

А. Б. БОРОВКОВ¹, З. Т. САФИУЛЛИН², Н. В. ПАНЧЕНКО²**РОСТ *DUNALIELLA SALINA* В СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЕ**

Представлена возможность культивирования зеленой галобной микроводоросли *Dunaliella salina* в условиях систематического заражения культуры цианобактериями и диатомовыми микроводорослями. Показано управление ростом смешанной культуры с помощью таких факторов, как соленость, температура, механическая чистка.

Морские микроводоросли являются источником целого ряда уникальных биологически активных веществ (БАВ) [4]. Накопленные к настоящему времени данные по культивированию морских микроводорослей позволяют утверждать, что при соблюдении определенных условий они могут выращиваться в интенсивной культуре в массовом количестве и использоваться в практических целях [2]. Условия стерильности при промышленном культивировании обычно значительно хуже лабораторных, что приводит к постоянному внесению в культиваторы других микроводорослей. Это обстоятельство вынуждает исследовать рост смешанной культуры и управление им для приведения культуры к альгологически чистой. Цель нашей работы состояла в изучении возможности культивирования зеленой галобной микроводоросли *Dunaliella salina* в смешанной культуре.

Материал и методы. Работа выполнена на базе предприятия «Кайлас» (г. Симферополь, Крым) с 23 июня по 25 октября 2004 г. Зеленая галобная микроводоросль *Dunaliella salina* была получена из коллекции микроводорослей ИнБЮМ НАН Украины. Культиваторами служили прямоугольные бассейны 2 × 2,5 м из пищевой полиэтиленовой пленки толщиной 150 мкм, уложенной на выровненную поверхность грунта и закрепленной на ограждающих конструкциях с помощью деревянных планок. Для культивирования использовали модифицированную питательную среду Ben-Amotz [3]. Пресную воду для её приготовления брали из скважины, расположенной на территории предприятия. Источником NaCl, MgSO₄, CaCl₂ в среде служила морская соль. Культиваторы размещались в стандартной стеклянной теплице для выращивания сельскохозяйственных культур. В эксперименте водоросли выращивали при естественном освещении методом непрерывных культур. Максимальная освещенность в географический полдень (12^{h30}) достигала 110 клк. Суточная температура колебалась в пределах 24 – 36°C (первые два этапа эксперимента) и 16 – 28°C (третий этап эксперимента). Ежесуточный обмен составлял 10 %. Объем культуры в каждом культиваторе составлял 250 л, при высоте слоя раствора 5 см. Этот объем на протяжении всего эксперимента поддерживали, доливая пресную воду перед измерениями до отметки 5 см. Культуры постоянно перемешивали с помощью аквариумного электронасоса «Струмок». Суспензии микроводорослей барботировали газовой воздушной смесью, которую создавали с помощью аквариумного компрессора «Махіта», производительностью 4,8 л/мин и углекислоты из газового баллона высокого давления. Углекислоту смешивали с воздухом в микрокамере из полиэтиленовой трубки. Подачу углекислоты в смеситель осуществляли через тонкий капилляр (медицинскую иглу).

Оптическую плотность (пропускание) при длине волны 750 нм, D₇₅₀ измеряли с помощью концентрационного фотоэлектроколориметра КФК-2; абсолютная погрешность при измерении величины пропускания не превышает 1,0 %, размах показаний, определяющий случайную погрешность, не превышает 0,3 %. Число клеток, млн/мл, определяли в камере Горяева под световым микроскопом при увеличении 360. Температуру измеряли ртутным термометром, 0 - 100, абсолютная погрешность 0,5 %.

© А. Б. Боровков, З. Т., Сафиуллин, Н. В. Панченко, 2005

Результаты и обсуждение. Поскольку для приготовления питательных сред использовали воду из скважины, которая предположительно содержала клетки диатомовых микроводорослей и цианобактерий, заражение культуры *D. salina* было неизбежным. Оптическая плотность культуры возрастала пропорционально росту числа клеток *D. salina* на единицу объема. Культура цианобактерий росла более динамично, но это не сказалось на динамике оптической плотности (рис. 1). Цианобактерии были представлены соединенными попарно цилиндрическими клетками, размерами в несколько раз меньшими, чем *D. salina*. Численность диатомей также возросла, но несущественно. Стационарное состояние сообщества характеризовалось следующими показателями: $D_{750} - 0,78$ ед.опт.пл.; *Dunaliella salina* – 1,5 млн. кл./мл; цианобактерии – 12,7 млн. кл./мл., диатомей – 0,2 млн. кл./мл. После выхода сообщества по численности на стационар начали второй этап эксперимента, в ходе которого соленость среды повысили с 60 г/л до 120 г/л. После повышения солености наблюдали резкий скачок оптической плотности культуры (рис. 1), незначительное повышение числа клеток *D. salina* (рис. 2), снижение числа клеток цианобактерий (рис. 3). Постепенно происходила смена цианобактерий в бассейне: попарно соединенных клеток становилось меньше, но появился новый вид, представленный одиночными клетками значительно меньших размеров. Численность диатомовых микроводорослей в первый же день снизилась вдвое, и на 4 день данный вид при микроскопировании уже не обнаруживался (рис. 4).

Стационарное состояние сообщества при повышенной солености характеризовалось следующими показателями: $D_{750} - 1,1$ ед. опт. пл.; *D. salina* – 3,6 млн. кл./мл; цианобактерии – 10,6 млн. кл./мл. Благодаря подвижности клеток *D. salina*, удалось найти способ механической очистки культуры от сопутствующих цианобактерий, который состоял в следующем: по достижении стационарного состояния аккуратно с поверхности бассейна выкачали 4,5 см культуры, затем, тщательно вымыв дно и стенки бассейна от осадка, вернули культуру *D. salina* обратно в бассейн. После этого режим выращивания при 120 г/л морской соли и 0,1 обмене поддерживался до конца эксперимента. После механической чистки бассейна на третьем этапе культивирования наблюдали двукратное снижение числа клеток *D. salina*, двукратное снижение оптической плотности и пятикратное снижение численности цианобактерий (рис. 3). При этом соединенные попарно клетки исчезли окончательно и остались только одиночные круглые. Через 3 дня после механической чистки сообщество пришло в стационарное состояние: $D_{750} - 0,61$ ед.опт.пл.; *D. salina* – 2,4 млн. кл./мл; цианобактерии – 6,6 млн. кл./мл. Стационар характеризовался заниженными показателями в связи с более низким температурным режимом (рис. 1).

Механическую чистку бассейна можно рассматривать как один из способов осуществления непропорционально-проточного режима культивирования. Данный режим позволяет выращивать смешанные культуры организмов с заданным соотношением видов в альгоценозе [1]. Для поддержания культуры *D. salina* альгологически чистой требуется проведение процедуры очистки промышленных бассейнов не реже одного раза в три дня – для вытеснения цианобактерий не достигших максимальной плотности. Стабилизацию температуры на уровне 23°C, т.е. 16°C – ночью и 28°C – днем, также можно использовать для поддержания *D. salina* альгологически чистой, так как понижение температуры до этого уровня незначительно снижает прирост *D. salina* и существенно снижает прирост цианобактерий.

Вышеприведенные способы борьбы с заражением основной культуры посторонними микроводорослями наиболее действенны при солености среды 120 кг/м³ хлорида натрия.

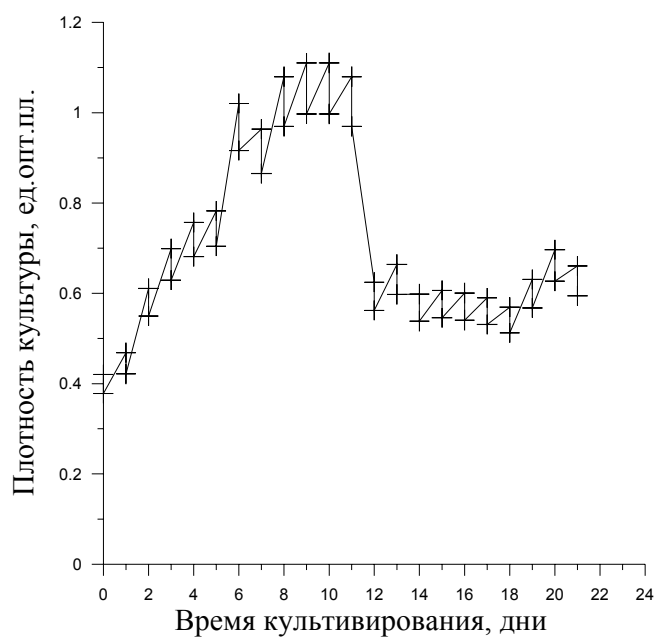


Рисунок 1. Динамика оптической плотности смешанной культуры *D. salina*, диатомовых микроводорослей и цианобактерий в квазинепрерывном режиме
Figure 1 Dynamics of optical density of mixed culture *D. salina*, diatomic microalgae and blue-green algae in the quasicontinuous regime

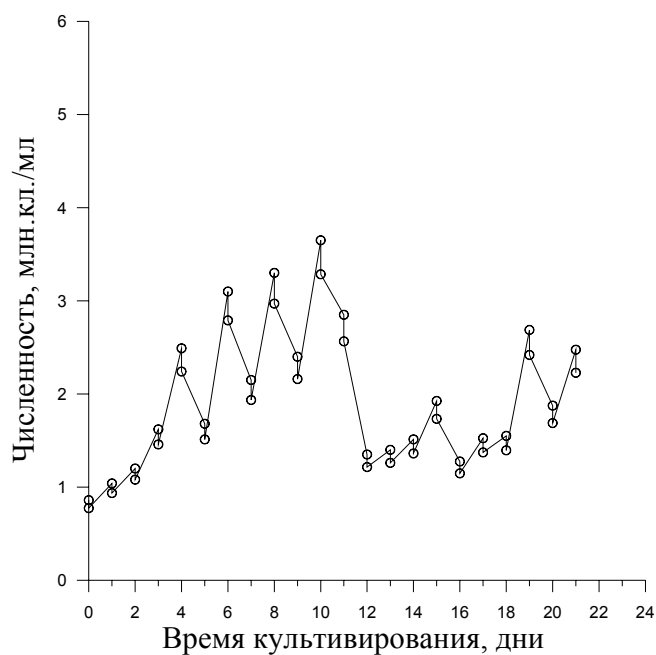


Рисунок 2. Динамика численности культуры *D. salina* в квазинепрерывном режиме
Figure 2. Dynamics of culture *D. salina* quantity in the quasicontinuous regime

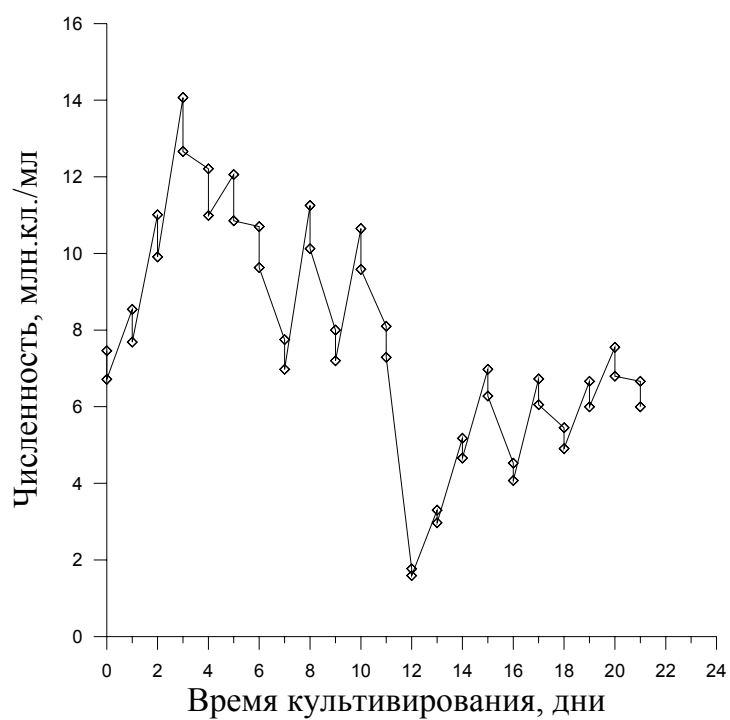


Рисунок 3. Динамика численности культуры цианобактерий в квазинепрерывном режиме
Figure 3. Dynamics of blue-green algae culture quantity in the quasicontinuous regime

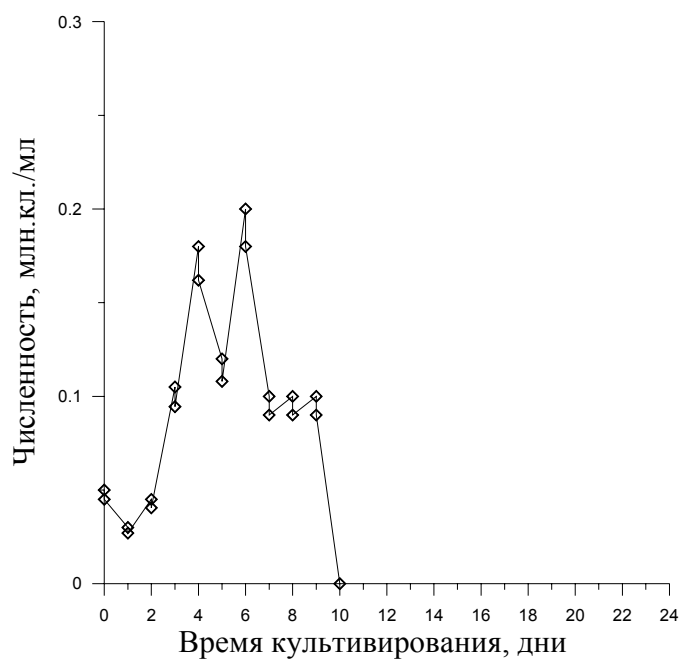


Рисунок 4. Динамика численности культуры диатомовых водорослей в квазинепрерывном режиме
Figure 4. Dynamics of diatoms culture quantity in the quasicontinuous regime

Заключение. Разработаны рекомендации по технологии выращивания *Dunaliella salina* по сохранению культуры альгологически чистой при заражении ее цианобактериями и диатомовыми микроводорослями. При систематическом внесении цианобактерий или диатомей рекомендуемый уровень солености – 120 кг/м³ хлорида натрия (морской соли). Необходимо систематически проводить механическую чистку бассейнов (один из способов осуществления непропорционально-проточной системы культивирования). Допускается проведение мероприятий по стабилизации суточной температуры на уровне 18 - 28°C. При случайном и единичном внесении культуры цианобактерий или диатомей извне - рекомендуется временно поднять уровень солености до 120 кг/м³. За время необходимое для двойного обмена среды по объему провести несколько механических чисток бассейнов.

1. Кокова В. Е., Лисовский Г. М. Непропорционально-проточная культура простейших. - Новосибирск: Наука, 1976. – 76 с.
2. Тренкениш Р. П. Одноклеточные водоросли: массовое культивирование и практическое использование // Прикладная альгология. - 1999. - №. 1 - 3. - С. 7 - 10.
3. Shaish A., Avron M., Ben-Amotz A. Effect of inhibitors on the formation of stereoisomers in the biosynthesis of β -carotene in *Dunaliella bardawil* // Plant. Cell. Physiol. - 1990. - **31**, No. 5. – P. 689 – 696.
4. Zilberman D., Caswell M. Algalculture.- Department of Agricultural and Resource Economics, University of California at Berkeley, 2000. - 100 p.

1 – Институт биологии южных морей НАН Украины,
г. Севастополь

2 – ООО «Кайлас», г. Симферополь

Получено 20.06.2005

A. B. BOROVKOV, Z. T. SAFIULLIN, N. V. PANCHENKO

DUNALIELLA SALINA GROWTH IN THE MIXED CULTURE

Summary

The possibility of cultivation of green microalgae *Dunaliella salina* in conditions of regular infestation with culture blue-green algae and diatomic microalgae is carried out. Control of body height in mixed culture with the help of such factors, as the salinity, temperature, mechanical cleaning is shown.