

УДК 581.143 : 58.635

**ИНТЕНСИВНАЯ КУЛЬТУРА DUNALIELLA SALINA TEOD
И НЕКОТОРЫЕ ЕЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ****А. А. АБДУЛЛАЕВ, В. Е. СЕМЕНЕНКО***Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР, Москва*

Показана возможность введения в интенсивную культуру зеленой галофильной водоросли *Dunaliella salina Teod*, что обеспечивает существенную интенсификацию ее роста (прирост числа клеток до 18—20 млн/мл в сутки). Проведено изучение зависимости роста *D. salina* в условиях интенсивной культуры от состава и pH питательной среды, концентрации NaCl, температуры, интенсивности света и сопряженного влияния перечисленных факторов. Показано быстрое истощение среды Артари в условиях интенсивной культуры *D. salina* и разработана концентрированная питательная среда применительно к выращиванию *D. salina* в интенсивной культуре высокой плотности (100 и более млн клеток/мл). Показана возможность квазинепрерывного выращивания культуры *D. salina* с высокой продуктивностью.

Галофильная зеленая водоросль *Dunaliella salina* привлекает к себе внимание большого числа исследователей. Наряду с изучением систематики и экологии рода *Dunaliella*, *Teod*, что наиболее полно рассматривается в недавно появившейся монографии Масюк [1], проводятся исследования физиологии различных представителей данного рода [2—10], особенностей их метаболизма [6, 11—17] и субмикроскопической организации [18, 19]. Интерес этот обусловлен, с одной стороны, особенностями биологии этих организмов, способных развиваться в высококонцентрированных (2—4 М NaCl) солевых растворах, что определяется, очевидно, спецификой организации и функционирования их мембранных систем; с другой стороны, тем, что эти водоросли накапливают в определенных условиях большое количество β -каротина и их рассматривают как возможных продуцентов провитамина А [1, 10, 20, 21].

Физиологические особенности, а также некоторая специфика строения клеток *D. salina*, делают ее интересным модельным объектом для изучения целого ряда теоретических вопросов: 1) проблем солеустойчивости растительных клеток и механизмов осморегуляции; 2) биосинтеза и функциональной роли β -каротина, гиперсинтез которого происходит в клетках *D. salina* как своеобразная адаптивная реакция на экстремальные воздействия; 3) механизмов транспорта ионов и органических веществ через перипласт, который является единственным барьером на пути экзогенных веществ в клетку *D. salina*.

Отсутствие у *D. salina* жесткой целлюлозной оболочки в сочетании с жизнедеятельностью в высококонцентрированных солевых растворах делает ее практически уникальным объектом для препаративного выделения органелл (ядер, хлоропластов и др.) из фотосинтезирующих клеток посредством простых приемов ресуспендирования клеток в физиологические растворы с различной тоничностью и дифференциального центрифугирования. Вместе с тем применяемые для выращивания *D. salina* методы культивирования и получаемая при этом продуктивность — 1—4 млн клеток/мл за 30 дней, т. е. 0,03—0,1 млн клеток/мл в сутки

[1, 6, 10] — слишком мала, что затрудняет не только практическое применение этих водорослей как продуцентов β -каротина, но и проведение исследований, в особенности биохимических.

В связи с этим целью настоящей работы было изучение возможности введения *D. salina* в интенсивную культуру и оптимизация ее роста и фотосинтетической продуктивности, а также исследование в условиях интенсивной культуры зависимости роста от напряженности таких физиологически значимых параметров, как условия углеродного питания, концентрация, состав и рН питательной среды, температура, освещенность и сочетания этих факторов.

МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования использованы четыре альгологически чистых штамма *Dunaliella salina*, *Teod* (штаммы 2, 6, 9 и 10) и *Dunaliella minuta*, *Lerche* (штамм 40), которые были любезно предоставлены нам Н. П. Масюк.

Для выращивания *Dunaliella* в условиях интенсивной культуры применены методы и режимы, которые были разработаны ранее в нашей лаборатории для *Chlorella* [22],

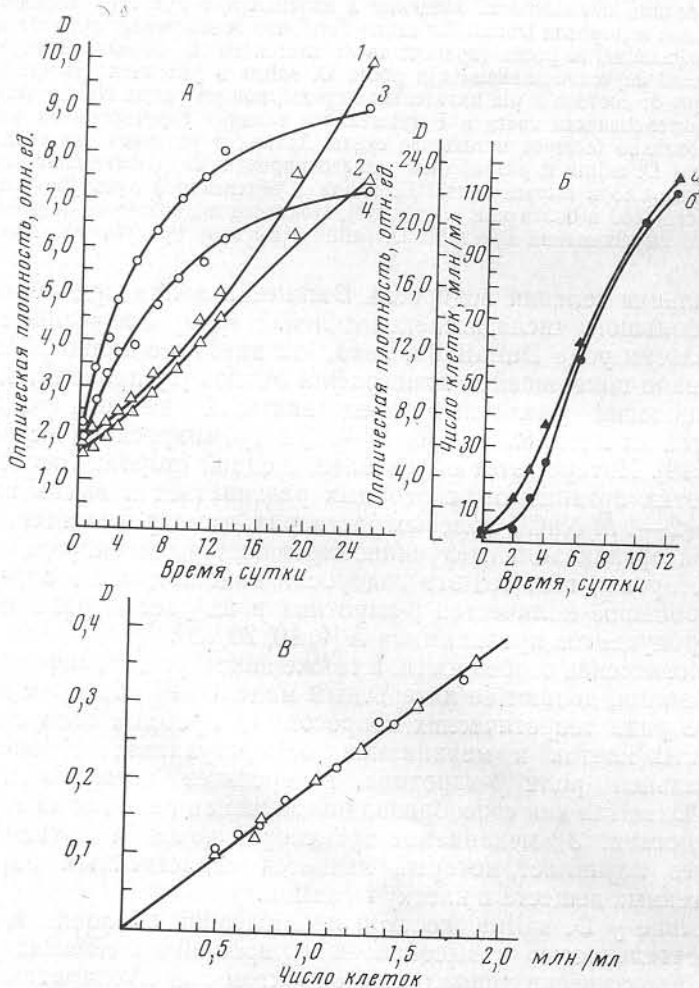


Рис. 1. Зависимость оптических свойств суспензий различных штаммов *Dunaliella salina* от тоничности растворов, применяемых для разведения суспензии и возраста культур
 А, 1—4, Б, а — изменение оптической плотности по ходу роста культуры;
 Б, б — изменение численности клеток; штаммы: 1, 2—2; 3, 4—10; а, б, В —
 9; 1, 3 — разведение водой, 2, 4 — физиологическим раствором. В — зависи-
 мость оптической плотности культуры от численности клеток (результаты
 двух опытов)

23] и оказались пригодными и успешно использовались в дальнейшем для интенсификации роста и фотосинтетической продуктивности *Anacystis nidulans* [24, 25], *Spirulina platensis* [26] и других микроводорослей. Культивирование проводили в стеклянных культуральных сосудах объемом 250 мл при круглосуточном освещении культур люминесцентными лампами (тип ЛБЦ-30 и ЛБ-80, интенсивность света соответственно 40 и 60 тыс. эрг/см²сек) или 6-киловаттной ксеноновой лампой ДКСТВ-6000, которая позволяла вести эксперименты в широком диапазоне освещенностей в пределах от 10 до 400 тыс. эрг/см²сек в зависимости от цели опыта. Культуральные сосуды размещали в кюветы из оргстекла; температура воды в которых автоматически стабилизировалась на заданном уровне с помощью ультрагермостатов. Культуры непрерывно барботировали газовой смесью с 1,7% CO₂. В качестве питательной среды использовали среду Артари и оригинальную питательную среду, состав которой приведен ниже. Культуральные сосуды, питательные среды, систему разводки газовой смеси, увлажнители и бактериальный фильтр стерилизовали автоклавированием.

Световые и температурные кривые роста культур снимали в модернизированной установке УИВ [27] с лампой ДКСТВ-6000 в качестве источника света и термостатированием культур.

Учет скорости роста культур проводили путем прямого счета числа клеток в камере Горяева и нефелометрически — по изменению оптической плотности культуры на проградированном предварительно фотоэлектроколориметре ФЭКМ-56 с зеленым светофильтром. Сложность учета числа клеток *D. salina* при интенсивном ее культивировании, когда плотность культуры за короткое время достигает больших величин, состоит в том, что клетки в культурах разного возраста отличаются разной устойчивостью к осмотическому шоку. Поэтому при разведении водой суспензий в различные фазы роста культуры (что необходимо для измерения числа клеток и оптической плотности) имеет место различная степень набухания и разрушения клеток. Это приводит, как видно из рис. 1, А, к увеличению мутности раствора и завышению данных оптической плотности, которое возрастает по мере старения культуры и имеет различный характер у разных штаммов. Поэтому во всех опытах для разведения суспензий *D. salina* применялась не вода, а изотонический физиологический раствор 2 М NaCl, что давало линейную зависимость (рис. 1, Б) между оптической плотностью и численностью клеток культуры на всех фазах ее роста (рис. 1, В).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость скорости роста и продуктивности различных штаммов *Dunaliella salina* от состава и рН питательной среды в условиях интенсивной культуры. Одной из наиболее широко используемых при культивировании *D. salina* питательных сред является среда Артари [3]. Очень простая по составу (таблица), эта среда содержит наиболее высокие по сравнению с другими средами [1, 6] концентрации биогенных элементов, что является одним из главных требований к условиям интенсивного культивирования микроводорослей [23, 28]. Введение *D. salina* в интенсивную культуру, режим которой обеспечивает оптимальное сочетание физиологически значимых для фотоавтотрофных организмов факторов среды, сразу же обнаружило способность *D. salina* к высоким темпам размножения. Как видно из рис. 2, скорость роста ее в условиях интенсивной культуры (кривые 4—6) в 50—80 раз превышает описанные [1, 6, 9, 20] значения (кривые 1—3). При этом, как видно из кривой 4, культура на среде Артари достаточно быстро достигает плотности порядка 20 млн клеток/мл и выходит на плато, что свидетельствует, очевидно, о быстром истощении среды Артари в условиях интенсивной культуры. Это потребовало создания специальной среды применительно к условиям интен-

Состав питательных сред для культивирования *Dunaliella salina*

Реактивы	Среда Артари, г/л	Оригинальная среда*, г/л
NaCl	116	116
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50	50
KNO ₃	2,5	5
K ₂ HPO ₄	0,2	—
KH ₂ PO ₄	—	1,25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	—	0,009
EDTA	—	0,037
Ca(NO ₃) ₂	Следы	—
Почвенная вытяжка	»	—

* В среду вносится раствор микроэлементов (1 мл на 1 л среды) следующего состава: H₃BO₃—2,86; MnCl₂·4H₂O—1,81; ZnSO₄·7H₂O—0,222 г/л; MoO₃—176,4; NH₄VO₃—229,6 мг/10 л. После приготовления и стерилизации среды pH ее доводится до 7,5 с помощью 0,1 N NaOH.

сивного культивирования *D. salina*. Состав одной из составленных нами питательных смесей приведен в таблице.

Как видно из рис. 2 (кривая 6), рост *D. salina* на этой среде протекает с такой же скоростью, что и на среде Артари в начальный период, однако культура достигает существенно более высоких плотностей без выхода на плато. Составленная среда имеет кислый рН (4,9—5,2), и без его корректировки наблюдается в начальный период роста водорослей значительный лаг-период (кривая 5), который полностью снимается при корректировке рН этой среды до 7,4—7,5 после ее стерилизации с помощью 0,1 N NaOH (кривая 6). При этом различные штаммы (рис. 3, А) имеют различный лаг-период при их инокуляции на среду с кислым начальным рН (5,2) и соответственно различную способность к подщелачиванию среды, что видно из значений конечного рН среды (столбцы на рис. 3, А) после 10 дней культивирования водорослей. В то же время при корректировке исходного рН среды до 7,5 рост всех штаммов *D. salina* происходит (рис. 3, Б) без заметного лаг-периода, давая при двустороннем освещении (40 тыс. эрг/см²сек) ежесуточные приросты порядка 5—6 млн. клеток на 1 мл. Это дает основание рекомендовать составленную среду (с корректировкой исходного рН до 7,5) для условий интенсивного культивирования *D. salina*, и она использовалась во всех дальнейших, в том числе и описанных ниже, экспериментах.

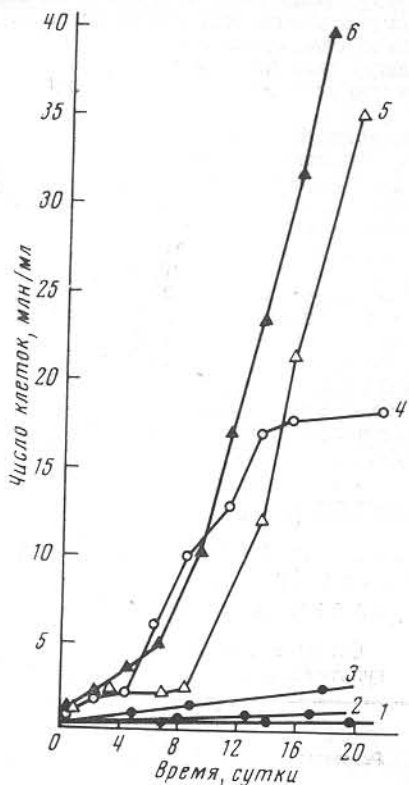


Рис. 2. Сравнительная характеристика скорости роста *D. salina* (штамм 2) в условиях экстенсивной (1—3) и интенсивной (4—6) культуры

1 — по данным Масюк [9]; 2 — Дроковой [20]; 3 — Милько [6]; 4 — рост на среде Артари; 5 — на оригинальной среде без корректировки рН; 6 — то же с корректировкой

в природных условиях и в лабораторной культуре. В условиях лабораторной экстенсивной культуры было показано, что оптимальным для роста *D. salina* является 2 M раствор NaCl. При его более высоких концентрациях наблюдается некоторое угнетение роста, а при 1 и 0,5 M концентрациях — гибель водорослей.

Изучение влияния концентрации хлористого натрия на рост *D. salina* в условиях интенсивной культуры (с применением описанной выше питательной среды) также обнаружило (рис. 4) максимальную скорость роста водорослей при 2 M его концентрации. Вместе с тем, как видно из рис. 4, А (кривая 2) и рис. 4, Б, в этих условиях в отличие от экстенсивной лабораторной культуры, наблюдается достаточно активный рост водорослей при 1 M концентрации NaCl, что, возможно, обусловлено некоторым компенсирующим влиянием «общей солености» разработанной

Зависимость роста *D. salina* в интенсивной культуре от концентрации хлористого натрия. Наиболее специфической особенностью *D. salina* является то, что она может нормально развиваться только в высококонцентрированных солевых растворах, содержащих 11% NaCl, и сохраняет жизнеспособность в 20—25%, т. е. почти насыщенном растворе. Естественно поэтому, что многие исследователи изучали влияние этого фактора на рост *Dunaliella* [1, 10]

питательной среды, содержащей более высокие концентрации биогенных элементов по сравнению со средой Артари.

Зависимость роста интенсивной культуры *D. salina* от температуры. Температурная зависимость роста *D. salina* неоднократно изучалась в условиях лабораторной культуры [1, 4, 6, 7]. Однако, полученные данные относительно температурного оптимума роста даже для одного и того же вида далеко не совпадают у различных

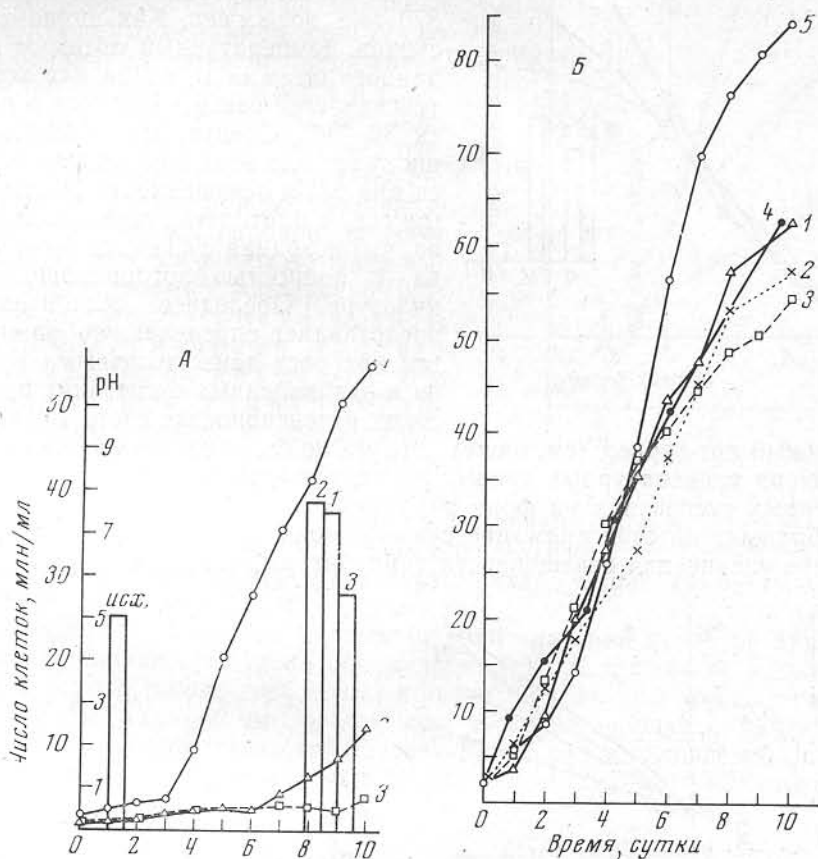


Рис. 3. Сравнительная характеристика роста различных штаммов *Dunaliella* при разных значениях исходного pH питательной среды
 А — исходное pH 4,9—5,2; штаммы 1—6; 2—2; 3—10. Столбцами отмечены значения pH исходного и в конце культивирования каждого штамма.
 Б — исходное pH 7; 1—4 — *D. salina*, Теод. штаммы: 1—6; 2—2; 3—10; 4—9; 5 — *D. minuta* Lerche, штамм 40. Среда — оригинальная, освещение двухстороннее, 40 тыс. эрг см² сек.

исследователей. Так, Джайбор [4] нашел температурный оптимум роста *D. salina* при 30°, Милько [6] — в пределах 20—25°, а Юркова [7] установила одинаковую скорость роста в пределах 20—32°. Поскольку температурный оптимум является параметром, существенным образом зависящим от соотношения напряженностей других факторов среды, и прежде всего от освещенности [27], подобные расхождения обусловлены различием условий, в которых отдельные авторы изучали температурную зависимость роста *Dunaliella* в экстенсивной культуре.

Введение *D. salina* в интенсивную культуру, естественно, делает необходимым снятие температурных кривых роста и определение температурного оптимума на фоне характерного для этих условий выращивания сочетания сопряженно действующих факторов.

На рис. 5, А, Б, В представлена динамика роста *D. salina* (штамм 9) при различных температурах и интенсивностях света. Температурные кривые (рис. 5, Г) построены по величинам прироста числа клеток за 6

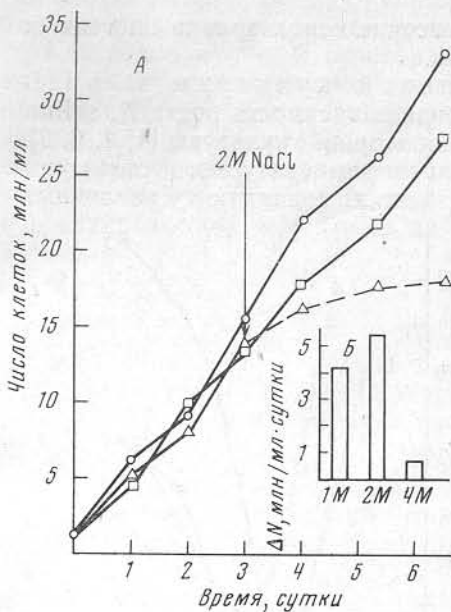


Рис. 4. Влияние различных концентраций NaCl на рост (А) и среднесуточные приросты числа клеток (Б) *D. salina* (штамм 9)

1—1 М NaCl, 2—2 М, 3—4 М. Стрелкой отмечено время дополнительного внесения NaCl в культуру 2 до получения 4М концентрации

сутки культивирования для 60, 160 и 370 тыс. $\text{эрг}/\text{см}^2\text{сек}$. Как видно из рисунков, температурный оптимум роста данного штамма *D. salina* для всех интенсивностей света находится в области $32\text{--}34^\circ$. Следует подчеркнуть, что инокулят для этих опытов выращивался при 28° и освещенности 60 тыс. $\text{эрг}/\text{см}^2\text{сек}$, а плотность засева была близка к полностью поглощающей свет культуре. Последнее обстоятельство представляет определенную важность, так как рост данного штамма *D. salina* в разбавленных суспензиях при высоких интенсивностях света имеет значительный лаг-период (см. ниже). Это могло бы приводить к искажению характера температурных кривых роста культуры при их снятии в разбавленных суспензиях на фоне различных интенсивностей света.

Обращает на себя внимание сужение зоны оптимальных температур по мере увеличения освещенности температуры, что отмечалось ранее

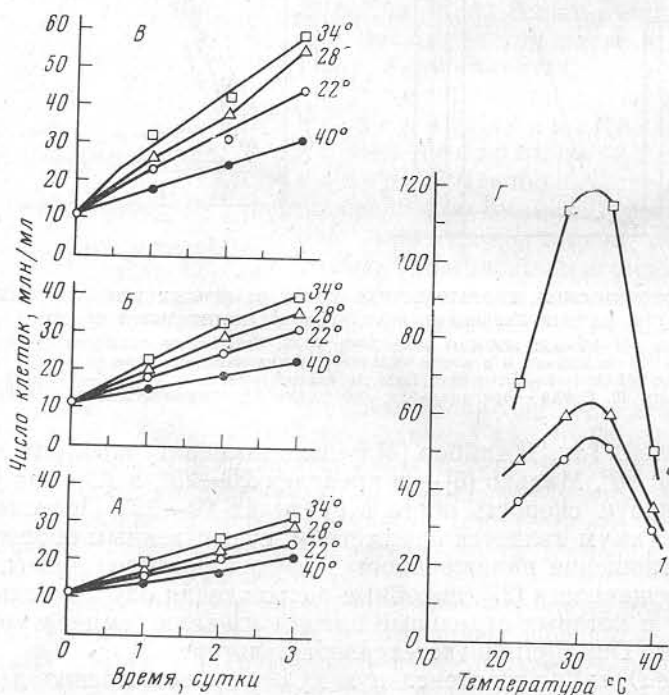


Рис. 5. Зависимость роста *D. salina* (штамм 9) от температуры и интенсивности света

А—В—динамика роста культуры при различных температурах; А—при 60 тыс. $\text{эрг}/\text{см}^2\text{сек}$, Б—при 160 тыс., В—при 370 тыс.; Г—температурные кривые прироста числа клеток за 6 суток при 60 тыс. (1), 160 тыс. (2) и 370 тыс. $\text{эрг}/\text{см}^2\text{сек}$ (3)

Рис. 6. Зависимость динамики роста *D. salina* (штамм 9) от интенсивности света
1—20 тыс., 2—40 тыс., 3—60 тыс. $\text{эрг}/\text{см}^2\text{сек}$

Владимировой и др. [27] для некоторых штаммов хлореллы. В данном случае это видно из сравнения соотношения скоростей роста при оптимальной температуре и, например, при 22° на фоне различных интенсивностей света. Если при 60 тыс. $\text{эрг}/\text{см}^2\text{сек}$ это отношение равно 1,48, то при 370 тыс. $\text{эрг}/\text{см}^2\text{сек}$ —1,77, что свидетельствует, очевидно, о некотором фотоингибировании деления клеток при неблагоприятных температурах. Подобное явление отмечалось для хлореллы на фоне высоких экстремальных температур [29].

Зависимость роста *D. salina* от интенсивности света и сопряженного действия освещенности и температуры. Зависимость роста и фотосинтеза *D. salina* и некоторых других видов *Dunaliella* от интенсивности света изучалась целым рядом авторов в опытах, различающихся по длительности, условиям культивирования и составу питательных сред [1, 6, 8]. Насыщение световых кривых роста культуры найдено в пределах 6—10 тыс. лк и показана ее высокая фотостойчивость.

Выращивание *D. salina* (штамм 9) в интенсивной культуре при различных интенсивностях света обнаружило (рис. 6, кривая 3) значительный лаг-период (около трех суток) в развитии культуры при высоких освещенностях (более 60 тыс. $\text{эрг}/\text{см}^2\text{сек}$) в случае небольших плотностей засева (2 млн/мл, толщина слоя суспензии—3 см) в отличие от низких освещенностей (рис. 6, кривые 1 и 2), когда рост культуры при такой же

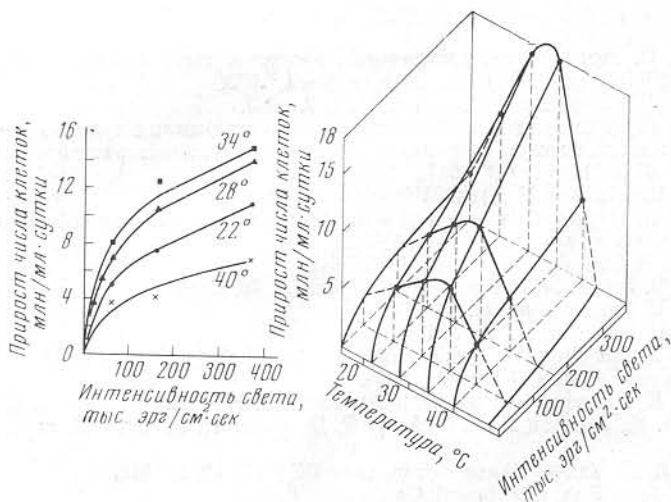
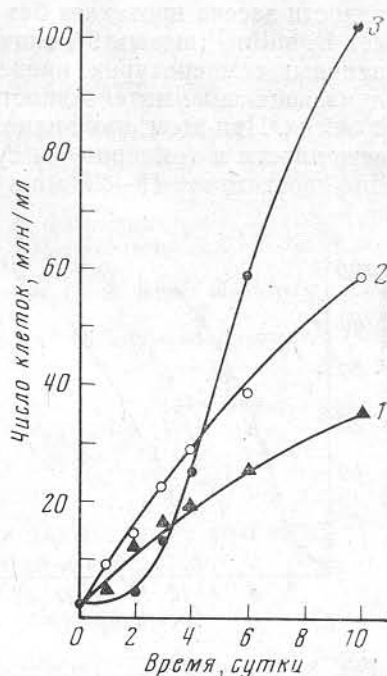


Рис. 7. Зависимость скорости роста *D. salina* (штамм 9) от интенсивности света при различных температурах (А) и сопряженного влияния освещенности и температуры (Б)

плотности засева протекает без заметного лаг-периода. Световые кривые роста *D. salina* (штамм 9), снятые в условиях интенсивной культуры при различных температурах, представленные на рис. 7, А, показывают, что полунасыщающие интенсивности света находятся в области 50—80 тыс. $\text{эрг}/\text{см}^2\text{сек}$. При этом, как видно из рис. 7, Б, при определенном сочетании освещенности и температуры суточные приросты численности клеток *D. salina* достигают 18—20 млн. на 1 мл суспензии, что более чем в 200 раз превышает описанные в литературе продуктивности этой культуры.

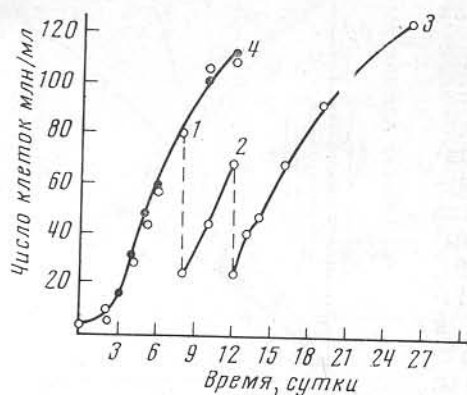


Рис. 8. Сравнительная характеристика роста *D. salina* (штамм 9) в накопительном и квазинепрерывном режиме
1—3 — циклы роста периодически разбавляемой культуры, 4 — контроль

Применение метода периодических разбавлений культуры (квазинепрерывное выращивание) с поддержанием оптической плотности в пределах линейного участка кривой роста показывает (рис. 8) возможность длительного интенсивного культивирования *D. salina* с высокой и стабильной продуктивностью. Следует отметить, что в условиях интенсивной культуры клетки *D. salina* сохранили близкие к описанным в [9] размеры, высокую подвижность, и размножение их происходило в основном посредством вегетативного деления.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о возможности введения в интенсивную культуру галофильной зеленой водоросли *D. salina*, что обеспечивает существенное повышение ее ростовых характеристик и фотосинтетической продуктивности.

В заключение авторы приносят благодарность Н. П. Масюк за предоставленные штаммы *D. salina*, которые были использованы в данной работе, и за интересное обсуждение рассматриваемых в статье вопросов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Масюк Н. П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella Teod.* «Наукова думка», Киев, 1973.
2. Teodoresco E. C. Beih. z. Bot. Centr., 18, 1, 2, 1905.
3. Артари А. П. Исследования над простейшими организмами соленых озер. 1. К вопросу о физиологическом равновесии солей в питательных растворах. М., 1916.
4. Gibor A. Biol. Bull., 111, 617, 1956.
5. Wegmann K., Metzner H. Arch. Microbiol., 78, 1971.
6. Милько Е. С. Изучение физиологии и пигментообразования зеленой водоросли *Dunaliella*. Автореф. канд. дис., МГУ, 1963.
7. Юркова Г. Н. Укр. бот. ж., 22, 51, 1965.
8. Юрина Е. В. Вести. МГУ, сер. 4 (Биол., поч.), 6, 76, 1966.
9. Масюк Н. П. Укр. бот. ж., 28, 595, 1971
10. Масюк Н. П. Укр. бот. ж., 22, 3, 1965.
11. Wegmann K. Der Weg des Kohlenstoffs bei der Photosynthese und Dunkelfixierung in *Dunaliella spec.* Thesis. Tübingen, 1968.
12. Wegmann K. Progress in Photosynthesis Res. Ed. H. Metzner. Tübingen, 317, 1969.
13. Johnson M. K., Johnson E. J., McElroy R. D., Speer H. S., Bruff B. S. J. Bacteriol, 95, 4, 1968.
14. Исаченко Б. Л. Изд-во Главн. ботан. сада РСФСР, 18, 1, 1918.
15. Parsons T. R. J. Fish. Res. Board. Canada, 18, 6, 1961.
16. Масюк Н. П., Радченко М. И. Гидробиол. ж., 6, 3, 51, 1970.
17. Миронюк В. И. Особенности некоторых окислительно-восстановительных систем водоросли *Dunaliella salina Teod.* Автореф. канд. дис. Киев, Ин-т бот-ки АН УССР, 1969.
18. Trezzi F., Jalli M. G., Bellini E. Giorn. Bot. Ital., 71, 1, 1964; 71, 6, 1964.

19. Цолова М. Изв. Ин-та физиол. растений «Методий Попов», 15, 408, 1966.
20. Дрокова I. Г. Укр. бот. ж., 27, 370, 1970.
21. Масюк Н. П. Укр. бот. ж., 26, 21, 1969.
22. Семененко В. Е., Владимирова М. Г., Ничипорович А. А. В сб.: Проблемы космической биологии, II, 326. М., Изд-во АН СССР, 1962.
23. Владимирова М. Г., Семененко В. Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. М., Изд-во АН СССР, 1962.
24. Семененко В. Е., Владимирова М. Г., Райков Н. И., Игнатъевская М. А. В сб.: Биология сине-зеленых водорослей, II. М., Изд-во МГУ, 163, 1969.
25. Владимирова М. Г., Игнатъевская М. А., Райков Н. И. В сб.: Управляемый биосинтез. «Наука», 86, 1966.
26. Пиневич В. В., Верзилин Н. Н., Михайлов А. А. Физиол. растений, 17, 1073, 1970.
27. Владимирова М. Г., Семененко В. Е., Жукова Т. С., Кованова Е. С. В сб.: Управляемый биосинтез. «Наука», 93, 1966.
28. Владимирова М. Г., Семененко В. Е., Ничипорович А. А. В сб.: Проблемы космической биологии, II, 314. Изд-во АН СССР, 1962.
29. Семененко В. Е., Владимирова М. Г., Орлеанская О. Б. Физиол. растений, 14, 612, 1967.

Поступила в редакцию
23.IV.1974

INTENSIVE CULTURE OF DUNALIELLA SALINA TEOD. AND SOME OF ITS PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS

A. A. ABDULLAEV, V. E. SEMENENKO

*K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology,
USSR Academy of Sciences, Moscow*

A possibility of the introduction into the intensive culture of the green halophytic alga *Dunaliella salina* Teod. has been shown, which increases its growth rate (up to $18 \cdot 10^6$ to $20 \cdot 10^6$ cells per day). The effect of the composition and pH of the cultural medium, the concentration of NaCl, temperature, the intensity of light and the combined effect of these factors on the growth of *D. salina* were studied in the conditions of intensive culture. The Artari medium is exhausted rapidly in these conditions, and the concentrated nutrient medium has been found suitable for growing *D. salina* in the intensive culture of a high density ($100 \cdot 10^6$ cells per 1 ml and more). Quasicontinuous cultivation of *D. salina* with a high yield was shown to be possible.