

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 582.263+636.087.8

Морфологический и молекулярно-генетический анализ штаммов зеленых микроводорослей, выделенных из коммерческих биопрепаратов на основе «живой хлореллы»

Е.С. Кривина* , А.Д. Темралеева 

Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Россия, 142290, г. Пушкино, Проспект науки, д. 3

*e-mail: pepelisa@yandex.ru

В настоящей работе с помощью морфологического и молекулярно-генетического анализов впервые были изучены *Chlorella*-подобные штаммы зеленых микроводорослей из различных отечественных коммерческих биопрепаратов. Установлено, что во всех анализируемых образцах присутствуют представители *Chlorella*-клады или сестринской *Parachlorella*-клады. Кроме того, были обнаружены микроводоросли из родов *Edaphochlorella*, *Chloroidium*, *Edaphochloris* и *Muriella*, принадлежащих классу Trebouxiophyceae, а также *Coelastrella* и *Chromochloris*, относящиеся к классу Chlorophyceae. По данным прямой световой микроскопии во всех препаратах наблюдали нитчатые цианобактерии, а в биопрепарате «Гера» было отмечено наличие диатомовых водорослей. Поскольку правильная идентификация зеленых микроводорослей на основе фенотипических признаков весьма затруднительна вследствие их скудности, неинформативности и изменчивости, контроль за составом микроводорослей в биопрепаратах следует осуществлять, используя современные молекулярно-генетические методы.

Ключевые слова: биопрепараты, *Chlorella*-подобные водоросли, морфология, филогения, идентификация, видовое богатство, криптические виды

Род *Chlorella* sensu lato является архетипом одноклеточных зеленых микроводорослей (Chlorophyta) и высокопроизводительным первичным продуцентом водных и наземных экосистем. Впервые он был описан М.В. Бейеринком в 1890 г. и изначально объединял все мелкие (<10 мкм) коккоидные одноклеточные зеленые микроводоросли из водных местообитаний. Несмотря на длительную историю изучения, до сих пор в систематике *Chlorella*-подобных микроводорослей существует много пробелов, связанных с высоким криптическим разнообразием группы, вследствие чего в ряде случаев практически невозможно правильно определить с помощью световой микроскопии фенотипически слабо дифференцированные таксоны. Многие морфологические признаки (например, формирование колоний, продуцирование щетинок, образование слизи) чрезвычайно вариабельны и зависят от характера и силы воздействия внешних факторов [1–4]. Тем не менее, «маленькие зеленые шарики» детально изучаются, поскольку они повсеместно распространены и играют важную экологическую роль, активно участвуя в фотосинтетической аэрации, процессах синтеза органического вещества и самоочищения сред путем аккумуляции, трансформации и минерализации

поллютантов. В настоящее время биотехнологический потенциал *Chlorella*-подобных водорослей вызывает большой интерес для биоремедиации сточных вод, производства биотоплива, кормов для животных, биологически активных добавок (БАД), медицинских и косметологических препаратов, а также в качестве удобрений в растениеводстве [5–9]. Так, например, согласно имеющимся данным, применение *Chlorella vulgaris* в рационе позволяет увеличить молочную продуктивность дойного стада, получить дополнительные привесы молодняка и взрослых особей, снизить негативное воздействие тяжелых металлов на организм животных [10–11]. В растениеводстве считается, что использование биомассы этой водоросли в качестве удобрения повышает полноту усвоения биодоступного фосфора, снижает его непродуктивную потерю и, как следствие, уменьшает риск эвтрофикации. Кроме того, замачивание семян в культуральной жидкости *Chlorella* оказывает благоприятное воздействие на степень их всхожести и длину проростков [12, 13]. Эффективность использования *Chlorella* в качестве БАД производители связывают с богатым витаминным профилем, высоким содержанием белка, полиненасыщенных жирных кислот и пигментов [12, 14]. В настоящее время

существует огромное количество биопрепаратов как на основе только *C. vulgaris*, так и в сочетании с другими водорослями. В связи с этим точная таксономическая идентификация состава таких препаратов весьма актуальна, поскольку биотехнологически значимые характеристики у представителей различных видов, несмотря на сходную морфологию, могут существенно варьировать [5, 7, 9–14].

Целью настоящей работы стало проведение таксономической идентификации штаммов *Chlorella*-подобных микроводорослей, выделенных из отечественных коммерческих биопрепаратов на основе «живой хлореллы», с помощью морфологического и молекулярно-генетического анализов.

Материалы и методы

Объекты исследования. Объектами данного исследования стали 19 штаммов зеленых микроводорослей, выделенных из 6 отечественных биопрепаратов на основе микроводорослей рода *Chlorella* (согласно информации производителей): 1) штаммы ZS1, ZS3, ZS4 и ZS9, выделенные из напитка «Зеленое солнце» (Общество с ограниченной ответственностью (ООО) «Зеленое Солнце», Пермский край); 2) штаммы G1, G4, G5, G6 и G7 из удобрения «Гера» (ООО «Гера», Московская область); 3) штаммы Ab4 и Ab5 из удобрения «Биоабсолют» (ООО НПО «БиоТехнология», Московская область); 4) штаммы ChloN2, ChloN3 и ChloN4 из органического напитка «Живая хлорелла» (ООО «Дело», Пензенская область); 5) штаммы S2, S3 и S8 из удобрения «Живая хлорелла» (ООО «Дело», Пензенская область); 6) штаммы St1 и St6 из удобрения «StimGarden» (ООО «Дело», Пензенская область).

Изолирование и культивирование штаммов. Содержимое жидких биопрепаратов тщательно перемешивали до однородного состояния в стерильных условиях. Сухой порошок удобрения «Биоабсолют» разводили в стерильной воде Milli-Q в соотношении 1:4 в трехкратной повторности. Каплю жидкости наносили на твердую среду BG-11 с азотом (1%-ный агар, pH = 7,2) и далее многократно пересекали отдельные колонии до получения альгологически чистых культур. Изоляты культивировали в климатостате в стандартных условиях (температура +23–25°C, свет 60–75 $\mu\text{моль фотонов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, фотопериод 12 ч).

Морфологический и молекулярно-генетический анализ осуществляли по стандартным методикам, подробно описанным в статье Кривиной с соавт. [15].

Результаты и обсуждение

Состав каждого из исследуемых биопрепаратов был предварительно изучен с помощью прямой световой микроскопии. В результате было установлено, что ни один из них не является аль-

гологически чистой культурой *C. vulgaris*, как заявлено на этикетках. Во всех коммерческих продуктах наблюдали разные по морфологии зеленые водоросли и цианобактерии, а также гифы и цисты микроскопических грибов. Наибольшим разнообразием отличался биопрепарат «Гера», в составе которого дополнительно обнаружены диатомеи. В результате изоляции и очистки штаммов из биопрепаратов было получено 56 культур микроводорослей и 8 культур цианобактерий. Для дальнейшего анализа было отобрано 19 наиболее часто встречающихся штаммов зеленых микроводорослей с *Chlorella*-подобной морфологией хотя бы на одном из этапов жизненного цикла (табл. 1).

Согласно результатам филогенетического анализа с использованием фрагмента нуклеотидной последовательности 18S–ITS1–5.8S–ITS2 только девять штаммов вошли в состав *Chlorella*-клады (рис. Прилож. 1). Так, штаммы S3, ZS1, ChloN4, Ab5 с максимальной статистической поддержкой кластеризовались с представителями голотипа рода *Chlorella* – *C. vulgaris*. Генетические различия внутри кластера, объединяющего штаммы *C. vulgaris*, не превышали 0,1% (внутривидовой уровень в рамках *Chlorella*-клады). Строение и вторичная структура внутренних транскрибируемых спейсеров штаммов S3, ZS1, ChloN4, Ab5 были идентичны аутентичному штамму SAG 211-11b.

Штаммы ZS9 и G1 с максимальной статистической поддержкой группировались с аутентичным штаммом *C. sorokiniana* SAG 211-8k. Морфологические характеристики (табл. 1) и уровень генетических различий (менее 0,1%) также подтвердили принадлежность к этому виду. При этом отметим, что, несмотря на сходную морфологию с типовым видом *C. vulgaris*, молекулярно-генетический анализ показал, что «истинными» хлореллами данная группа организмов не является [2, 15]. Внутренние транскрибируемые спейсеры исследуемых штаммов были идентичны аутентичному штамму *C. sorokiniana*.

Штамм ChloN3 с максимальной статистической поддержкой вошел в состав кластера, объединяющий представителей *Parachlorella kessleri* (прил. 1). Генетические дистанции внутри кластера были менее 0,1% и соответствовали внутривидовому уровню, в то время как межвидовые генетические дистанции варьировали в диапазоне от 0,4 до 0,9%. Хотя последовательности спейсеров ITS1 и ITS2 между штаммом ChloN3 и аутентичным штаммом SAG 211-11g не были идентичны, компенсаторные замены (compensatory base change – CBC) в них отсутствовали.

Исследуемые штаммы ChloN2 и St1 вошли в кластер с *Planktochlorella nurekis*. Принадлежность к этому виду подтверждена также результатами морфологического анализа (табл. 1) и анализа генетических дистанций. Различия с аутентичным штаммом CAUP H 8701 составляли

менее 0,1% (внутривидовой уровень). СВС во вторичной структуре ITS1 и ITS2 между исследуемыми штаммами и CAUP H 8701 не обнаружены.

Штамм St6 морфологически был близок к представителям рода *Chloroidium* (табл. 1, рис. Прилож. 1), что было подтверждено с помощью филогенетического анализа: исследуемый штамм кластеризовался с представителями *C. saccharophilum*, включая аутентичный штамм SAG 2149. Генетические различия фрагмента 18S–ITS1–5.8S–ITS2 между штаммами St6 и SAG 2149 составляли 0,3%. В рамках рода *Chloroidium* такой уровень различий соответствует внутривидовому, в то время как межвидовые генетические дистанции составляют не менее 0,9%. Кроме того, в составе нуклеотидной последовательности гена 18S рРНК штамма St6 так же, как и у других представителей *C. saccharophilum*, присутствует интрон длиной 399 нуклеотидов. Вторичная структура внутренних транскрибируемых спейсеров штамма St6 не имела существенных отличий от аутентичного штамма SAG 2149. СВС в ITS1 и ITS2 отсутствовали.

Морфологические характеристики штаммов G4, ZS3 и S2 соответствовали зеленой водоросли *Edaphochlorella mirabilis* (табл. 1). Уровень генетических различий фрагмента 18S–ITS1–5.8S–ITS2 (рис. Прилож. 1) между исследуемыми штаммами был не более 0,1%, с аутентичным штаммом *E. mirabilis* SAG 38.88 и близким к нему штаммами – 0,4–0,5%. Однако на данном этапе исследования, ввиду того, что род *Edaphochlorella* монотипный, нельзя с уверенностью рассматривать этот уровень генетических различий как внутривидовой или межвидовой. Тем не менее, на основании полного

сходства последовательностей ITS1 и ITS2 между штаммами ZS3, G4, S2 и SAG 38.88, а также отсутствия СВС во вторичной структуре спейсеров все три штамма были идентифицированы как *E. mirabilis*.

Штаммы G6 и ZS4 морфологически были близки к *Nannochloris*-подобным водорослям (табл. 1). В настоящее время идентификация и классификация видов и родов *Nannochloris*-клады основаны на анализе гена 18S рРНК, поскольку информации о нуклеотидных последовательностях спейсеров крайне мало [24–26]. Согласно результатам филогенетического анализа гена 18S рРНК, штаммы ZS4 и G6 с максимальной статистической поддержкой вошли в состав кластера *Edaphochloris andrejevii* (рис. Прилож. 2), типового вида недавно описанного нового рода микроводорослей [24]. Уровень генетических различий с сестринскими штаммами не превышал 0,1%, что в данной кладе соответствует внутривидовому уровню. Различия нуклеотидных последовательностей ITS2 с учетом вторичной структуры между исследуемыми штаммами и аутентичным штаммом ACSSI 104 не были обнаружены.

В соответствии с морфологическими характеристиками штамм G7 был предварительно определен как *Muriella terrestris* (табл. 1), что впоследствии подтвердилось данными 18S рРНК-анализа (рис. Прилож. 2). Генетические дистанции не превышали 0,1%. Дополнительно был проанализирована нуклеотидная последовательность ITS2, вторичная структура которой у штамма G7 имела тот же специфический признак, характерный для представителей *M. terrestris*, но не свойственный большинству зеленых водорослей [27], – развет-

Таблица 1

Морфологические характеристики исследуемых штаммов, выделенных из биопрепаратов

Штаммы	Форма клеток	Размер, мкм	Хлоропласт	Пиреноид	Автоспоры	Расхождение с типовым диагнозом	
<i>Chlorella vulgaris</i> S3, ZS1, ChloN4, Ab5	Ш, ШОВ	3,2 –6,5	Ч	1, с сегменти- рованной крахмальной оберткой	2–8	отсутствует [1, 3, 16–24]	
<i>C. sorokiniana</i> ZS9, G1	Ш	2,6–5,5	Ч, П		2–16		
<i>Parachlorella kessleri</i> ChloN3	О (МК), Ш (ЗК)	4,9–7,2	Ч, Ш				
<i>Planktochlorella nurekis</i> St1, ChloN2	Ш	4–11	Ч, Б				
<i>Chloroidium saccharophilum</i> St6	Ш, ШОВ	4,4 –7,8 × 2,9–6,1	Ч, П				2–4
<i>Coelastrella aeroterrestrica</i> Syp_8, BA_Chlo4	Ш, ШОВ	5 –10	Ц (МК), С (ЗК)	2–16			
<i>Edaphochlorella mirabilis</i> ZS3, G4, S2	Ш	3–8	Ч		отсутствует		
<i>Chromochloris zofingiensis</i> G5		3–20	Л (МК), Н (ЗК)				
<i>Muriella terrestris</i> G7		3–7	Ч, Б (МК), Н (ЗК)				
<i>Edaphochloris andrejevii</i> ZS4, G6		2–5,5	Ч	2–8			

Примечание: форма клеток: Ш – шаровидная, ШОВ – широкоовальная, О – овальная; МК – молодые клетки, ЗК – зрелые клетки; хлоропласт: Ч – чашевидный, П – поясковидный, Ш – шаровидный, Б – блюдцевидный, Ц – цельный, С – сегментированный, Л – лопастной, Н – несколько.

вленную шпильку III CBC между штаммами *M. terrestris* обнаружено не было.

Штаммы S8 и Ab4 изначально были идентифицированы как *Coelastrella* sp. (табл. 1). Филогенетический анализ 18S–ITS1–5.8S–ITS2 показал, что данные штаммы с максимальной статистической поддержкой входят в состав кластера *C. aeroterrestrica*, совместно с аутентичным штаммом данного вида SWK 1-2 (рис. Прилож. 3). Уровень генетических различий между штаммами S8, Ab4 и аутентичным штаммом SWK 1-2 составил менее 0,1%, а между штаммами вида *C. aeroterrestrica* данный показатель колебался от 0 до 0,4%. Для сравнения, генетические дистанции между таксономически признанными видами *C. striolata* и *C. corcontica*, а также между *C. corcontica* и *C. aeroterrestrica* составляли 0,6%. Кроме того, в составе нуклеотидной последовательности 18S рРНК у исследуемых штаммов, так же, как и у других представителей *C. aeroterrestrica*, присутствуют два интрона длиной 392 и 598 нуклеотидов. Первичная и вторичная структура ITS1 у штаммов, выделенных из биопрепаратов, была идентична таковой у аутентичного штамма SWK 1-2, включая особенность, присущую многим штаммам рода *Coelastrella* – разветвленную шпильку I. Вторичная структура ITS2 у исследуемых штаммов также характеризовалась отличительной чертой в виде разветвленной шпильки I [27] и совпадала с таковой у аутентичного штамма SWK 1-2. CBC в обоих спейсерах отсутствовали.

Штамм G5 имел морфологические признаки, типичные для зеленых микроводорослей рода *Chromochloris* (табл. 1). Однако молодые клетки обладают *Chlorella*-подобной морфологией. По данным анализа фрагмента 18S–ITS1–5.8S–ITS2 исследуемый штамм со 100%-ной статистической поддержкой группировался с *Chromochloris zofingiensis* CCAAP 211/14 (рис. Прилож. 3), при этом генетические различия с аутентичным штаммом отсутствовали. Состав и вторичные структуры ITS1

и ITS2 штамма G5 и аутентичного штамма CCAAP 211/14 были идентичны, CBC отсутствовали.

Таким образом, в составе каждого из исследуемых шести отечественных коммерческих биопрепаратов были обнаружены микроводоросли либо из *Chlorella*-клады, либо из сестринской к ней *Parachlorella*-клады (табл. 2). Непосредственно *Chlorella vulgaris* была изолирована из четырех препаратов – напитков «Зеленое солнце» и «Живая хлорелла», удобрений «Биоабсолют» и «Живая хлорелла». В остальных препаратах она не была обнаружена. Из наиболее близких к ней видов в удобрении «Гера» была выявлена *C. sorokiniana*, в удобрении «StimGarden» – *Planktochlorella nurekis*. Ни один из препаратов не являлся монокультурой, как это было заявлено производителями. Среди выделенных штаммов, которые хотя бы на какой-то из стадий своего жизненного цикла обладают *Chlorella*-подобным морфотипом, были обнаружены представители родов *Edaphochlorella*, *Chloroidium*, *Coelastrella*, *Edaphochloris*, *Muriella* и *Chromochloris*. Наиболее богатым видовой состав *Chlorella*-подобных водорослей был в удобрении «Гера» и напитке «Зеленое солнце», наиболее бедным – в удобрении «Биоабсолют». В составе изученных биопрепаратов также были выявлены диатомовые водоросли и цианобактерии, что, скорее всего, является следствием контаминации исходной культуры в производственных условиях. Отметим, что правильная идентификация штаммов с *Chlorella*-подобным морфотипом весьма затруднительна вследствие скудности и неинформативности морфологических признаков, а также высокой фенотипической пластичности. Контроль качественного состава микроводорослей биопрепаратов нельзя осуществлять только при помощи световой микроскопии, необходимо привлекать современные молекулярно-генетические методы. В последнее время метабаркодирование становится все более популярным методом для изучения разнообразия микроорганизмов. Однако в данном

Таблица 2

Видовой состав зеленых микроводорослей, выделенных из коммерческих биопрепаратов на основе «живой хлореллы»

Вид	Zs	G	Ab	ChloN	S	St
<i>Chlorella vulgaris</i>	+	–	+	+	+	–
<i>C. sorokiniana</i>	+	+	–	–	–	–
<i>Parachlorella kessleri</i>	–	–	–	+	–	–
<i>Planktochlorella nurekis</i>	–	–	–	+	–	+
<i>Chloroidium saccharophilum</i>	–	–	–	–	–	+
<i>Edaphochlorella mirabilis</i>	+	+	–	–	+	–
<i>Edaphochloris andrejevii</i>	+	+	–	–	–	–
<i>Muriella terrestris</i>	–	+	–	–	–	–
<i>Coelastrella aeroterrestrica</i>	–	–	+	–	+	–
<i>Chromochloris zofingiensis</i>	–	+	–	–	–	–

Примечание: ZS – напиток «Зеленое солнце», G – удобрение «Гера», Ab – удобрение «Биоабсолют», ChloN – органический напиток «Живая хлорелла», S – удобрение «Живая хлорелла», St – удобрение «StimGarden», «+» – присутствует в биопрепарате, «–» – в биопрепарате не обнаружены

случае крайне важно правильно выбрать ДНК-баркод. При исследовании эукариотических организмов, как правило, часто используют короткие вариабельные области V4 и V9 гена 18S рРНК [28]. В процессе исследования нами было установлено, что эти регионы очень консервативны для представителей *Chlorella*-клады. Так, регион V4 гена 18S рРНК содержал 90% консервативных сайтов, V9 – 83% консервативных сайтов, что не позволяет разграничить многие виды. В связи с этим при наличии альгологически чистой культуры наиболее надежным и эффективным методом идентификации может стать амплификация в качестве ДНК-баркода ITS2 с последующим секвенированием по Сэнгеру.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guiry M.D., Guiry G.M. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway [Электронный ресурс]. 2022. URL: <http://www.algaebase.org> (дата обращения 11.04.2022).
2. Krivina E., Temraleeva A. The difficulty identifying and the cryptic diversity of *Chlorella*-clada microalgae (Chlorophyta) // Microbiology. 2020. Vol. 89. N 6. P. 714–727.
3. Krienitz L., Hegewald E.H., Hepperle D., Huss V.A.R., Rohr T., Wolf M. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) // Phycologia. 2004. Vol. 43. N 5. P. 529–542.
4. Luo W., Pröschold T., Bock C., Krienitz L. Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) // Plant Biol. 2010. Vol. 12. N 3. P. 545–553.
5. Вайшля О.Б., Кулятов Д.В. Перспективные виды микроводорослей для биodeградации поллютантов водных экосистем юга Западной Сибири // Известия СамНЦ РАН. 2011. Т. 1. № 4. С. 787–789.
6. Mehrabadi A., Farid M.M., Craggs R. Potential of five different isolated colonial algal species for wastewater treatment and biomass energy production // Algal Res. 2017. Vol. 21. P. 1–8.
7. Adar O., Kaplan-Levy R.N., Banet G. High temperature *Chlorellaceae* (Chlorophyta) strains from the Syrian-African Rift Valley: the effect of salinity and temperature on growth, morphology and sporulation mode // Eur. J. Phycol. 2016. Vol. 51. N 4. P. 387–400.
8. Lipstein B., Hurwitz S. The nutritional value of sewage-grown samples of *Chlorella* and *Micractinium* in broiler diets // Poult. Sci. 1983. Vol. 62. N 7. P. 1254–1260.
9. Onay M., Sonmez C.A., Oktem H., Yücel M. Thermoresistant green microalgae for effective biodiesel production: Isolation and characterization of unialgal species from geothermal flora of Central Anatolia // Bioresour. Technol. 2014. Vol. 169. P. 62–71.
10. Pulz O., Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. Vol. 65. N 6. P. 635–648.
11. Shim J.Y., Shin H.S., Han H.S., Park J.G., Lim B.L., Chung K.W. Protective effects of *Chlorella vulgaris* on liver toxicity in cadmium-administered rats // J. Med. Food. 2008. Vol. 11. N 3. P. 479–485.
12. Mulbry W., Westhead E.K., Pizarro C., Sikora L. Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer // Bioresour. Technol. 2005. Vol. 96. N 4. P. 451–458.
13. Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P.Y., Vaca-Garcia C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review // Renew. Sust. Energ. Rev. 2014. Vol. 35. P. 265–278.
14. Беспалов В.Г., Некрасова В.Г., Иорданишвили А.К. Современный взгляд на биологически активные добавки к пище и их использование в лечебно-профилактических целях в клинической медицине // Медицина. XXI век. 2007. № 9. С. 86–94.
15. Krivina E., Temraleeva A., Sinetova M. New species *Micractinium kostikovii* (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae) from Russia // Phycol. Res. 2022. Vol. 70. N 1. P. 22–34.
16. Beijerinck M.W. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen // Botanische Zeitung. 1890. Vol. 47. P. 725–785.
17. Shihira I., Krauss R.W. *Chlorella*. Physiology and taxonomy of forty-one isolates. Maryland: University of Maryland, 1965. 97 pp.
18. Škaloud P., Němcová Y., Pytela J., Bogdanov N. I., Bock C., Pickinpaugh S.H. *Planktochlorella nurekis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid green alga carrying significant biotechnological potential // Fottea. 2014. Vol. 14. N 1. P. 53–62.
19. Darienko T., Gustavs L., Mudimu O., Rad Menendez C., Schumann R., Karsten U., Fried, T., Pröschold T. *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid green alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) // Eur. J. Appl. Physiol. 2010. Vol. 45. N 1. P. 79–95.
20. Tschalkner A., Gärtner G., Kofler W. *Coelastrella aeroterrestica* sp. nov. (Chlorophyta, Scenedesmoideae) a new, obviously often overlooked aeroterrestrial species // Algal. Stud. 2008. Vol. 128. P. 11–20.
21. Darienko T., Gustavs L., Pröschold T. Species concept and nomenclatural changes within the genera *Elliptochloris* and *Pseudochlorella* (Trebouxiophyceae) based on an integrative approach // J. Physiol. 2016. Vol. 52. N 6. P. 1125–1145.
22. Fucíková C., Lewis L.E. Intersection of *Chlorella*, *Muriella* and *Bracteacoccus*: Resurrecting the genus *Chromochloris* Kol et Chodat (Chlorophyceae, Chlorophyta) // Fottea. 2012. Vol. 12. N 1. P. 83–93.
23. Petersen J.B. Einige neue Erdalgen // Arch. Protested. 1932. Vol. 76. P. 395–408.

24. Temraleeva A.D., Krivina E.S., Boldina O.N. *Edaphochloris* gen. nov.: a new genus of soil green algae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) with simple morphology // Plant Syst. Evol. 2022. Vol. 308. N 1: 4.

25. Yamamoto M., Nishikawa T., Kajitani H., Kawano S. Patterns of asexual reproduction in *Nannochloris bacillaris* and *Marvania geminata* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) // Planta. 2007. Vol. 226. N 4. P. 917–927.

26. Somogyi B., Felföldi T., Solymosi K., Flieger K., Márialigeti K., Böddi B., Vörös L. One step closer to eliminating the nomenclatural problems of minute coccoid green algae: *Pseudochloris wilhelmii*, gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) // Eur. J. Phycol. 2014. Vol. 48. N 4. P. 427–436.

27. Keller A., Schleicher T., Förster F., Ruderisch B., Dandekar T., Müller T., Wolf M. ITS2 data corroborate a monophyletic chlorophycean DO-group (Sphaeropleales) // BMC Evol. Biol. 2008. Vol. 8: 218.

28. Decelle J., Romac S., Sasaki E., Not F., Mahé F., Lovejoy C. Intracellular diversity of the V4 and V9 regions of the 18S rRNA in marine protists (Radiolarians) assessed by high-throughput sequencing // PLoS One. 2014. Vol. 9. N 8: e104297.

Поступила в редакцию 25.03.2022

После доработки 03.07.2022

Принята в печать 27.07.2022

RESEARCH ARTICLE

Morphological and molecular genetic analysis of green microalgal strains isolated from commercial biological products based on “living *Chlorella*”

E.S. Krivina* , A.D. Temraleeva 

Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences”,
prosp. Nauki 3, Pushchino, 142290, Russian Federation

*e-mail: pepelisa@yandex.ru

In the present study, *Chlorella*-like strains of green microalgae from various commercial biological products were studied for the first time using morphological and molecular genetic analyses. It was found that representatives of the *Chlorella* clade or sister *Parachlorella* clade were present in all analyzed samples. In addition, microalgae from the genera *Edaphochlorella*, *Chloroidium*, *Edaphochloris* and *Muriella* belonging to the Trebouxiophyceae class, as well as *Coelastrella* and *Chromochloris* belonging to the Chlorophyceae class were found. According to direct light microscopy data, filamentous cyanobacteria were observed in all preparations, and the presence of diatoms was also noted in the biopreparation “Gera”. Since the correct identification of green microalgae based on phenotypic traits is very difficult due to their scarcity, lack of information and variability, the control of the composition of microalgae in biological products should be carried out using modern molecular genetic methods.

Keywords: biological products, *Chlorella*-like algae, morphology, phylogeny, identification, species richness, cryptic species

Funding: The study was funded by the Russian Foundation for Basic Research, project number 19-34-60002.

Сведения об авторах

Кривина Елена Сергеевна — канд. биол. наук, и.о. науч. сотр. группы «Альгологическая коллекция АСССИ», ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук». Тел.: 8-496-773-86-33; e-mail: pepelisa@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0849-5832>

Темралева Анна Диссенгалиевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр., руководитель группы «Альгологическая коллекция АСССИ», ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук». Тел.: 8-496-773-86-33; e-mail: temraleeva.anna@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3445-0507>