

New strains of green microalgae from extreme environments in Crimea: identification using an integrative taxonomic approach

Dantsyuk N.V.^{1*}, Mansurova I.M.¹, Degtyar I.V.², Kuleshova O.N.¹, Drobeckaya I.V.¹, Bocharova E.A.¹, Lishaev V.N.¹, Kirin M.P.¹, Krivenko O.V.¹

¹ A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, 2 Nakhimov Ave., Sevastopol, 299011, Russia

² Sevastopol State University, 3 Universitetskaya St., Sevastopol, 299053, Russia

ABSTRACT. This study was conducted as part of a project to establish a bioresource collection of carotenogenic microalgae from the Crimean region with the aim of identifying promising strains adapted to the climatic conditions of southern Russia. A large-scale sampling campaign was carried out in extreme habitats of the western and south-eastern parts of the peninsula, resulting in the isolation and characterization of five novel strains of green algae. Taxonomic identification was performed using an integrative approach that combined analysis of life cycle traits, morphological characterization by light and scanning electron microscopy, and phylogenetic analysis of the nuclear ribosomal DNA region (ITS1–5.8S–ITS2). The strains were assigned to four genera within the classes Chlorophyceae (*Coelastrella thermophila* IBSS-98, *Tetrademus obliquus* IBSS-164, *Desmodesmus multivariabilis* IBSS-167 and IBSS-171) and Trebouxiophyceae (*Dictyosphaerium ehrenbergianum* IBSS-163). All strains represent species new to the IBSS collection and were obtained in pure culture from the Crimean algal flora for the first time. The broad range of biotechnological applications for these strains – from environmental remediation to production of high-value compounds for the pharmaceutical, cosmetic, and food industries, as well as biofuels – highlights the importance of further research and supports the potential for regional economic development.

Keywords: microalgae, culture collection, phylogenetic analysis, integrative approach, *Coelastrella thermophila*, *Tetrademus obliquus*, *Desmodesmus multivariabilis*, *Dictyosphaerium ehrenbergianum*, biotechnology

For citation: Dantsyuk N.V., Mansurova I.M., Degtyar I.V., Kuleshova O.N., Drobeckaya I.V., Bocharova E.A., Lishaev V.N., Kirin M.P., Krivenko O.V. New strains of green microalgae from extreme environments in Crimea: identification using an integrative taxonomic approach // Limnology and Freshwater Biology. 2026. - № 4. - P. 310-337. DOI: 10.31951/2658-3518-2026-A-4-310

1. Introduction

Microalgae biotechnology offers significant potential for implementing the concept of a circular economy (Santos et al., 2025), which provides a harmonious balance between environmental and economic priorities. It allows for the creation of zero-waste industrial systems, minimizing anthropogenic impact, and reducing greenhouse gas emissions across various economic sectors (Dvoretzky et al., 2022; Ende and Abomohra, 2024).

Taxonomically, microalgae are a polyphyletic group of eukaryotes that, through parallel evolution via single or multiple endosymbiosis, acquired the capacity for photosynthesis (Glibert, 2024). The phylogenetic divergence of microalgal lineages began early in the evolution of autotrophic eukaryotes, resulting in the exceptional diversity of metabolic networks among their modern representatives (Hildebrand et al., 2013).

Microalgae cells are able to accumulate significant amounts of proteins, carbohydrates, polar and neutral lipids with a rich set of fatty acids, and synthesize a wide range of biologically active compounds, including pigments (carotenoids, chlorophyll), vitamins, phytohormones, and antibiotics (Elsayed et al., 2024). This determines scientific interest in studying their biotechnological potential, stimulating the search for new valuable metabolites and the identification of promising producer strains for the industrial production of targeted compounds. Technological progress opens up opportunities for using microalgae biomass in several key areas: as a renewable fuel source (Jaremko et al., 2023), as a feedstock for the environmentally friendly production of bioplastics and biopolymers, and for restoring disturbed aquatic and terrestrial biotopes (Kim et al., 2022; Silva et al., 2025).

Screening the natural diversity of microalgae in extreme biotopes is a key approach for identifying strains with high biotechnological potential. Adaptation to extreme condi-

*Corresponding author. E-mail address: dantsiuk@ibss-ras.ru (N.V. Dantsyuk)

Received: June 20, 2026;

Accepted after revised: July 28, 2026;

Available online: August 28, 2026

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



tions is associated with a shift in intracellular metabolism towards the biosynthesis of secondary metabolite compounds that often exhibit high biological activity (Solovchenko and Minyuk, 2021; Debnath et al., 2024). The deposition of strains in living culture collections is a critical step in the development of biotechnological research. It ensures the confirmed taxonomic status of the object, its storage under strictly controlled conditions, and the maintenance of the purity and viability of the culture (Temraleeva and Sinetova, 2023). Such collection funds provide a reliable basis for employing reference strains in both fundamental research and industrial biotechnological development. Legislative recognition of their importance for biodiversity conservation (Federal Law of the Russian Federation of November 27, 2024 “On Bioresource Centers...”) emphasizes the strategic importance of these collections for national biotechnology infrastructure.

The collection of live cultures of carotenogenic microalgae at the A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS (IBSS, registration no. 1201 in the World Data Centre for Microorganisms, WDCM) (Dantsyuk et al., 2021) was established in 2002 as part of the general collection of live cultures of microalgae at the Institute of Biology of the Southern Seas. Since 2017, it has been included in the Noah’s Ark National Depository of Living Systems (a project of Lomonosov Moscow State University) under the identifier IBSS-ALGAE. The collection is replenished through targeted intercollection exchange and the isolation of new strains from the natural environment.

Due to the climatic conditions in the Russian Federation, mass cultivation of microalgae is only possible in a limited number of regions. Therefore, the search for new strains promising for industrial cultivation in the southern regions is a pressing issue for scaling up biotechnological processes. As part of the development of the IBSS collection, screening of Crimean algal flora began in 2024, aiming to identify microalgal strains adapted to local conditions. To date, 37 strains of Chlorophyta have been isolated from extreme habitats in the western and southeastern parts of the peninsula and belong to various ecological groups – aquatic, aerophilic, soil species, and lichen phycobionts.

The aim of this study was to describe five new Crimean microalgal strains deposited in the IBSS collection and identified through research of their life cycle, morphological fine structure, and molecular genetic analysis. Based on literary sources, the prospects for the practical use of new collection strains in biotechnological processes are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Sampling areas

Sampling was conducted in four locations in the steppe region of Western Crimea and in the foothills of the southeastern and southwestern parts of

the Peninsula during the spring and summer (Fig. 1., Table 1).

Sampling point 1 – the innermost part of Lake Donuzlav near the village of Krasnoyarskoye (north side of the bridge, 5-10 m from a freshwater well). A 3-4 m deep section is separated by a dam, creating freshwater conditions (Ryabushko et al., 2021). Salinity in the main body of water is 17.5-18.2‰.

Sampling point 2 – the eastern part of the Lake Kyzyl-Yar (a former hypersaline water body off the western coast of Crimea). The lake has been subjected to eutrophication and desalinization due to waters from the Mezhgornoye Reservoir (Shadrin et al., 2018). Sampling took place in the furthest part from the sea, with brackish water (2‰).

Sampling point 3 – an open plastic container with fresh water within the urban area of Sevastopol.

Sampling point 4 – rock baths on the slope of Mount Legener (Karadag volcanic massif). Rounded depressions in the rock (radius ~1 m, depth 0.5 m) are arranged in a cascade every 2-3 meters. Sampling was carried out in August, when there was no hydrological connection between the basins (the waters were stagnant). Samples were collected separately from different sites.

2.2. Material collection

Water samples from rock baths and natural water bodies were collected at the surface layer (0-0.1 m) using sterile Falcon polypropylene tubes. Salinity was measured with an ATAGO PAL-06S portable refractometer (Japan). Scrapings of wet deposit from a container with fresh water were taken with cotton swabs and sealed in polyethylene bags. Each sample was labeled with its number, collection date, precise GPS coordinates, and the collector’s name. The samples were stored in laboratory conditions at temperatures and lighting levels as close as possible to in situ conditions until analysis.



Fig.1. Sampling map: 1 – Lake Donuzlav, corner part; 2 – Lake Kyzyl-Yar, eastern part; 3 – Sevastopol, Nakhimov Ave., 2; 4 – Karadag Nature Reserve, Mount Legener.

Table 1. Field sample collection areas.

No	Sampling area and points		Coordinates	Altitude	Salinity	Biotop	Date
1	Western Crimea, steppe region	Chernomorsky district, Krasnoyarskoye village, the corner part of Donuzlav Lake	45.500180, 33.264876	0 m	2‰	Water body	27.08.2024
2		Saki district, Lake Kyzyl-Yar (easternmost part, remote from the sea)	45.066459, 33.648638	1 m	2‰	Water body	27.08.2024
3	Southwestern Crimea, foothills	Sevastopol, Nakhimov Avenue, 2	44.616969, 33.522144	16 m	0‰	Plastic container with water	05.2024
4	Southeastern Crimea, foothills	Karadag Nature Reserve, Kara-Dag volcanic massif, Mt. Legener.	44.941943, 35.202785	300 m	0‰	Water body	20.08.2024

2.3. Isolation and cultivation of algal strains

Water samples were concentrated by centrifugation at low speed (70-130 g, 2-3 min). The supernatant was removed, and an artificial nutrient medium diluted 2-3 times with distilled water was added to the cell pellet. Bold's standard mineral medium (BBM) for green microalgae was used in this study (Bischoff and Bold, 1963). Biomaterial scrapings on cotton swabs were placed in glass vials containing diluted BBM, sealed with cotton-gauze stoppers, and incubated at room temperature for several days. To obtain algologically pure cultures, a method of multiple serial dilutions and inoculation of individual cells with a micropipette was used (Temraleeva et al., 2014). The final stage included inoculation on 1.5% BBM-agar in Petri dishes using the depletion streak method (Temraleeva et al., 2014).

Germination and formation of the first colonies were observed on an average after 2 weeks. To obtain an actively vegetating batch culture, individual microalgae colonies were inoculated with a microbiological loop into glass test tubes with a small volume (0.3 ml) of liquid BBM, sealed with cotton-gauze stoppers and incubated at room temperature and illumination of 35 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Cell viability was monitored under a light microscope. For antibacterial treatment, a cocktail of broad-spectrum antibiotics was used (Kan and Pan, 2010): ampicillin (500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) and cefotaxime (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Fungicidal treatment was performed with a solution of fundazole (40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Mokrosnop and Zolotareva, 2012). For long-term storage, algologically pure microalgae cultures on 1.5% BBM-agar were placed in duplicate under controlled conditions. Samples were placed in a modified Snaige refrigerator display case equipped with Feron DL 20W T4 6400K LED lamps (Russia) and two additional thermostats (type F/2000, manufacturer FTWOF PRODIGY). The temperature was maintained at 14-16°C, with a light intensity of 20-26 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and a photoperiod of 15 h light: 9 h dark.

Five green microalgae strains were isolated and assigned numbers: IBSS-98, IBSS-164, IBSS-167, IBSS-171, and IBSS-163.

2.4. Light microscopy (LM)

Morphometric parameters of cell isolates were determined using a Nikon Eclipse Ts2R inverted light microscope. Linear dimensions were measured on micrographs obtained using a Lumenera Infinity 3 digital camera and processed using ImageJ Software (National Institute of Health, USA). A sample of 100 cells was taken for cell population size analysis. Live cultures were used for taxonomic identification. The algal life cycle was observed for 1-4 weeks.

2.5. Scanning electron microscopy (SEM)

To obtain cell surface images, samples were fixed with a glutaraldehyde solution at a final concentration of 1% in phosphate buffer (Chubchikova et al., 2022). Samples were dehydrated in a series of increasing concentrations of ethanol or ethanol and acetone (Rylkova et al., 2023). Critical point drying of the samples was performed in a Leica EM CPD300 system (Germany) for 2.5 hours in soft mode. Sputtering with an Au/Pd alloy (0.5-1.0 min) was performed in a Leica EM ACE200 system (Germany). SEM images of the cells were obtained using a Hitachi SU3500 scanning electron microscope (Japan) at the Microscopy Laboratory of the IBSS.

2.6. Molecular genetic analysis

Total DNA was extracted from concentrated microalgae cultures using the DNA-Extran-3 kit (Synthol, Russia) according to the manufacturer's protocol. The nuclear ribosomal gene cluster, including the ITS1, 5.8S rDNA, and ITS2 regions, was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the EncycloPlus PCR kit (Eurogen, Russia) with primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). The amplification protocol included: initial denaturation at 94°C for 3 min; 34 cycles (denaturation – 30 s at 94°C, primer annealing – 30 s at 60°C, elongation – 60 s at 72°C); and final elongation – 10 min at 72°C. The quality of the amplicons was assessed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide at a concentration of 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. PCR products were purified using the ColGen kit (Synthol, Russia) and sequenced using the GenSeq kit (Synthol, Russia) on a Nanophore 05 genetic analyzer (Institute for Advanced Studies, SevSU, Russia). Sequence editing and assembly were performed by manually comparing the forward and reverse chromatograms using 4Peaks (<http://nucleobytes.com/index.php/4peaks>).

Primary analysis of nucleotide sequences was performed using the BLASTn algorithm (Zhang et al., 2000; Morgulis et al., 2008). The obtained sequences for each strain were used as queries for an NCBI search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The best matches were selected for further reconstruction based on sequence coverage, E-value, and percent identity, with a primary focus on sequences from authentic strains.

Multiple sequence alignment was performed using MAFFT v.7.48 (Katoh and Toh, 2010) with the L-INS-I algorithm, followed by removal of ambiguously aligned regions at the 5' and 3' ends. The length of the resulting matrix was 890 bp for IBSS-98, IBSS-164, IBSS-167, and IBSS-171 and 4989 bp for IBSS-163. Phylogenetic reconstructions were performed using the maximum likelihood (ML) method in the program IQ-TREE 3.0.0 (Trifinopoulos et al., 2016). The GTR+I+G4 and TIM2+F+I+R2 nucleotide substitution models was automatically selected using ModelFinder using the Bayesian information criterion (BIC). The level of statistical support for the phylogenetic tree topology was assessed using three ratios: SH-like approximate likelihood ratio test (SH-aLRT, 10000 replications), "ultrafast" bootstrap ("ultrafast bootstrap", 10000 pseudoreplications), and aBayes method (number of failed iterations 1000). A Bayesian phylogenetic analysis was performed using BEAST v.10.5.0 (Suchard et al., 2018) for the concatenation matrix under the GTR+I+G4 substitution model and the Yule process of speciation. We calculated the Kimura two-parameter (K2P) distances using the MEGA 11 software (Kimura, 1980; Tamura et al., 2021). Visualization and editing of phylogenetic trees were performed using the phylo.io online service (<https://phylo.io/index.html>).

Preliminary taxonomic identification based on morphological features was performed using identification keys (Komárek and Fott, 1983; Tsarenko, 1990; Andreeva, 1998). Algal taxonomy is specified according to AlgaeBase (Guiry and Guiry, 2026).

3. Results

3.1. Strain identification using molecular phylogeny

For five new strains isolated in pure culture and deposited in the IBSS collection, nucleotide sequences

of the rDNA marker region, including ITS1–5.8S–ITS2 (partially), were obtained. The total sequence length was 597 bp for strains IBSS-171 and IBSS-167, 620 bp for IBSS-98, 693 bp for IBSS-164, and 706 bp for IBSS-163. Initial analysis revealed that the sequences cluster within two chlorophyte families: Scenedesmaceae (IBSS-98, IBSS-164, IBSS-167, and IBSS-171) and Chlorellaceae (IBSS-163). A separate phylogenetic reconstruction was performed for each family. Multiple sequence alignments supporting these reconstructions are provided

in Supplementary files S1 and S2, for Scenedesmaceae and Chlorellaceae, respectively (available via <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.32731128>).

On the phylogenetic tree of the Scenedesmaceae family (Fig. 2), the obtained sequences are distributed among three closely related clades formed by representatives of the genera *Desmodesmus* (IBSS-171 and IBSS-167), *Tetradismus/Acutodesmus* (IBSS-164), and *Coelastrella* (IBSS-98).

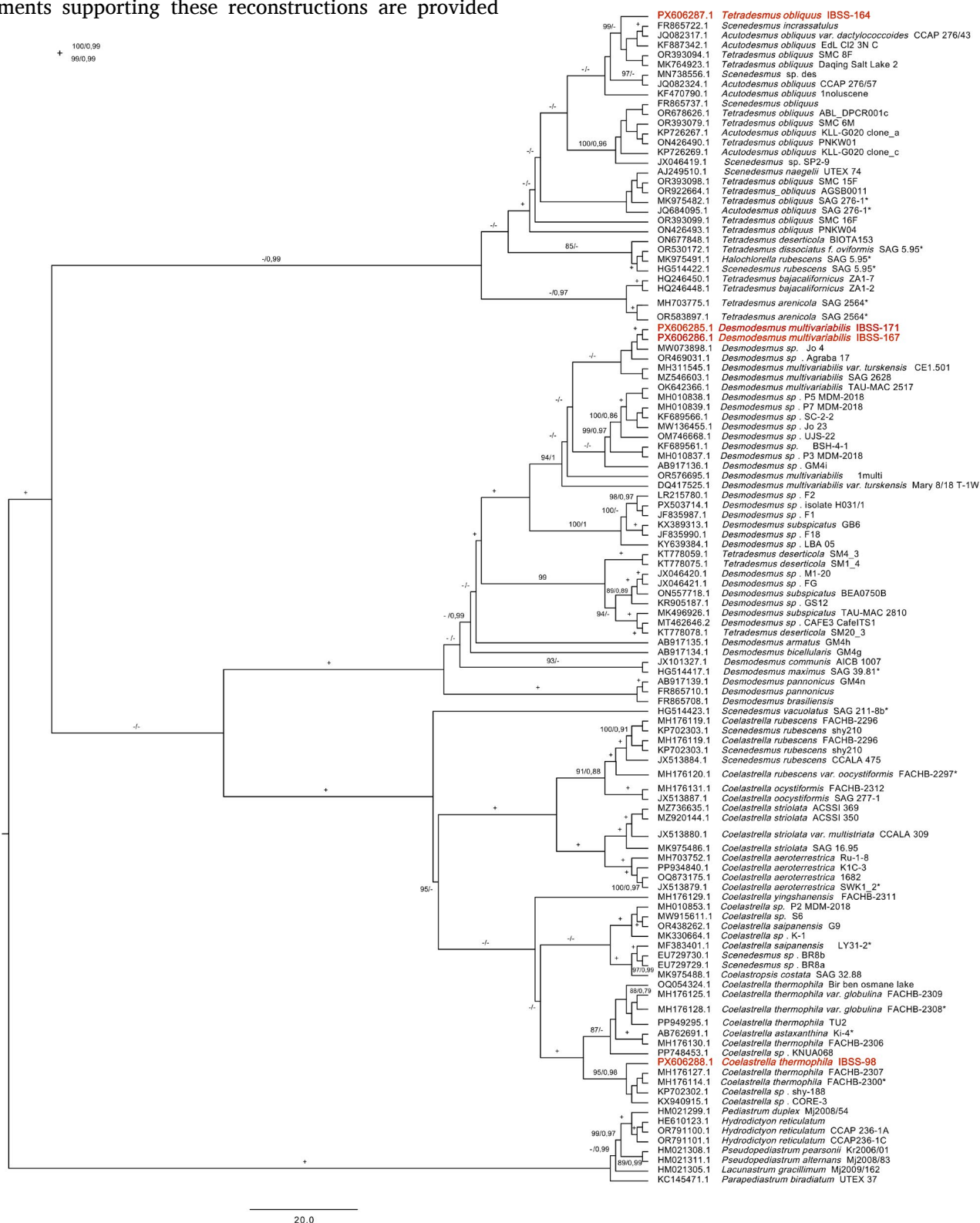


Fig.2. Position of the new strains IBSS-98, IBSS-164, IBSS-167, and IBSS-171 on the phylogenetic tree of the Scenedesmaceae, reconstructed by maximum likelihood (ML) from the ITS rDNA region. Support values are indicated as BS/PP (Bootstrap percentage / Bayesian posterior probability); only nodes with BS ≥ 85 and PP ≥ 0.85 are displayed on the tree. Support values BS ≥ 99 and PP ≥ 0.99 are marked with an asterisk (+). Authentic strains are marked with an asterisk (*).

The sequences of the analyzed genomic regions from strains IBSS-171 and IBSS-167 are completely identical. In the phylogenetic tree, these strains are included in a clade that encompasses several *D. multivariabilis* strains, including the authentic *D. multivariabilis* SAG 2058 and the variety *D. multivariabilis* var. *turskensis*, as well as more than ten unidentified *Desmodesmus* sp. isolates (Fig. 2). The Bayesian support of the node (posterior probability, PP) was 1.00, and the bootstrap support (BS) was 94%, indicating high reliability of this cluster. The closest phylogenetic neighbours of the Crimean strains are the unidentified isolates *Desmodesmus* Jo.4 and *Desmodesmus* sp. Agraba 17. The genetic distances to these isolates, calculated using the Kimura twoparameter (K2P) model, amount to 1.0% and 1.2%, respectively. For the nearest sister lineage, characterized by high statistical support and comprising six *Desmodesmus* sequences, including the identified *D. subspicatus* GB6 strain, the genetic distance values range between 2.2% and 4.5%.

Based on their position in the phylogenetic tree and the estimated genetic distances, the novel strains IBSS-171 and IBSS-167 were assigned to the *D. multivariabilis* lineage and deposited in NCBI under accession numbers PX606285 and PX606286, respectively. Nonetheless, further investigation of this lineage is needed, ideally employing a more extensive set of genetic markers.

Strain IBSS-164 belongs to a clade comprising over 20 strains, predominantly identified as *Tetradismus obliquus* (including synonyms *Acutodesmus*/*Scenedesmus*), which also includes the sequence of the authentic strain *T. obliquus* SAG 2761. The cluster is strongly supported by high posterior probability (PP = 0.99) and bootstrap (BS = 99%) values. Evolutionary distances within this lineage range from 0 to

1.4%. The distance between strain IBSS-164 and its closest neighbours is approximately 0.5%, which corresponds to the average value for the *T. obliquus* clade. Evolutionary distances to the nearest lineages of other species within the genus (*T. arenicola* and *T. bajacalifornicus*), represented on the phylogenetic tree and characterised by high node support, range from 2.6 to 4.2%. Based on these data, the sequence of strain IBSS-164 was assigned to the *Tetradismus obliquus* lineage and deposited in the NCBI database under accession number PX606287.

The sequence of strain IBSS-98 (the third of the isolated representatives of the family Scenedesmaceae) belongs to a clade of *Coelastrella thermophila* strains that shows maximum statistical support: PP = 1.00 and BS = 100% (Fig. 2). Genetic distances to the closest neighbours, including the sequence of the authentic *C. thermophila* strain FACHB-2300, do not exceed 0.3%. Evolutionary distances within the entire *C. thermophila* clade, including distinct variants, range from 0.6 to 1.3%. At the same time, genetic distances to the sequences of the so-called “core” group of *Coelastrella* species (in particular, *C. rubescens*, *C. yingshanensis*, *C. saipanensis*, and *C. aeroterrestrica*) range from 3 to 9%. Thus, the available data allow for the reliable differentiation of distinct *Coelastrella* species based on the analysis of the examined ribosomal gene cluster region. The *C. thermophila* IBSS-98 sequence has been deposited in NCBI under accession number PX606288.

The sequence of strain IBSS-163 is completely identical to the corresponding genomic region of the authentic strain *Dictyosphaerium ehrenbergianum* CCAP 222/14. In the phylogenetic tree (Fig. 3), these sequences, together with the type strain of *D. ehrenbergianum* CCAP 222/45, form a sister lineage to the clade comprising two strains of *D. libertatis*. This

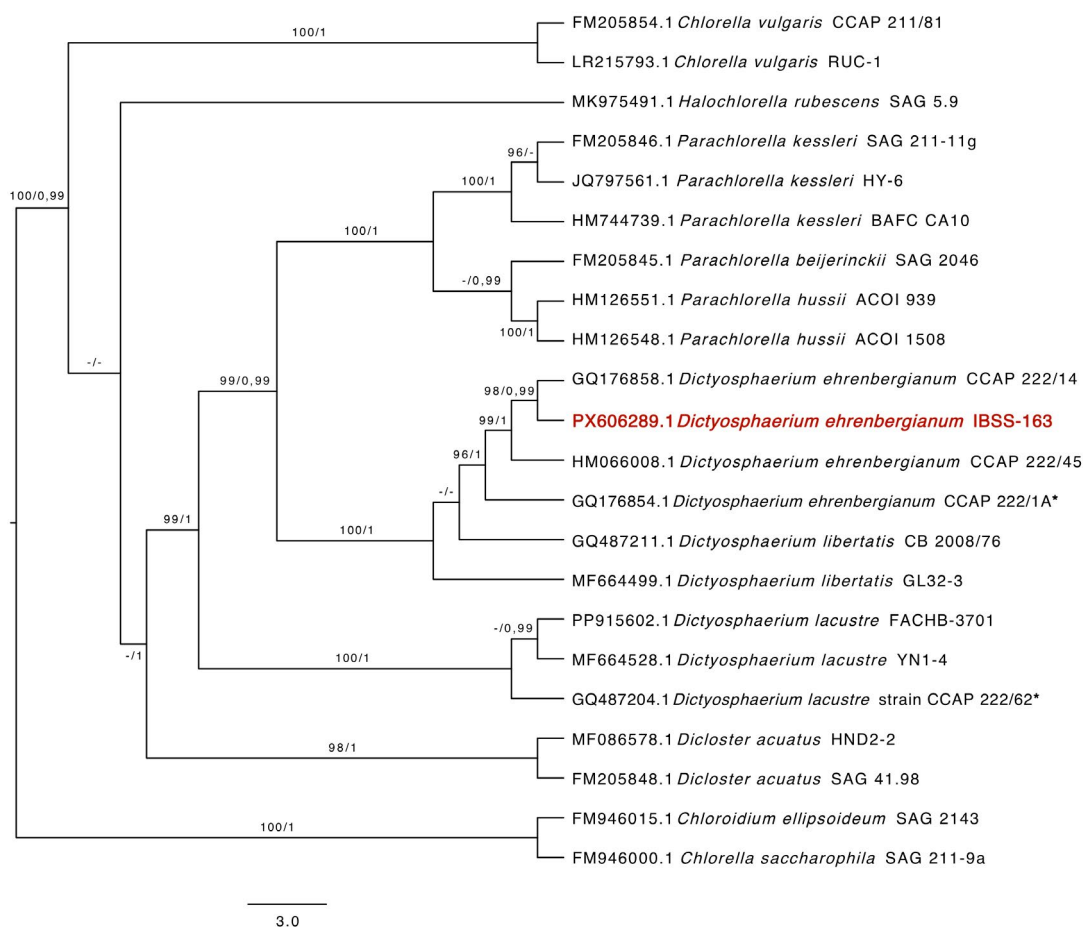


Fig.3. Position of the new strain IBSS-163 on the phylogenetic tree of representatives of the Chlorellaceae family, reconstructed from the ITS rDNA sequence using the maximum likelihood (ML) method. Support values are indicated as BS/PP (Bootstrap percentage / Bayesian posterior probability); only nodes with BS $\geq$ 0.85 and PP $\geq$ 85 are displayed on the tree. Authentic strains are marked with an asterisk (*).

topology is strongly supported by $PP = 1.00$ and $BS \geq 96\%$. Evolutionary distances in the studied genomic region between the species *D. ehrenbergianum* and *D. libertatis* range from 3 to 4%, whereas intraspecific distances for *D. ehrenbergianum* are approximately an order of magnitude lower (around 0.3%). Based on the presented phylogenetic analysis results, strain IBSS-163 has been assigned to the *Dictyosphaerium ehrenbergianum* lineage and deposited in NCBI under accession number PX606289.

3.2. Strain identification using an integrative approach

The morphological characterization of the new strains was carried out using LM, based on diagnostically significant morphometric and biological features observed at different stages of the microalgae life cycle. Scanning electron microscopy (SEM) revealed fine cell wall structures that were not visible under LM in some algal species. Together, these methods provided a more comprehensive morphological description of the studied strains. In addition, the type, shape, and color of colonies formed on solid agar medium were taken into account; colonies typically appeared approximately two weeks after inoculation.

Based on a combination of diagnostic features, including morphotype, cell shape and size, intracellular contents, and life cycle characteristics, the isolates were assigned to two classes of the algal lineage Chlorophyta: Chlorophyceae (4 strains) and Trebouxiophyceae (1 strain).

Coelastrella thermophila strain IBSS-98 Qinghua Wang, Huiyin Song, Xudong Liu, Guoxiang Liu & Zhengyu Hu 2019 (Chlorophyceae, Sphaeropleales, Scenedesmaceae).

Habitat

The strain was isolated from red biofilm on an open plastic container with fresh water that had been exposed to air for a long time (Point 3, Table 1). The isolate was identified as an aerophyte.

Morphology and Biology

On agar nutrient medium, the colonies of the isolated strain are solitary and dark green, turning bright orange as they aged. The cells in liquid culture are spindle-shaped, ovoid, or ellipsoid, with a parietal cup-shaped chloroplast clearly marked by a single pyrenoid (Fig. 4 A, B).

Cell sizes range from 6.5 to 12.5 μm in length and from 2.8 to 9.7 μm in width. The morphological features of the strain correspond to those typical of the genus *Coelastrella* Chodat 1922. A characteristic feature of this species, according to Wang et al. (2019), is the presence of asymmetrically elongated, ellipsoidal young cells, sometimes pointed at only one end.

Asexual reproduction occurs through the formation of autospores (2–4). Before division, the cells acquire a rounded shape. Sexual reproduction was not observed. SEM images reveal a characteristic cell wall sculpture in the form of meridional ribs (mostly 10–14) converging toward the cell poles (Fig. 4 C, D).

Based on an integrative analysis of morphological and molecular genetic characteristics, the new strain IBSS-98 has been identified as *Coelastrella thermophila*.

Strain IBSS-164 *Tetradismus obliquus* (Turpin) M.J.Wynne 2016 (Chlorophyceae, Sphaeropleales, Scenedesmaceae)

Habitat

The strain was isolated from the eutrophic brackish waters of Lake Kyzyl-Yar, located in the steppe zone near Crimea's western coast. The sample was collected in August from the part of the lake furthest from the sea (Point 2, Table 1).

Morphology and Biology

On agar nutrient medium, colonies of the isolated strain are small, dark green, and acquire a yellow-green tint upon long-term storage (over two months). In liquid culture, the cells are solitary, oval or spindle-shaped, and form coenobium-like clusters of four cells without a mucous wrapper, arranged in a single plane (Fig. 5 A, B). The chloroplast is parietal, filling the interior of the cell, and one pyrenoid is located near the cell center.

Cell dimensions vary between 3.5–6.5 μm in length and between 1.7–4.7 μm in width. As the culture ages, the cells primarily occur as coenobium-like clusters. In the SEM image, the cell wall surface is smooth with polar thickenings and sparse meridional ribs (Fig. 5 C, D).

Reproduction is asexual, with autospores in groups of 2–4, without zoospore formation. Sexual reproduction was not observed.

Based on a combination of morphological characteristics, in particular, cell size and shape, as well as the pattern of their organization into a coenobium (Cho and Lee, 2024), strain IBSS-164 fully corresponds to the description

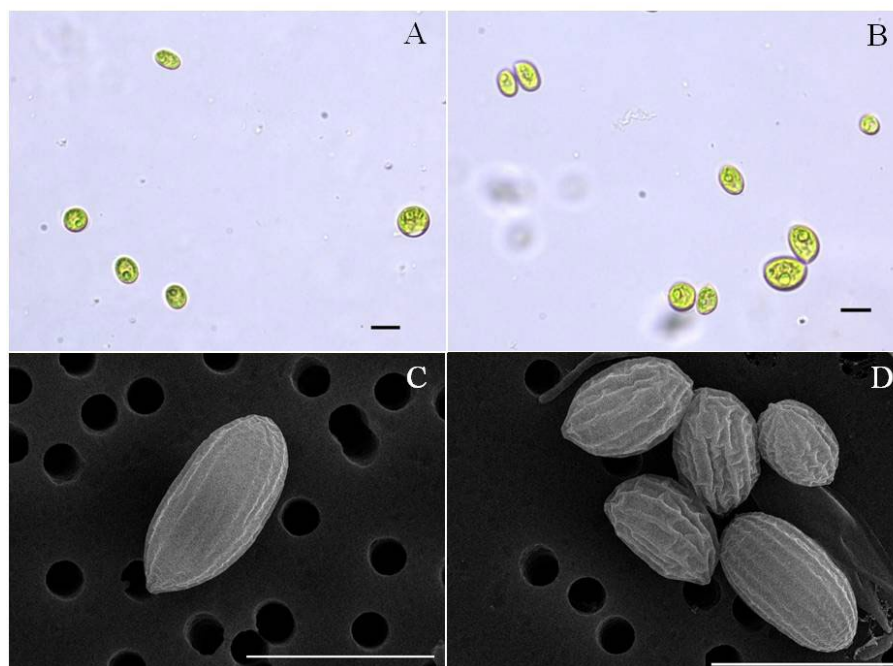


Fig.4. Images of young vegetative cells of the IBSS-98 *Coelastrella thermophila* strain: A, B – LM; C, D – SEM, scale bar 10 μm .

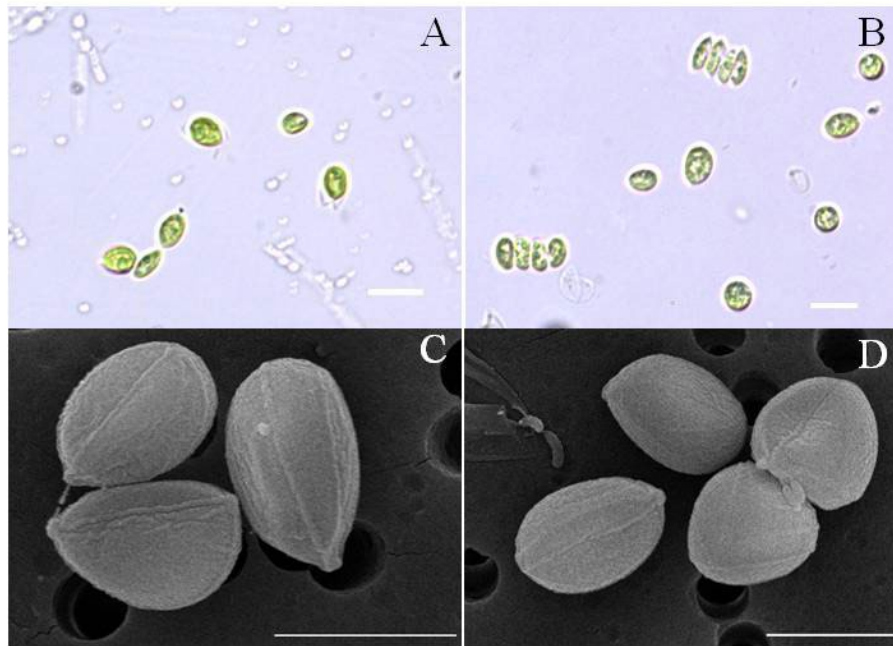


Fig.5. Images of young cells of the *Tetrademus obliquus* strain IBSS-164: A, B – LM, scale bar 10 μm ; C, D – SEM, scale bar 5 μm .

of *Tetrademus obliquus* (Oliveira et al., 2021; Cho and Lee, 2024). This morphological assignment is supported by molecular genetic data.

Strains IBSS-167, IBSS-171 *Desmodesmus multivariabilis* E. Hegewald, Antal Schmidt, A. Braband & P. M. Tsarenko 2005 (Chlorophyceae, Sphaeropleales, Scenedesmaceae).

Habitat

Two strains of the same species were isolated from stagnant waters of a cascade system of rock baths on the slope of Mount Legener in the Karadag massif (Point 4, Table 1), collected in August. The samples were independent due to the lack of hydrological connection between the collection sites at the time of sampling.

Morphology and Biology

On agar nutrient medium, colonies of both strains are bulky and dark green. In liquid culture, single oval cells are found as well as 2–4-celled coenobiums arranged in a plane, suggesting that the algae exhibit pleomorphism at various stages of growth and development (Fig. 6).

The cells are nonmotile, and epistuctures such as lateral “spines” and “horns” are not visible under a light micro-

scope. Cell dimensions vary between 3–8 μm in length and 2–7 μm in width. The chloroplast occupies most of the cell's volume, with a single distinct round pyrenoid. SEM images clearly show small warts and a few horn-like structures of equal length, located perpendicular to the cell wall (Fig. 6). Along the cell are uneven and knobbly meridional ribs, which may be entire or partially reduced.

Reproduction is asexual, with the formation of autospores; sexual reproduction has not been observed.

Both strains match the description provided in the literature (Gorelova et al., 2015; Demura et al., 2021; Xu et al., 2024). Based on morphological characteristics and phylogenetic analysis, strains IBSS-167 and IBSS-171 were identified as *Desmodesmus multivariabilis*.

Strain IBSS-163 *Dictyosphaerium ehrenbergianum* Nägeli 1849 (Trebouxiphyceae, Chlorellales, Chlorellaceae).

Habitat

The strain was isolated from brackish waters (2‰) at the upper part of Lake Donuzlav with depths of 3–4 m, separated from the main water area (Point 1, Table 1).

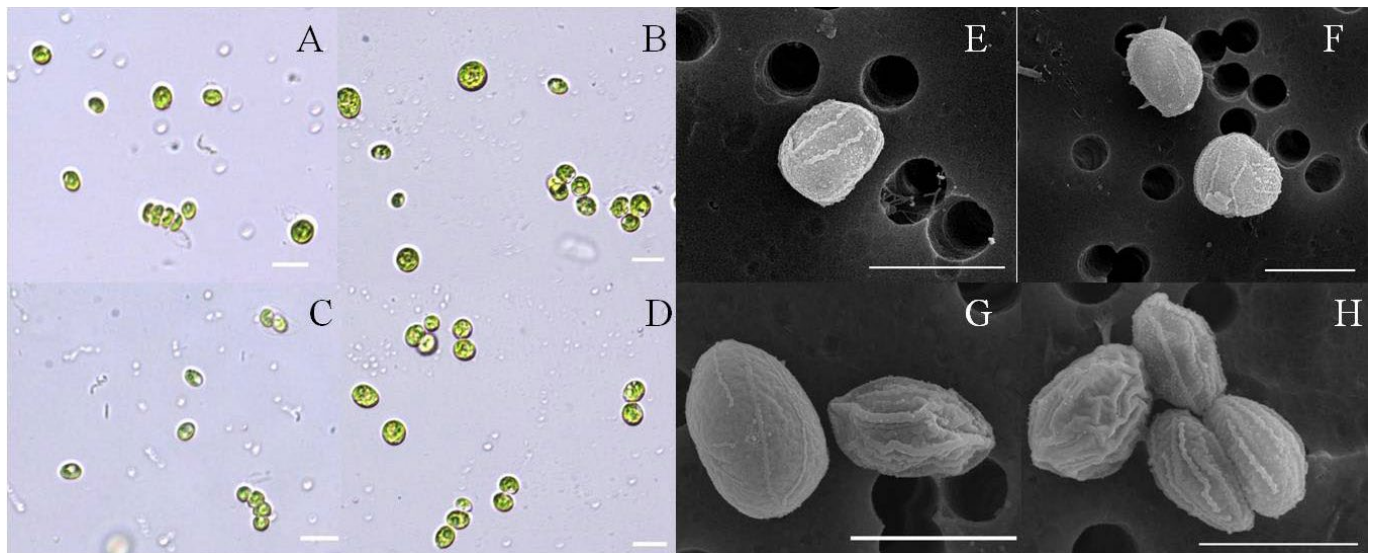


Fig.6. Images of *Desmodesmus multivariabilis* cells: A, B – LM of strain IBSS-167, C, D – LM of strain IBSS-171, scale bar = 10 μm ; E, F – SEM of strain IBSS-167, G, H – SEM of strain IBSS-171, scale bar = 5 μm .

Morphology and Biology

On agar nutrient medium, the isolated colonies are solitary and bright green. In liquid culture, the cells form free-floating colonies consisting of four or more oval (ovoid) cells arranged in a cross-shaped pattern, laterally attached to gelatinous mucus cords in the transverse position. (Fig. 7 A, B). The cords extend radially from the colony center and divide dichotomously or tetratomously. Young cells range in size from 4.5 to 6.5 μm in length and from 2.5 to 5 μm in width. Older colonies consist of 8–16 rounded cells at the ends of mucus cords, forming “inflorescences,” and may sometimes be surrounded by mucous membranes.

Reproduction occurs through colony fragmentation into segments of four cells arranged in a cross-like pattern on mucous cords (Fig. 7 B). The chloroplast is parietal with a single pyrenoid. In the SEM images, the cell walls and mucous cords are covered with warts (Fig. 7 D, E). As the culture aged, cells gradually increased in size, ranging from 4.5 to 7.5 μm in length and from 3.5 to 5 μm in width. Over time, the colonies compacted, obscuring the visibility of the mucilaginous strands (Fig. 7 C). Mature colonies disintegrated into individual cells due to the degradation of the mucilaginous connections (Fig. 7 F).

Based on morphological characteristics (Bock, 2010) and molecular genetic analysis (Fig. 3), the new strain IBSS-163 was identified as *Dictyosphaerium ehrenbergianum*.

4. Discussion

The role of national and regional microalgae culture collections in the development of biotechnologies and the conservation of biodiversity has been repeatedly emphasized in the literature (Kurpan et al., 2025; Lourenço, 2020). In this context, the expansion of the carotenogenic microalgae collection at the IBSS is of particular importance: since 2021, the number of maintained strains has increased from 44 to 131, while the proportion of local isolates (from Crimea and the Black Sea coastal regions of the Caucasus) has risen from 25% to 40%. Targeted screening of the Crimean algal flora has enabled the isolation of approximately 40 new strains in pure culture, which require detailed taxonomic and biotechnological characterization.

Taxonomic identification of five isolates was performed using an integrative approach that combined molecular genetic methods with morphological data (light and scanning

electron microscopy). The species assignment of the isolates is supported by molecular phylogenetic analyses and is consistent with the morphological, ecological, and ontogenetic characteristics of the respective taxa described in the literature (Komárek and Fott, 1983; Tsarenko, 1990; Andreeva, 1998).

Selecting appropriate molecular markers for species differentiation in green algae remains a methodological challenge, largely due to the inherent limitations of morphological identification, specifically, high intraspecific variability and the similarity of closely related taxa (Krivina et al., 2025). In the present study, molecular identification of the new strains was based on phylogenetic analysis of the ITS region – a marker widely used to address taxonomic issues in green microalgae, alongside traditional DNA barcodes (SSU, rbsL, tufA) (Hoshina, 2014; Proeschold and Darienko, 2020; Krivina et al., 2024; Temraleeva and Bukin, 2022).

The resulting phylogenetic reconstructions show unambiguous placement of all new strains within four distinct clades characterized by high node support; these clades correspond to the species *Desmodesmus multivariabilis*, *Tetradasmus obliquus*, and *Coelastrella thermophila* (Chlorophyceae) and *Dictyosphaerium ehrenbergianum* (Trebouxiophyceae). Genetic distances calculated using the K2P model for the ITS region effectively differentiate intra and interspecific variability levels: intraspecific values typically remain below 2.2%, while distances between closely related species range from 3–4% and may reach 8–9% for more distantly related species. The observed genetic distance values are consistent with the data obtained for the ITS2 region (Hoshina, 2014). Thus, analysis of the ITS region allows reliable differentiation of species within the studied monophyletic lineages of Chlorophyceae and Trebouxiophyceae. At the same time, resolving the intra-specific structure and identifying potentially new species require the use of additional markers. According to current recommendations, this can be achieved through detailed analysis of the ITS2 region structure, as well as multigene reconstructions based on concatenated sequences of ribosomal and plastid genes or on the complete plastid genome (Krivina et al., 2025; Cho and Lee, 2024).

All identified strains are new to the FRC IBSS collection and have been isolated in pure culture from the Crimean algal flora for the first time. Considering the published data on the capacity of representatives of these taxa to accumulate valuable bioactive compounds, they represent promising candidates as biotechnological producer strains (see Table 2).

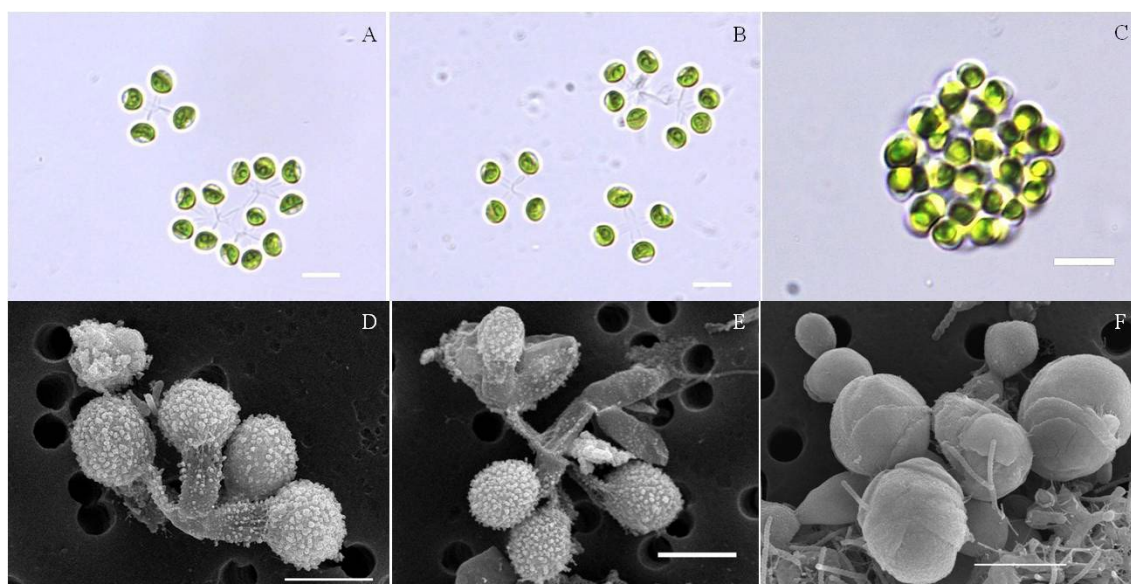


Fig.7. Images of *Dictyosphaerium ehrenbergianum* IBSS-163 cells: A, B – LM, young colonies; C – LM, mature colony (3-week culture), scale bar = 10 μm ; D, E – SEM, young colonies; F – SEM, mature cells without the cell wall, scale bar = 5 μm .

Table 2. Systematization of literature data on microalgae species new to the IBSS collection: biotopes, biologically active substances, application areas, and representation in collections.

Microalgae	Biotope	Bioactive compounds	Application	Collections featuring the species
<i>Coelastrella thermophila</i>	Aquatic, soil, moist surfaces, extreme ^{6,5,2}	Carotenoids, Lipids, PUFAs ⁶ MUFAs, SFAs ⁵	Bioenergetics, Cosmeceuticals and Pharmaceuticals ^{6,5}	SyKoA, FACHB, CCCryo, SAG
<i>Tetradesmus obliquus</i>	Aquatic (including rocky pools) ^{9,13}	Carotenoids, lutein ¹³ Lipids, MUFAs, SFAs ⁹	Bioenergetics, Pharmaceuticals and Nutraceuticals ^{9,12,8}	UTEX, SAG, CCAP, VKM
<i>Desmodesmus multivariabilis</i>	Aquatic (freshwater, brackish); soil; symbiont of benthic invertebrates ⁷	PUFAs ¹	Pharmaceuticals and Nutraceuticals ¹ Bioremediation ¹¹	BCAC, CCAP, SAG, UTEX, VCA, TAU-MAC, FBCC
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	Aquatic (freshwater, brackish) ^{3,4}	Lipids, MUFAs, SFAs ^{10,4}	Bioenergetics ^{10,4}	CALU, CCAP, UTEX, FACHB

Note: PUFAs (polyunsaturated fatty acids); MUFAs (monounsaturated fatty acids); SFAs (saturated fatty acids).

¹Akgül and Kösel, 2023; ²Baldanta et al., 2025; ³Bock, 2010; ⁴Borah et al., 2018; ⁵Boutarfa et al., 2022; ⁶Goecke et al., 2020; ⁷Gorelova et al., 2015; ⁸Huang, 2025; ⁹Ismagulova et al., 2018; ¹⁰Jiang et al., 2018; ¹¹Onyancha et al., 2022; ¹²Scoculi de Lira et al., 2025; ¹³Ünür and Ünlü, 2022.

SYKOA Strain collection of microalgae and cyanobacteria from northern and arctic regions in the Institute of Biology of Komi Scientific Centre (<http://ib.komisc.ru:8008/sykoa/collection/>)

VKM All-russian collection of microorganisms (<http://www.vkm.ru/rus/Catalogue.htm>)

FACHB Freshwater Algae Culture Collection Chinese Academy of Sciences (http://english.ihb.cas.cn/research/platforms/nmpmp/202012/t20201202_255451.html)

CCCryo -Culture Collection of Cryophilic Algae (<https://www.izi-bb.fraun>)

SAG Sammlung von Algenkulturen at University of Göttingen (<https://www.unigoettingen.de/de/184982.html>)

UTEX Culture Collection of Algae (<https://utex.org/>)

CCAP Culture Collection of Algae and Protozoa (<https://www.ccap.ac.uk/>)

BCAC Bashkortostan collection of algae and cyanobacteria

CALU Collection of cyanobacteria, algae, and algal parasites (Collection of Algae of Leningrad University)

VCA Collection of Cyanobacteria and Algae of the Laboratory of Botany of the Federal Research Center for Biodiversity FEB

RAS

TAU-MAC MicroAlgae and Cyanobacteria culture collection (<http://cyanobacteria.myspecies.info>)

FBCC Bioresources Culture Collection (<https://fbp.nnibr.re.kr/fbcc/?lang=en>).

The isolated species are all cosmopolitan and demonstrate high ecological plasticity, allowing them to thrive in a wide range of habitats (Table 2). Most species within the genera *Coelastrella*, *Tetradesmus*, and *Desmodesmus* are aerophytes that inhabit soil, rock and concrete surfaces, brick walls and tree bark (Table 2). In contrast, species of the *Dictyosphaerium* genus are common freshwater inhabitants and can dominate the phytoplankton community, forming blooms (Bock, 2010; Scoculi de Lira et al., 2025). Our sampling sites align well with the known natural biotopes of the identified microalgal strains.

In response to deteriorating external conditions (dehydration, salt stress, and exposure to high solar radiation), the aforementioned microalgae genera accumulate secondary metabolites, particularly fatty acids (FAs) (Ancona-Canché et al., 2017; Zhu et al., 2020). Microalgal lipids and triacylglycerols (TAGs) represent promising feedstocks for third-generation biofuel production (Jaremkov et al., 2023). Species of the genus *Tetradesmus* efficiently produce lipids that can be used for biodiesel synthesis (Ismagulova et al., 2018; do Carmo Cesário et al., 2022). Notably, the total lipid content of their biomass varies considerably, ranging from 10% to 56% (Oliveira et al., 2021). For the IPPAS S-2023 strain, Ismagulova et al. (2018) determined the potential lipid content to be 20–40% of the total FAs under nitrogen-starvation conditions. Microalgae of the genus *Coelastrella* are also a promising source of renewable energy, since their biomass contains 18% lipids, which are suitable in quality for biodiesel production (Nayana et al., 2025). The fatty acid composition of lipids isolated from *Coelastrella* sp. KKU-P1 biomass is mainly represented by monounsaturated (MUFA) and unsaturated (USFA) fatty acids, which account for 49.7% and

43.7% of the lipid fraction, respectively (Thepsuthammarat et al., 2023). Mixotrophic cultivation of *Coelastrella* spp. yielded biomass with mainly MUFAs and SFAs (67.8–91.2%) (Boutarfa et al., 2022). Representatives of the genus *Desmodesmus* showed significant lipid accumulation under nitrogen starvation – from 36% to 58% of the dry biomass, while the percentage of TAGs in the total lipid pool reached 64–78% (Pan et al., 2011). *Dictyosphaerium ehrenbergianum* strain IL2 is characterized by high levels of saturated fatty acids (SFAs) (approximately 40%) and MUFAs (42% to 60%), primarily C16 and C18 fractions (Jiang et al., 2018). Research by Borah (2018) confirms the potential for using *D. ehrenbergianum* lipids as an alternative feedstock for biodiesel.

Microalgae are also a source of valuable bioactive compounds with a wide range of applications in the pharmaceutical, cosmetic, and nutraceutical industries and as feed additives in mariculture and livestock farming (Oliveira et al., 2022). Their metabolites exhibit antitumor, antidiabetic, anti-inflammatory, and antioxidant activities, which opens up opportunities for the development of functional foods with increased biological value (Oliveira et al., 2022). Members of the *Desmodesmus* genus can be used in the food industry as nutraceuticals and pharmaceuticals due to their diverse biochemical composition (Akgül and Kösel, 2023). The *Desmodesmus multivariabilis* strain has an exceptionally high PUFA content – 72% of the total lipids (Akgül and Kösel, 2023). The *Desmodesmus* sp. KNUA231 showed record activity in omega-3 fatty acid synthesis up to 54% (Shin et al., 2025). In *T. obliquus*, under nitrogen deficiency, C18:1 accounted for 50.6% and 53.4% of total FAs in heterotrophic and mixotrophic cultures, respectively (Oliveira et al., 2021). *Coelastrella* sp. FGS-001 also demonstrated a strong ability to

produce PUFAs with their proportion of total FAs reaching about 44–45%, especially linolenic acid (C18:3n3) – 30–34% (Goecke et al., 2020). A high PUFA content (45.6–65.2%) was observed during photoautotrophic cultivation of *Coelastrella* spp. (Minyuk et al., 2017). In contrast, *Coelastrella thermophila* var. *globulina* was dominated by MUFAs, accounting for 51% of the total FAs (Boutarfa et al., 2022), with a significant proportion of PUFAs (22%) and SFAs (27%). The FA composition of *C. multistriata* MZ-Ch23 was dominated by α -linolenic acid (29.4–38.1% of the total FA), and this strain is considered a potential producer of omega-3 fatty acids (Maltsev et al., 2021).

T. obliquus has a strong antioxidant potential due to its rich content of phenolic compounds, flavonoids, and pigments, in particular, carotenoids. It is used in the aquaculture, food, and pharmaceutical industries (do Carmo Cesário et al., 2022). Microalgae of the genus *Coelastrella* exhibit a pronounced ability to accumulate secondary carotenoids of the astaxanthin group – highly valuable pigments, widely demanded in aquaculture and pharmacology as antioxidants and immunomodulators with cardio- and neuroprotective properties (Maltsev et al., 2021; Minyuk et al., 2017; Ismagulova et al., 2018; Chekanov, 2023). The ability to secondary carotenogenesis has been revealed in a number of strains of *Coelastrella terrestris*, *Coelastrella aeroterrestrica*, and *C. thermophila* var. *globulina* (Chekanov, 2023; Goecke et al., 2020). Under two-stage cultivation, *Coelastrella rubescens* produces biotechnologically significant amounts of astaxanthin (Chubchikova et al., 2010).

In addition to their biotechnological value, microalgae from these four genera are promising for use in bioremediation. Their effective biosorption and detoxification mechanisms enable them to accumulate substantial amounts of heavy metals, pesticides, and pharmaceutical residues, making them suitable both for the remediation and for the monitoring of polluted ecosystems (Luo et al., 2016; Alwaleed et al., 2025; Onyancha et al., 2022). The effectiveness of this approach has been demonstrated in the phytoremediation of wastewater, including agricultural and industrial effluents (Baldanta et al., 2025; Ogbonna et al., 2021).

5. Conclusion

As part of a project to establish a bioresource collection of carotenogenic microalgae from the Crimean region, five new strains of green microalgae were isolated from diverse extreme biotopes in the western and southeastern parts of Crimea. Their species affiliation was determined using an integrative taxonomic approach. These strains are new to the IBSS collection and represent the first records from the Crimean algal flora. They belong to the genera *Coelastrella*, *Tetrademus*, *Desmodesmus*, and *Dictyosphaerium*, constituting a valuable biological resource. A comprehensive assessment of their biotechnological potential will require a series of studies, including elucidation of the evolutionary relationships among the strains and physiological investigations into the mechanisms regulating intracellular metabolism under environmental stress. An important aspect is the development of cost-effective cultivation methods, including specialized protocols for the targeted accumulation of biomass and specific metabolites. The emerging living culture collection serves as both an experimental platform for comprehensive research and a tool for preserving species diversity. It lays the foundation for a new economic sector in Crimea – the industrial cultivation of carotenogenic microalgae. This sector holds significant potential for the production of bioactive feed supplements, food additives, cosmetics, and lipids for industrial applications, offering broad prospects for the practical implementation of research findings.

Acknowledgements

The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation, Grant No. 24-26-20121 “Creation of a Bioresource Collection of Carotenogenic Algae of the Crimean Region” (State Registration No. 124102900026-9) and as part of the State assignment “Comprehensive Study of the Mechanisms of Operation of Marine Biotechnological Complexes for the Purpose of Obtaining Biologically Active Substances from Aquatic Organisms” (No. 124022400152-1).

The authors express their sincere gratitude to the staff of the Karadag Scientific Station for organizing the expedition, and to V. V. Gubanov (Researcher, Department of Ichthyology, Federal Research Centre “A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS”) for determining water salinity.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Akgül F., Kösel S. 2023. Phenotypic plasticity, growth, biochemical composition, total phenolic content, and antioxidant activity of microalga *Desmodesmus multivariabilis* under different nitrogen and phosphorus concentrations. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly 37(4): 273–288. DOI: [10.15255/CABEQ.2023.2199](https://doi.org/10.15255/CABEQ.2023.2199)
- Alwaleed E.A., Galal H.R.M., Aboueldahab M. et al. 2025. Maximizing lipid accumulation in *Tetrademus obliquus* under heavy metal stress for sustainable biodiesel innovation. BMC biotechnology 25(1): 20. DOI: [10.1186/s12896-025-00951-z](https://doi.org/10.1186/s12896-025-00951-z)
- Ancona-Canché K., López-Adrián S., Espinosa-Aguilar M. et al. 2017. Molecular phylogeny and morphologic data of strains of the genus *Coelastrella*. Botanical Sciences 95: 527–537. DOI: [10.17129/BOTSCI.1201](https://doi.org/10.17129/BOTSCI.1201)
- Andreeva V.M. 1998. Terrestrial and aerophilic green algae (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). Sankt-Peterburg: Nauka. (in Russian)
- Baldanta S., Ferreira A., Marco Vinuesa A.V. et al. 2025. A solar panel-origin microalga, *Coelastrella thermophila* D14, with high potential for wastewater biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology 109: 246. DOI: [10.1007/s00253-025-13618-8](https://doi.org/10.1007/s00253-025-13618-8)
- Bischoff H.W., Bold H.C. 1963. Some soil algae from enchanted rock and related algal species. In: Phycological Studies IV. 6318: 1–95. USA: University of Texas.
- Bock C. 2010. Genetic diversity and polyphyletic origin of the *Dictyosphaerium morphotype*. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.), Institut für Biologie/Zoologie der Freien Universität, Berlin. DOI: [10.17169/refubium-15273](https://doi.org/10.17169/refubium-15273)
- Borah N., Venkatesh H.N., Sudharshana T.N. et al. 2018. Isolation and utilization of *Dictyosphaerium ehrenbergianum* Nageli for biodiesel production: lipid extraction and biodiesel property analysis. Biofuels 11(8): 885–892. DOI: [10.1080/17597269.2018.1432270](https://doi.org/10.1080/17597269.2018.1432270)
- Boutarfa S., Senoussi M.M., Gonzalez-Silvera D. et al. 2022. The Green Microalga *Coelastrella thermophila* var. *globulina* (Scenedesmaceae, Chlorophyta) isolated from an Algerian hot spring as a potential source of fatty acids. Life 12(4): 560. DOI: [10.3390/life12040560](https://doi.org/10.3390/life12040560)
- 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)
- Cho H.S., Lee J.M. 2024. Taxonomic reinvestigation of the genus *Tetrademus* (Scenedesmaceae; Sphaeropleales) based on morphological characteristics and chloroplast

genomes. *Frontiers in Plant Science* 15: 1303175. DOI: [10.3389/fpls.2024.1303175](https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1303175)

Chubchikova I.N., Drobetskaya I.V., Dantsyuk N.V. et al. 2022. Optimization of the method of fixation of freshwater microalgae (Scenedesmaceae, Chlorophyta) for primary identification using scanning electron microscopy. *Voprosy sovremennoi al'gologii* [Questions 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)

Chubchikova I.N., Minyuk G.S., Drobetskaya I.V. 2010. Secondary carotenogenesis in green microalgae *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. under natural insolation and temperature. *Ekologiya Morya* 81: 77–81.

Dantsyuk N.V., Chelebieva E.S., Minyuk G.S. 2021. Working collection of living cultures of carotenogenic microalgae of the A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the South Seas. *Marine Biological Journal* 6(4): 3–18. DOI: [10.21072/mbj.2021.06.4.01](https://doi.org/10.21072/mbj.2021.06.4.01) (in Russian)

Debnath T., Bandyopadhyay T.K., Vanitha K. et al. 2024. Astaxanthin from microalgae: A review on structure, biosynthesis, production strategies and application. *Food Research International* 176: 113841. DOI: [10.1016/j.foodres.2023.113841](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113841)

Demura M., Noma S., Hayashi N. 2021. Species and fatty acid diversity of *Desmodesmus* (Chlorophyta) in a local Japanese area and identification of new docosahexaenoic acid-producing species. *Biomass* 1: 105–118. DOI: [10.3390/biomass1020008](https://doi.org/10.3390/biomass1020008)

do Carmo Cesário C., Soares J., Cossolin J.F.S. et al. 2022. Biochemical and morphological characterization of freshwater microalga *Tetrademus obliquus* (Chlorophyta: Chlorophyceae). *Protoplasma* 259(4): 937–948. DOI: [10.1007/s00709-021-01712-3](https://doi.org/10.1007/s00709-021-01712-3)

Dvoretzky D.S., Temnov M.S., Markin I.V. et al. 2022. Issues of developing effective biotechnology for the synthesis of valuable components from microalgae biomass. *Teoreticheskie osnovy khimicheskoi tekhnologii* [Theoretical foundations of chemical technology] 56(4): 418–433. DOI: [10.31857/S0040357122040029](https://doi.org/10.31857/S0040357122040029) (in Russian)

Elsayed M., Eraky M., Faisal S. et al. 2024. Phycochemicals. In: Abomohra A., Ende S. (eds.), *Value-added products from algae*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG Springer, pp. 71–95. DOI: [10.1007/978-3-031-42026-9_4](https://doi.org/10.1007/978-3-031-42026-9_4)

Ende S., Abomohra A. 2024. Opening the Algal Gateway. In: Abomohra A., Ende S. (eds.) *Value-added Products from Algae*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG Springer, pp. 1–9. DOI: [10.1007/978-3-031-42026-9_1](https://doi.org/10.1007/978-3-031-42026-9_1)

Glibert P.M. 2024. Endosymbiosis and Evolution. In: *Phytoplankton Whispering: An Introduction to the Physiology and Ecology of Microalgae*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG Springer, pp. 213–227. DOI: [10.1007/978-3-031-53897-1_10](https://doi.org/10.1007/978-3-031-53897-1_10)

Goecke F., Noda J., Paliocha M. et al. 2020. Revision of *Coelastrella* (Scenedesmaceae, Chlorophyta) and first register of this green coccoid microalga for continental Norway. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36(10): 149. DOI: [10.1007/s11274-020-02897-0](https://doi.org/10.1007/s11274-020-02897-0)

Gorelova O.A., Baulina O.I., Solovchenko A.E. et al. 2015. Similarity and diversity of the *Desmodesmus* spp. microalgae isolated from associations with White Sea invertebrates. *Protoplasma* 252: 489–503. DOI: [10.1007/s00709-014-0694-0](https://doi.org/10.1007/s00709-014-0694-0)

Guiry M.D., Guiry G.M. 2026. *AlgaeBase*. World-Wide Electronic Publication, University of Galway. URL: <https://www.algaebase.org/search/species/> (accessed: 02.02.2026).

Hildebrand M., Abbriano R.M., Polle J.E. et al. 2013. Metabolic and cellular organization in evolutionarily diverse microalgae as related to biofuels production. *Current opinion in chemical biology* 17(3): 506–514. DOI: [10.1016/j.cob](https://doi.org/10.1016/j.cob)

[cbpa.2013.02.027](https://doi.org/10.1016/j.cob)

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)

Huang D., Yu Q., Long J. et al. 2025. Nitrogen source determines the growth and morphology of *Tetrademus obliquus* by concentration-dependent pattern. *Journal of Applied Phycology* 37: 2259–2270. DOI: [10.1007/s10811-025-03533-w](https://doi.org/10.1007/s10811-025-03533-w)

Ismagulova T., Chekanov K., Gorelova O. et al. 2018. A new subarctic strain of *Tetrademus obliquus* – Part I: Identification and fatty acid profiling. *Journal of Applied Phycology* 30: 2737–2750. DOI: [10.1007/s10811-017-1313-1](https://doi.org/10.1007/s10811-017-1313-1)

Jaremko M., Tomar S., Agarwal S. et al. 2023. Microalgae: A promising source for biofuel production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 53: 102877. DOI: [10.1016/J.BCAB.2023.102877](https://doi.org/10.1016/j.BCAB.2023.102877)

Jiang Y., Pu X., Zheng D. et al. 2018. Cultivation of lipid-producing microalgae in struvite-precipitated liquid digestate for biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels* 11: 101. DOI: [10.1186/s13068-018-1102-3](https://doi.org/10.1186/s13068-018-1102-3)

Kan Y., Pan J. 2010. A one-shot solution to bacterial and fungal contamination in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* culture by using an antibiotic cocktail. *Journal of Phycology* 46(6): 1356–1358. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2010.00904.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00904.x)

Katoh K., Toh H. 2010. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics* 26(15): 1899–1900. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq224](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq224)

Kim G.M., Chang W.S., Kim Y.K. 2022. Biocomposites using whole or valuable component-extracted microalgae blended with polymers: A review. *Catalysts* 12(1): 25. DOI: [10.3390/catal12010025](https://doi.org/10.3390/catal12010025)

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16(2): 111–120.

Komárek J., Fott B. 1983. Chlorophyceae (Grünalgen) Ordnung: Chlorococcales. In: *Das Phytoplankton des Süßwassers (Band XVI, 6. Teil. Die Binnengewässer)*. (Huber-Pestalozzi, G. Eds). Stuttgart: E. Schweizerbart.

Krivina E., Sinetova M., Starikov A. et al. 2025. Testing the effectiveness of DNA barcoding markers and species delimitation methods within the genus *Coelastrella* (Sphaeropleales, Chlorophyta), with a description of *Coelastrella polaris* sp. nov. isolated from Arctic soils. *Curr Microbiol* 82: 311. DOI: [10.1007/s00284-025-04293-z](https://doi.org/10.1007/s00284-025-04293-z)

Krivina E., Sinetova M., Zadneprovskaya E. et al. 2024. The genus *Coelastrella* (Chlorophyceae, Chlorophyta): molecular species delimitation, biotechnological potential, and description of a new species *Coelastrella affinis* sp. nov., based on an integrative taxonomic approach. *Antonie van Leeuwenhoek* 117(1): 113. DOI: [10.1007/s10482-024-02008-1](https://doi.org/10.1007/s10482-024-02008-1)

Kurpan D., Cardeiras R., Bagnoud-Velásquez M. et al. 2025. Isolation, characterization, and maintenance of native Swiss microalgae for biotechnological prospection. *Scientific Reports* 15: 25573. DOI: [10.1038/s41598-025-10989-w](https://doi.org/10.1038/s41598-025-10989-w)

Lourenço S. 2020. Microalgae culture collections, strain maintenance, and propagation (Chapter 3). In: *Handbook of microalgae-based processes and products: Fundamentals and advances in energy, food, feed, fertilizer, and bioactive compounds*. Academic Press, pp. 49–84. DOI: [10.1016/B978-0-12-818536-0.00003-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818536-0.00003-8)

Luo L., He H., Yang C. et al. 2016. Nutrient removal and lipid production by *Coelastrella* sp. in anaerobically and aerobically treated swine wastewater. *Bioresource Technology* 216: 135–141. DOI: [10.1016/j.biortech.2016.05.059](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.059)

Maltsev Y., Krivova Z., Maltseva S. et al. 2021. Lipid accumulation by *Coelastrella multistriata* (Scenedesmaceae,

Sphaeropleales) during nitrogen and phosphorus starvation. Scientific Reports 11(1): 19818. DOI: [10.1038/s41598-021-99376-9](https://doi.org/10.1038/s41598-021-99376-9)

Minyuk G., Chelebieva E., Chubchikova I. et al. 2017. Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrella 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)

Mokrosnop V.M., Zolotareva E.K. 2012. The effect of fungicides on the growth of the microalgae *Euglena gracilis* Klebs (Euglenophyta). Al'gologiya [Algology] 22(4): 337–344. (in Russian)

Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y. et al. 2008. Database indexing for production MegaBLAST searches. Bioinformatics 24(16): 1757–1764. DOI: [10.1093/bioinformatics/btn322](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn322)

Nayana K., Sudhakar M.P., Arunkumar K. 2025. Biorefinery potential of *Coelastrella* biomass for fuel and bio-products – a review. Biomass Conversion and Biorefinery 15: 29613–29626. DOI: [10.1007/s13399-022-02519-9](https://doi.org/10.1007/s13399-022-02519-9)

Ogbonna I.O., Ikwebe J., Okpozu O.O. et al. 2021. Potential of *Dictyosphaerium* sp. LC172264: Concomitant remediation of cassava wastewater and accumulation of lipids for biodiesel production. Advances in Bioscience and Biotechnology 12(8): 257–274. DOI: [10.4236/abb.2021.128016](https://doi.org/10.4236/abb.2021.128016)

Oliveira C.Y.B., Jacob A., Nader C. et al. 2022. An overview on microalgae as renewable resources for meeting sustainable development goals. Journal of Environmental Management 320: 115897. DOI: [10.1016/j.jenvman.2022.115897](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115897)

Oliveira C.Y.B., Oliveira C.D.L., Prasad R. et al. 2021. A multidisciplinary review of *Tetrademus obliquus*: A microalga suitable for large-scale biomass production and emerging environmental applications. Reviews in Aquaculture 13: 1594–1618. DOI: [10.1111/raq.12536](https://doi.org/10.1111/raq.12536)

Onyancha F.M., Haneklaus N.H., Brink H.G. 2022. Cultivation of *Desmodesmus multivariabilis* for the treatment of cosmetic wastewater. Sustainability 14(23): 15665. DOI: [10.3390/su142315665](https://doi.org/10.3390/su142315665)

Pan Y.-Y., Wang S.-T., Chuang L.-T. et al. 2011. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. Bioresource Technology 102: 10510–10517. DOI: [10.1016/j.biortech.2011.08.091](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.091)

Proeschold T., Darienko T. 2020. The green puzzle *Stichococcus* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta): New generic and species concept among this widely distributed genus. Phytotaxa 441(2): 113–142. DOI: [10.11646/phytotaxa.441.2.2](https://doi.org/10.11646/phytotaxa.441.2.2)

Ryabushko V.I., Shchurov S.V., Kovrigina N.P. et al. 2021. Hydrological hydrochemical and hydrobiological studies of Lake Donuzlav (Western Crimea, Black Sea) based on the results of the 2018 expeditions. Ekologicheskaya bezopasnost' pribrezhnoi i shel'fovoi zon morya [Environmental safety of the coastal and offshore zones of the sea] 2: 80–93. DOI: [10.22449/2413-5577-2021-2-80-93](https://doi.org/10.22449/2413-5577-2021-2-80-93) (in Russian)

Rylkova O.A., Borovkov A.B., Khanaychenko A.N. et al. 2023. Features of sample preparation of samples of monadic microalgae forms for scanning electron microscopy. Bioraznoobrazie i ustoychivoe razvitiye [Biodiversity and sustainable development] 8(4): 62–74. DOI: [10.21072/eco.2023.28.05](https://doi.org/10.21072/eco.2023.28.05) (in Russian)

Santos B., Freitas F., Sobral A.J.F.N. et al. 2025. Microalgae and circular economy: Unlocking waste to resource pathways for sustainable development. International Journal of Sustainable Engineering 18(1): 2501488. DOI: [10.1080/19397038.2025.2501488](https://doi.org/10.1080/19397038.2025.2501488)

Scoculi de Lira G., Severo I.A., Ferraz F.A. et al. 2025. Multiparametric evaluation of *Tetrademus obliquus* biomass: An integrated approach including antioxidant, nutri-

tional, and energy properties. Microorganisms 13: 1583. DOI: [10.3390/microorganisms13071583](https://doi.org/10.3390/microorganisms13071583)

Shadrin N.V., Simonov V.G., Anufrieva E.V. et al. 2018. Anthropogenic transformation of Kyzyl-Yar Lake in Crimea: Multiyear research findings. Arid Ecosystems 8: 299–306. DOI: [10.1134/S2079096118040091](https://doi.org/10.1134/S2079096118040091)

Shin Y.-S., Do J.-M., Noh H.-S. et al. 2025. Exploring the potential of *Desmodesmus* sp. KNUA231 for bioenergy and biofertilizer applications and its adaptability to environmental stress. Applied Sciences 15: 5097. DOI: [10.3390/app15095097](https://doi.org/10.3390/app15095097)

Silva B.L., de Souza F.O., João J.J. et al. 2025. Algae-Filled Polypropylene: How Particle Size of *Nannochloropsis oculata* Biomass Affects Composite Properties. Polymer Engineering & Science 65(12): 6812–6822. DOI: [10.1002/pen.70166](https://doi.org/10.1002/pen.70166)

Solovchenko A., Minyuk G. 2021. The physiology of astaxanthin production by carotenogenic microalgae. In: Ravishankar G.A., Ranga Rao A. (eds.), Global perspectives on astaxanthin: From industrial production to food, health, and pharmaceutical applications (Chapter 2). Academic Press, pp. 19–35. DOI: [10.1016/B978-0-12-823304-7.00026-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823304-7.00026-X)

Suchard M.A., Lemey P., Baele G. et al. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. Virus Evolution 4(1): vey016. DOI: [10.1093/ve/vey016](https://doi.org/10.1093/ve/vey016)

Tamura K., Stecher G., Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. 2021. Molecular Biology and Evolution 38: 3022–3027. DOI: [10.1093/molbev/msab120](https://doi.org/10.1093/molbev/msab120)

Temraleeva A.D., Bukin Y.S. 2022. Morphology, molecular phylogeny, and species delimitation within microalgal genera *Eubrownia*, *Spongiococcum*, and *Chlorococcum* (Chlorophyceae, Chlorophyta). South African Journal of Botany 151: 396–409. DOI: [10.1016/j.sajb.2022.10.030](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.10.030)

Temraleeva A.D., Mincheva E.V., Bukin Yu.S. et al. 2014. Modern methods of isolation, cultivation and identification of green algae (Chlorophyta). Kostroma: Kostroma Printing House. (in Russian)

Temraleeva A.D., Sinetova M.A. 2023. Collections of microalgae and cyanobacteria in Russia: current state, problems and development prospects. Mikrobiologiya [Microbiology] 192(5): 429–440. DOI: [10.31857/S0026365623600232](https://doi.org/10.31857/S0026365623600232) (in Russian)

Thepsuthammarat K., Reungsang A., Plangklang P. 2023. *Coelastrella* sp. cultivation on unhydrolyzed molasses-based medium towards the optimization of conditions for growth and biomass production under mixotrophic cultivation. Molecules 28: 3603. DOI: [10.3390/molecules28083603](https://doi.org/10.3390/molecules28083603)

Trifinopoulos J., Nguyen L.-T., von Haeseler et al A.. 2016. W-IQ-TREE: A fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. Nucleic Acids Research 44(1): W232–W235. DOI: [10.1093/nar/gkw256](https://doi.org/10.1093/nar/gkw256)

Tsarenko P.M. 1990. A short determinant of chlorococcal algae of the Ukrainian SSR. Kiev: Naukova dumka. (in Russian)

Ünivar Ö.C., Ünlü E.S. 2022. De Novo Assembly and Annotation of Microalga *Tetrademus obliquus* Transcriptome. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 22(11): TRJFAS21341. DOI: [10.4194/TRJFAS21341](https://doi.org/10.4194/TRJFAS21341)

Wang Q., Song H., Liu X. et al. 2019. Morphology and molecular phylogeny of coccoid green algae *Coelastrella* sensu lato (Scenedesmaceae, Sphaeropleales), including the description of three new species and two new varieties. Journal of Phycology 55: 1290–1305.

White T.J., Bruns T., Lee S. et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T. White (Eds.), PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press Inc, pp. 315–322. DOI: [10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1)

Xu Y., Chen X., Melkonian M. et al. 2024. Comparative chloroplast genome analysis of two *Desmodesmus* species reveals genome diversity within Scenedesmaceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae) Protist: 175(6): 126073. DOI: [10.1016/j.protis.2024.126073](https://doi.org/10.1016/j.protis.2024.126073)

Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. et al. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology 7(1–2): 203–214. DOI: [10.1089/10665270050081478](https://doi.org/10.1089/10665270050081478)

Zhu X., Wang Z., Sun Y. et al. 2020. Surfactants at environmentally relevant concentrations interfere the inducible defense of *Scenedesmus obliquus* and the implications for ecological risk assessment. Environmental pollution (Barking, Essex: 1987) 261: 114131. DOI: [10.1016/j.envpol.2020.114131](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114131)

Новые штаммы зеленых микроводорослей из экстремальных биотопов Крыма: таксономическая идентификация с использованием интегративного подхода

Оригинальная статья

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

Данцюк Н.В.^{1*}, Мансурова И.М.¹, Дегтяр И.В.², Кулешова О.Н.¹,
Дробецкая И.В.¹, Бочарова Е.А.¹, Лишаев В.Н.¹, Кирин М.П.¹, Кривенко О.В.¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН», проспект Нахимова 2, Севастополь, 299011, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Севастопольский государственный университет», улица Университетская 33, Севастополь, 299053, Россия

АННОТАЦИЯ. Исследование выполнено в рамках проекта по созданию биоресурсной коллекции каротиногенных микроводорослей Крымского региона с целью выявления перспективных штаммов, адаптированных к климатическим условиям юга России. В ходе массового сбора образцов из экстремальных биотопов западной и юго-восточной частей полуострова были выделены и охарактеризованы пять новых штаммов зелёных водорослей. Таксономическая идентификация проведена с применением интегративного подхода, который включал анализ особенностей жизненного цикла, морфологическое описание с использованием световой и сканирующей электронной микроскопии, а также филогенетический анализ участка ядерного генома (ITS1–5.8S–ITS2). В результате штаммы были отнесены четырём родам в составе классов Chlorophyceae (*Coelastrella thermophila* IBSS-98, *Tetrademus obliquus* IBSS-164, *Desmodesmus multivariabilis* IBSS-167 и IBSS-171) и Trebouxiophyceae (*Dictyosphaerium ehrenbergianum* IBSS-163). Все штаммы – новые для коллекции ИнБЮМ виды, впервые полученные в чистой культуре из крымской альгофлоры. Многообразие направлений использования этих видов в биотехнологических процессах – от очистки окружающей среды до производства ценных продуктов для фармацевтической, косметической и пищевой промышленности, а также биотоплива – определяет актуальность их дальнейшего изучения, открывая перспективы для развития региональной экономики.

Ключевые слова: микроводоросли, коллекция культур, филогенетический анализ, интегративный подход, *Coelastrella thermophila*, *Tetrademus obliquus*, *Desmodesmus multivariabilis*, *Dictyosphaerium ehrenbergianum*, биотехнологии

Для цитирования: Данцюк Н.В., Мансурова И.М., Дегтяр И.В., Кулешова О.Н., Дробецкая И.В., Бочарова Е.А., Лишаев В.Н., Кирин М.П., Кривенко О.В. Новые штаммы зеленых микроводорослей из экстремальных биотопов Крыма: таксономическая идентификация с использованием интегративного подхода // Limnology and Freshwater Biology. 2026. - № 4. - С. 310-337. DOI: 10.31951/2658-3518-2026-A-4-310

1. Введение

Биотехнологии культивирования микроводорослей обладают значительным потенциалом для реализации концепции экономики замкнутого цикла (Santos et al., 2025). Они позволяют гармонично сочетать экологические и экономические приоритеты, обеспечивая создание безотходных промышленных систем, минимизацию антропогенного воздействия и сокращение выбросов парни-

ковых газов в различных отраслях хозяйственной деятельности (Дворецкий и др., 2022; Ende and Abomohra, 2024).

С таксономической точки зрения микроводоросли представляют собой полифилетическую группу одноклеточных эукариот, которые в процессе параллельной эволюции за счёт однократного или множественного эндосимбиоза приобрели способность к фотосинтезу (Glibert, 2024). Филогенетическое расхождение линий микрово-

*Автор для переписки. Адрес e-mail: dantsiuk@ibss-ras.ru (Н.В. Данцюк)

Поступила: 20 июня 2026;

Принята после доработки: 28 июля 2026;

Опубликована online: 28 августа 2026

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



дорослей началось на самых ранних этапах эволюции автотрофных эукариот, что обусловило исключительное разнообразие метаболических сетей их современных представителей (Hildebrand et al., 2013). Клетки микроводорослей способны накапливать значительные количества белка, углеводов, полярных и нейтральных липидов с богатым набором жирных кислот, а также синтезировать широкий спектр биологически активных соединений, включая пигменты (каротиноиды, хлорофилл), витамины, фитогормоны и антибиотики (Elsayed et al., 2024). Это определяет научный интерес к изучению их биотехнологического потенциала, стимулируя поиск новых ценных метаболитов и идентификацию перспективных штаммов-продуцентов для промышленного получения целевых соединений. Технологический прогресс открывает возможности для использования биомассы микроводорослей в нескольких ключевых направлениях: как возобновляемого источника топлива (Jaremko et al., 2023); в качестве сырья для экологически чистого производства биопластика и биополимеров; для восстановления нарушенных водных и наземных биотопов (Kim et al., 2022; Silva et al., 2025).

Скрининг природного разнообразия микроводорослей в экстремальных биотопах служит ключевым подходом для выявления штаммов с высоким биотехнологическим потенциалом. Адаптация к экстремальным условиям сопряжена со сдвигом внутриклеточного метаболизма в сторону биосинтеза вторичных метаболитов – соединений, часто обладающих высокой биологической активностью (Solovchenko and Minyuk, 2021; Debnath et al., 2024). Депонирование штаммов в коллекциях живых культур является критически важным этапом для развития биотехнологических исследований. Он обеспечивает подтверждённый таксономический статус объекта, хранение микроводорослей в строго контролируемых условиях, а также поддержание чистоты и жизнеспособности культуры (Темралеева и Синетова, 2023). Такие коллекционные фонды служат надёжной основой для использования эталонных штаммов как в фундаментальных исследованиях, так и в разработке промышленных технологических процессов. Законодательное закрепление их роли в сохранении биоразнообразия (ФЗ РФ от 27.11.2024 «О биоресурсных центрах...») подчёркивает стратегическое значение подобных коллекций для национальной биотехнологической инфраструктуры.

Коллекция живых культур каротиногенных микроводорослей ФИЦ ИнБЮМ (акроним IBSS, регистрационный № 1201 в World Data Centre for Microorganisms, WDCM) (Данцюк и др., 2021) была создана в 2002 году как часть общей коллекции живых культур микроводорослей Института биологии южных морей. С 2017 года она включена в национальный банк-депозитарий живых систем «Ноев ковчег» (проект МГУ им. М.В. Ломоносова) под идентификатором IBSS-ALGAE. Пополнение фонда осуществляется за счёт направленного межколлекционного обмена и выделения новых штаммов непосредственно из природной среды.

В силу климатических особенностей территории Российской Федерации массовое культивирование микроводорослей возможно лишь в ограниченном числе регионов. В связи с этим поиск новых штаммов, перспективных для промышленного выращивания в южных регионах страны, представляет собой актуальную задачу для масштабирования биотехнологических процессов. В рамках развития коллекции IBSS в 2024 году начат скрининг альгофлоры Крыма, направленный на поиск штаммов микроводорослей, адаптированных к местным условиям. На текущий момент получено 37 штаммов Chlorophyta, выделенных из экстремальных биотопов западной и юго-восточной частей полуострова и относящихся к различным экологическим группам микроводорослей – водные, аэрофильные, почвенные виды, фикобионты лишайников.

Цель настоящей работы – описание пяти новых крымских штаммов микроводорослей, депонированных в коллекцию IBSS, идентификация которых выполнена на основе изучения их жизненного цикла, особенностей тонкой морфологической структуры, а также результатов молекулярно-генетического анализа. По данным литературных источников обсуждаются перспективы практического использования новых коллекционных штаммов в биотехнологических процессах.

2. Материалы и методы

2.1. Районы сбора проб

Отбор проб проводили в четырех точках в степной части западного Крыма, предгорьях юго-восточной и юго-западной части полуострова в весенне-летний период (Рис. 1, Таблица 1).

Точка 1 – кутовая часть озера Донузлав у села Красноярское (северная сторона моста, 5–10 м от пресного колодца). Участок глубиной 3–4 м отделён дамбой, что формирует пресноводные условия (Рябушко и др., 2021). Солёность в основной акватории — 17,5–18,2‰.

Точка 2 – плавни в восточной части озера Кызыл-Яр (бывший гиперсолёный водоём у западного побережья Крыма). Озеро подвержено эвтрофикации и распреснению за счёт вод Межгорного водохранилища (Shadrin et al., 2018). Отбор проб



Рис.1. Карта отбора проб: 1 – оз. Донузлав, кутовая часть; 2 – оз. Кызыл-Яр, восточная часть; 3 – г. Севастополь, пр. Нахимова, 2; 4 – Карадагский природный заповедник, г. Легенер.

Таблица 1. Районы сбора полевых образцов.

№	Район сбора		Координаты	Высота над уровнем моря	Соленость	Биотоп	Дата
1	Западный Крым, степной район	р-н Черноморский, с. Красноярское, кутовая часть оз. Донузлав	45.500180, 33.264876	0 м	2‰	Водоем	27.08.2024
2		р-н Сакский, плавни оз. Кызыл-Яр (восточная часть озера, наиболее удаленная от моря)	45.066459, 33.648638	1 м	2‰	Водоем	27.08.2024
3	Юго-западный Крым, предгорье	г. Севастополь, пр. Нахимова, 2	44.616969, 33.522144	16 м	0‰	Пластиковая емкость с водой	05.2024
4	Юго-восточный Крым, предгорье	Карадагский природный заповедник, горно-вулканический массив Кара-Даг, г. Легенер	44.941943, 35.202785	300 м	0‰	Водоем	20.08.2024

выполнен в наиболее удалённой от моря части с солоноватыми водами (2‰).

Точка 3 – емкость с пресной водой в пределах городской застройки г. Севастополь.

Точка 4 – скальные ванны на склоне горы Легенер (горно-вулканический массив Карадаг). Естественные округлые углубления в породе (радиус ~1 м, глубина 0,5 м) расположены каскадом на расстоянии 2–3 м друг от друга. Отбор проб выполнен в августе в условиях отсутствия гидрологической связи между ваннами (застойное состояние вод). Пробы взяты независимо из разных объектов.

2.2. Сбор материала

Отбор проб воды из каменных ванн и естественных водоёмов проводили у поверхности (0–0,1 м) с использованием стерильных полипропиленовых пробирок типа Falcon. Солёность определяли портативным рефрактометром ATAGO PAL-06S (Япония). Каждую пробу маркировали с указанием: номера, даты сбора, GPS координат и фамилии сотрудника, выполнившего отбор. До момента анализа пробы хранили в лабораторных условиях при температуре и освещённости, максимально приближённых к *in situ* параметрам.

2.3. Изоляция и культивирование штаммов водорослей

Водные пробы концентрировали центрифугированием при низкой скорости (70–130g, 2–3 мин). Супернатант удаляли, а к осадку клеток добавляли искусственную питательную среду, разбавленную дистиллированной водой в 2–3 раза. В работе использовали унифицированную стандартную минеральную среду Болда (BBM) для зелёных микроводорослей (Bischoff and Bold, 1963). Соскобы биоматериала на ватных палочках помещали в стеклянные флаконы с разбавленной средой BBM,

закрывали ватно-марлевыми пробками и инкубировали при комнатной температуре несколько суток. Для получения альгологически чистых культур применяли метод многократного последовательного разведения и инокуляцию отдельных клеток методом микропипетки (Темралеева и др., 2014). Финальный этап включал посев на агаризованную (1,5%) среду BBM в чашках Петри методом истающего штриха (Темралеева и др., 2014).

Прорастание и образование первых колоний наблюдали в среднем через 2 недели. Для получения активно вегетирующей накопительной культуры отдельные колонии микроводорослей переносили микробиологической петлёй в стеклянные пробирки с небольшим объёмом (0,3 мл) жидкой среды BBM, закрывали ватно-марлевыми пробками и инкубировали при комнатной температуре и освещении 35 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹. Контроль жизнеспособности клеток проводили под световым микроскопом. Для антибактериальной обработки использовали коктейль антибиотиков широкого спектра действия (Kan and Pan, 2010): ампициллин (500 мкг·мл⁻¹) и цефотаксим (100 мкг·мл⁻¹). Фунгицидную обработку выполняли раствором фундазола (40 мкг·мл⁻¹) (Мокросноп и Золотарёва, 2012). Для длительного хранения в коллекции альгологически чистые культуры микроводорослей на агаризованной (1,5%) среде BBM помещали в двух повторностях в контролируемые условия. Образцы размещали в модифицированной холодильной витрине Snaige, оснащённой светодиодными лампами Feron DL 20W T4 6400K (Россия) и двумя дополнительными терморегуляторами (тип F/2000, производитель FTWOF PRODIGY), где поддерживали температуру 14–16°C, интенсивность освещения 20–26 мкмоль фотонов м⁻²с⁻¹ и фотопериодом 15 ч свет: 9 ч темнота.

Выделено 5 штаммов зелёных микроводорослей с присвоением номеров: IBSS-98, IBSS-164, IBSS-167, IBSS-171, IBSS-163.

2.4. Световая микроскопия (СМ)

Морфометрические параметры клеток выделенных штаммов определяли с использованием инвертированного светового микроскопа Nikon Eclipse Ts2R. Линейные размеры измеряли по микрофотографиям, полученным цифровой камерой Infinity 3 Lumenera, с обработкой в программе ImageJ Software (National Institute of Health, USA). Выборка для анализа размерной структуры клеточных популяций включала 100 клеток. Для таксономической идентификации использовали живую культуру. Наблюдения за жизненным циклом водорослей проводили в течение 1–4 недель.

2.5. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Для получения изображений поверхности клеток образцы фиксировали раствором глутарового альдегида в фосфатном буфере (конечная концентрация - 1%) (Чубчикова и др., 2022). Пробы дегидратировали в серии возрастающих концентраций этанола или смеси этанола и ацетона (Рылькова и др., 2023). Сушку образцов в критической точке проводили в установке Leica EM CPD300 (Германия) в течение 2,5 ч в мягком режиме. Напыление сплавом Au/Pd (0,5–1,0 мин) выполняли в системе Leica EM ACE200 (Германия). СЭМ-изображения клеток получали с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi SU3500 (Япония) на базе Лаборатории микроскопии ФИЦ ИнБЮМ.

2.6. Молекулярно-генетический анализ

Тотальную ДНК выделяли из концентрированных культур микроводорослей с использованием набора «ДНК-Экстрен-3» («Синтол», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Амплификацию участка кластера ядерных рибосомальных генов, включающего области ITS1, 5.8S рДНК и ITS2, проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием набора реагентов «Encyclo Plus PCR kit» («Евроген», Россия) и праймеров ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') и ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). Протокол амплификации включал: начальную денатурацию при 94°C в течение 3 мин; 34 цикла (денатурация – 30 с при 94°C, отжиг праймеров – 30 с при 60°C, элонгация – 60 с при 72°C); финальную элонгацию – 10 мин при 72°C. Качество ампликонов оценивали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием в концентрации 0,2 мкг/мл. ПЦР-продукты очищали с использованием набора «ColGen» («Синтол», Россия) и секвенировали с помощью набора «GenSeq» («Синтол», Россия) на генетическом анализаторе «Нанофор 05» (Институт перспективных исследований, СевГУ, Россия). Редактирование и сборку последовательностей выполняли в программе 4Peaks, сопоставляя прямые и обратные хроматограммы (<http://nucleobytes.com/index.php/4peaks>).

<http://nucleobytes.com/index.php/4peaks>).

Первичный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием алгоритма BLASTn (Zhang et al., 2000; Morgulis et al., 2008). Полученные для каждого штамма последовательности использовались в качестве запросов для поиска в базе данных NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). На основании показателей покрытия последовательности, E-значения и процента идентичности выбирали наилучшие совпадения, которые были использованы для дальнейшего филогенетического анализа, с особым акцентом на последовательности эталонных (аутентичных) штаммов.

Множественное выравнивание последовательностей выполняли в программе MAFFT v.7.48 (Katoh and Toh, 2010) с алгоритмом L-INS-I, с последующим удалением неоднозначно выровненных участков на 5'- и 3'-концах. Длина полученной матрицы составила 890 п.н. для IBSS-98, IBSS-164, IBSS-167, IBSS-171 и 4989 п.н. для IBSS-163. Филогенетические реконструкции проводили методом максимального правдоподобия (ML) в программе IQ-TREE 3.0.0 (Trifinopoulos et al., 2016). Модели нуклеотидных замен GTR+I+G4 и TIM2+F+I+R2 были автоматически выбраны с помощью ModelFinder по байесовскому информационному критерию (BIC). Уровень статистической поддержки топологии филогенетического дерева оценивали с помощью трех показателей: приближенного теста отношения правдоподобия типа Shimodaira-Hasegawa (SH-aLRT, 10000 репликаций), «сверхбыстрого» бутстрепа (ultrafast bootstrap 10000 псевдорепликаций) и метода aBayes (максимальное число неудачных итераций – 1000). Байесовский филогенетический анализ был выполнен с использованием программы BEAST v.10.5.0 (Suchard et al., 2018) для конкатенированной матрицы со следующими параметрами запуска: модель замен – GTR+I+G4 и модель видообразования – процесс Юла. Расстояния по двухпараметрической модели Кимура (K2P) были рассчитаны с помощью программного обеспечения MEGA 11 (Kimura, 1980; Tamura et al., 2021). Визуализацию и редактирование филогенетических деревьев выполняли с использованием онлайн-сервиса phylo.io (<https://phylo.io/index.html>).

Для предварительной таксономической идентификации по морфологическим признакам использовали определители (Komárek and Fott, 1983; Царенко, 1990; Андреева, 1998). Систематика водорослей указана в соответствии с базой данных AlgaeBase (Guiry and Guiry, 2026).

3. Результаты

3.1. Идентификация штаммов методами молекулярной филогении

Для пяти новых штаммов, выделенных в чистую культуру и депонированных в коллекции IBSS, получены нуклеотидные последовательности маркерного участка рДНК в ITS-области, включающей ITS1–5.8S–ITS2 (частично). Общая длина после-

довательностей составила: 597 п. н. для штаммов IBSS-171 и IBSS-167, 620 п. н. для IBSS-98, 693 п. н. для IBSS-164, 706 п. н. для IBSS-163. Первичный анализ показал, что последовательности кластеризуются в пределах двух семейств хлорофитовых водорослей: Scenedesmaceae (IBSS-98, IBSS-164, IBSS-167 и IBSS-171), Chlorellaceae (IBSS-163). Для каждого семейства была выполнена отдельная

филогенетическая реконструкция. Использованные для их построения множественные выравнивания приведены в Приложениях S1 и S2 соответственно для Scenedesmaceae и Chlorellaceae (доступны по <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.32731128>).

На филогенетическом дереве семейства Scenedesmaceae (Рис. 2) полученные последовательности распределены по трем близкородственным

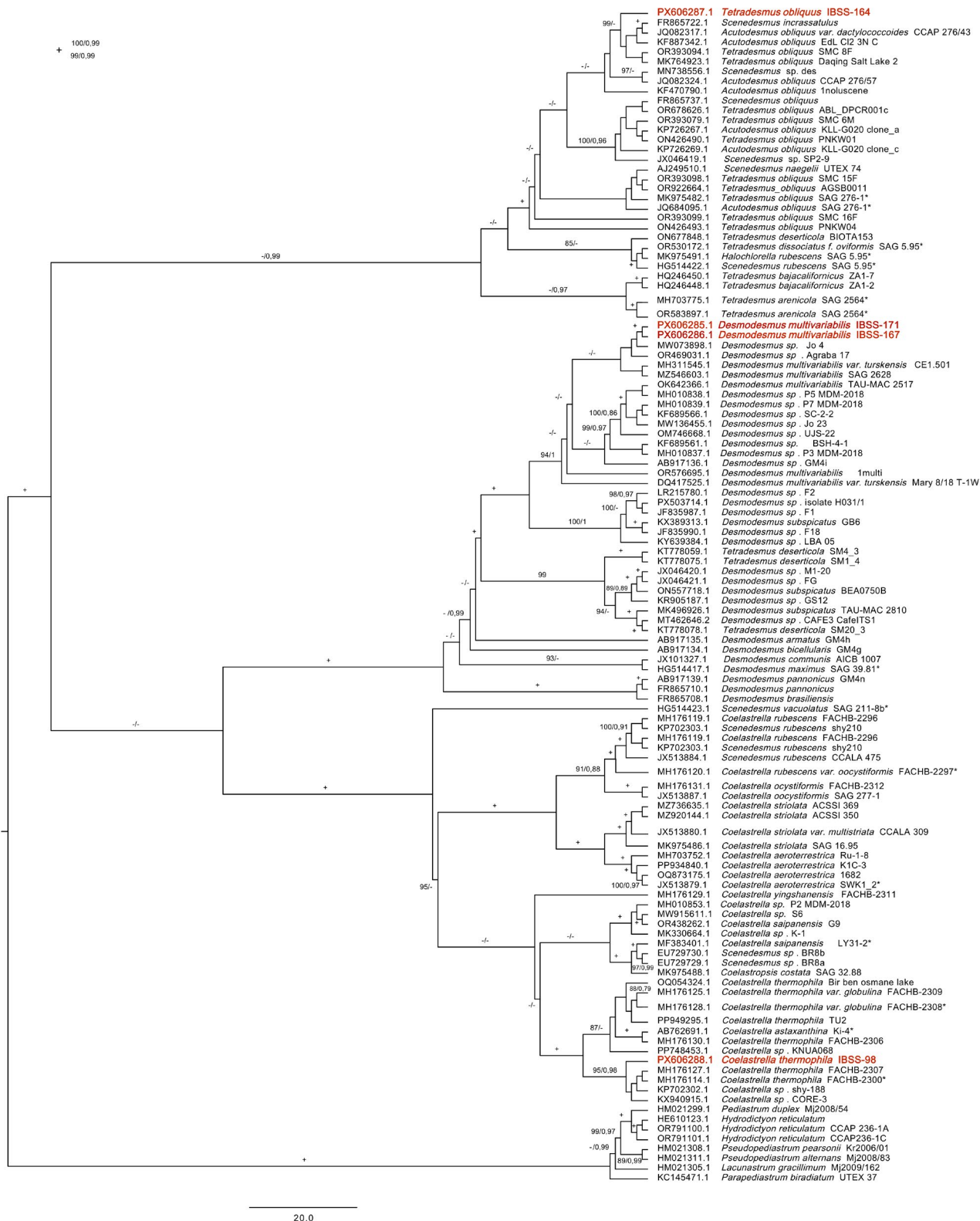


Рис.2. Положение новых штаммов IBSS-98, IBSS-164, IBSS-167 и IBSS-171 на филогенетическом дереве семейства Scenedesmaceae, реконструированном методом максимального правдоподобия (ML) по последовательности ITS-области рДНК. Значения поддержки узлов указаны в формате BS/PP (процент бутстрепподдержки / байесовская постериорная вероятность); на дереве отображены только узлы с BS $\geq$ 85 и PP $\geq$ 0.85.

Поддержки узлов BS $\geq$ 99 и PP $\geq$ 0.99 отмечены символом (+). Аутентичные штаммы отмечены символом (*).

кладам, сформированным представителями родов *Desmodesmus* (IBSS-171 и IBSS-167), *Tetradasmus/Acutodesmus* (IBSS-164) и *Coelastrella* (IBSS-98).

Последовательности анализируемых участков геномов штаммов IBSS-171 и IBSS-167 полностью идентичны. На филогенетическом дереве данные штаммы входят в состав клады, которая объединяет несколько штаммов *D. multivariabilis*, включая аутентичный штамм *D. multivariabilis* SAG 2058 и его разновидность *D. multivariabilis* var. *turskensis*, а также более десяти неидентифицированных изолятов рода *Desmodesmus* sp. (Рис. 2). Байесовская поддержка узла (постериорная вероятность, PP) максимальная – 1,00, бутстреп-поддержка (BS) составляет 94%, что свидетельствует о высокой надёжности поддержки этого кластера. Ближайшими филогенетическими соседями крымских штаммов выступают неидентифицированные изоляты *Desmodesmus* Jo.4 и *Desmodesmus* sp. Agrab 17. Генетические дистанции до этих изолятов, рассчитанные по двухпараметрической модели Кимуры (K2P), составляют 1,0% и 1,2% соответственно. Для ближайшей сестринской линии, характеризующейся высокой статистической поддержкой и включающей шесть последовательностей рода *Desmodesmus* (в том числе идентифицированный штамм *D. subspicatus* GB6), значения генетических дистанций находятся в интервале 2,2–4,5%.

С учетом положения на филогенетическом дереве и оценки генетических дистанций, новые штаммы IBSS-171 и IBSS-167 были отнесены к линии *D. multivariabilis* и депонированы в базе NCBI под номерами доступа PX606285 и PX606286 соответственно. Но очевидно, что структура данной линии требует дальнейшего изучения с использованием более широкого набора генетических маркеров.

Штамм IBSS-164 относится к кладе, включающей свыше 20 штаммов, в основном идентифицируемых как *Tetradasmus obliquus* (синонимы: *Acutodesmus/Scenedesmus*), в том числе последовательность аутентичного штамма *T. obliquus* SAG 2761. Высокие значения PP = 0,99 и BS = 99% свидетельствуют о надёжности выделенного кластера. Эволюционные дистанции внутри данной линии варьируют в диапазоне от 0 до 1,4%. Расстояние между штаммом IBSS-164 и его ближайшими соседями составляет около 0,5%, что соответствует среднему значению для клады *T. obliquus*. Эволюционные дистанции до ближайших линий других видов рода (*T. arenicola* и *T. bajacalifornicus*), представленных на филогенетическом дереве и характеризующихся высокой поддержкой узлов, варьируют в диапазоне 2,6–4,2%. На основании полученных данных последовательность штамма IBSS-164 была отнесена к линии *Tetradasmus obliquus* и депонирована в базе NCBI под номером PX606287.

Последовательность штамма IBSS-98, третьего из выделенных представителей семейства Scenedesmaceae, входит в кладу, объединяющую штаммы *Coelastrella thermophila*, и которая имеет максимальный уровень статистической поддержки: PP = 1,00 и BS = 100% (Рис. 2). Генетические дис-

танции до ближайших соседей, включая последовательность аутентичного штамма *C. thermophila* FACHB-2300, не превышают 0,3%. Эволюционные дистанции в пределах всей клады *C. thermophila*, включая отдельные варианты этого вида, варьируют в диапазоне от 0,6 до 1,3%. При этом генетические расстояния до последовательностей так называемой «коровой» группы видов рода *Coelastrella* (в частности, *C. rubescens*, *C. yingshanensis*, *C. saipanensis*, *C. aeroterrestica*) составляют от 3 до 9%. Таким образом, имеющиеся данные позволяют с высокой степенью достоверности дифференцировать отдельные виды рода *Coelastrella* на основании анализа исследуемого участка рибосомального кластера генов. Последовательность *C. thermophila* IBSS-98 депонирована в базе NCBI под номером PX606288.

Последовательность штамма IBSS-163 полностью идентична соответствующему участку генома аутентичного штамма *Dictyosphaerium ehrenbergianum* CCAP 222/14. На филогенетическом дереве (Рис. 3) эти последовательности совместно с образцом типового вида *D. ehrenbergianum* CCAP 222/45 формируют сестринскую линию по отношению к кладе, включающей два штамма *D. libertatis*. Надёжность данной топологии подтверждается высокими значениями поддержки: PP = 1,00 и BS ≥ 96%. Эволюционные дистанции на изученном участке генома между видами *D. ehrenbergianum* и *D. libertatis* варьируют в пределах 3–4%, тогда как внутривидовые расстояния для *D. ehrenbergianum* на порядок ниже (около 0,3%). На основании полученных данных штамм IBSS-163 отнесён к линии *D. ehrenbergianum* и зарегистрирован в базе NCBI под номером PX606289.

3.2. Идентификация штаммов на основе интегративного подхода

Морфологическое описание новых штаммов проводили с использованием СМ по доступным диагностически значимым морфометрическим и биологическим признакам на разных стадиях жизненного цикла микроводорослей. Применение СЭМ позволило выявить микроскопические особенности структуры клеточной оболочки, не поддающиеся визуализации у ряда видов при помощи СМ. В комплексе оба метода обеспечили расширенное морфологическое описание исследуемых штаммов. Дополнительно учитывали тип, форму и цвет колоний на твёрдой агаризованной среде, формирующихся в среднем через две недели после посева.

На основании совокупности диагностических признаков — морфотипа, формы и размеров клеток, внутриклеточного содержимого и особенностей жизненного цикла — выделенные штаммы отнесены к двум классам водорослевой линии Chlorophyta: Chlorophyceae (4 штамма) и Trebouxiophyceae (1 штамм).

Штамм IBSS-98 *Coelastrella thermophila* Qinghua Wang, Huiyin Song, Xudong Liu, Guoxiang Liu & Zhengyu Hu 2019 (Chlorophyceae, Sphaeropleales, Scenedesmaceae).

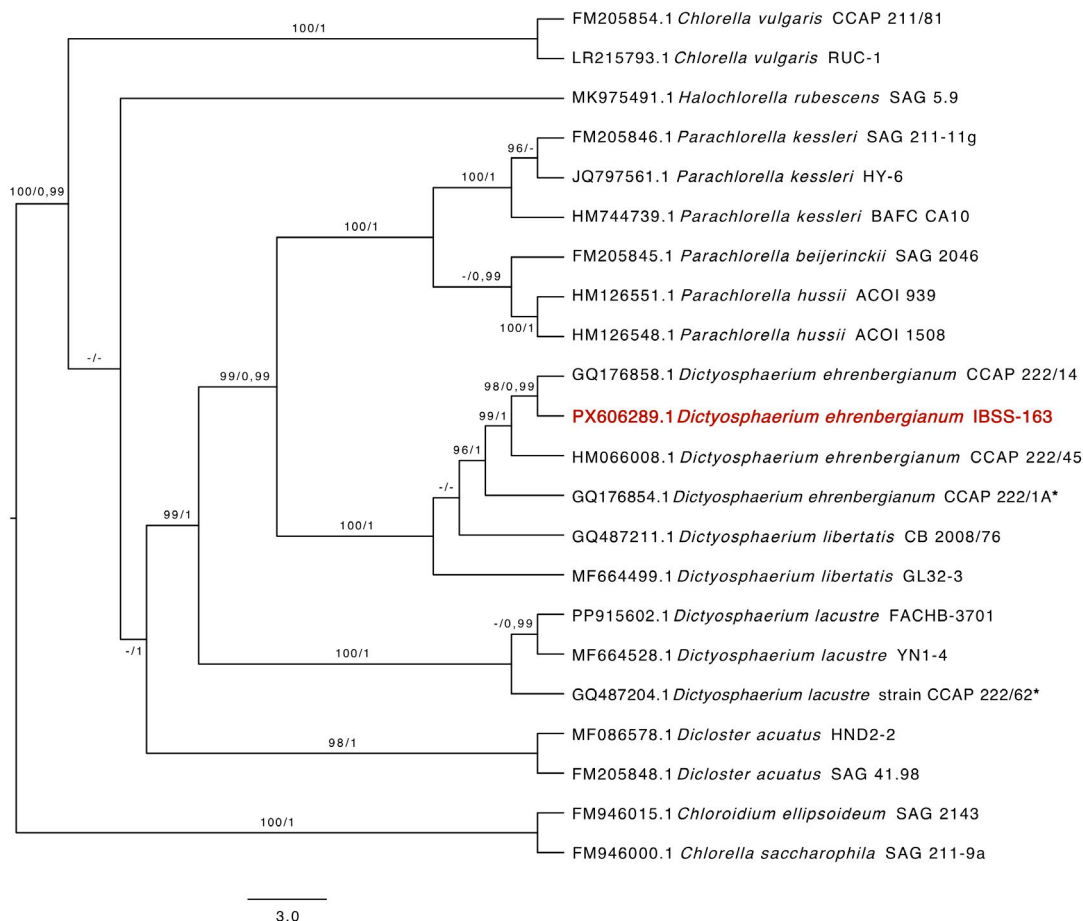


Рис.3. Положение нового штамма IBSS-163 на филогенетическом дереве отдельных представителей семейства Chlorellaceae, реконструированном методом максимального правдоподобия (ML) по последовательности ITS-области рДНК. Значения поддержки узлов указаны в формате BS/PP (процент бутстрепподдержки / байесовская постериорная вероятность); на дереве отображены только узлы с BS $\geq$ 85 и PP $\geq$ 0.85. Аутентичные штаммы отмечены символом (*)

Местообитание

Штамм получен из красного водорослевого налёта на пластиковой ёмкости с пресной водой, которая длительное время находилась на открытом воздухе (Точка 3, Таблица 1). Идентифицирован как аэрофит.

Морфология и биология

На агаризованной питательной среде колонии выделенного штамма одиночные темно-зеленого цвета, по мере старения приобретают ярко-оранжевый цвет. В жидкой культуре клетки веретеновидной, яйцевидной или эллипсоидной формы с пристеночным и чашевидным хлоропластом, отчетливо видимым одним пиреноидом (Рис. 4 А, Б).

Размеры клеток варьируют в пределах 6,5–12,5 мкм в длину и 2,8–9,7 мкм в ширину. Морфологические признаки штамма соответствуют признакам, типичным для рода *Coelastrella*, определенного Chodat в 1922 году. Так же следует отметить характерную особенность для этого вида, согласно Wang et al. (2019) – это наличие асимметрично вытянутых эллипсоидальной формы молодых клеток, иногда заостренными только с одного конца.

Бесполое размножение путем образования автоспор (по 2–4), перед делением клетки приобретали округлую форму. Половой процесс не наблюдали. На изображениях СЭМ клеток заметна

характерная скульптура клеточной оболочки в виде меридиональных ребер (в основном по 10–14), сходящихся к полюсам клетки (Рис. 4 В, Г).

На основании комплексного анализа морфологических и молекулярно-генетических признаков новый штамм IBSS-98 идентифицирован как *Coelastrella thermophila*.

Штамм IBSS-164 *Tetrademus obliquus* (Turpin) M.J.Wynne 2016 (Chlorophyceae, Sphaeropleales, Scenedesmaceae)

Местообитание

Штамм изолирован из эвтрофных солоноватых вод озера Кызыл-Яр, расположенного в степной зоне вблизи западного побережья Крыма. Проба была отобрана в августе в наиболее удаленной от моря части озера (Точка 2, Таблица 1).

Морфология и биология

На агаризованной питательной среде колонии выделенного штамма мелкие темно-зеленого цвета, при длительном хранении (в течение 2-х месяцев) приобретают желто-зеленый оттенок. В жидкой культуре клетки одиночные овальной или веретеновидной формы и в виде ценобиев, состоящих из четырех клеток без слизистой оболочки, расположенными в одной плоскости (Рис. 5 А, Б). Хлоропласт пристеночный, заполняющий внутреннюю поверхность клетки и один пиреноид вблизи центра клетки.

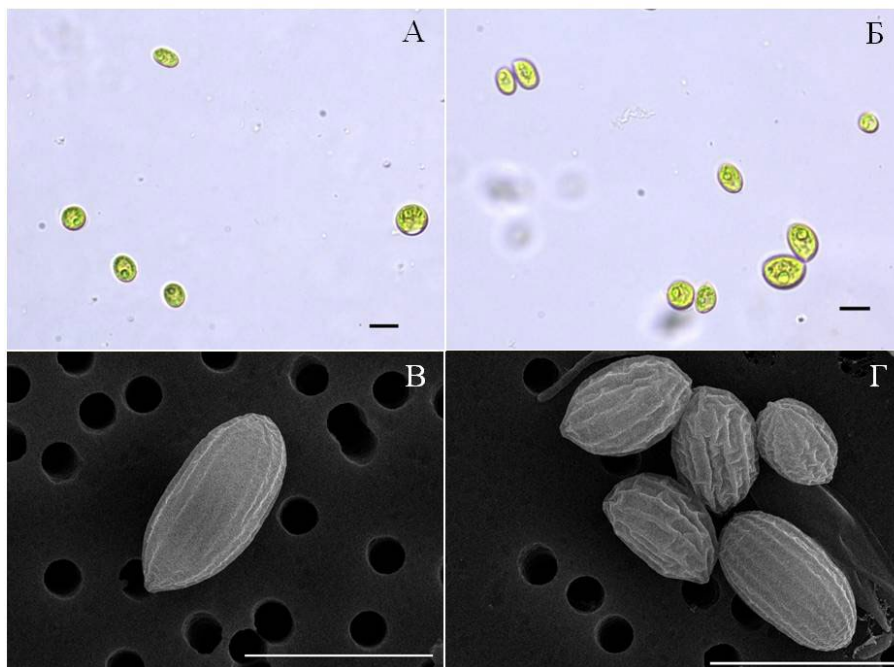


Рис.4. Изображения молодых вегетативных клеток штамма IBSS-98 *Coelastrella thermophila*: А, Б – СМ; В, Г – СЭМ, шкала 10 мкм.

Размеры клеток варьируют в пределах 3,5–6,5 мкм в длину и 1,7–4,7 мкм в ширину. По мере старения культуры клетки в основном встречаются в виде ценобиев. На изображении СЭМ поверхность клеточной стенки гладкая с полярными утолщениями и редкими меридиональными ребрами (Рис. 5 В, Г).

Размножение бесполое автоспорами по 2–4, без образования зооспор. Половой процесс не наблюдали.

По совокупности морфологических признаков, и в частности по размеру и форме клеток, порядка их организации в ценобий (Cho and Lee, 2024), штамм IBSS-164 полностью соответствует описанию *Tetrademus obliquus* (Oliveira et al., 2021; Cho and Lee, 2024), что подтверждается данными молекулярно-генетических исследований.

Штаммы IBSS-167, IBSS-171 *Desmodesmus multivariabilis* E.Hegewald, Antal Schmidt, A.Braband & P.M.Tsarenko 2005 (Chlorophyceae, Sphaeropleales, Scenedesmaceae).

Местообитание

Два штамма одного вида изолированы из застойных вод каскадной системы скальных ванн на склоне г. Легенер массива Карадаг (Точка 4, Таблица 1), отобранных в августе. Пробы независимы ввиду отсутствия гидрологической связи между объектами на момент отбора.

Морфология и биология

На агаризованной питательной среде колонии обоих штаммов темно-зеленого цвета. В жидкой культуре встречаются как одиночные клетки овальной формы, так и непостоянное количество

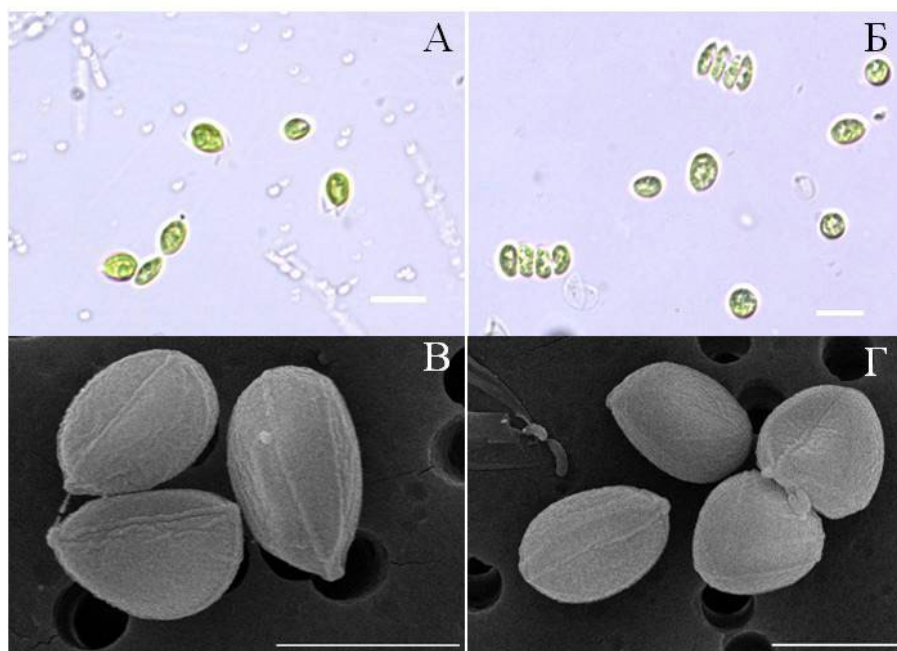


Рис.5. Изображения молодых клеток штамма IBSS-164 *Tetrademus obliquus*: А, Б – СМ, шкала 10 мкм; В, Г – СЭМ, шкала 5 мкм.

клеток в ценобиях (по 2–4 клетки) расположенных в одной плоскости, что говорит о плеоморфности водоросли на разных стадиях роста и развития (Рис. 6).

Клетки неподвижные, под световым микроскопом эпиструктуры в виде боковых «шипики» и «рогов» не заметны. Размеры клеток варьируют в пределах 3–8 мкм в длину и 2–7 мкм в ширину. Хлоропласт занимает большую часть объема клетки с одним четко выраженным круглым пиреноидом. На снимках, полученных при помощи СЭМ на поверхности клеточной оболочки отчетливо заметны мелкие бородавки и немногочисленные роговидные отростки одинаковой длины, расположенные перпендикулярно клеточной оболочке (Рис. 6). Вдоль клетки неровные и бугристые меридиональные ребра, которые могут быть целыми или частично редуцированными.

Размножение бесполое с образованием автоспор, половой процесс не отмечен.

Оба штамма соответствуют описанию, представленному в литературе (Gorelova et al., 2015; Demura et al., 2021; Xu et al., 2024). На основании морфологических признаков и результатов филогенетического анализа штаммы IBSS-167 и IBSS-171 идентифицированы как *Desmodesmus multivariabilis*.

Штамм IBSS-163 *Dictyosphaerium ehrenbergianum* Nägeli 1849 (Trebouxiophyceae, Chlorellales, Chlorellaceae).

Местообитание

Штамм изолирован из солоноватых вод (2‰) кутовой части озера Донузлав с глубинами 3–4 м, отгороженной от основной акватории (Точка 1, Таблица 1).

Морфология и биология

На агаризованной питательной среде колонии выделенного штамма одиночные ярко-зеленого цвета. В жидкой культуре клетки в виде свободно-плавающих колоний, состоящих из 4-х и более крестообразно расположенных симметричных клеток овальной (яйцевидной) формы, прикрепленных к слизистым желатинизированным тяжам боками в поперечном положении клеток (Рис. 7 А, Б). Тяжи

идут радиально от центра колонии и разделяются дихотомически или тетратомически. Размеры молодых клеток в пределах 4,5–6,5 мкм в длину и 2,5–5 мкм в ширину. Более старые колонии состоят из 8–16 округлых клеток на концах слизистых тяжей в виде «соцветий», иногда могут быть окружены слизистыми оболочками.

Отмечено размножение фрагментацией колонии на сегменты, состоящие из 4-х крестообразно расположенных клеток на слизистых тяжах (Рис. 7 Б). Хлоропласт пристеночный с одним пиреноидом. На изображении СЭМ поверхность клеточной оболочки и слизистые тяжи покрыты бородавками (Рис. 7 Г, Д). По мере старения культуры наблюдали незначительное увеличение размеров клеток в пределах 4,5–7,5 мкм в длину и 3,5–5 мкм в ширину, и уплотнение колоний, из-за чего слизистые тяжи не визуализировались (Рис. 7 В). Зрелые колонии распадались на отдельные одиночные клетки вследствие потери слизистых стеблей (Рис. 7 Е).

На основании морфологических признаков (Bock, 2010) и результатов молекулярно-генетического анализа (Рис. 3), новый штамм IBSS-163 идентифицирован как *Dictyosphaerium ehrenbergianum*.

4. Обсуждение

Роль национальных и региональных коллекций культур микроводорослей в развитии биотехнологий и сохранении биоразнообразия неоднократно подчёркивалась в литературе (Kurpan et al., 2025; Lourenço, 2020). В этом контексте расширение коллекции каротиногенных микроводорослей ФИЦ ИнБЮМ приобретает особую значимость: с 2021 года число поддерживаемых штаммов увеличилось с 44 до 131, при этом доля местных изолятов (Крым и причерноморские районы Кавказа) возросла с 25 до 40%. Целенаправленный скрининг альгофлоры Крыма позволил выделить около 40 новых штаммов в чистой культуре, требующих детального таксономического и биотехнологического описания.

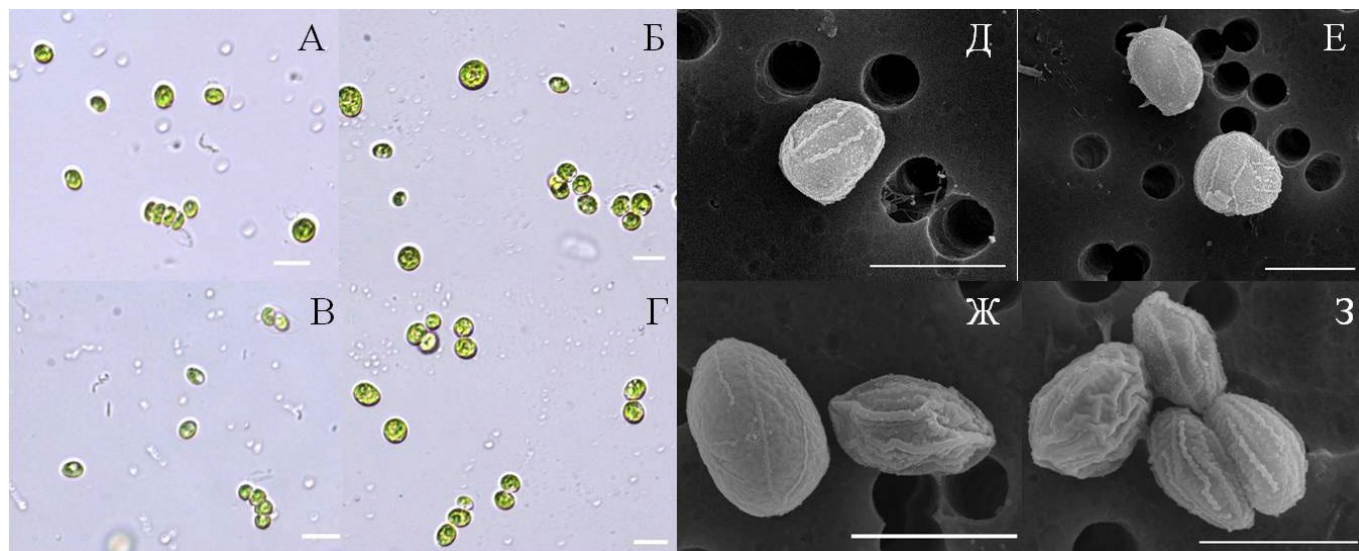


Рис.6. Изображения клеток *Desmodesmus multivariabilis*: А, Б – СМ штамма IBSS-167, В, Г – СМ штамма IBSS-171, шкала 10 мкм; Д, Е – СЭМ штамма IBSS-167, Ж, З – СЭМ штамма IBSS-171, шкала 5 мкм.

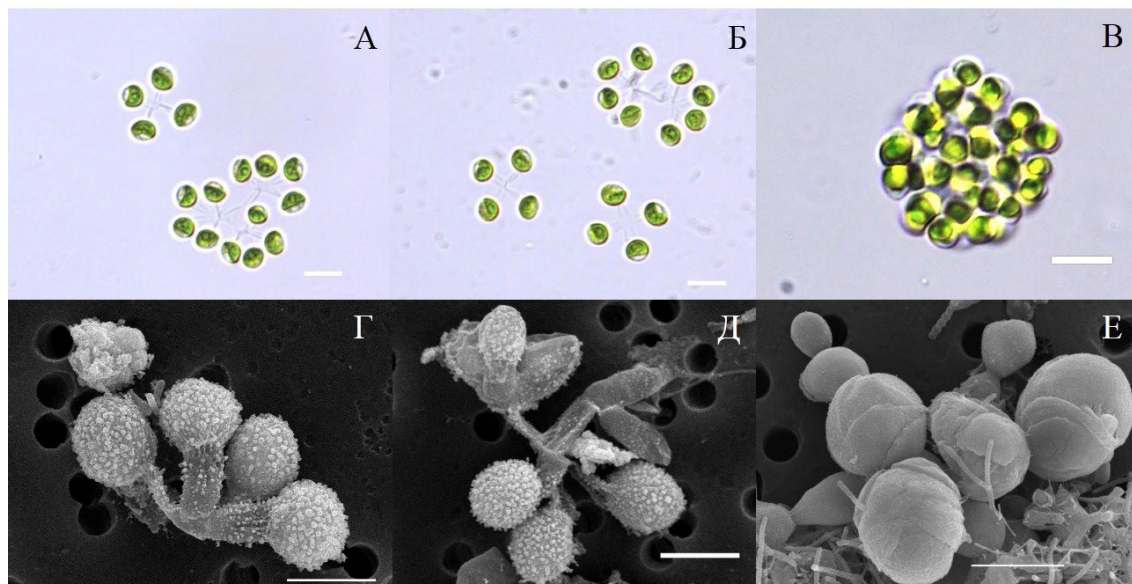


Рис.7. Изображения клеток штамма IBSS-163 *Dictyosphaerium ehrenbergianum*: А, Б – СМ, молодые колонии; В – СМ, зрелая колония (3-х недельная культура), шкала 10 мкм; Г, Д – СЭМ, молодые колонии, Е – СЭМ, зрелые клетки без оболочки, шкала 5 мкм.

Таксономическая идентификация пяти изолятов была выполнена с применением интегративного подхода, сочетающего молекулярно-генетические методы и морфологические данные (световая и электронная микроскопия). Видовая принадлежность изолятов обоснована методами молекулярной филогении и согласуется с описанными в литературе морфологическими, экологическими и онтогенетическими характеристиками соответствующих таксонов (Komárek and Fott, 1983; Царенко, 1990; Андреева, 1998).

Определение наиболее подходящих молекулярных маркеров для видовой дифференциации зелёных водорослей остаётся предметом методических обсуждений, что связано с серьёзными ограничениями морфологического подхода – высокой внутривидовой изменчивостью и сходством близких таксонов. В настоящем исследовании для молекулярной идентификации новых штаммов был использован филогенетический анализ ITS-региона, маркера, широко применяемого для разрешения таксономических вопросов у зелёных микроводорослей наряду с традиционными баркодами (SSU, *rbsL*, *tufA*) (Hoshina, 2014; Proeschold and Darienko, 2020; Krivina et al., 2024; 2025; Temraleeva and Bukin, 2022).

Полученные филогенетические реконструкции демонстрируют однозначное размещение всех новых штаммов внутри четырёх отдельных ветвей с высокой поддержкой узлов; эти ветви соответствуют видам *Desmodesmus multivariabilis*, *Tetradismus obliquus*, *Coelastrella thermophila* (Chlorophyceae) и *Dictyosphaerium ehrenbergianum* (Trebouxiophyceae). Генетические дистанции, рассчитанные с использованием модели K2P для ITS-региона, позволяют эффективно разграничивать уровни внутри- и межвидовой изменчивости: внутривидовые значения, как правило, не превышают 2,2%, тогда как дистанции между близкородственными видами варьируют в диапазоне 3–4% и могут достигать 8–9% для более

отдалённых видов. Наблюдаемые значения генетических дистанций согласуются с данными, полученными для региона ITS2 (Hoshina, 2014). Таким образом, анализ ITS-региона позволяет надёжно дифференцировать виды в пределах исследованных монофилетических линий Chlorophyceae и Trebouxiophyceae. Вместе с тем разрешение внутривидовой структуры и идентификация потенциально новых видов требуют привлечения дополнительных маркеров. Согласно современным рекомендациям, для этих целей целесообразно использовать детальный анализ структуры ITS2-региона, а также мультигенные реконструкции на основе конкатенированных последовательностей рибосомальных и пластидных генов либо полного пластидного генома (Krivina et al., 2025; Cho and Lee, 2024).

Все идентифицированные штаммы являются новыми для коллекции ИнБЮМ и впервые выделены в чистую культуру из крымской альгофлоры. С учётом литературных данных о способности представителей этих таксонов к накоплению ценных биологически активных соединений, они представляют интерес как потенциальные биотехнологические продуценты (см. Таблица 2).

Все выделенные виды являются космополитами и отличаются высоким уровнем экологической пластичности, что позволяет им колонизировать разнообразные местообитания (Таблица 2). Большинство представителей родов *Coelastrella*, *Tetradismus* и *Desmodesmus* относятся к аэрофитам и обычно встречаются на поверхности почвы, скальных и бетонных субстратах, кирпичных стенах и коре деревьев. В отличие от них, представители рода *Dictyosphaerium* – широко распространённые обитатели пресноводных водоемов, способные формировать их «цветения» (Bock, 2010; Scoculi de Lira et al., 2025). Места отбора наших изолятов полностью соответствуют типичным биотопам, характерным для естественного распространения идентифицированных штаммов микроводорослей.

Таблица 2. Систематизация литературных данных о новых для коллекции IBSS видах микроводорослей: биотопы, биологически активные вещества, области применения, представленность в коллекциях.

Вид микроводоросли	Биотопы	Биоактивные вещества	Применение	Коллекции, где представлен вид
<i>Coelastrella thermophila</i>	Водные, почвенные, влажные поверхности, экстремальные ^{6,5,2}	Каротиноиды, Липиды, ПНЖК ⁶ Липиды, МНЖК, НЖК ⁵	Биоэнергетика Космецевтика и фармацевтика ^{6,5}	SYKOA, FACHB, CCCryo, SAG
<i>Tetradasmus obliquus</i>	Водные (в т. ч. скальные ванны) ^{9,13}	Каротиноиды, лютеин ¹³ Липиды, МНЖК, НЖК ⁹	Биоэнергетика, фармацевтика и нутрицевтика ^{9,12,8}	UTEX, SAG, CCAP, VKM
<i>Desmodesmus multivariabilis</i>	Водные (пресные, солоноватые); почвенные; симбионт донных беспозвоночных ⁷	ПНЖК ¹	Фармацевтика и нутрицевтика ¹ Биоремедиация ¹¹	BCAC, CCAP, SAG, UTEX, VCA, TAU-MAC, FBCC
<i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i>	Водные (пресные, солоноватые) ^{3,4}	Липиды, МНЖК, НЖК ^{10,4}	Биоэнергетика ^{10,4}	CALU, CCAP, UTEX, FACHB

Примечание:

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; МНЖК – мононенасыщенные жирные кислоты; НЖК – насыщенные жирные кислоты.

¹Akgül and Kösel, 2023; ²Baldanta et al., 2025; ³Bock, 2010; ⁴Borah et al., 2018; ⁵Boutarfa et al., 2022; ⁶Goecke et al., 2020; ⁷Gorelova et al., 2015; ⁸Huang et al., 2025; ⁹Ismagulova et al., 2018; ¹⁰Jiang et al., 2018; ¹¹Onyancha et al.2022; ¹²Scoculi de Lira et al., 2025; ¹³Ünivar and Ünlü, 2022.

SYKOA Коллекция живых штаммов микроводорослей Института биологии Коми Нц Уро РАН (<http://ib.komisc.ru:8008/sykoa/collection/>)

VKM Всероссийская коллекция микроорганизмов (<http://www.vkm.ru/rus/Catalogue.htm>)

FACHB Коллекция культур пресноводных водорослей Китайской академии наук (http://english.ihb.cas.cn/research/platforms/npmp/202012/t20201202_255451.html)

CCCryo Коллекция культур криофильных водорослей (<https://www.izi-bb.fraun>)

SAG – Коллекция культур водорослей Гёттингского университета (<https://www.unigoettingen.de/de/184982.html>)

UTEX – Коллекция культур водорослей Техасского университета (<https://utex.org/>)

CCAP Коллекция культур водорослей и простейших (<https://www.ccap.ac.uk/>)

BCAC Коллекции водорослей и цианобактерий Башкортостана

CALU Коллекция цианобактерий, водорослей и паразитов водорослей

VCA Коллекция цианобактерий и водорослей лаборатории ботаники ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН

TAU-MAC Коллекция культур микроводорослей и цианобактерий (<http://cyanobacteria.myspecies.info>)

FBCC Коллекция культур пресноводных биоресурсов (<https://fbp.nnibr.re.kr/fbcc/?lang=en>)

В условиях неблагоприятных внешних факторов, таких как обезвоживание, солевой стресс, высокая инсоляция и азотное голодание, микроводоросли родов *Coelastrella*, *Tetradasmus*, *Desmodesmus* и *Dictyosphaerium* активно накапливают липиды, преимущественно в форме триацилглицеринов (ТАГ) (Ancona-Canché et al., 2017; Zhu et al., 2020), что делает их перспективным сырьём для производства биотоплива третьего поколения (Jaremko et al., 2023).

Данные литературы подтверждают высокую способность этих таксонов к накоплению липидов. В стрессовых условиях содержание общих липидов в биомассе *Tetradasmus* и *Desmodesmus* достигает 20–56% и 36–58% соответственно; при этом доля целевых ТАГ у *Desmodesmus* может составлять до 64–78% от общего пула липидов (Ismagulova et al., 2018; Pan et al., 2011; Oliveira et al., 2021; do Carmo Cesário et al., 2022). Липидная фракция *Coelastrella* и *Dictyosphaerium* также обладает значительным потенциалом (до 18% и выше) и характеризуется профилем жирных кислот, благоприятным для производства биодизеля, а в частности, высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, вклю-

чая мононенасыщенные (МНЖК) и полиненасыщенные (ПНЖК) (Jiang et al., 2018; Thepsuthammarat et al., 2023; Boutarfa et al., 2022; Nayana et al., 2025). Таким образом, сочетание высокой продуктивности по липидам и оптимального жирнокислотного состава обосновывает возможность использования данных микроводорослей в качестве альтернативного сырья для биодизеля (Borah et al., 2018).

Помимо значимости для биоэнергетики, микроводоросли родов *Coelastrella*, *Tetradasmus* и *Desmodesmus* представляют интерес как источники биологически активных соединений для фармацевтики и производства функциональных продуктов питания (Oliveira et al., 2022; Akgül and Kösel, 2023). Ключевым преимуществом этих таксонов является их способность синтезировать полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК), в особенности соединения омега-3 ряда. Согласно опубликованным данным, содержание ПНЖК у *Desmodesmus* может достигать 54–72% от суммы жирных кислот (Akgül and Kösel, 2023; Shin et al., 2025), а у *Coelastrella* – до 45–65% (Goecke et al., 2020; Minyuk et al., 2017; Boutarfa et al., 2022); при этом отдельные штаммы рассматриваются как перспективные продуценты

α-линоленовой кислоты (Goecke et al., 2020; Maltsev et al., 2021). Вариабельность жирнокислотного профиля, обусловленная видовой принадлежностью и условиями культивирования, позволяет целенаправленно получать липидные фракции с заданными свойствами – от обогащённых МНЖК до высоконасыщенных ценными ПНЖК (Oliveira et al., 2021; Boutarfa et al., 2022), что расширяет спектр их промышленного применения.

Изученные микроводоросли характеризуются выраженным антиоксидантным потенциалом, что расширяет спектр их применения в пищевой промышленности, фармацевтике и аквакультуре. В частности, *Tetrademus obliquus* отличается высоким содержанием фенольных соединений, флавоноидов и каротиноидов (do Carmo Cesário et al., 2022). Особый интерес представляют виды рода *Coelastrella*: они способны ко вторичному каротиногенезу и накоплению астаксантина – ценного пигмента с иммуномодулирующими, кардиопротекторными и нейрорепараторными свойствами (Maltsev et al., 2021; Minyuk et al., 2017; Ismagulova et al., 2018; Chekanov, 2023). Способность активно синтезировать астаксантин экспериментально подтверждена для многих видов, включая *C. terrestris*, *C. aeroterrestrica* и *C. thermophila* var. *globulina* (Chekanov, 2023; Goecke et al., 2020). При этом использование двухстадийных схем культивирования (на примере *C. rubescens*) позволяет добиться технологически значимой продуктивности по данному пигменту (Chubchikova et al., 2010; Minyuk et al., 2017).

Помимо биотехнологической ценности, микроводоросли указанных четырёх родов перспективны для применения в биоремедиации. Эффективные механизмы биосорбции и детоксикации позволяют им накапливать значительные количества тяжёлых металлов, пестицидов и остатков фармацевтических препаратов, что это даёт возможность использовать их как для очистки, так и для мониторинга загрязнённых экосистем (Luo et al., 2016; Alwaleed et al., 2025; Onyancha et al., 2022). Эффективность такого подхода подтверждена при фиторемедиации сточных вод, в том числе сельскохозяйственных и промышленных (Baldanta et al., 2025; Ogbonna et al., 2021).

5. Заключение

В рамках реализации проекта по созданию биоресурсной коллекции каротиногенных микроводорослей крымского региона из экстремальных биотопов различной природы в западной и юго-восточной частях Крыма были выделены пять новых штаммов зелёных водорослей. Их видовая принадлежность была определена на основе интегративного подхода. Полученные штаммы являются новыми для коллекции ФИЦ ИнБЮМ видами, впервые изолированными из альгофлоры Крыма. Они принадлежат к родам *Coelastrella*, *Tetrademus*, *Desmodesmus* и *Dictyosphaerium*, представляя собой ценный биологический ресурс. Для всесторонней оценки их биотехнологического потенциала необ-

ходимо проведение ряда исследований, включающих уточнение эволюционных связей изучаемых штаммов, физиологические исследования механизмов регуляции внутриклеточного метаболизма в ответ на комплексное воздействие стрессовых факторов окружающей среды. Важным направлением является разработка экономически эффективных методов культивирования, в том числе создание специализированных протоколов для направленного накопления биомассы и целевых метаболитов. Создаваемая коллекция живых культур выступает в качестве экспериментальной базы для проведения комплексных исследований и служит инструментом сохранения видового разнообразия. Она закладывает фундамент для развития новой хозяйственной отрасли в Крыму – промышленного культивирования каротиногенных микроводорослей. Это направление имеет значительный потенциал для производства биологически активных кормовых и пищевых добавок, косметики и технических липидов, что открывает широкие перспективы практического применения полученных результатов.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российским научным фондом, грант № 24-26-20121 «Создание биоресурсной коллекции каротиногенных водорослей крымского региона» (№ гос. регистрации 124102900026-9) и в рамках государственного задания «Комплексное исследование механизмов функционирования морских биотехнологических комплексов с целью получения биологически активных веществ из гидробионтов» (№124022400152-1).

Авторы выражают искреннюю благодарность коллективу Карадагской научной станции за организацию экспедиции, а также В.В. Губанову (м.н.с. отдела ихтиологии, ФИЦ ИнБЮМ) за определение солёности воды.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конкурирующих интересов.

Список литературы

- Андреева В.М. 1998. Почвенные и аэрофильные зелёные водоросли (Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales). Санкт-Петербург: Наука.
- Данцюк Н.В., Челебиева Э.С., Минюк Г.С. 2021. Рабочая коллекция живых культур каротиногенных микроводорослей Института биологии южных морей имени А. О. Ковалевского. Морской биологический журнал 6(4): 3–18. DOI: [10.21072/mbj.2021.06.4.01](https://doi.org/10.21072/mbj.2021.06.4.01)
- Дворецкий Д.С., Темнов М.С., Маркин И.В. и др. 2022. Вопросы разработки эффективной биотехнологии синтеза ценных компонентов из биомассы микроводорослей. Теоретические основы химической технологии 56(4): 418. DOI: [10.31857/S0040357122040029](https://doi.org/10.31857/S0040357122040029)
- Мокросноп В.М., Золотарёва Е.К. 2012. Влияние фунгицидов на рост культуры микроводоросли *Euglena gracilis* Klebs (Euglenophyta). Альгология 22(4): 337–344.

- Рылькова О.А., Боровков А.Б., Ханайченко А.Н. и др. 2023. Особенности пробоподготовки образцов монадных форм микроводорослей для сканирующей электронной микроскопии. Биоразнообразие и устойчивое развитие 8(4): 62–74. DOI: [10.21072/eco.2023.28.05](https://doi.org/10.21072/eco.2023.28.05)
- Рябушко В.И., Щуров С.В., Ковригина Н.П. и др. 2021. Гидролого-гидрохимические и гидробиологические исследования озера Донузлав (Западный Крым, Чёрное море) по результатам экспедиций 2018 года. Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон моря 2: 80–93. DOI: [10.22449/2413-5577-2021-2-80-93](https://doi.org/10.22449/2413-5577-2021-2-80-93)
- Темралева А.Д., Синетова М.А. 2023. Коллекции микроводорослей и цианобактерий в России: современное состояние, проблемы и перспективы развития. Микробиология 92(5): 429–440. DOI: [10.31857/S0026365623600232](https://doi.org/10.31857/S0026365623600232)
- Темралева А.Д., Минчева Е.В., Букин Ю.С. и др. 2014. Современные методы выделения, культивирования и идентификации зелёных водорослей (Chlorophyta). Кострома: Костромской печатный дом.
- Царенко П.М. 1990. Краткий определитель хлорококковых водорослей Украинской ССР. Киев: Наукова думка.
- Чубчикова И.Н., Дробецкая И.В., Данцюк Н.В. и др. 2022. Оптимизация метода фиксации пресноводных микроводорослей (Scenedesmaceae, 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)
- Akgül F., Kösel S. 2023. Phenotypic plasticity, growth, biochemical composition, total phenolic content, and antioxidant activity of microalga *Desmodesmus multivariabilis* under different nitrogen and phosphorus concentrations. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly 37(4): 273–288. DOI: [10.15255/CABEQ.2023.2199](https://doi.org/10.15255/CABEQ.2023.2199)
- Alwaleed E.A., Galal H.R.M., Aboueldahab M. et al. 2025. Maximizing lipid accumulation in *Tetradismus obliquus* under heavy metal stress for sustainable biodiesel innovation. BMC biotechnology 25(1): 20. DOI: [10.1186/s12896-025-00951-z](https://doi.org/10.1186/s12896-025-00951-z)
- Ancona-Canché K., López-Adrián S., Espinosa-Aguilar M. et al. 2017. Molecular phylogeny and morphologic data of strains of the genus *Coelastrella*. Botanical Sciences 95: 527–537. DOI: [10.17129/BOTSCI.1201](https://doi.org/10.17129/BOTSCI.1201)
- Baldanta S., Ferreira A., Marco Vinuesa A.V. et al. 2025. A solar panel-origin microalga, *Coelastrella thermophila* D14, with high potential for wastewater biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology 109: 246. DOI: [10.1007/s00253-025-13618-8](https://doi.org/10.1007/s00253-025-13618-8)
- Bischoff H.W., Bold H.C. 1963. Some soil algae from enchanted rock and related algal species. In: Phycological Studies IV. 6318: 1–95. USA: University of Texas.
- Bock C. 2010. Genetic diversity and polyphyletic origin of the *Dictyosphaerium morphotype*. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.), Institut für Biologie/Zoologie der Freien Universität, Berlin. DOI: [10.17169/refubium-15273](https://doi.org/10.17169/refubium-15273)
- Borah N., Venkatesh H.N., Sudharshana T.N. et al. 2018. Isolation and utilization of *Dictyosphaerium ehrenbergianum* Nageli for biodiesel production: lipid extraction and biodiesel property analysis. Biofuels 11(8): 885–892. DOI: [10.1080/17597269.2018.1432270](https://doi.org/10.1080/17597269.2018.1432270)
- Boutarfa S., Senoussi M.M., Gonzalez-Silvera D. et al. 2022. The Green Microalga *Coelastrella thermophila* var. *globulina* (Scenedesmaceae, Chlorophyta) isolated from an Algerian hot spring as a potential source of fatty acids. Life 12(4): 560. DOI: [10.3390/life12040560](https://doi.org/10.3390/life12040560)
- 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)
- Cho H.S., Lee J.M. 2024. Taxonomic reinvestigation of the genus *Tetradismus* (Scenedesmaceae; Sphaeropleales) based on morphological characteristics and chloroplast genomes. Frontiers in Plant Science 15: 1303175. DOI: [10.3389/fpls.2024.1303175](https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1303175)
- Chubchikova I.N., Minyuk G.S., Drobetskaya I.V. 2010. Secondary carotenogenesis in green microalgae *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. under natural insolation and temperature. Ekologiya Morya 81: 77–81.
- Debnath T., Bandyopadhyay T.K., Vanitha K. et al. 2024. Astaxanthin from microalgae: A review on structure, biosynthesis, production strategies and application. Food Research International 176: 113841. DOI: [10.1016/j.foodres.2023.113841](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113841)
- Demura M., Noma S., Hayashi N. 2021. Species and fatty acid diversity of *Desmodesmus* (Chlorophyta) in a local Japanese area and identification of new docosaheptaenoic acid-producing species. Biomass 1: 105–118. DOI: [10.3390/biomass1020008](https://doi.org/10.3390/biomass1020008)
- do Carmo Cesário C., Soares J., Cossolin J.F.S. et al. 2022. Biochemical and morphological characterization of freshwater microalga *Tetradismus obliquus* (Chlorophyta: Chlorophyceae). Protoplasma 259(4): 937–948. DOI: [10.1007/s00709-021-01712-3](https://doi.org/10.1007/s00709-021-01712-3)
- Elseyed M., Eraky M., Faisal S. et al. 2024. Phycochemicals. In: Abomohra A., Ende S. (eds.), Value-added products from algae. Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG Springer, pp. 71–95. DOI: [10.1007/978-3-031-42026-9_4](https://doi.org/10.1007/978-3-031-42026-9_4)
- Ende S., Abomohra A. 2024. Opening the Algal Gateway. In: Abomohra A., Ende S. (eds.) Value-added Products from Algae. Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG Springer, pp. 1–9. DOI: [10.1007/978-3-031-42026-9_1](https://doi.org/10.1007/978-3-031-42026-9_1)
- Glibert P.M. 2024. Endosymbiosis and Evolution. In: Phytoplankton Whispering: An Introduction to the Physiology and Ecology of Microalgae. Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG Springer, pp. 213–227. DOI: [10.1007/978-3-031-53897-1_10](https://doi.org/10.1007/978-3-031-53897-1_10)
- Goecke F., Noda J., Paliocha M. et al. 2020. Revision of *Coelastrella* (Scenedesmaceae, Chlorophyta) and first register of this green coccoid microalga for continental Norway. World Journal of Microbiology and Biotechnology 36(10): 149. DOI: [10.1007/s11274-020-02897-0](https://doi.org/10.1007/s11274-020-02897-0)
- Gorelova O.A., Baulina O.I., Solovchenko A.E. et al. 2015. Similarity and diversity of the *Desmodesmus* spp. microalgae isolated from associations with White Sea invertebrates. Protoplasma 252: 489–503. DOI: [10.1007/s00709-014-0694-0](https://doi.org/10.1007/s00709-014-0694-0)
- Guiry M.D., Guiry G.M. 2026. AlgaeBase. World-Wide Electronic Publication, University of Galway. URL: <https://www.algaebase.org/search/species/> (accessed: 02.02.2026).
- Hildebrand M., Abbriano R.M., Polle J.E. et al. 2013. Metabolic and cellular organization in evolutionarily diverse microalgae as related to biofuels production. Current opinion in chemical biology 17(3): 506–514. DOI: [10.1016/j.cbpa.2013.02.027](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.02.027)
- 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)
- Huang D., Yu Q., Long J. et al. 2025. Nitrogen source determines the growth and morphology of *Tetradismus obliquus* by concentration-dependent pattern. Journal of Applied Phycology 37: 2259–2270. DOI: [10.1007/s10811-025-03533-w](https://doi.org/10.1007/s10811-025-03533-w)
- Ismagulova T., Chekanov K., Gorelova O. et al. 2018. A new subarctic strain of *Tetradismus obliquus* – Part I: Identification and fatty acid profiling. Journal of Applied Phycology 30: 2737–2750. DOI: [10.1007/s10811-017-1313-1](https://doi.org/10.1007/s10811-017-1313-1)
- Jaremko M., Tomar S., Agarwal S. et al. 2023. Microalgae:

A promising source for biofuel production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 53: 102877. DOI: [10.1016/j.BCAB.2023.102877](https://doi.org/10.1016/j.BCAB.2023.102877)

Jiang Y., Pu X., Zheng D. et al. 2018. Cultivation of lipid-producing microalgae in struvite-precipitated liquid digestate for biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels* 11: 101. DOI: [10.1186/s13068-018-1102-3](https://doi.org/10.1186/s13068-018-1102-3)

Kan Y., Pan J. 2010. A one-shot solution to bacterial and fungal contamination in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* culture by using an antibiotic cocktail. *Journal of Phycology* 46(6): 1356–1358. DOI: [10.1111/j.1529-8817.2010.00904.x](https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2010.00904.x)

Katoh K., Toh H. 2010. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics* 26(15): 1899–1900. DOI: [10.1093/bioinformatics/btq224](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq224)

Kim G.M., Chang W.S., Kim Y.K. 2022. Biocomposites using whole or valuable component-extracted microalgae blended with polymers: A review. *Catalysts* 12(1): 25. DOI: [10.3390/catal12010025](https://doi.org/10.3390/catal12010025)

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16(2):111–120.

Komárek J., Fott B. 1983. Chlorophyceae (Grünalgen) Ordnung: Chlorococcales. In: *Das Phytoplankton des Süßwassers* (Band XVI, 6. Teil. Die Binnengewässer). (Huber-Pestalozzi, G. Eds). Stuttgart: E. Schweizerbart.

Krivina E., Sinetova M., Starikov A. et al. 2025. Testing the effectiveness of DNA barcoding markers and species delimitation methods within the genus *Coelastrella* (Sphaeropleales, Chlorophyta), with a description of *Coelastrella polaris* sp. nov. isolated from Arctic soils. *Curr Microbiol* 82: 311. DOI: [10.1007/s00284-025-04293-z](https://doi.org/10.1007/s00284-025-04293-z)

Krivina E., Sinetova M., Zadneprovskaya E. et al. 2024. The genus *Coelastrella* (Chlorophyceae, Chlorophyta): molecular species delimitation, biotechnological potential, and description of a new species *Coelastrella affinis* sp. nov., based on an integrative taxonomic approach. *Antonie van Leeuwenhoek* 117(1): 113. DOI: [10.1007/s10482-024-02008-1](https://doi.org/10.1007/s10482-024-02008-1)

Kurpan D., Cardeiras R., Bagnoud-Velásquez M. et al. 2025. Isolation, characterization, and maintenance of native Swiss microalgae for biotechnological prospection. *Scientific Reports* 15: 25573. DOI: [10.1038/s41598-025-10989-w](https://doi.org/10.1038/s41598-025-10989-w)

Lourenço S. 2020. Microalgae culture collections, strain maintenance, and propagation (Chapter 3). In: *Handbook of microalgae-based processes and products: Fundamentals and advances in energy, food, feed, fertilizer, and bioactive compounds*. Academic Press, pp. 49–84. DOI: [10.1016/B978-0-12-818536-0.00003-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818536-0.00003-8)

Luo L., He H., Yang C. et al. 2016. Nutrient removal and lipid production by *Coelastrella* sp. in anaerobically and aerobically treated swine wastewater. *Bioresource Technology* 216: 135–141. DOI: [10.1016/j.biortech.2016.05.059](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.059)

Maltsev Y., Krivova Z., Maltseva S. et al. 2021. Lipid accumulation by *Coelastrella multistriata* (Scenedesmaceae, Sphaeropleales) during nitrogen and phosphorus starvation. *Scientific Reports* 11(1): 19818. DOI: [10.1038/s41598-021-99376-9](https://doi.org/10.1038/s41598-021-99376-9)

Minyuk G., Chelebieva E., Chubchikova I. et al. 2017. Stress-induced secondary carotenogenesis in *Coelastrella 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)

Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y. et al. 2008. Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* 24(16): 1757–1764. DOI: [10.1093/bioinformatics/btn322](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn322)

Nayana K., Sudhakar M.P., Arunkumar K. 2025. Biorefinery potential of *Coelastrella* biomass for fuel and

bioproducts – a review. *Biomass Conversion and Biorefinery* 15: 29613–29626. DOI: [10.1007/s13399-022-02519-9](https://doi.org/10.1007/s13399-022-02519-9)

Ogbonna I.O., Ikwebe J., Okpozu O.O. et al. 2021. Potential of *Dictyosphaerium* sp. LC172264: Concomitant remediation of cassava wastewater and accumulation of lipids for biodiesel production. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 12(8): 257–274. DOI: [10.4236/abb.2021.128016](https://doi.org/10.4236/abb.2021.128016)

Oliveira C.Y.B., Jacob A., Nader C. et al. 2022. An overview on microalgae as renewable resources for meeting sustainable development goals. *Journal of Environmental Management* 320: 115897. DOI: [10.1016/j.jenvman.2022.115897](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.115897)

Oliveira C.Y.B., Oliveira C.D.L., Prasad R. et al. 2021. A multidisciplinary review of *Tetrademus obliquus*: A microalga suitable for large-scale biomass production and emerging environmental applications. *Reviews in Aquaculture* 13: 1594–1618. DOI: [10.1111/raq.12536](https://doi.org/10.1111/raq.12536)

Onyancha F.M., Haneklaus N.H., Brink H.G. 2022. Cultivation of *Desmodesmus multivariabilis* for the treatment of cosmetic wastewater. *Sustainability* 14(23): 15665. DOI: [10.3390/su142315665](https://doi.org/10.3390/su142315665)

Pan Y.-Y., Wang S.-T., Chuang L.-T. et al. 2011. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. *Bioresource Technology* 102: 10510–10517. DOI: [10.1016/j.biortech.2011.08.091](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.08.091)

Proeschold T., Darienko T. 2020. The green puzzle *Stichococcus* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta): New generic and species concept among this widely distributed genus. *Phytotaxa* 441(2): 113–142. DOI: [10.11646/phytotaxa.441.2.2](https://doi.org/10.11646/phytotaxa.441.2.2)

Santos B., Freitas F., Sobral A.J.F.N. et al. 2025. Microalgae and circular economy: Unlocking waste to resource pathways for sustainable development. *International Journal of Sustainable Engineering* 18(1): 2501488. DOI: [10.1080/19397038.2025.2501488](https://doi.org/10.1080/19397038.2025.2501488)

Scoculi de Lira G., Severo I.A., Ferraz F.A. et al. 2025. Multiparametric evaluation of *Tetrademus obliquus* biomass: An integrated approach including antioxidant, nutritional, and energy properties. *Microorganisms* 13: 1583. DOI: [10.3390/microorganisms13071583](https://doi.org/10.3390/microorganisms13071583)

Shadrin N.V., Simonov V.G., Anufrieva E.V. et al. 2018. Anthropogenic transformation of Kyzyl-Yar Lake in Crimea: Multiyear research findings. *Arid Ecosystems* 8: 299–306. DOI: [10.1134/S2079096118040091](https://doi.org/10.1134/S2079096118040091)

Shin Y.-S., Do J.-M., Noh H.-S. et al. 2025. Exploring the potential of *Desmodesmus* sp. KNUA231 for bioenergy and biofertilizer applications and its adaptability to environmental stress. *Applied Sciences* 15: 5097. DOI: [10.3390/app15095097](https://doi.org/10.3390/app15095097)

Silva B.L., de Souza F.O., João J.J. et al. 2025. Algae-Filled Polypropylene: How Particle Size of *Nannochloropsis oculata* Biomass Affects Composite Properties. *Polymer Engineering & Science* 65(12): 6812–6822. DOI: [10.1002/pen.70166](https://doi.org/10.1002/pen.70166)

Solovchenko A., Minyuk G. 2021. The physiology of astaxanthin production by carotenogenic microalgae. In: Ravishanker G.A., Ranga Rao A. (eds.), *Global perspectives on astaxanthin: From industrial production to food, health, and pharmaceutical applications* (Chapter 2). Academic Press, pp. 19–35. DOI: [10.1016/B978-0-12-823304-7.00026-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823304-7.00026-X)

Suchard M.A., Lemey P., Baele G. et al. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution* 4(1): vey016. DOI: [10.1093/ve/vey016](https://doi.org/10.1093/ve/vey016)

Tamura K., Stecher G., Kumar S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. 2021. *Molecular Biology and Evolution* 38: 3022–3027. DOI: [10.1093/molbev/msab120](https://doi.org/10.1093/molbev/msab120)

Temraleeva A.D., Bukin Y.S. 2022. Morphology, molecular phylogeny, and species delimitation within microalgal genera *Eubrownia*, *Spongiococcum*, and *Chlorococcum* (Chlorophyceae,

Chlorophyta). *South African Journal of Botany* 151: 396–409. DOI: [10.1016/j.sajb.2022.10.030](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.10.030)

Thepsuthammarat K., Reungsang A., Plangklang P. 2023. *Coelastrella* sp. cultivation on unhydrolyzed molasses-based medium towards the optimization of conditions for growth and biomass production under mixotrophic cultivation. *Molecules* 28: 3603. DOI: [10.3390/molecules28083603](https://doi.org/10.3390/molecules28083603)

Trifinopoulos J., Nguyen L.-T., von Haeseler et al A.. 2016. W-IQ-TREE: A fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research* 44(1): W232–W235. DOI: [10.1093/nar/gkw256](https://doi.org/10.1093/nar/gkw256)

Ünüvar Ö.C., Ünlü E.S. 2022. De Novo Assembly and Annotation of Microalga *Tetrademus obliquus* Transcriptome. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 22(11): TRJFAS21341. DOI: [10.4194/TRJFAS21341](https://doi.org/10.4194/TRJFAS21341)

Wang Q., Song H., Liu X. et al. 2019. Morphology and molecular phylogeny of coccoid green algae *Coelastrella* sensu lato (Scenedesmaceae, Sphaeropleales), including the description of three new species and two new varieties. *Journal of Phycology* 55: 1290–1305.

White T.J., Bruns T., Lee S. et al. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press Inc, pp. 315–322. DOI: [10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1)

Xu Y., Chen X., Melkonian M. et al. 2024. Comparative chloroplast genome analysis of two *Desmodesmus* species reveals genome diversity within Scenedesmaceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae) *Protist* 175(6): 126073. DOI: [10.1016/j.protis.2024.126073](https://doi.org/10.1016/j.protis.2024.126073)

Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. et al. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7(1–2): 203–214. DOI: [10.1089/10665270050081478](https://doi.org/10.1089/10665270050081478)

Zhu X., Wang Z., Sun Y. et al. 2020. Surfactants at environmentally relevant concentrations interfere the inducible defense of *Scenedesmus obliquus* and the implications for ecological risk assessment. *Environmental pollution* (Barking, Essex: 1987) 261: 114131. DOI: [10.1016/j.envpol.2020.114131](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114131)