

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ ИМ. А.О. КОВАЛЕВСКОГО

ЧЕЛЕБИЕВА ЭЛИНА СЕРГЕЕВНА

УДК 582.263:577.127

**ОСОБЕННОСТИ ВТОРИЧНОГО КАРОТИНОГЕНЕЗА
У ЗЕЛЁНЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ**

03.02.10 – гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Севастополь – 2014

Диссертация является рукописью

Работа выполнена в Институте биологии южных морей им. А.О. Ковалевского,
г. Севастополь

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Минюк Галина Семеновна
Институт биологии южных морей
им. А.О. Ковалевского
старший научный сотрудник

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Соловченко Алексей Евгеньевич
Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова,
ведущий научный сотрудник

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Гольдин Евгений Борисович,
Южный филиал Национального университета
биоресурсов и природопользования Украины -
«Крымский агротехнологический университет»,
доцент

Защита диссертации состоится «19» декабря 2014 г. в 14 часов на заседании специализированного учёного совета Д 50.214.01 при Институте биологии южных морей по адресу: 299011 РФ, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии южных морей по адресу: 299011 РФ, г. Севастополь, пр. Нахимова, 2.

Автореферат разослан «___» _____ 2014 г.
Учёный секретарь
специализированного ученого совета Д 50.214.01
кандидат биологических наук

Н. В. Пospelова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Многие виды эврибионтных и экстремофильных зелёных микроводорослей при резком ухудшении условий среды обитания накапливают в липидных включениях цитоплазмы или стромы пластид значительное количество специфических (вторичных) каротиноидов (ВКР), отличных по структуре и функциональным свойствам от фотосинтетических (первичных) каротиноидов (ПКР), локализованных в тилакоидах хлоропластов. По химической природе ВКР у *Chlorophyceae*, за редким исключением, являются C_{40} -кетокаротиноидами (ККР) - интермедиатами ферментативного окисления β -каротина в астаксантин (3,3'-дигидрокси- β , β -каротин-4,4'-дион) (АСТ). Процесс синтеза и накопления ВКР, получивший название «вторичного каротиногенеза» (ВКРГ), рассматривается в настоящее время как неотъемлемый компонент комплекса морфо-физиологических и биохимических адаптаций эврибионтных *Chlorophyceae* к действию повреждающих факторов среды. Его ключевая роль состоит в удержании окислительного стресса, неизбежно развивающегося при экстремальных внешних воздействиях, в пределах, позволяющих водорослям перейти из вегетативного состояния в стадию покоя (Boussiba, 2000; Lemoine, Schoefs, 2010; Соловченко, 2013). Существенное увеличение интереса к исследованию природы ВКРГ у микроводорослей в последние 10-15 лет вызвано выявлением исключительно высокой биологической активности АСТ (мощного антиоксиданта, стимулятора деятельности иммунной, нервной и сердечно-сосудистой систем), нашедшего широкое применение в аквакультуре, медицине, производстве БАД и лечебной косметики (Lorenz, Cysewski, 2000; Higuera-Ciarama, 2006; Dufossé, 2009). При этом подавляющее большинство работ в данном направлении выполнено на планктонной зелёной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* Flotow 1844 (Volvocales) – единственном среди микроводорослей промышленном источнике природного АСТ (Boussiba, 2000; Li et al., 2011 и др.). В то же время сведения о многочисленной группе продуцентов ККР из других таксонов и экологических групп весьма фрагментарны и нередко ограничиваются лишь краткими сообщениями об их способности синтезировать АСТ. И только для небольшого числа видов из родов *Clorella*, *Scenedesmus*, *Chlorococcum*, *Scotiellopsis* и др. выполнены более детальные исследования, характеризующие особенности профиля их ВКР в зависимости от условий культивирования (Корескú et al., 2000; Костиков и др., 2001; Yuan et al., 2002; Kim et al., 2007; Qin et al., 2008; Чубчикова и др., 2009 и др.). Однако даже эти результаты плохо поддаются сравнительному анализу, так как характеризуют разные виды и штаммы при существенно разнящихся параметрах культивирования. Необходимым условием таких обобщений является наличие материалов, полученных в сходных экспериментальных условиях на объектах с безусловно доказанным таксономическим статусом. Только при таком подходе могут быть реализованы два наиболее актуальных в теоретическом и практическом плане аспекта исследований ВКРГ:

- развитие представлений о механизмах адаптации микроводорослей к условиям абиотического стресса как теоретической основы решения проблемы сохранения

хозяйственно ценных видов;

- выявление новых коммерчески перспективных источников природного АСТ.

Особый интерес в этом плане представляют микроводоросли, характеризующие надвидовые таксоны двух эволюционных линий Chlorophyceae – *Chlamydomonas applanata* и *C. lobulata* – и, в частности, порядки Volvocales и Scenedesmales Kostikov, в пределах которых, по литературным данным, ВКРГ встречается наиболее часто (Костиков и др., 2001).

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертационная работа выполнена в отделе физиологии животных и биохимии Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского в рамках научных исследований по темам: «Разработка научных основ, методов и технологий сохранения и восстановления биоразнообразия морских экосистем» (№ ГР 0106U012579, 2007-2011); «Адаптации экосистем приморских элементов экосети Украины под действием биотических и абиотических факторов» (№ ГР 0112U001629, 2012-2016); конкурсному проекту НАНУ «Проведение комплексных экологических, гидробиологических и биотехнологических исследований с целью решения фундаментальных и прикладных проблем устойчивого использования ресурсного потенциала, восстановления и сохранения морского биоразнообразия и качества морской среды Азово-Черноморского региона» (№ ГР 0110U006203, 2011-2013). Во всех темах автор участвовала в качестве исполнителя.

Цель и задачи исследований. Цель исследования – выявить общие закономерности и особенности вторичного каротиногенеза и сопряжённых с ним морфо-физиологических адаптаций у зелёных микроводорослей - представителей порядков Volvocales и Scenedesmales при различных моделях экспериментального абиотического стресса.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. В условиях двухстадийной накопительной культуры исследовать динамику морфометрических и физиолого-биохимических показателей функционального состояния зелёной микроводоросли *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (Volvocales) (численности и размеров клеток, содержания и состава пигментов и сухого вещества) в зависимости от природы химических активаторов вторичного каротиногенеза.

2. Провести молекулярно-генетическую верификацию таксономического статуса объектов исследования для подтверждения их принадлежности к порядку Scenedesmales.

3. Исследовать динамику численности и размеров клеток, содержания и состава пигментов, массовой доли сухого вещества и его основных компонентов у микроводорослей семейства Scenedesmaceae - *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler et al. 1997 и *Pseudospongiococcum protococcoides* Gromov et Mamkaeva 1974 и Bracteacoccaceae - *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrova 1931 в условиях модельного абиотического стресса, индуцирующего вторичный каротиногенез.

Объект исследования – альгологически чистые культуры 4 видов зелёных микроводорослей порядков Volvocales и Scenedesmales.

Предмет исследования – видовая и экологическая специфичность ВКРГ как ключевого физиолого-биохимического механизма защиты микроводорослей от абиотического стресса.

Методы исследования: методы лабораторного культивирования микроводорослей, физиолого-биохимические методы исследования функциональной активности клеток с использованием световой микроскопии, микрофотосъёмки, ПЦР-диагностики, проточной цитометрии, компьютерной морфометрии с применением программы ImageJ, спектрофотометрии, ВИД-спектроскопии, фотоколориметрии, тонкослойной хроматографии, качественных цветных реакций, гравиметрии, расчетных методов определения продуктивности культур по биомассе и каротиноидам; методы статистического анализа. При выполнении работы биоэтические нормы не нарушены.

Научная новизна полученных результатов. Работа является первым комплексным исследованием особенностей ВКРГ и сопряжённых с ним физиологических процессов у 4 видов микроводорослей, характеризующим общие и специфические черты морфо-биологических и физиолого-биохимических адаптаций у представителей двух массовых, эволюционно удалённых порядков Chlorophyceae - Volvocales и Scenedesmales.

Впервые определена последовательность нуклеотидов в маркерном ядерном гене 18S рРНК у двух видов микроводорослей, на основании чего изменен таксономический статус штамма IPPAS D-292 с *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard 1988 на *Scenedesmus rubescens* Kessler et al. 1997 и на молекулярно-генетическом уровне подтверждён статус *Pseudospongiosococcum protococcoides* (штамм CALU-221).

Впервые показана высокая фенотипическая и функциональная гетерогенность накопительных культур *E. carotinos* (штамм АСКУ 573-06), опосредованная постоянным наличием в культурах вегетативных клеток, содержащих ККР. Выявлены специфические черты адаптивного ответа водоросли на стресс-индукцию ВКРГ: высокая устойчивость к химическим стресс-агентам; активная споруляция на протяжении всей «красной» стадии, приводящая к существенному уменьшению средних объёмов клеток (в 1,8–6,8 раза); определяющая роль моноэфиров АСТ в формировании цитоплазматического пула ВКР; наличие в составе ВКР значительного количества эфиров адонирубина (10-12 % от Σ КР).

Впервые в сравнительном аспекте исследована динамика морфометрических и физиолого-биохимических показателей состояния клеток у 3-х представителей порядка Scenedesmales в условиях модельного стресса. Выявлены общие черты их адаптивного ответа на однотипное стресс-воздействие: существенное увеличение объёмов клеток; идентичность качественного состава ВКР, включающего полный набор интермедиатов биосинтеза АСТ, аномально высокое содержание свободных форм АСТ и адониксантина (АДК) у видов семейства Scenedesmaceae (23,6-31,8 % от суммы); технологически значимый выход липидов из литра исходной культуры (187-329 мг·л⁻¹·сут⁻¹). Показано наличие у каждой из сценедесмальных микроводорослей одного или нескольких признаков, не свойственных другим объектам исследования: а) высокое содержание β -каротина у *S. rubescens* – 30,6-34,0 % Σ КР; б) высокое содержание полярных ксантофиллов (17,2-21,6 % Σ КР) у *P. protococcoides*; в) преимущественное запасание АСТ в форме диэфиров у *B. minor* (38,7-42,3% Σ КР).

Практическое значение полученных результатов. Полученные результаты позволяют определить направление и метод поиска перспективных для массового

культивирования продуцентов ККР, а именно – скрининг обитателей мелких пересыхающих водоемов, аэрофильных и эдафотрофных видов из порядков Scenedesmales и Volvocales по унифицированной схеме двухстадийной накопительной культуры. Сведения об общих закономерностях и особенностях ВКРГ у видов разной таксономической и экологической специализации и апробированные варианты двухстадийной культуры могут быть использованы при разработке научных основ культивирования зелёных микроводорослей для получения природных ККР группы АСТ.

Личный вклад соискателя. Работы по молекулярно-генетической идентификации объектов исследования, основной комплекс экспериментальных работ (постановка 5 многовариантных опытов, определение морфо-физиологических показателей функционального состояния водорослей: численности и размеров клеток, содержания хлорофиллов, каротиноидов, белка и липидов в культурах и биомассе водорослей), анализ и обобщение полученных результатов выполнены автором самостоятельно.

При работе над диссертацией консультативную помощь автору оказывали: научный руководитель к.б.н., с.н.с. Г. С. Минюк, д.б.н., проф. И. Ю. Костиков, к. б. н. В. Р. Бойко, к.б.н., с.н.с. В. С. Муханов. Техническую помощь в определении концентрации азота в среде, содержания СВ и углеводов в биомассе оказывали н.с., к.б.н. И. В. Дробецкая и м.н.с. И. Н. Чубчикова. Участие коллег в исследованиях отражено в совместных публикациях. Права соавторов не нарушены. Автор выражает им искреннюю благодарность.

Апробация результатов исследований. Результаты исследования представлены на 8 международных и региональных конференциях: Международной научной конференции «Каразинские естественнонаучные студии» (Харьков, 2011), VII Международной научно-практической конференции молодых учёных по проблемам водных экосистем «Pontus Euxinus-2011» (Севастополь, 2011), XIII съезде Украинского ботанического общества (Львов, 2011), IV Международной конференции «Актуальные проблемы современной альгологии» (Киев, 2012), XII конференции молодых ученых «Научные, прикладные и образовательные аспекты физиологии, генетики, биотехнологии растений и микроорганизмов» (Киев, 2012), IX Международной научной конференции студентов и аспирантов, приуроченной к 150-летию со дня рождения академика В. Вернадского (Львов, 2013), Международной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы ботаники и экологии» (Щёлкино, 2013), Международной научной конференции «Физиология и биотехнология оксигенных фототрофных микроорганизмов: взгляд в будущее» (Москва, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 18 научных работ (4 без соавторов), из которых: 8 статей в специализированных научных изданиях, рекомендованных ВАК. Из них 3 – в изданиях, реферируемых наукометрической и библиографической базами «Thomson Reuters» и «Agris». 10 работ опубликовано в материалах национальных и международных конференций.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, 4-х разделов, выводов, списка использованных источников. Работа изложена на 157 страницах, содержит 9 таблиц и 60 рисунков. Список литературы включает 222 источника, из них 186 на латинице.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во вступлении обоснована актуальность исследования, сформулированы его цели и задачи, охарактеризованы научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

В первом разделе «Вторичный каротиногенез как механизм адаптации микроводорослей к действию экстремальных факторов внешней среды» на основе литературных данных рассмотрены современные представления о ВКРГ как одном из ключевых физиолого-биохимических механизмов адаптации эврибионтных зелёных микроводорослей к изменениям условий среды обитания. Показано распространение ВКРГ в системе Chlorophyta и биологические особенности микроводорослей-продуцентов ККР. Приведены сведения о влиянии факторов внешней среды на индукцию и интенсивность ВКРГ. Проанализированы состав, структура, физико-химические свойства, биосинтез и функциональная роль ВКР у зелёных микроводорослей, биологическая активность и области применения АСТ.

Во втором разделе «Объекты и методы исследования» приведены сведения о таксономическом статусе объектов исследования по системе И. Ю. Костикова и соавт. (2001), источнике использованных в работе штаммов, методов и условий их культивирования, молекулярно-генетических, морфометрических и физиолого-биохимических методов анализа функциональной активности водорослей, а также методов статистической обработки полученных результатов.

Объектами исследования служили: *Ettlia carotinos*a Komárek 1989 (Volvocales) (штамм Mainx, АСКУ 573-06) и три представителя порядка Scenedesmales – *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler et al. 1997 (Scenedesmaceae) (штамм IPPAS D-292), *Pseudospongiococcum protococcoides* Gromov & Mamkaeva 1974 (Scenedesmaceae) (штамм CALU-221) и *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrova 1931 (Bracteacoccaceae) (штамм АСКУ 506-06). Верификация таксономического статуса штаммов IPPAS D-292 и CALU-221 была проведена на основе молекулярно-филогенетического анализа последовательностей нуклеотидов маркерного ядерного гена, кодирующего 18S рРНК (Nakada et al., 2008). ДНК выделяли по протоколу изоляции ДНК из растений (DNA Microprep Isolation from Plants). Амплификацию последовательности 18S рРНК проводили при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР), с использованием пары универсальных эукариотических праймеров для 18S рРНК: прямого праймера (1-F) и обратного (1528-R). Секвенирование амплифицированных последовательностей осуществляли прямыми (1-F), (528-F), (1055-F) и обратными праймерами (1055-R), (536-R), (1528-R) в лаборатории MACROGEN (Нидерланды).

Водоросли выращивали методом двухстадийной накопительной культуры (Kobayashi, 1991; Минюк и др., 2010) в стеклянных конических колбах объёмом 100-500 мл. Условия культивирования на I («зелёной») стадии: питательная среда BBM 3N (Scenedesmales) и ОНМ (Fabregas et al. 2000) (*E. carotinos*a), одностороннее освещение (4000-7000 лк) лампами «Feron» (DL 20W 6400K) с фотопериодом 15 ч свет : 9 ч темнота, температура среды – 25-26 °С, скорость продувки газо-воздушной смесью 0,44 л·мин⁻¹·л⁻¹ (0,7 % CO₂

(v/v), начальная численность клеток $(2,3-2,4) \cdot 10^6$ кл·мл⁻¹. Перевод культур на II («красную») стадию осуществляли путём резкого изменения ключевых параметров культивирования: 3-10-кратного разбавления «зелёных» культур дистиллированной водой или редуцированной по N ($4,12 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) и P ($5,32 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) средой BBM, изменения режима освещения с одностороннего периодического на двухстороннее круглосуточное (по 7000 Лк с каждой из сторон), увеличения скорости продувки до $1 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$. Для интенсификации биосинтеза ККР в разных экспериментах в среду вносили ацетат натрия (NaAc) до концентрации 0,05M, хлорид натрия (NaCl) 200 mM, смесь сульфата железа II и пероксида водорода ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) ($0,45 \text{ mM}$ и 10^{-4} mM , соответственно). Варианты без добавления химических активаторов ВКРГ служили контролем. Температуру питательной среды на «красной» стадии для всех видов поддерживали на уровне 26 °C. Каждый вариант экспериментов выполняли в трёх повторностях.

Освещённость на наружной поверхности колб измеряли при помощи люксметра Ю-116. Динамику численности клеток регистрировали при помощи камеры Горяева БКГ-4 и проточного цитометра Cytomics TM FC 500 (Beckman Coulter, США) (Franklin, 2001). Линейные размеры клеток устанавливали при помощи микроскопа Leica DM-1000, цифровой камеры Leica Microsystem AG и компьютерной программы ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Объёмы клеток (V) рассчитывали по формуле шара или вытянутого сфероида (Брянцева, 2003). Содержание сухого вещества (СВ) в культурах определяли весовым методом на мембранных фильтрах «Sartorius» (8 мкм). Содержание белка анализировали по методу Лоури (Lowry, 1951), общих липидов – фосфованилиновым методом в модификации (Ahlgren, Merino, 1991), углеводов – при помощи фенольного и сернокислотного реагентов (Strickland, Parsons, 1968) на КФК-3-01 «ЗОМЗ» (Россия). Пигменты из сырой биомассы экстрагировали 100 % ацетоном (Britton, 1995). Содержание ΣКР в экстрактах определяли спектрофотометрическим методом на СФ 46 (ЛОМО) по Лихтенталеру (Lichtenthaler, 1987). Фракционный состав ΣКР исследовали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках «TLC Silica gel 60» Merck (Германия) в двух системах растворителей: I - гексан-ацетон 9:1; II - гексан-бензол-ацетон 5:3,75:0,8 (Дробецкая и др., 2009). Идентификацию фракций КР проводили по химическим, спектральным и хроматографическим тестам (Britton, 1995; Rodriguez-Amaya, 2001; Britton et al., 2004; Egeland et al, 2011; JPCL «Lipid bank»).

Построение графиков и статистическую обработку данных осуществляли при помощи пакетов прикладных программ Golden Software Grapher 7 и Microsoft Excel.

В третьем разделе «Особенности вторичного каротиногенеза у кокоидных микроводорослей порядка Volvocales на примере *E. carotinos* Komárek 1989» приведены сведения, характеризующие влияние различных химических активаторов ВКРГ – ацетата натрия (NaAc), хлорида натрия (NaCl) и смеси сульфата железа II и пероксида водорода (Fe^{2+} и H_2O_2) на динамику численности и размеров клеток, содержание пигментов, СВ и его основных компонентов в культурах, клетках и биомассе *E. carotinos* на «красной» стадии двухстадийной накопительной культуры. Работе предшествовал предварительный

эксперимент по введению в культуру коллекционного штамма АСКУ 573-06, длительно хранившегося на агаризованных средах и ранее не культивировавшегося в лабораторных условиях. При исследовании особенностей автотрофного роста *E. carotinos* на различных питательных средах была отмечена высокая фенотипическая и функциональная гетерогенность лабораторных культур этого вида, определяющаяся характером деления клеток. Показано, что в культуре эттли размножается одновременно при помощи двухжгутиковых зооспор (чаще всего по 8-16 в зооспорангии) и апланоспор. В последнем случае из материнской клетки образуются 2-6 или 1 апланоспора. Это определяет значительную вариабельность линейных размеров ($L = 4-15$ мкм; $D = 3-14$ мкм) и объёмов клеток ($V = 27-1340$ мкм³). Ещё одна особенность вида, отмеченная и другими авторами (Orosa et al., 2001), состоит в том, что в культурах этой водоросли всегда (даже при достаточном содержании элементов питания в среде) присутствуют вегетативные клетки, содержащие АСТ, в то время как у других продуцентов АСТ вторичные каротиноиды в клетках появляются только при ухудшении условий среды.

Основу культуры, полученной в конце «зелёной» стадии при выращивании водоросли на полуторной по N и P среде ОНМ, составляли агрегированные в скопления или одиночные зелёные клетки среднего размера ($V = 268-576$ мкм³) с узким красным кольцом ККР вокруг ядра. Доля таких клеток в общем числе составляла 49%. Около 20% приходилось на крупные делящиеся клетки с формирующимися в них зоо- и апланоспорами ($V = 700-1125$ мкм³). Кроме того, в культуре присутствовали двухжгутиковые грушевидные зооспоры ($L = 5,6-16$ мкм), мелкие шаровидные клетки (недавно осевшие зооспоры) ($V = 30-60$ мкм³), молодые растущие вегетативные клетки ($L = 6-8$ мкм), а также немногочисленные крупные зрелые апланоспоры, полностью окрашенные ККР в красный цвет ($V = 700-900$ мкм³). Такая неоднородность популяции и в частности наличие в ней значительного резерва вегетативных клеток, способных быстро перейти к делению, и определила характер адаптивной реакции водоросли на резкое изменение комплекса ключевых факторов внешней среды на «красной» стадии культивирования. Численность клеток во всех культурах не только не снизилась, как это регистрировалось в сходных экспериментах с *H. phuvialis* и эдафотрофными видами из других порядков (Минюк и др., 2007; Чубчикова, 2009), но и существенно увеличилась к концу «красной стадии» (рис. 1А). На протяжении 1-3-х суток клетки эттли размножались как зооспорами, так и апланоспорами. В последующем при углублении дефицита питания наблюдалось только деление с образованием апланоспор. При этом ВКР, содержащиеся в материнских клетках, равномерно распределялись между дочерними клетками, в зооспорах они концентрировались преимущественно в апикальной части вблизи жгутиков, в апланоспорах были локализованы в виде красного кольца в перинуклеарной зоне или равномерно распределялись по всему объёму клетки. Несмотря на положительную динамику численности клеток в присутствии активаторов ВКРГ, все они угнетали спорогенез, и плотность культур в вариантах с добавками химических стрессоров была ниже, чем в контроле.

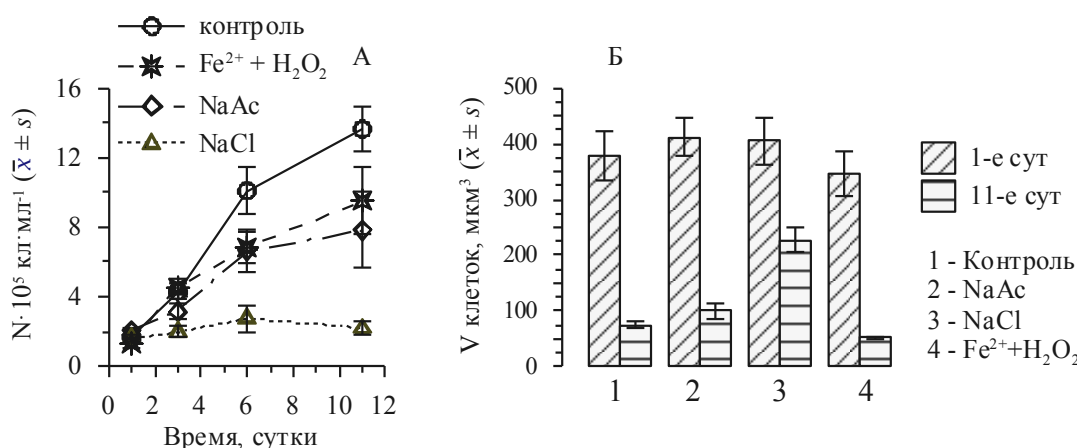


Рис. 1 Численность (А) и размеры клеток (Б) *E. carotinosa* на «красной» стадии культивирования в зависимости от химической природы активаторов вторичного каротиногенеза

Наиболее ярко это проявилось в культурах, подвергнутых солевому стрессу, где активизация деления была отмечена только на 6-е сутки, когда все клетки были уже красными. Характерной особенностью этих культур было отсутствие размножения зооспорами и более высокая степень агрегации клеток в скопления.

Активная споруляция, продолжавшаяся в течение всей «красной» стадии, привела к существенному уменьшению размеров клеток во всех вариантах эксперимента (в 1,8 – 6,8 раза). На 11-е сут самыми мелкими были апланоспоры в культурах, стрессированных с добавлением в среду смеси $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ (только 4,6 % клеток имели объём выше 80 мкм³), в то время как в условиях солевого стресса таких клеток было 86 %, причём их средний объём из-за ингибирования деления был в 2,3-4,4 раза выше, чем в других вариантах (рис. 1Б).

Наличие в клетках исходной культуры ВКР, т.е. уже запущенного механизма трансляции генов биосинтеза АСТ, определили быстрый метаболический ответ клеток этлии на комплексное стресс-воздействие – уже через 3-4 ч все культуры приобрели бурый оттенок. Раньше других изменение окраски было отмечено в варианте с добавлением смеси Fe^{2+} и H_2O_2 . В конце «красной стадии» содержание $\Sigma\text{КР}$ ($37,34 \pm 0,34 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) (рис. 2А), их массовая доля в СВ ($2,09 \pm 0,05 \%$) (рис. 2 Б) и среднесуточный выход из литра исходной культуры ($9,04 \pm 0,10 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$) (рис. 2В) здесь были такими же высокими, как и в контроле (во всех случаях $P > 0,05$), хотя плотность культуры (кл·мл⁻¹) на завершающей стадии эксперимента была приблизительно в 1,4 раза ниже (рис. 1А).

Для сравнительной оценки интенсивности ВКРГ, как правило, анализируют характер динамики и скорость накопления $\Sigma\text{КР}$ в расчёте на клетку. Однако результаты, полученные при работе с *E. carotinosa*, свидетельствуют о том, что необходимо учитывать изменение размеров клеток в зависимости от стадии клеточного цикла и характера стресс-воздействия, т.е. более корректно оценивать интенсивность ВКРГ по изменению содержания пигментов в единице объёма (мкм³) клетки. Использование такого способа выражения концентрации

показывает, что уровень КР в клетках контроля вырос по отношению к начальному более чем на 400 % и максимальная интенсивность ВКРГ наблюдалось не при повышенной солёности, как это вытекает из рис. 3А, а при включении в стресс-комплекс химических промоторов ПОЛ - смеси Fe^{2+} и H_2O_2 (рис. 3Б, В).

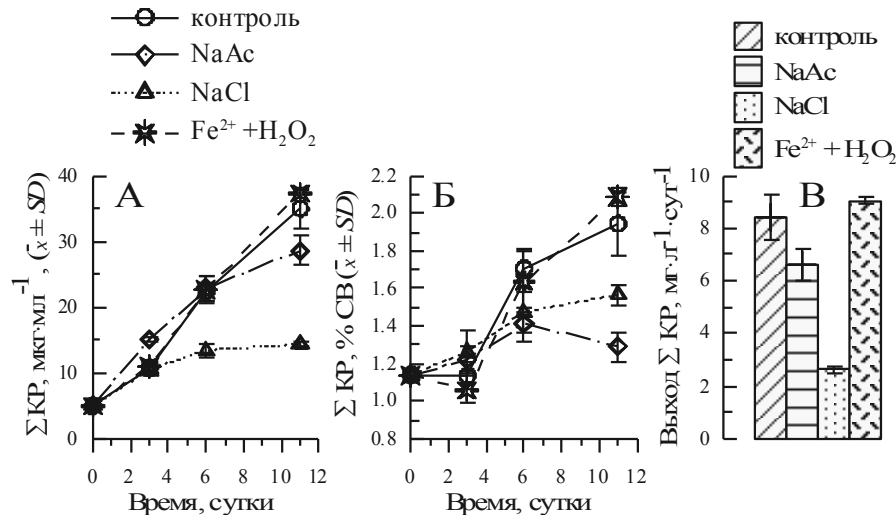


Рис. 2 Динамика содержания суммарных каротиноидов в культурах (А) и сухой биомассе (Б) *Ectliia carotinosa* и среднесуточный выход каротиноидов (В) в зависимости от химической природы стресс-агентов

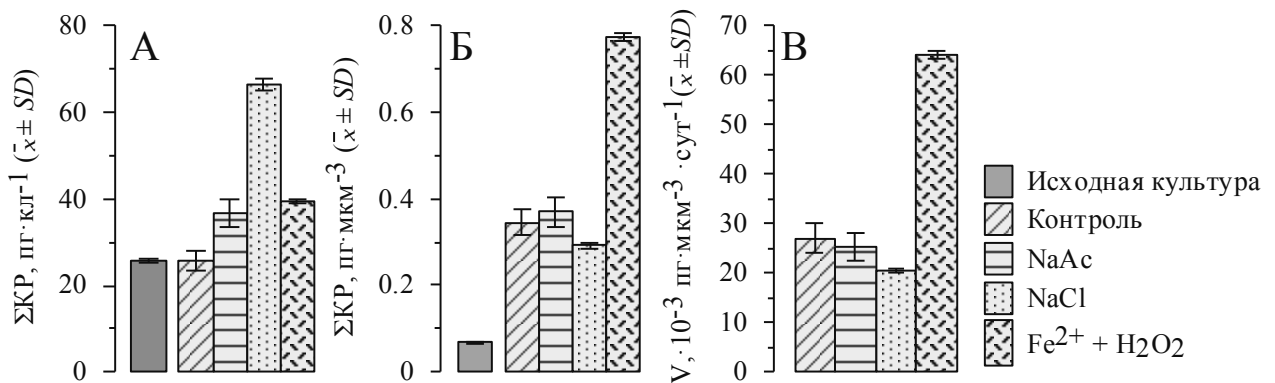


Рис. 3. Содержание суммарных каротиноидов в расчёте на клетку (А) и мкм³ объёма клетки (Б) в начале и конце «красной» стадии и средняя скорость накопления пигментов (В) в зависимости от природы химических стресс-агентов

Средняя скорость накопления $\Sigma\text{КР}$ в единице объёма клетки $(63,9 \pm 1,0) \cdot 10^{-3}$ пг·мкм⁻³·сут⁻¹) при действии на них смеси $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ была в 2,5 раза выше, чем в контроле. Выход $\Sigma\text{КР}$ из литра исходной культуры, являющийся результирующей скорости деления и скорости биосинтеза пигментов в клетках, в обоих вариантах был сходным и составлял соответственно $8,4 \pm 0,9$ и $9,0 \pm 0,1$ мг·л⁻¹·сут⁻¹ (рис. 2В). При внесении NaAc до конечной концентрации 50 мМ и NaCl до 200 мМ усиления биосинтеза ВКР по сравнению с

контролем не наблюдалось. По мере формирования покоящихся стадий клеточного цикла состав КР существенно менялся – относительное содержание ПКР неуклонно снижалось (рис. 4Д, Е), а доля ВКР увеличилась до 85-95% от Σ КР (рис. 4 А-В).

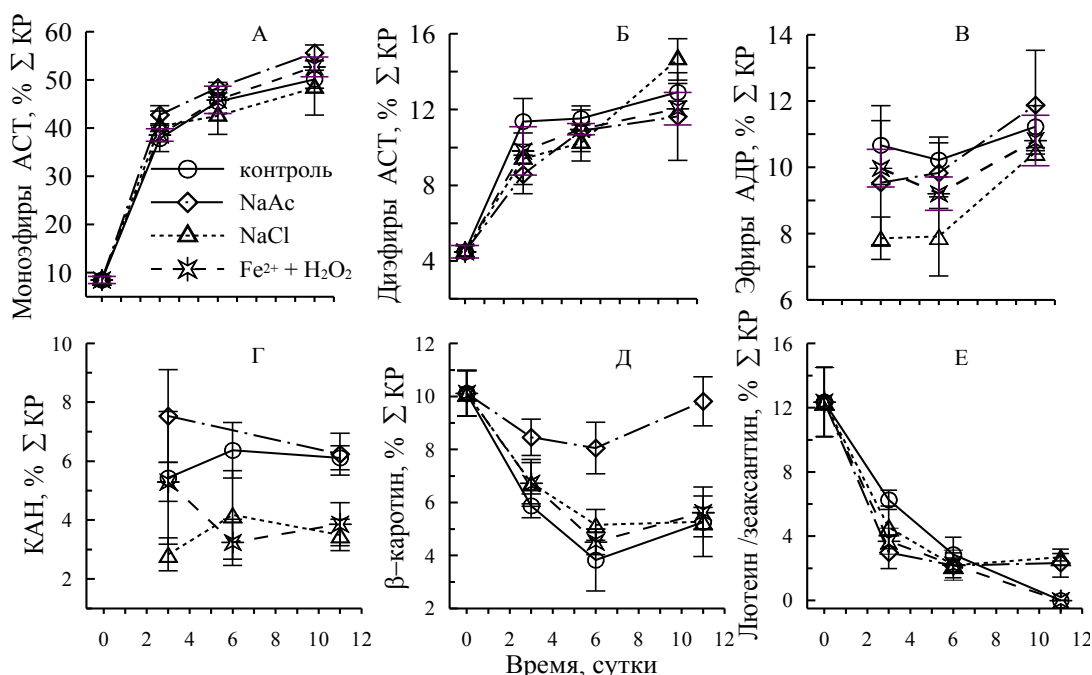


Рис. 4 Динамика содержания ($\bar{x} \pm s$) вторичных (А-Г) и первичных каротиноидов (Д, Е) в клетках *E. carotinosa* в зависимости от природы химических стресс-агентов

Анализ содержания пигментов в расчёте на клетку показывает, что в каждом из вариантов эксперимента, независимо от природы химических стресс-агентов, формирование цитоплазматического пула КР в созревающих апланоспорах этлии определяла одна фракция - моноацильные эфиры АСТ (МЭАСТ). Уже за первые 3-е суток её относительное содержание в Σ КР во всех вариантах выросло в 4,5-5,4 раза, а к окончанию эксперимента - в 5,7-6,6 раза (рис. 4а). Доля диацильных эфиров АСТ (ДЭАСТ) также росла, хотя и не так быстро. На третьи сут она увеличилась по отношению к начальному уровню в 2,3-2,5 раза, а за следующие 8 сут – всего на 13,5-15,9 % (рис. 4 Б). В результате к концу эксперимента на фоне повышения суммарной доли эстерифицированного АСТ до 63-67 % отношение ДЭАСТ/МЭАСТ во всех случаях уменьшилось примерно в 2 раза (с 0,55 до 0,2–0,3), и роль моноэфиров АСТ как ключевой фракции ВКР проявилась ещё чётче. Относительное содержание кантаксантина (КАН) на протяжении всей «красной стадии» практически не менялось и составляло 4-6 % от Σ КР. Характерной особенностью фракционного состава ВКР *E. carotinosa*, отличающей этот вид от других продуцентов АСТ, является наличие заметного количества адонирубина в форме его ацильных эфиров (10-12 % Σ КР).

Накопление ВКР в стрессированных культурах этлии сопровождалось накоплением СВ. Максимум СВ в литре культуры ($2,21 \pm 0,06$ мг·л⁻¹) отмечен в варианте с добавлением NaAc,

минимум – при повышенной солёности. В последнем случае содержание СВ за 11 сут увеличилось лишь в 2 раза, тогда как в остальных культурах – в 4-5 раз. Накопление СВ в апланоспорах *E. carotinosa*, как и у *H. pluvialis* (Минюк и др. 2007), происходило главным образом за счёт увеличения содержания углеводов и липидов. По мере созревания апланоспор относительное содержание углеводов в сухом веществе увеличилось с 23 до 37-47 %, липидов – с 18 до 28-50 %, а массовая доля белка снизилась с 40 до 7-16 %. Следует особо отметить факт интенсификации биосинтеза липидов у *E. carotinosa* при действии химических активаторов ВКРГ. В присутствии ацетата и смеси Fe^{2+} и H_2O_2 их конечная концентрация ($800\text{--}900 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$) и среднесуточный выход из литра исходной культуры (около $200 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$ с учётом её разведения при переходе на «красную» стадию) (рис. 5) превысили уровень контроля как минимум вдвое. Содержание липидов в «красной» биомассе, собранной по окончании эксперимента в этих вариантах, составило $37,9\pm 2,9$ и $50,4\pm 3,5$ % СВ, что было в 1,4-1,8 раза выше, чем в «красной» биомассе, полученной из контроля.

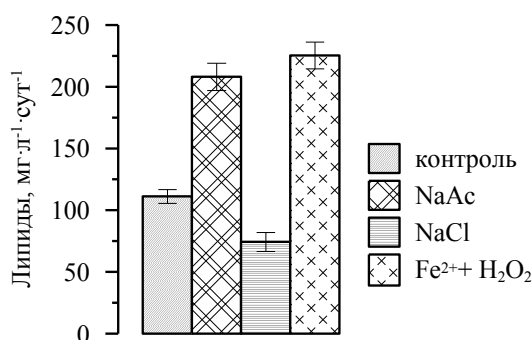


Рис. 5 Выход липидов из литра исходной культуры *E. carotinosa* в зависимости от природы химических стресс-агентов

В четвёртом разделе «Сравнительные характеристики роста и ВКРГ у микроводорослей порядка Scenedesmales в условиях двухстадийной накопительной культуры» рассматриваются морфометрические, физиолого-биохимические и продукционные характеристики планктонных и эдафофильных представителей порядка Scenedesmales из двух разных семейств: Scenedesmaceae – *S. rubescens* и *P. protococcoides* и Bracteacossaceae – *B. minor*. Основное внимание уделяется особенностям адаптации видов к условиям экспериментального стресса, индуцирующего ВКРГ. В дополнение к этому приведены сведения о динамике роста и морфофункциональных показателей водорослей на «зелёной» стадии (т.е. в периодической культуре), что представляет самостоятельный интерес для пополнения сведений о физиологии малоизученных видов Scenedesmales и дает представление о функциональном состоянии клеток в момент стресс-воздействия.

Перед выполнением основной части работы были определены нуклеотидные последовательности ядерного гена, кодирующего 18S рРНК у штаммов CALU-221 и IPPAS D-292 для подтверждения их принадлежности к порядку Scenedesmales. Для *B. minor* аналогичные данные получены ранее (Fucikova, Lewis, 2011) (рег. № в Генбанке NCBI - JF-717398.1). Полученные для штамма CALU-221 последовательности 18S рРНК длиной 1729 п.н. и штамма IPPAS D-292 длиной 1713 п.н. были добавлены к матрице

последовательностей 18S рРНК выборки зелёных водорослей, депонированных в NCBI. Установлено, что штамм CALU-221 уникален и не идентичен ни одному из секвенированных видов водорослей, представленных в базе данных NCBI. Во всех вариантах филогенетических деревьев штамм CALU-221 попадал в кладу «Coelastrella» семейства Scenedesmaceae. Показано, что штамм IPPAS D-292 *C. reinhardtii* на 100% идентичен штамму CCAP 232/1 *S. rubescens* (Dangeard) Kessler et al. 1997 (Kessler et al., 1997).

Анализируя динамику численности клеток у сценедесмальных водорослей на среде ВВМ 3N (рис. 6 А) следует отметить, что с 1-х по 12-е сут все три вида по скорости роста не различались ($\mu_{\text{ср}} = 0,18-0,19 \text{ сут}^{-1}$). На 9-10-е сут содержание азота во всех культурах приблизилось к нулю и на 14-е сут виды из семейства Scenedesmaceae прекратили рост.

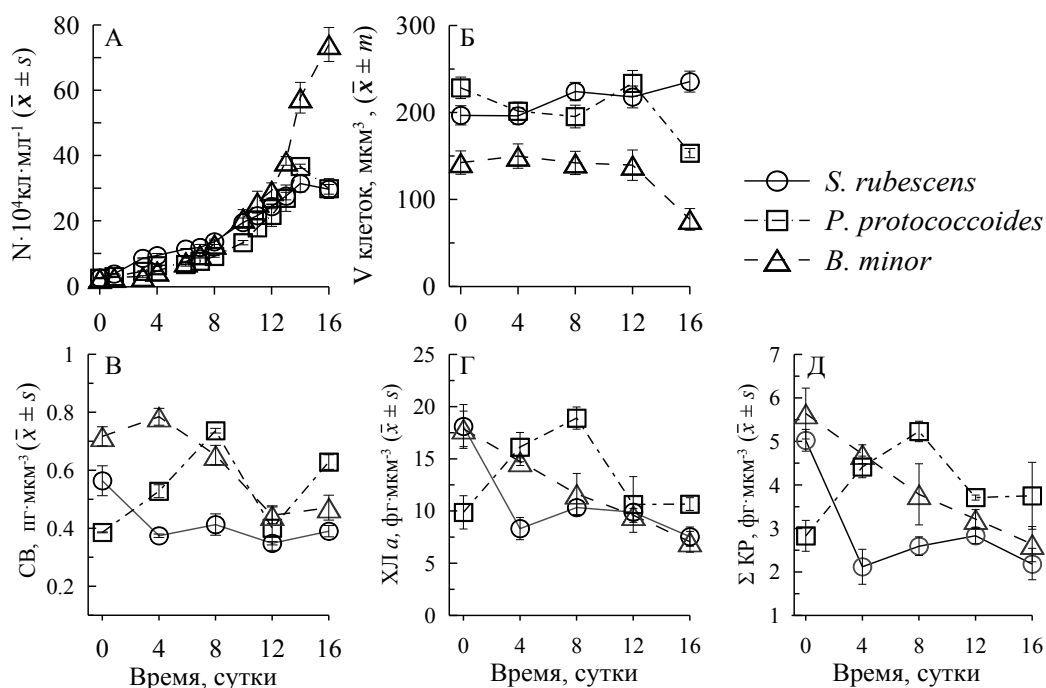


Рис. 6 Динамика численности клеток (А), средних объёмов (Б), содержания сухого вещества (В), хлорофилла а (Г) и суммарных каротиноидов (Д) в мкм^3 клеточного объёма у сценедесмальных микроводорослей на «зелёной» стадии культивирования

В то же время в культурах *B. minor* численность клеток продолжала увеличиваться ускоренными темпами ($\mu_{\text{ср}}=0,31 \text{ сут}^{-1}$) до 16-х сут. Размножение зооспорами, преобладающее у этого вида на начальной стадии роста, уступило место делению с образованием апланоспор/автоспор, что сопровождалось неуклонным снижением числа крупных зооспорангиев вплоть до их полного исчезновения на 16-е сут. Основу культуры (62%) составили мелкие клетки ($V < 80 \text{ мкм}^3$), частично агрегированные в скопления. Их средний объём уменьшился по отношению к начальному почти в 2 раза и был в 3 раза ниже, чем у *S. rubescens*, у которого на протяжении всей вегетативной стадии преобладало деление с образованием апланоспор и средний объём клеток не только не уменьшился, но даже несколько увеличился (с 197 до 236 мкм^3 , т.е. примерно в 1,2 раза) (рис. 6Б). В то же

время у эдафотрофного вида *P. protococcoides* из этого же семейства размер клеток, так же как и у *B. minor*, достоверно уменьшился в 1,5 раза ($P < 0,05$). Примечательно, что этот вид заметно отличался от двух других по направленности динамики содержания СВ, ХЛа и Σ КР в расчёте на мкм^3 . В конце «зелёной» стадии количественные характеристики этих показателей были самыми высокими.

Индукцию ВКРГ (перевод культур на «красную» стадию) проводили путём резкого изменения комплекса физико-химических параметров культивирования. Роль ключевых стресс-факторов играли более чем 20-кратный положительный градиент облучённости клеток и подострый дефицит элементов питания ($4,12 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \text{ N}$ и $5,32 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \text{ P}$). В качестве активатора ВКРГ использовали NaAc (50 мМ). Результаты, характеризующие ответную реакцию культур на стресс, представлены на рис. 7.

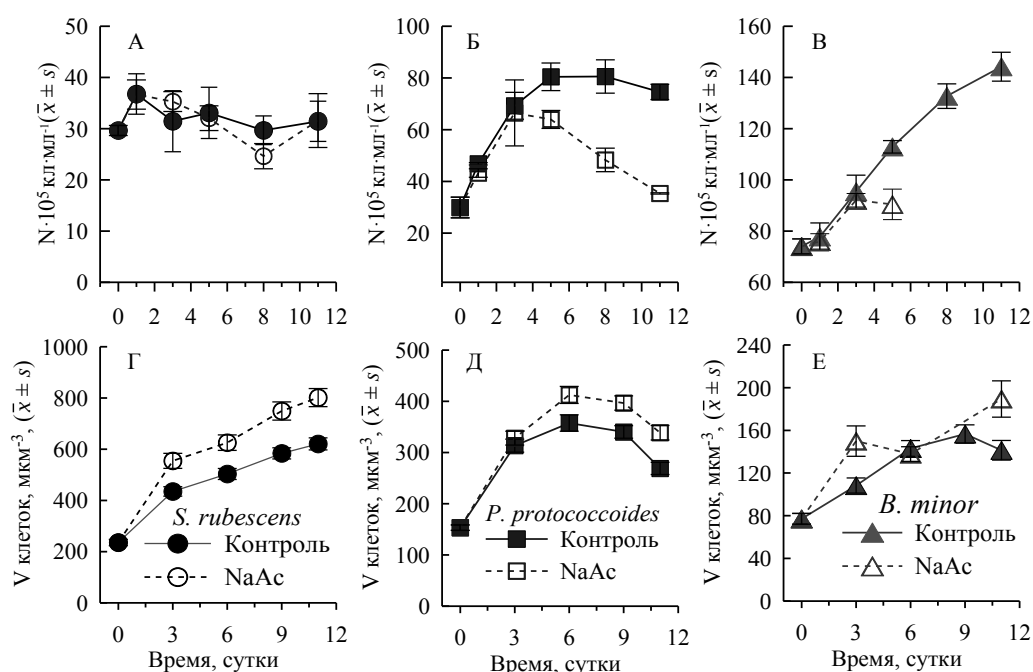


Рис. 7 Динамика численности (А-В) и объёмов (Г-Е) клеток сценедесмальных микроводорослей на «красной» стадии культивирования

Прежде всего, следует отметить общую для всех трёх видов особенность – ни в одной из контрольных культур не было отмечено массового отмирания клеток, как это наблюдалось в аналогичных условиях у *H. pluvialis* (Минюк и др., 2007), или стрессовой активизации споруляции, сопровождающейся существенным мельчанием клеток, как у *E. carotinos*. В остальном реакция сценедесмальных микроводорослей на стресс была различной. У *S. rubescens* численность клеток, как в контрольном, так и в опытном вариантах, сохранялась на исходном уровне на протяжении всего постстрессорного периода (рис. 7А). При этом в присутствии NaAc средние объёмы красных апланоспор увеличились по отношению к объёмам зелёных вегетативных клеток в 3,4 раза (с 235 до 887 мкм^3), а в контроле – только 2,6 раза (с 235 мкм^3 до 621 мкм^3) (рис. 7Г). Иная картина

наблюдалась в культурах *P. protococcoides* – ацетат вызвал гибель молодых апланоспор, образовавшихся в 1-3-и сут, в результате чего конечная численность клеток в опыте снизилась до начальной величины (рис. 7 Б). Размеры апланоспор увеличились по сравнению с исходными в 1,8-2,2 раза, причем и в этом случае отмечено достоверное стимулирующее влияние ацетата (рис. 7 Д). Наиболее яркая негативная реакция на ацетат отмечена в культурах *B. minor*. В его присутствии клетки водоросли образовывали плотные хлопьевидные скопления, которые не удавалось диспергировать даже при продувке суспензии воздушным компрессором со скоростью 9 л·мин⁻¹ (Sera 550R), что затрудняло определение численности клеток в этих вариантах. В связи с этим здесь и далее на рисунках, характеризующих постстрессорные изменения *B. minor* в расчёте на клетку и мкм³, данные для варианта «ацетат» не представлены.

Динамика содержания пигментов на «красной» стадии у исследованных нами сценедесмальных водорослей была типичной для всех продуцентов АСТ в условиях абиотического стресса. Массивное накопление ВКР в клетках происходило на фоне резкого снижения содержания ХЛа (рис. 8, 9).

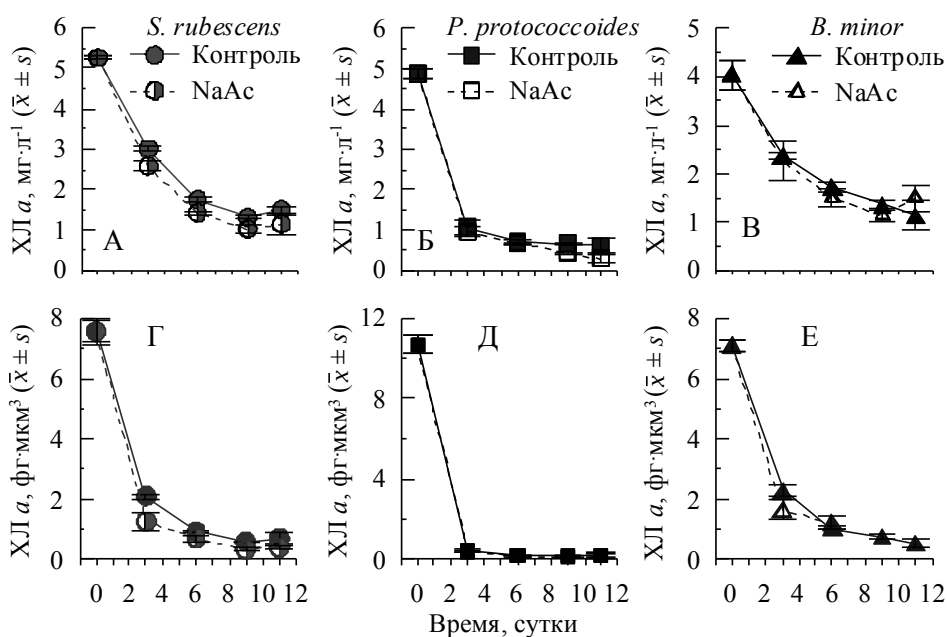


Рис. 8 Динамика содержания хлорофилла *a* в культурах (А-В) и мкм³ клеточного объёма (Г-Е) у сценедесмальных микроводорослей на «красной» стадии культивирования

Направленность изменений содержания ХЛа у всех видов при всех способах выражения его концентрации была сходной, однако по масштабам деградации пигмента лидировал *P. protococcoides*, у которого уровень ХЛа в расчёте на литр культуры снизился в 8 раз, а в расчёте на мкм³ – в 44 раза (рис. 8Б, Д). У *S. rubescens* и *B. minor* аналогичные изменения были менее масштабными – содержание ХЛа в культурах сократилось в 3,5 и 3,6 раза, в расчёте на мкм³ – в 10,6 и 12,8 раза. В качестве специфических характеристик

реакции *Scenedesmales* на индукцию ВКРГ следует отметить: а) беспрецедентно низкие величины массовой доли Хла в СВ в конце «красной» стадии (0,03-0,09 % СВ) и б) отсутствие выраженного негативного влияния ацетата на динамику содержания ХЛа.

Анализ динамики содержания Σ КР в культурах и клетках *Scenedesmales*, показывает, что и в этом случае *P. protococcoides* существенно отличался от двух других видов (рис. 9).

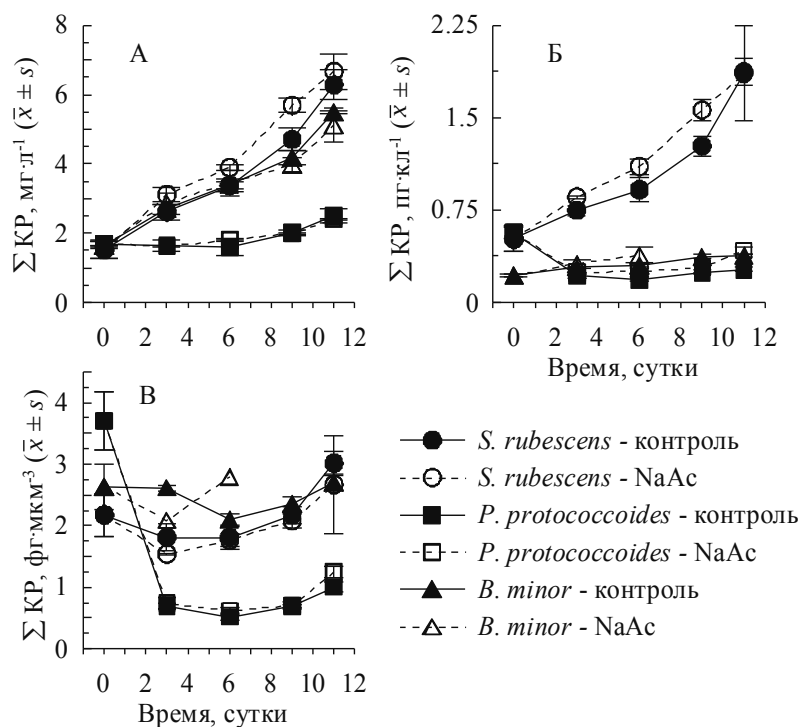


Рис. 9 Динамика содержания суммарных каротиноидов в культурах (А), клетках (В) и единицу клеточного объёма (В) у сценедесмальных микроводорослей на «красной» стадии

Средняя продуктивность (P_{cp}) его культур по Σ КР (0,06-0,07 мг·л⁻¹·сут⁻¹) на «красной» стадии в контроле была ниже, чем у близкородственного *S. rubescens* (0,43-0,48 мг·л⁻¹·сут⁻¹) в 5,8 раз, в варианте «ацетат» - в 7,4 раза. Сопоставление данных по содержанию Σ КР с динамикой численности и размеров клеток на «красной» стадии показывает, что в культурах *S. rubescens* пул Σ КР формировался, главным образом, за счёт 3-4-кратного увеличения размеров апланоспор, так как содержание Σ КР в мкм³ клетки заметно увеличилось лишь на 9-11-е сут, а число клеток на стадии ВКРГ практически не менялось. В контрольных культурах *B. minor* конечный уровень Σ КР определялся, в основном, 2-кратным увеличением числа и размеров клеток, так как и у этого вида объёмное содержание пигментов росло незначительно.

Наименее выраженная картина ВКРГ *P. protococcoides* – всего лишь полуторное возрастание уровня Σ КР в культурах – была, по всей вероятности, опосредована преобладанием скорости деградации ПКР над скоростью накопления ВКР. На это указывает резкое падение в стрессированных клетках содержания Σ КР в мкм³ в 1-3-е сут (рис. 9Б) и достоверно более низкий уровень каротиноидов в культурах (в 2,6-4 раза) на

протяжении всей «красной» стадии (рис. 9А). Теоретический выход Σ КР из литры исходной культуры с начальной численностью клеток $(2,0-2,2) \cdot 10^6$ кл·мл⁻¹ у *S. rubescens* составил $1,76 \pm 0,02$ в контроле и $1,93 \pm 0,21$ мг·л⁻¹·сут⁻¹ в варианте NaAc, у *B. minor* - соответственно $1,43 \pm 0,01$ и $1,29 \pm 0,21$ мг·л⁻¹·сут⁻¹, что сопоставимо с выходом у других водорослей этого же порядка - *B. giganteus* и *S. rubescens* (Чубчикова и др, 2010, 2011). В то же время у *P. protococcoides* аналогичные показатели не превышали $0,31$ мг·л⁻¹·сут⁻¹.

К специфическим чертам исследованных видов Scenedesmales следует отнести более широкий, чем у представителей порядка Volvocales *H. pluvialis* и *E. carotinosus*, спектр ВКР, включающий в себя полный набор интермедиатов биосинтеза АСТ (табл. 1).

Таблица 1

Фракционный состав каротиноидов в клетках микроводорослей в конце «красной» стадии (% от суммы КР, $\bar{x} \pm s$)

Наименование фракции каротиноидов	<i>S. rubescens</i>	<i>P. protococcoides</i>	<i>B. minor</i>
	контроль/NaAc	контроль/NaAc	контроль/NaAc
Моноэфиры астаксантина	$10,42 \pm 0,35$ / $7,89 \pm 0,67$	$32,61 \pm 3,36$ / $30,58 \pm 2,70$	$5,17 \pm 1,38$ / $9,16 \pm 1,20$
Диэфиры астаксантина	следы/ следы	$7,00 \pm 2,25$ / $4,02 \pm 0,38$	$42,34 \pm 2,81$ / $38,74 \pm 3,85$
Моноэфиры адониксантина	$8,53 \pm 1,02$ / $4,99 \pm 0,24$	$2,48 \pm 0,96$ / $0,72 \pm 0,16$	$15,81 \pm 1,17$ / $17,51 \pm 0,90$
Эфиры адонирубина	следы/ следы	следы/ следы	$5,28 \pm 1,53$ / $6,7 \pm 0,36$
Сумма свободных форм астаксантина и адониксантина	$23,62 \pm 2,32$ / $31,81 \pm 0,84$	$25,50 \pm 4,43$ / $23,57 \pm 2,35$	следы/ следы
Кантаксантин	$14,22 \pm 1,13$ / $8,99 \pm 1,04$	$12,60 \pm 1,04$ / $17,08 \pm 2,46$	$13,15 \pm 0,66$ / $11,51 \pm 0,98$
β- каротин	$30,57 \pm 0,64$ / $34,00 \pm 1,44$	$2,68 \pm 0,50$ / $2,37 \pm 0,41$	$3,98 \pm 0,64$ / $3,57 \pm 0,58$
Сумма полярных ксантофиллов	следы/ следы	$17,16 \pm 3,41$ / $21,66 \pm 1,39$	следы/ следы
Сумма кетокаротиноидов	$64,51 \pm 5,65$ / $62,27 \pm 3,37$	$79,37 \pm 5,55$ / $75,96 \pm 1,57$	$93,31 \pm 4,68$ / $91,10 \pm 1,97$

В заданных экспериментальных условиях их суммарное относительное содержание в «красных» спорах Scenedesmales достигало 50-75 % от содержания общих КР, из которых от 9 до 17 % приходилось на дикетокаротиноид кантаксантин (β,β-каротин-4,4'-дион). Качественный состав ВКР у всех трёх микроводорослей был идентичен, однако доля отдельных фракций в сумме КР существенно различалась даже у представителей одного и того же семейства. Единственной общей особенностью водорослей семейства

Scenedesmaceae, отличающей их от *B. minor* (Bracteacoccaceae), является неординарно высокое относительное содержание свободных форм астаксантина и адониксантина (23,6-31,8 % от суммы), достоверно увеличивающееся в присутствии ацетата. В количественном отношении фракционный состав КР в конце «красной» стадии у каждого из видов характеризовался одним или несколькими специфическими признаками, несвойственными другим объектам исследования. Так, *S. rubescens* от других водорослей отличало неожиданно высокое для продуцентов АСТ содержание β -каротина (30,6-34,0 % Σ КР). *P. protococcoides* характеризовался высоким содержанием полярных ксантофиллов (17,2-21,6 % Σ КР), *B. minor* – преимущественным запасанием АСТ в форме диацильных эфиров. На «красной» стадии культивирования продуктивность Scenedesmales по суммарным КР не связана напрямую с относительным содержанием АСТ в общем пуле накопленных КР. У наиболее продуктивного по Σ КР *S. rubescens* доля всех форм АСТ в Σ КР была почти в два раза ниже, чем у наименее продуктивного *P. protococcoides*. Максимальный среди трёх видов выход АСТ из литра исходной культуры с начальной численностью клеток $(2,3-2,4) \cdot 10^6$ кл·мл⁻¹, отмеченный у *B. minor*, составил $0,64 \pm 0,06$ мг·л⁻¹·сут⁻¹.

ВКРГ у сценедесмальных видов, как и у других продуцентов АСТ, тесно сопряжен с увеличением содержания СВ в клетках при их переходе из вегетативного состояния в стадию покоя. Линейная зависимость между содержанием СВ и Σ КР в культурах имеет высокий коэффициент корреляции ($r=0,975-0,991$) и может быть использована для косвенной оценки содержания Σ КР на «красной» стадии. При этом состав СВ претерпевал типичные для продуцентов АСТ изменения. Содержание липидов и углеводов в клетках существенно увеличивалось, в то время как содержание белка снижалось (рис 10).

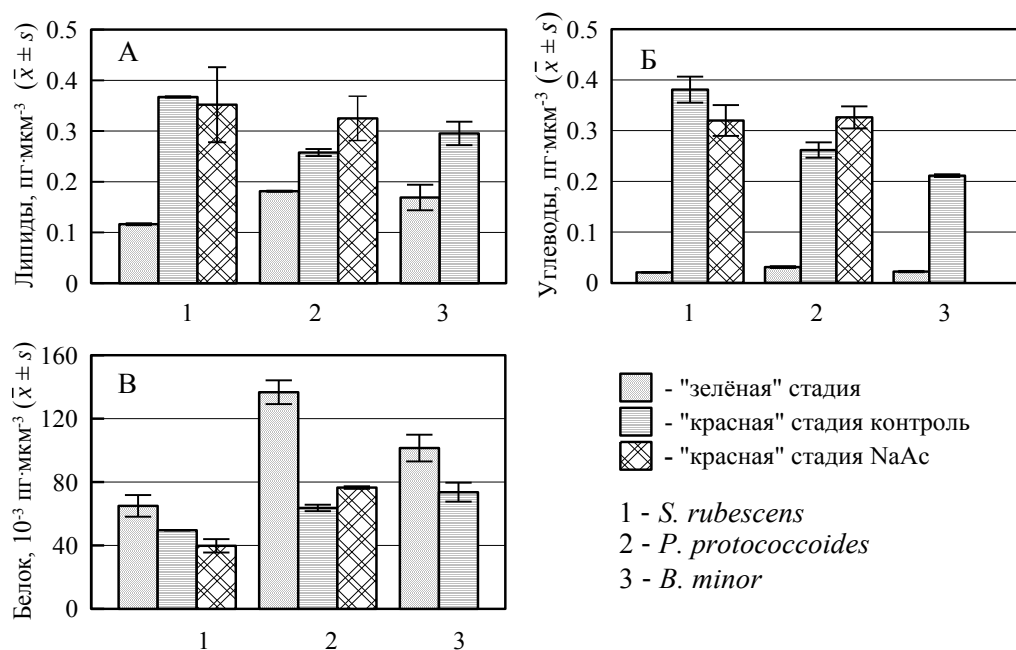


Рис. 10 Содержание основных компонентов сухого вещества в конце «зелёной» и «красной» стадий у различных видов Scenedesmales

Теоретический выход липидов из литра исходной суспензии клеток с начальной численностью $(2,3-2,4) \cdot 10^6$ кл·мл⁻¹, с учётом 10-кратного разведения «зелёной» культуры при переходе на «красную» стадию, составил у *S. rubescens* 253-329, у *P. protococcoides* – 208-201, у *B. minor* – 187-202 мг·л⁻¹·сут⁻¹. По этому признаку все исследованные виды Scenedesmales могут составить конкуренцию морским микроводорослям, рекомендуемым для производства биотоплива (Carlsson, 2007; Peng, 2012). Примечательно, что по процентному содержанию липидов в биомассе наименее продуктивный вид *B. minor* существенно превосходил наиболее продуктивный *S. rubescens*, что объясняется меньшей скоростью накопления СВ в клетках брактеакоккуса. Так, в варианте «ацетат» массовая доля липидов у *B. minor* ($64,45 \pm 4,12$ % СВ) была достоверно выше (на 25,7 %), чем у *S. rubescens* ($47,91 \pm 1,35$ % СВ). Это обстоятельство следует учитывать при анализе данных о перспективности различного рода растительного сырья для получения биотоплива.

Многократный прирост уровня углеводов в культурах и клетках водорослей (рис. 10Б), по всей вероятности, связан не только с запасанием энергетических резервов, но и с утолщением клеточных оболочек и образованием вокруг стрессированных клеток слизистых обёрток (Андреева, 1998). Содержание белка в культурах всех трёх водорослей к концу «красной» стадии уменьшилось, по сравнению с её началом, примерно в 4 раза, а его массовая доля в СВ сократилась с 17-23 до 5-13 %. В то же время в расчёте на мкм³ клеточного объёма масштаб потерь был заметно ниже (рис. 10В).

ВЫВОДЫ

Результаты работы дополняют современные представления об особенностях вторичного каротиногенеза у зелёных микроводорослей сведениями о 4-х ранее не исследовавшихся в данном аспекте видах, представляющих два массовых, эволюционно удаленных порядка Chlorophyceae – Volvocales и Scenedesmales.

1. Впервые определена последовательность нуклеотидов в маркерном ядерном гене 18S рРНК у двух видов микроводорослей, на основании чего изменён таксономический статус штамма IPPAS D-292 с *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard 1988 на *Scenedesmus rubescens* Kessler et al. 1997 и на молекулярно-генетическом уровне подтверждён статус *Pseudospongiococcum protococcoides* (штамм CALU-221).

2. К общим эколого-физиологическим характеристикам исследованных видов в условиях экспериментально индуцированного ВКРГ следует отнести:

- высокую устойчивость к использованным моделям абиотического стресса;
- противоположную направленность динамики содержания фотосинтетических пигментов и вторичных каротиноидов в формирующихся спорах;
- тесное сопряжение процессов накопления вторичных каротиноидов и сухого вещества и характерные изменения его состава – увеличение массовой доли общих липидов и углеводов на фоне снижения содержания белка;
- технологически значимый выход липидов из литра исходной культуры (187-329 мг·л⁻¹·сут⁻¹).

3. Видовые особенности ВКРГ у *E. carotinos* (Volvocales) опосредованы высокой фенотипической и функциональной гетерогенностью вегетативных клеток и постоянным присутствием в них некоторого количества кетокаротиноидов. К специфическим чертам адаптивного ответа водоросли на стресс-индукцию ВКРГ относятся:

- максимально быстрая из всех исследованных видов метаболическая реакция на стресс, наиболее выраженная при действии смеси $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$;
- активный спорогенез на протяжении всей «красной» стадии, приводящий к уменьшению средних объёмов клеток в 1,8-6,8 раза;
- определяющая роль моноэфиров АСТ в формировании общего пула ВКР;
- наличие в составе ВКР эфиров адонирубина (10-12 % от суммы КР);

4. Характерными чертами стресс-реакции водорослей порядка Scenedesmales являются:

- существенное увеличение объёмов клеток (в 2-3,5 раза), наиболее выраженное в присутствии ацетата натрия;
- полный набор интермедиатов биосинтеза астаксантина, в сумме составляющих 50-75 % от $\sum \text{КР}$, из которых от 9 до 17 % приходится на кантаксантин;
- наличие у каждого вида специфических черт ВКРГ, не свойственных другим объектам исследования: необычно высокое для продуцентов АСТ содержание β -каротина у *S. rubescens* (30,6-34,0 % от $\sum \text{КР}$); высокая доля полярных ксантофиллов у *P. protococcoides* (17,2-21,6 % от $\sum \text{КР}$); преимущественное запасание АСТ в форме диацильных эфиров у *B. minor* (38,7-42,3% $\sum \text{КР}$); аномально высокое содержание (23,6-31,8 % от суммы) свободных форм АСТ и АДК у водорослей семейства Scenedesmaceae.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК

1. Челебиева Э.С. Скрининг одноклеточных зелёных водорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов 3. Введение в лабораторную культуру и первичная оценка биотехнологического потенциала зелёной микроводоросли *Ettlia carotinos* Komárek 1989 / Э. С. Челебиева // Морск. экол. журн. – 2011. – Отд. вып. № 2 . – С. 96 - 102.

2. Физиолого-биохимические характеристики микроводоросли *Ettlia carotinos* Komarek 1989 (Chlorophyceae) в условиях экспериментального стресса / Э. С. Челебиева, Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова // Морск. экол. журн. – 2013. – Т. XII, №. 2. – С. 78 – 87.

3. Динамика химического состава *Ettlia carotinos* Komarek 1989 (Chlorophyceae) при экспериментальной индукции вторичного каротиногенеза / Э. С. Челебиева, Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова // Морск. экол. журн. – 2013. – Т. XII, №. 3. – С. 75 – 87.

4. Челебієва Е.С. Особливості вторинного каротиногенезу у зеленої мікроводорості *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler et al. в умовах двохстадійної накопичувальної культури / Е. С. Челебієва, Г. С. Мінюк, І. М. Чубчикова // Вчені записки ТНУ. Серія

«Біологія, хімія». - 2013. – Т. 26 (65), № 4. – С. 175 – 187.

5. Челебієва Е.С. Морфологічні та молекулярно-філогенетичні дослідження *Scenedesmus rubescens* (Chlorophyta) / Е. С. Челебієва, С. В. Скребовська // Вчені записки ТНУ. Серія «Біологія, хімія». - 2013. – Т. 26 (65), № 2. – С. 189 – 196.

6. Челебієва Е.С. Місце в системі Chlorophyta одноклітинної автоспороутворюючої водорості *Pseudospongiococcum protococcoides* / Е. С. Челебієва, С. В. Скребовська // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2013. – Вип. 62. – С. 75 – 81.

7. Скрининг зелёных микроводорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. Актуальность, стратегия и тактика исследований / Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова, Н. В. Данцюк, Э. С. Челебиева // Экология моря. – 2010. – Вып. 80. – С. 67 – 78.

8. Скрининг одноклеточных зелёных водорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. 2. Особенности роста и вторичного каротиногенеза у представителей рода *Bracteacoccus* (Chlorophyceae) / И. Н. Чубчикова, И. В. Дробецкая, Г. С. Минюк, Н. В. Данцюк, Э. С. Челебиева // Морск. экол. журн. – 2011. – Т. 10, № 1 – С. 91 – 97.

Материалы и тезисы конференций:

9. Челебиева Э.С. Особенности роста и вторичного каротиногенеза у зелёной микроводоросли *Ettlia carotinos* / Э. С. Челебиева // VII Международная научно-практическая конференция молодых ученых по проблемам водных экосистем «Pontus Euxinus – 2011», посвящённая 140-летию Института биологии южных морей Национальной академии наук Украины (Севастополь, 24-27 мая 2011 г.) – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2011. – С. 252 – 254.

10. Чубчикова И.Н. Особенности вторичного каротиногенеза у зелёных микроводорослей рода *Bracteacoccus* Терег в условиях экспериментального стресса / И. Н. Чубчикова, Э. С. Челебиева // XIII з'їзд Українського ботанічного товариства (Львів, 19-23 вересня 2011 р.). – Львів, 2011. – С. 338.

11. Минюк Г.С. Вторичный каротиногенез як механізм адаптації микроводорослей до екстремальних умов зовнішнього середовища / Г. С. Минюк, І. В. Дробецька, І. М. Чубчикова, Н. В. Данцюк, Е. С. Челебієва // XIII з'їзд Українського ботанічного товариства (Львів, 19-23 вересня 2011 р.). – Львів, 2011. – С. 309.

12. Минюк Г. С. Опыт исследования зелёных микроводорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов / Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова, Н. В. Данцюк, Э. С. Челебиева // Международная научная конференция "Каразинские естественнонаучные студии" (Харьков, 1-4 февраля 2011 г.). – Харьков, 2011. – С. 258 – 260.

13. Влияние химических активаторов вторичного каротиногенеза на физиолого-биохимические характеристики зелёной микроводоросли *Ettlia carotinos* Komárek 1989 / Э. С. Челебиева, Г. С. Минюк, И. В. Дробецкая, И. Н. Чубчикова. // Актуальные проблемы современной альгологии: Тезисы докладов IV Международной конференции (Киев, 23-25

мая 2012 г.). – Киев, 2012. – С. 324.

14. Челебиева Э.С. Динамика физиолого-биохимических характеристик зелёных микроводорослей в условиях экспериментальной индукции вторичного каротиногенеза / Э. С. Челебиева // Наукові, прикладні та освітні аспекти фізіології, генетики, біотехнології рослин і мікроорганізмів: Матеріали XII конференції молодих вчених (Київ, 15-16 листопада 2012 р.). – Київ, 2012. – С. 165 – 166.

15. Chelebieva E. S. Features of secondary carotinogenesis in green microalgae *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler et al. / E. S. Chelebieva / Міжнародна конференція молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології» (Щолкіне, 18-22 червня 2013). – К.: Фітосоціоцентр, 2013. – С. 32 – 33.

16. Skrebovska S. V. *Pseudospongiococcum protococcoides* position detection in the system Chlorophyta / S. V. Skrebovska, E. S. Chelebieva // Міжнародна конференція молодих учених «Актуальні проблеми ботаніки та екології» (Щолкіне, 18-22 червня 2013). – К.: Фітосоціоцентр, 2013. – С. 61 – 62.

17. Скребовська С. В. Видова ідентифікація штаму (IPPAS D-292) із використанням молекулярно-генетичних методів дослідження / С. В. Скребовська, Е. С. Челебієва // IX Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів приурочена до 150-річчя від дня народження академіка В. Вернадського (Львів, 16-19 квітня 2013 р.) – Львів, 2013. – С. 139 – 140.

18. Chlelebieva E. S. Features of secondary carotenogenesis in a green microalgae family Scenedesmaceae / E. S. Chlelebieva, G. S. Minyuk, I. N. Chubchikova // Conference abstract book International scientific conference in memoriam of the 80th anniversary of professor Mikhail V. Gusev "Physiology and biotechnology of oxygenic photoautotrophic microorganisms: looking into the future (Moscow, 27th-30th of May 2014). – Moscow, 2014. – P. 36 – 37.

АННОТАЦИЯ

Челебиева Э.С. Особенности вторичного каротиногенеза у зелёных микроводорослей. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.10 – гидробиология. – Институт биологии южных морей им А.О. Ковалевского, Севастополь, 2014.

Получены новые данные, характеризующие динамику морфометрических и физиолого-биохимических характеристик вторичного каротиногенеза (ВКРГ) и сопряжённых с ним физиологических процессов у 4 видов микроводорослей из двух массовых, эволюционно удалённых порядков Chlorophyceae – Volvocales (*Ettlia carotinsa*) и Scenedesmales Kostikov (*Scenedesmus rubescens*, *Pseudospongiococcum protococcoides* и *Bracteacoccus minor*) при различных моделях абиотического стресса. Показано, что ВКРГ у всех микроводорослей, независимо от их таксономического и экологического статуса, характеризуется рядом общих черт, а именно: высокая устойчивость клеток к стрессу; противоположная направленность динамики содержания фотосинтетических пигментов и вторичных каротиноидов (ВКР) в формирующихся спорах; тесное сопряжение процессов

накопления ВКР и сухого вещества и характерные изменения его состава – увеличение массовой доли общих липидов и углеводов на фоне снижения содержания белка; технологически значимый выход липидов $187\text{--}329 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$. К специфическим чертам адаптивного ответа *E. carotinosa* на стресс-индукцию ВКРГ относятся: активный спорогенез, уменьшение средних объёмов клеток в 1,8–6,8 раза; более высокая, чем у сценедесмальных видов, объёмная скорость накопления суммарных каротиноидов ($\Sigma\text{КР}$) с максимумом в варианте $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ ($63,9 \cdot 10^{-3} \text{ пг} \cdot \text{мкм}^{-3} \cdot \text{сут}^{-1}$); определяющая роль моноэфиров астаксантина (АСТ) в формировании цитоплазматического пула ВКР; наличие в их составе эфиров адонирубина (10–12 % от $\Sigma\text{КР}$). К характерным особенностям стресс-реакции *Scenedesmales* относятся: существенное увеличение объёмов клеток (в 2,0–3,5 раза), наличие полного набора интермедиатов биосинтеза АСТ (50–75 % от $\Sigma\text{КР}$), значительное количество кантаксантина (9–17 % от $\Sigma\text{КР}$). Кроме того, у каждого из видов фракционный состав ВКР характеризовался одним или несколькими отличительными признаками: необычно высокое для продуцентов АСТ содержание β -каротина у *S. rubescens* (30,6–34,0 % от $\Sigma\text{КР}$); высокая доля первичных ксантофиллов у *P. protococcoides* (17,2–21,6 % от $\Sigma\text{КР}$); преимущественное запасание АСТ в форме диацильных эфиров у *B. minor* (38,7–42,3% $\Sigma\text{КР}$); аномально высокое содержание (23,6–31,8 % от суммы) свободных форм АСТ и адониксантина у *S. rubescens* и *P. protococcoides*.

Ключевые слова: зелёные микроводоросли, модельный абиотический стресс, морфофизиологические адаптации, вторичный каротиногенез, кетокаротиноиды, астаксантин.

АНОТАЦІЯ

Челебієва Е.С. Особливості вторинного каротиногенезу у зелених мікроводоростей. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.02.10 - гідробіологія. - Інститут біології південних морів ім. А.О. Ковалевського, Севастополь, 2014.

Отримані нові дані, що характеризують динаміку морфометричних і фізіолого-біохімічних характеристик вторинного каротиногенезу (ВКРГ) і сполучених з ним фізіологічних процесів у 4-х видів мікроводоростей з двох масових, еволюційно віддалених порядків Chlorophyceae – Volvocales (*Ettlia carotinosa*) і Scenedesmales Kostikov (*Scenedesmus rubescens*, *Pseudospongiococcum protococcoides* і *Bracteacoccus minor*) при різних моделях абиотичного стресу. Показано, що у всіх мікроводоростей, незалежно від їх таксономічного та екологічного статусу, ВКРГ характеризується рядом спільних рис, а саме: висока стійкість клітин до стресу; протилежна спрямованість динаміки вмісту фотосинтетичних пігментів і вторинних каротиноїдів (ВКР) під час формування спор; тісне поєднання процесів накопичення ВКР та сухої речовини в клітинах і характерні зміни його складу – збільшення масової частки загальних ліпідів і вуглеводів на фоні зниження вмісту білка; технологічно значимий вихід ліпідів ($187\text{--}329 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{добу}^{-1}$). До специфічних рис адаптивної відповіді *E. carotinosa* на стрес-індукцію ВКРГ відносяться: активний спорогенез, що приводить до

зменшення середніх об'ємів клітин в 1,8-6,8 рази; більш висока, ніж у сценедесмальних видів, об'ємна швидкість накопичення сумарних каротиноїдів ($\Sigma\text{КР}$) з максимумом в варіанті $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ ($63,9 \cdot 10^{-3} \text{ г} \cdot \text{км}^{-3} \cdot \text{добу}^{-1}$); визначальна роль моноєфірів атаксантину (АСТ) в формуванні цитоплазматичного пулу ВКР; наявність в їх складі ефірів адонірубіна (10-12% від $\Sigma\text{КР}$). До характерних особливостей стрес-реакції досліджених видів *Scenedesmales*, що відрізняють їх від продуцентів АСТ з порядку *Volvocales*, відносяться: істотне збільшення об'ємів клітин (в 2-3,5 рази), більш широкий спектр ВКР, що включає в себе повний набір інтермедіатів біосинтезу АСТ (50-75% від $\Sigma\text{КР}$), наявність значної кількості кантаксантину (9-17% від $\Sigma\text{КР}$). Крім того, у кожного з видів фракційний склад ВКР характеризується одним або декількома відмінними ознаками: незвично високий для продуцентів АСТ вміст β -каротину у *S. rubescens* (30,6-34,0% від $\Sigma\text{КР}$); висока частка полярних ксантофілів у *P. protococcoides* (17,2-21,6% від $\Sigma\text{КР}$); переважне накопичення АСТ у формі діацильних ефірів у *B. minor* (38,7-42,3% $\Sigma\text{КР}$); аномально високий вміст (23,6-31,8% від суми) вільних форм АСТ і адоніксантину у *S. rubescens* і *P. protococcoides*.

Ключові слова: зелені мікрроводорості, модельний абіотичний стрес, морфофізіологічні адаптації, вторинний каротиногенез, кетокаротиноїди, атаксантин.

ABSTRACT

Chelebieva E. S. Features of secondary carotenogenesis in green microalgae. - Manuscript.

Thesis for the degree of candidate of biological sciences, specialty 03.02.10 - Hydrobiology. - A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Sevastopol, 2014.

The thesis presents new data on the dynamics of morphometric, physiological and biochemical characteristics of secondary carotenogenesis (SCARG) and associated physiological processes in 4 species of microalgae from two large, evolutionarily distant orders of Chlorophyceae – *Volvocales* (*Ettlia carotinosa*) and *Scenedesmales* Kostikov (*Scenedesmus rubescens*, *Pseudospongiococcum protococcoides* and *Bracteacoccus minor*) under different models of abiotic stress. It is shown that SCARG in all microalgae, regardless of their taxonomic and ecological status are characterized by a number of common features. These include: high cell resistance to stress; opposite trends of content of photosynthetic pigments and secondary carotenoids (SCAR) in forming spores; close coupling between secondary carotenoids and dry matter (DM) accumulation in cells and characteristic changes in DM composition – increasing the abundance of total lipids and carbohydrates against a background of decrease in protein level; technologically significant yield of lipids ($187\text{-}329 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$). Specific features of the adaptive stress response of *E. sarotinosa* include active sporogenesis, which leads to a decrease in the average cell volume 1.8-6.8 times; higher than that of *Scenedesmales* species volumetric rate of total carotenoids (tCAR) accumulation with a maximum in the variant of $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ ($63,9 \cdot 10^{-3} \cdot \text{mm}^{-3} \cdot \text{day}^{-1}$); critical role of astaxanthin (AST) monoesters in the formation of cytoplasmic pool of SCAR; presence of adonirubin esters in SCAR composition (10-12% of tCAR). The characteristic features of the stress response of the investigated *Scenedesmales* species, differing them from the AST

producers from order Volvocales, includes: a substantial increase in the cell volume (2.0-3.5 times); a wider range of SCAR, which includes a complete set of biosynthetic intermediates of AST (50 - 75% of tCAR); the presence of significant amounts of canthaxanthin (9 -17% of tCAR). In addition, each of investigated species was characterized by one or more distinguishing features of secondary carotenoid composition: unusual for AST producers high level of β -carotene in *S. rubescens* (30,6-34,0% of tCAR); high abundance of polar xanthophylls in *P. protococcoides* (17,2-21,6% of tCAR); predominant storage of AST in the form of diacyl esters in *B. minor* (38,7-42,3% tCAR); abnormally high levels (23,6-31,8% of tCAR) of the free forms of astaxanthin and adonixanthin in *S. rubescens* and *P. protococcoides*.

Keywords: green microalgae, model abiotic stress, morphological and physiological adaptations, secondary carotenogenesis, ketocarotenoids, astaxanthin.