

# Identification and comprehensive characterization of a new soil strain of carotenogenic microalgae *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 (Chlorophyta)

Chubchikova I.N.<sup>1\*</sup>, Dantsyuk N.V.<sup>1</sup>, Drobetskaya I.V.<sup>1</sup>, Temraleeva A.D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, 2 Nakhimov Ave., Sevastopol, 299011, Russian Federation

<sup>2</sup> All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Russian Federation

**ABSTRACT.** We conducted a complex study of the new green microalgae strain VKM AI-296, isolated from arable soil and identified as *Chlorosarcinopsis* sp. (Chlamydomonadales, Chlorophyta), using molecular phylogenetic analysis (18S rDNA and ITS2 sequences) and light and scanning electron microscopy. The strain's morphology, growth, and carotenogenesis during two-stage batch cultivation were studied. In a liquid medium, the cells occurred singly or in packages surrounded by extracellular mucilage, with cell sizes of 3-6 µm. By the end of the "green" stage (vegetative growth) lutein was the predominant pigment, accounting for >60% of the total carotenoids. Other primary carotenoids were also present: beta-carotene (14.6%), neoxanthin (11.1%), and antheraxanthin (7.1%). At the end of the "red" (secondary carotenogenesis) stage, the culture's dry biomass content was 1.92 ± 0.04 g/L, with carotenoids accounting for 0.3% of the dry biomass. The pigment profile was dominated by ketocarotenoids: astaxanthin (mono- and diesters), canthaxanthin, and adonixanthin monoesters (35%, 21% and 20% of the total carotenoid content, respectively). Over the entire cultivation period (17 days), the average biomass productivity and total carotenoid productivity were 0.10 g/L/day and 0.2 mg/L/day, respectively. *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 may be a perspective object of further research aimed at optimizing cultivation conditions as a source of lutein at the "green" stage, as well as canthaxanthin and esters of astaxanthin and adonixanthin at the "red" stage.

**Keywords:** *Chlorosarcinopsis* sp., cell morphology, molecular phylogenetic analysis, two-stage batch culture, secondary carotenoids, thin-layer chromatography

**For citation:** Chubchikova I.N., Dantsyuk N.V., Drobetskaya I.V., Temraleeva A.D. Identification and comprehensive characterization of a new soil strain of carotenogenic microalgae *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 (Chlorophyta) // Limnology and Freshwater Biology. 2026. - № 2. - P. 78-102. DOI: 10.31951/2658-3518-2026-A-2-78

## 1. Introduction

*Chlorosarcinopsis* is a genus of microalgae within the order Chlamydomonadales (Chlorophyta), commonly found in terrestrial environments, particularly in arid and semi-arid deserts (Friedmann and Ocampo-Paus, 1965; Andreeva, 1998; Lewis and Lewis, 2005; Hall et al., 2010; Khani-Juyabad et al., 2019).

Soil is home to a variety of microorganisms, including bacteria, fungi, protozoa, and microalgae. Unlike planktonic microalgae, whose habitat conditions, as a rule, vary insignificantly with the seasons and daytime, soil microalgae, living on the soil's surface or in its upper horizons, are subjected to permanent stress,

enduring diurnal and seasonal fluctuations of environmental conditions. These are dramatic changes in irradiance, temperature, moisture, nutrient availability, etc. The key link in the survival strategy of soil species, including microalgae of the genus *Chlorosarcinopsis*, in conditions of severe abiotic stress is the ability to secondary carotenogenesis (SC) associated with the ability of cells to rapidly transition from the state of active vegetation to the resting stage and vice versa. Ketocarotenoids (KCar) are a group of pigments that are neither structurally nor functionally related to the photosynthetic apparatus (Lemoine and Schoefs, 2010; Solovchenko, 2013). Their functions include shielding the nucleus and cellular organelles, utilizing excess

\*Corresponding author. E-mail address: [chubchikova\\_in@ibss-ras.ru](mailto:chubchikova_in@ibss-ras.ru) (I.N. Chubchikova)

**Received:** December 17, 2025;

**Accepted after revised:** February 27, 2026;

**Available online:** April 24, 2026

© Author(s) 2026. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



photosynthates, and “quenching” reactive oxygen species and preventing their formation (Solovchenko, 2013; Remias et al., 2016). The natural KCar astaxanthin is widely used in pharmaceuticals, nutraceuticals, cosmetics, dietetics, and aquaculture, and its range of applications is rapidly expanding. It is safe for human consumption, unlike its synthetic analogue, which is only approved for aquaculture (Nair et al., 2023).

Regarding this, in recent decades, much attention has been paid to the study of the SC process as a key adaptation mechanism in extremobiont green microalgae of different taxonomic and ecological groups. The bulk of information about SC patterns in unicellular microalgae was obtained from examples of a limited number of planktonic, soil and aerophytic species from the orders Chlamydomonadales and Sphaeropleales (*Haematococcus lacustris*, *Chromochloris zofingiensis*, *Coelastrella rubescens*, *Bracteacoccus pseudominor*, and *B. minor*) (Minyuk et al., 2014; 2017; Chelebieva et al., 2018; Minyuk et al., 2020; Malik et al., 2022). However, the diversity of carotenogenic microalgae species is much greater than is commonly believed. Advances in high-throughput whole-genome sequencing have identified orthologs of  $\beta$ -carotene ketolase, the key enzyme responsible for the synthesis of KCar from  $\beta$ -carotene, across the genomes of numerous microalgal species (Jeffers and Roth, 2021). Therefore, further search for commercially promising producers of KCar (astaxanthin and its metabolic precursors) and development of methods for their industrial cultivation remains relevant (Chubchikova et al., 2009; 2012; Minyuk et al., 2014; Chen et al., 2017; Minyuk et al., 2017; Marchenko et al., 2019; Minyuk et al., 2019; 2020; Doppler et al., 2022; Saito et al., 2023).

An additional adaptation mechanism enhances the survival strategy of sarcinoid microalgae, allowing them to successfully withstand abrupt changes in environmental conditions. This is the ability to produce copious amounts of mucilage—the so-called “mucous membranes” and “wrappers”. The main component of mucilage is extracellular hydrophilic colloidal polysaccharides dominated by galactose, glucose, and rhamnose (Gollerbach and Shtina, 1969; Laroche, 2022). The matrix performs several functions. It ensures the attachment of cells to each other, protects them from contamination and abrupt biotic and abiotic stresses, smoothing out jumps in insolation, humidity, and temperature, especially for cells located within the cellular aggregate. In addition to polysaccharides, the mucus contains low-molecular protein compounds. There is information on the active growth of *Chlorosarcinopsis* spp. on mixo- and heterotrophic media under laboratory conditions (Cherdchukeattisak et al., 2018; Vasistha et al., 2021), which suggests the use of mucilage during periods of starvation as an available organic source of carbon and nitrogen.

These features of sarcinoid microalgae suggest that, under conditions of mass open cultivation, the survival rate of such species will be significantly higher than that of more sensitive planktonic species, which may have a positive effect on the KCar and biomass productivity.

The two-stage batch culture method (Boussiba, 2000; Fábregas et al., 2001; Minyuk et al., 2017) enables comprehensive studies of strains, including optical and scanning electron microscopy, molecular phylogeny, and evaluation of production characteristics during both active growth and secondary carotenogenesis.

The aim of this study was to investigate the strain VKM Al-296 using a polyphase method in a two-stage batch culture.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Strain origin

The object of the study was a soil microalgal strain VKM Al-296 isolated from arable typical chernozem in the Stavropol Territory, Russian Federation (45°07'N, 42°01'E) in 2018. Unialgal culture was obtained as described by Temraleeva et al. (2014). The soil suspension was transferred to BG-11 agar plates (1.5% agar, pH 7.2) and incubated under constant conditions until cell colonies appeared. The cultivation regime was as follows: temperature 23–25 °C, photoperiod 12 h light: 12 h dark, and photosynthetic photon flux density (PPFD) 60–75  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$  provided by cool white fluorescent lamps. Individual colonies were scraped off and repeatedly subcultured under the same conditions until an algologically pure culture was obtained.

The strain was initially deposited in the Algological Collection (ACSSI) of the Institute of Physicochemical and Biological Problems in Soil Science, Russian Academy of Sciences (RAS), under the number ACSSI 296. Subsequently, it was transferred to the All-Russian Collection of Microorganisms (VKM) of the Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, where it was assigned the number VKM Al-296.

### 2.2. Morphological analysis

The morphological characteristics and life cycle of the strain VKM Al-296 were studied using light microscopy (LM) with a Leica DM750 microscope (Germany). Images were captured using a Leica Flexicam C3 color digital camera (Germany), and observations were conducted over a period ranging from two weeks to six months.

For scanning electron microscopy (SEM), the cells were fixed with 2% glutaraldehyde in 10-fold diluted 66.7 mmol Na-K phosphate buffer (pH 7.34) at 4°C for 24 hours. The sample was then postfixed with a 0.005% Lugol's iodine solution and dehydrated through a graded series of ethanol solutions with increasing concentrations, following the protocol described by Chubchikova et al. (2022). SEM imaging was performed using the Hitachi SU3500 scanning electron microscope (Japan).

### 2.3. DNA extraction, PCR, and sequencing

Total DNA was extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA) following the manufacturer's

instructions. The nucleotide sequences of the 18S rDNA and ITS2 regions were amplified using the Screen Mix-HS reagent (Evrogen, Russia). The primers and amplification conditions were selected based on articles described by White et al. (1990) and Katana et al. (2001), with details provided in Table 1. PCR amplifications were carried out using a Gradient T100 thermal cycler (Bio-Rad, USA). The target PCR products were visualized by electrophoresis on a 1% agarose gel. Following electrophoresis, the PCR products were purified using the Cleanup Mini kit (Evrogen, Russia) according to the manufacturer's protocol. The purified PCR products were then sent for sequencing to Evrogen (Russia).

## 2.4. Phylogenetic analysis

The obtained nucleotide sequences were deposited in the GeneBank database under the following accession numbers: MT338814 (18S rDNA) and MT340909 (ITS2). To identify closely related sequences, the BLASTn algorithm from NCBI was utilized. For phylogenetic analysis, two datasets were constructed:

1. The 18S rDNA dataset included 70 sequences from various representatives of the order Chlamydomonadales, including clades such as Arenicolinia, Stephanosphaerina, and Chlorogonia. Authentic strains of the genus *Gungnir* (Dunaliellinia clade) were used as the outgroup.
2. The ITS2 dataset included 66 sequences from all representatives of the Arenicolinia clade, including uncultured species, with authentic strains of *Chlorococcum isabeliense* (Stephanosphaerina clade) serving as the outgroup.

Taxonomic names were standardized according to the AlgaeBase database (Guiry and Guiry, 2025).

Multiple sequence alignment was performed using the MAFFT online tool (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/mafft>). The best-fitting evolutionary model for each locus (18S rDNA and ITS2) was determined using the Akaike Information Criterion (AIC) implemented in jModelTest version 2.1.10 (Darriba et al., 2012). For maximum likelihood (ML) analysis, 1,000 bootstrap replicates were generated for each

dataset using the PhyML program. Statistical support for the branches was assessed using bootstrap probabilities (BP). Bayesian inference (BI) was conducted using the BEAST software version 1.8.4. Two runs of  $10^8$  generations were performed, with sampling every  $10^4$  generations, and the first 25% were discarded as burn-in. Convergence of Markov chains was confirmed by ensuring ESS (Effective Sample Size) values  $> 200$ , and the results were visualized using the Tracer ver. 1.5 program. A consensus tree was generated using TreeAnnotator ver. 1.8.4, with branch support measured using Bayesian posterior probabilities (PP). Genetic distances were calculated in the MEGA 6 program using the Kimura 2-parameter model. For ITS2 secondary structure analysis, the sequences were folded using the RNAfold web server (<https://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>), following the principle of minimum free energy. The accuracy of the predicted secondary structures was assessed based on guidelines from Caisová et al. (2013). Comparison of ITS2 secondary structures, identification of conserved motifs, and analysis of compensatory base changes (CBCs) were performed using the 4SALE 1.7 software (Seibel et al., 2006). CBC approach, as proposed by Coleman (2000; 2003; 2009), was employed to distinguish species based on ITS2 sequences. Finally, the ITS2 secondary structures were visualized using the PseudoViewer3 software (Byun and Han, 2009).

## 2.5. Cultivation condition

The strain was cultivated using a two-stage batch culture method (Boussiba, 2000; Fábregas et al., 2001) in BBM nutrient medium (Bischoff and Bold, 1963). Microalgae were grown in three biological replicates using 0.75 L plastic Tissue Culture Flasks ("Falcon", USA). The culture volume was 0.6 L, with initial dry biomass (DW) content 0.3 g/L.

The first ("green") stage lasted nine days and was conducted under the following cultivation conditions: unilateral illumination provided by cold-white LED lamps "Feron" DL 20W T4 6400K, (Russia), photosynthetic photon flux density (PPFD) of 130  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$  (as measured at the side surface of flasks), with a light mode of 15:9 h (light/dark), temperature

**Table 1.** Primers and amplification conditions for PCR.

Locus	Primers	Sequence (5'–3')	Amplification conditions
18S rDNA	F	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	95°C, 5 min; 95°C, 1 min, 55°C, 1 min, 72°C, 2 min, 35 cycles; 72°C, 5 min
	R	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTACG	
	402–23F*	GCTACCACATCCAAGGAAGGCA	
	1323–44F*	CGAACGAGACCTCAGCCTGCTA	
	416–37R*	ATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCC	
	898–919R*	TAAATCCAAGAATTTACCTCT	
	1308–39R*	CTCGTTCGTTAACGGAATTAACC	
	1636–57R*	GGTAGGAGCGACGGCGGTGTG	
ITS2	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	95°C, 3 min; 95°C, 30s, 52–57°C, 30 s, 72°C, 40 s, 35 cycles; 72°C, 10 min
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

**Note:** \* internal sequencing primers.

28 ± 0.5 °C, and continuous air bubbling at a rate of 0.44 L/min/L. The culture pH was maintained at 7.0 ± 0.05 with CO<sub>2</sub> supply from a gas cylinder during 8 h, controlled by an Aqua Medic pH2001C system (Germany) equipped with a Camozzi A7E solenoid valve (Italy).

To induce the “red” stage, the culture was transferred to bilateral 24-hour illumination with the same PPF on each side and a temperature of 28–29 °C. The CO<sub>2</sub> supply remained unchanged. Additionally, a 1% NaCl solution was added to a final concentration of 5 mmol. The “red” stage lasted 8 days.

## 2.6. Monitoring of the culture growth

Growth characteristics of the strain were evaluated by monitoring biomass dynamics. DW content (g/L) was determined gravimetrically on nitrocellulose membrane filters “Sartorius” (Germany) with a pore size of 3.0 μm (Vonshak, 1985). The biomass on the filters was washed with distilled water (three or four times, 15 mL each) to remove mucilage. The specific growth rate ( $\mu$ ) and productivity of cultures ( $P$ ) were calculated using the method described by Wood et al. (2005).

$$\mu = \ln(DW_1 / DW_0) / (t_1 - t_0) \quad (1)$$

$$P = (DW_1 - DW_0) / (t_1 - t_0) \quad (2)$$

where  $P$  is the average productivity, g/L/day;

DW<sub>0</sub>—initial DW, g/L;

DW<sub>1</sub>—the final DW, g/L;

t<sub>1</sub>—t<sub>0</sub>—growth period, days;

$\mu$ —specific growth rate, day<sup>-1</sup>.

## 2.7. Pigment assay

Pigment concentrations were determined spectrophotometrically (spectrophotometer SF-2000 UV/Vis, OKB Spectr, Russia). The content of chlorophylls *a* and *b* and total carotenoids throughout the experiment was determined in biomass dimethylsulfoxide extracts (Merck, ACS grade) and calculated as described by Solovchenko et al. (2010).

The composition of carotenoids in the acetone extracts at the end of “green” and “red” stages was investigated by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel (Britton, 2008). Extracts from “green” biomass were analyzed on reversed phase TLC plates, Silica gel 60 RP-18 (Merck, Germany) in the solvent system ethylacetate-methanol-water (50:40:10) (Henry et al., 1983). For the analysis of pigments from “red” biomass, normal-phase TLC Silica gel 60 plates (Merck, Germany) and two sequential solvent systems were used: I—hexane-acetone 9:1; II—hexane-benzene-acetone 5:3:75:0.8 (Minyuk and Solovchenko, 2018). Preliminary, in the acetone extract of each tested sample, the content of chlorophyll *a* (Chl*a*), chlorophyll *b* (Chl*b*), and total Car was calculated according to Lichtenthaler (1987).

Carotenoid fractions were identified by chemical, spectral and chromatographic tests for the presence and number of hydroxy- and ketogroups; position of absorption maxima in UV-VIS spectra in three solvents (hexane, benzene and acetone); and R<sub>f</sub> matching of identified fractions and carotenoid standards in joint

chromatography (Rodriguez-Amaya, 2001; Britton et al., 2004; Britton, 2008; Egeland et al., 2011; Minyuk and Solovchenko, 2018).

## 2.8. Statistics

All measurements were conducted in three biological and three analytical replicates. Average values ( $\bar{x}$ ) and their standard errors (SE) were calculated using Microsoft Excel’s statistical package. Data visualization was performed using Golden Software Grapher (version 17.3.454).

## 3. Results

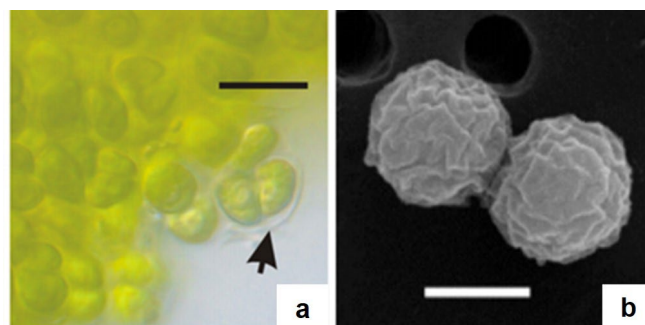
### 3.1. Identification of the strain VKM Al-296: morphology and phylogenetic analysis

Based on LM and SEM observations, the strain VKM Al-296 was preliminarily identified as a member of the genus *Chlorosarcinopsis*. This assumption was supported by several key morphological features: the formation of cell packets, the presence of naked biflagellate zoospores, a parietal chloroplast, and a single pyrenoid with an interrupted starch sheath. Young vegetative cells were spherical and developed into dyads, tetrads, and more complex structures through desmoschisis. Pseudofilament clusters were not observed. A distinctive characteristic of the VKM Al-296 strain was small cell size (up to 6 μm) and the formation of multicellular packages surrounded by visible extracellular mucilage (Fig. 1).

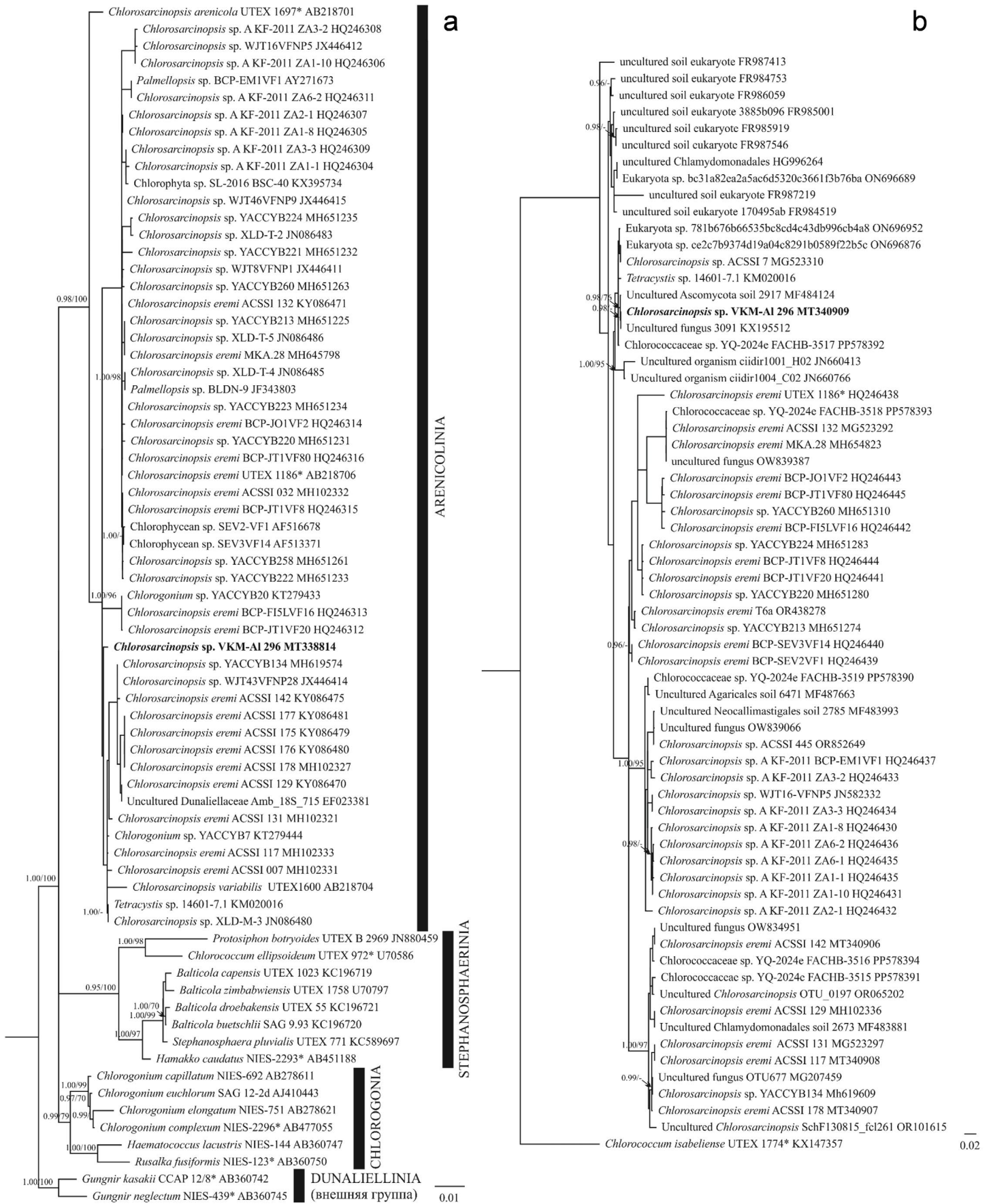
During long-term storage of the culture (approximately six months), a noticeable shift in biomass color from green to reddish-brown was observed. This change indicates the synthesis of secondary carotenoids, a common response of carotenogenic algae to acute nutritional deficiency and desiccation.

18S rDNA analysis revealed that the strain VKM Al-296 belongs to the well-supported Arenicolinia clade (Fig. 2a), clustering closely with authentic strains such as *C. eremi* UTEX 1186, *C. arenicola* UTEX 1697, and *C. variabilis* UTEX 1600.

Within the Arenicolinia clade, the strain VKM Al-296 represents an independent phylogenetic lineage that does not cluster with any of the known representatives. Genetic distances within the clade ranged



**Fig.1.** LM (a) and SEM (b) microscopy images of the strain *Chlorosarcinopsis* sp. VKM Al-296. Black arrow indicates extracellular mucilage. Scale: a—10 μm; b—3 μm.



**Fig.2.** Bayesian phylogenetic trees of the strain VKM Al-296 based on the comparison of nucleotide sequences of 18S rDNA (a) and ITS2 (b). The best-fit evolutionary model for both markers was GTR + I + G. Statistical support for tree nodes is indicated by posterior probabilities (PP) and bootstrap values (BP); PP values < 0.9 and BP values < 70% are not shown. Note: The studied strain is highlighted in bold; \* denotes authentic strains.

from 0 to 1.2%. Specifically, the studied strain differed by 0.1% from *C. eremi* UTEX 1186, by 0.9% from *C. arenicola* UTEX 1697, and by 0.4% from *C. variabilis* UTEX 1600. To enhance phylogenetic resolution, the variable ITS2 region was analyzed in addition to the conserved 18S rDNA (Fig. 2b). However, this did not improve clustering within the group. The strain VKM Al-296 grouped with algal sequences that had been misidentified as uncultured fungi. No differences were observed among these three sequences. The genetic distance between VKM Al-296 and *C. eremi* UTEX 1186 was 1.7%. The range of genetic variation within the Arenicolinia clade spanned from 0% to 12%. Based on the ITS2 species threshold of 10% (Hoshina and Fujiwara, 2013; Hoshina, 2014), it can be inferred that the clade includes several yet-to-be-described species. Unfortunately, the ITS2 sequences for *C. arenicola* UTEX 1697 and *C. variabilis* UTEX 1600 have not been deposited in GenBank. Comparison of the ITS2 secondary structures of VKM Al-296 and *C. eremi* UTEX 1186 revealed only hemi-compensatory base changes in helices I, II, and IV (Fig. 3).

No compensatory base changes were identified. Based on the morphological and genetic differences between the studied strain and *C. eremi*, the strain was classified as a *Chlorosarcinopsis* sp.

### 3.2. Growth characteristics of the strain VKM Al-296 under two-stage cultivation

It should be noted that the active accumulation of biomass in the culture of *Chlorosarcinopsis* sp. did not stop throughout the experiment (Fig. 4a).

In the first two days, in addition to division by aplanospores, there was reproduction by zoospores. Numerous metabolic biflagellated zoospores were recorded in the cultures during the morning hours. By the mid-day, zoospores lost motility and became rounded. Sexual reproduction was not observed. The transfer of microalgae cultures to the “red” stage by adding NaCl to the nutrient medium and increasing

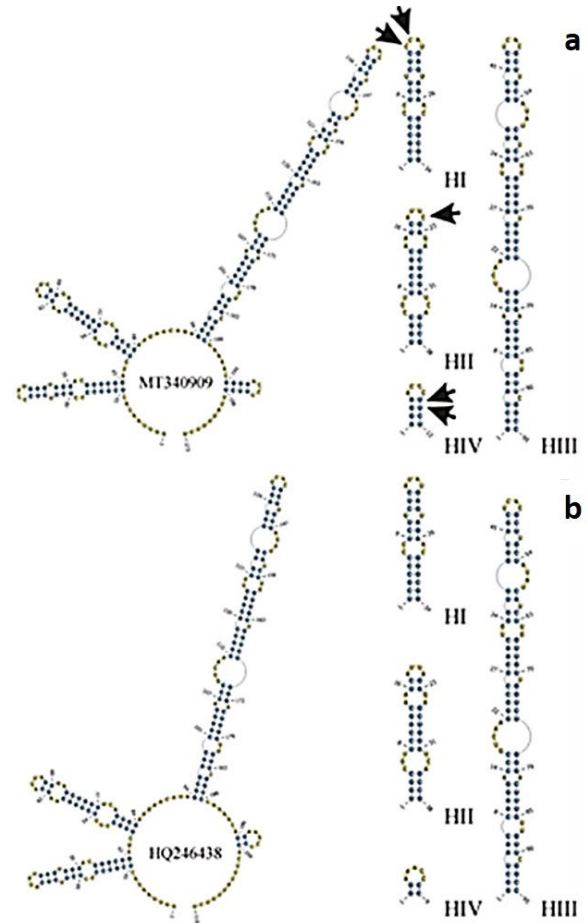


Fig.3. ITS2 secondary structure of *Chlorosarcinopsis* sp. VKM Al-296 (a) and *C. eremi* UTEX 1186 (b): general structure and helices. Black arrows indicate hemi-compensatory base changes.

illumination and temperature did not cause visually obvious cell death, which usually occurs in planktonic microalgae under similar stress conditions (Minyuk et al., 2007). Instead, the predominant mode of reproduction shifted to desmoschisis, leading to the formation of multicellular flat packets surrounded by mucilage (Fig. 1).

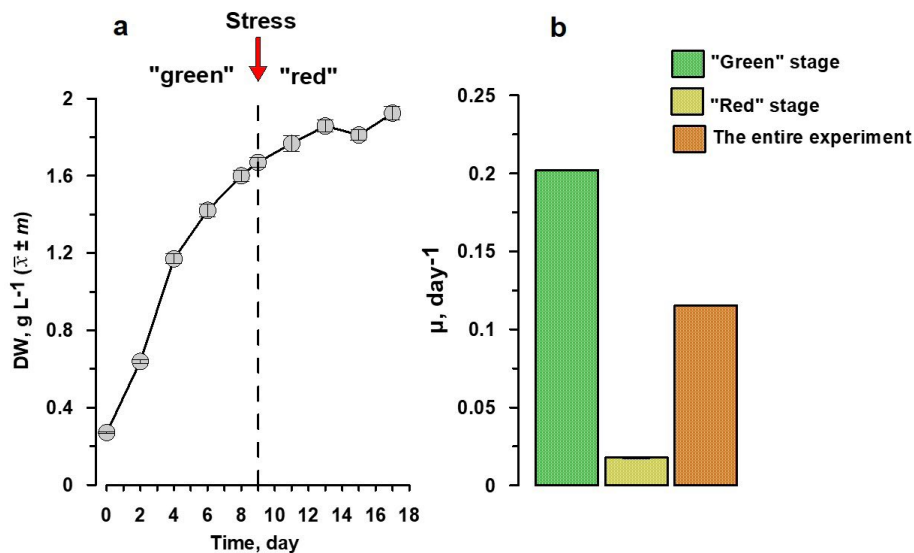


Fig.4. Dry weight dynamics (a) and specific growth rate (b) at the “green” and “red” stages and for entire experiment in *Chlorosarcinopsis* sp.

The VKM Al-296 strain culture grew faster at the “green” stage than the related *C. eremi* strain VKM Al-132 that was cultivated under natural light (Dantsyuk et al., 2024). At the SC stage, although both strains were subjected to the same stress, VKM Al-296 biomass accumulation was significantly slower, and, hence, its productivity over the entire experiment (0.10 g/L/day) was slightly lower than that of *C. eremi* VKM Al-132 (0.12 g/L/day) (Dantsyuk et al., 2024).

### 3.3. Pigment content of *Chlorosarcinopsis* sp. VKM Al-296 during cultivation

The chlorophyll content in *Chlorosarcinopsis* sp. changed in a manner typical for two-stage cultivation: during the “green” stage, with sufficient biogenic elements in the culture, it increased due to active cell division. By the end of the green stage, Chl<sub>a</sub> reached  $7.50 \pm 0.12$  µg/mL ( $0.45 \pm 0.01$  % DW), and Chl<sub>b</sub> –  $3.34 \pm 0.05$  µg/mL ( $0.20 \pm 0.01$  % DW). After stress, as a result of the destruction of chlorophyll molecules, their content sharply decreased by an order of magnitude (Fig. 5).

In contrast, the total Car content in the culture increased due to active biomass accumulation (Fig. 6a). The percentage of total Car in DW decreased sharply by the fourth day and remained relatively constant (0.3% of dry weight) until the end of the experiment. (Fig. 6b).

An increase in the Car/Chl<sub>a</sub> ratio from 0.33 to 0.64 by the ninth day (Fig. 6c) served as a key criterion for assessing the culture’s readiness to transition to the secondary carotenogenesis stage. Visually, this readiness was marked by a change in the culture’s color from green to a marsh yellow hue.

During the “red” stage, the Chl<sub>a</sub> content in the culture decreased 10-fold, while Chl<sub>b</sub> content decreased 5-fold. In contrast, the total Car content increased 1.3-fold (Fig. 5a, c; Fig. 6a). The total carotenoid productivity calculated for the entire experiment was  $0.20 \pm 0.01$  mg/L/day, which was comparable to that of the related strain *C. eremi* VKM Al-132 (Dantsyuk et al., 2024).

### 3.4. Thin Layer Chromatography and carotenoid composition

Although the total Car content in microalgal biomass remained relatively constant from day 4 of the “green” stage, the qualitative composition of carotenoids changed significantly throughout the subsequent period. The application of TLC allowed for a detailed comparison of the carotenoid profiles at the end of the “green” and “red” stages.

In green cultures, lutein was the dominant carotenoid, accompanied by significant amounts of β-carotene and neoxanthin (Fig. 7a, 8a). However, following stress exposure, the culture’s primary carotenoids characteristic of the “green” stage were replaced by secondary carotenoids (KCar), which were synthesized during the “red” stage (Fig. 7b, 8b). By the end of the experiment, the content of lutein and β-carotene in *Chlorosarcinopsis* sp. cells had decreased by an order of magnitude. In red cultures, canthaxanthin, adonixanthin monoesters, and astaxanthin esters were the predominant carotenoids (Fig. 8a, b).

Overall, these fractions accounted for 75–80% of the total Car (Fig. 8a, b). Notably, the fractions of astaxanthin esters alone reached nearly 35% of the total Car. The carotenoid profile of the studied strain *Chlorosarcinopsis* sp. VKM Al-296 at the “red” stage was similar to that of the strain *C. eremi* VKM Al-132, previously presented by Dantsyuk et al. (2024).

Despite the relatively low total carotenoid content (approximately 0.3% DW), the carotenoid composition of *Chlorosarcinopsis* sp. VKM Al-296 is notable for its high-value KCar, including canthaxanthin, and esters of adonixanthin, adonirubin, and astaxanthin, which together account for ~80% of the total carotenoids.

## 4. Discussion

The taxonomy of *Chlorosarcinopsis* has a complex and convoluted history since 1958 (Herndon, 1958). Initially, 21 species were grouped into the genus, with *C. minor* as the type species. Over time, some species were reclassified into the genera *Neochlorosarcina*,

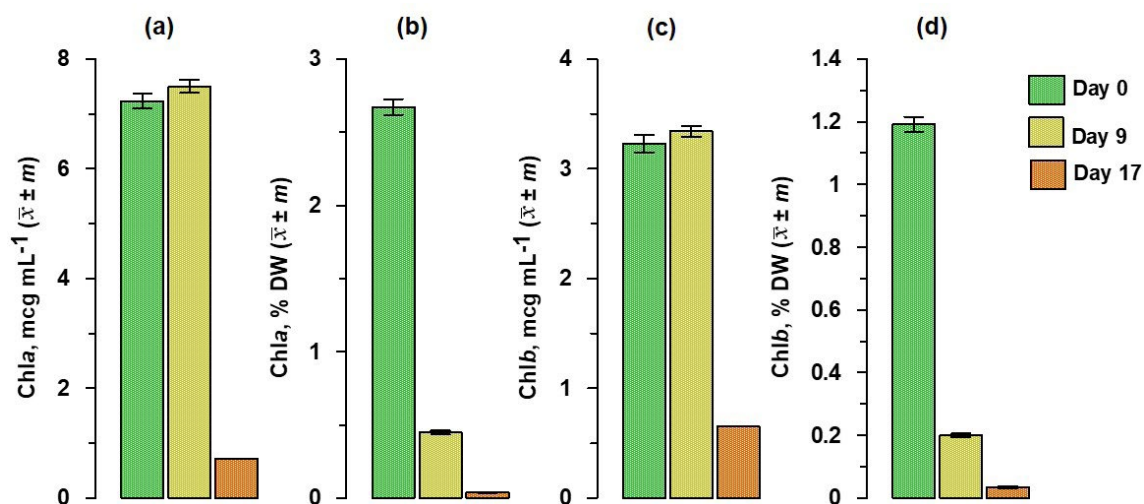


Fig.5. Chlorophyll content in the culture (a, c) and dry biomass (b, d) of *Chlorosarcinopsis* sp. at the beginning of experiment (day 0) and at the end of “green” (day 9) and “red” (day 17) stages.

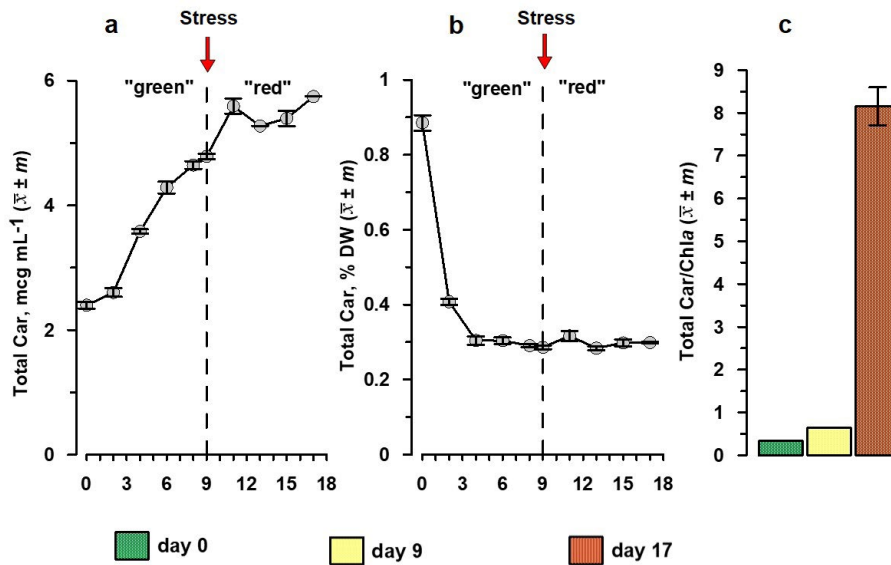


Fig.6. Total carotenoids content in culture (a) and dry biomass (b) in *Chlorosarcinopsis* sp., and total Car/Chl a ratio (c).

*Desmotetra*, and *Desmochloris*. Molecular studies later revealed that genus *Chlorosarcinopsis* is polyphyletic, with its members distributed across at least two phylogroups: Arenicolinia, including *C. arenicola*, *C. eremi*, and *C. variabilis*, and Stephanosphaerina, including *C. minor*, *C. aggregata*, *C. bastropiensis*, and *C. dissociata* (Watanabe et al., 2006; Nakada et al., 2008). Since the holotype of *C. minor* forms an independent phylogenetic lineage within the Stephanosphaerina clade, the other groups do not belong to the true *Chlorosarcinopsis* genus and should be described as new genera with a *Chlorosarcinopsis*-like morphology. The taxonomy of *Chlorosarcinopsis* remains unresolved, as some species (*C. angulosa*, *C. caeca*, and *C. superba*) have not yet been sequenced, and others lack sufficient sequence diversity, particularly in more variable loci. A key challenge is the choice of molecular markers to improve the clustering of the Arenicolinia phylogroup. Species delimitation based on the 18S rDNA and the ITS2 regions has proven problematic, suggesting that the *rbcl* gene might be more suitable.

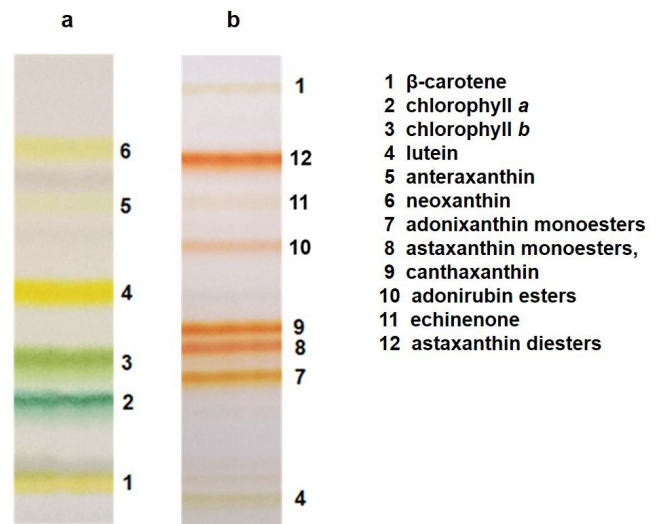


Fig.7. *Chlorosarcinopsis* sp. thin-layer chromatogram at the end of "green" (a) and "red" (b) stages of cultivation.

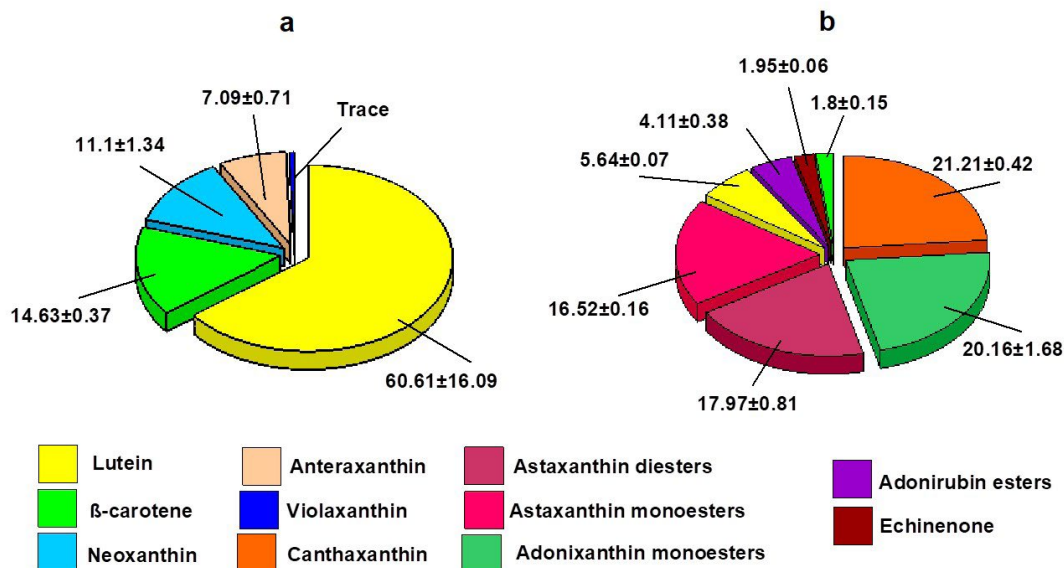


Fig.8. Carotenoid composition of *Chlorosarcinopsis* sp. at the "green" (a) and "red" (b) stages of the experiment ( $\bar{x} + m$ ).

The application of the two-stage batch culture method to sarcinoid microalgae has its own peculiarities. Cell aggregation into three-dimensional clusters does not allow evaluating the state of the culture by cell division rate. Due to deformation of cells within aggregates, cell sizes are distorted. Thus, the assessment of the productive qualities of *Chlorosarcinopsis* is based solely on the measurement of the DW content in the culture. The presence of a mucilage matrix (mucilage) consisting of complex polysaccharide and protein components determines the peculiarities of DW dynamics (Domozych and LoRicco, 2024). Vesicles of mucilage form inside the cell within the Golgi apparatus, through bulb-shaped pores, and mucilage is then released outside, enveloping *Chlorosarcinopsis* cells and aggregating them (Domozych and Rogers-Domozych, 1993). The formation of multicellular packets as a result of cell division, as well as the shielding effect of the mucus matrix, rapidly deteriorates light conditions, which distinguishes sarcinoid microalgae from planktonic species. Therefore, bubbling (continuous aeration) of cultures is a necessary for the cultivation of these species.

Growth characteristics of the studied strain reflect the broad environmental tolerance typical of soil microalgae. The observed over six-fold increase in the DW content during the “green” stage is consistent with the microalgae growth dynamics in nutrient-rich culture medium. The sustained growth, even under stress, confirms the presence of an adaptive mechanism for managing drastic changes in critical environmental factors (Doppler et al., 2022; Nayana et al., 2022), a hallmark of carotenogenic microalgae.

The production characteristics of *Chlorosarcinopsis* sp., adapted to laboratory cultivation conditions, were comparable to those of previously studied extremobionts. Specifically, the average biomass productivity of *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 during the “green” stage exceeded that reported for the other strains, such as *Bracteacoccus minor*, *Coelastrella rubescens*, and *Chromochloris zofingiensis* (order Sphaeropleales), as well as *Pseudosporangium protocooides* (order Chlamydomonadales), which exhibited productivities of 0.08–0.09 g/L/day (Chubchikova and Drobetskaya, 2020).

The observed changes in the pigment composition of *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 following the transition to the “red” stage are characteristic of carotenogenic microalgae. These changes support the concept of secondary carotenogenesis as a survival strategy, enabling cells to maintain viability under stressful conditions through metabolic reorganization.

The analysis of the carotenoid composition confirmed that a defining characteristic of the genus *Chlorosarcinopsis* during the active growth (“green”) stage is the absolute predominance of lutein, consistent with the findings by Cherdchukeattisak et al. (2018). The second most significant pigment was  $\beta$ -carotene, whose content in the culture at the end of the “green” stage reached 0.7 mg/L, comparable to the 0.543 mg/L reported by Wongsansilp et al. (2007).

At the SC stage, the carotenoid profile was dominated by canthaxanthin, mono- and diesters of astax-

anthin, and monoesters of adonixanthin. The percentage of esterified astaxanthin in total Car (34.5%) was similar to the data presented by Chekanov (2023) for *Chlainomonas rubra* (32–44.5 %).

The total Car average productivity throughout the experiment ( $0.20 \pm 0.01$  mg/L/day) was comparable to that of *Chromochloris zofingiensis* and *Neochloris wimmeri*, which exhibited productivities of 0.21 and 0.22 mg/L/day, respectively (Orosa et al., 2000).

The astaxanthin content in DW of *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 (0.11%), was comparable to that of *Chromochloris zofingiensis* (0.17%) (Del Campo et al., 2004), *Coelastrella* sp. S6 (0.17–0.18%) (Corato et al., 2022), and *Halochlorella rubescens* (0.12–0.18%) (Chekanov, 2023).

The presence of astaxanthin’s metabolic precursors, along with astaxanthin, in the carotenoid profile does not reduce the biological value of red biomass and its extracts. Additionally, the high content of lutein (60%) in the green biomass makes the strain a promising source of this pigment.

## 5. Conclusion

Microscopic and molecular genetic analyses of the 18S rDNA confirmed the taxonomic position of the strain VKM AI-296 within the Arenicolinia clade. Using the primary and secondary structures of ITS2, we identified the strain as *Chlorosarcinopsis* sp.

The growth, physiological, and biochemical characteristics of the *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 strain during two-stage batch cultivation are comparable to those previously reported for carotenogenic green microalgae of the orders Sphaeropleales and Chlamydomonadales under similar conditions.

The carotenoid composition of “green” cells is dominated by lutein, while “red” cells contain a mixture of valuable ketocarotenoids, including canthaxanthin and esters of adonixanthin and astaxanthin. The similarity of the carotenoid profile of *Chlorosarcinopsis* sp. with that of other members of Sphaeropleales and Chlamydomonadales indirectly supports the similarity of astaxanthin biosynthesis pathways in these microalgae.

The strain *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 is a potentially promising candidate for further research aimed at optimizing cultivation conditions (temperature, light intensity, nutrient supply, and stress type) to enhance biomass growth during the “green” stage and ketocarotenoid biosynthesis during the “red” stage. Successful solution of this problem could unlock opportunities for the biotechnological application of this strain as a producer of lutein or ketocarotenoids.

## Acknowledgements

The authors thank Dr. G.S. Minyuk, scientific advisor at the A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, Russian Academy of Sciences, for the assistance in analyzing the obtained data and consultations regarding the text of the article.

This work was performed under the project “Complex Investigation of Functioning Mechanisms of Marine Biotechnological Complexes in Order to Produce Biologically Active Substances from Hydrobionts” (No. 124022400152-1). Morphological and molecular genetic analyses were carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (State Assignment No. FMRM-2026-0015).

## Conflict of interest

The authors declare no competing interests.

## References

- Andreeva V.M. 1998. Terrestrial and aerophilic green algae (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). Sankt-Peterburg: Nauka. (in Russian)
- Bischoff H.W., Bold H.C. 1963. Some soil algae from enchanted rock and related algal species. *Phycological Studies* IV 6318:1–95.
- Boussiba S. 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum* 108(2):111–117. DOI: [10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x](https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x)
- Britton G. 2008. TLC of carotenoids. In: Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J., Kowalska T. (Eds.), *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. New York, CRC Press, pp. 543–573. DOI: [10.1201/9781420046786](https://doi.org/10.1201/9781420046786)
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. 2004. *Carotenoids Handbook*. Basel, Birkhäuser Verlag.
- Byun Y., Han K. 2009. PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. *Bioinformatics* 25(11): 1435–1437. DOI: [10.1093/bioinformatics/btp252](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp252)
- Caisová L., Marin B., Melkonian M. 2013. A consensus secondary structure of ITS2 in the Chlorophyta identified by phylogenetic reconstruction. *Protist* 164(4): 482–496. DOI: [10.1016/j.protis.2013.04.005](https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.04.005)
- Chekanov K. 2023. Diversity and distribution of carotenogenic algae in Europe: A Review. *Marine Drugs* 21: 108. DOI: [10.3390/md21020108](https://doi.org/10.3390/md21020108)
- Chelebieva E.S., Dantsyuk N.V., Chekanov K.A. et al. 2018. Identification and morphological-physiological characterization of astaxanthin producer strains of *Haematococcus pluvialis* from the Black Sea region. *Applied Biochemistry and Microbiology* 54(6): 639–648. DOI: [10.1134/S0003683818060078](https://doi.org/10.1134/S0003683818060078)
- Chen J., Liu L., Wei D. 2017. Enhanced production of astaxanthin by *Chromochloris zofingiensis* in a microplate-based culture system under high light irradiation. *Bioresource technology* 245: 518–529. DOI: [10.1016/j.biortech.2017.08.102](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.102)
- Cherdchukeattisak P., Fraser P.D., Purton S. et al. 2018. Detection and enhancement of ketocarotenoid accumulation in the newly isolated sarcinoid green microalga *Chlorosarcinopsis* PY02. *Biology* 7: 1–14. DOI: [10.3390/biology7010017](https://doi.org/10.3390/biology7010017)
- Chubchikova I.N. 2012. Effect of medium composition on the content of secondary carotenoids in microalgae *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. (Chlorophyceae). *Morskoy Ekologicheskij Zhurnal [Marine Ecological Journal]* 9(4): 95–101. (in Russian)
- Chubchikova I.N., Minyuk G.S., Drobetskaya I.V. et al. 2009. Chlorococcal microalgae as source of natural secondary carotenoids. *Ecologia morya [Marine Ecology]* 77: 77–83. (in Russian)
- Chubchikova I.N., Drobetskaya I.V. 2020. Antiradical activity estimation of secondary carotenoids of four green microalgae species from order Sphaeropleales in vitro. *Trudy Karadagskoj nauchnoj stancii im. T.I. Vyazemskogo – prirodno go zapovednika RAN [Proceedings of the T.I. Vyazemsky Karadag scientific station – Nature Reserve of the RAS]* 2(14): 66–78. DOI: [10.21072/eco.2021.14.07](https://doi.org/10.21072/eco.2021.14.07) (in Russian)
- Chubchikova I.N., Drobetskaya I.V., Dantsyuk N.V. et al. 2022. Optimization of freshwater microalgae (Scenedesmaceae, Chlorophyta) fixation method for primary taxonomic identification by scanning electron microscopy. *Voprosy sovremennoj algologii [Issues of modern algology]* 1(28): 102–109. DOI: [10.33624/2311-0147-2022-1\(28\)-102-109](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2022-1(28)-102-109) (in Russian)
- Coleman A.W. 2000. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. *Protist* 151: 1–9. DOI: [10.1078/1434-4610-00002](https://doi.org/10.1078/1434-4610-00002)
- Coleman A.W. 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics* 19: 370–375. DOI: [10.1016/S0168-9525\(03\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00118-5)
- Coleman A.W. 2009. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 197–203. DOI: [10.1016/j.ympev.2008.10.008](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.10.008)
- Corato A., Le T.T., Baurain D. et al. 2022. A fast-growing oleaginous strain of *Coelastrella* capable of astaxanthin and canthaxanthin accumulation in phototrophy and heterotrophy. *Life* 12:334. DOI: [10.3390/life12030334](https://doi.org/10.3390/life12030334)
- Dantsyuk N.V., Chubchikova I.N., Temraleeva A.D. et al. 2024. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of the sarcinoid microalga *Chlorosarcinopsis eremi* (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Russian Journal of Plant Physiology* 71: 131. DOI: [10.1134/S1021443724607328](https://doi.org/10.1134/S1021443724607328)
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R. et al. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772. DOI: [10.1038/nmeth.2109](https://doi.org/10.1038/nmeth.2109)
- Del Campo J.A., Rodríguez H., Moreno J. et al. 2004. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 848–854. DOI: [10.1007/s00253-003-1510-5](https://doi.org/10.1007/s00253-003-1510-5)
- Domozych D.S., LoRicco J.G. 2024. The extracellular matrix of green algae. *Plant Physiology* 194: 15–32. DOI: [10.1093/plphys/kiad384](https://doi.org/10.1093/plphys/kiad384)
- Domozych D.S., Rogers-Domozych C. 1993. Mucilage processing and secretion in the green alga *Closterium* II. Ultrastructure and immunocytochemistry. *Journal of Phycology* 29: 659–667. DOI: [10.1111/j.0022-3646.1993.00659.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1993.00659.x)
- Doppler P., Kriechbaum R., Käfer M. et al. 2022. *Coelastrella terrestris* for adonixanthin production: physiological characterization and evaluation of secondary carotenoid productivity. *Marine Drugs* 20(3): 175. DOI: [10.3390/md20030175](https://doi.org/10.3390/md20030175)
- Egeland E.S., Garrido J.L., Clementson L. et al. 2011. Data sheets aiding identification of phytoplankton carotenoids and chlorophylls. In: Roy S., Llewellyn C., Egeland E.S. et al. (Eds.), *Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*. Cambridge, pp. 665–822.
- Fábregas J., Otero A., Maseda A. et al. 2001. Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of biotechnology* 89(1): 65–71. DOI: [10.1016/S0168-1656\(01\)00289-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00289-9)
- Friedmann I., Ocampo-Paus R. 1965. A new *Chlorosarcinopsis* from the Negev Desert. *Journal of Phycology* 1(4): 185–191. DOI: [10.1111/j.1529-8817.1965.tb04581.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1965.tb04581.x)
- Gollerbach M.M., Shtina E.A. 1969. *Soil algae*. Leningrad: Nauka. (in Russian)

- Guiry M.D., Guiry G.M. 2025. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. URL: <http://www.algaebase.org> (accessed: 24 November 2025).
- Hall J.D., Fučíková K., Lo C. et al. 2010. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. *Cryptogamie*, *Algologie* 31(4): 529–555.
- Henry L.E.A., Mikkelsen J.D., Møller B.L. 1983. Pigment and acyl lipid composition of photosystem I and II vesicles and of photosynthetic mutants in barley. *Carlsberg Research Communications* 48: 131–148. DOI: [10.1007/bf02906174](https://doi.org/10.1007/bf02906174)
- Herndon W. 1958. Studies on chlorosphaeracean algae from soil. *American Journal of Botany* 45(4): 298–308.
- Hoshina R. 2014. DNA analyses of a private collection of microbial green algae contribute to a better understanding of microbial diversity. *BMC Research Notes* 7: 592. DOI: [10.1186/1756-0500-7-592](https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-592)
- Hoshina R., Fujiwara Y. 2013. Molecular characterization of *Chlorella* cultures of the National Institute for Environmental Studies culture collection with description of *Micractinium inermum* sp. nov., *Didymogenes sphaerica* sp. nov., and *Didymogenes soliella* sp. nov. (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *Phycological Research* 61: 124–132. DOI: [10.1111/pre.12010](https://doi.org/10.1111/pre.12010)
- Jeffers T.L., Roth M.S. 2021. Revealing mechanisms of algal astaxanthin production and bioengineering potential using multiomics. In: Ravishankar G.A., Ambati R.R. (Eds.), *Global perspectives on Astaxanthin: from industrial production to food, health, and pharmaceutical applications*. Cambridge, pp. 181–208. DOI: [10.1016/B978-0-12-823304-7.00010-60](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823304-7.00010-60)
- Katana A., Kwiatowski J., Spalik K. et al. 2001. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA. *Journal of Phycology* 37(3): 443–451. DOI: [10.1046/j.1529-8817.2001.037003443.x](https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037003443.x)
- Khani-Juyabad F., Mohammadi P., Zarrabi M. 2019. Comparative analysis of *Chlorosarcinopsis eremi* mitochondrial genome with some Chlamydomonadales algae. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 25(5): 1301–1310. DOI: [10.1007/s12298-019-00696-y](https://doi.org/10.1007/s12298-019-00696-y)
- Lewis L.A., Lewis P.O. 2005. Unearthing the molecular phylogeny of desert soil green algae (Chlorophyta). *Systematic Biology* 54(6): 936–947. DOI: [10.1080/10635150500354852](https://doi.org/10.1080/10635150500354852)
- Laroche C. 2022. Exopolysaccharides from microalgae and cyanobacteria: diversity of strains, production strategies, and applications. *Marine Drugs* 20(5): 336. DOI: [10.3390/md20050336](https://doi.org/10.3390/md20050336)
- Lemoine Y., Schoefs B. 2010. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research* 106: 155–177. DOI: [10.1007/s11120-010-9583-3](https://doi.org/10.1007/s11120-010-9583-3)
- Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods in Enzymology* 148: 350–382.
- Malik S., Ashraf M.U.F., Shahid A. et al. 2022. Characterization of a newly isolated self-flocculating microalga *Bracteacoccus pseudominor* BERC09 and its evaluation as a candidate for a multiproduct algal biorefinery. *Chemosphere* 304: 135346. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2022.135346](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135346)
- Marchenko M.M., Dorosh I.V., Cheban L.M. 2019. Induction of carotenogenesis in *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew cultivated on the closed waterside from recirculating aquaculture system. *Biotechnologia Acta* 12(2): 46–55. DOI: [10.15407/biotech12.02.046](https://doi.org/10.15407/biotech12.02.046)
- Minyuk G.S., Terentyeva N.V., Drobetskaya I.V. 2007. A comparison of characteristics of morpho-physiological and biochemical traits in three strains of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyta, Chlamydomonadales). *International Journal on Algae* 9(2): 174–186. DOI: [10.1615/INTERJALGAE.v9.i2.70](https://doi.org/10.1615/INTERJALGAE.v9.i2.70)
- Minyuk G.S., Chelebieva E.S., Chubchikova I.N. 2014. Secondary carotenogenesis of the green microalga *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrova (Chlorophyta) in a two-stage culture. *International Journal on Algae* 16(4): 354–368. DOI: [10.1615/InterJAlgae.v16.i4.50](https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v16.i4.50)
- Minyuk G., Chelebieva E., Chubchikova I. et al. 2017. Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrrella rubescens* (Scenedesmales, Chlorophyta), a producer of value-added keto-carotenoids. *Algae* 32(3): 245–259. DOI: [10.4490/algae.2017.32.8.6](https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.8.6)
- Minyuk G.S., Solovchenko A.E. 2018. Express analysis of microalgal secondary carotenoids by TLC and UV-Vis spectroscopy. In: Barriero C., Barriero J.-L. (Eds.), *Microbial Carotenoids: Methods and Protocols*. New York, pp. 73–95. DOI: [10.1007/978-1-4939-8742-9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9)
- Minyuk G., Dantsyuk N., Chelebieva E. et al. 2019. The effect of diverse nitrogen sources in the nutrient medium on the growth of the green microalgae *Chromochloris zofingiensis* in the batch culture. *Marine Biological Journal* 4: 41–52. DOI: [10.21072/mbj.2019.04.4.04](https://doi.org/10.21072/mbj.2019.04.4.04)
- Minyuk G., Sidorov R., Solovchenko A. 2020. Effect of nitrogen source on the growth, lipid, and valuable carotenoid production in the green microalga *Chromochloris zofingiensis*. *Journal of Applied Phycology* 32: 923. DOI: [10.1007/s10811-020-02060-0](https://doi.org/10.1007/s10811-020-02060-0)
- Nair A., Ahirwar A., Singh S. et al. 2023. Astaxanthin as a king of ketocarotenoids: structure, synthesis, accumulation, bioavailability and antioxidant properties. *Marine Drugs* 21(3): 176. DOI: [10.3390/md21030176](https://doi.org/10.3390/md21030176)
- Nakada T., Misawa K., Nozaki H. 2008. Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 281–291. DOI: [10.1016/j.ympev.2008.03.016](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.03.016)
- Nayana K., Sudhakar M.P., Arunkumar K. 2022. Biorefinery potential of *Coelastrrella* biomass for fuel and bio-products—a review. *Biomass Conversion and Biorefinery*. DOI: [10.1007/s13399-022-02519-9](https://doi.org/10.1007/s13399-022-02519-9)
- Orosa M., Torres E., Fidalgo P. et al. 2000. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal of Applied Phycology* 12: 553–556.
- Remias D., Pichrtova M., Pangratz M. et al. 2016. Ecophysiology, secondary pigments and ultrastructure of *Chlainomonas* sp. (Chlorophyta) from the European Alps compared with *Chlamydomonas nivalis* forming red snow. *Microbiology Ecology* 92(4): fiw030. DOI: [10.1093/femsec/fiw030](https://doi.org/10.1093/femsec/fiw030)
- Rodriguez-Amaya D.B. 2001. *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington: ILSI Press.
- Saito M., Watanabe H., Sasaki M. et al. 2023. Coproduction of lipids and carotenoids by the novel green alga *Coelastrrella* sp. depending on cultivation conditions. *Biotechnology Reports* 37: e00769. DOI: [10.1016/j.btre.2022.e00769](https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00769)
- Seibel P.N., Müller T., Dandekar T. et al. 2006. 4SALE – a tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. *BMC Bioinformatics* 7: 498. DOI: [10.1186/1471-2105-7-498](https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-498)
- Solovchenko A. 2013. Physiology and adaptive significance of secondary carotenogenesis in green microalgae. *Russian Journal of Plant Physiology* 60(1): 1–13. DOI: [10.1134/S1021443713010081](https://doi.org/10.1134/S1021443713010081)
- Solovchenko A., Merzlyak M., Khozin-Goldberg I. et al. 2010. Coordinated carotenoid and lipid syntheses induced in *Parietochloris incisa* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) mutant deficient in  $\Delta 5$  desaturase by nitrogen starvation and high light. *Journal of Phycology* 46: 763–772. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2010.00849.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00849.x)
- Temraleeva A.D., Mincheva E.V., Bukin Y.S. et al. 2014. Modern methods of isolation, cultivation and identification

of green algae (Chlorophyta). Kostroma: Kostroma Printing House. (in Russian)

Vasistha S., Khanra A., Rai M.P. 2021. Influence of microalgae-ZnO nanoparticle association on sewage wastewater towards efficient nutrient removal and improved biodiesel application: An integrated approach. *Journal of Water Process Engineering* 39: 101711. DOI: [10.1016/j.jwpe.2020.101711](https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101711)

Vonshak A. 1985. Microalgae: Laboratory growth techniques and outdoor biomass production. In: Coombs J., Hall D., Long S. et al. (Eds.), *Techniques in Bioproduktivty and Photosynthesis*. Oxford: Pergamon Press, pp. 188–203. DOI: [10.1016/B978-0-08-031999-5.50025-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-031999-5.50025-X)

Watanabe S., Mitsui K., Nakayama T. et al. 2006. Phylogenetic relationships and taxonomy of sarcinoid green algae: *Chlorosarcinopsis*, *Desmotetra*, *Sarcinochlamys* gen. nov., *Neochlorosarcina*, and *Chlorosphaeropsis* (Chlorophyceae,

Chlorophyta) *Journal of Phycology* 42: 679–695. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2006.00196.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00196.x)

White T.J., Bruns T., Lee S. et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. et al. (Eds.), *PCR protocols*. San Diego: Academic Press, pp 315–324.

Wongsansilp T., Tansakul P., Arunyanart M. 2007. Factors affecting growth and betacarotene content of *Chlorosarcinopsis* sp. (PSU/CHL20) in batch culture. *Kasetsart J (Nat Sci)* 41(1):153–157.

Wood A.M., Everroad R.C., Wingard L.M. 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. In: Andersen R.A. (Ed.), *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, pp. 269–285. DOI: [10.1016/B978-012088426-1/50019-6](https://doi.org/10.1016/B978-012088426-1/50019-6)

# Идентификация и комплексная характеристика нового почвенного штамма каротиногенной микроводоросли *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 (Chlorophyta)

Чубчикова И.Н.<sup>1\*</sup>, Данцюк Н.В.<sup>1</sup>, Дробецкая И.В.<sup>1</sup>, Темралеева А.Д.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН, проспект Нахимова, 2, Севастополь, 299011, Российская Федерация

<sup>2</sup> Всероссийская коллекция микроорганизмов (VKM), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина, Пущино, Научно-исследовательский центр биологических исследований Российской академии наук, 142290 Пущино, Российская Федерация

**АННОТАЦИЯ.** Проведено комплексное исследование нового штамма зеленых микроводорослей VKM AI-296, выделенного из пахотной почвы. На основе молекулярно-филогенетического анализа последовательностей 18S рДНК и ITS2, а также данных световой и сканирующей электронной микроскопии штамм идентифицирован как *Chlorosarcinopsis* sp. (Chlamydomonadales, Chlorophyta). Изучены его морфология, рост и каротиногенез в условиях двухстадийного накопительного культивирования. Установлено, что в жидкой среде клетки размером 3–6 мкм присутствовали поодиночке или в пакетах, окруженных внеклеточной слизью. К концу «зеленой» стадии (вегетативный рост) преобладающим пигментом был лютеин, составляющий более 60% от общего количества каротиноидов. Также присутствовали другие первичные каротиноиды: бета-каротин (14,6%), неоксантин (11,1%) и антраксантин (7,1%). В конце «красной» стадии (вторичного каротиногенеза) содержание сухой биомассы в культуре составляло  $1,92 \pm 0,04$  г/л, при этом каротиноиды составляли 0,3% от сухой биомассы. В пигментном профиле преобладали кетокаротиноиды: астаксантин (моно- и дизфиры), кантаксантин и моноэфиры адониксантина (35%, 21% и 20% от общего содержания каротиноидов, соответственно). За весь период культивирования (17 суток) средняя продуктивность культур по биомассе и общая продуктивность по каротиноидам составляли 0,10 г/л/сут и 0,2 мг/л/сут, соответственно. *Chlorosarcinopsis* sp. штамм VKM AI-296 может стать перспективным объектом дальнейших исследований, направленных на оптимизацию условий культивирования, в качестве источника лютеина на «зеленой» стадии, а также кантаксантина и эфиров астаксантина и адониксантина на «красной» стадии.

**Ключевые слова:** *Chlorosarcinopsis* sp., морфология клеток, молекулярно-филогенетический анализ, двухстадийное культивирование, вторичные каротиноиды, тонкослойная хроматография

Для цитирования: Чубчикова И.Н., Данцюк Н.В., Дробецкая И.В., Темралеева А.Д. Идентификация и комплексная характеристика нового почвенного штамма каротиногенной микроводоросли *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 (Chlorophyta) // Limnology and Freshwater Biology. 2026. - № 2. - С. 78-102. DOI: 10.31951/2658-3518-2026-A-2-78

## 1. Введение

*Chlorosarcinopsis* — род микроводорослей, относящихся к отряду Chlamydomonadales (Chlorophyta), широко распространенный в наземных условиях, особенно в засушливых и полусушливых пустынях (Friedmann and Ocampo-Paus, 1965; Андреева, 1998; Lewis and Lewis, 2005; Hall et al., 2010; Khani-Juyabad et al., 2019).

Почва является средой обитания для множества микроорганизмов, включая бактерии, грибы, простейшие и микроводоросли. В отличие от планктонных микроводорослей, условия обитания которых, как правило, незначительно меняются в зависимости от времени года и времени суток, почвенные микроводоросли, обитающие на поверхности почвы или в ее верхних горизонтах, подвергаются постоянному стрессу, выдерживая суточные и сезонные

\*Автор для переписки. Адрес e-mail: [chubchikova\\_in@ibss-ras.ru](mailto:chubchikova_in@ibss-ras.ru) (И.Н. Чубчикова)

Поступила: 17 декабря 2025;

Принята после доработки: 27 февраля 2026;

Опубликована online: 24 апреля 2026

© Автор(ы) 2026. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



колебания условий окружающей среды. Это резкие изменения освещенности, температуры, влажности, доступности питательных веществ и т. д. Ключевым звеном в стратегии выживания почвенных видов, включая микроводоросли рода *Chlorosarcinopsis*, в условиях абиотического стресса является способность к вторичному каротиногенезу (ВКГ), связанная со способностью клеток быстро переходить из состояния активной вегетативной фазы в состояние покоя и наоборот. Кетокаротиноиды (ККар) — это группа пигментов, которые структурно и функционально не связаны с фотосинтетическим аппаратом (Lemoine and Schoefs, 2010; Solovchenko, 2013). Установлено, что их функции включают защиту ядра и клеточных органелл, использование избытка продуктов фотосинтеза, а также «гашение» активных форм кислорода и предотвращение их образования (Solovchenko, 2013; Remias et al., 2016). Природный ККар астаксантин широко используется в фармацевтике, нутрицевтике, косметике, диетологии и аквакультуре, и спектр его применения быстро расширяется. Он безопасен для употребления в пищу, в отличие от своего синтетического аналога, который разрешен для использования только в аквакультуре (Nair et al., 2023).

В связи с этим в последние десятилетия большое внимание уделяется изучению процесса ВКГ как ключевого механизма адаптации у экстремобионтных зеленых микроводорослей различных таксономических и экологических групп. Основная часть информации о закономерностях ВКГ у одноклеточных микроводорослей была получена на примерах ограниченного числа планктонных, почвенных и аэрофитных видов из порядков Chlamydomonadales и Sphaeropleales (*Haematococcus lacustris*, *Chromochloris zofingiensis*, *Coelastrella rubescens*, *Bracteacoccus pseudominor*, *B. minor*) (Minyuk et al., 2014; 2017; Chelebieva et al., 2018; Minyuk et al., 2020; Malik et al., 2022). Однако разнообразие видов каротиногенных микроводорослей намного больше, чем принято считать. Достижения в области высокопроизводительного полногеномного секвенирования позволили идентифицировать ортологи β-каротинкетотазы, ключевого фермента, ответственного за синтез ККар из β-каротина, в геномах многочисленных видов микроводорослей (Jeffers and Roth, 2021). Поэтому дальнейший поиск коммерчески перспективных продуцентов ККар (астаксантина и его метаболитических предшественников) и разработка методов их промышленного культивирования остаются актуальными (Чубчикова и др., 2009; 2012; Minyuk et al., 2014; Chen et al., 2017; Minyuk et al., 2017; Marchenko et al., 2019; Minyuk et al., 2019; 2020; Doppler et al., 2022; Saito et al., 2023).

Стратегия выживания сарциноидных микроводорослей усиливается дополнительным адаптационным механизмом, позволяющим им успешно противостоять резким изменениям условий окружающей среды. Это способность производить большое количество слизи – так называемых «слизистых оболочек» и «обертков» (муцилажа). Основным компонентом муцилажа являются внеклеточные гидро-

фильные коллоидные полисахариды, в которых преобладают галактоза, глюкоза и рамноза (Голлербах и Штина, 1969; Laroche, 2022). Такой внеклеточный матрикс выполняет несколько функций. Он обеспечивает прикрепление клеток друг к другу, защищает их от контаминации и резких биотических и абиотических стрессов, сглаживая скачки инсоляции, влажности и температуры, особенно для клеток, расположенных внутри клеточного агрегата. Помимо полисахаридов, слизь содержит низкомолекулярные белковые соединения. Имеются данные об активном росте *Chlorosarcinopsis* spp. на миксо- и гетеротрофных средах в лабораторных условиях (Cherdchukeattisak et al., 2018; Vasistha et al., 2021), что позволяет предположить использование слизи в периоды голодания как доступного органического источника углерода и азота.

Эти особенности сарциноидных микроводорослей позволяют предположить, что в условиях массового открытого культивирования выживаемость таких видов будет значительно выше, чем у более чувствительных планктонных видов, что может положительно сказаться на продуктивности по биомассе и ККар.

Метод двухстадийной накопительной культуры (Boussiba, 2000; Fábregas et al., 2001; Minyuk et al., 2017) позволяет проводить комплексные исследования штаммов, включая световую и сканирующую электронную микроскопию, молекулярно-филогенетический анализ и оценку продукционных характеристик как в период активного роста, так и в процессе вторичного каротиногенеза.

Целью данного исследования было изучение штамма VKM AI-296 с использованием комплексного метода в условиях двухстадийной накопительной культуры.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Изоляция штамма

Объектом исследования являлся штамм почвенной микроводоросли VKM AI-296, выделенный в 2018 году из пахотного типичного чернозема в Ставропольском крае, Российская Федерация (45°07' с.ш., 42°01' в.д.). Альгологически чистую культуру получали методом, описанным Темралеевой и соавт. (2014). Почвенную суспензию высевали на поверхность плотной питательной среды BG-11 (1,5% агар, pH 7,2) в чашках Петри и инкубировали в контролируемых условиях (температура 23–25 °С, фотопериод 12 ч света/12 ч темноты, освещенность 60–75 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>/с, обеспечиваемая люминесцентными лампами холодного белого света) до появления колоний. Далее отдельные колонии многократно пересевали и культивировали в тех же условиях до получения альгологически чистой культуры.

Первоначально штамм был депонирован в Альгологическую коллекцию Института физико-химических и биологических проблем почвоведения РАН (ACSSI) под номером ACSSI 296. Впоследствии

он был передан во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов (VKM) Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, где ему был присвоен номер VKM A1-296.

## 2.2. Морфологический анализ

Морфологию и жизненный цикл штамма VKM A1-296 исследовали методом световой микроскопии с использованием микроскопа Leica DM750 (Германия) и цифровой цветной камеры Leica Flexcam C3 (Германия) для документирования изображений. Наблюдения проводили в течение периода от двух недель до шести месяцев.

Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) клетки фиксировали 2% раствором глутаральдегида в 10-кратно разбавленном 66,7 мМоль Na-K фосфатном буфере (pH 7,34) при 4°C в течение 24 часов. Затем образец дополнительно фиксировали 0,005% раствором Люголя и обезвоживали в градуированной серии растворов этанола с возрастающей концентрацией (Чубчикова и др., 2022). Для получения СЭМ-изображений клеток использовали сканирующий электронный микроскоп Hitachi SU3500 (Япония) на базе Лаборатории микроскопии ФИЦ ИнБЮМ.

## 2.3. Выделение ДНК, ПЦР и секвенирование

Суммарную ДНК экстрагировали с использованием набора DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Нуклеотидные последовательности регионов 18S рДНК и ITS2 амплифицировали с использованием готовой смеси Screen Mix-HS (Евроген, Россия). Праймеры и режимы амплификации были подобраны на основании методик, описанных White et al. (1990) и Katana et al. (2001), и приведены в Таблице 1. Амплификацию проводили с помощью термоциклера T100 (Bio-Rad, США). Целевые продукты ПЦР визуализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле. После электрофореза ампликоны очищали с помощью набора Cleanup

Mini (Евроген, Россия) по протоколу производителя. Далее очищенные продукты ПЦР были направлены для проведения секвенирования в компанию Евроген (Россия).

## 2.4. Молекулярно-филогенетический анализ

Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в базу данных GenBank под номерами: MT338814 (18S рДНК) и MT340909 (ITS2). Для поиска близкородственных последовательностей использовали алгоритм BLASTn (NCBI). Филогенетический анализ проводили на основе двух независимо сформированных наборов данных:

1. Набор данных 18S рДНК включал 70 последовательностей от различных представителей порядка Chlamydomonadales, в том числе из клад Arenicolinia, Stephanosphaerina и Chlorogonia. В качестве внешней группы использовали аутентичные штаммы рода *Gungnir* (клада Dunaliellinia).
2. Набор данных ITS2 включал 66 последовательностей от всех представителей клады Arenicolinia, включая некультивируемые виды. В качестве внешней группы использовали аутентичный штамм *Chlorococcum isabeliense* (= *Pleurastrum isabeliense*) из клады Stephanosphaerina.

При анализе использовали современную таксономическую систему, принятую в базе данных AlgaeBase (Guiry and Guiry, 2025).

Множественное выравнивание последовательностей выполняли с помощью онлайн-сервиса MAFFT (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/mafft>). Оптимальную эволюционную модель для каждого локуса (18S рДНК и ITS2) определяли с использованием информационного критерия Акаике (AIC), реализованного в программе jModelTest 2.1.10 (Darriba et al., 2012). В рамках анализа методом максимального правдоподобия (ML) для каждого набора данных было сгенерировано 1000 реплик бутстреп-анализа с использованием программы PhyML. Статистическую поддержку вет-

Таблица 1. Праймеры и условия амплификации.

Локус	Праймеры	Последовательность (5'-3')	Условия амплификации
18S рДНК	F	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT	95°C, 5 мин; 95°C, 1 мин, 55°C, 1 мин, 72°C, 2 мин, 35 циклов; 72°C, 5 мин
	R	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTACG	
	402-23F*	GCTACCACATCCAAGGAAGGCA	
	1323-44F*	CGAACGAGACCTCAGCCTGCTA	
	416-37R*	ATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCC	
	898-919R*	TAAATCCAAGAATTTCACCTCT	
	1308-39R*	CTCGTTCGTTAACGGAATTAACC	
	1636-57R*	GGTAGGAGCGACGGGCGGTGTG	
ITS2	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	95°C, 3 мин; 95°C, 30 с, 52-57°C, 30 с, 72°C, 40 с, 35 циклов; 72°C, 10 мин
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Примечание: \* внутренние секвенирующие праймеры.

вей оценивали по значениям вероятностей бутстрепа (BP). Байесовский вывод (BI) проводили с использованием программы BEAST 1.8.4. Выполняли два независимых прогона по  $10^8$  поколений каждый с отбором каждые  $10^4$  поколений; первые 25% поколений отбрасывали (burn-in). Сходимость цепей Маркова подтверждали, убедившись, что значения эффективного размера выборки (ESS) превышали 200, а результаты визуализировали в программе Tracer 1.5. Консенсусное дерево строили с помощью программы TreeAnnotator 1.8.4, где поддержка ветвей оценивалась по апостериорным вероятностям Байеса (PP). Генетические дистанции рассчитывали в программе MEGA 6 с использованием двухпараметрической модели Кимуры. Для анализа вторичной структуры ITS2 последовательности сворачивали с помощью веб-сервера RNAfold (<https://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) в соответствии с принципом минимальной свободной энергии. Достоверность предсказанных вторичных структур оценивали на основе критериев, предложенных Caisová et al. (2013). Сравнение вторичных структур ITS2, идентификацию консервативных мотивов и анализ полных компенсаторных замен (CBC) проводили с использованием программы 4SALE 1.7 (Seibel et al., 2006). Для разграничения видов по последовательностям ITS2 применяли CBC-подход, разработанный A. Coleman (2000; 2003; 2009). Визуализацию вторичных структур ITS2 выполняли в программе PseudoViewer3 (Byun and Han, 2009).

## 2.5. Условия культивирования

Штамм выращивали методом двухстадийной накопительной культуры (Boussiba, 2000; Fábregas et al., 2001) в питательной среде BBM (Bischoff and Bold, 1963). Микроводоросли выращивали в трех биологических повторностях, используя пластиковые культуральные флаконы объемом 0,75 л («Falcon», США). Объем культуры составлял 0,6 л; начальное содержание сухой биомассы (СБ) — 0,3 г/л.

Первая («зеленая») стадия культивирования, длительностью 9 суток, проходила в следующих условиях: одностороннее освещение, обеспечиваемое светодиодными лампами холодного белого света «Feron» DL 20W T4 6400K (Россия), плотность потока ФАР 130 мкмоль фотонов/м<sup>2</sup>/с (измеренная на боковой поверхности колб), световой режим 15:9 ч (свет/темнота), температура  $28 \pm 0,5$  °C и непрерывное барботирование воздухом со скоростью 0,44 л/мин/л. pH культуры поддерживали на уровне  $7,0 \pm 0,05$  дозированной подачей CO<sub>2</sub> из газового баллона в течение 8 часов, контролируя системой Aqua Medic pH2001C (Германия), оснащенной электромагнитным клапаном Camozzi A7E (Италия).

Для индукции «красной» стадии культуру перевели на двустороннее 24-часовое освещение с той же самой плотностью потока ФАР с каждой стороны и температурой 28–29 °C. Подача CO<sub>2</sub> оста-

валась неизменной. Дополнительно был внесен 1% раствор NaCl до конечной концентрации в культуре 5 мМоль. «Красная» стадия длилась 8 дней.

## 2.6. Мониторинг роста культуры

Ростовые характеристики штамма оценивали по динамике биомассы. Содержание СБ (г/л) определяли гравиметрическим методом на нитроцеллюлозных мембранных фильтрах «Sartorius» (Германия) с размером пор 3,0 мкм (Vonshak, 1985). Биомассу на фильтрах промывали дистиллированной водой (три или четыре раза по 15 мл каждый) для удаления слизи. Удельную скорость роста ( $\mu$ ) и продуктивность культур ( $P$ ) рассчитывали по методу, описанному Wood et al. (2005).

$$\mu = \ln(CB_1 / CB_0) / (T_1 - T_0) \quad (1)$$

$$P = (CB_1 - CB_0) / (T_1 - T_0) \quad (2)$$

где  $P$  – средняя продуктивность г/л/сут;

$CB_0$  – начальная СБ, г/л;

$DW_1$  – конечная СБ, г/л;

$T_1 - T_0$  – период роста, сут;

$\mu$  – удельная скорость роста, сут<sup>-1</sup>.

## 2.7. Анализ пигментов

Концентрации пигментов определяли спектрофотометрически (спектрофотометр СФ-2000 UV/Vis, ОКБ Спектр, Россия). Содержание хлорофиллов  $a$  и  $b$  и суммарных каротиноидов на протяжении всего эксперимента определяли в диметилсульфоксидных экстрактах биомассы (Merck, класс ACS) и рассчитывали, как описано у Solovchenko et al. (2010).

Состав каротиноидов в ацетоновых экстрактах в конце «зеленой» и «красной» стадий исследовали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагеле (Britton, 2008). Экстракты из «зеленой» биомассы анализировали на пластинах с обращенной фазой Silica gel 60 RP-18 (Merck, Германия) в системе растворителей этилацетат-метанол-вода (50:40:10) (Henry et al., 1983). Для анализа пигментов из «красной» биомассы использовали пластины Silica gel 60 (Merck, Германия) с нормальной фазой с последовательным использованием двух систем растворителей: I – гексан-ацетон 9:1; II – гексан-бензол-ацетон 5:3.75:0.8 (Minyuk and Solovchenko, 2018). Предварительно в ацетоновом экстракте каждого исследуемого образца определяли содержание хлорофилла  $a$  (Хла), хлорофилла  $b$  (Хлб) и суммарных Кар по методу Lichtenthaler (1987).

Идентификацию каротиноидных фракций проводили с помощью химических, спектральных и хроматографических тестов на наличие и количество гидроксильных и кетогрупп; определения максимумов поглощения в УФ/видимых спектрах в трех растворителях (гексане, бензоле и ацетоне); сопоставления Rf идентифицированных фракций и стандартов каротиноидов в совместной хроматографии (Rodriguez-Amaya, 2001; Britton et al., 2004; Britton, 2008; Egeland et al., 2011; Minyuk and Solovchenko, 2018).

## 2.8. Статистика

Все измерения проводили в трех биологических и трех аналитических повторностях. Средние значения ( $\bar{x}$ ) и их стандартные ошибки (SE) рассчитывали с помощью статистического пакета Microsoft Excel. Графическую визуализацию данных выполняли с помощью программы Golden Software Grapher (версия 17.3.454).

## 3. Результаты

### 3.1. Идентификация штамма VKM AI-296: морфология и филогенетический анализ

На основании наблюдений с помощью световой и сканирующей электронной микроскопии штамм VKM AI-296 был предварительно отнесен к роду *Chlorosarcinopsis*. Данное предположение подтверждалось несколькими ключевыми морфологическими признаками: образование пакетов клеток, наличие голых двужгутиковых зооспор, пристенного хлоропласта и одного пиреноида с прерывистой крахмальной оберткой. Молодые вегетативные клетки имели сферическую форму и в результате десмосхизиса формировали диады, тетрады и более сложные структуры. Формирование псевдонитей не наблюдалось. Отличительной особенностью штамма VKM AI-296 являлись малый размер клеток (до 6 мкм) и образование многоклеточных пакетов, окруженных видимым слоем внеклеточной слизи (Рис. 1).

При длительном хранении культуры (около 6 месяцев) наблюдали заметное изменение цвета биомассы с зеленого на красновато-коричневый. Данное изменение указывает на синтез вторичных каротиноидов – типичную реакцию каротиногенных водорослей на острую нехватку питательных веществ и дегидратацию.

18S рДНК анализ показал, что штамм VKM AI-296 относится к кладе *Arenicolinia* (Рис. 2а), формируя кластер с аутентичными штаммами, такими как *C. eremi* UTEX 1186, *C. arenicola* UTEX 1697 и *C. variabilis* UTEX 1600.

Внутри клады *Arenicolinia* штамм VKM AI-296 представляет собой независимую филогенетическую линию, которая не объединяется в кластер ни с одним из известных представителей. Генетические дистанции внутри клады варьировали от 0 до 1,2%. В частности, изучаемый штамм отличался на 0,1% от *C. eremi* UTEX 1186, на 0,9% от *C. arenicola* UTEX 1697 и на 0,4% от *C. variabilis* UTEX 1600. Для повышения филогенетического разрешения, помимо консервативного локуса 18S рДНК, был проанализирован вариабельный регион ITS2 (Рис. 2б). Однако это не улучшило кластеризацию внутри группы. Штамм VKM AI-296 образовал кластер с последовательностями водорослей, которые ранее были ошибочно идентифицированы как некультивируемые грибы. Между этими тремя последовательностями различий выявлено не было. Генетическая дистанция между VKM AI-296 и *C. eremi* UTEX 1186 составила 1,7%. Общий диапазон генетической

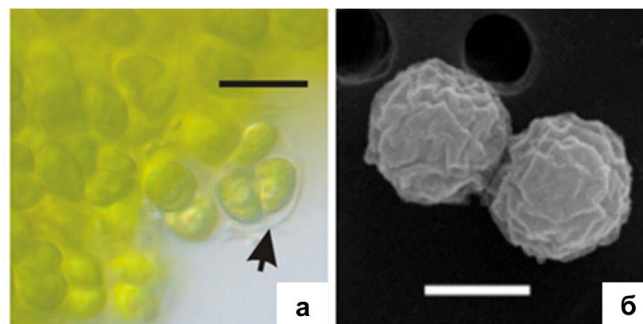


Рис. 1. Фотографии световой (а) и сканирующей электронной (б) микроскопии штамма *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296. Черной стрелкой обозначена внеклеточная слизь. Шкала: а – 10 мкм; б – 3 мкм.

изменчивости внутри клады *Arenicolinia* составил от 0 до 12%. На основании установленного для ITS2 порога видового различия в 10% (Hoshina and Fujiwara, 2013; Hoshina, 2014) можно сделать вывод, что клада включает несколько еще не описанных видов. К сожалению, последовательности ITS2 для *C. arenicola* UTEX 1697 и *C. variabilis* UTEX 1600 не депонированы в GenBank. Сравнение вторичных структур ITS2 VKM AI-296 и *C. eremi* UTEX 1186 выявило лишь полукомпенсаторные замены нуклеотидных пар в спиральях I, II и IV (Рис. 3).

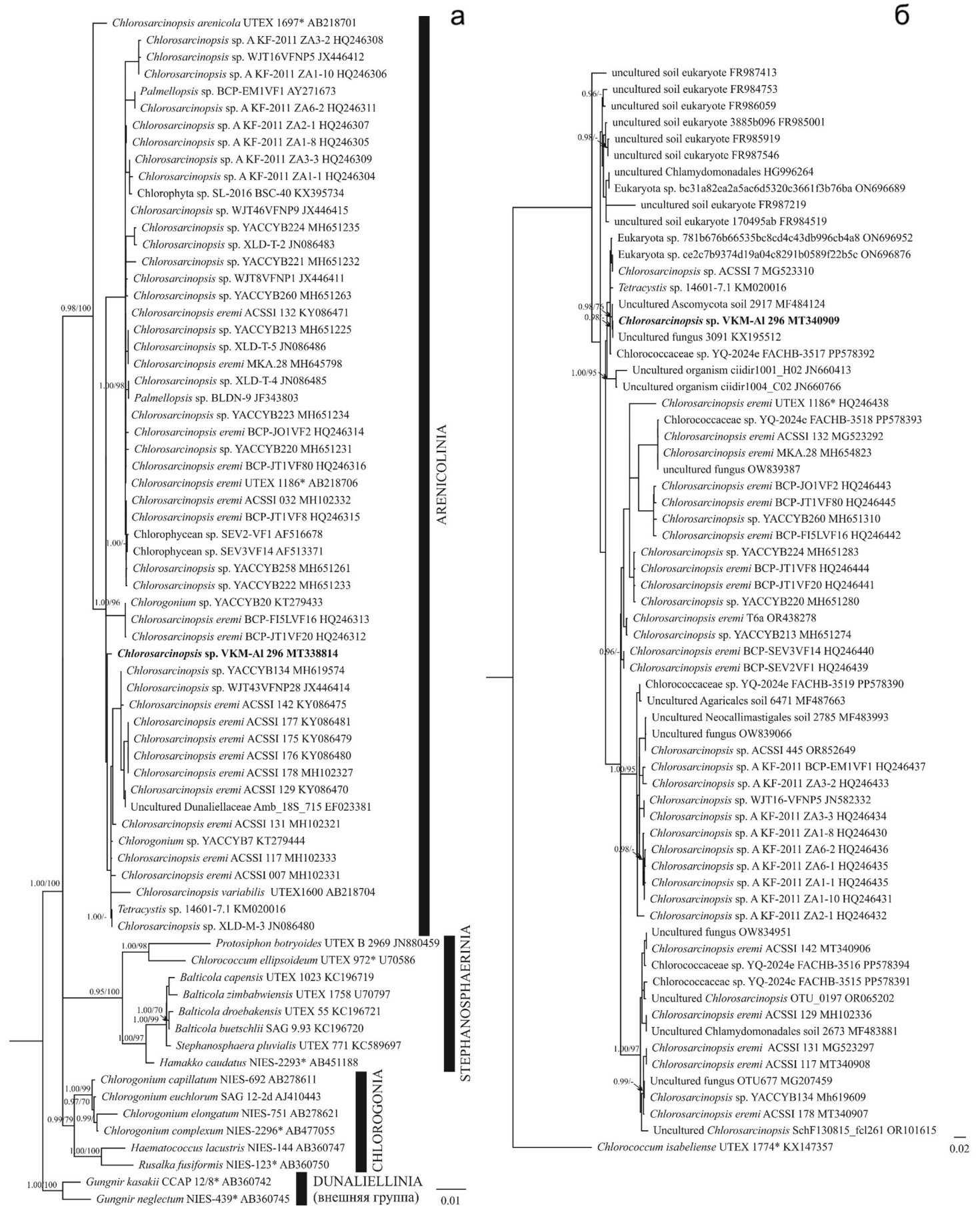
Полные компенсаторные замены нуклеотидных пар выявлены не были. На основании морфологических и генетических различий между VKM AI-296 и *C. eremi* UTEX 1186 исследуемый штамм был идентифицирован как *Chlorosarcinopsis* sp.

### 3.2. Ростовые характеристики штамма VKM AI-296 в условиях двухстадийного культивирования

Следует отметить, что активное накопление биомассы в культуре *Chlorosarcinopsis* sp. не прекращалось на протяжении всего эксперимента (Рис. 4а).

В первые два дня, помимо деления апланоспорами, наблюдалось размножение зооспорами. В утренние часы в культурах было обнаружено множество метаболических двужгутиковых зооспор. К полудню зооспоры теряли подвижность и округлялись. Полового размножения не наблюдалось. Перевод культур микроводорослей на «красную» стадию путем добавления NaCl в питательную среду и увеличения освещения и температуры не вызывал визуально заметной гибели клеток, которая происходит у планктонных микроводорослей в аналогичных стрессовых условиях (Минюк и др., 2007). В новых условиях преобладающим способом размножения стал десмосхиз, приводящий к образованию многоклеточных плоских пакетов, окруженных слизью (Рис. 1).

Культура штамма VKM AI-296 на «зеленой» стадии росла быстрее, чем родственный штамм *C. eremi* VKM AI-132, культивируемый при естественном освещении (Данцюк и др., 2024). Несмотря на то, что оба штамма подвергались одинаковому стрессу, на стадии ВКГ накопление биомассы VKM



**Рис.2.** Байесовские филогенетические деревья штамма VKM AI-296, построенные на основе сравнения нуклеотидных последовательностей 18S рДНК (а) и ITS2 (б). Для обоих локусов оптимальной эволюционной моделью оказалась GTR + I + G. Статистическая поддержка узлов дерева указана в виде апостериорных вероятностей (PP) и значений бустрепа (BP); значения PP < 0.9 и BP < 70% не показаны.

Примечание: исследуемый штамм выделен полужирным шрифтом, звездочкой (\*) отмечены аутентичные штаммы.

AI-296 происходило значительно медленнее, и, как следствие, его продуктивность на протяжении всего эксперимента (0,10 г/л/сут) была несколько ниже, чем у *C. eremi* VKM AI-132 (0,12 г/л/сут) (Данцюк и др., 2024).

### 3.3. Содержание пигментов в *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 на протяжении культивирования

Содержание хлорофиллов у *Chlorosarcinopsis* sp. изменялось типичным для двухстадийного культивирования образом: на «зеленой» стадии, при достаточном количестве биогенных элементов в культуре, оно увеличивалось за счет активного деления клеток. К концу «зеленой» стадии содержание Хл *a* достигло  $7,50 \pm 0,12$  мкг/мл ( $0,45 \pm 0,01$  % от СБ), Хл *b* –  $3,34 \pm 0,05$  мкг/мл ( $0,20 \pm 0,01$  % от СБ). После стресса, в результате разрушения молекул хлорофиллов, их содержание снизилось на порядок (Рис. 5).

Напротив, содержание суммарных каротиноидов в культуре увеличилось за счет активного накопления биомассы (Рис. 6а). Массовая доля суммарных каротиноидов в сухой биомассе резко снизилась к четвертым суткам и оставалась относительно постоянной (0,3% от сухого веса) до конца эксперимента (Рис. 6б).

Увеличение соотношения Кар/Хл *a* с 0,33 до 0,64 к 9-м суткам (Рис. 6в) послужило ключевым критерием для оценки готовности культуры к переходу на стадию вторичного каротиногенеза. Визуально эта готовность проявилась в изменении цвета культуры с зеленого на болотно-желтый.

В течение «красной» стадии содержание Хл *a* в культуре снизилось в 10 раз, а содержание Хл *b* — в 5 раз. В то же время содержание суммарных каротиноидов увеличилось в 1,3 раза (Рис. 5а,в; Рис. 6а). Общая продуктивность каротиноидов, рассчитан-

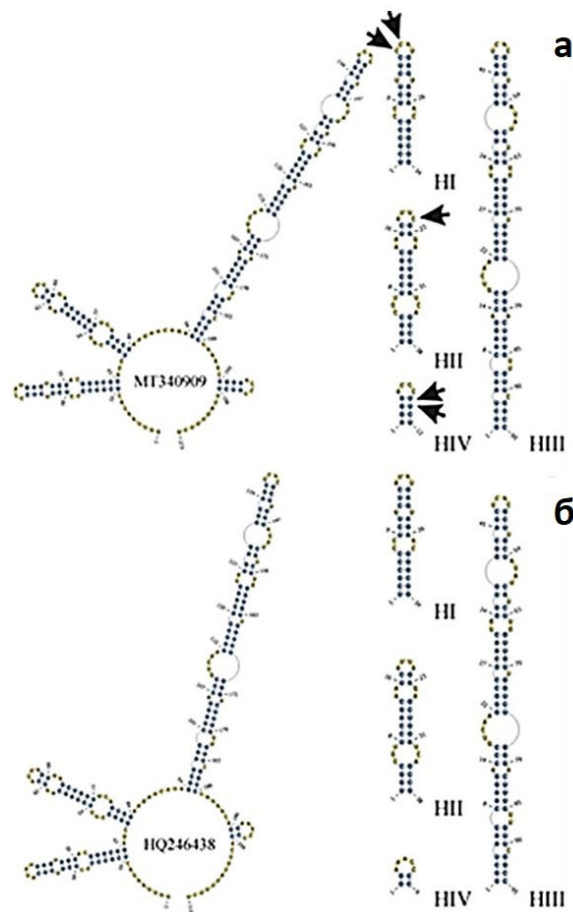


Рис.3. Вторичная структура ITS2 штаммов *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 (а) и *C. eremi* UTEX 1186 (б): общая организация и спирали. Черными стрелками показаны полукомпенсаторные замены нуклеотидных пар.

ная для всего эксперимента, составила  $0,20 \pm 0,01$  мг/л/сут, что сопоставимо с показателем родственного штамма *C. eremi* VKM AI-132 (Данцюк и др., 2024).

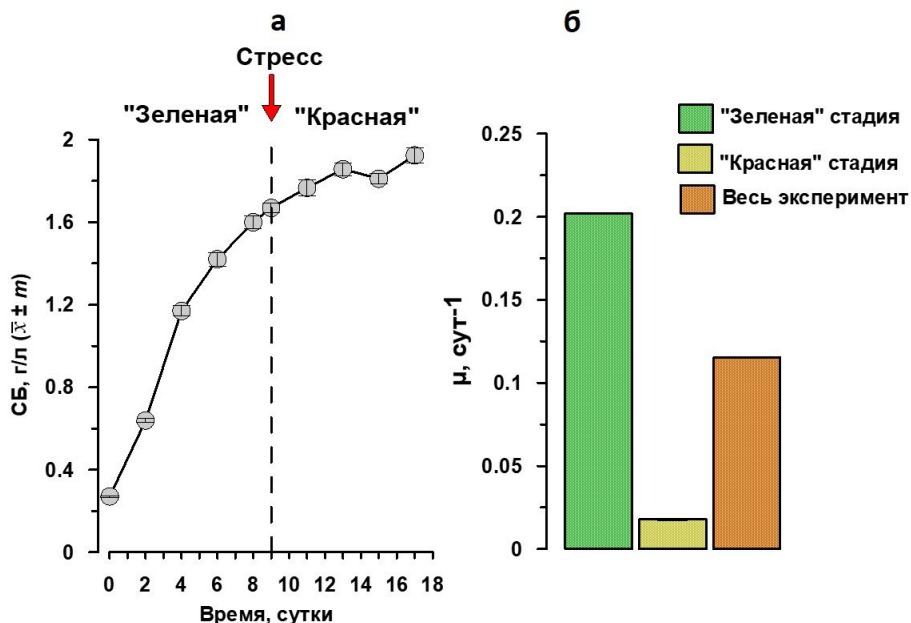


Рис.4. Динамика сухой биомассы (а) и удельная скорость роста (б) *Chlorosarcinopsis* sp. на «зеленой» и «красной» стадиях, а также на протяжении всего эксперимента.

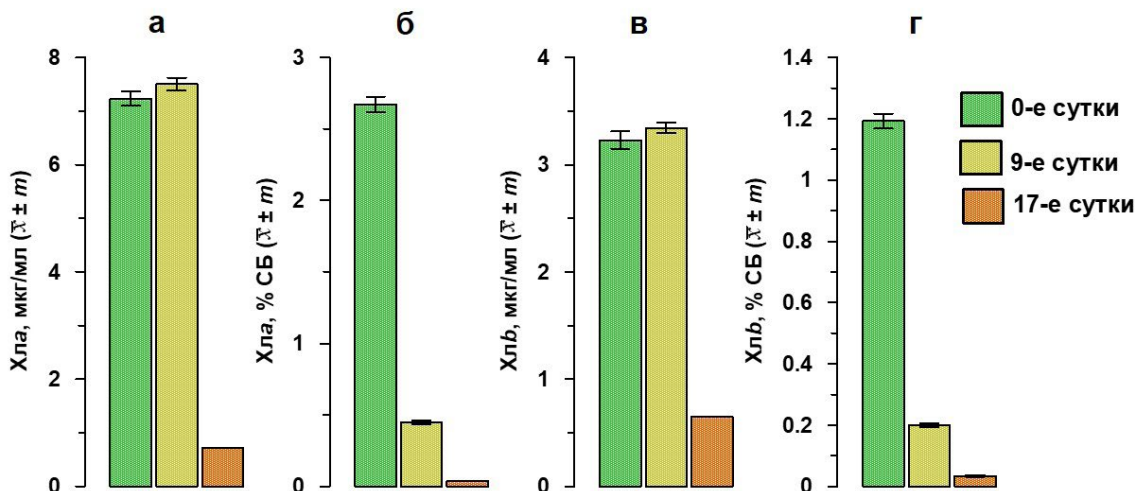


Рис.5. Содержание хлорофиллов в культуре (а, в) и сухой биомассе (б, г) *Chlorosarcinopsis* sp. в начале эксперимента (0-е сутки) и в конце «зеленой» (9-е сутки) и «красной» (17-е сутки) стадий.

### 3.4. Тонкослойная хроматография и состав каротиноидов

Хотя содержание суммарных каротиноидов в биомассе микроводорослей, начиная с 4-х суток «зеленой» стадии, оставалось относительно постоянным, качественный состав каротиноидов значительно изменился в течение последующего периода. Применение тонкослойной хроматографии позволило провести детальное сравнение профилей каротиноидов в конце «зеленой» и «красной» стадий.

В зеленых культурах доминирующим каротиноидом был лютеин при значительном количестве β-каротина и неоксантина (Рис. 7а, 8а). Однако после стрессирования культуры первичные каротиноиды, характерные для «зеленой» стадии, сменились вторичными каротиноидами (ККар), образующимися на «красной» стадии (Рис. 7б, 8б). К концу эксперимента содержание лютеина и β-каротина в клетках *Chlorosarcinopsis* sp. уменьшилось на поря-

док. В красных культурах преобладающими каротиноидами были кантаксантин, моноэфиры адониксантина и эфиры астаксантина (Рис. 8а, б).

В общей сложности эти фракции достигали 75–80 % от общего количества каротиноидов (Рис. 8а, б). Примечательно, что фракции эфиров астаксантина сами по себе составляли почти 35 % от общего количества каротиноидов. Каротиноидный профиль исследуемого штамма *Chlorosarcinopsis* sp. VKM А1-296 на «красной» стадии оказался сходным с профилем штамма *C. eremi* VKM А1-132, ранее представленным Данцюк и соавт. (2024).

Несмотря на относительно низкое содержание суммарных каротиноидов (приблизительно 0,3% от сухой биомассы), каротиноидный состав *Chlorosarcinopsis* sp. VKM А1-296 интересен содержанием ценных ККар, включая кантаксантин, а также эфиры адониксантина, адонирубина и астаксантина, которые в сумме составляют около 80% от суммарных каротиноидов.

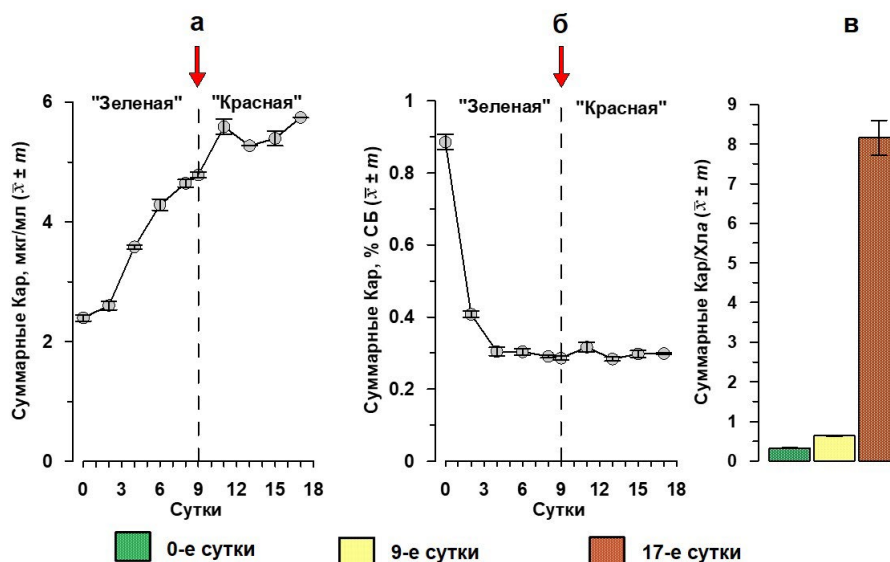


Рис.6. Содержание суммарных каротиноидов в культуре (а) и сухой биомассе (б) *Chlorosarcinopsis* sp., а также соотношение суммарных Кар/Хла (в).

#### 4. Обсуждение

Таксономия рода *Chlorosarcinopsis* имеет сложную и запутанную историю, начавшуюся в 1958 году (Herndon, 1958). Первоначально в род включали 21 вид, с *C. minor* в качестве типового. Со временем некоторые виды были переклассифицированы в роды *Neochlorosarcina*, *Desmotetra* и *Desmochloris*. Молекулярные исследования позднее показали, что род *Chlorosarcinopsis* является полифилетичным: его представители распределены по меньшей мере в две филогруппы – *Arenicolinia* (включая *C. arenicola*, *C. eremi* и *C. variabilis*) и *Stephanosphaerinia* (включая *C. minor*, *C. aggregata*, *C. bastropiensis* и *C. dissociata*) (Watanabe et al., 2006; Nakada et al., 2008). Поскольку голотип *C. minor* формирует независимую филогенетическую линию внутри клады *Stephanosphaerinia*, остальные группы не относятся к собственно роду *Chlorosarcinopsis* и должны быть описаны как новые роды, обладающие морфологией, сходной с *Chlorosarcinopsis*. Тем не менее, таксономия *Chlorosarcinopsis* до сих пор не разрешена, поскольку для некоторых видов (*C. angulosa*, *C. caeca* и *C. superba*) секвенирование еще не проведено, а для других отсутствует достаточный уровень генетического полиморфизма, особенно по более вариабельным локусам. Ключевой проблемой является выбор молекулярных маркеров для улучшения кластеризации филогруппы *Arenicolinia*. Разграничение видов на основе регионов 18S рДНК и ITS2 оказалось проблематичным, что указывает на возможную пригодность для этих целей пластидного гена *rbcL*.

Применение метода двухстадийной накопительной культуры к сарциноидным микроводорослям имеет свои особенности. Агрегация клеток в трехмерные кластеры не позволяет оценить состояние культуры по скорости деления клеток. Из-за деформации клеток внутри агрегатов размеры клеток искажаются. Таким образом, оценка продуктивных качеств *Chlorosarcinopsis* основывается исключительно на измерении содержания сухой биомассы

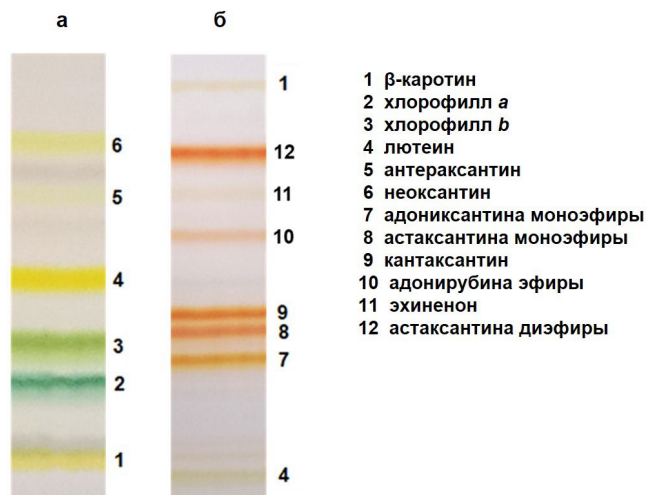


Рис.7. Тонкослойная хроматография *Chlorosarcinopsis* sp. в конце «зеленой» (а) и «красной» (б) стадий культивирования.

в культуре. Особенности динамики сухой биомассы определяются наличием слизистого матрикса (муцилажа), состоящего из сложных полисахаридных и белковых компонентов (Domozych and LoRizzo, 2024). Везикулы муцилажа образуются внутри клетки в аппарате Гольджи, через поры в форме луковицы, а затем высвобождаются наружу, обволакивая клетки *Chlorosarcinopsis* и вызывая их агрегацию (Domozych and Rogers-Domozych, 1993). Образование многоклеточных скоплений в результате деления клеток, а также экранирующий эффект слизистого матрикса быстро ухудшают условия освещения, что отличает сарциноидные микроводоросли от планктонных видов. Поэтому барботирование (непрерывная аэрация) культур является необходимым условием для культивирования этих видов.

Ростовые характеристики изучаемого штамма отражают широкую экологическую устойчивость, характерную для почвенных микроводорослей.

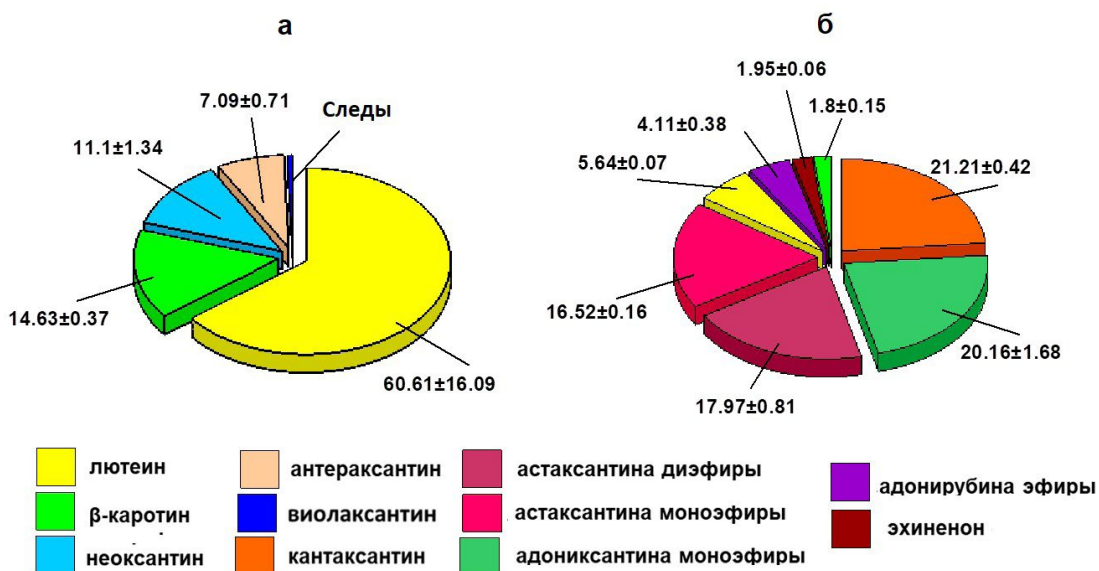


Рис.8. Состав каротиноидов *Chlorosarcinopsis* sp. на «зеленой» (а) и «красной» (б) стадиях эксперимента ( $\bar{x} + m$ ).

Наблюдаемое более чем шестикратное увеличение содержания СБ в период «зеленой» стадии соответствует динамике роста микроводорослей в богатой питательными веществами питательной среде. Сохранение этой тенденции роста даже после воздействия стресса подтверждает наличие адаптационного механизма, позволяющего справляться с резкими изменениями критических факторов окружающей среды (Doppler et al., 2022; Nayana et al., 2022), что является отличительной чертой каротиногенных микроводорослей.

Производительные характеристики *Chlorosarcinopsis* sp., адаптированного к лабораторным условиям культивирования, были сопоставимы с таковыми у ранее изученных экстремобионтов. В частности, средняя продуктивность по биомассе *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 на «зеленой» стадии превысила показатели, зафиксированные для других штаммов, таких как *Bracteacoccus minor*, *Coelastrella rubescens* и *Chromochloris zofingiensis* (порядок Sphaeropleales), а также *Pseudospongiococcum protococcoides* (порядок Chlamydomonadales), продуктивность которых составила 0,08–0,09 г/л/сут (Чубчикова и Дробецкая, 2020).

Наблюдаемые изменения пигментного состава *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 после перехода на «красную» стадию характерны для каротиногенных микроводорослей. Эти изменения подтверждают концепцию вторичного каротиногенеза как стратегии выживания, позволяющей клеткам сохранять жизнеспособность в стрессовых условиях за счет перестройки метаболизма.

Анализ состава каротиноидов подтвердил, что характерной чертой рода *Chlorosarcinopsis* в период активного роста («зеленой» стадии) является абсолютное преобладание лютеина, что согласуется с выводами Cherdchukeattisak et al. (2018). Вторым по значимости пигментом является  $\beta$ -каротин, содержание которого в культуре в конце «зеленой» стадии достигало 0,7 мг/л, что сопоставимо с 0,543 мг/л (Wongsansilp et al., 2007).

На стадии ВКГ в профиле каротиноидов преобладали кантаксантин, моно- и диэфиры астаксантина, а также моноэфиры адониксантина. Доля эстерифицированного астаксантина в общем количестве каротиноидов (34,5%) согласуется с данными, представленными К. Чекановым (Chekanov, 2023) для *Chlainomonas rubra* (32–44,5 %).

Средняя продуктивность суммарных Кар за весь эксперимент ( $0,20 \pm 0,01$  мг/л/сутки) оказалась сопоставима с таковой у *Chromochloris zofingiensis* и *Neochloris wimmeri* (0,21 и 0,22 мг/л/сут, соответственно) (Orosa et al., 2000).

Содержание астаксантина в сухой массе *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 (0,11%) было сопоставимо с содержанием астаксантина у *Chromochloris zofingiensis* (0,17%) (Del Campo et al., 2004), *Coelastrella* sp. S6 (0,17–0,18 %) (Corato et al., 2022) и *Halochlorella rubescens* (0,12–0,18 %) (Chekanov, 2023).

Присутствие метаболитических предшественников астаксантина, наряду с самим астаксантином,

в каротиноидном профиле не снижает биологическую ценность красной биомассы и ее экстрактов. Кроме того, высокое содержание лютеина (60%) в зеленой биомассе делает этот штамм перспективным источником этого пигмента.

## 5. Заключение

Микроскопический и молекулярно-генетический анализ 18S рДНК подтвердил таксономическое положение штамма VKM AI-296 в пределах клады Arenicolinia. Анализ первичной и вторичной структур ITS2 позволил идентифицировать данный штамм как *Chlorosarcinopsis* sp.

Ростовые, физиологические и биохимические характеристики штамма *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 в условиях двухстадийной накопительной культуры сопоставимы с ранее описанными характеристиками каротиногенных зеленых микроводорослей порядков Sphaeropleales и Chlamydomonadales в аналогичных условиях.

В составе каротиноидов «зеленых» клеток преобладает лютеин, тогда как «красные» клетки содержат смесь ценных кетокаротиноидов, включая кантаксантин и эфиры адониксантина и астаксантина. Сходство каротиноидного профиля *Chlorosarcinopsis* sp. с таковым у других представителей Sphaeropleales и Chlamydomonadales косвенно подтверждает предположение о сходных путях биосинтеза астаксантина у этих микроводорослей.

Штамм *Chlorosarcinopsis* sp. VKM AI-296 является потенциально перспективным кандидатом для дальнейших исследований, направленных на оптимизацию условий культивирования (температура, интенсивность света, снабжение питательными веществами и природа стресс-агента) с целью повышения роста биомассы на «зеленой» стадии и биосинтеза кетокаротиноидов на «красной» стадии. Успешное решение этой проблемы может открыть возможности для биотехнологического применения этого штамма в качестве продуцента лютеина или кетокаротиноидов.

## Благодарности

Авторы выражают глубокую благодарность кандидату биологических наук Г.С. Минюк, научному консультанту Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского Российской академии наук, за помощь в анализе полученных данных и консультации по тексту статьи.

Данная работа выполнена в рамках государственного задания «Комплексное исследование механизмов функционирования морских биотехнологических комплексов с целью получения биологически активных веществ из гидробионтов» (проект № 124022400152-1). Морфологический и молекулярно-генетический анализы были выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Госзадание №FMRM-2026-0015).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конкурирующих интересов.

## Список литературы

- Андреева В.М. 1998. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). Санкт-Петербург: Наука.
- Голлербах М.М., Штина Э.А. 1969. Почвенные водоросли. Ленинград: Наука.
- Данцюк Н.В., Чубчикова И.Н., Темралева А.Д. и др. 2024. Морфофизиологические и биохимические характеристики сарциноидной микроводоросли *Chlorosarcinopsis eremi* (Chlorophyceae, Chlorophyta). Физиология растений 71(6): 820–829. DOI: [10.31857/S0015330324060159](https://doi.org/10.31857/S0015330324060159)
- Минюк Г.С., Терентьева Н.В., Дробецкая И.В. 2007. Сравнительная характеристика морфологических и физиолого-биохимических признаков трех штаммов *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyta, Chlamydomonadales). Альгология 17(2): 148–159. DOI: [10.1615/INTERJALGAE.v9.i2.70](https://doi.org/10.1615/INTERJALGAE.v9.i2.70)
- Темралева А.Д., Миничева Е.В., Букин Ю.С. и др. 2014. Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (Chlorophyta). Кострома: Костромской печатный дом.
- Чубчикова И.Н. 2012. Влияние состава среды на содержание вторичных каротиноидов у микроводоросли *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. (Chlorophyceae). Морской экологический журнал 9(4): 95–101.
- Чубчикова И.Н., Дробецкая И.В. 2020. Оценка антирадикальной активности вторичных каротиноидов у четырех видов зеленых микроводорослей порядка Sphaeropleales в системе in vitro. Труды Карадагской научной станции им. Т.И. Вяземского - природного заповедника РАН 2(14): 66–78. DOI: [10.21072/eco.2021.14.07](https://doi.org/10.21072/eco.2021.14.07)
- Чубчикова И.Н., Дробецкая И.В., Данцюк Н.В. и др. 2022. Оптимизация метода фиксации пресноводных микроводорослей (Scenedesmeceae, Chlorophyta) для первичной идентификации с использованием сканирующей электронной микроскопии. Вопросы современной альгологии 1(28): 102–109. DOI: [10.33624/2311-0147-2022-1\(28\)-102-109](https://doi.org/10.33624/2311-0147-2022-1(28)-102-109)
- Чубчикова И.Н., Минюк Г.С., Дробецкая И.В. и др. 2009. Хлорококковые микроводоросли как потенциальный источник природных кето-каротиноидов. Экология моря 77: 77–83.
- Bischoff H.W., Bold H.C. 1963. Some soil algae from enchanted rock and related algal species. Phycological Studies IV 6318:1–95.
- Boussiba S. 2000. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: cellular physiology and stress response. Physiologia Plantarum 108(2):111–117. DOI: [10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x](https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x)
- Britton G. 2008. TLC of carotenoids. In: Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J., Kowalska T. (Eds.), Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. New York, CRC Press, pp. 543–573. DOI: [10.1201/9781420046786](https://doi.org/10.1201/9781420046786)
- Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. 2004. Carotenoids Handbook. Basel, Birkhäuser Verlag.
- Byun Y., Han K. 2009. PseudoViewer3: generating planar drawings of large-scale RNA structures with pseudoknots. Bioinformatics 25(11): 1435–1437. DOI: [10.1093/bioinformatics/btp252](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp252)
- Caisová L., Marin B., Melkonian M. 2013. A consensus secondary structure of ITS2 in the Chlorophyta identified by phylogenetic reconstruction. Protist 164(4): 482–496. DOI: [10.1016/j.protis.2013.04.005](https://doi.org/10.1016/j.protis.2013.04.005)
- Chekanov K. 2023. Diversity and distribution of carotenogenic algae in Europe: A Review. Marine Drugs 21: 108. DOI: [10.3390/md21020108](https://doi.org/10.3390/md21020108)
- Chelebieva E.S., Dantsyuk N.V., Chekanov K.A. et al. 2018. Identification and morphological-physiological characterization of astaxanthin producer strains of *Haematococcus pluvialis* from the Black Sea region. Applied Biochemistry and Microbiology 54(6): 639–648. DOI: [10.1134/S0003683818060078](https://doi.org/10.1134/S0003683818060078)
- Chen J., Liu L., Wei D. 2017. Enhanced production of astaxanthin by *Chromochloris zofingiensis* in a microplate-based culture system under high light irradiation. Bioresource technology 245: 518–529. DOI: [10.1016/j.biortech.2017.08.102](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.102)
- Cherdchukeattisak P., Fraser P.D., Purton S. et al. 2018. Detection and enhancement of ketocarotenoid accumulation in the newly isolated sarcinoid green microalga *Chlorosarcinopsis* PY02. Biology 7: 1–14. DOI: [10.3390/biology7010017](https://doi.org/10.3390/biology7010017)
- Coleman A.W. 2000. The significance of a coincidence between evolutionary landmarks found in mating affinity and a DNA sequence. Protist 151: 1–9. DOI: [10.1078/1434-4610-00002](https://doi.org/10.1078/1434-4610-00002)
- Coleman A.W. 2003. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. Trends in Genetics 19: 370–375. DOI: [10.1016/S0168-9525\(03\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00118-5)
- Coleman A.W. 2009. Is there a molecular key to the level of “biological species” in eukaryotes? A DNA guide. Molecular Phylogenetics and Evolution 50: 197–203. DOI: [10.1016/j.ympev.2008.10.008](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.10.008)
- Corato A., Le T.T., Baurain D. et al. 2022. A fast-growing oleaginous strain of *Coelastrella* capable of astaxanthin and canthaxanthin accumulation in phototrophy and heterotrophy. Life 12:334. DOI: [10.3390/life12030334](https://doi.org/10.3390/life12030334)
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R. et al. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8): 772. DOI: [10.1038/nmeth.2109](https://doi.org/10.1038/nmeth.2109)
- Del Campo J.A., Rodríguez H., Moreno J. et al. 2004. Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). Applied Microbiology and Biotechnology 64: 848–854. DOI: [10.1007/s00253-003-1510-5](https://doi.org/10.1007/s00253-003-1510-5)
- Domozych D.S., LoRiccio J.G. 2024. The extracellular matrix of green algae. Plant Physiology 194: 15–32. DOI: [10.1093/plphys/kiad384](https://doi.org/10.1093/plphys/kiad384)
- Domozych D.S., Rogers-Domozych C. 1993. Mucilage processing and secretion in the green alga *Closterium* II. Ultrastructure and immunocytochemistry. Journal of Phycology 29: 659–667. DOI: [10.1111/j.0022-3646.1993.00659.x](https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1993.00659.x)
- Doppler P., Kriechbaum R., Käfer M. et al. 2022. *Coelastrella terrestris* for adonixanthin production: physiological characterization and evaluation of secondary carotenoid productivity. Marine Drugs 20(3): 175. DOI: [10.3390/md20030175](https://doi.org/10.3390/md20030175)
- Egeland E.S., Garrido J.L., Clementson L. et al. 2011. Data sheets aiding identification of phytoplankton carotenoids and chlorophylls. In: Roy S., Llewellyn C., Egeland E.S. et al. (Eds.), Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography. Cambridge, pp. 665–822.
- Fábregas J., Otero A., Maseda A. et al. 2001. Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Journal of biotechnology 89(1): 65–71. DOI: [10.1016/S0168-1656\(01\)00289-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00289-9)
- Friedmann I., Ocampo-Paus R. 1965. A new *Chlorosarcinopsis* from the Negev Desert. Journal of Phycology 1(4): 185–191. DOI: [10.1111/j.1529-8817.1965.tb04581.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1965.tb04581.x)
- Guiry M.D., Guiry G.M. 2025. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. URL: <http://www.algaebase.org> (Accessed: 24 November 2025).

- Hall J.D., Fučíková K., Lo C. et al. 2010. An assessment of proposed DNA barcodes in freshwater green algae. *Cryptogamie, Algologie* 31(4): 529–555.
- Henry L.E.A., Mikkelsen J.D., Møller B.L. 1983. Pigment and acyl lipid composition of photosystem I and II vesicles and of photosynthetic mutants in barley. *Carlsberg Research Communications* 48: 131–148. DOI: [10.1007/bf02906174](https://doi.org/10.1007/bf02906174)
- Herndon W. 1958. Studies on chlorosphaeracean algae from soil. *American Journal of Botany* 45(4): 298–308.
- Hoshina R. 2014. DNA analyses of a private collection of microbial green algae contribute to a better understanding of microbial diversity. *BMC Research Notes* 7: 592. DOI: [10.1186/1756-0500-7-592](https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-592)
- Hoshina R., Fujiwara Y. 2013. Molecular characterization of *Chlorella* cultures of the National Institute for Environmental Studies culture collection with description of *Micractinium inermum* sp. nov., *Didymogenes sphaerica* sp. nov., and *Didymogenes soliella* sp. nov. (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *Phycological Research* 61: 124–132. DOI: [10.1111/pre.12010](https://doi.org/10.1111/pre.12010)
- Jeffers T.L., Roth M.S. 2021. Revealing mechanisms of algal astaxanthin production and bioengineering potential using multiomics. In: Ravishankar G.A., Ambati R.R. (Eds.), *Global perspectives on Astaxanthin: from industrial production to food, health, and pharmaceutical applications*. Cambridge, pp. 181–208. DOI: [10.1016/B978-0-12-823304-7.00010-60](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823304-7.00010-60)
- Katana A., Kwiatowski J., Spalik K. et al. 2001. Phylogenetic position of *Koliella* (Chlorophyta) as inferred from nuclear and chloroplast small subunit rDNA. *Journal of Phycology* 37(3): 443–451. DOI: [10.1046/j.1529-8817.2001.037003443.x](https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.037003443.x)
- Khani-Juyabad F., Mohammadi P., Zarrabi M. 2019. Comparative analysis of *Chlorosarcinopsis eremi* mitochondrial genome with some Chlamydomonadales algae. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 25(5): 1301–1310. DOI: [10.1007/s12298-019-00696-y](https://doi.org/10.1007/s12298-019-00696-y)
- Laroche C. 2022. Exopolysaccharides from microalgae and cyanobacteria: diversity of strains, production strategies, and applications. *Marine Drugs* 20(5): 336. DOI: [10.3390/md20050336](https://doi.org/10.3390/md20050336)
- Lemoine Y., Schoefs B. 2010. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research* 106: 155–177. DOI: [10.1007/s11120-010-9583-3](https://doi.org/10.1007/s11120-010-9583-3)
- Lewis L.A., Lewis P.O. 2005. Unearthing the molecular phylogeny of desert soil green algae (Chlorophyta). *Systematic Biology* 54(6): 936–947. DOI: [10.1080/10635150500354852](https://doi.org/10.1080/10635150500354852)
- Lichtenthaler H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods in Enzymology* 148: 350–382.
- Malik S., Ashraf M.U.F., Shahid A. et al. 2022. Characterization of a newly isolated self-flocculating microalga *Bracteacoccus pseudominor* BERC09 and its evaluation as a candidate for a multiproduct algal biorefinery. *Chemosphere* 304: 135346. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2022.135346](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135346)
- Marchenko M.M., Dorosh I.V., Cheban L.M. 2019. Induction of carotenogenesis in *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew cultivated on the closed waterside from recirculating aquaculture system. *Biotechnologia Acta* 12(2): 46–55. DOI: [10.15407/biotech12.02.046](https://doi.org/10.15407/biotech12.02.046)
- Minyuk G., Chelebieva E., Chubchikova I. et al. 2017. Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrrella rubescens* (Scenedesmaceae, Chlorophyta), a producer of value-added keto-carotenoids. *Algae* 32(3): 245–259. DOI: [10.4490/algae.2017.32.8.6](https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.8.6)
- Minyuk G., Dantsyuk N., Chelebieva E. et al. 2019. The effect of diverse nitrogen sources in the nutrient medium on the growth of the green microalgae *Chromochloris zofingiensis* in the batch culture. *Marine Biological Journal* 4: 41–52. DOI: [10.21072/mbj.2019.04.4.04](https://doi.org/10.21072/mbj.2019.04.4.04)
- Minyuk G., Sidorov R., Solovchenko A. 2020. Effect of nitrogen source on the growth, lipid, and valuable carotenoid production in the green microalga *Chromochloris zofingiensis*. *Journal of Applied Phycology* 32: 923. DOI: [10.1007/s10811-020-02060-0](https://doi.org/10.1007/s10811-020-02060-0)
- Minyuk G.S., Chelebieva E.S., Chubchikova I.N. 2014. Secondary carotenogenesis of the green microalga *Bracteacoccus minor* (Chodat) Petrova (Chlorophyta) in a two-stage culture. *International Journal on Algae* 16(4): 354–368.
- Minyuk G.S., Solovchenko A.E. 2018. Express analysis of microalgal secondary carotenoids by TLC and UV-Vis spectroscopy. In: Barriero C., Barriero J.-L. (Eds.), *Microbial Carotenoids: Methods and Protocols*. New York, pp. 73–95. DOI: [10.1007/978-1-4939-8742-9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9)
- Nair A., Ahirwar A., Singh S. et al. 2023. Astaxanthin as a king of ketocarotenoids: structure, synthesis, accumulation, bioavailability and antioxidant properties. *Marine Drugs* 21(3): 176. DOI: [10.3390/md21030176](https://doi.org/10.3390/md21030176)
- Nakada T., Misawa K., Nozaki H. 2008. Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 281–291. DOI: [10.1016/j.ympev.2008.03.016](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.03.016)
- Nayana K., Sudhakar M.P., Arunkumar K. 2022. Biorefinery potential of *Coelastrrella* biomass for fuel and bioproducts—a review. *Biomass Conversion and Biorefinery*. DOI: [10.1007/s13399-022-02519-9](https://doi.org/10.1007/s13399-022-02519-9)
- Orosa M., Torres E., Fidalgo P. et al. 2000. Production and analysis of secondary carotenoids in green algae. *Journal of Applied Phycology* 12: 553–556.
- Remias D., Pichrtova M., Pangratz M. et al. 2016. Ecophysiology, secondary pigments and ultrastructure of *Chlainomonas* sp. (Chlorophyta) from the European Alps compared with *Chlamydomonas nivalis* forming red snow. *Microbiology Ecology* 92(4): fiw030. DOI: [10.1093/femsec/fiw030](https://doi.org/10.1093/femsec/fiw030)
- Rodriguez-Amaya D.B. 2001. *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington: ILSI Press.
- Saito M., Watanabe H., Sasaki M. et al. 2023. Coproduction of lipids and carotenoids by the novel green alga *Coelastrrella* sp. depending on cultivation conditions. *Biotechnology Reports* 37: e00769. DOI: [10.1016/j.btre.2022.e00769](https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00769)
- Seibel P.N., Müller T., Dandekar T. et al. 2006. 4SALE – a tool for synchronous RNA sequence and secondary structure alignment and editing. *BMC Bioinformatics* 7: 498. DOI: [10.1186/1471-2105-7-498](https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-498)
- Solovchenko A. 2013. Physiology and adaptive significance of secondary carotenogenesis in green microalgae. *Russian Journal of Plant Physiology* 60(1): 1–13. DOI: [10.1134/S1021443713010081](https://doi.org/10.1134/S1021443713010081)
- Solovchenko A., Merzlyak M., Khozin-Goldberg I. et al. 2010. Coordinated carotenoid and lipid syntheses induced in *Parietochloris incisa* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) mutant deficient in  $\Delta 5$  desaturase by nitrogen starvation and high light. *Journal of Phycology* 46: 763–772. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2010.00849.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00849.x)
- Vasistha S., Khanra A., Rai M.P. 2021. Influence of microalgae-ZnO nanoparticle association on sewage wastewater towards efficient nutrient removal and improved biodiesel application: An integrated approach. *Journal of Water Process Engineering* 39: 101711. DOI: [10.1016/j.jwpe.2020.101711](https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101711)
- Vonshak A. 1985. Microalgae: Laboratory growth techniques and outdoor biomass production. In: Coombs J., Hall D., Long S. et al. (Eds.), *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis*. Oxford: Pergamon Press, pp. 188–203. DOI: [10.1016/B978-0-08-031999-5.50025-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-031999-5.50025-X)
- Watanabe S., Mitsui K., Nakayama T. et al. 2006. Phylogenetic relationships and taxonomy of sarcinoid green algae: *Chlorosarcinopsis*, *Desmotetra*, *Sarcinochlamys* gen. nov.,

*Neochlorosarcina*, and *Chlorosphaeropsis* (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology* 42: 679–695. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2006.00196.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2006.00196.x)

White T.J., Bruns T., Lee S. et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. et al. (Eds.), *PCR protocols*. San Diego: Academic Press, pp. 315–324.

Wongsansilp T., Tansakul P., Arunyanart M. 2007. Factors affecting growth and betacarotene content of *Chlorosarcinopsis* sp. (PSU/CHL20) in batch culture. *Kasetsart J (Nat Sci)* 41(1):153–157.

Wood A.M., Everroad R.C., Wingard L.M. 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. In: Andersen R.A. (Ed.), *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, pp. 269-285. DOI: [10.1016/B978-012088426-1/50019-6](https://doi.org/10.1016/B978-012088426-1/50019-6)