

УДК 582.264.1:577.161.1:581.133.(1+5)

В.П. КОМАРИСТАЯ¹, С.П. АНТОНЕНКО¹, А.Н. РУДАСЬ²

¹Харьковский национальный ун-т им. В.Н. Каразина,
кафедра ботаники и экологии растений,
61077 Харьков, пл. Свободы, 4, Украина

²ООО «Бетакар-Х»,
ул. Гуданова, 16, оф. 7, 61024 Харьков, Украина

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *DUNALIELLA SALINA* TEOD. ПРИ СУБОПТИМАЛЬНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ АЗОТА И ФОСФОРА И ИСКЛЮЧЕНИИ ИХ ИЗ СРЕДЫ

Исследовано влияние субоптимальных концентраций азота и фосфора и исключения их из культуральной среды на накопление β-каротина клетками *Dunaliella salina* Teod., динамику роста культуры и потребление этих биогенов при благоприятных для деления клеток значениях освещенности, температуры, концентрации солей. Исключение фосфора (концентрация K_2HPO_4 менее 0,2 мг/л) при внесении субоптимальных концентраций азота способствовало более интенсивному накоплению β-каротина и росту культуры, чем исключение обоих биогенов или только азота (концентрация KNO_3 менее 0,1 мг/л) при субоптимальных концентрациях фосфора. Поддержание в среде субоптимальных концентраций обоих биогенов (20-80 мг/л KNO_3 и 4-9 мг/л K_2HPO_4) значительно стимулировало рост культуры, но подавляло каротиногенез. Поддержание в среде постоянной концентрации фосфора на уровне 45 мг/л K_2HPO_4 при субоптимальных концентрациях азота или его исключении угнетало рост культуры и процесс каротиногенеза. Потребление азота и фосфора клетками *D. salina* было максимальным в начале роста культуры и пропорциональным концентрации этих биогенов в среде. Взаимной зависимости потребления азота и фосфора от их концентраций в среде не наблюдалось. Полученные данные могут свидетельствовать о специфичности влияния недостатка азота и фосфора на метаболизм клеток *D. salina*. Обсуждаются возможные причины несогласованности данных разных авторов об индукции каротиногенеза у *D. salina*.

Ключевые слова: *Dunaliella salina*, β-каротин, азот, фосфор.

Введение

Несмотря на многочисленные исследования, окончательно не выяснены факторы и механизмы индукции сверхсинтеза β-каротина в клетках *Dunaliella salina* Teod., а также его функции у этого вида (Lamers et al., 2008). По данным Н.П. Масюк (1973), максимальная интенсивность каротиногенеза достигается при одновременном действии следующих

© В.П. Комаристая, С.П. Антоненко, А.Н. Рудась, 2010

факторов: повышенное содержание солей, температура и освещенность; недостаток или отсутствие азота и фосфора; наличие источников углерода. Значение этих факторов для индукции каротиногенеза различно (Coesel et al., 2008). Индуцирующее действие недостатка фосфора не подтверждается в ряде работ (Дрокова, 1969; Ven-Amotz et al., 1982).

Исследование влияния на процесс каротиногенеза отдельных факторов и их сочетаний позволит выяснить механизмы индукции каротиногенеза и функции β -каротина у *D. salina*.

Цель работы – изучить влияние субоптимальных концентраций азота и фосфора, а также их исключения из среды на динамику содержания β -каротина в клетках *D. salina*, рост культуры и потребление этих биогенов при благоприятных для деления клеток условиях солености, освещенности и температуры.

Материалы и методы

Объектом исследования служила культура *D. salina*, выделенная из штамма IBSS, который поддерживается в коллекции культур микроводорослей кафедры ботаники ХНУ на среде, приготовленной из морской соли (плотность среды 1,15 г/см³) без дополнительного внесения биогенов (Догадина, Комаристая, 2005). Инокулят отбирали из культуры на стационарной фазе роста и высевали на среду, содержащую 116 г/л NaCl, 50 г/л MgSO₄ · 7H₂O (плотность среды 1,11 г/см³) и микроэлементы (H₃BO₃ – 2 мг/л; MnSO₄ · H₂O – 2 мг/л; ZnSO₄ · 7H₂O – 0,025 мг/л; CoCl₂ · 6H₂O – 0,015 мг/л; FeSO₄ · 7H₂O – 5 мг/л; CuSO₄ · 5H₂O – 0,08 мг/л; (NH₄)MoO₄ – 0,03 мг/л; Na₂ЭДТА – 5 мг/л).

Для исследования были выбраны субоптимальные концентрации азота и фосфора, намного ниже ростового оптимума для *D. salina*, который составляет 0,5-1 г/л NaNO₃ и 0,02-0,25 г/л K₂HPO₄ (Масюк, 1973). Азот вносили в форме KNO₃ в зависимости от варианта опыта (без внесения – исключение азота, 20, 40 и 80 мг/л), фосфор – в форме KH₂PO₄ (без внесения – исключение фосфора, 4, 9, а также концентрация 45 мг/л, относящаяся к оптимальному диапазону). Полная схема эксперимента включала все сочетания концентраций KNO₃ и KH₂PO₄ (всего 16 вариантов опыта). Поскольку реактивы для приготовления питательной среды практически всегда содержат примеси солей азота и фосфора, некоторый минимальный уровень этих биогенов неизбежно присутствовал в средах, к которым нитраты и фосфаты специально не добавляли. Концентрации биогенов в этих вариантах при посеве были ниже пределов чувствительности использованных аналитических методик: 0,1 мг/л для KNO₃ и 0,2 мг/л для

K_2HPO_4 . В остальных вариантах для изучения влияния определенных концентраций азота и фосфора на исследуемые показатели, концентрации биогенов в среде в процессе культивирования поддерживали на относительно стабильном уровне. Для этого каждые 3 сут из культур отбирали аликвоты по 3 мл, в которых определяли содержание нитратов и фосфатов. Затем в культуры вносили азот и фосфор до исходной концентрации и добавляли 3 мл среды до исходного объема.

Культуры выращивали в колбах Эрленмейера объемом 25 мл, по 15 мл культуры в колбе, при освещенности 5 клк от четырех ламп «Maxus» с цветовой температурой 2700 К мощностью 32 Вт. Фотопериод: 16 ч – свет, 8 ч – темнота; температура 24–28 °С. Кроме концентраций азота и фосфора, условия культивирования находились в пределах, оптимальных для *D. salina* значений, установленных Н.П. Масюк (1973): удельный вес среды 1,08–1,11 г/см³, температура 25–30 °С, освещенность 5–6 клк.

Определение нитратов и фосфатов. Аликвоты центрифугировали для осаждения клеток при 3 тыс. об/мин. Нитраты определяли по методу Cataldo et al. (1975), фосфаты – по методу Fiske, Subbarow (1925). Концентрацию KNO_3 и K_2HPO_4 (мг/л) рассчитывали по предварительно построенным калибровочным кривым.

Определение β-каротина. Осадки клеток *D. salina* после центрифугирования аликвот экстрагировали этилацетатом. Оптическую плотность экстрактов определяли при 440 нм. Содержание β-каротина рассчитывали с помощью удельного коэффициента экстинкции $E_{1\%}^{1\text{ cm}} = 2500$ (Carotenoids, 1998). Содержание β-каротина выражали в пг на клетку водорослей.

Контроль динамики роста культур. При посеве и каждые 3 сут роста культур подсчитывали число клеток в камере Горяева. Концентрацию клеток выражали в тыс. на 1 мл.

Статистическая обработка. Полную схему эксперимента повторяли 4 раза. Проверка с помощью критерия Шапиро-Уилка показала, что распределение экспериментальных данных отличается от нормального. Для статистической обработки данных использовали непараметрические критерии: Краскла-Уоллиса – для сравнения исследуемых показателей при разных концентрациях биогенов, Фридмана – для анализа этих показателей в динамике (Гланц, 1999). На графиках представлены средние значения. Обсуждаемые в тексте различия достоверны на уровне значимости 95 %.

Результаты и обсуждение

Во всех вариантах эксперимента в первые 6 сут культивирования содержание β-каротина в клетках резко снижалось, клетки теряли оранжевую окраску (рис. 1). Этот период соответствовал наиболее

интенсивному росту культур (рис. 2) и максимальному поглощению биогенов (рис. 3, 4), что подтверждается также литературными данными (Горбунова и др., 2007). Рост культур в вариантах опыта с исключением биогенов продолжался до исчерпания азота и фосфора в среде (см. рис. 2). В процессе роста культур в этих вариантах начиналось накопление β -каротина и восстановление оранжевой окраски клеток (см. рис. 1). На средах с исключением фосфора и субоптимальными концентрациями азота культуры накапливали β -каротин и росли в 2 раза интенсивнее, чем на всех средах с исключением азота (см. рис. 1, 2). Поддержание в среде субоптимальных концентраций обоих биогенов (20-80 мг/л KNO_3 и 4-9 мг/л KH_2PO_4) значительно стимулировало рост культур (см. рис. 2), но подавляло каротиногенез (см. рис. 1), и клетки оставались зелеными.

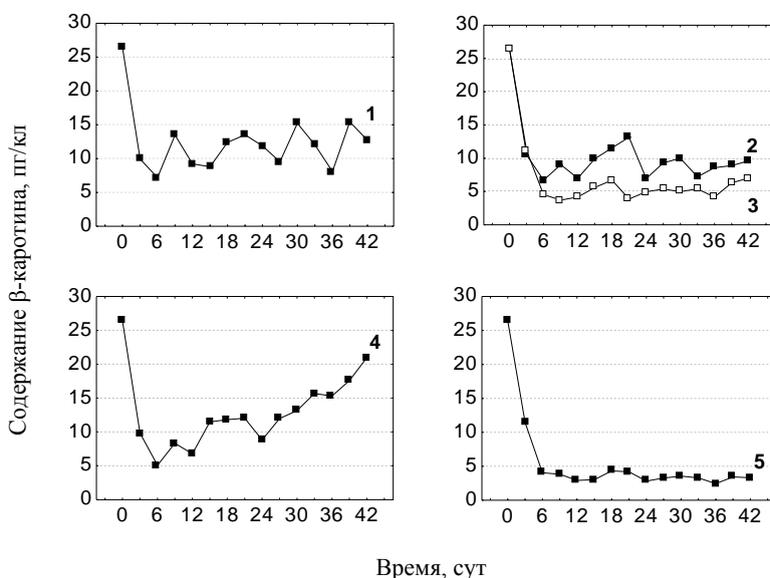


Рис. 1. Динамика содержания β -каротина в клетках *Dunaliella salina* на средах: 1 – без внесения KNO_3 и KH_2PO_4 ; 2 – без внесения KNO_3 , 4-9 мг/л KH_2PO_4 ; 3 – без внесения KNO_3 , 45 мг/л KH_2PO_4 ; 4 – 20-80 мг/л KNO_3 , без внесения KH_2PO_4 ; 5 – 20-80 мг/л KNO_3 , 4-45 мг/л KH_2PO_4

Полученные результаты подтверждают данные литературы о том, что каротиногенез индуцируется у *Dunaliella bardawil* Ben-Amotz et Avron (= *D. salina* (Borowitzka, Siva, 2007) только при снижении концентрации азота в среде в процессе культивирования до нуля (Ben-Amotz, Avron, 1983).

Рост культур ингибировался при поддержании в среде постоянной концентрации фосфора на уровне 45 мг/л KH_2PO_4 , соответствующему оптимальному для деления клеток *D. salina* диапазону. Несмотря на

ингибирование деления, которое проявлялось уже на 6-9 сут роста, клетки в этот период активно поглощали фосфор (см. рис. 4). Вероятно, ингибирование роста этих культур вызвано недостатком азота и, вследствие этого, неблагоприятным соотношением азота и фосфора. Снижение интенсивности роста культуры в данном случае не приводило к индукции каротиногенеза даже при исключении азота (см. рис. 1).

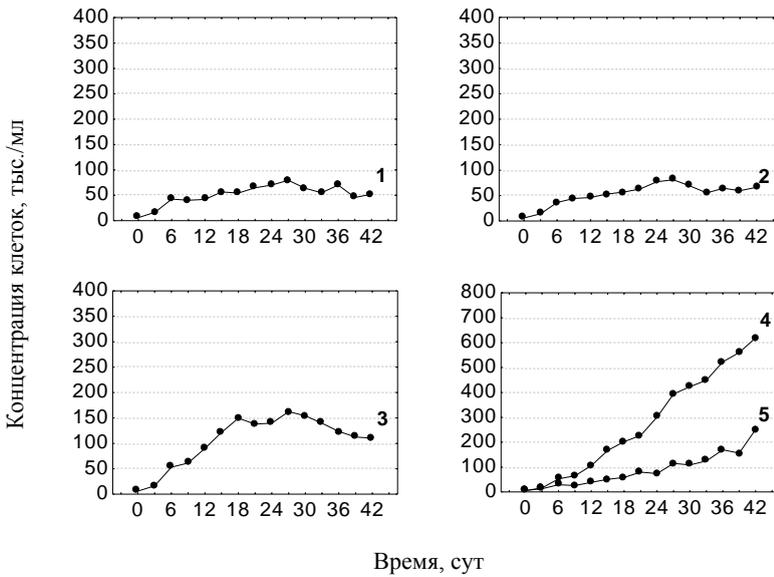


Рис. 2. Динамика роста культур *Dunaliella salina* на средах: 1 – без внесения KNO_3 и KH_2PO_4 ; 2 – без внесения KNO_3 , 4-45 мг/л KH_2PO_4 ; 3 – 20-80 мг/л KNO_3 , без внесения KH_2PO_4 ; 4 – 20-80 мг/л KNO_3 , 4-9 мг/л KH_2PO_4 ; 5 – 20-80 мг/л KNO_3 , 45 мг/л KH_2PO_4

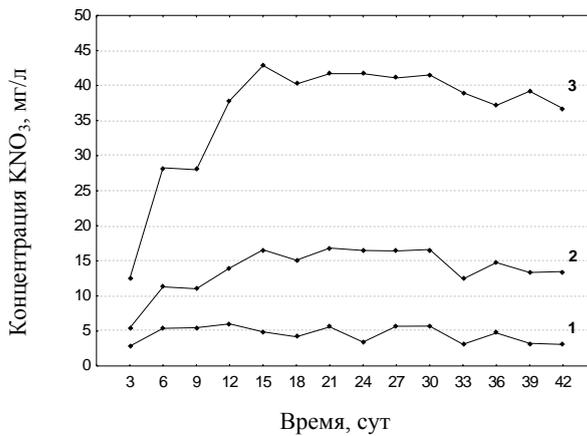


Рис. 3. Остаток азота в среде *Dunaliella salina* через 3 сут после внесения до исходной концентрации: 1 – 20 мг/л KNO_3 , 0-45 мг/л KH_2PO_4 ; 2 – 40 мг/л KNO_3 , 0-45 мг/л KH_2PO_4 ; 3 – 80 мг/л KNO_3 , 0-45 мг/л KH_2PO_4

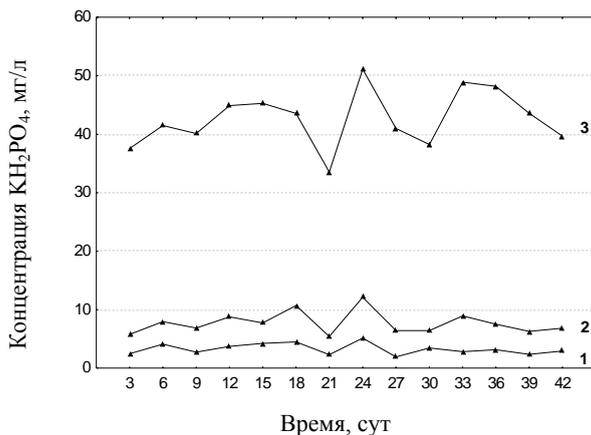


Рис. 4. Остаток фосфора в среде *Dunaliella salina* через 3 сут после внесения до исходной концентрации: 1 – 4 мг/л K₂HPO₄, 0-80 мг/л KNO₃; 2 – 9 мг/л K₂HPO₄, 0-80 мг/л KNO₃; 3 – 45 мг/л K₂HPO₄, 0-80 мг/л KNO₃

Полученные результаты показывают, что взаимосвязь между интенсивностью деления клеток и накоплением в них β-каротина имеет более сложный характер, чем, как предполагалось ранее (Масюк, 1973), обратная зависимость.

При оптимальных для деления клеток содержании солей, освещенности и температуре для индукции каротиногенеза было достаточно исключения из среды одного из двух биогенов, что согласуется с литературными данными (Масюк, 1967). Концентрация β-каротина при выращивании на средах с исключением только азота достигала 10-12 пг на 1 клетку, азота и фосфора – 15 пг на 1 клетку, а в варианте с исключением только фосфора на фоне внесения азота – свыше 20 пг на 1 клетку (см. рис. 1). Исключение только фосфора оказалось более эффективным индуктором каротиногенеза, чем одновременное исключение обоих биогенов (рис. 1). Это противоречит сделанному ранее выводу о том, что для максимальной интенсивности накопления β-каротина требуется одновременное действие всех факторов каротиногенеза (Масюк, 1973).

В некоторых работах (Дрокова, 1969; Ven-Amotz et al., 1982; Радченко, 1984) недостаток фосфора не вызывал индукции каротиногенеза. Это может быть связано с тем, что клетки инокулята, выращенного в условиях нормальной обеспеченности фосфором, при исключении фосфора из питательной среды продолжали расходовать внутриклеточные запасы полифосфатов. Клетки *D. salina* не накапливают нитрат (Kagni, Avron, 1988), поэтому не вызывает сомнения, что его исключение из питательной среды, всегда приводящее к дефициту азота, индуцирует каротиногенез. Поскольку концентрации азота и фосфора в среде не

оказывали взаимного влияния на их поглощение клетками (рис. 3, 4), можно заключить, что индукция каротиногенеза в условиях дефицита азота и фосфора являются независимыми процессами.

Колебания остатка фосфора, превышающее в ряде случаев его исходное содержание в среде (см. рис. 4), могут быть связаны с погрешностью дозирования малых количеств фосфата, недостаточной разрешающей способностью методики его анализа, присутствием следовых количеств фосфатов в растворе NaCl и $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, который вносили в культуру для компенсации объема после отбора аликвот для анализа. А возможно, эти колебания связаны с выделением в среду клетками водоросли и последующим гидролизом содержащих фосфор экзометаболитов. Данный вопрос требует дальнейших исследований.

Ведущим фактором каротиногенеза, как показано в недавних исследованиях (Coesel et al., 2008; Ramos et al., 2008), является дефицит азота. Так, по данным Coesel et al. (2008), в присутствии азота не отмечалась индукция накопления β -каротина высокой интенсивностью света и соленостью. К сожалению, уровень азота и фосфора в среде в процессе культивирования в большинстве работ по индукции каротиногенеза не контролировался.

Так, в одной из работ (Милько, 1963) β -каротин определялся лишь на начальных стадиях роста культур, посеянных на среды с оптимальными и субоптимальными концентрациями обоих биогенов, что, по нашим данным, подавляет каротиногенез (см. рис. 1), либо на среды с исключением одного из биогенов. В этот период в среде еще могут оставаться подавляющие каротиногенез следовые количества азота и фосфора (Горбунова и др., 2007), внесенные с реактивами и инокулятом, который выращивался, в отличие от наших опытов, при оптимальных концентрациях биогенов (Милько, 1963). Полученные этим автором данные по содержанию β -каротина, в пересчете на 1 клетку, отвечают представленным на рис. 1 данным о минимальном содержании β -каротина. Фактически, индукция каротиногенеза в этом опыте не наблюдалась. По-видимому, по аналогичным причинам на оптимальной по биогенам среде не удалось получить значительного усиления каротиногенеза под действием высокой солености, хотя в этих условиях наблюдалось ингибирование роста (Милько, 1963). Несмотря на то, что клетки в опытах имели зеленую окраску и желтели только в старых культурах (Милько, 1963), в последующих публикациях эта работа цитируется как классическая по индукции каротиногенеза у *D. salina* дефицитом биогенов и высокой концентрацией солей (Масюк, 1973; Borowitzka, Borowitzka, 1988).

Результаты экспериментов разных авторов по количественным показателям индукции каротиногенеза у *D. salina* часто не совпадают.

Иногда на основании только уровня каротиногенеза подвергается сомнению видовая принадлежность объектов исследований (Loeblich, 1982; Borowitzka, Siva, 2007). Это касается штамма *D. salina*, выделенного из Азовских солепромыслов и исследованного Е.С. Милько (1963), а также штамма № 6, выделенного Н.П. Масюк из бассейнов Сакского сольпрома (Дрокова и др., 1964; Дрокова, Довгорука, 1966; Масюк, 1967; Миронюк, Эйно́р, 1968-1970; Миронюк, 1969а, б; Дрокова, 1970, 1971; Миронюк, Суды́на, 1970; Дрокова, Попова, 1971, 1973, 1974а-в; Радченко, 1984). По нашему мнению, биохимический критерий, предложенный L.A. Loeblich (1982) и поддержанный M.A. Borowitzka, Ch.J. Siva (2007), – способность к накоплению свыше 20 пг β-каротина на 1 клетку при увеличении солености среды и освещенности, не может служить надежным признаком видовой идентификации *D. salina*, поскольку уровень каротиногенеза зависит и от других факторов, в частности, как показывают наши результаты и данные литературы, от обеспеченности клеток азотом и фосфором (см. рис. 1).

Штамм Н.П. Масюк № 6, служивший объектом большинства отечественных работ по биохимии *D. salina*, как правило, выращивался при оптимальных концентрациях биогенов (Дрокова и др., 1964; Дрокова, Довгорука, 1966; Миронюк, Эйно́р, 1968-1970; Миронюк, 1969а, б; Дрокова, 1970; Миронюк, Суды́на, 1970; Дрокова, Попова, 1973, 1974а, б), либо на чистой природной рапе, исходное содержание азота и фосфора в которой в публикациях не приводится (Дрокова, 1970; Дрокова, Попова, 1974в). Содержание β-каротина на 1 клетку во всех вариантах опытов, для которых приведены соответствующие данные (Дрокова и др., 1964; Дрокова, 1970, 1971; Дрокова, Попова, 1971, 1973, 1974а-в), не превышало либо превышало незначительно минимальные значения, полученные в наших опытах (см. рис. 1). К сожалению, для экспериментов, в которых наблюдался переход зеленой формы в красную, в частности при повышении солености среды, данные, позволяющие рассчитать содержание β-каротина на 1 клетку, не приведены (Дрокова и др., 1964).

Через 2,5-3 месяца после посева штамма № 6 на оптимальную по биогенам среду на фоне увеличения концентрации соли клетки приобретали желтую окраску (Миронюк, Эйно́р, 1968-1970; Миронюк, 1969а, б; Миронюк, Суды́на, 1970), содержание β-каротина в них увеличивалось до 14 пг (Миронюк, Эйно́р, 1968). Основываясь на данных литературы (Горбунова и др., 2007), можно предположить, что в периодической культуре такого возраста азот и фосфор из питательной среды были практически полностью поглощены клетками и в культуре сложились условия дефицита биогенов.

У того же штамма при исключении азота и разбавлении дистиллированной водой основного питательного раствора на 25-е сутки

роста культуры содержание β -каротина в клетках составляло 12 пг и они приобретали оранжевую окраску (Радченко, 1984). Отсутствие каротиногенеза на неразбавленных растворах питательных солей (Радченко, 1984), возможно, объясняется следовыми количествами биогенов в среде и инокуляте, выращенном на оптимальной по биогенам среде.

При выращивании штамма № 6 на природной рапе без добавок биогенов или при обогащении одним из двух биогенов до оптимальной концентрации содержание β -каротина достигало через месяц 10-13 пг на клетку водоросли (Масюк, 1967). При исключении минеральных солей азота и фосфора и обогащении среды отходами пищевых и бродильных производств, в состав которых входили субоптимальные дозы этих биогенов и органический углерод, в отдельных вариантах опыта через месяц выращивания содержание β -каротина превышало 16 пг на клетку (Масюк и др., 1966).

Использованный в наших опытах штамм в зависимости от условий минерального питания демонстрировал сходную вариабельность содержания β -каротина в клетках и оказался способен к накоплению свыше 20 пг на клетку β -каротина при дефиците фосфора и субоптимальных концентрациях азота, т.е. для сомнений в видовой принадлежности штамма Н.П. Масюк № 6 и отнесению его к *Dunaliella parva* Lerche (Loeblich, 1982) нет достаточных оснований.

Столь же мало обоснованными являются сомнения (Borowitzka, Siva, 2007) в видовой принадлежности остальных штаммов *D. salina*, выделенных Н.П. Масюк (1973). Присутствием остаточных количеств биогенов в среде, а не ошибочной идентификацией вида, возможно, объясняется неудачная попытка индуцировать каротиногенез высокой соленостью среды еще у ряда штаммов *D. salina* (Cifuentes et al., 1992, 2001).

Очевидно, для уточнения видовой принадлежности коллекционных штаммов *D. salina* требуется экспериментальная проверка их способности к накоплению β -каротина при контроле содержания азота и фосфора в питательной среде. Нельзя также исключить вероятность того, что штаммы, в течение многих лет поддерживаемые в лабораторных условиях на средах, богатых биогенами, даже при сохранении альгологической чистоты культуры постепенно утрачивают способность к каротиногенезу. По нашему мнению, требуются также дополнительные исследования для уточнения видового статуса *D. parva*, так как эта форма была описана на культуральном материале и не имеет авторского латинского диагноза (Lerche, 1936/1937).

Взаимосвязь между интенсивностью деления клеток и каротиногенезом имеет сложный неоднозначный характер. Дефицит азота и

фосфора, вероятно, оказывает на метаболизм *D. salina* независимое специфическое действие, которое выражается в разной степени ингибирования деления клеток и накопления β -каротина. Игнорирование исследователями ведущих факторов каротиногенеза – дефицита азота и фосфора, приводит к незначительному накоплению β -каротина культурой *D. salina*. Исходя из этого, тезис о накоплении β -каротина клетками *D. salina* вследствие «разобщения клеточных функций деления и фотосинтеза» (Семененко, Абдуллаев, 1980) представляется значительно упрощенным.

Имеющиеся на сегодняшний день данные о роли и механизмах индукции β -каротина у *D. salina* обобщены в обзоре (Lamers et al., 2008). Основные гипотезы относительно функции вторичного β -каротина у этой водоросли – это экранирование фотосинтетического аппарата клетки от повреждающего действия избыточного света в диапазоне длин волн 330-500 нм и гашение активных форм кислорода, генерируемых фотосинтезирующей клеткой в условиях стресса. Образование клеточных оболочек зигот может быть одной из функций вторичного β -каротина у *D. salina* (Комаристая, Горбулин, 2006). В качестве гипотетических механизмов рецепции сигнала, запускающего сверхсинтез β -каротина, предполагаются пока неизвестный фоторецептор ультрафиолетового света, не выявленный сенсор или сигнальный каскад, запускаемый синглетным кислородом, либо восстановленное состояние пула пластохинона в электронтранспортной цепи хлоропласта. Допускается роль липидных депозитов, в которых накапливается β -каротин, в активации ферментов каротиногенеза путем снятия ингибирования продуктом реакции (Lamers et al., 2008). Дефицит азота повышает уровень экспрессии генов ферментов биосинтеза β -каротина у *D. salina*: фитоинсинтазы *Psy*, фитоиндесатуразы *Pds* (Coesel et al., 2008) и ликопин- β -циклазы *Lcy- β* (Ramos et al., 2008).

Изучение специфических изменений метаболизма клеток *D. salina* при дефиците фосфора, сопровождающихся накоплением β -каротина, может дать дополнительные данные для выяснения функции β -каротина и механизмов индукции его сверхсинтеза.

Выводы

1. Исключение фосфора (концентрация $\text{KН}_2\text{PО}_4$ менее 0,2 мг/л) при внесении субоптимальных концентраций азота способствует более интенсивному накоплению β -каротина и росту культуры *D. salina*, чем исключение обоих биогенов либо исключение азота (концентрация KNO_3 менее 0,1 мг/л) при субоптимальных концентрациях фосфора.

2. Поддержание в среде субоптимальных концентраций обоих биогенов (20-80 мг/л KNO_3 и 4-9 мг/л KH_2PO_4) значительно стимулирует рост культуры, но подавляет каротиногенез.

3. Поддержание в среде постоянной концентрации фосфора на уровне 45 мг/л KH_2PO_4 при субоптимальных концентрациях азота или его исключении угнетает рост культуры и каротиногенез.

4. Взаимосвязь между интенсивностью деления клеток и каротиногенезом имеет сложный неоднозначный характер.

5. Потребление азота и фосфора клетками *D. salina* максимально в начале роста культуры и пропорционально концентрации этих биогенов в среде. Взаимное влияние концентраций азота и фосфора на их потребление отсутствует.

6. Дефицит азота и фосфора, вероятно, оказывают на метаболизм *D. salina* независимое специфическое действие, которое отражается в разной степени ингибирования деления клеток и накопления β -каротина.

Благодарности

Авторы выражают благодарность зав. кафедрой ботаники и экологии растений ХНУ, д.б.н., профессору Т.В. Догадиной за ценные замечания в процессе работы над статьей, а также президенту АОЗТ СК «Лемма», к.т.н. С.И. Чернышову и генеральному директору Lemma-Consulting GmbH (Дюссельдорф, Германия) А. Красильникову за предоставленную возможность работать с оригиналом статьи W. Lerche.

*V.P. Komaristaya*¹, *S.P. Antonenko*¹, *A.N. Rudas*²

¹Botany and Plant Ecology Department, V.N. Karazin Kharkov National University, 4, Svobody Sq. Or Pl. like above, Kharkov 61077, Ukraine

²LLC «Betacar-X»,

16, Gudanova St., office 7, 61024 Kharkov, Ukraine

CULTIVATION OF *DUNALIELLA SALINA* TEOD. AT SUBOPTIMAL CONCENTRATIONS AND EXCLUSION OF NITROGEN AND PHOSPHORUS FROM THE MEDIUM

The effect of suboptimal concentration and the exclusion of nitrogen and phosphorus from the medium on β -carotene accumulation by *Dunaliella salina* Teod. cells, culture growth dynamics, and the uptake of these nutrients under favorable conditions for cell division values of salinity, illumination, and temperature were investigated. Phosphorus exclusion (KH_2PO_4 concentration less than 0.2 mg/L) at suboptimal nitrogen concentrations insertion favored twice more β -carotene accumulation and culture growth than both nutrients' exclusion or nitrogen

exclusion (KNO_3 concentration less than 0.1 mg/L) at suboptimal concentrations of phosphorus. Keeping suboptimal concentrations of both nutrients in the medium (from 20 mg/L KNO_3 and 4 mg/L KH_2PO_4) significantly stimulated culture growth but suppressed carotenogenesis. Keeping constant concentrations of phosphorus in the medium at a level of 45 mg/L of KH_2PO_4 at suboptimal nitrogen concentrations or its exclusion inhibited both culture growth and carotenogenesis. Nitrogen and phosphorus uptake by *D. salina* cells was maximal at the beginning of growth and proportional to the concentrations of these nutrients in the medium. Mutual dependence of nitrogen and phosphorus uptake of their concentrations was absent. The data obtained may support the specificity of nitrogen and phosphorus depletion effects on the metabolism of *D. salina* cells. The possible reasons of incompatibility of different investigators data on carotenogenesis induction in *D. salina* are discussed.

Keywords: *Dunaliella salina*, β -carotene, nitrogen, phosphorus.

- Гланц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
- Горбунова С.Ю., Лелеков А.С., Боровков А.Б. Динамика азота и фосфора в среде при интенсивном культивировании микроводоросли *Dunaliella salina* // Экол. моря. – 2007. – Вып. 74. – С. 21-24.
- Догадина Т.В., Комаристая В.П. Каталог культур микроводорослей в коллекции кафедры ботаники Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина // Вісн. ХНАУ, сер. Біол. – 2005. – 2, № 7. – С. 121-130.
- Дрокова І.Г. Пігменти двох штамів водорості *Dunaliella salina* Teod. // Укр. бот. журн. – 1969. – 26, № 6. – С. 82-83.
- Дрокова І.Г. Деякі каротиноносні штами водорості *Dunaliella salina* Teod. // Там же. – 1970. – 27, № 3. – С. 370-372.
- Дрокова І.Г. Стереїзомери β -каротину водорості *Dunaliella salina* Teod. // Там же. – 1971. – 28, № 5. – С. 670-673.
- Дрокова І.Г., Довгорука С.І. Каротиноутворення у водорості *Dunaliella salina* Teod. під впливом деяких джерел вуглецю // Там же. – 1966. – 23, № 1. – С. 59-62.
- Дрокова І.Г., Попова Р.Ц. Пігментний склад деяких каротиноносних штамів водорості *Dunaliella salina* Teod. // Там же. – 1971. – 28, № 2. – С. 153-155.
- Дрокова І.Г., Попова Р.Ц. Порівняльна характеристика каротиноносності деяких штамів *Dunaliella salina* Teod. в умовах масової культури // Там же. – 1973. – 30, № 3. – С. 329-331.
- Дрокова І.Г., Попова Р.Ц. Про вплив спектрального складу світла на водорість *Dunaliella salina* Teod. // Там же. – 1974а. – 31, № 1. – С. 121-124.
- Дрокова І.Г., Попова Р.Ц. Про вміст токоферолу у водорості *Dunaliella salina* Teod. // Там же. – 1974б. – 31, № 2. – С. 229-231.
- Дрокова І.Г., Попова Р.Ц. Про вирощування каротиноносних штамів водорості *Dunaliella salina* Teod. на природній ропі // Там же. – 1974в. – 31, № 5. – С. 649-653.

- Дрокова І.Г., Попова Р.Ц., Туник Н.Д. Вміст каротину у водорості *Dunaliella salina* Teod. при вирощуванні її в лабораторних умовах // Там же. – 1964. – **21**, № 5. – С. 44-49.
- Комаристая В.П., Горбулін О.С. Спорополненні в складі клітинних оболонок зигот *Dunaliella salina* Teod. (*Chlorophyta*) // Альгологія. – 2006. – **16**, № 1. – С. 47-56.
- Масюк Н.П. Оцінка придатності ропи Сакських водойм для вирощування каротиноносних водоростей // Укр. бот. журн. – 1967. – **24**, № 4. – С. 37-43.
- Масюк Н.П. Морфологія, систематика, екологія, географічне розповсюдження роду *Dunaliella* Teod. і перспективи його практичного використання. – Київ: Наук. думка, 1973. – 244 с.
- Масюк Н.П., Беренштейн О.П., Юркова Г.Н. Вплив відходів харчових та бродильних виробництв на ріст та нагромадження каротину в культурі *Dunaliella salina* Teod. // Укр. бот. журн. – 1966. – **23**, № 3. – С. 35-43.
- Милько Е.С. Влияние различных факторов среды на пигментообразование водоросли *Dunaliella salina* // Микробиология. – 1963. – **32**, № 2. – С. 299-306.
- Миронюк В.І. Деякі особливості окисно-відновних систем одноклітинної зеленої водорості *Dunaliella salina* Teod. // Укр. бот. журн. – 1969а. – **26**, № 1. – С. 54-59.
- Миронюк В.І. Каталаза та пероксидаза *Dunaliella salina* Teod. // Там же. – 1969б. – **26**, № 2. – С. 92-95.
- Миронюк В.І., Судьїна О.Г. Редуктазо-аскорбатоксидазні властивості водорості *Dunaliella salina* Teod. // Там же. – 1970. – **27**, № 4. – С. 443-449.
- Миронюк В.І., Эйнон Л.О. Кислородный обмен и содержание пигментов у разных форм *Dunaliella salina* Teod. в условиях повышения содержания хлористого натрия // Гидробиол. журн. – 1968. – **4**, № 4. – С. 23-29.
- Миронюк В.І., Эйнон Л.О. Цитохромоксидаза *Dunaliella salina* Teod. // Укр. бот. журн. – 1969. – **26**, № 6. – С. 88-92.
- Миронюк В.І., Эйнон Л.О. Влияние производных фенола на кислородный обмен *Dunaliella salina* Teod. // Гидробиол. журн. – 1970. – **6**, № 3. – С. 91-95.
- Радченко М.Й. Пігментоутворення у *Dunaliella salina* Teod. в умовах різної солоності середовища // Укр. бот. журн. – 1984. – **41**, № 6. – С. 65-70.
- Семененко В.Е., Абдуллаев А.А. Параметрическое управление биосинтезом β-каротина в клетках *Dunaliella salina* в условиях интенсивной культуры // Физиол. раст. – 1980. – **27**, № 1. – С. 31-41.
- Ben-Amotz A., Avron M. On the factors which determine massive β-carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil* // Plant. Physiol. – 1983. – **72**, N 3. – P. 593-597.
- Ben-Amotz A., Katz A., Avron M. Accumulation of β-carotene in halotolerant algae: purification and characterization of β-carotene-rich globules from *Dunaliella bardawil* // J. Phycol. – 1982. – **18**, N 4. – P. 529-537.
- Borowitzka M.A., Borowitzka L.J. *Dunaliella* // Microalgal biotechnol. – Cambridge: Univ. Press, 1988. – P. 27-58.
- Borowitzka M.A., Siva Ch.J. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (*Chlorophyta*, *Dunaliellales*) with emphasis on the marine and halophilic species // J. Appl. Phycol. – 2007. – **19**, N 5. – P. 567-590.

- Carotenoids* / IARC Working Group on the Evaluation of Cancer Preventive Agents. Intern. Agency Res. Cancer. – 1998. – Vol. 2. – 326 p.
- Cataldo D.A., Haroon M., Schrader L.E. et al. Rapid colorimetric determination of nitrite in plant tissue // Comm. Soil Sci. Plant Anal. – 1975. – 6, N 1. – P. 71-80.
- Cifuentes A.S., Gonzales M., Conejeros M. et al. Growth and carotenogenesis in 8 strains of *Dunaliella salina* Teod. from Chile // J. Appl. Phycol. – 1992. – 4, N 2. – P. 111-118.
- Cifuentes A.S., Gonzales M.A., Inostroza I. et al. Reappraisal of physiological attributes of nine strains of *Dunaliella* (*Chlorophyceae*): growth and pigment content across a salinity gradient // J. Phycol. – 2001. – 37, N 2. – P. 334-344.
- Coesel S.N., Baumgartner A.C., Teles L.M. et al. Nutrient limitation is the main regulatory factor for carotenoid accumulation and for *Psy* and *Pds* steady state transcript levels in *Dunaliella salina* (*Chlorophyta*) exposed to high light and salt stress // Mar. Biotechnol. – 2008. – 10, N 5. – P. 602-611.
- Fiske C.H., Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus // J. Biol. Chem. – 1925. – 66, N 2. – P. 375-378.
- Karni L., Avron M. Ion content of the halotolerant alga *Dunaliella salina* // Plant and Cell Physiol. – 1988. – 29, N 8. – P. 1311-1314.
- Lamers P.P., Janssen M., De Vos R.C.H. et al. Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for cell-factory applications // Trends in Biotechnol. – 2008. – 26, N 11. – P. 631-638.
- Lerche W. Untersuchungen über Entwicklung und Fortpflanzung in der Gattung *Dunaliella* // Arch. Protistenk. – 1936/1937. – Bd. 88. – S. 236-268.
- Loeblich L.A. Photosynthesis and pigments influenced by light intensity and salinity in the halophile *Dunaliella salina* (*Chlorophyta*) // J. Mar. Biol. Ass. UK. – 1982. – 62, N 3. – P. 493-508.
- Ramos A., Coesel S., Marques A. et al. Isolation and characterization of a stress-inducible *Dunaliella salina* *Lcy-β*-gene encoding a functional lycopene β-cyclase // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – 79, N 5. – P. 819-828.

Получена 26.10.09

Рекомендовала к печати Е.И. Шнюкова