

МИКРОБИОЛОГИЯ

Научная статья

УДК 579.68

EDN RYVIXZ

doi: 10.17072/1994-9952-2024-4-412-420



Влияние психротолерантных метилотрофных бактерий на рост, пигментный состав и накопление белка и углеводов у микроводоросли *Chlorella vulgaris*

Дмитрий Юрьевич Шаравин^{1✉}, Полина Геннадьевна Беляева²,
Екатерина Михайловна Цещинская³, Валентина Владимировна Галямина⁴

^{1–4} Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

^{1✉} dima-sharavin@yandex.ru

² belyaeva@psu.ru

³ reutskix@mail.ru

⁴ galhamina_v@mail.ru

Аннотация. Изучено влияние шести психротолерантных метилотрофных бактерий, выделенных из образцов мохово-лишайниковой растительности и водных объектов на территории Антарктических оазисов и горных районов республики Алтай на рост, пигментный состав и накопление белка и углеводов в культуре зелёной микроводоросли *Chlorella vulgaris* при температурах +10 и +20°C. Стандартные графики роста хлореллы без бактериальной суспензии при +20 и +10°C выходили на плато на 5–6 и 9 сутки соответственно, достигая 30 и 16×10⁶ кл/мл. Установлено, что пять из шести психротолерантных штаммов при совместном культивировании с хлореллой при температуре +10°C на численность хлореллы, содержание пигментов и концентрацию белка влияния не оказывали. Положительное воздействие выявлено только для xPrг3, в частности на содержание углеводов. Также обнаружен негативный эффект Бел19 на численность хлореллы и содержание пигментов при +10°C. При культивировании хлореллы со штаммами бактерий при температуре +20°C выявлено увеличение численности водорослей с xPrг3, концентрации хлорофилла *a* с Бел19 (119% от контроля), углеводов с изолятом xPrг17 и содержания внутриклеточного белка хлореллы с Ал5, Бел19, Бел62 и xPrг17.

Ключевые слова: *Chlorella vulgaris*, метилотрофы, пигменты, белки, углеводы, холодовой стресс

Для цитирования: Влияние психротолерантных метилотрофных бактерий на рост, пигментный состав и накопление белка и углеводов у микроводоросли *Chlorella vulgaris* / Д. Ю. Шаравин, П. Г. Беляева, Е. М. Цещинская, В. В. Галямина // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2024. Вып. 4. С. 412–420. <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-412-420>.

Благодарности: работа выполнена в рамках Государственного задания № 124020500028-4.

MICROBIOLOGY

Original article

The effect of psychrotolerant methylotrophic bacteria on the growth, pigment content and accumulation of protein and carbohydrates in the microalgae *Chlorella vulgaris*

Dmitry Y. Sharavin^{1✉}, Polina G. Belyaeva², Ekaterina M. Tseshchinskaya³,
Valentina V. Galyamina⁴

^{1–4} Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russia

^{1✉} dima-sharavin@yandex.ru

² belyaeva@psu.ru

³ reutskix@mail.ru

⁴ galhamina_v@mail.ru

Abstract. The study is devoted to the effect of six psychrotolerant methylotrophic bacteria isolated from samples of moss-lichen community and water bodies, collected at the territory of Antarctic oases and mountainous region of the Altai republic on the growth, pigment content and accumulation of protein and carbohydrates

by the green microalgae *Chlorella vulgaris* at temperatures of +10°C and +20°C. Standard growth curves of chlorella without bacterial suspension at +20°C and +10°C reached the stationary growth phase on days 5-6 and 9, respectively, reaching 30 and 16×10⁶ cells/ml. It was found that five of the six psychrotolerant strains had no effect on the number of chlorella cells, pigment content and protein concentration when co-cultured with microalgae at the temperature of +10°C. A positive effect was found only for xPrg3, in particularly on the carbohydrate concentration. A negative effect of Bel19 on the cell number and pigment content at +10°C was also found. Inoculation of chlorella under the temperature of +20°C with same bacterial strains lead to increase in: cell number with the strain xPrg3, chlorophyll *a* with Bel19 (119% of the control), carbohydrates with the isolate xPrg17 and intracellular protein content with Al5, Bel19, Bel62 and xPrg17.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, methylotrophs, pigments, proteins, carbohydrates, cold stress

For citation: Sharavin D. Y., Belyaeva P. G., Tseshchinskaya E. M., Galyamina V. V. [The effect of psychrotolerant methylotrophic bacteria on the growth, pigment content and accumulation of protein and carbohydrates in the microalgae *Chlorella vulgaris*]. *Bulletin of the Perm University. Biology*. Iss. 4 (2024): pp. 412-420. (In Russ.). <http://dx.doi.org/10.17072/1994-9952-2024-4-412-420>.

Acknowledgments: the work was supported by the Russian Science Foundation, Grant No. 124020500028-4.

Введение

Криосфера представляет интерес как долгосрочное хранилище микробного разнообразия планеты, где доминируют различные виды холодоустойчивых микроорганизмов [Priscu, Christner, 2004; Miteva, 2008; Sajjad et al., 2020]. Психрофильные и психротолерантные бактерии способны синтезировать широкий спектр пигментов, экзополисахаридов, уникальные ферменты холодового шока и другие полимеры для защиты от воздействий окружающей среды [Hoover, Pikuta, 2010; Sajjad et al., 2020]. Предполагается, что психротолерантные и психрофильные микроорганизмы как составная часть растительно-микробных ассоциаций могут эффективно стимулировать рост и продуктивность сельскохозяйственных растений в условиях холодного климата [Balcazar et al., 2015].

Растения являются глобальным продуцентом C₁-соединений, а аэробные метилотрофные бактерии часто ассоциированы с ними и могут заселять поверхность листьев, присутствуя в семенах и ризосфере многих растений, поставляя растению-симбионту фитогормоны (ауксины, цитокинины), витамины и другие биологически активные вещества [Kutschera, 2007; Madhaiyan et al., 2007; Delmotte et al., 2009]. Ввиду того, что источником метанола могут служить не только наземные растения, но и водоросли, можно сделать вывод о глобальном распространении фитосимбиоза метилотрофных бактерий на поверхности планеты [Mincer, Aicher, 2016].

Зелёная микроводоросль *Chlorella vulgaris* наиболее интенсивно используется для биологической очистки сточных вод, получения зелёной биомассы, в качестве кормовой и пищевой добавки, в медицинской и парфюмерной промышленности. Биомасса хлореллы может служить источником разнообразных высокомолекулярных соединений: белков, жиров, углеводов, органических кислот, витаминов и т.д. Бактериальное микроокружение хлореллы (фикосфера) играет существенную роль в продуктивности экосистем и совместно с ассоциированными бактериями может использоваться в целях биоремедиации и производстве зелёной водорослевой биомассы [Wirth et al., 2020].

Несмотря на интерес со стороны исследователей к бактериям, ассоциированным с представителями рода *Chlorella*, есть единичные работы, где метилотрофные бактерии рассматривались как симбионты хлореллы и микроводорослей в целом. Поэтому, особенно актуально в этой связи использование экстремофильных, в частности психрофильных метилотрофов для снижения негативного воздействия низких температур на хлореллу.

Цель работы – изучить возможность использования холодоустойчивых метилотрофов, выделенных из Антарктики и горных районов, для стимулирования роста и увеличения содержания пигментов и метаболитов *Chlorella vulgaris* при пониженных температурах.

Материалы и методы

Объектом исследований служил штамм *Chlorella vulgaris* IMBR-19 (получен из Института морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН) без бактериального загрязнения, поддерживаемый в стерильных условиях при оптимальной для данного штамма температуре +28°C (точность поддержания температуры ±0.1°C) на жидкой среде BG-11, с освещённостью около 6500 Лк и чередованием световых и темновых фаз 12ч/12ч [Rogers et al., 2020]. Колбы, содержащие микроводоросли, встряхивали вручную два раза в день.

Для выделения холодоустойчивых культур метилотрофов использовали образцы воды из водотоков, альгобактериальных матов и биообрастаний, почв, мха и лишайников, отобранные в ходе полевых работ 65-й Российской антарктической экспедиции и в горных районах республики Алтай. Для получения изо-

лятов метилотрофных бактерий использовали модифицированную среду «К» [Sharavin, Belyaeva, 2024]. Для выделения и культивирования метиловых бактерий, обладающих альтернативной метанолдегидрогеназой, вместо $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ добавляли смесь $\text{LaCl}_3 \times 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Ce}_2(\text{SO}_4)_3 \times 4\text{H}_2\text{O}$ до концентрации 30 μM каждого. Культивирование метилотрофов осуществляли при $+10^\circ\text{C}$. Оптическую плотность культур измеряли при длине волны 590 нм на спектрофотометре (Cary 100, Agilent Technologies). Бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 6 000 об/мин, осадок ресуспендировали в физрастворе. Влияние 6 штаммов метиловых бактерий (список штаммов представлен в таблице) на рост зелёной водоросли *Chlorella* оценивали в процессе их совместного культивирования в стеклянных ёмкостях объёмом 25 мл при температурах $+10^\circ\text{C}$ и $+20^\circ\text{C}$. Засевная доза хлореллы содержала $1.5\text{--}1.6 \times 10^6$ кл./мл. Начальная pH культуральной среды составляла 7.0. Оптимальная температура роста для большинства из используемых в данной работе культур бактерий составляла $+20^\circ\text{C}$.

Список использованных в работе культур бактерий [List of bacterial cultures]

Штамм	Источник выделения	Координаты точки отбора	Оптимальная температура роста культуры, $^\circ\text{C}$
Ал1	Вода с эпилимнионом из горного озера (Алтай)	49°52.6649' СШ 86°34.3694' ВД	20
Ал5	Обрастания на камнях, р. Кучерла (Алтай)	49°54.1298' СШ 86°24.9902' ВД	20
Бел19	Вода из руч. Станционный, вытекающего из оз. Китеж	62° 11,869' ЮШ 58° 57,777' ЗД	20
Бел62	Накипной лишайник (р-н ст. Беллинсгаузен, о. Кинг-Джордж)	62° 12.713' ЮШ 59° 00.374' ЗД	20
xПрг3	Мхи и водоросли на солнечной стороне скал (р-н ст. Прогресс, Холмы Ларсеманн)	69° 22.975' ЮШ 76° 23.252' ВД	20
xПрг17	Отложения чёрного цвета на дне озера (р-н ст. Прогресс, Холмы Ларсеманн)	69° 23.200' ЮШ 76° 22.538' ВД	12

Соотношение стартовых концентраций клеток бактерий и водорослей (при засевах) составляло 1:1. Подсчёт численности клеток хлореллы проводили в камере Горяева на микроскопе ZEISS Axiostar Plus (Германия) [Dvoretzky et al., 2017]. Эксперименты проведены в трёх биологических повторностях.

Определение пигментов микроводорослей производили в карбиноловых экстрактах на 14-е сутки культивирования. Аликвоты культур осаждали центрифугированием и отмывали от культуральной жидкости дистиллированной водой. Осаждённые клетки хлореллы разрушали при помощи ручного гомогенизатора. Затем в гомогенат добавляли холодный ацетон «хч» (80%), содержимое встряхивали и помещали в темноту на 12 часов при 4°C . После этого центрифугировали при 6 000 об/мин 10 мин. Надосадочную жидкость, которая представляла собой вытяжку пигментов, переносили в кварцевую кювету и спектрофотометрировали на Cary 100 (Agilent Technologies, США) при длинах волн, соответствующих максимуму абсорбции пигментов (663 нм – хлорофилл *a*, 645 нм – хлорофилл *b*, 470 нм – каротиноиды и 750 нм – поправка на неспецифическую абсорбцию и рассеяние света экстрактом). Концентрацию (мкг/мл) исследуемых пигментов – хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов – в клетках хлореллы определяли по формулам Н.К. Lichtenthaler [1987].

Количественную оценку внутриклеточного белка в разрушенных при помощи ручного гомогенизатора клетках осуществляли методом Бредфорда с использованием красителя Кумасси бриллиантовый синий G-250 (100 мг) при длине волны 595 нм [Bradford, 1976].

Общее содержание углеводов определяли по методу Герберта с антроновым реактивом при длине волны 625 нм. Концентрацию углеводов в пробах высчитывали по калибровочной кривой стандартных растворов глюкозы [Herbert, Phipps, Strange, 1971].

Полученные результаты обработаны статистически с использованием программы Statistica 6.0 по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Согласно графику роста хлореллы (рис. 1), полученному опытным путём, через 2 дня культивирования количество клеток при $+20^\circ\text{C}$ достигало 11×10^6 кл./мл, в то время как при $+10^\circ\text{C}$ – не превышало 5×10^6 кл./мл. К пятым суткам плотность культур составляла 30 и 7×10^6 кл./мл при $+20$ и $+10^\circ\text{C}$ соответственно. Кривые роста выходили на плато на 5–6 сутки при $+20^\circ\text{C}$ и на 9 сутки при $+10^\circ\text{C}$ (до 16×10^6 кл./мл).

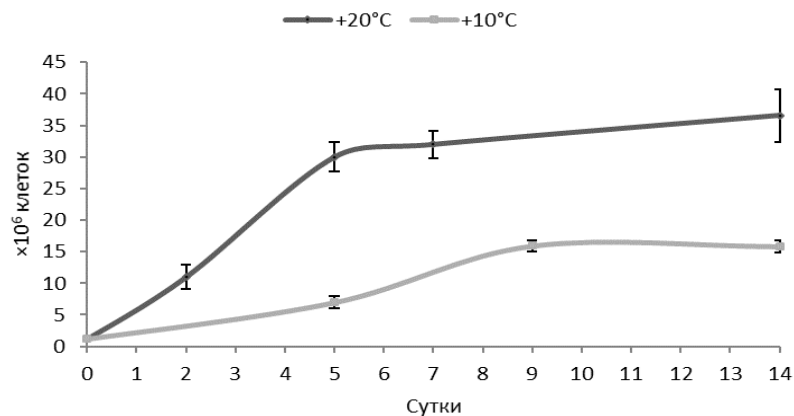


Рис. 1. Стандартный график роста хлореллы при +10°C и +20°C
 [Standard chlorella growth curve at +10°C and +20°C]

При совместном культивировании хлореллы с тестируемыми штаммами метилотрофных бактерий стимулирующего влияния бактерий на численность микроводорослей при температуре +10°C на 7 и 14 сутки не выявлено (рис. 2). Более того, эффект штамма Бел19 был негативный. При температуре инкубации +20°C заметный положительный эффект на рост хлореллы оказал хПрг3 на 14е сутки (126% от контроля) (рис. 3). Остальные варианты опыта при +20°C не имели существенных отличий от контроля.

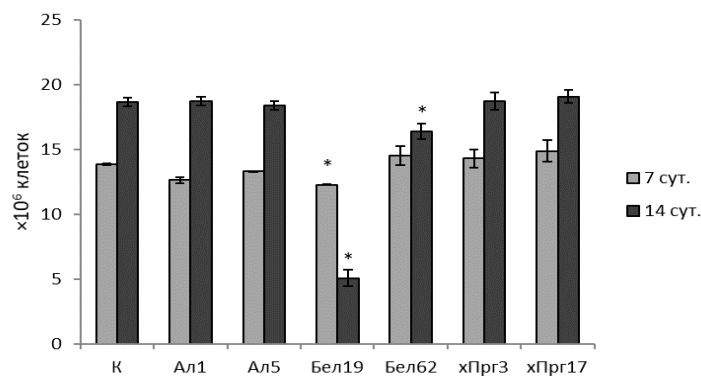


Рис. 2. Численность хлореллы на 7 и 14 сутки при инокулировании с культурами бактерий при +10°C
 [The number of chlorella cells inoculated with bacterial cultures at +10°C on day 7 and 14]

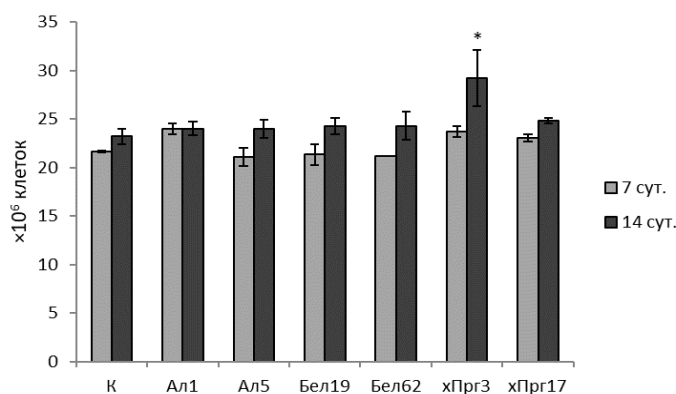


Рис. 3. Численность хлореллы на 7 и 14 сутки при инокулировании с культурами бактерий при +20°C
 [The number of chlorella cells inoculated with bacterial cultures at +20°C on day 7 and 14]

На содержание пигментов микроводоросли при +10°C метилотрофные бактерии значимого положительного воздействия также не оказали. За исключением хлорофилла *a* у хПрг3 (3.13 мкг/мл), опытные варианты либо находились на уровне контрольных значений (К – 3.00 мкг/мл; хПрг17 – 2.98 мкг/мл),

либо имели более низкую концентрацию (рис. 4). Ранее, при +10°C, нами было выявлено стимулирующее влияние штамма хПрг3 как на численность, так и на содержание пигментов хлореллы [Шаравин и др., 2023].

В текущем эксперименте обнаружено негативное воздействие Бел19 как на содержание пигментов при +10°C, так и на численность клеток хлореллы. Однако при +20°C данный штамм оказал стимулирующее влияние на содержание хлорофилла *a*, превысив контроль на 19% (рис. 5), при этом численность соответствовала контрольным значениям (рис. 3). Количество каротиноидов при +20°C в эксперименте со штаммами Ал1, хПрг3 и хПрг17 на 14 сутки выше контрольных в среднем в 1.7 раза, что может быть связано со старением культуры водоросли.

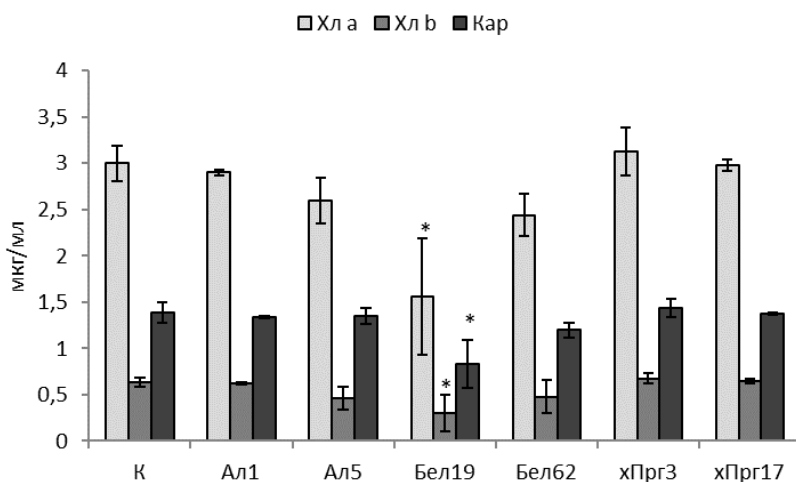


Рис. 4. Содержание пигментов, на 14 сутки (+10°C)
[Pigment content, within 14 days (+10°C)]

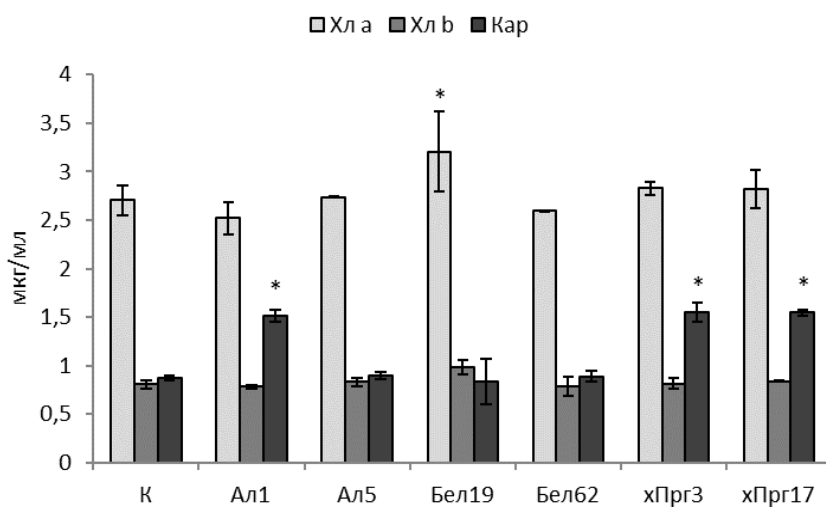


Рис. 5. Содержание пигментов, на 14 сутки (+20°C)
[Pigment content, within 14 days (+20°C)]

Эксперимент по совместному культивированию психротолерантных метилотрофов с хлореллой при +10 и +20°C выявил положительное влияние двух штаммов (хПрг3 на 16% при +10°C и хПрг17 на 37% при +20°C относительно контролей) на содержание углеводов в хлорелле (рис. 6). Концентрация углеводов в хлорелле в опытах при +10°C с Ал5, Бел19 и Бел62 не могла быть достоверно измерена из-за сильного развития бактериальных культур и невозможности полного разделения компонентов.

Данные по синтезу углеводов при воздействии низких температур, исходя из ряда источников – весьма противоречивы. Согласно [Lindberg et al., 2022], концентрация некоторых сахаров в *Ch. vulgaris* может существенно увеличиваться при пониженной (+5°C) температуре, по сравнению со значениями при +22°C. Однако показано, что при увеличении температуры роста относительно оптимальной (на 7–12°C), также может воз-

растать содержание углеводов [Dai et al., 2022]. Некоторые представители рода *Chlorella* склонны выделять растворимые сахара в культуральную среду с увеличением температуры, в то время как содержание внутриклеточных растворимых сахаров не изменялось с колебаниями температуры [Cao et al., 2016].

На содержание внутриклеточного белка хлореллы в опытах при температуре +20°C выявлено положительное воздействие Ал5, Бел19, Бел62 и хПрг17 (120, 144, 111 и 136% относительно контроля соответственно). При инокулировании хлореллы штаммами Ал1 и хПрг3 при температуре +10°C на 14-е сутки зафиксировано снижение количества белка в культуре микроводоросли относительно контроля (рис. 7). Как и в случае с углеводами, данные по внутриклеточным белкам хлореллы при +10°C с Ал5, Бел19 и Бел62 получить не удалось по вышеуказанной причине. В литературе показано, что *Chlorella* sp.-Arg накапливает белки, а также липиды при низких температурах (менее +15°C) [Cao et al., 2016]. Также отмечено, что разные штаммы хлореллы могут синтезировать большее количество белка как при повышенных, так и при пониженных (5–10°C) температурах [Cao et al., 2016; Idenyi et al., 2021]. В нашем случае используется относительно теплолюбивый штамм хлореллы и для него температура +10°C, исходя из графика роста (см. рис. 1), является существенным фактором, замедляющим рост культуры. При этом метилотрофные бактерии, продолжая своё развитие, вероятно, начинали подавлять микроводоросли, находясь в ограниченном объёме.

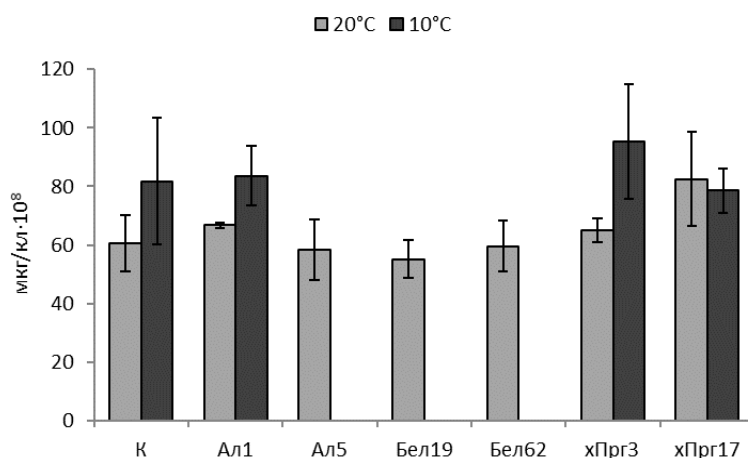


Рис. 6. Концентрация углеводов в культуре *Chlorella* с бактериями на 14 сутки при +20°C и +10°C [Carbohydrate concentration in *Chlorella* culture with bacteria on day 14 at +20°C and +10°C]

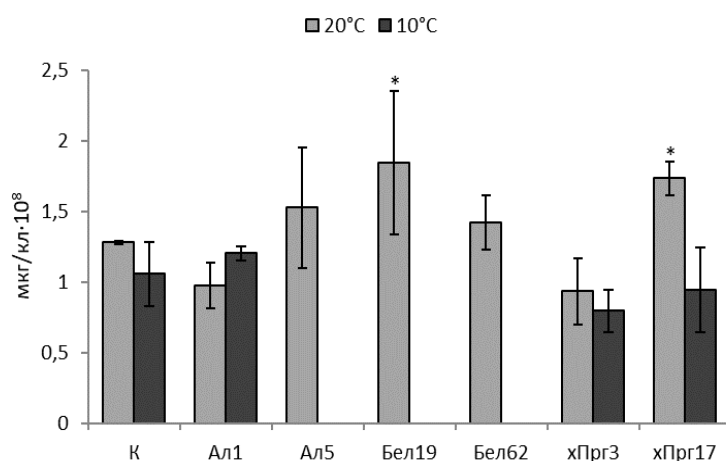


Рис. 7. Концентрация белка в культуре *Chlorella* с бактериями на 14 сутки при +20°C и +10°C [Protein concentration in *Chlorella* culture with bacteria on day 14 at +20°C and +10°C]

В литературе можно встретить работы по изучению влияния психрофильного бактериального микроокружения холодоустойчивых микроводорослей, но не используемых в биотехнологии штаммов хлореллы. Упоминания метилотрофных компонент таких сообществ единичны, а данные о положительном влиянии психрофилов на морфологические и биохимические показатели представителей рода *Chlorella* не отличаются стабильностью.

Заключение

В результате проведённого исследования явного стимулирующего влияния психротолерантных метилотрофных бактерий на численность, содержание пигментов и концентрацию белка хлореллы при температуре +10°C не выявлено, но при этом обнаружено положительное влияние на содержание углеводов в хлорелле при культивировании с хПрг3 (116% от контроля).

Более значимое воздействие оказали используемые штаммы бактерий при сокультивировании с хлореллой при температуре +20°C. Заметный положительный эффект на численность культуры водоросли оказал только штамм хПрг3 (126% от контроля), на содержание пигментов, в частности хлорофилла *a* – Бел19 (119% от контроля), на содержание углеводов относительно контроля хПрг17 (137% от контроля). На содержание внутриклеточного белка хлореллы выявлено положительное воздействие с Ал5, Бел19, Бел62 и хПрг17 (120, 144, 111 и 136% от контроля соответственно).

Для использования психротолерантных метилотрофов стимуляции роста *Chlorella vulgaris* при пониженных температурах необходимы дальнейшие исследования по подбору оптимальных соотношений численности бактерий и водорослей для достижения устойчивого положительного эффекта.

Список источников

1. Шаравин Д.Ю. и др. Влияние психротолерантных метилотрофных бактерий на рост и концентрацию пигментов микроводоросли *Chlorella vulgaris* // Развитие современных систем земледелия и животноводства, обеспечивающих экологическую безопасность окружающей среды: материалы Всерос. науч. конф. Пермь, 2023. С. 398-404.
2. Balcazar W. et al. Bioprospecting glacial ice for plant growth promoting bacteria // Microbiol. Res. 2015. Vol. 177. P. 1–7. DOI: 10.1016/j.micres.2015.05.001.
3. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. 1976. Vol. 72. P. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
4. Cao K. et al. The eurythermal adaptivity and temperature tolerance of a newly isolated psychrotolerant Arctic *Chlorella* sp. // J. Appl. Phycol. 2016. Vol. 28. P. 877–888. DOI: 10.1007/s10811-015-0627-0.
5. Dai Y.R. et al. Thermal-tolerant potential of ordinary *Chlorella pyrenoidosa* and the promotion of cell harvesting by heterotrophic cultivation at high temperature // Front. Bioeng. Biotechnol. 2022. Vol. 10. Art. 1072942. DOI: 10.3389/fbioe.2022.1072942.
6. Delmotte N. et al. Community proteogenomics reveals insights into physiology of phyllosphere bacteria // PNAS. 2009. Vol. 106, № 38. P. 16428–16433. DOI: 10.1073/pnas.0905240106.
7. Dvoretzky D. et al. The effect of the complex processing of microalgae *Chlorella vulgaris* on the intensification of the lipid extraction process // Chem. Eng. Trans. 2017. Vol. 57. P. 721–726. DOI: 10.3303/CET1757121.
8. Herbert D., Phipps P.J., Strange R.E. Chapter III. Chemical analysis of microbial cells // Methods in microbiology / eds. J.R. Norris, D.W. Ribbons. 1971. Vol. 5. P. 209–344.
9. Hoover R.B., Pikuta E.V. Psychrophilic and psychrotolerant microbial extremophiles in polar environments. CRS Press, 2010. P. 1–42. URL: <https://ntrs.nasa.gov/api/citations/20100002095/downloads/20100002095.pdf>.
10. Idenyi J.N. et al. Characterization of strains of *Chlorella* from Abakaliki, Nigeria, for the production of high-value products under variable temperatures // J. Appl. Phycol. 2021. Vol. 33. P. 275–285. DOI: 10.1007/s10811-020-02313-y.
11. Kutschera U. Plant-associated methylobacteria as co-evolved phytosymbionts // Plant Signaling & Behavior. 2007. Vol. 2, № 2. P. 74–78. DOI: 10.4161/psb.2.2.4073.
12. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Methods Enzymol. 1987. Vol. 148. P. 350–382. doi: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
13. Lindberg A. et al. Cold stress stimulates algae to produce value-added compounds // Biores. Technol. Rep. 2022. Vol. 19. Art. 101145. DOI: 10.1016/j.biteb.2022.101145.
14. Madhaiyan M. et al. *Methylobacterium oryzae* sp. nov., an aerobic pink-pigmented, facultatively methylotrophic, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing bacterium isolated from rice // IJSEM. 2007. Vol. 57. P. 326–331. DOI: 10.1099/ijms.0.64603-0.
15. Mincer T.J., Aicher A.C. Methanol production by a broad phylogenetic array of marine phytoplankton // PLoS ONE. 2016. Vol. 11, № 3. Art. e0150820. DOI: 10.1371/journal.pone.0150820.
16. Miteva V.R. Bacteria in Snow and Glacier Ice // Margesin R. et al. Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. 2008. P. 31–50. DOI: 10.1007/978-3-540-74335-4_3.
17. Priscu J.C., Christner B.C. Earth's icy biosphere // Microbial diversity and bioprospecting. ASM Press, 2004. P. 130–145.
18. Rogers T.L. et al. Trophic control changes with season and nutrient loading in lakes // Ecol. Lett. 2020. Vol. 23, № 8. P. 1287–1297. DOI: 10.1111/ele.13532.

19. Sajjad W. et al. Pigment production by cold-adapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications // *Extremophiles*. 2020. Vol. 24. P. 447–473. DOI: 10.1007/s00792-020-01180-2.
20. Sharavin D.Y., Belyaeva P.G. Biotechnological potential of psychrotolerant methylobacteria isolated from biotopes of Antarctic oases // *Arch. Microbiol.* 2024. Vol. 206, № 323. P. 1–16. DOI: 10.1007/s00203-024-04056-7.
21. Wirth R. et al. *Chlorella vulgaris* and its phycosphere in wastewater: Microalgae-bacteria interactions during nutrient removal // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. Vol. 8. Art. 557572. DOI: 10.3389/fbioe.2020.557572.

References

1. Sharavin D.Y., Belyaeva P.G., Tsheshchinskaya E.M., Galyamina V.V. [Influence of psychrotolerant methylotrophic bacteria on the growth and pigment content of microalgae *Chlorella vulgaris*]. *Razvitie sovremennykh sistem zemledelija i životnovodstva, obespečivajuich èkologičeskiju bezopasnost' okružajuščej sredy* [The development of modern farming and animal husbandry systems that ensure environmental safety. Materials of the All-Russian Scientific Conference]. Perm, 2023, pp. 398-404. (In Russ.).
2. Balcazar W., Rondón J., Rengifo M., Ball M.M., Melfo A., Gómez W., Yarzabal L.A. Bioprospecting glacial ice for plant growth promoting bacteria. *Microbiol. Res.* V. 177 (2015): pp. 1–7. DOI: 10.1016/j.micres.2015.05.001.
3. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. V. 72 (1976): pp. 248-254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
4. Cao K., He M., Yang W., Chen B., Luo W., Zou S., Wang C. The eurythermal adaptivity and temperature tolerance of a newly isolated psychrotolerant Arctic *Chlorella* sp. *J. Appl. Phycol.* V. 28 (2016): pp. 877-888. DOI: 10.1007/s10811-015-0627-0.
5. Dai Y.R., Wang D., Zhu Y.R., Yang K.X., Jiao N., Sun Z.L., Wang S.K. Thermal-tolerant potential of ordinary *Chlorella pyrenoidosa* and the promotion of cell harvesting by heterotrophic cultivation at high temperature. *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. 10 (2022). Art. 1072942. DOI: 10.3389/fbioe.2022.1072942.
6. Delmotte N., Knief C., Chaffron S., Innerebner G., Roschitzki B., Schlapbach R., Mering C., Vorholt J.A. Community proteogenomics reveals insights into physiology of phyllosphere bacteria. *PNAS*. V. 106, No. 38 (2009): pp. 16428-16433. DOI: 10.1073/pnas.0905240106.
7. Dvoretzky D., Dvoretzky S., Temnov M., Akulinin E., Zuurro A. The effect of the complex processing of microalgae *Chlorella vulgaris* on the intensification of the lipid extraction process. *Chem. Eng. Trans.* V. 57 (2017): pp. 721-726. DOI: 10.3303/CET1757121.
8. Herbert D., Phipps P.J., Strange R.E. Chapter III Chemical analysis of microbial cells. In: Norris J.R., Ribbons D.W., eds. *Methods in microbiology*. 1971, V. 5, pp. 209-344.
9. Hoover R.B., Pikuta E.V. Psychrophilic and psychrotolerant microbial extremophiles in polar environments. CRS Press, 2010, pp. 1-42. URL: <https://ntrs.nasa.gov/api/citations/20100002095/downloads/20100002095.pdf>.
10. Idenyi J.N., Eya J.C., Ogbonna J.C., Chia M.A., Alam M.A., Ubi B.E. Characterization of strains of *Chlorella* from Abakaliki, Nigeria, for the production of high-value products under variable temperatures. *J. Appl. Phycol.* V. 33 (2021): pp. 275-285. DOI: 10.1007/s10811-020-02313-y.
11. Kutschera U. Plant-associated methylobacteria as co-evolved phytosymbionts. *Plant Signaling & Behavior*. V. 2, No. 2 (2007): pp. 74-78. DOI: 10.4161/psb.2.2.4073.
12. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* V. 148 (1987): pp. 350-382. DOI: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
13. Lindberg A., Niemi C., Takahashi J., Sellstedt A., Gentili F.G. Cold stress stimulates algae to produce value-added compounds. *Biores. Technol. Rep.* V. 19 (2022): 101145. DOI: 10.1016/j.biteb.2022.101145.
14. Madhaiyan M., Kim B.Y., Poonguzhali S., Kwon S.W., Song M.H., Ryu J.H., Go S.J., Koo B.S., Sa T.M. *Methylobacterium oryzae* sp. nov., an aerobic pinc-pigmented, facultatively methylotrophic, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-producing bacterium isolated from rice. *IJSEM*. V. 57 (2007): pp. 326-331. DOI: 10.1099/ijms.0.64603-0.
15. Mincer T.J., Aicher A.C. Methanol production by a broad phylogenetic array of marine phytoplankton. *PLoS ONE*. V. 11, No. 3 (2016). Art. e0150820. DOI:10.1371/journal.pone.0150820.
16. Miteva V.R. Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. In: Margesin et al. (eds.) *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. 2008, pp. 31-50. DOI: 10.1007/978-3-540-74335-4_3.
17. Priscu J.C., Christner B.C. Earth's icy biosphere. In: *Microbial diversity and bioprospecting*, ASM Press, 2004, pp. 130-145.
18. Rogers T.L., Munch S.B., Stewart S.D., Palkovacs E.P., Giron-Nava A., Matsuzaki S.S., Symons C.S. Trophic control changes with season and nutrient loading in lakes. *Ecol. Lett.* V. 23, No. 8 (2020): pp. 1287-1297. DOI: 10.1111/ele.13532.

19. Sajjad W., Din G., Rafiq M., Iqbal A., Khan S., Zada S., Ali B., Kang S. Pigment production by cold-adapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications. *Extremophiles*. V. 24 (2020): pp. 447-473. DOI: 10.1007/s00792-020-01180-2.

20. Sharavin D.Y., Belyaeva P.G. Biotechnological potential of psychrotolerant methylobacteria isolated from biotopes of Antarctic oases. *Arch. Microbiol.* V. 206, No. 323 (2024): 1-16. DOI: 10.1007/s00203-024-04056-7.

31. Wirth R., Pap B., Böjti T., Shetty P., Lakatos G., Bagi Z., Kovács K.L., Maróti G. *Chlorella vulgaris* and its phycosphere in wastewater: Microalgae-bacteria interactions during nutrient removal. *Front. Bioeng. Biotechnol.* V. 8 (2020). Art. 557572. DOI: 10.3389/fbioe.2020.557572.

Статья поступила в редакцию 12.09.2024; одобрена после рецензирования 11.11.2024; принята к публикации 26.11.2024.

The article was submitted 12.09.2024; approved after reviewing 11.11.2024; accepted for publication 26.11.2024.

Информация об авторах

Д. Ю. Шаравин – канд. биол. наук, младший научный сотрудник Лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии;

П. Г. Беляева – д-р биол. наук, старший научный сотрудник Лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии;

Е. М. Цещинская – инженер Лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии;

В. В. Галямина – канд. биол. наук, инженер Лаборатории клеточной иммунологии и нанобиотехнологии.

Information about the authors

D. Y. Sharavin – candidate of biology, junior researcher of the Laboratory of cell immunology and nanobiotechnology;

P. G. Belyaeva – doctor of biology, senior scientist of the Laboratory of cell immunology and nanobiotechnology;

E. M. Tshchinskaya – engineer of the Laboratory of cell immunology and nanobiotechnology;

V. V. Galyamina – candidate of biology, engineer of the Laboratory of cell immunology and nanobiotechnology.

Вклад авторов:

Шаравин Д. Ю. – научное руководство; концепция исследования; написание исходного текста рукописи; итоговые выводы.

Беляева П. Г. – концепция исследования; развитие методологии; итоговые выводы.

Цещинская Е. М. – проведение лабораторных экспериментов.

Галямина В. В. – проведение лабораторных экспериментов.

Contribution of the authors:

Sharavin D. Y. – research supervision; research concept; writing the draft; final conclusions.

Belyaeva P. G. – research concept; methodology development; final conclusions.

Tshchinskaya E. M. – carrying out the experiments.

Galyamina V. V. – carrying out the experiments.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interests.