

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 582.263

ОЦЕНКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА И УТОЧНЕНИЕ
ТАКСОНОМИЧЕСКОГО СТАТУСА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ
РОДА *PARIETOCHLORIS* (TREBOUXIOPHYCEAE) КОЛЛЕКЦИИ CALUК.А. Шибзухова^{1,*}, О.В. Гаврилова², О.Б. Чивкунова¹,
Р.А. Сидоров³, А.Е. Соловченко¹, Е.С. Лобакова¹¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;²кафедра микробиологии, биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет,
199034, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9;³лаборатория липидного обмена, Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН,
Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35

*e-mail: karina_shibzuhova@rambler.ru

Проведены морфологическое, биохимическое и молекулярно-генетическое исследование зелёных микроводорослей из коллекции цианобактерий, водорослей и паразитов водорослей Санкт-Петербургского государственного университета (CALU), предположительно принадлежащих к роду *Parietochloris*, с целью оценки биотехнологического потенциала и уточнения филогенетического положения. Определено, что исследованные штаммы имеют близкое родство к двум родам из разных классов — *Lobosphaera* (Trebouxiaceae) и *Deasonia* (Actinochloridaceae) — и могут представлять биотехнологический интерес в качестве продуцентов ценных полиненасыщенных жирных кислот, в особенности арахидоновой, линолевой и α-линоленовой.

Ключевые слова: зелёные микроводоросли, *Parietochloris*, *Lobosphaera*, *Deasonia*, арахидоновая кислота, молекулярная идентификация

В последние годы наблюдается рост интереса исследователей к микроводорослям (МВ) близкородственных родов *Parietochloris* и *Lobosphaera*, обусловленный их способностью накапливать рекордные количества ω6-полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), таких как докозагексаеновая (ДГК, C22:6), эйкозапентаеновая (ЭПК, C20:5) и, в особенности, арахидоновая (АК, C20:4). Последняя играет одну из ключевых ролей в синтезе важной группы биогенных физиологически активных веществ, эйкозаноидов, в организме человека [1]. Накопление в клетках МВ жирных кислот (ЖК) регулируется целым рядом факторов окружающей среды и является, как правило, стрессовым для их роста. В качестве стрессовых факторов выступают изменения элементного состава минерального питания (в частности, дефицит азота в питательной среде), низкая температура и высокая интенсивность освещения [2]. Характер ответа МВ на стрессовые факторы и накопления в их клетках ПНЖК, как правило, являются штамм-специфичными.

Зелёная МВ *Parietochloris incisa* (H. Reisl) S. Watanabe на сегодняшний день представляет собой богатейший природный растительный источник АК [2]. В связи с этим продолжается поиск новых штаммов МВ данного вида в природе и существующих коллекциях, а также подбор условий их культивирования для достижения максимального выхода АК [3].

Систематическое положение МВ данного вида в последнее время подвергается ревизии из-за противоречий между результатами молекулярной идентификации и литературных данных по таксономии [3].

В этой связи целью данной работы было уточнение таксономического статуса и оценка биотехнологического потенциала штаммов МВ, предположительно относящихся к роду *Parietochloris*, из коллекции цианобактерий, водорослей и паразитов водорослей Санкт-Петербургского государственного университета (CALU).

Материалы и методы исследования

Культуры шести штаммов зелёных МВ рода *Parietochloris* из коллекции CALU были предоставлены ресурсным центром “Культивирование микроорганизмов” научного парка Санкт-Петербургского государственного университета. Штаммы *P. pseudoalveolaris* (Deason et Bold) CALU 924 и CALU 925 были выделены из почвенных проб Дальнего Востока России, штаммы *Parietochloris* sp. CALU 934 и 1488 — из почвенных проб берега озера в посёлке Гвардейское (Ленинградская область, Россия), штаммы *P. bilobata* (Vinatzer) V. Andr. comb. nov. CALU 1497 и CALU 855 — из почвенных проб разнотравного луга (Овручский район, Житомирская область, Украина).

Альгологически чистые культуры МВ выращивали в конических колбах Эрленмейера на азот-

содержащей (N+) и безазотной (N-) средах Громова [4] при температурах +22°C и +10°C при постоянном освещении белым светом 40 мкмоль квантов ФАР/м²·с в течение 7 сут (ФАР – фотосинтетически активная радиация). Культивирование при низкой температуре и отсутствии в среде культивирования азота моделировало рост МВ в условиях стресса.

Спектры поглощения суспензий и экстрактов пигментов регистрировали на спектрофотометре Agilent Cary 300 UV-Vis (Agilent Technologies, США). Жирнокислотный состав суммарных липидов анализировали методом газовой хроматографии масс-спектрометрии с использованием газового хроматографа Agilent 7890A (Agilent Technologies, США), соединенного с квадрупольным масс-спектрометром Agilent 5975C (Agilent Technologies, США) [5]. Относительное содержание ЖК определяли в весовых процентах (вес.%) от суммарного содержания в пробе, коэффициент ненасыщенности ЖК определяли как описано ранее [6]. Коэффициент ненасыщенности ЖК рассчитывали по формуле:

$$K = \Sigma UFA / \Sigma SFA,$$

где K – коэффициент ненасыщенности, ΣUFA – суммарное содержание ненасыщенных жирных кислот (вес.%), ΣSFA – суммарное содержание насыщенных жирных кислот (вес.%) в пробе.

Молекулярно-генетическую идентификацию проводили путём анализа нуклеотидной последовательности фрагмента ядерного рибосомального кластера генов, включающего последовательности внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1 и ITS2, а также ген 5.8S рРНК, с использованием праймеров NS1 и ITS2 [7]. Поиск ближайших гомологов полученных последовательностей проводили в базе данных NCBI GeneBank с помощью программы BLAST [8]. Построение филогенетических деревьев осуществляли при помощи алгоритма ближайших соседей (NJ) [9]. Достоверность топологии оценивалась при помощи bootstrap-теста (1 000 повторностей) [10].

Подготовка и исследование образцов с помощью растрового (сканирующего) и просвечивающего (трансмиссионного) микроскопов проводили согласно модифицированной методике, описанной ранее [11].

Результаты и обсуждение

Исследованные штаммы МВ были представлены в основном неподвижными одиночными сферическими вегетативными клетками диаметром 4–10 μm (CALU 924), 2–15 μm (CALU 925), 7–14 μm (CALU 1497 и CALU 855), до 20 μm (CALU 934 и CALU 1488). В жизненном цикле большинства штаммов выявлены подвижные зооспоры с двумя изоконтными жгутиками на апикальном конце клетки и неподвижные автоспорангии,

содержащие в среднем восемь дочерних клеток. Исключением был штамм CALU 934, у которого основная жизненная форма была представлена вегетативными клетками и апланоспорами, окрашенными в зелёный и оранжевый цвет.

По данным растровой и трансмиссионной электронной микроскопии, клетки всех исследованных культур обладали толстой клеточной стенкой, состоящей, как правило, из четырёх хорошо выраженных слоёв. На её поверхности присутствовали штамм-специфичные эпиструктуры: бородавки, булабовидные выросты, тяжи. Изученные клетки МВ содержали пристенный лопастной хлоропласт, окружённый двумя мембранами и имеющий хорошо развитую систему тилакоидов в стромах. У всех штаммов в хлоропластах был обнаружен крупный пиреноид с интрапиреноидными тилакоидами, окружённый крахмальными зёрнами. В цитоплазме наблюдалось накопление многочисленных липидных глобул.

Спектры поглощения суспензий клеток изученных культур имели характерную для зелёных МВ форму: они характеризовались наличием максимумов хлорофиллов a (678 и 438–440 нм) и b (плечо около 650 нм), а также плечом в диапазоне 460–490 нм, свойственным каротиноидам.

Из спектров поглощения суспензий, компенсированных на рассеяние, следует, что присутствие азота в среде культивирования не влияло на содержание каротиноидов в клетках культуры CALU 934, тогда как в клетках штаммов CALU 924, CALU 925, CALU 1497 и CALU 855 на безазотной среде их количество возрастало. При выращивании на среде (N+) штаммы CALU 924, CALU 925, в отличие от штаммов CALU 1497 и CALU 855, были чувствительными к пониженной температуре (+10°C) и реагировали на неё снижением содержания хлорофиллов.

У всех штаммов, за исключением CALU 934, главными ЖК в составе суммарных липидов были пальмитиновая (C16:0), олеиновая (C18:1), линолевая (C18:2), α-линоленовая (C18:3) и арахидоновая кислоты. В суммарных липидах клеток всех изученных штаммов присутствовала также ЭПК, однако её доля не превышала 3 вес.%.

Состав ЖК липидов клеток МВ CALU 934 значительно отличался от такового у других изученных культур. Суммарные липиды клеток данной культуры не содержали ЖК с очень длинной цепью (рис. 1, А). Главными ЖК были C₁₆-кислоты (27 вес.%), из которых 17 вес.% составляла пальмитиновая, и C₁₈-кислоты (олеиновая, линолевая, α-линоленовая), на долю которых приходилось 72 вес.%.

У штамма CALU 924 на безазотной среде значительно увеличивалось содержание АК, достигая 33 вес.%, тогда как доля C18:3 снижалась почти втрое (с 10 до 3,5 вес.%). Снижение температуры при культивировании на азотсодержащей среде индуцировало повышение доли C₁₈-кислот (олеи-

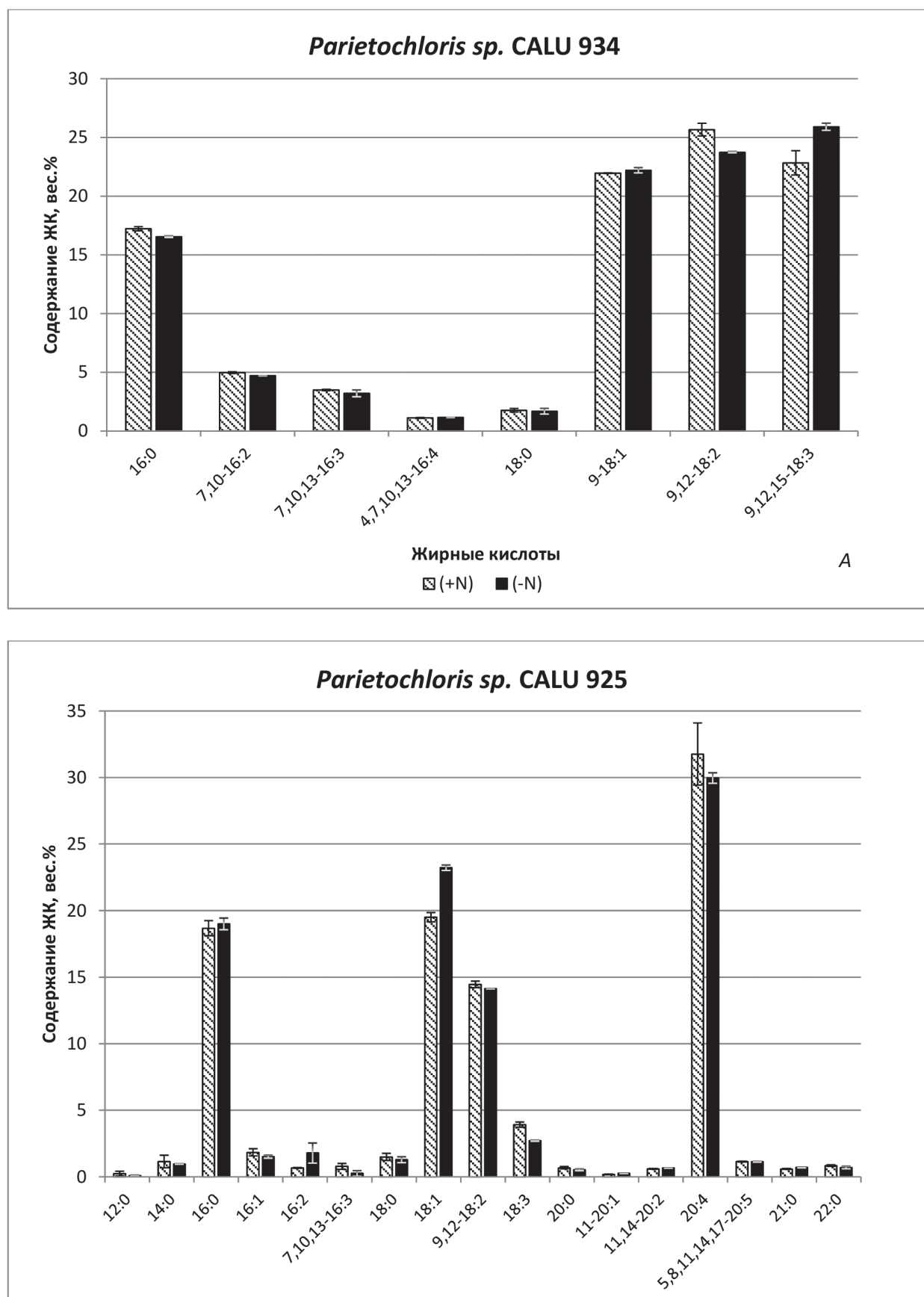
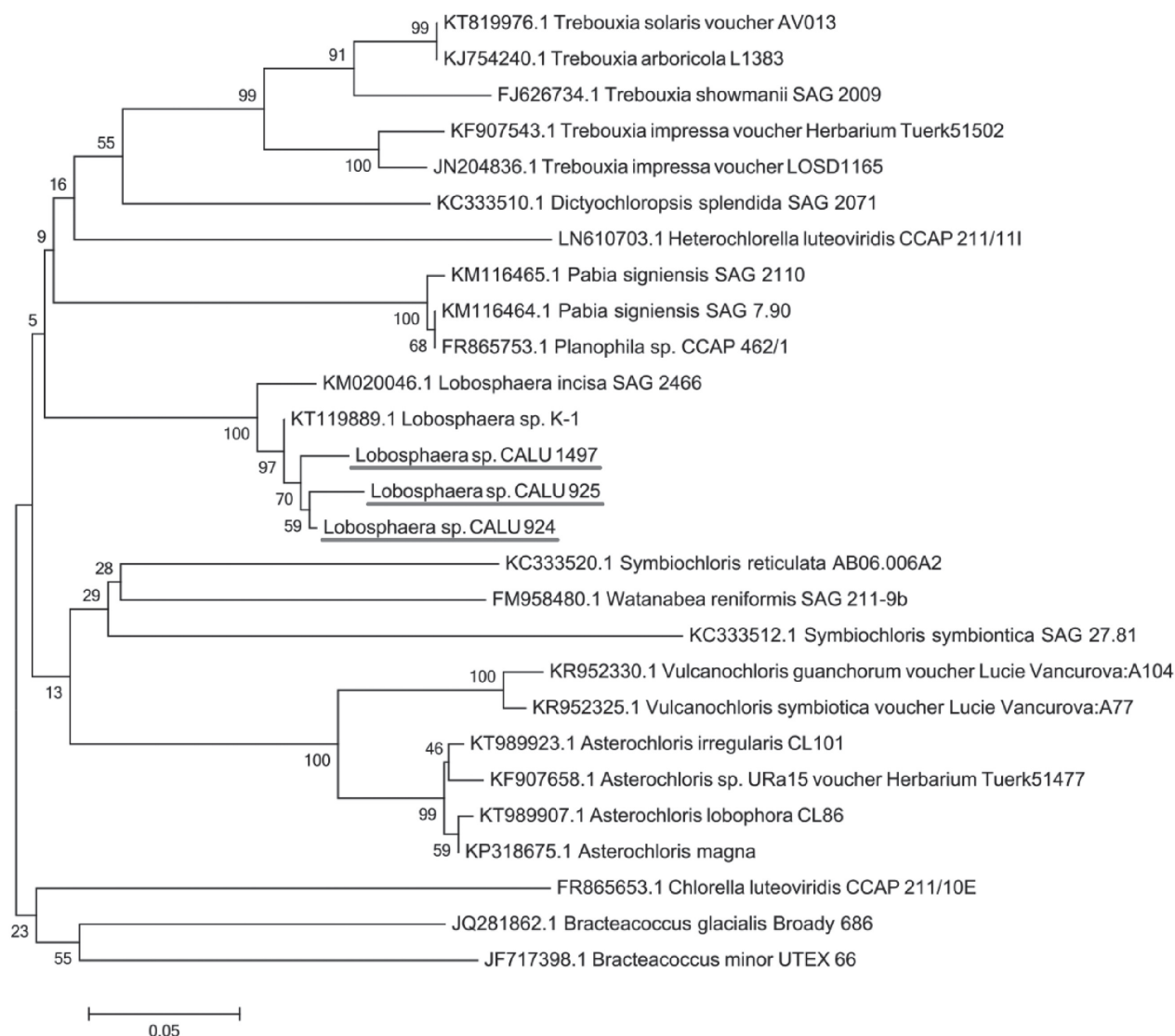
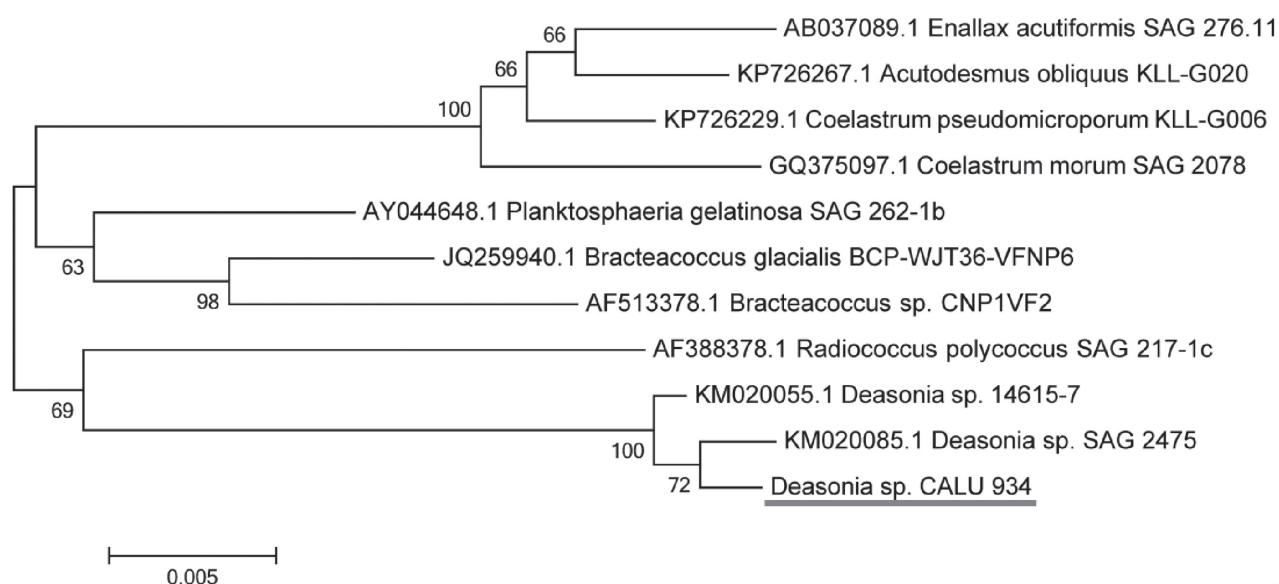


Рис. 1. Состав жирных кислот липидов в клетках штаммов *Parietochloris pseudoalveolaris* (Deason et Bold) CALU 925 (A) и *Parietochloris* sp. CALU 934 (B), культивируемых на азотной (N+) и безазотной (N-) средах Громова



A



B

Рис. 2. Филогенетическое положение исследованных штаммов *Lobosphaera* sp. CALU 924, 925, 1497 (А) и *Deasonia* sp. CALU 934 (Б) (подчёркнуты), определённое по результатам анализа участков нуклеотидной последовательности ITS1-5.8SpPHK-ITS2

новой и *цис*-вакценовой) (с 12 до 20 вес.%) и незначительный рост относительного содержания C20:4 и C20:5 (на 2 и 0,5 вес.%, соответственно). Вместе с тем, отмечалось повышение коэффициента ненасыщенности от 2,17 (при +22°C на (N+) среде) до 3,00 (при +10°C на (N-) среде).

МВ CALU 925 характеризовались наибольшим по сравнению с МВ CALU 924, CALU 855 и CALU 1497, исходным количеством АК, достигающим 32 вес.% от суммарного содержания ЖК, и большим разнообразием минорных ЖК с очень длинной цепью, содержание которых не превышало 4 вес.% (рис. 1, Б). Следует отметить, что у данного штамма было выявлено низкое, по сравнению с CALU 924, CALU 855 и CALU 1497, содержание C18:3, составлявшее менее 4 вес.%. Уровень АК у штамма CALU 925 увеличивался лишь на 2 вес.% при культивировании при пониженной температуре. Отсутствие азота в среде культивирования не влияло на содержание АК. При понижении температуры отмечалось незначительное увеличение коэффициента ненасыщенности ЖК.

Изменение условий культивирования МВ CALU 1497 не влияло на содержание АК (21–25 вес.%). Для данного штамма было характерно накопление C18:1 до 30–32 вес.% на безазотной среде. Коэффициент ненасыщенности ЖК возрастал с 3,4 при культивировании на полной среде и температуре +22°C до 4,5 на безазотной среде и температуре +10°C.

Полученные в ходе молекулярно-генетических исследований данные свидетельствуют о близком родстве штаммов CALU 924 и CALU 925, идентифицированных при первичном депонировании как *P. pseudoalveolaris* Watanabe et Floyd, и штаммов CALU 1497 и CALU 855, определённых как *P. bilobata* V. Andr. comb. nov., с МВ рода *Lobosphaera* (Trebouxiaceae), а штамма *P. pseudoalveolaris* Watanabe et Floyd CALU 934 с МВ рода *Deasonia* (Actinochloridaceae). На основании сравнительного анализа

нуклеотидных последовательностей фрагмента ITS1-5.8SpPHK-ITS2 МВ можно заключить, что все изученные штаммы, за исключением *Deasonia sp.* CALU 934, имеют близкое родство между собой и, вместе с тем, с МВ рода *Parietochloris* (рис. 2, А, Б).

Таким образом, в ходе исследования был проведён сравнительный морфологический, биохимический и молекулярно-генетический анализ шести штаммов МВ из коллекции CALU. Установлено, что как по молекулярно-генетическим, так и биохимическим данным штамм CALU 934 и CALU 1488 имеют родство с МВ рода *Deasonia* (Actinochloridaceae), тогда как МВ CALU 924, CALU 925, CALU 855 и CALU 1497 имеют близкое родство между собой и с МВ рода *Lobosphaera* (Trebouxiaceae). Проведена оценка биотехнологического потенциала исследованных штаммов МВ. По результатам биохимических исследований *Deasonia sp.* CALU 934 может представлять биотехнологический интерес как потенциальный продуцент C18-ПНЖК, в частности, линолевой и α -линоленовой кислот, а штаммы *Lobosphaera sp.* CALU 924 и CALU 925 – в качестве продуцентов в рекордных количествах C20-ПНЖК, в особенности АК. Особый интерес для биотехнологии может представлять штамм *Lobosphaera sp.* CALU 1497, как продуцент АК, не требующий создания особых условий культивирования для накопления в биомассе данной ПНЖК в значительных количествах.

Авторы выражают благодарность научному сотруднику кафедры биоинженерии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, к.б.н. К.А. Чеканову за помощь в проведении молекулярно-генетических исследований и обработке полученных данных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00029) с использованием оборудования Центра коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Weber P.C., Fischer S., von Schacky C., Lorenz R., Strasser T. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids and eicosanoids formation in man // Health effects of polyunsaturated fatty acid in seafood's / Eds. A.P. Simopoulos, R.R. Kifer, and R.E. Martin. Orlando: Academic press, 1986. P. 227–238.
2. Solovchenko A.E., Khozin-Goldberg I., Didi-Cohen S., Cohen Z., Merzlyak M.N. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa* // J. Appl. Phycol. 2008. Vol. 20. N 3. P. 245–251.
3. Dumancas G.G., Murdianti B.S., Lucas E.A. Arachidonic acid. Dietary sources and general functions. N.Y.: Nova Science Publishers, 2013. 255 pp.
4. Громов Б.В., Титова Н.Н. Коллекция культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института Ленинградского университета (CALU) // Культивирование коллекционных штаммов водорослей. Межвуз. сб. / Под ред. Б.В. Громова. Л.: Из-во Ленингр. ун-та, 1983. С. 3–27.
5. Solovchenko A., Khozin-Goldberg I., Recht L., Boussiba S. Stress induced changes in optical properties, pigment and fatty acid content of *Nannochloropsis sp.*: Implications for non-destructive assay of total fatty acids // Mar. Biotechnol. 2011. Vol. 13. N 3. P. 527–535.
6. Ветчинникова Л.В., Серебрякова О.С., Ильинова М.К. Динамика содержания липидов и жирнокислотного состава отдельных фракций в женских сережках березы повислой (*Betula pendula* Roth) // Труды Карельского научного центра РАН. 2013. № 3. С. 74–81.
7. White T.J., Bruns T.D., Lee S.B., Taylor J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications. A guide to methods and applications / Eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. N.Y.: Academic Press, 1990. P. 315–322.

8. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucleic Acids Res.* 1997. Vol. 25. N 17. P. 3389–3402.

9. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. Vol. 4. N 4. P. 406–425.

10. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap // *Evolution.* 1985. Vol. 39. N 4. P. 783–791.

11. Gorelova O.A., Kosevich I.A., Baulina O.I., Fedorenko T.A., Torshkheeva A.Z., Lobakova E.S. Associations between the White Sea invertebrates and oxygen-evolving phototrophic microorganisms // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2009. Vol. 64. N 1. P. 16–22.

Поступила в редакцию

15.05.2017

Принята в печать

15.06.2017

MYCOLOGY AND ALGOLOGY

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL ASSESSMENT AND TAXONOMIC STATUS REFINEMENT OF MICROALGAE OF THE GENUS *PARIETOCHLORIS* (TREBOUXIOPHYCEAE) IN THE CALU-COLLECTION

K.A. Shibzukhova^{1,*}, O.V. Gavrilova², O.B. Chivkunova¹,
R.A. Sidorov³, A.E. Solovchenko¹, E.S. Lobakova¹

¹Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Department of Microbiology, School of Biology, Saint Petersburg State University,
Universitetskaya nab. 7–9, Saint-Petersburg, 199034, Russia;

³Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Science,
Botanicheskaya ul. 35, Moscow, 127276, Russia

*email: karina_shibzuhova@rambler.ru

We have carried out morphological, biochemical, as well as molecular and genetic studies of green microalgae from the Collection of cyanobacteria, algae and algal parasites of Saint-Petersburg State University (CALU), presumably belonging to the genus *Parietochloris*, to assess their biotechnological potential and to refine their phylogenetic position. It was found that the investigated strains have a close relationship to two genera from different classes – *Lobosphaera* (Trebouxiaceae) and *Deasonia* (Actinochloridaceae). They can be of interest as producers of valuable polyunsaturated fatty acids, especially arachidonic, linoleic, α -linolenic.

Keywords: green microalgae, *Parietochloris*, *Lobosphaera*, *Deasonia*, arachidonic acid, molecular identification

Сведения об авторах

Шибзухова Карина Ахмедовна – аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: karina_shibzuhova@rambler.ru

Гаврилова Ольга Владимировна – канд. биол. наук, доц. кафедры микробиологии биологического факультета СПбГУ. Тел.: 8-812-321-33-59; e-mail: avanti1958@inbox.ru

Чивкунова Ольга Борисовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: olga.chivkunova@mail.ru

Сидоров Роман Александрович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Лаборатории липидного обмена Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН. Тел.: 8-499-678-54-24; e-mail: roman.sidorov@mail.ru

Соловченко Алексей Евгеньевич – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

Лобакова Елена Сергеевна – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: elena.lobakova@rambler.ru