



УДК. 582.263:639.64

Еркин БАЙМУРЗАЕВ,

PhD, Национальный университет Узбекистана, Ташкент, Узбекистан

E-mail: erkin9414@gmail.com ORCID: 0000-0002-9234-7620

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

КИНЕТИКА ПОТРЕБЛЕНИЯ АЗОТА МИКРОВОДОРОСЛЬЮ *DUNALIELLA SALINA* ПРИ ПЕРИОДИЧЕСКОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Аннотация

Исследована динамика накопления биомассы *Dunaliella salina* и потребления минерального азота при периодическом культивировании. Установлено, что рост культуры имеет типичный сигмоидальный характер с последовательной сменой лаг-, экспоненциальной, стационарной фаз и фазы снижения биомассы. Максимальная концентрация биомассы ($1,10 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) достигалась на 5-е сутки культивирования и сопровождалась интенсивным потреблением азота. К восьмым суткам азот в питательной среде был практически полностью исчерпан, что привело к прекращению роста и снижению биомассы до $0,30 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ к концу эксперимента. Выявлена выраженная обратная зависимость между концентрацией азота и накоплением биомассы, подтверждающая лимитирующую роль азота в развитии *D. salina*. Показано, что оптимальная продолжительность культивирования для получения максимального выхода биомассы составляет 5–7 суток, тогда как азотное голодание может использоваться для индукции синтеза β -каротина и нейтральных липидов. Полученные результаты могут быть использованы при оптимизации технологических режимов промышленного культивирования *D. salina*.

Ключевые слова: *Dunaliella salina*, периодическое культивирование, биомасса, азотное голодание, β -каротин, кривая роста.

DAVRIY KULTIVATSIYA JARAYONIDA *DUNALIELLA SALINA* MIKROSUVO‘TI TOMONIDAN AZOT O‘ZLASHTIRILISH KINETIKASI

Annotatsiya

Dunaliella salina mikroalgasining davriy (batch) kultivatsiyasi sharoitida biomassa to‘planishi va mineral azotning o‘zlashtirilish dinamikasi o‘rganildi. Tadqiqot natijalari madaniyat o‘shining lag, eksponensial, stasionar va biomassa kamayish bosqichlaridan iborat bo‘lgan tipik sigmoidal xarakterga ega ekanligini ko‘rsatdi. Biomassaning maksimal konsentratsiyasi ($1,10 \text{ g/l}$) kultivatsiyaning 5-sutkasida qayd etildi va azotning jadal o‘zlashtirilishi bilan kuzatildi. Sakkizinchi sutkaga kelib oziqa muhitidagi azot deyarli to‘liq tugadi, natijada hujayralar o‘shishi to‘xtab, tajriba oxiriga kelib biomassa $0,30 \text{ g/l}$ gacha kamaydi. Oziqa muhitidagi azot konsentratsiyasi bilan biomassa to‘planishi o‘rtasida yaqqol teskari bog‘liqlik aniqlandi, bu esa azotning *D. salina* o‘shini cheklovchi asosiy omillardan biri ekanligini tasdiqlaydi. Biomassaning maksimal hosildorligini ta‘minlash uchun kultivatsiyaning optimal davomiyligi 5–7 kun ekanligi ko‘rsatildi. Shu bilan birga, azot tanqisligi sharoitida kultivatsiyani davom ettirish β -karotin va neytral lipidlar biosintezini rag‘batlantirish uchun qo‘llanishi mumkin. Olingan natijalar *D. salina* ni sanoat miqyosida yetishtirishning texnologik rejimlarini optimallashtirishda amaliy ahamiyatga ega.

Kalit so‘zlar: *Dunaliella salina*, davriy kultivatsiya, biomassa, azot tanqisligi, β -karotin, o‘shish egri chizig‘i.

KINETICS OF NITROGEN CONSUMPTION BY THE MICROALGA *DUNALIELLA SALINA* IN BATCH CULTURE

Annotation

The dynamics of biomass accumulation and mineral nitrogen uptake by *Dunaliella salina* under batch cultivation conditions were investigated. The culture exhibited a typical sigmoid growth pattern, comprising the lag, exponential, stationary, and decline phases. The maximum biomass concentration (1.10 g L^{-1}) was achieved on the fifth day of cultivation and was accompanied by intensive nitrogen consumption. By the eighth day, nitrogen in the culture medium was almost completely depleted, resulting in growth cessation and a subsequent decline in biomass to 0.30 g L^{-1} by the end of the experiment. A pronounced inverse relationship between nitrogen concentration and biomass accumulation was observed, confirming the limiting role of nitrogen in the growth of *D. salina*. The results indicate that the optimal cultivation period for maximum biomass production is 5–7 days, whereas prolonged cultivation under nitrogen-deficient conditions may be applied to induce the biosynthesis of β -carotene and neutral lipids. These findings provide a scientific basis for optimizing technological regimes for the industrial cultivation of *D. salina*.

Keywords: *Dunaliella salina*; batch cultivation; biomass; nitrogen starvation; β -carotene; growth curve.

Введение. Микроводоросли являются ключевыми агентами глобальных биогеохимических циклов, обеспечивая фиксацию CO_2 и ассимиляцию макроэлементов (азота, фосфора, серы, кремния) в процессе окислительного фотосинтеза [1]. Благодаря высокой метаболической пластичности, эти фотоавтотрофные микроорганизмы эффективно применяются в качестве биоиндикаторов антропогенной нагрузки на гидросистемы [2]. Изучение механизмов поглощения и метаболизма нутриентов критически важно как для моделирования природных сукцессий, так и для оптимизации промышленного культивирования микроводорослей с целью получения ценной биомассы, ее производных или селективного концентрирования элементов [3].

В коммерческой биотехнологии традиционно используются синтетические минеральные среды. Однако высокая стоимость чистых солей существенно увеличивает себестоимость биомассы, что экономически нерентабельно при

монопродуктовой ориентации производства (например, при экстракции только β -каротина) [4]. Для повышения рентабельности биотехнологических систем необходим переход к концепции биорефинирования — комплексной безотходной переработке биомассы с фракционированием на спектр целевых продуктов: белки, липиды, углеводы и пигменты [5].

В естественных и полупромышленных гипергалинных экосистемах массовое развитие популяции облигатного галофила *Dunaliella* лимитируется в первую очередь дефицитом доступных форм азота и фосфора [6]. Доступность данных макронутриентов оказывает регуляторное воздействие на метаболический профиль клеток, фракционный состав фотосинтетических пигментов, активность электрон-транспортной цепи в тилакоидных мембранах, а также на общую кинетику роста и репродуктивный потенциал этой микроводоросли [7].

Согласно экспериментальным данным, наиболее благоприятным источником ассимилируемого азота для поддержания высоких темпов роста *Dunaliella salina* является нитрат натрия (NaNO_3) [8]. Оптимальный диапазон концентраций NaNO_3 для максимизации удельной скорости роста составляет 0.5–1.0 г/л. При этом исследуемый вид демонстрирует уникальную физиологическую толерантность к избытку нутриента: скорость репродукции клеток практически не варьирует при изменении концентрации солей азота в чрезвычайно широких пределах — от 0.25 до 20.0 г/л [9]. Столь широкий ростовой оптимум и стойкость к высоким дозам азотистых соединений обеспечивают штаммам *Dunaliella* значительное технологическое преимущество, делая их идеальными объектами для интенсивного крупномасштабного культивирования в открытых и закрытых фотобиореакторах.

Тем не менее, имеющиеся литературные данные свидетельствуют о существенной гетерогенности физиологического отклика различных видов и штаммов зеленых микроводорослей при варьировании концентраций макронутриентов в питательной среде [10]. Физиологические потребности культуры и кинетика поглощения элементов могут значительно отличаться даже в пределах одного рода.

Исходя из изложенного, цель данной работы — исследовать динамику остаточной концентрации азота в питательной среде при интенсивном культивировании микроводоросли *Dunaliella salina*, а также рассчитать истинную физиологическую потребность культуры в азоте для оптимизации параметров ростовых сред и максимизации выхода биомассы.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали галофильную микроводоросль *Dunaliella salina* из коллекции промышленно ценных микроорганизмов Института микробиологии Академии наук Республики Узбекистан. Культивирование осуществляли на модифицированной питательной среде Артари следующего состава: NaCl — 120 г·л⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 50 г·л⁻¹, KNO_3 — 2,5 г·л⁻¹, K_2HPO_4 — 0,2 г·л⁻¹, NaHCO_3 — 1,0 г·л⁻¹ с добавлением микроэлементов (H_3BO_3 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MoO_3 , NH_4VO_3) в следовых концентрациях. Среду готовили на водопроводной воде.

Культивирование проводили в композитных пластмассовых прямоугольных лотках размером 100 × 200 × 20 см и рабочим объемом 200 л. Перемешивание и аэрацию культуры осуществляли непрерывным барботированием воздухом. Освещённость на поверхности культуры поддерживали на уровне около 20 кЛк, температуру суспензии — в пределах 26–30 °С. Потери воды вследствие испарения ежедневно компенсировали добавлением дистиллированной воды.

Пробы для определения роста культуры и содержания нитратов отбирали ежедневно. Прирост биомассы оценивали тремя независимыми методами: микроскопическим подсчётом клеток в камере Горяева, гравиметрическим определением сухой биомассы и фотометрическим измерением оптической плотности суспензии на фотоколориметре KF-77 Zalimp (Польша). На основании полученных данных строили калибровочные зависимости между оптической плотностью, концентрацией клеток и сухой биомассой культуры. Концентрацию нитрат-ионов в культуральной среде определяли с использованием ион-селективного электрода на иономере И-160М [11].

Результаты и обсуждение. Динамика накопления биомассы *Dunaliella salina* и изменения концентрации минерального азота в питательной среде при периодическом культивировании представлена на рисунке 1. Полученная кривая роста имеет типичный сигмоидальный характер, соответствующий классической схеме периодического культивирования микроводорослей и включающий последовательную смену лаг-, экспоненциальной, стационарной фаз и фазы отмирания.

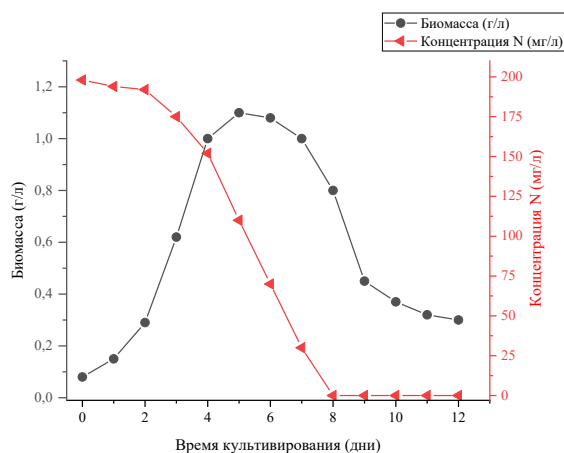


Рисунок 1. Динамика концентрации азота и плотности культуры *Dunaliella salina*

На начальном этапе культивирования (0–2 сутки) прирост биомассы был незначительным — с 0,08–0,10 до 0,28–0,30 г·л⁻¹, — что типично для лаг-фазы и обусловлено адаптацией клеточного метаболизма к условиям среды, включая перестройку ферментативных систем ассимиляции азота. Концентрация азота в этот период сохранялась на уровне 185–205 мг N/л, что свидетельствует о низкой скорости его потребления клетками на стадии физиологической адаптации.

В период с третьих по пятые сутки культура переходила в экспоненциальную фазу роста, о чём свидетельствует более чем трёхкратное увеличение биомассы (с 0,62 до 1,10 г·л⁻¹). Данная фаза сопровождалась интенсивным снижением концентрации азота (со 175 до 100 мг N/л), что согласуется с известной закономерностью сопряжённости скорости клеточного деления с интенсивностью азотного питания, необходимого для синтеза структурных и функциональных белков, нуклеиновых кислот и фотосинтетических пигментов.

На 6–7 сутки культивирования прирост биомассы практически прекратился (1,00–1,05 г/л), тогда как концентрация азота продолжала снижаться (до 40–70 мг N/л), что характеризует переход культуры в стационарную фазу вследствие прогрессирующего лимитирования по азоту. К восьмым суткам содержание азота в среде приближалось к нулевому значению, что свидетельствует о его практически полном исчерпании; одновременно отмечалось снижение биомассы до 0,80 г·л⁻¹, указывающее на начало фазы отмирания.

Дальнейшее культивирование в условиях полного азотного дефицита (9–12 сутки) сопровождалось устойчивым снижением биомассы до 0,30 г·л⁻¹. Данная динамика может быть объяснена прекращением синтеза *de novo* азотсодержащих соединений, снижением фотосинтетической активности вследствие деградации хлорофилл-белковых комплексов и мобилизацией внутриклеточных резервов азота для поддержания базового метаболизма — реакцией, ранее описанной для *D. salina* и других представителей рода как типичный ответ на азотное голодание.

Установленная обратная зависимость между содержанием азота в среде и приростом биомассы подтверждает лимитирующую роль азота в контроле продуктивности культуры *D. salina* при периодическом культивировании. Вместе с тем азотное голодание рассматривается не только как фактор, ограничивающий рост, но и как физиологический триггер накопления вторичных метаболитов — прежде всего β-каротина и нейтральных липидов, — что имеет самостоятельное прикладное значение. С учётом полученных данных выбор стадии сбора биомассы должен определяться целью культивирования: для получения максимального выхода биомассы оптимальным является период 5–7 суток, тогда как продление культивирования в условиях азотного дефицита целесообразно для направленной стимуляции биосинтеза каротиноидов.

Выводы. Установлено, что при периодическом культивировании *Dunaliella salina* максимальная концентрация биомассы (1,10 г·л⁻¹) достигается на пятые сутки и сохраняется на близком уровне до седьмых суток культивирования. Исходное содержание минерального азота (200–205 мг N/л) практически полностью исчерпывается к восьмым суткам вследствие интенсивной ассимиляции клетками, что сопровождается прекращением роста культуры и последующим снижением биомассы до 0,30 г·л⁻¹ к двенадцатым суткам. Полученные результаты подтверждают ключевую регуляторную роль азота в динамике роста *D. salina* и могут служить научной основой для оптимизации технологических режимов культивирования, направленных как на максимизацию выхода биомассы, так и на получение биомассы с повышенным содержанием каротиноидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Maltsev, Y., & Maltseva, K. (2021). Nitrogen and phosphorus concentrations in nutrient media across various taxonomic and ecological groups of microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 33(4), 2121–2135.
2. Borowitzka, M. A. (2018). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. In *Progress in Industrial Microbiology* (Vol. 52, pp. 117–135). Springer, Cham.
3. Wu, Z., Duangmanee, P., Zhao, P., Juntawong, N., & Ma, C. (2016). The effects of light, temperature, and nutrition on growth and pigment accumulation of three *Dunaliella salina* strains isolated from saline soil. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(1), e26732.
4. Chantzistroutsou, X., Ntzouvaras, A., Papadaki, S., Tsirigoti, A., Tzovenis, I., & Economou-Amilli, A. (2023). Carotenogenic Activity of Two Hypersaline Greek *Dunaliella salina* Strains under Nitrogen Deprivation and Salinity Stress. *Water*, 15(2), 241.
5. Charioui, I., et al. (2019). Growth and Carotenoid Production in *Dunaliella* spp. Isolated from Hypersaline Habitats: Effect of NaNO₃ Concentration. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 15, 88–95.
6. Harvey, P. J., & Ben-Amotz, A. (2020). Towards a sustainable bioeconomy: production of β-carotene, omega-3 fatty acids and biodiesel by *Dunaliella salina*. *New Biotechnology*, 56, 126–132.
7. Sui, Y., & Flammini, A. (2024). Optimization of nutrient feeding strategies for high-density cultivation of *Dunaliella salina* in photobioreactors. *Bioresource Technology*, 391, 129910.
8. Kim, M., et al. (2022). Identification and characterization of *Dunaliella salina* OH214 strain newly isolated from a saltpan in Korea. *Algae*, 37(3), 223–234.
9. Srinivasan, R., et al. (2025). Influence of macro-nutrients manipulation on biomass productivity and biochemical composition of *Dunaliella* species. *Journal of Biotechnology*, 402, 45–54.
10. Guedes, A. C., Amaro, H. M., & Malcata, F. X. (2019). Microalgae as sources of high-value bioactive compounds—Insights on industrial production. *Marine Drugs*, 17(10), 540.
11. Методы гидрохимических исследований основных биогенных элементов — М.: Изд-во ВНИРО, 1988. — 25 с.