33. Maltsev Y., Krivova Z., Maltseva S., Maltseva K., Gorshkova E., Kulikovskiy M. Lipid accumulation by *Coelastrella multistriata* (Scenedesmaceae, Sphaeropleales) during nitrogen and phosphorus starvation. *Scientific Reports*, 2021, vol. 11, art. no. 19818 (13 p.). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99376-9>
34. Mikhailyuk T., Glaser K., Tsarenko P., Demchenko E., Karsten U. Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast in the context of an integrative approach to the taxonomy of microalgae and cyanobacteria. *European Journal of Phycology*, 2019, vol. 54, iss. 3, pp. 263–290. <https://doi.org/10.1080/09670262.2018.1557257>
35. Minyuk G., Chelebieva E., Chubchikova I., Dantsyuk N., Drobetskaya I., Sakhon E., Chekanov K., Solovchenko A. Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrella rubescens* (Scenedesmaceae, Chlorophyta), a producer of value-added keto-carotenoids. *Algae*, 2017, vol. 32, iss. 3, pp. 245–259. <https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.8.6>
36. Mohanasundaram Y., Arumugam N., Sarangam B., Alagarsamy A., Raja R. An introduction to *Haematococcus*. In: *Haematococcus. Biochemistry, Biotechnology and Biomedical Applications* / R. Raja, S. Hemaiswarya, M. Narayanan, S. Kandasamy, K. Jayappriyan (Eds). Singapore : Springer, 2023, pp. 1–10. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-2901-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-981-99-2901-6_1)
37. Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T. L., Agarwala R., Schäffer A. A. Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, 2008, vol. 24, iss. 16, pp. 1757–1764. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn322>
38. Mota G. C. P., Moraes L. B. S. D., Oliveira C. Y. B., Oliveira D. W. S., Abreu J. L. D., Dantas D. M. M., Gálvez A. O. Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: Processes, applications, and market. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2022, vol. 52, iss. 5, pp. 598–609. <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1966802>
39. Nayana K., Sudhakar M. P., Arunkumar K. Biorefinery potential of *Coelastrella* biomass for fuel and bioproducts – a review. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2022, 14 p. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02519-9>
40. Patel A. K., Tambat V. S., Chen C. W., Chauhan A. S., Kumar P., Vadrale A. P., Huang C.-Y., Dong C., Singhania R. R. Recent advancements in astaxanthin production from microalgae: A review. *Bioresource Technology*, 2022, vol. 364, art. no. 128030 (12 p.). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128030>
41. Shah M. R., Liang Y., Cheng J. J., Daroch M. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*, 2016, vol. 7, art. no. 531 (28 p.). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00531>
42. Solovchenko A., Minyuk G. The physiology of astaxanthin production by carotenogenic microalgae. In: *Global Perspectives on Astaxanthin. From Industrial Production to Food, Health, and Pharmaceutical Applications* / G. A. Ravishankar, A. Ranga Rao (Eds). London, UK ; San Diego, CA ; Cambridge, MA ; Oxford, UK : Academic Press, 2021, chap. 2, pp. 19–35. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823304-7.00026-X>
43. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, vol. 38, iss. 7, pp. 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
44. Trifinopoulos J., Nguyen L.-T., von Haeseler A., Minh B. Q. W-IQ-TREE: A fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research*, 2016, vol. 44, iss. W1, pp. W232–W235. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256>
45. Voitsekovich A., Beck A. Lichen photobionts of the rocky outcrops of Karadag massif (Crimean Peninsula). *Symbiosis*, 2016, vol. 68, iss. 1–3, pp. 9–24. <https://doi.org/10.1007/s13199-015-0346-y>
46. Wang Q., Song H., Liu X., Liu B., Hu Z., Liu G. Morphology and molecular phylogeny of coccoid green algae *Coelastrella* sensu lato (Scenedesmaceae, Sphaeropleales), including the description of three new species and two new varieties. *Journal of Phycology*, 2019, vol. 55, iss. 6, pp. 1290–1305. <https://doi.org/10.1111/jpy.12915>

47. White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications* / M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. White (Eds). San Diego, CA ; New York : Academic Press, 1990, pp. 315–322.
48. Wood A. M., Everroad R. C., Wingard L. M. Measuring growth rates in microalgal cultures. In: *Algal Culturing Techniques* / R. A. Andersen (Ed.). New York : Elsevier Academic Press, 2005, chap. 18, pp. 269–286.
49. Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 2000, vol. 7, no. 1–2, pp. 203–214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>

**A NEW STRAIN OF A CAROTENOGENIC GREEN MICROALGA  
*COELASTRELLA RUBESCENS*,  
SUITABLE FOR CULTIVATION  
IN THE CLIMATIC CONDITIONS OF SOUTHERN RUSSIA**

**N. Dantsyuk<sup>1</sup>, O. Krivenko<sup>1</sup>,  
I. Mansurova<sup>1</sup>, and I. Degtyar<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation

<sup>2</sup>Sevastopol State University, Sevastopol, Russian Federation

E-mail: [krivenko@ibss-ras.ru](mailto:krivenko@ibss-ras.ru)

A new carotenogenic strain of a green microalga *Coelastrella* Chodat (Scenedesmaceae, Sphaeropleales) was isolated in unialgal culture from the thallus of a Crimean epilithic lichen sampled in Sevastopol in March 2024. The strain is characterized by a pronounced ability to accumulate secondary carotenoids under acute abiotic stress conditions. We describe the methods we used to isolate phycobionts from small lichen samples, purify algae, establish axenic culture, adapt cells to laboratory conditions, and maintain strains in long-term culture collection. Species identification was performed using a combination of morphological (light and scanning electron microscopy) and molecular genetic approaches (analysis of the ITS1–5.8S–ITS2 fragment of the 18S rRNA gene cluster). The novel strain was identified as *Coelastrella rubescens* (Vinatzer) Kaufnerová & Eliás, 2013 and deposited into the collection of living cultures of carotenogenic microalgae at IBSS (<https://algae.ibss-ras.ru>), designated as IBSS-156. The growth characteristics of the IBSS-156 strain were evaluated under two-stage batch culture conditions. The data indicate high specific growth rates of the alga at the vegetative stage: up to  $(0.62 \pm 0.11)$  day<sup>-1</sup>. The dynamics of the algal pigment composition that we received reflects the massive accumulation of secondary carotenoids under stressful conditions. We found that measuring the absorption spectra of living microalgal cultures in the visible region allows for a rapid assessment of their physiological state and the rate of ketocarotenoid accumulation in biomass during two-stage cultivation. The obtained results highlight the potential of Crimean lichens as a source of promising astaxanthin-producing strains suitable for mass cultivation in arid and hot climates, such as those found in the Crimea and adjacent regions of southern Russia.

**Keywords:** carotenogenic microalgae, phycobionts, *Coelastrella*, two-stage cultivation