



УДК 582.263:577.115

Э. С. Челебиева, асп., Г. С. Минюк, к. б. н., с. н. с., И. В. Дробецкая, к. б. н., н. с.,
И. Н. Чубчикова, м. н. с.

Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского Национальной академии наук Украины, Севастополь, Украина

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
МИКРОВОДОРОСЛИ *ETTLIA CAROTINOSA* KOMÁREK 1989 (CHLOROPHYCEAE)
В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕССА**

Впервые приведены экспериментальные данные, характеризующие влияние химических активаторов вторичного каротиногенеза (CH_3COONa , NaCl и смеси FeSO_4 и H_2O_2) на динамику численности и размеров клеток и содержания в них суммарных каротиноидов у зелёной микроводоросли *Ettlia carotinos* Komárek 1989 при выращивании методом двухстадийной накопительной культуры

Ключевые слова: *Ettlia carotinos*, вторичный каротиногенез, численность и размеры клеток, суммарные каротиноиды

Данная работа является продолжением исследований особенностей вторичного каротиногенеза (ВКРГ) у зелёной микроводоросли *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (= *Neochloris wimmeri*, Archibald et Bold 1991; = *Chlorococcum wimmeri*, Kouwets 1995), начатых в 2011 г. в рамках скрининга новых коммерчески перспективных продуцентов природного астаксантина (АСТ) [8, 12 – 15]. Среди микроводорослей с ярко выраженной способностью к гиперсинтезу кетокаротиноидов (ККР) этот вид заслуживает особого внимания, прежде всего, благодаря своей филогенетической близости к *Haematococcus pluvialis* – «классическому» модельному объекту в исследованиях ВКРГ [15, 26] и пока ещё единственному среди микроводорослей промышленному источнику АСТ [18]. В настоящее время эволюционная близость родов *Haematococcus* и *Ettlia* (а именно, принадлежность к порядку Volvocales) убедительно подтверждена с использованием морфологических, ультраструктурных и молекулярно-генетических методов [1, 20, 28]. Так, по [23], использованный в нашей работе штамм *E. carotinos* (SAG 213-4 = АСКУ 573-06, рег. № в Генбанке GU 292342) по последовательности нуклеотидов в ядерном гене, кодирующем 18S рРНК, на 99 % идентичен *Haematococcus* sp. (штамм KORD103,

рег. № в Генбанке FJ877140) [22, 24]. Вместе с тем, *H. pluvialis* и *E. carotinos* существенно различаются между собой по ряду морфо-биологических и эколого-физиологических признаков. Гематоккоккус – планктонный монадный крупноклеточный вид, населяющий эфемерные пресноводные водоёмы [9, 21, 30]. Эттия – наземная микроводоросль с более мелкими (в 1.5 – 2 раза) безжгутиковыми клетками колониально-коккоидного морфотипа [1, 6]. При этом следует заметить, что подавляющее большинство из известных в настоящее время продуцентов АСТ, в том числе и исследованные нами ранее *Scotiellopsis rubescens*, *Bracteacoccus giganteus*, *B. minor*, *Pseudospongiococcum protococcoides* и *Chlorella zofingiensis* [13 – 15], являются, как и *E. carotinos*, обитателями эдафолитных и аэролитных биотопов. Включение данного вида в список объектов скрининга позволит получить сопоставимый фактический материал для анализа особенностей ВКРГ как у близкородственных видов, населяющих разные экологические ниши, так и у видов, далеких филогенетически, но сходных по требованиям к условиям окружающей среды.

Такой подход будет способствовать не только углублению представлений о ВКРГ как ключевом адаптационном механизме у микроводорос-

лей, подверженных частой смене состояний увлажнения и высыхания, но и корректировке направлений поиска новых промышленных источников ККР.

В предварительном эксперименте при выращивании *E. carotinos* по упрощённой схеме двухстадийной накопительной культуры, отличающейся от использовавшейся ранее [8] меньшим градиентом освещённости, более низкой (20 мМ) концентрацией ацетата натрия (NaAc) и отсутствием в стресс-комплексе NaCl, было показано, что этот вид отличается рядом характерных физиолого-биохимических признаков, в целом определяющих высокий среднесуточный выход АСТ из литра исходной культуры (не менее $5.5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$). Наиболее важными из них являются: а) активный спорогенез в ответ на индукцию ВКРГ; б) высокий выход суммарных каротиноидов ($\Sigma\text{КР}$) ($9.5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$); в) доминирование в составе $\Sigma\text{КР}$ эфиров АСТ ($\approx 60\%$) [12].

Целью настоящего исследования было оценить морфологические и физиолого-биохимические характеристики *E. carotinos* при использовании более жёстких приемов экспериментальной индукции биосинтеза ККР, основанных на внесении в среду химических активаторов ВКРГ в сочетании с увеличением облучённости клеток за счёт снижения их начальной численности. Основные задачи работы состояли в оценке влияния природы химических активаторов ВКРГ (NaCl, CH_3COONa и смеси FeSO_4 и H_2O_2) на динамику численности и размеров клеток, содержания сухого вещества и каротиноидов в культурах, клетках и биомассе водоросли на «красной» стадии двухстадийной накопительной культуры.

Материал и методы. Объектом исследования служил штамм Mainx (IBSS-91 = АСКУ 573-06 = SAG 213-4), переданный в ИнБИОМ НАНУ из коллекции кафедры ботаники Киевского национального университета им. Т. Шевченко. На I («зелёной») стадии водоросль выращивали методом накопительной культуры в конических колбах на модифицированной среде CHU-13 [31] с увеличенным содержанием N ($164.7 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) и P ($28.2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$). Интенсивность одностороннего бокового освещения (лампы «Feron» DL 28W 6400K) постепенно (с интервалом в 3 сут) увеличивали от 17 до $68 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Скорость продувки культуры воздушно-углекислотной смесью (0.1% CO_2 v/v) составляла $1.8 \text{ л} \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$, температура питательной среды – 22 – 24 °С. При численности клеток $6 \cdot 10^5 \cdot \text{кл} \cdot \text{мл}^{-1}$ и

остаточной концентрации N и P в среде 15.34 и 1.09 $\text{мг} \cdot \text{л}^{-1}$, соответственно, культуру использовали для проведения эксперимента по оценке интенсивности ВКРГ в зависимости от природы химических стресс-агентов. Индукцию ВКРГ в клетках водоросли осуществляли по разработанной ранее схеме путём резкого одновременного изменения комплекса ключевых физико-химических параметров среды [8]. Для этого в литровые конические колбы внесли по 130 мл исходной «зелёной» культуры, 1.15 мл 0.8 М раствора K_2HPO_4 и 0.2 мл маточного раствора микроэлементов (МЭ) для среды CHU-13 (наличие P и МЭ в среде в следовых количествах заметно ускоряет ВКРГ [15]). Активаторы ВКРГ вносили следующим образом: вариант (вар.) № 1 – контроль (без добавок); вар. № 2 – ацетат натрия (NaAc) до 50 мМ (для увеличения отношения C/N); вар. № 3 – хлорид натрия (NaCl) до 200 мМ (для создания осмотического шока); в) вар. № 4 – смесь сульфата железа II и пероксида водорода ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) до 0.45 мМ и 10^{-4} мМ, соответственно (для увеличения концентрации активных форм кислорода в клетках). Объём суспензии водорослей во всех колбах довели дистиллированной водой до 400 мл. В результате разведения концентрация N в среде снизилась до 4.95, а P – до $0.75 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, численность клеток – до $\approx 1.90 \cdot 10^5 \text{ кл} \cdot \text{мл}^{-1}$. Культуры перевели на круглосветное двухстороннее освещение при $E = 136 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ с каждой стороны. Температуру среды поддерживали в диапазоне 20 – 21 °С при помощи кондиционирования воздуха в помещении и охлаждения поверхности колб направленным потоком воздуха от вентилятора. Каждый из 4-х вариантов опыта выполняли в 2-х повторях.

Численность клеток в культурах (N) определяли путём счёта в камере Горяева [7]. Их линейные размеры (длину (L) и ширину (D)) устанавливали по микрофотографиям при помощи микроскопа Leica DM-1000, оснащённого цифровой камерой Leica Microsystem AG, и компьютерной программы ImageJ [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>]. Объёмы клеток (V) рассчитывали по формуле шара или вытянутого сфероида (при соотношении $L/D > 1.03$) [2]. Содержание сухого вещества (СВ) в культурах определяли весовым методом на нитроцеллюлозных мембранных фильтрах «Sartorius» (8 мкм). Пигменты из сырой биомассы экстрагировали как в [17]. Содержание $\Sigma\text{КР}$ в экстрактах анализировали спектрофотометрическим методом на СФ 46 (ЛОМО) по

Лихтенгалеру с использованием уравнений, предложенных для Chlorophyta [27].

$$\begin{aligned} C_{ХЛa} &= 11.24D_{661,6} - 2.04 D_{644,8} \\ C_{ХЛb} &= 20.13 D_{644,8} - 4.19 D_{661,6} \\ C_{\Sigma КР} &= (1000D_{470} - 1.9 C_{ХЛa} - 63.14 \\ &\quad C_{ХЛb}) / 214, \end{aligned}$$

где: $C_{ХЛa}$ – концентрация хлорофилла a , $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$;
 $C_{ХЛb}$ – концентрация хлорофилла b , $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$;
 $C_{\Sigma КР}$ – концентрация суммарных каротиноидов, $\text{мкг} \cdot \text{мл}^{-1}$ экстракта.

Среднюю скорость накопления $\Sigma КР$ в клетках рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{\Sigma КР_1 - \Sigma КР}{(t_1 - t)}$$

где: V – средняя скорость накопления $\Sigma КР$ в клетках, $\text{пг} \cdot \text{мкм}^{-3} \cdot \text{сут}^{-1}$; $КР_1$ и $КР$ – среднее содержание $\Sigma КР$ на 11-е и 0-е сутки, соответственно, $\text{пг} \cdot \text{мкм}^{-3}$; $t_1 - t$ – промежутки времени между определениями, сут.

Все аналитические измерения для каждой биологической повторности проводили трижды. Данные, приведенные на рисунках и в тексте, являются средними из значений, полученных для всех биологических и аналитических повторностей (\bar{x}). Рассеяние результатов относительно \bar{x} характеризуется выборочным стандартным отклонением (s) или ошибкой средней арифметической (m).

Результаты и обсуждение. Ранее при исследовании особенностей автотрофного роста *Ettlia carotinos* на различных питательных средах была отмечена высокая фенотипическая и функциональная гетерогенность лабораторных культур этого вида [12], определяющаяся характером деления клеток. В культуре эттлия 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 варибельность линейных размеров ($L = 4 - 15$ мкм; $D = 3 - 14$ мкм) и объёмов клеток ($V = 27 - 1340$ мкм³).

Ещё одна особенность вида (или данного штамма?), отмеченная также в [29], состоит в том, что в культурах этой водоросли всегда (даже при достаточном содержании элементов питания в среде) присутствуют вегетативные клет-

ки, содержащие АСТ. В противоположность этому, в клетках *H. pluvialis* и всех исследованных нами эдафобитных продуцентов ККР [13 – 15] вторичные каротиноиды (ВКР) появляются только при ухудшении условий среды (прежде всего, при остром дефиците азота) [9 – 11, 13 – 14].

Основу культуры, полученной в конце «зелёной» стадии (исходной для проведения данного эксперимента) составляли агрегированные в скопления или одиночные зелёные клетки среднего размера ($L = 8 - 11$ мкм, $D = 8 - 10$ мкм, $V = 268 - 576$ мкм³) с узким красным кольцом ККР вокруг ядра. Доля таких клеток в общем числе составляла около $\approx 49\%$. Около 20% приходилось на крупные делящиеся клетки с формирующимися внутри них зоо- и апланоспорами ($L = 15 - 16$ мкм, $V = 700 - 1125$ мкм³). Кроме того, в культуре присутствовали подвижные зооспоры (двухжгутиковыи клетки грушевидной формы с $L = 5.6 - 16$ мкм), только что осевшие зооспоры (мелкие шаровидные клетки с $L = 3 - 6$ мкм и $V = 30 - 60$ мкм³), молодые растущие вегетативные клетки ($L = 6 - 8$ мкм), а также немногочисленные крупные зрелые апланоспоры, полностью окрашенные ККР в красный цвет ($L = 11 - 13$ мкм и $V = 700 - 900$ 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. Несмотря на более жёсткое, по сравнению с предыдущим экспериментом, стресс-воздействие [12] численность клеток во всех культурах не только не снизилась (как это регистрировалось в экспериментах с *H. pluvialis* и эдафобитными видами из других порядков [5, 9 – 11, 13 – 15]), но и заметно увеличилась к концу «красной стадии» в вар. № 1, 2 и 4 (рис. 1 А).

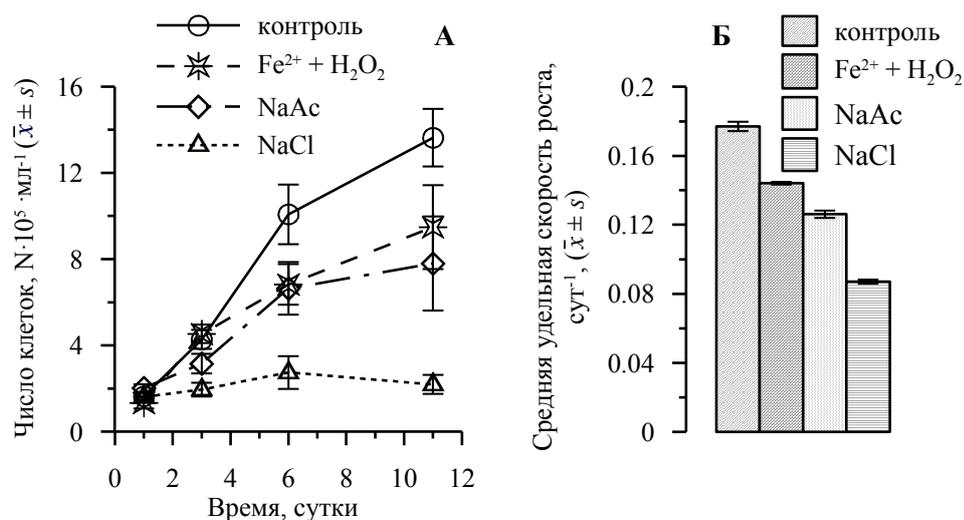


Рис. 1 Динамика численности клеток (А) и средняя удельная скорость роста (Б) культур *Ettlia carotinosa* на «красной» стадии культивирования в зависимости от химической природы стресс-агентов
 Fig. 1 Changes in the cell numbers (А) and specific growth rate (Б) of *Ettlia carotinosa* cultures during «red» cultivation stage depending on the chemical nature of the stress agents

В этих культурах клетки на протяжении первых 3-х суток размножались как зоо-, так и апланоспорами. В последующие дни при углублении дефицита питания наблюдалось только деление с образованием апланоспор. При этом ККР, содержащиеся в материнских клетках, распределялись между дочерними клетками. В зооспорах они концентрировались преимущественно в апикальной части вблизи жгутиков и реже (при делении полностью красных клеток) распределялись по всему объёму. В апланоспорах ККР были локализованы, как и у *H. pluvialis* [9, 10], сначала в виде красного кольца в перинуклеарной зоне цитоплазмы, а затем равномерно окрашивали всю клетку.

Необходимо отметить, что, несмотря на положительную динамику численности клеток в культурах с активаторами ВКРГ, все они угнетали спорогенез, и численность клеток в вариантах с добавками химических стрессоров на протяжении всего периода наблюдений была ниже, чем в контроле. Наиболее ярко это проявилось в культурах, подвергнутых солевому стрессу (вар. 4), где активизация деления была отмечена только на 6-е сутки, когда все клетки были уже красными. Характерной особенностью культур, подвергнутых воздействию NaCl, было отсутствие в них размножения зооспорами и более высокая степень агрегации клеток в хлопьевидные скопления.

В целом же следует ещё раз подчеркнуть особое положение *E. carotinosa* среди видов, уже протестированных нами в рамках скрининга зелёных микроводорослей как потенциальных источников АСТ. Такая высокая устойчивость водоросли к используемым нами моделям экспериментального стресса отмечена впервые и в общем плане может быть объяснена с позиции гипотезы о наличии положительной связи между степенью гетерогенности природных и лабораторных популяций микроводорослей и их выносливостью по отношению к повреждающим факторам среды [3, 4].

Конкретизация этих представлений применительно к *E. carotinosa* предполагает особое внимание к факту наличия в исходной культуре значительного пула вегетативных клеток, защищённых ККР от неконтролируемого развития окислительного стресса. Подтверждением тому могут быть данные, полученные нами ранее в экспериментах с *H. pluvialis* [11]. При стрессировании функционально однородных культур этого вида, состоящих из вегетативных монадных клеток, не содержащих ККР, смертность достигала 80 %, в то время как в гетерогенных культурах, включающих помимо монад неподвижные пальмеллы (еще зелёные, но уже с увеличенным отношением КР/ХЛ а), отход клеток снижался до 25 – 30 % (рис. 2).

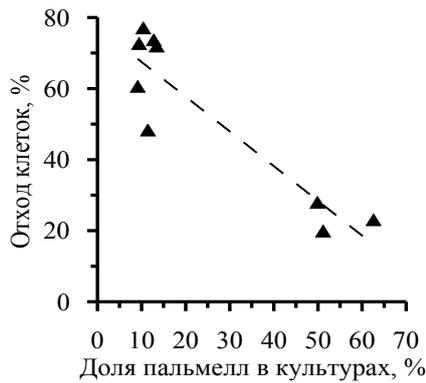


Рис. 2 Зависимость между долей пальмелл в культурах *H. pluvialis* и сокращением общей численности клеток при стресс-воздействии с использованием ацетата (0.45 мМ) и хлорида натрия (0.17 мМ)
 Fig. 2 The relationship between the part of palmell in cultures of *H. pluvialis* and reduction of total cell number under stress exposure with the use of sodium acetate (0.45 mM) and sodium chloride (0.17 mM)

Наличие в клетках исходной культуры вторичных каротиноидов (т.е. уже запущенного механизма трансляции генов, кодирующих

биосинтез АСТ) определило более быстрый, чем у других видов, метаболический ответ клеток этлия на комплексное стресс-воздействие. Уже через 3 – 4 ч все культуры приобрели бурый оттенок, тогда как в экспериментах с другими видами визуальные признаки ВКРГ проявлялись только через 10 – 12 ч. Раньше других изменение окраски было отмечено в варианте с добавлением инициаторов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – смеси Fe^{2+} и H_2O_2 (вар. № 4).

В конце «красной стадии» содержание $\Sigma КР$ ($37.34 \pm 0.34 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$) (рис. 3 А), их массовая доля в сухом веществе ($2.09 \pm 0.05 \%$) (рис. 3 Б) и среднесуточный выход из литра исходной культуры ($9.04 \pm 0.10 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}\cdot\text{сут}^{-1}$) (рис. 3 В) здесь были такими же высокими, как и в контроле (во всех случаях $P > 0.05$), хотя плотность культуры (кл. $\cdot\text{мл}^{-1}$) на завершающей стадии эксперимента была \approx в 1.4 раза ниже (рис. 1 А).

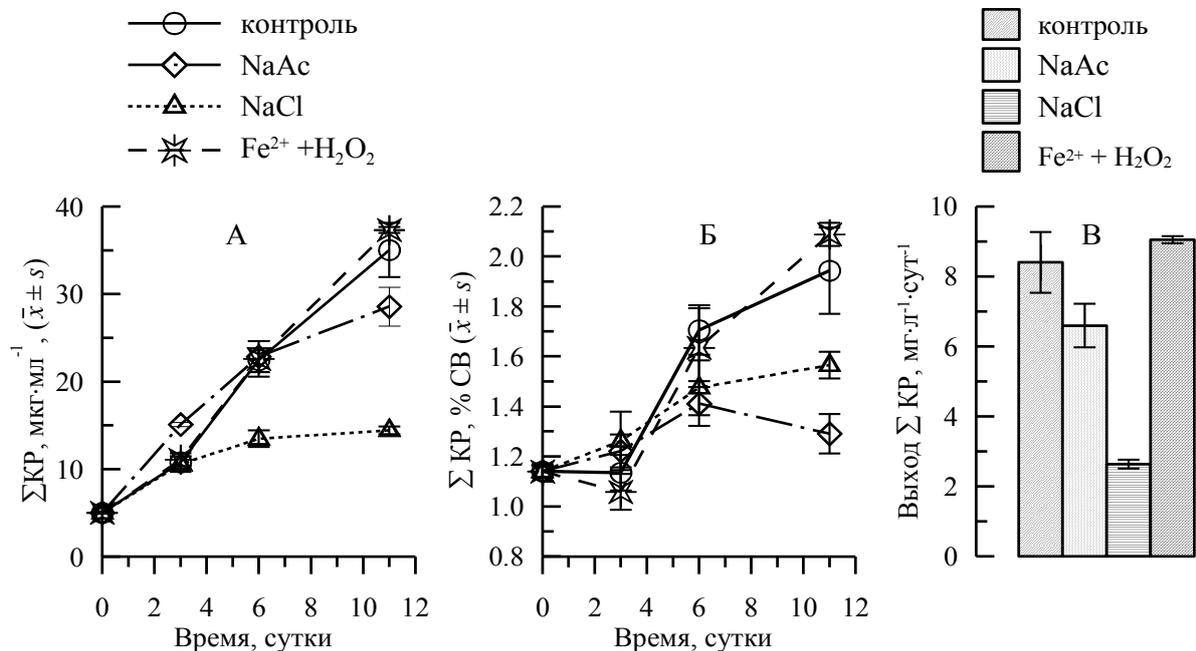


Рис. 3 Динамика содержания суммарных каротиноидов в культурах (А) и сухой биомассе (Б) *Ectlia carotinosa* и среднесуточный выход каротиноидов (В) в зависимости от химической природы стресс-агентов
 Fig. 3 The dynamics of total carotenoids in cultures (A) and dry biomass (Б) of *Ectlia carotinosa* and the average carotenoid yield (В), depending on the chemical nature of the stress agents

Анализируя описанные выше изменения в состоянии культур, заметим, что такие показатели, как выход Σ КР из литра культуры и его содержание в сухом веществе, широко используемые для характеристики продуцентов АСТ, далеко не всегда адекватно отражают интенсивность ВКРГ в клетках водорослей, так как зависят не только от скорости биосинтеза ККР, но и от выживаемости клеток и скорости накопления в них сухого вещества [8, 9]. Эти показатели в большей степени отражают биотехнологический потенциал вида. Для сравнительной оценки интенсивности ВКРГ в зависимости от условий среды, как правило, анализируют характер динамики и скорость накопления Σ КР и ключевых фракций ККР в расчёте на клетку. При исследовании особенностей ВКРГ у *H. pluvialis* мы, как и другие авторы, уделяли такому анализу основное внимание [9 – 11]. Однако результаты, полученные при работе с *E. carotinos*, свидетельствуют о том, что и этот подход имеет свои ограничения и может привести к ошибочной трактовке экспериментальных данных.

Дело в том, что активный спорогенез, продолжавшийся в течение «красной» стадии, привёл к существенному и неравнозначному уменьшению размеров клеток эттлии во всех вариантах эксперимента (в 1.8 – 6.8 раза) (рис. 4). На 11-е сут самыми мелкими были апланоспоры в культурах, стрессированных с добавлением в среду смеси $Fe^{2+} + H_2O_2$. В этом варианте только 4.6 % клеток имели объём выше 80 μm^3 , в то время как в условиях солевого стресса (вар. № 3) таких клеток было 86 %, а их средний объём из-за ингибирования деления был в 2.3 – 4.4 раза выше, чем в других вариантах. Эта особенность существенно отличает *E. carotinos* от *H. pluvialis*, у которого в сходных условиях деление сохранивших жизнеспособность клеток прекращается, и средний объём апланоспор по мере их созревания увеличивается до среднего объёма пальмелл или в отдельных случаях превышает его [9 – 11].

Столь значительная вариабельность размеров клеток в зависимости от стадии кле-

точного цикла и характера стресс-воздействия не позволяет использовать показатели, основанные на содержании каротиноидов в расчёте на клетку, для характеристики интенсивности стресс-реакции этой водоросли на негативное внешнее воздействие. Например, в контрольных культурах равенство содержания Σ КР в клетках в начале и конце «красной стадии» ($\approx 26 \mu g \cdot \mu l^{-1}$) (рис. 5 А) без учёта уменьшения их среднего объёма (рис. 4) может быть интерпретировано как отсутствие ВКРГ в культурах, стрессированных без использования химических добавок. На самом деле в клетках, различающихся по объёму в 5 раз, содержалось одинаковое количество Σ КР. В таких случаях внутриклеточное содержание пигментов более корректно рассчитывать на единицу объёма (μm^3) 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 наблюдалась не при повышенной солёности, как это вытекает из рис. 5А, а при включении в стресс-комплекс химических промоторов ПОЛ – смеси Fe^{2+} и H_2O_2 (рис. 5 Б, В).

Средняя скорость накопления Σ КР в единицу объёма клетки (63.9 ± 1.0) $10^{-3} \mu g \cdot \mu m^{-3} \cdot \text{сут}^{-1}$) при действии на них смеси $Fe^{2+} + H_2O_2$ (непосредственных инициаторов образования активных форм кислорода) была в 2.5 раза выше, чем в контроле. Выход Σ КР из литра исходной культуры, являющийся результирующей скорости деления и скорости биосинтеза пигментов в клетках, в обоих вариантах был сходным: соответственно 8.4 ± 0.9 и $9.0 \pm 0.1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ (рис. 3 В).

Реакция культур *E. carotinos* на внесение в питательную среду ацетата натрия до концентрации 50 мМ существенно отличалась от ярко выраженной двойственной реакции *H. pluvialis* на аналогичное воздействие. У планктонного вида на фоне 45 % смертности монадных клеток наблюдалось не только существенное ускорение биосинтеза КР в формирующихся апланоспорах, но и достоверное увеличение среднесуточного выхода Σ КР из литра культуры [5].

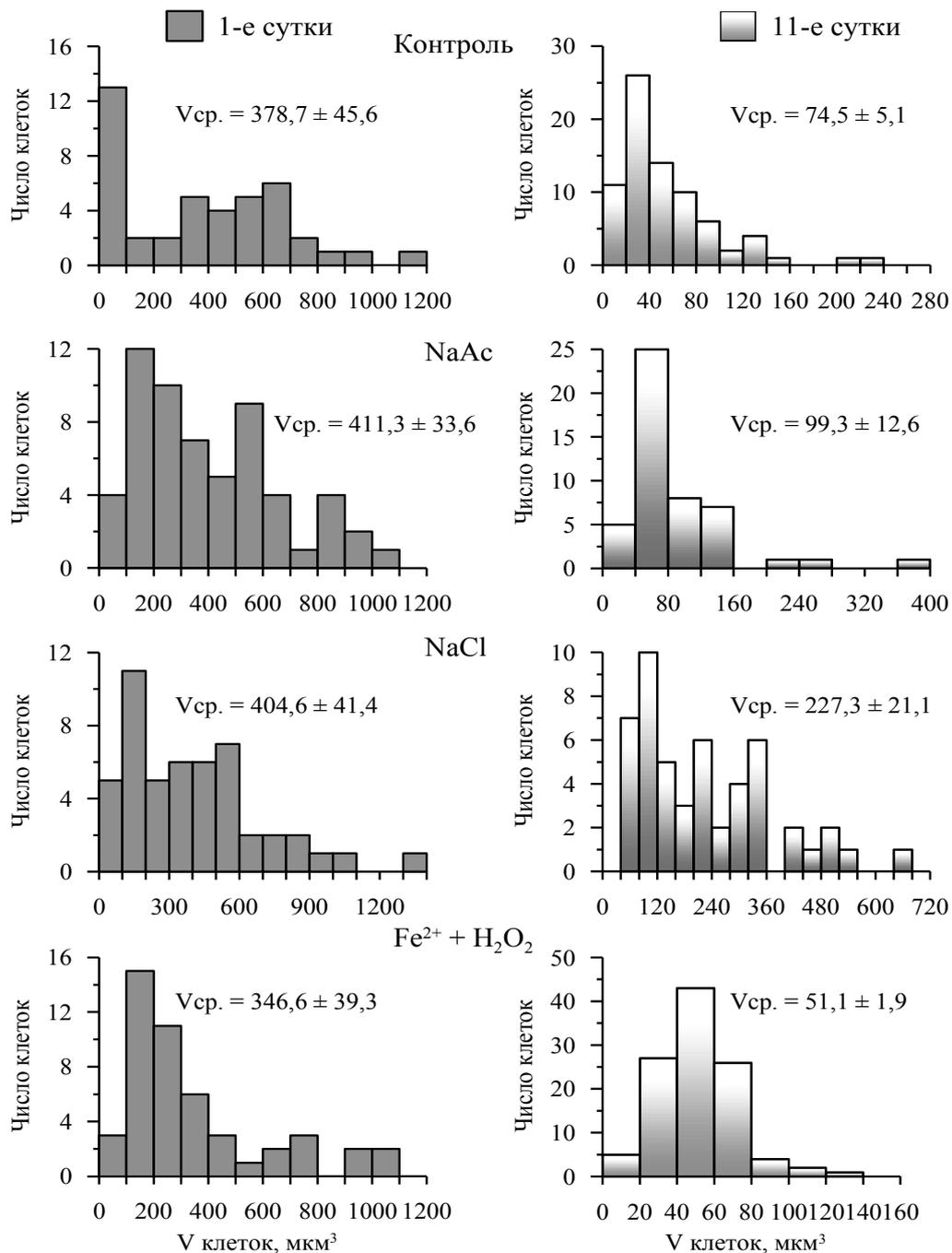


Рис. 4 Гистограммы распределения клеток *E. carotinosa* по объёму в 1-е и 11-е сутки «красной» стадии культивирования в зависимости от природы химических стресс-агентов
 Fig. 4 Histograms of the distribution of *E. carotinosa* cells by volume in the 1st and 11th day of the «red» cultivation stage, depending on the nature of the chemical stress agents

В культурах этлии, как уже отмечено, массового отмирания вегетативных клеток не происходило. По сравнению с контролем наблюдалось незначительное увеличение среднего объёма апланоспор. Хотя и в том, и в

другом случае модальную группу (30 – 34% от общего числа клеток) составляли мелкие клетки с $V = 20 - 40 \mu m^3$, доля более крупных клеток с $V > 80 \mu m^3$ здесь была выше (рис. 4).

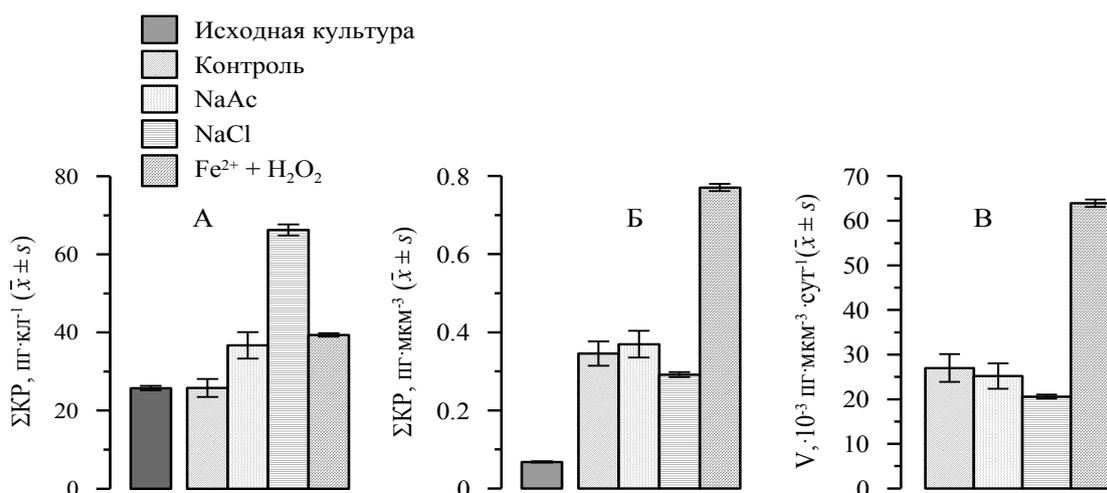


Рис. 5 Содержание суммарных каротиноидов в расчёте на клетку (А) и единицу объёма клетки (Б) в начале и конце «красной» стадии и средняя скорость накопления пигментов (В) в зависимости от природы химических стресс-агентов

Fig. 5 Total carotenoid content per cell (A) and per unit cell volume (Б) at the beginning and end of the «red» stage and mean pigment accumulation rate (B), depending on the nature of the chemical stress agents

Поэтому более высокий уровень $\Sigma\text{КР}$ в клетках (рис. 5 А) отражал не столько интенсификацию ВКРГ ацетатом, сколько особенности размерной структуры популяций. Подтверждением тому являются отсутствие различий между сравниваемыми вариантами по скорости накопления $\Sigma\text{КР}$ в единице объёма апланоспор ($(27.0 \pm 0.3) \cdot 10^{-2}$ и $(25.2 \pm 2.8) \cdot 10^{-2}$ $\text{pg} \cdot \text{кл}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$) и самое низкое из всех вариантов содержание $\Sigma\text{КР}$ в биомассе (1.3 ± 0.1 % СВ), собранной в конце эксперимента (рис. 3 Б).

Сходная картина зарегистрирована и варианте с внесением в культуры этлии хлорида натрия до концентрации 200 мМ. И в этом случае усиления биосинтеза ВКР по сравнению с контролем не наблюдалось. Самое высокое среди всех вариантов содержание $\Sigma\text{КР}$ в расчёте на клетку определялось более крупными размерами апланоспор. Скорость накопления $\Sigma\text{КР}$ в единице объёма клетки (рис. 5 В), их массовая доля в сухом веществе (рис. 3 Б) и среднесуточный выход (рис. 3 В) в условиях повышенной солёности были ниже, чем в контроле (по выходу $\Sigma\text{КР}$ этот вариант уступал контрольному в 3 раза).

Такая необычная для продуцентов АСТ реакция водоросли на неоднократно апробиро-

ванные активаторы ВКРГ [5, 9 – 11, 13 – 16, 26], по всей вероятности, объясняется постоянным присутствием в вегетативных клетках этого вида (или только данного штамма?) пула кетокаротиноидов [12], удерживающих в момент стресс-воздействия уровень активных форм кислорода от неуправляемого лавинообразного нарастания и в значительной мере нивелирующее действие химических стресс-агентов. Дальнейшее накопление каротиноидов в созревающих апланоспорах способствует стабилизации процессов ПОЛ на уровне, позволяющем вегетативным клеткам сохранить жизнеспособность путём перехода из стадии активной жизнедеятельности в стадию покоя.

Выводы. Резюмируя приведенные выше результаты, отметим некоторые специфические черты экспериментально индуцированного ВКРГ у *E. carotinos*, существенно отличающие этот вид от исследованных ранее продуцентов ККР. **1.** Лабораторные периодические культуры *E. carotinos* (штамм SAG 213-4 = АСКУ 573-06) на всех стадиях развития характеризуются высокой фенотипической и функциональной гетерогенностью. Их главная особенность, определяющая характер физиологического ответа на стресс-воздействие, – наличие значительного резерва паль-

меллоидных клеток, способных быстро перейти к делению и содержащих в перинуклярной зоне цитоплазмы некоторое количество вторичных каротиноидов ($\approx 7 \cdot 10^{-2}$ пг·мкм³). **2.** Резкое стрессирование культур путём одновременного изменения комплекса ключевых физико-химических параметров среды вызывает у *E. carotinos* активный спорогенез, в результате которого численность клеток в культурах в постстрессорный период увеличивается, а их объём существенно (\approx в 2 – 7 раз) уменьшается. **3.** Дополнительное усиление стресс-воздействия при помощи химических активаторов ВКРГ: NaAc (50 мМ), NaCl (200 мМ) и FeSO₄ (0,45 мМ) + H₂O₂ (10⁻¹ мкМ) подавляет спорогенез, причём наиболее сильным ингибитором деления клеток является NaCl. **4.**

Из трёх апробированных в данном исследовании химических стресс-агентов чётко выражено положительное влияние на интенсивность биосинтеза вторичных каротиноидов в клетках *E. carotinos* оказывала только смесь сульфата железа II и гидропероксида. Средняя скорость накопления Σ КР в расчёте на единицу объёма клетки ($63.9 \cdot 10^{-2} \cdot \text{пг} \cdot \text{мкм}^{-3} \cdot \text{сут}^{-1}$) в этом варианте была в 2.5 раза выше, чем в контроле при среднесуточном выходе Σ КР равном $8.4 \pm 0.9 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю признательность зав. кафедрой ботаники Киевского национального университета им. Т. Шевченко д. б. н., проф. И. Ю. Костикову за предоставление штамма *Ettlia carotinos* из коллекции АСКУ.

1. Андреева В. М. Почвенные и аэрофильные зелёные водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorocarcinales). – СПб.: Наука, 1998. – 351 с.
2. Брянцева Ю. В., Курилов А. В. Расчет объемов клеток микроводорослей и планктонных инфузорий Черного моря. – Севастополь, 2003. – 20 с.
3. Гапочка Л. Д. Об адаптации водорослей. – М.: Изд-во МГУ, 1981. – 80 с.
4. Гродзинский Д. М. Надежность растительных систем. – Киев: Наукова думка, 1983. – 365 с.
5. Данцюк Н. В. Влияние ацетата натрия на интенсивность вторичного каротиногенеза у зелёной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* // Экология моря. – 2010. – Спец. вып. 80: Биотехнология водорослей. – С. 44 – 50.
6. Костіков І. Ю., Романенко П. О., Демченко Е. М. і інш. Водорості ґрунтів України (історія та методи дослідження, система, конспект флори). – Київ: Фітосоціоцентр, 2001. – 300 с.
7. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – Киев: Наук. думка, 1975. – С. 228 – 230.
8. Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н. и др. Скрининг зелёных микроводорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. Актуальность, стратегия и тактика исследований // Экология моря. – 2010. – Спец. вып. 80: Биотехнология водорослей – С. 67 – 78.
9. Минюк Г. С., Терентьева Н. В., Дробецкая И. В. Сравнительная характеристика морфологических и физиолого-биохимических признаков трех штаммов *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyta, Chlamydomonadales) // Альгология – 2007. – 17, № 2. – С. 148 – 159.
10. Минюк Г. С., Ерохин В. Е., Гордиенко А. П. и др. Физиолого-биохимические и биофизические характеристики одноклеточной водоросли *Haematococcus pluvialis* – перспективного источника природного астаксантина / Микроводоросли Чёрного моря: проблемы сохранения биоразнообразия и биотехнологического использования. – Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2008. – С. 353 – 378.
11. Терентьева Н. В., Дробецкая И. В., Чубчикова И. Н. и др. Влияние освещённости на физиолого-биохимические характеристики зелёной микроводоросли *Haematococcus pluvialis* (Chlamydomonadales) // Экология моря. – 2008. – Вып. 75. – С. 82 – 88.
12. Челебиева Э. С. Скрининг одноклеточных зелёных водорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. 3. Введение в лабораторную культуру и первичная оценка биотехнологического потенциала *Ettlia carotinos* // Морск. экол. журн. – 2011. – Отд. вып. № 2. – С. 96 – 112.
13. Чубчикова И. Н., Дробецкая И. В., Минюк Г. С. и др. Скрининг одноклеточных зелёных водорослей как потенциальных источников природных кетокаротиноидов. 2. Особенности роста и вторичного каротиногенеза у представителей рода *Bracteacoccus* (Chlorophyceae) // Морск. экол. журн. – 2011. – 10, № 1. – С. 91 – 97.
14. Чубчикова И. Н., Минюк Г. С., Дробецкая И. В., Данцюк Н. В. Хлорококковые микроводоросли как потенциальный источник природных кетокаротиноидов // Экология моря. – 2009. – Вып.

77. – С. 77 – 83.
15. Чубчикова І. Н., Мінюк Г. С., Дробецька І. В. Вторичний каротиногенез у зеленої мікроводорослі *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. в умовах природної освітленості та температури. – Екологія моря. – 2010. – Спец. вип. 81: Управління біосинтезом гідробіонтів. – С. 77 – 81.
 16. Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response // *Physiol. Plant.* – 2000. – **108**. – P. 111 – 117.
 17. Britton G. Worked examples of isolation and analysis carotenoids / Carotenoids. – Vol.1 A: Isolation and Analysis. – Basel: Birkhauser, 1995 – P. 199 – 225.
 18. Cysewski G.R.; Lorenz R.T. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products—species of high potential: *Haematococcus* / Handbook of Microalgal Culture, Biotechnology and Applied Phycology. – Oxford: Blackwell Science, 2004. – P. 281 – 288.
 19. Davies B. H., Hsu W. J., Chichester C. O. The mechanism of the conversion of beta-carotene into canthaxanthin by the brine shrimp *Artemia salina* L. (Crustacea: Branchiopoda) // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1970. – **33**. – P. 601 – 615.
 20. Deason T. R., Silva P. C., Watanabe S., Floyd G. L. Taxonomic status of the species of the green algal genus *Neochloris*. – *Pl. Syst. Evol.* – **177**, No 3 – 4. – P. 213 – 219.
 21. Elliot A M. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis* // *Arch. Protistenk.* – 1934. – **82**. – P. 250 – 272.
 22. *Ettlia carotinos* strain SAG 213-4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence. – GenBank: GU 292342. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/283827865>.
 23. Guiry M.D., Guiry G.M. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication. – Galway: National University of Ireland, 2012. – <http://www.algaebase.org>;
 24. *Haematococcus* sp. KORDI03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence. – GenBank: FJ877140.1. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/269148116>.
 25. Komarek J. Polynuclearity of vegetative cells in coccoid green algae from the family Neochloridaceae. – *Arch. Protistenk.* – 1989. – **137**. – P. 255 – 273.
 26. Lemoine Y., Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress // *Photosynth. Res.* – 2010. – **106**. – P. 155 – 177.
 27. Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes // *Methods Enzym.* – 1987. – **148**. – P. 350 – 382.
 28. Neustupa J., Eliáš M., Skaloud P. et al. *Xylochloris irregularis* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel subaerial coccoid green alga // *Phycologia*. – 2011. – **50**, No 1. – P. 57 – 66.
 29. Orosa M., Valero J. F., Herrero C. et al. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions // *J. Biotechnol. Lett.* – 2001. – **23**, No 13. – P. 1079 – 1085.
 30. Proctor V. W. Some Controlling Factors in the Distribution of *Haematococcus pluvialis* // *Ecology*. – 1957. – **38**, No. 3. – P. 457 – 462.
 31. Yamaguchi K., Nakano H., Murakami M. et al. Lipid composition of a green alga *Botryococcus braunii* // *Agric. Biol. Chem.* – 1987. – **51**, No 2. – P. 493 – 498.

Поступила 06. юня 2012 г.
Після доработки 07. фебруаля 2013 г.

Фізіолого-біохімічні характеристики *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (Chlorophyceae) в умовах експериментального стресу. Е. С. Челебієва, Г. С. Мінюк, І. В. Дробецька, І. М. Чубчикова. Вперше наведено експериментальні дані, що характеризують вплив хімічних активаторів вторинного каротиногенезу (CH_3COONa , NaCl та суміші FeSO_4 і H_2O_2) на динаміку чисельності і розмірів клітин і вмісту в них сумарних каротиноїдів у зеленій мікроводорослі *Ettlia carotinos* Komárek 1989 при вирощуванні методом двохстадійної накопичувальної культури.

Ключові слова: *Ettlia carotinos*, вторинний каротиногенез, чисельність і розміри клітин, сумарні каротиноїди

Physiological and biochemical characteristics of *Ettlia carotinos* Komárek 1989 (Chlorophyceae) under experimental stress condition. E. S. Chelebieva, G. S. Minyuk, I. V. Drobetskaya, I. N. Chubchikova. For the first time the experimental data characterizing the effect of chemical activators of secondary carotenogenesis (CH_3COONa , NaCl and mixture of FeSO_4 and H_2O_2) on population dynamics, size of cells and total content of carotenoids in green algae *Ettlia carotinos* Komárek 1989 grown in a two-stage batch culture have been reported.

Key words: *Ettlia carotinos*, secondary carotenogenesis, cell numbers, cell sizes, total carotenoids