

ОСОБЕННОСТИ НАКОПЛЕНИЯ И СООТНОШЕНИЯ ПИГМЕНТОВ В КУЛЬТУРЕ *DUNALIELLA SALINA* TEOD. ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ПОВЕРХНОСТНОЙ ОСВЕЩЁННОСТИ

Боровков А.Б., Гудвиллович И.Н.

Институт морских биологических исследований им. А.О. Ковалевского РАН

пр. Нахимова, 2, г. Севастополь, 299011, РФ; e-mail: spirit2000sev@yandex.ru; gudirina2008@yandex.ru

Поступила в редакцию: 02.07.2018.

Аннотация. Исследованы особенности динамики содержания пигментов и их соотношения в накопительной культуре *D. salina* при различной поверхностной освещённости. Показано, что изменение поверхностной освещённости в диапазоне 60-250 Вт/м² оказывает влияние как на содержание хлорофилла *a* и суммарных каротиноидов в культуре *D. salina*, так и на их соотношение. Так, повышение освещённости от 60 до 250 Вт/м² приводит к увеличению соотношения Кар/Хл *a* в 1,4-1,7 раза.

Ключевые слова: *Dunaliella salina*; накопительное культивирование; поверхностная освещённость; хлорофилл *a*; каротиноиды.

Зелёная микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. широко известна как один из наиболее перспективных природных источников β-каротина. Ещё в 60-х годах 20 в. Н.П. Масюк был предложен двухэтапный метод культивирования *D. salina* в открытых бассейнах, в основе которого лежит метод периодических культур, предусматривающий на первом этапе создание условий, способствующих накоплению биомассы микроводоросли, а на втором – инициирующим накоплению β-каротина в её клетках [1]. Известно, что перестройка пигментного аппарата дуналиеллы и переход к накоплению в её клетках β-каротина происходит под действием стрессовых факторов, важнейшим из которых признан световой фактор [1-5]. Однако, этот переходный процесс сопровождается гибелью определённой части клеток культуры, вплоть до её полной гибели. Поэтому большое значение имеет физиологическое состояние культуры на этом этапе; она должна быть подготовлена к воздействию стрессовых факторов. Известно, что одним из показателей физиологического состояния культуры является содержание пигментов и, особенно, их соотношение: так, для успешного перевода культуры на вторую стадию под воздействие стрессовых факторов, доля каротиноидов, пигментов, защищающих клетку от стрессового воздействия света, должна быть увеличена по сравнению с их содержанием в культуре на первой стадии активного роста [4, 6, 7]. Поэтому целью работы было выявить особенности накопления и соотношения пигментов в культуре *D. salina* при переходе от первого ко второму этапу её выращивания.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования – зелёная микроводоросль *Dunaliella salina* Teod. (штамм IMBR-2 из ЦКП "Коллекция гидробионтов Мирового океана" ФГБУН ИМБИ), культуру которой выращивали в стеклянных фотобиореакторах плоскопараллельного типа с рабочей толщиной 5 см. Культуру *D. salina* выращивали в накопительном режиме на модифицированной питательной среде по [5]. Модификация заключалась в добавлении морской соли до 120 г·дм⁻³. Температура при выращивании составляла – 27-29 °С, pH среды – 7-8 единиц. На первом этапе освещённость рабочей поверхности культиваторов составляла 80 Вт/м². После достижения культурой стадии замедления роста, она была разбавлена в 3 раза средой без добавления азота и фосфора и перераспределена в пять культиваторов с поверхностной освещённостью 60, 100, 150, 200 и 250 Вт/м². В процессе выращивания культура снабжалась газо-воздушной смесью с концентрацией углекислоты 3 % по объёму.

Содержание сухого вещества в культуре (СВ) определяли объёмно-весовым [8], а также фотометрическим методом [9]. Количественное определение содержания пигментов проводили спектрофотометрическим методом [9]. Хлорофиллы и каротиноиды экстрагировали из клеток 100% ацетоном. Спектры экстрактов пигментов регистрировали на спектрофотометре СФ-2000 в диапазоне длин волн 400-800 нм с шагом 0,1 нм. Расчет концентраций пигментов проводили по формулам, предложенным [10] по значениям оптической плотности на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения соответствующих пигментов. Рассчитывали средние арифметические (\bar{x}), стандартные отклонения (S), основные ошибки средних, доверительные интервалы для средних ($\pm \Delta \bar{x}$). Все расчёты проводили для уровня значимости $\alpha=0,05$; в таблицах и на графиках представлены средние значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Начальная плотность культуры *D. salina* для всех вариантов эксперимента составляла 0,54-0,58 г СВ/л. За первые 2 суток выращивания плотность культуры выросла, причём прирост биомассы для вариантов с

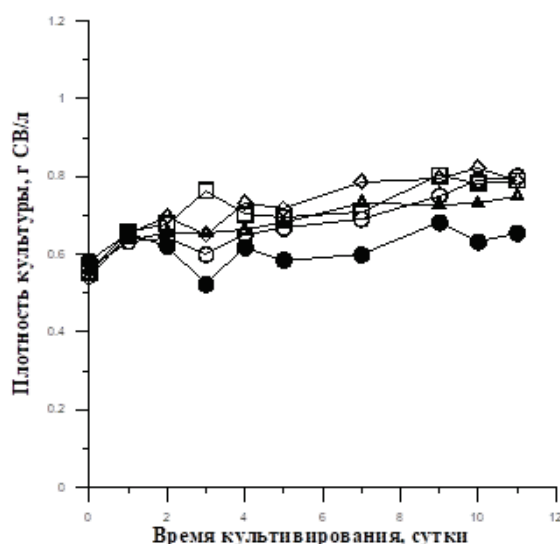


Рисунок 1. Плотность культуры *D. salina* при различной освещённости: ● – 250 Вт/м², ○ – 200 Вт/м², ◇ – 150 Вт/м², ▲ – 100 Вт/м², □ – 60 Вт/м²

освещённостью 150-250 Вт/м² был незначительным и составил, в среднем, около 10 % (0,04-0,07 г СВ/л). Для вариантов эксперимента с более низкой освещённостью (60 и 100 Вт/м²) этот показатель был выше в 2 раза (0,1-0,13 г СВ/л) (рис. 1).

Следует отметить, что при разбавлении культуры использовали среду без добавления минеральных солей азота и фосфора, поэтому прирост культуры определялся остаточным количеством биогенов в маточной культуре. Свет является важнейшим фактором, определяющим продукционные свойства культур микроводорослей, которые являются фототрофными организмами. Зависимость жизнедеятельности водорослей, в частности, фотосинтеза от освещённости может выражаться как в лимитировании, так и в ингибировании их роста [4, 5], что по-видимому и наблюдалось в эксперименте с увеличением поверхностной освещённости. Наиболее неблагоприятные условия для культуры *D. salina* были в варианте с максимальной освещённостью, где за 5 суток общий прирост плотности культуры оказался нулевым. Таким образом, созданные условия обеспечили нахождение культуры на стадии замедления роста и стационарной, а резкое повышение освещённости было необходимым условием перестройки пигментного аппарата, поскольку ведущим фактором каротиногенеза *D. salina* признан световой на фоне дефицита минерального обеспечения [1, 2, 5].

Небольшой рост плотности культуры *D. salina* в первые сутки для всех вариантов эксперимента сопровождался увеличением содержания Хл *a* (на 25-35 %), а содержание суммарных Кар при этом значительно не изменилось (рис. 2).

На 5-е сутки содержание Хл *a* в культуре уменьшилось, причём, максимальное снижение по сравнению с первоначальным (на 35-40 %) отмечено для вариантов с освещённостью 150-250 Вт/м². Следует отметить, что на всех этапах эксперимента прослеживалась зависимость содержания Хл *a* в культуре от поверхностной освещённости: с увеличением последней – концентрация пигмента понижалась. Что касается суммарных Кар, то их содержание в культуре было более стабильным и чёткой зависимости от освещённости выявить не удалось.

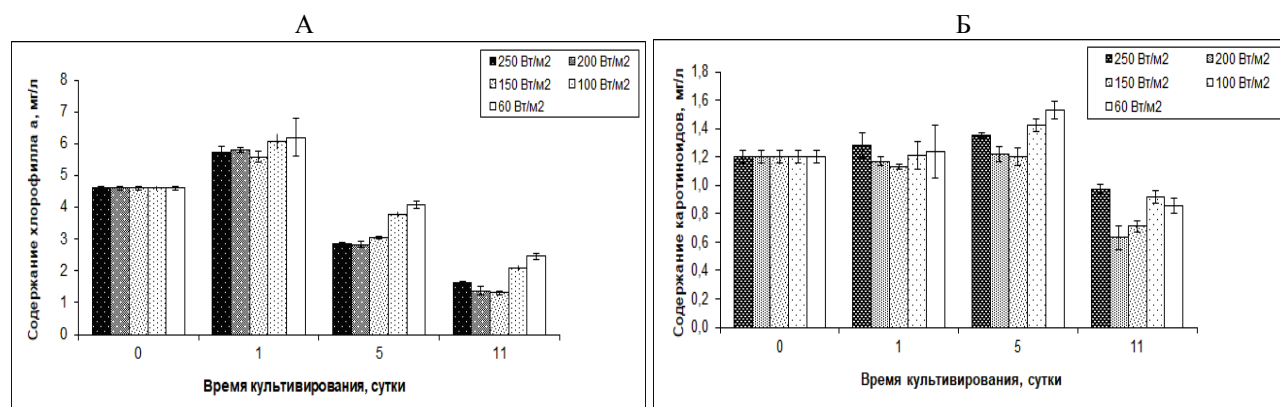


Рисунок 2. Содержание хлорофилла *a* (А) и суммарных каротиноидов (Б) в культуре *D. salina* при различной поверхностной освещённости

Таблица 1. Соотношение Кар/Хл а в культуре *D. salina* при различной поверхностной освещённости

Время выращивания, сут	Соотношение Кар/Хл а				
	250 Вт/м ²	200 Вт/м ²	150 Вт/м ²	100 Вт/м ²	60 Вт/м ²
0	0,26				
1	0,22	0,22	0,21	0,19	0,20
5	0,48	0,45	0,42	0,38	0,35
11	0,60	0,50	0,52	0,46	0,36

В процессе эксперимента изменялось не только содержание пигментов в культуре *D. salina*, но и их соотношение. Так, к 11-м суткам эксперимента значение соотношения Кар/Хл а увеличилось для всех вариантов. Наибольший рост соотношения Кар/Хл а (в 2,3 раза) отмечен для варианта с максимальной поверхностной освещённостью, а наименьший (в 1,4 раза) – при 60 Вт/м² (табл. 1).

Следует отметить, что на изменение соотношения Кар/Хл а в культуре *D. salina* также оказывала влияние величина поверхностной освещённости: так с её повышением от 60 до 250 Вт/м² соотношение Кар/Хл а увеличивалось в 1,4 и в 1,7 раза на 5-е и 11-е сутки соответственно.

Таким образом стационарная стадия роста культуры *D. salina* характеризовалась уменьшением содержания Хл а (в 1.9-2.0 раза по сравнению с первоначальным уровнем) и более стабильным содержанием суммарных Кар в культуре. Показано, что увеличение поверхностной освещённости от 60 до 250 Вт/м² на стационарной фазе выращивания *D. salina* оказывало разнонаправленное действие на содержание Хл а в культуре и соотношение Кар/Хл а: так, рост освещённости вызывал характерное для реакции водорослей на стрессовое воздействие увеличение соотношения Кар/Хл а (в 1,4-1,7 раза). Это свидетельствует об адаптации культуры *D. salina* к изменившемуся уровню освещённости и подготовке к переходу на стадию каротиногенеза.

Работа выполнена в рамках темы Госзадания ФГБУН ИМБИ АААА-А18-118021350003-6.

Список литературы / References:

1. Масюк Н.П. *Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода Dunaliella Teod.* Киев: Наук. думка, 1973, 487 с. [Masjuk N.P. *Morphologija, sistematika, ekologija, geographicheskoe rasprostranenie roda Dunaliella Teod.* Kiev: Nauk. dumka, 1973, 487 p. (In Russ.)]
2. Боровков А.Б., Гудвилевич И.Н. Аprobация двухстадийного выращивания *Dunaliella salina* Teod. в полупромышленных условиях. *Вопросы современной альгологии*, 2017, № 1 (13). URL: <http://algology.ru/1155>. [Borovkov A.B., Gudvilovich I.N. The testing of two-stage cultivation of *Dunaliella salina* Teod. in semi-industrial conditions. *Voprosy sovremennoj al'gologii*, 2017, no. 1 (13). URL: <http://algology.ru/1155>. (In Russ.)]
3. Ben-Amotz A. New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for β -carotene production. *J. of Appl. Phycol.*, 1995, vol. 7, pp. 65-68.
4. Lamers P.P., Van de Laak C.C.W., Kaasenbrood P.S. et al. Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*. *Biotechnol. and Bioeng.*, 2010, vol. 106, no. 4, pp. 638-648.
5. Shaish A., Avron M., Ben-Amotz A. Effect of inhibitors on the formation of stereoisomers in the biosynthesis of β -carotene in *Dunaliella bardawil*. *Plant. Cell. Physiol.*, 1990, vol. 31, no. 5, pp. 689-696.
6. Гудвилевич И.Н., Боровков А.Б., Тренкеншу Р.П. Опыт выращивания микроводорослей-продуцентов БАВ в полупромышленных условиях. *«Современные технологии продуктов питания»: сб. науч. статей материалы 2-й Междунар. науч.-практич. конф.* Курск: Юго-Зап. гос. ун-т, ЗАО «Университетская книга», 2015, с. 44-50. [Gudvilovich I.N., Borovkov A.B., Trenkenshu R.P. The experience of growing microalgae-producer BAS in semi-industrial conditions. *«Sovremennie tehnologii produktov pitaniya»: Proceedings of 2-й International Science Practical Conference.* Kursk: ЗАО «Universitetskaja kniga», 2015, pp. 44-50. (In Russ.)]
7. Минюк Г.С., Челебиева Э.С., Чубчикова И.Н. [и др.] Влияние pH и CO₂ на рост и метаболизм микроводоросли *Coelastrrella (Scotiellopsis) rubescens*. *Физиология растений*, 2016, т. 63, № 4, с. 601-614. [Minjuk G.S., Chelebjeva E.S., Chubchikova I.N. et al. The influence pH и CO₂ on growth and metabolism of microalgae *Coelastrrella (Scotiellopsis) rubescens*. *Phiziologija rasteniy*, 2016, vol. 63, no. 4, pp. 601-614. (In Russ.)]
8. Тренкеншу Р.П., Белянин В.Н. Влияние элементов минерального питания на продуктивность водоросли *Platymonas viridis* Rouch. *Биология моря*, 1979, № 51, с. 41-46. [Trenkenshu R.P., Belyanin V.N. The influence of elements of mineral nutrition on productivity of algae *Platymonas viridis* Rouch. *Biologija morja*, 1979, no. 51, pp. 41-46. (In Russ.)]
9. Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф. и др. *Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике.* Киев: Наук. думка, 1975, 247 с. [Sirenko L.A., Sakevich A.I., Osipov L.Ph. [et al.] *Metodi phiziologo-biochimicheskogo issledovanija vodorosley v gidrobiologicheskoy praktike.* Kiev: Nauk. dumka, 1975, 247 p. (In Russ.)]
10. Wellburn A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Phys.*, 1994, vol. 144, pp. 307-313.

SPECIALITY OF PIGMENTS ACCUMULATION AND ITS RATIO IN *DUNALIELLA SALINA* TEOD. CULTURE UNDER DIFFERENT SURFACE IRRADIANCE**Borovkov A.B., Gudvilovich I.N.**

The A.O. Kovalevsky Institute of Marine Biological Research of RAS

Nachimov av., 2, Sevastopol, 299011, Russia; e-mail: spirit2000sev@yandex.ru; gudirina2008@yandex.ru

Abstract. The speciality of pigments accumulation and its ratio in batch culture of *D. salina* under the different level of cultivator's operational surface irradiance were researched. It is experimentally shown, that the variation of cultivator's the irradiance level in the range 60-250 Watt·m⁻² influenced on pigments content and total carotenoids in *D. salina* culture, as well as on its ratio. Thus, surface irradiance increase by a factor of 4,2 (from 60 to 250 Watt·m⁻²) caused 1,4-1,7 times growth of Car/Chl *a* ratio.

Key words: *Dunaliella salina*; batch cultivation; surface irradiance; chlorophyll *a*; carotenoids.