

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРОВОДОРОСЛИ *DUNALIELLA SALINA* НА
ОТКРЫТОМ ВОЗДУХЕ В СРАВНИТЕЛЬНОМ АНАЛИЗЕ¹Тонких А.К., ²Баймурзаев Е.Н., ³Верушкина О.А.

Институт микробиологии АН РУз, Ташкент

<https://doi.org/10.5281/zenodo.8364690>

Аннотация. В работе изучены одностадийный и двухстадийный методы культивирования Аральского штамма микроводоросли *Dunaliella salina* на открытом воздухе. Показано, что в климатических условиях Узбекистана наиболее предпочтительным методом культивирования Аральского штамма *Dunaliella salina* является двухстадийный метод, при котором в прудах глубиной 30 см при полунепрерывном режиме получают зелёную биомассу, а затем в прудах глубиной 5 см получают жёлтую биомассу с концентрацией каротиноидов 2-3%. При этом за сезон в 4-5 месяцев можно получить с 1 м² прудов приблизительно 2,4 кг сухой жёлтой биомассы.

Ключевые слова: Аральский штамм микроводоросли *Dunaliella salina*, каротиноиды, культивирование на открытом воздухе.

Annotatsiya. Ushbu tadqiqot ishida *Dunaliella salina* mikroshuvo'ti Orol shtammining ochiq havoda etishtirishning bir va ikki bosqichli usullari tadqiq etildi. O'zbekiston iqlim sharoitida *Dunaliella salina* Orol shtammini yetishtirishning eng maqbul usuli ikki bosqichli usul bo'lib, unda chuqurligi 30 sm bo'lgan suv havzalarida yarim uzluksiz rejimda yashil biomassa, so'ngra 5 sm chuqurlikdagi suv havzalarida karotinoid kontsentratsiyasi 2-3% bo'lgan sariq biomassa olinadi. Ushbu usul bilan 4-5 oy davomida, mavsumda 1 m² hovuzdan taxminan 2,4 kg quruq sariq biomassa olish mumkin.

Kalit so'zlar: *Dunaliella salina* mikroshuvo'ti Orol shtammi, karotinoidlar, ochiq havoda etishtirish.

Abstract. In this work, one-stage and two-stage methods of cultivating the Aral strain of microalgae *Dunaliella salina* in the open air were studied. It is shown that in the climatic conditions of Uzbekistan, the most preferred method of cultivating the Aral strain of *Dunaliella salina* is a two-stage method, in which green biomass is obtained in ponds 30 cm deep in a semi-continuous mode, and then yellow biomass with a carotenoid concentration of 2-3% is obtained in ponds 5 cm deep. At the same time, for a season of 4-5 months, approximately 2.4 kg of dry yellow biomass can be obtained from 1 m² of ponds.

Keywords: Aral strain of *Dunaliella salina* microalgae, carotenoids, outdoor cultivation.

Введение. В Аральском море в 2000-2005 годах концентрация солей поднялась выше 100 г·л⁻¹, и в нём в 2005 г впервые была обнаружена галотолерантная микроводоросль *Dunaliella salina* Teodoresco [Sapozhnikov et al., 2010].

Dunaliella salina является объектом промышленного культивирования во многих странах: Австралии, Индии, Израиле, Китае, США и др. как продуцент каротиноидов (до 10% от сухой массы), липидов (до 10% от сухой массы) и глицерина (до 30% сухой массы) [Ben-Amotz, 2009].

В Институте микробиологии АН РУз Аральский штамм *Dunaliella salina* был охарактеризован, изучены особенности его размножения и развития, его химический состав. В частности Аральская популяция *Dunaliella salina* содержит такие же высокие

концентрации каротиноидов, как и описанные в литературе штаммы этой микроводоросли [Тонких и др., 2020].

По данным Продовольственной и Сельскохозяйственной Организации ООН (FAO UN) [The State of Food, 2017], дефицит витамина А или его предшественника β -каротина испытывает 53,0% детей и 38,4% взрослых в Узбекистане. Кроме того, высушенная биомасса *Dunaliella salina* и полученные из неё препараты обладают иммуностимулирующими, антираковыми, антиатеросклеротическими, противовоспалительными, антимикробными, антидиабетическими, антиаллергическими, гепатопротекторными и другими терапевтическими свойствами [Arun & Singh, 2016]. Это предполагает возможность широкого использования препаратов из дуналиеллы в качестве биологически активных добавок и фармпрепаратов.

Промышленное культивирование *D. salina* в Узбекистане и производство на её основе витаминизированных пищевых добавок поможет решить проблему дефицита витамина А у населения и даст импульс к развитию фармпромышленности.

В промышленных масштабах в разных странах *Dunaliella salina* производится исключительно в прудах и лагунах на открытом воздухе. Причём, для получения богатой каротиноидами биомассы дуналиеллы используют различные методы культивирования: одно стадийное или двух стадийное в различных вариантах.

Методы культивирования *Dunaliella salina* основаны на том, что в благоприятных условиях (солёность 40-150 г·л⁻¹, избыток биогенных элементов (К, N, Р), освещённость 5-20 клк, температура 30-40 °С, перемешивание или барботирование воздухом, для обеспечения CO₂) *Dunaliella salina* размножается и развивается в основном в зелёной форме, то есть с содержанием хлорофиллов около 30 мг·г⁻¹ и общих каротиноидов около 2 мг·г⁻¹ сухого веса [Масюк, 1973; Borowitzka, 2005]. При стрессовых условиях (недостаток биогенных элементов, температура выше 40 °С, освещённость выше 30 клк, солёность 250-350 г/л) *Dunaliella salina* накапливает каротиноиды выше 20 мг·г⁻¹ сухого веса и превращается в цисты, содержащие каротиноиды до 100-120 мг·г⁻¹ [Масюк, 1973].

При одно стадийном культивировании в одном пруде, обычно глубиной около 10 см, создают условия, чтобы *Dunaliella salina* размножалась и развивалась в обогащённой каротиноидами форме. При этом содержание каротиноидов получается более низкое, чем при двух стадийном культивировании, но более высокая плотность клеток и продуктивность культуры. Кроме того, используется один тип прудов. [Borovkov et al., 2020].

При двух стадийном культивировании дуналиелла размножается в «зелёной» форме в одних прудах, глубиной 20-30 см, при оптимальных условиях для размножения и роста, а увеличение концентрации каротиноидов происходит в других прудах глубиной 5 см, в которых создают стрессовые условия для максимального накопления каротиноидов «жёлто-красное» культивирование [Масюк, 1973].

Иногда в одном пруде последовательно сначала создают условия для «зелёного» культивирования, а затем создают стрессовые условия для накопления каротиноидов [Borowitzka, Vonshak, 2017].

Целью настоящей работы явилось изучение возможности культивирования Аральского штамма *Dunaliella salina* на открытом воздухе в климатических условиях Узбекистана с использованием различных методов культивирования.

Материалы и методы. Аральский штамм микроводоросли *Dunaliella salina* получен из коллекции микроорганизмов Института микробиологии АН РУз.

На открытом воздухе культивирование проводили в лотках размером 100 x 200 x 20 см из алюминиевых композитных панелей с перемешиванием лопастными мешалками и барботированием воздухом и в композитных пластиковых лотках диаметром 2 м и высотой 0,5 м при перемешивании лопастными мешалками или за счёт барботирования воздухом, при толщине культуральной среды 30 см, при температуре в течение суток 20-42 °С и солнечном освещении.

Микроводоросли культивировали в среде Артари с общей солёностью 240 г·л⁻¹ на водопроводной воде.

Концентрацию микроводорослей определяли тремя методами: 1 – микроскопическим, подсчитывая число клеток в камере Горяева (10⁶·мл⁻¹), 2 – весовым, взвешивая высушенные нитроцеллюлозные фильтры диаметром 5 см и размером пор 0,45 мкм до и после фильтрования через них 10 мл суспензии микроводорослей и 3 – оптическим, измеряя оптическую плотность суспензии на электрическом фотоколориметре KF-77 Zalimp (Польша). На основании этих трёх методов получали калибровочные графики зависимости оптической плотности от количества клеток в 10⁶·мл⁻¹ и биомассы в г·л⁻¹ (рис.1.). В дальнейшем использовали наиболее быстрый и простой метод измерения оптической плотности.

Содержание хлорофиллов и общих каротиноидов в 80% ацетоновых экстрактах определяли спектрофотометрически по формулам:

$$\text{Хлорофилл а: } Cl_a = 12.25 A_{663.2} - 2.79 A_{646.8} \text{ (мг·мл}^{-1}\text{)}$$

$$\text{Хлорофилл b: } Cl_b = 21.5 A_{646.8} - 5.1 A_{663.2} \text{ (мг·мл}^{-1}\text{)}$$

$$\text{Общие каротиноиды: } Car = (1000 A_{470} - 1.82 Cl_a - 85.02 Cl_b)/198 \text{ (мг·мл}^{-1}\text{)}$$

где А-абсорбция света при указанных длинах волн.

В работе использовали микроскоп Leica IM с камерой Leica DFC-280 компании Leica Microsystems (Великобритания).

Освещённость измеряли в люксах с помощью измерителя освещённости CA813 компании AEMC Instrments (USA). Пересчёт люксов в единицы фотосинтетически активной радиации (ФАР) для дневного солнечного света выполняли по формуле: 1000 лк = 18 ± 5 мкмоль·фотонов м⁻²·с⁻¹.

Обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики, определяя средние величины и ошибку средней.

Результаты и их обсуждение. При культивировании в открытых прудах практически невозможно поддерживать культуру *D. salina* чистой. Она контаминируется другими галофильными микроорганизмами, включая и из рода *Dunaliella*, которые не производят высокие концентрации каротиноидов. Чтобы уменьшить содержание посторонних микроорганизмов обычно увеличивают концентрацию солей [Borowitzka, Vonshak, 2017]. При культивировании *Dunaliella salina* в открытых лотках в Ташкенте при общей концентрации солей около 140 г·л⁻¹ чистая культура *D. salina* быстро контаминируется различными галофильными микроорганизмами, попадающими в среду из воздуха с пылью. Наибольший урон при этом наносят шарообразные жгутиковые простейшие, похожие на представителей рода *Noctiluca* размером около 30 мкм, которые питаются представителями рода *Dunaliella*.

Чтобы избавиться от посторонних микроорганизмов концентрацию NaCl повысили до $200 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$, при этом с учётом $50 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, общая концентрация солей стала около $225 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$. При этой концентрации солей диатомовые и хищные простейшие в культуральной среде не появлялись, но остались *Dunaliella salina*, *Dunaliella viridis*, *Dunaliella minuta*, похожие на трихомонады жгутиковые простейшие, и различные бактерии. Доля клеток *D. minuta*, жгутиковых простейших и бактерий была небольшой (ориентировочно не более 3% по объёму). В основном, биомасса клеток состояла из трудно различимых в зелёной стадии *D. salina* и *D. viridis*. *D. viridis* в отличие от *D. salina*, большие концентрации каротиноидов не накапливают, поэтому в общей биомассе содержание каротиноидов получается ниже, чем если бы биомасса состояла исключительно из *D. salina*. Но с этим обстоятельством приходится мириться при культивировании *D. salina* в открытых прудах в условиях Узбекистана.

Далее для выбора наиболее эффективного метода культивирования дуналиеллы были исследованы методы *одностадийного* и *двухстадийного* культивирования.

При *одностадийном* культивировании создают условия, чтобы в одном пруде *D. salina* размножалась и развивалась в обогащённой каротиноидами форме. Для этого все клетки должны подвергаться освещённости выше 20 клк. Для создания такой освещённости толщину культуральной среды делают около 10 см без интенсивного перемешивания, или если толщина среды больше, среду интенсивно вертикально перемешивают, чтобы клетки дуналиеллы регулярно попадали в область интенсивного освещения.

Мы использовали метод интенсивного вертикального перемешивания в лотке с толщиной культуральной среды 30 см. На поверхности лотка освещённость в течение дня достигала 50 клк и все клетки поочерёдно подвергались этой освещённости. Дополнительно для обеспечения культуры углекислым газом проводилось барботирование культуры воздухом.

При добавлении в среду инокулята *D. salina* в концентрации $0,2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ за 30 дней концентрация биомассы выросла до $0,65 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ и из-за недостатка биогенных элементов рост биомассы замедлился. После добавления в среду концентрата биогенных элементов рост биомассы снова увеличился. Таким образом за 4 месяца (июнь-сентябрь) концентрация биомассы выросла до $2,2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$. Концентрация каротиноидов также постоянно увеличивалась и достигла концентрации около $24,0 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Далее в октябре в связи с уменьшением среднесуточных температур увеличение биомассы и каротиноидов остановилось. Таким образом, при одностадийном методе культивирования приблизительно с 3 м^2 площади лотка с толщиной среды 30 см и объёмом среды 900 л и конечной концентрации биомассы около $2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ за сезон 5 месяцев можно получить около 2 кг сухой биомассы или около 0,6 кг с одного квадратного метра поверхности лотка с концентрацией каротиноидов около 2%.

При *двухстадийном* культивировании можно использовать один пруд с одной толщиной культуральной среды (обычно около 15 см) или разные пруды: для зелёного культивирования около 30 см, для жёлтого культивирования около 5 см.

При двухстадийном культивировании в одном пруду (15 см) сначала создают условия для интенсивного размножения клеток в зелёной форме (добавление биогенных элементов, аэрация, если необходимо, то прикрывают пруд от интенсивного света), а затем, когда концентрация биомассы достигает $2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ и более разбавляют среду средой без

биогенных элементов в несколько раз, за счёт чего освещённость клеток увеличивается выше 20 клк и в них усиливается каротиногенез [Borovkov et al., 2021].

В нашем эксперименте в лоток с 15 см культуральной среды была внесена *Dunaliella salina* до концентрации около $0,1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$. В результате барботирования избытком воздуха и внесения биоогенных элементов, без интенсивного вертикального перемешивания, концентрация биомассы через 22 дня увеличилась до $2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$. После этого аэрация и добавления биоогенных элементов были прекращены и увеличение биомассы существенно замедлилось, а концентрация каротиноидов начала увеличиваться. На 40 день концентрация каротиноидов достигла $26 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$ и увеличение каротиноидов остановилось.

Таким образом, за 45 дней с одного квадратного метра поверхности лотка с толщиной среды 15 см и объёмом среды 150 л при концентрации биомассы около $2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$, можно получить 300 г биомассы с концентрацией каротиноидов около 2%. За сезон 5 месяцев с пруда глубиной 15 см при этом методе можно получить около 1 кг биомассы с одного квадратного метра.

В эксперименте с *двухстадийным культивированием*, в лотке с толщиной среды 30 см проводили «зелёное культивирование» при регулярном добавлении биоогенных элементов, избыточной аэрацией и без интенсивного вертикального перемешивания. При этих условиях подвижные клетки *D. salina* могут сами выбирать себе глубину, при которой освещённость для них будет наиболее комфортной.

Если в лоток содержащий среду с общей солёностью около $225 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$, добавить инокулят *D. salina* до концентрации около $0,2 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$, то за 5-6 дней концентрация биомассы повысится до $0,5 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$. Затем увеличение массы культуры замедляется из-за истощения запасов биоогенных элементов (N, P, K). После добавления концентрата биоогенных элементов рост культуры возобновляется. За 24 дня концентрация биомассы увеличивается до приблизительно до $2,0 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$. Для стимуляции накопления каротиноидов за счёт увеличения освещённости увеличивать концентрацию биомассы не имеет смысла, так как при большой оптической плотности культуры трудно добиться стрессирующей их освещённости. Поэтому был использован метод полунепрерывного (квазинепрерывного) культивирования, при котором при достижении концентрации биомассы около $2,0 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$, половина культуральной среды с клетками отбирали и помещали в лотки с толщиной среды 5 см. В лотки глубиной 30 см добавляли свежую среду и продолжали культивирование. За 5-6 дней концентрация биомассы увеличивалась до $2,0 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ и отбор половины среды повторяли.

В лотках глубиной 5 см клетки *D. salina* за 3-4 дня накапливали каротиноиды и становились жёлтыми. Далее за 1-2 дня они теряли способность к движению и превращались в красные апланоспоры. Однако, в этом лотке смесь необходимо перемешивать лопастной мешалкой. Без перемешивания, сверху образовывалась корка соли и под ней культуральная среда нагревалась на солнце выше 60°C . Клетки дуналиеллы при такой температуре разрушались. С перемешиванием и добавлением воды среда не нагревалась выше 42°C .

Таким образом, через 5-6 дней культуральная среда в лотке глубиной 5 см содержит, в основном, красные апланоспоры *D. salina* и зелёные клетки *D. viridis*. Содержание общих каротиноидов в этой смеси клеток рода *Dunaliella* было $20\text{-}30 \text{ мг} \cdot \text{г}^{-1}$ сухой биомассы.

Климатические условия Узбекистана позволяют выращивать зелёную биомассу микроводорослей рода *Dunaliella* на открытом воздухе 6 месяцев в году и из них только 4 месяца безоблачного неба подходят для получения жёлтой биомассы.

Исходя из разницы толщины культуральной среды в лотках «зелёного» и «жёлтого» культивирования и времени культивирования в каждом пруде, на 1 м² площади прудов глубиной 30 см необходимо 4-5 м² прудов глубиной 5 см.

При содержании биомассы около 2,0 г л⁻¹ с 1 м² поверхности пруда при толщине среды 5 см за 5 дней можно получить 100 г жёлтой биомассы с содержанием общих каротиноидов 2-3%. За сезон 4 месяца можно получить с 1 м² **приблизительно 2,4 кг** сухой жёлтой биомассы.

Таким образом, *двухстадийный* метод культивирования микроводорослей рода *Dunaliella* в прудах глубиной 30 см и 5 см является предпочтительным для климатических условий Узбекистана.

Для расчёта себестоимости и экономической эффективности производства сухой жёлтой биомассы Аральской дуналиеллы необходимо провести эксперименты на экспериментальной пилотной миниплантации с площадью прудов около 1000 м².

Вывод. Наиболее предпочтительным методом культивирования Аральского штамма *Dunaliella salina* в климатических условиях Узбекистана является двухстадийный метод при культивировании в зелёной форме в прудах глубиной 30 см и для получения богатых каротинами клеток, культивирование в прудах глубиной 5 см.

REFERENCES

1. Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella Teod.* и перспективы его практического использования. Киев: Наукова думка, 1973. 244 с.
2. Тонких А.К., Фёдорова О.А., Верушкина О.А., Разаков Р.М. Мирзарахметова Д.Т. Микроводоросль *Dunaliella salina* из водоёмов Приаралья//Вестник Аграрной науки Узбекистана. 2020. №3 (81). С.176-180.
3. Arun N., Singh D.P. A review on pharmacological applications of halophilic alga *Dunaliella* // *Indian Journal of Geo-Marine Science*, 2016, vol. 45 (3), pp. 440-447.
4. Ben-Amotz A. Bioactive Compounds: Glycerol Production, Carotenoid Production, Fatty Acids Production. In: *The Alga Dunaliella: Biodiversity, Physiology, Genomics and Biotechnology* /Ami Ben-Amotz, Jürgen E.W. Polle, D.V. Subba Rao (Eds.). Enfield, New Hampshire, USA: Science Publishers, 2009, pp. 189-208.
5. Borovkov A.B., Gudvilovich I.N., Avsiyan A.L. Scale-up of *Dunaliella salina* cultivation: from strain selection to open ponds// *Journal of Applied Phycology*. 2020. V.32. P.1545-1558 <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02104-5>
6. Borowitzka M.A., Vonshak A. Scaling up microalgal cultures to commercial scale// *European Journal of Phycology*. 2017. V. 52, No. 4, 1569-418. <https://doi.org/10.1080/09670262.2017.1365177>
7. The State of Food Security and Nutrition in Europe and Central Asia. Report 2017. //Food and Agriculture Organization of the United Nations, Budapest, 2017, 72 p. (www.fao.org/publications).
8. Sapozhnikov F.V., Arashkevich E.G., Ivanishcheva P.S. Chapter XIV Biodiversity. In: *The Handbook of Environmental Chemistry. Vol. 7: The Aral Sea Environment, 1st Edition.* / A.G.

Kostianoy and A.N. Kosarev (Eds.). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2010, pp. 235–282.
<https://www.nhbs.com/the-aral-sea-environment-book>. DOI 10.1007/698.2009.36.