

Erkin БАЙМУРЗАЕВ,
Старший преподаватель кафедры Биотехнологии и микробиологии НУУз, PhD
E-mail: erkin9414@gmail.com

На основании рецензии профессора кафедры Биотехнологии и микробиологии НУУз, д.б.н., профессор А.Вахабова

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ОТКРЫТОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ АРАЛЬСКОГО ШТАММА МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA SALINA* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ, БОГАТОЙ КАРОТИНОИДАМИ

Аннотация

В настоящем исследовании изучена возможность культивирования Аральского штамма микроводоросли *Dunaliella salina* на открытом воздухе в климатических условиях Узбекистана для получения биомассы, богатой каротиноидами. Эксперименты проводились в открытых лотках (прудах) глубиной 10 см при перемешивании и барботировании воздухом в квазинепрерывном режиме. Показано, что варьирование факторов среды - солёности, освещённости и температуры - позволяет эффективно управлять ростом смешанной культуры и повышать биосинтетическую активность клеток. Полученные результаты демонстрируют потенциал использования экстремальных климатических условий Приаралья для промышленного культивирования *Dunaliella salina* с целью биотехнологического получения каротиноидов и биомассы, применимой в фармацевтической и пищевой промышленности.

Ключевые слова: *Dunaliella salina*, культивирование, β -каротин, пальмеллы, биогенные элементы, галофиллы.

KAROTINOIDLARGA BOY BIOMASSA OLISH MAQSADIDA *DUNALIELLA SALINA* OROL SHTAMMI MIKROSUVOTINI OCHIQ SHAROITDA O'STIRISH JARAYONINI MAQBULLASHTIRISH

Annotatsiya

Ushbu tadqiqotda *Dunaliella salina* Orol shtammi mikrosvotini O'zbekiston iqlim sharoitida karotinoidlarga boy biomassa olish maqsadida ochiq havoda yetishtirish imkoniyati o'rganildi. Tajribalar 10 sm chuqurlikdagi ochiq lotoklarda (hovuzlarda) kvazi uzluksiz rejimda havo bilan aralashtirib va barbotaj qilib o'tkazildi. Muhit omillari - sho'rlik, yorug'lik va haroratni o'zgartirish orqali aralash kulturaning o'sishini samarali boshqarish va hujayralarning biosintetik faolligini oshirish mumkinligi aniqlandi. Olingan natijalar Orolbo'yi hududining ekstremal iqlim sharoitlaridan foydalanib, *Dunaliella salina* ni sanoat miqyosida yetishtirish orqali farmatsevtika va oziq-ovqat sanoatida qo'llaniladigan karotinoidlarni va biomassani biotexnologik usulda olish imkoniyatlarini ko'rsatmoqda.

Kalit so'zlar: *Dunaliella salina*, yetishtirish, β -karotin, palmellalar, biogen elementlar, galofillar.

OPTIMIZATION OF OPEN CULTIVATION CONDITIONS FOR THE ARAL STRAIN OF MICROALGA *DUNALIELLA SALINA* TO OBTAIN CAROTENOID-RICH BIOMASS

Annotation

This study investigates the potential for cultivating the Aral Sea strain of microalgae *Dunaliella salina* in open-air conditions under the climate of Uzbekistan to obtain carotenoid-rich biomass. The experiments were conducted in open troughs (ponds) 10 cm deep with mixing and air bubbling in a quasi-continuous mode. It has been demonstrated that varying environmental factors - salinity, light intensity, and temperature - enables effective management of mixed culture growth and enhances the biosynthetic activity of cells. The obtained results showcase the potential of utilizing the extreme climatic conditions of the Aral Sea region for industrial cultivation of *Dunaliella salina* for the biotechnological production of carotenoids and biomass applicable in the pharmaceutical and food industries.

Keywords: *Dunaliella salina*, cultivation, β -carotene, palmella, biogenic elements, halophiles.

Введение. Проблема рационального использования биологических ресурсов в условиях экстремальных экосистем Приаралья остаётся одной из ключевых задач современной биотехнологии. Галофильные микроводоросли, в частности *Dunaliella salina*, представляют собой уникальные фототрофные микроорганизмы, способные выживать при чрезвычайно высоких концентрациях соли, интенсивной солнечной радиации и значительных колебаниях температуры [2, 6]. Эти экстремальные параметры соответствуют климатическим условиям Приаралья, что делает данный регион естественным биотопом для культивирования *D. salina*. Высокая биосинтетическая способность этой микроводоросли к накоплению β -каротина и других изопреновых соединений представляет значительный интерес для фармацевтической, косметической и пищевой промышленности. По данным современных исследований, при соблюдении оптимальных параметров среды морские микроводоросли могут выращиваться в интенсивной культуре и использоваться в качестве источника биологически активных веществ [4]. Следует отметить, что условия стерильности при промышленном культивировании микроводорослей обычно существенно отличаются от лабораторных, что способствует постоянной контаминации культуральной среды другими микроорганизмами. Это обстоятельство делает актуальным исследование роста смешанных культур и разработку методов их управления с целью получения альгологически чистых и стабильных биопродуктов.

Таким образом, цель настоящей работы заключалась в изучении возможности разработки технологии культивирования местного Аральского штамма *Dunaliella salina* в открытых лотках под воздействием природных климатических факторов.

Материалы и методы. Объект исследования – Аральский штамм микроводоросли *Dunaliella salina* получен из коллекции микроорганизмов Института Микробиологии АН РУз.

В работе использовали металлический лоток на 200 л среды и площадью 2 м² с лопастной мешалкой (рис. 1) и надувной детский бассейн также на 200 л среды и площадью 2 м². Слой водной среды в лотках был 10 см. Этот объем на протяжении всего эксперимента поддерживали, доливая пресную воду перед измерениями до отметки 10 см. Культуры постоянно перемешивали с помощью лопастной мешалки.



Рис. 1. Металлический лоток с лопастной мешалкой

Водоросли выращивали на модифицированной питательной среде Артари [4] с общей солёностью 225 г·л⁻¹ на водопроводной воде: NaCl – 200 г·л⁻¹; MgSO₄·7H₂O – 50 г·л⁻¹; KNO₃ – 2,5 г·л⁻¹; K₂HPO₄ – 0,2 г·л⁻¹; NaHCO₃ – 1,0 г·л⁻¹; 1 мл·л⁻¹ концентрированного раствора микроэлементов: H₃BO₃ – 2,8 г·л⁻¹; MnCl₂·4H₂O – 1,8 г·л⁻¹; ZnSO₄·7H₂O – 0,2 г·л⁻¹; MoO₃ – 0,02 г·л⁻¹; NH₄VO₃ – 0,02 г·л⁻¹; FeSO₄·7H₂O – следы.

В настоящее время для получения богатой каротинами биомассы *D. salina* при лабораторном и промышленном культивировании используется двухэтапный метод культивирования [1, 3, 5, 6].

На начальном этапе эксперимента водоросли выращивали накопительным методом. Освещённость на поверхности культур составляла в среднем 5 -10 клк (90 180 μMol (photons) s⁻¹m⁻²) за счёт уменьшения освещённости от Солнца тканевым навесом. В втором этапе мы удалили навес, освещённость стала 50 -70 клк (900 – 1260 μMol (photons) s⁻¹m⁻²) и за один солнечный день клетки пожелтели и далее развивались уже в жёлтой форме. Температура среды в лотке днём поднималась до 36°C, ночью опускалась до 22°C.

Измерения оптической плотности (D) суспензии зелёных микроводорослей измеряли на фотоэлектрическом фотометре KF-77 Zalimp (Польша), при длине волны 550 нм в кюветках объёмом 10 мл с длиной оптического пути света 15 мм. Микроскопическим методом и методом взвешивания фильтров для этих разведений определяли концентрацию клеток и вес биомассы. Составляли график соответствия оптической плотности весу биомассы и концентрации клеток.

Результаты. При культивировании микроводорослей под открытым небом стерильность культуры поддерживать невозможно, поэтому культивирование всегда происходит в смешанной культуре. В нашей культуре, помимо *D. minuta*, различных диатомовых и цианобактерий завелись и хищные гетеротрофные флагеллаты (жгутиковые), которые постоянно вращаясь засасывают в свой рот различные микроорганизмы размером до 8 мкм. Компании, производители биомассы дуналиеллы используют различные способы очистки культуры от загрязняющих микроорганизмов. Причём эти способы редко публикуются.

Опытным путём мы установили, что только при концентрации солей больше 200 г/л наш Аральского штамм *D. salina* остаётся относительно чистым. *D. minuta* и сопутствующие микроорганизмы при такой концентрации солей практически не развиваются. Поэтому, при культивировании дуналиеллы под открытым небом и даже в лабораторных нестерильных условиях мы стали использовать модернизированную среду Артари, в которой концентрация NaCl была 200 г·л⁻¹, а с учётом 50 г·л⁻¹ MgSO₄, общая концентрация солей стала около 240 г·л⁻¹. Наш штамм *D. salina* хорошо развивается при такой концентрации солей.

В наших экспериментах в лотки со средой Артари объёмом 100 л, общей солёностью 240 г·л⁻¹ добавили по 5 л инокулята с концентрацией зелёных клеток *D. salina* около 2 млн/мл (1 г·л⁻¹), поэтому исходная концентрация клеток стала около 50 мг л⁻¹.

Среду с инокулятом зелёных клеток культивировали при освещённости 5 -10 клк (90 180 μMol (photons) s⁻¹m⁻²) за счёт уменьшения освещённости от Солнца тканевым навесом.

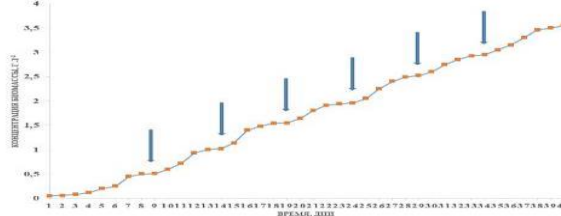


Диаграмма 1. Увеличение биомассы Аральского штамма *D. salina* в среде Артари (общей солёностью 240 г·л⁻¹) при освещённости 5 – 10 клк (90 – 180 μMol (photons) s⁻¹m⁻² = 18,5 – 39 W m⁻²) в лотке объёмом 100 л. Температура культуральной воды колебалась от 20°C до 36°C. Стрелками показано добавление концентрата биогенных элементов.

На диаграмме 1. видно, что в течение 8-9 дней концентрация биомассы повышается и выходит на плато при концентрации биомассы около 500 мг л⁻¹. После добавления концентрата биогенных элементов (KNO₃, K₂HPO₄) увеличение концентрации биомассы снова продолжилось до концентрации около 1,0 г л⁻¹. После добавления ещё одной порции биогенных элементов рост биомассы увеличился примерно до 1,5 г л⁻¹. Однако, после следующего добавления

биогенных элементов биомасса не увеличилась, а даже несколько уменьшилась за счёт осаждения клеток на дно лотка и образования пальмелл.

Рост биомассы начал увеличиваться только через 6 дней и он вырос до 2,0 г л⁻¹. После последовательных двух добавлений биогенных элементов биомасса увеличилась примерно до 3,0 г л⁻¹ и опять началось осаждение клеток на дно и образование пальмелл. На дне лотка образуется бело-серый слой из пустых оболочек пальмелл. Этот слой нельзя удалять, так как из него продолжают выходить маленькие (меньше 1 мкм) бесцветные клетки, которые растут, зеленеют и вырастают до взрослых зелёных особей с размерами 20 x 15 мкм.

Таким образом, при культивировании Аралского штамма *D. salina* необходимо учитывать периоды размножения клеток в пальмеллах.

После удаления навеса освещённость стала 50 -70 кЛк (900 – 1260 μMol (photons) s⁻¹m⁻²) и за один солнечный день клетки пожелтели и далее развивались уже в жёлтой форме. Температура среды в лотке днём поднималась до 36°C, ночью опускалась до 22°C.

Под микроскопом все клетки были жёлтыми, и было принято решение собрать их с помощью молочного сепаратора. Со 100 л культуральной среды при трёх кратном сепарировании с разбавлением среды водой удалось собрать около 200 г биомассы. Супернатант слили обратно в лоток, добавили биогенные элементы и снова поставили под навес с освещённостью 5 -10 кЛк.

Характерной особенностью дуналиеллы является то, что благодаря легкой проницаемости плазматической мембраны для воды и некоторых ионов она быстро уравнивает внутреннее осмотическое давление с внешним [2, 3]. Таким образом плотность внутреннего содержимого клеток дуналиеллы становится равной плотности внешней среды, из-за чего её трудно бывает осадить полностью центрифугированием или сепарированием. Если непосредственно перед сепарированием разбавить культуральную среду на 10 - 20%, то можно собрать в 1,5 – 2 раза больше биомассы.

Высушенная биомасса была жёлто-коричневого цвета. Она содержала каротиноидов около 20 мг/г (2%) сухой биомассы.

В июле дневные температуры воздуха поднимались выше 40°C а ночные не опускались ниже 28°C. Днём температура культуральной среды толщиной 10 см повышалась до 44°C и развитие дуналиеллы остановилось. Они все опустились на дно превратились в цисты и распались на мелкие частицы. Развитие возобновилось только в августе, когда температура культуральной среды не поднималась выше 34°C.

В озёрах Приаралья верхний слой воды в июле также прогревается выше 40°C и дуналиелла опускается на глубину, где температура не превышает 32 -34°C. По-видимому, глубину лотков при строительстве плантаций дуналиеллы в климатических условиях Узбекистана надо делать достаточно большой, но не 10 - 20 см, как это делают в южных приморских странах.

Ещё одной особенностью Приаралья является резко континентальный климат – зимой температура опускается до -30°C, а летом может в тени подниматься до 50°C, а на Солнце ещё выше. Кроме того, для Приаралья характерны сильные сезонные колебания концентрации солей, из-за осенне-зимних-весенних дождей и полного отсутствия осадков летом. Возможно, что преимущественное размножение Аралского штамма *D. salina* через пальмеллоидные структуры, которое характерно для стрессовых условий, и является способом приспособления к резко континентальным условиям.

В других странах дуналиеллу, в основном, культивируют в приморских районах, в которых температура не поднимается выше 35°C, поэтому там и не наблюдают пальмеллоидные структуры. Только в Индии после сезона дождей, когда концентрация солей резко уменьшается, было описано образование пальмелл для *D. salina* [7].

Заключение. Разработаны рекомендации по технологии выращивания *Dunaliella salina* по сохранению культуры альгологически чистой в открытом воздухе. Результаты, полученные в проведенных исследованиях, послужат основой для дальнейших работ по культивированию микроводорослей на территории Узбекистана. Дальнейшее исследование по подбору условий и совершенствование методов культивирования микроводорослей в больших искусственных бассейнах может служить для разработки технологии культивирования микроводорослей в полупромышленных условиях Узбекистана

Таким образом, в нашей работе, при культивировании *D. salina AR-1* в лотках под открытым небом, изучены некоторые особенности развития дуналиеллы в условиях климата Узбекистана.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боровков А.Б., Гудвиллович И.Н. Апробация двухстадийного выращивания *Dunaliella salina* Теод. в полупромышленных условиях // Вопросы современной альгологии. 2017. №1 (13). URL:<http://algology.ru/1155>
2. Боровков А.Б., Сафиуллин З.Т., Панченко Н.В. Рост *Dunaliella salina* в смешанной культуре. -Экология моря. 2005. Вып.67. -С.18-22.
3. Масюк Н.П. 1973. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Теод. – Киев: Наукова думка, - 244 с.
4. Баймурзаев Е.Н., Верушкина О.А., Тонких А.К. Основы технологии культивирования Аральского штамма микроводоросли *Dunaliella salina* на открытом воздухе // Хоразм Маъмун академияси ахборотномаси. Хива 2023 - № 10. 37-42 бет
5. Тренкеншу Р. П. Одноклеточные водоросли: массовое культивирование и практическое использование // Прикладная альгология. - 1999. - №. 1 - 3. - С. 7 - 10.
6. Ben-Amotz A. Industrial Production of Microalgal Cell-mass and Secondary Products – Major Industrial Species *Dunaliella*.// in Handbook of microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Ed. by Amos Richmond. Blackwell Science LTD. 2004. P. 273-280.
7. Zilberman D., Caswell M. Algalculture.- Department of Agricultural and Resource Economics, University of California at Berkeley, 2000. - 100 p.
8. Keerthi et al. Cysted forms of halophilic microalga *Dunaliella salina* under different stress conditions. Current science, Vol. 111, NO. 2, 2016