

**ЗЕЛЕНАЯ МИКРОВОДОРОСЛЬ *DUNALIELLA SALINA* TEOD. (ОБЗОР)**

На основе литературных данных дано описание внешнего вида, строения и размножения зеленой микроводоросли *Dunaliella salina* Teod. Рассматривается влияние экологических факторов (солености, элементов питания, pH среды) на жизнедеятельность клеток этого вида водорослей. Перечисляются области естественного обитания микроводоросли. Проводится анализ способов индукции повышенного синтеза и накопления  $\beta$ -каротина клетками *Dunaliella*.

**История обнаружения и краткая характеристика *Dunaliella salina* Teod.** Красное “цветение” гипергалинных водоемов обнаружили очень давно (1836 г.), однако о причинах его возникновения ученые спорили почти 100 лет. И лишь Дюналь [см. 14] первый связал это явление с развитием микроскопических водорослей, которые впоследствии стали объектом изучения широкого круга специалистов.

Наибольшую известность среди ботаников и специалистов-практиков получил род *Dunaliella* семейства Dunaliellaceae, описанный еще в 1905 г. Род водоросли был назван в честь Дюналя, который первым дал правильное объяснение “красного цветения” морской воды. История изучения водоросли подробно изложена в [14].

Род включает 29 солоноводных, морских, пресноводных и почвенных видов; 6 из них найдены на территории Украины исключительно в соленых водоемах. Хорошо известна *D. salina* – дуналиелла солоноводная, развивающаяся в гипергалинных водоемах юга Украины (степной Крым). В массовом количестве она вызывает красное “цветение”, особенно яркое в период летнего испарения воды из мелководных лагун. На поверхности последних образуется солевой концентрат в виде пластинок из кристаллов соли, а под ними теплая соленая вода (рапа). Водоросль является активным продуцентом глицерола, ряда жирных кислот,  $\beta$ -каротина (провитамина А).

Клетки водоросли разнообразной формы – овальные, эллипсоидные, яйцевидные, грушевидные, иногда шаровидные, цилиндрические или веретеновидные; радиально- или билатерально симметричные, редко дорсовентральные или слегка ассиметричные [14]. Размеры клеток разнообразны: их длина может колебаться от 2,8 до 40 мк, ширина от 1,5 до 20 мк, объём от 8 до 4500 мк<sup>3</sup>. Наиболее подробные иллюстрации по изменчивости дуналиелл имеются в [14], где представлены материалы по гомологическим рядам модификационной изменчивости видов дуналиелл. Это важно учитывать для контроля чистоты культуры, поскольку при выращивании клетки *D. salina*, окруженные лишь плазмолеммой, склонны к метаболии. Проявление последней наиболее сильно выражено при технологическом процессе, когда водоросли подвергаются различным воздействиям (например, перемешиванию, сепарированию, осаждению, фильтрации и т.д.).

Важную дополнительную информацию при идентификации организма имеет хлоропласт, по цвету чаще всего зеленый, иногда желтый, бурый до красного. В эксперименте способность изменять цвет проявляется как реакция на неблагоприятные условия существования. По форме хлоропласт обычно чашевидного типа с пиреноидом и глазком, реже без них. Пульсирующие вакуоли (одна или две) встречаются только у пресноводных видов. По обе стороны от папиллы, на выпуклом апикальном конце клетки прикреплены два жгутика. Обычно жгутики одинаковой длины, равной или превышающей длину клетки. У молодых, только что разделившихся клеток один из жгутиков может быть короче другого.

Клетки *D. salina* изоконтны и характеризуются веслоподобным движением жгутиков. Как и вся клетка, жгутики покрыты протоплазматической мембраной. Их тонкая структура характеризуется обычной конструкцией (9 + 2).

Для *D. salina* характерны вегетативный, бесполой и половой типы размножения. Первый является преобладающим, происходит преимущественно в темноте путём поперечного деления клеток. Последовательность деления органелл строго не детерминирована и легко нарушается, особенно в старых культурах. При этом образуются уродливые формы [14].

В неблагоприятных условиях *D. salina* способна образовывать цисты бесполого происхождения. Цисты имеют шаровидную форму, толстую двойную оболочку и гранулированное содержимое, освобождение которого при прорастании происходит через щель в оболочке. Перед прорастанием цисты её содержимое красного цвета зеленеет и делится с образованием 2 – 4 клеток.

Половой процесс у *D. salina* – гологамного типа. Копуляция может происходить как на свету, так и в темноте. В результате слияния двух клеток образуется неподвижная зигота, покрытая оболочкой (иногда слоистой). Перед прорастанием происходит редукционное деление с образованием 2 – 32 клеток. Количество клеток обусловлено размерами зиготы и условиями, в которых она развивается.

**Географическое распространение.** *D. salina* отмечена в Европе (Средиземноморье, побережье Черного, Азовского и Каспийского морей), Азии (степная зона Западной Сибири, Казахстан, Средняя Азия, Индия, Ява), Северной Америке (штаты Калифорния, Невада, Юта), Южной Америке (Чили), северной Африке (Алжир, пустыня Сахара) и Южной Австралии. В наиболее северных, менее характерных для данного вида местонахождениях (окрестности Иновроцлава, Польша; оз. Карачинское, Новосибирская обл.), обнаружены морфологически отклоняющиеся от типа популяции. На территории всего Земного шара этот вид представлен в аридных зонах (пустыни, степь, реге лесостепь), т. е. в условиях, способствующих образованию водоемов с высокой степенью минерализации воды. Гипергалинные водоемы, населенные *D. salina*, размещены не только во внутриконтинентальных, аридных или субаридных областях, но чаще всего — на побережьях морей и океанов. Таким образом, *D. salina*, отмеченная на пяти континентах, имеет мультирегиональный тип ареала.

**Экологическая толерантность.** Общей особенностью всех соленых водоемов является нестабильный солевой режим, на основании чего их относят к пойкилогалинным водоемам, в отличие от морских и пресных — гомойогалинных. Нестабильный солевой режим соленых водоемов является основным контролирующим фактором развития в них альгофлоры. Поэтому водоросли представлены здесь немногочисленными, исключительно пластичными видами, способными выдерживать резкие перепады и широкие границы солености.

Исследование эколого-физиологических, биохимических и цитологических особенностей гипергалофильных видов *Dunaliella* позволили пролить свет на механизм солеустойчивости. Феноменальная стойкость *D. salina* к резким осмотическим сдвигам не является результатом изоляции клеток от внешней среды и поддержания в них гомеостатических условий. Наоборот, эта устойчивость является результатом легкой проницаемости ряда плазматических мембран для воды и некоторых ионов, вследствие чего происходит быстрое уравнивание внешнего и внутреннего осмотического давления. Эти процессы, в свою очередь, сопровождаются резкими перепадами концентрации клеточного сока, что выдвигает новые проблемы приспособления внутриклеточных структур, фотосинтетического аппарата и белков плазмы к этим условиям. Данные многих авторов свидетельствуют о том, что с увеличением солености окружающей среды в клетках *Dunaliella* происходит перестройка пигментного аппарата, дыхательного и фотосинтетического метаболизма, нуклеинового обмена, смена активности терминальных оксидаз, обеспечивающие выживание этих водорослей в экстремальных условиях существования [13].

Согласно экспериментальным данным, амплитуда солености, которую выдер-

живает *D. salina*, находится в пределах 30 – 300 г/л [14, 19], по мнению других авторов, – 2,5 – 500 г/л [41].

Таким образом, экспериментальные данные подтверждают наблюдения в естественных условиях, свидетельствуя об эвригалобном характере этих видов и опровергая взгляд на них как на стеногалобные, облигатно гипергалобные организмы.

Резкое изменение осмотического давления при внезапном разбавлении концентрированной среды приводит к разрушению и гибели клеток *Dunaliella*. Однако А. П. Артари [14] установил, что *D. salina* может выдерживать внезапное изменение концентрации питательного раствора на 6, 12, 15 и даже 18 % в сторону уменьшения и на 6 - 12 % в сторону увеличения. При этом доказано, что способность приспосабливаться к резким изменениям концентрации окружающей среды является феноменом, свойственным индивидуальным клеткам, не зависящим от гетерогенности и генетической варибельности популяции. Благодаря своей выдающейся солеустойчивости гипергалобные виды *Dunaliella* являются исключительно удобными модельными объектами для изучения механизма галофилии.

Массовое развитие *Dunaliella* в естественных бассейнах чаще всего лимитируется недостатком биогенных элементов, азота и фосфора [14, 42]. Эти элементы влияют на характер метаболизма, состав пигментов, активность фотосинтетических процессов, рост и развитие *Dunaliella* [14, 28].

Как известно, зеленые водоросли способны усваивать азот органических и неорганических соединений. Основными источниками минерального азота являются нитраты, нитриты и соли аммония. Способность водорослей к утилизации различных форм азота в значительной степени зависит от активной реакции окружающей среды.

По данным А. П. Артари и Е. С. Милько, наиболее благоприятным источником азота для роста *D. salina* является азотнокислый натрий. Оптимальная для роста этих водорослей концентрация  $\text{NaNO}_3$  0,5 - 1 г/л, однако темп их размножения почти не зависит от концентрации  $\text{NaNO}_3$  в пределах 0,25 — 20 г /л [19]. Виды *Dunaliella* хорошо выдерживают насыщенные растворы нитратов. Широкий ростовой оптимум концентрации различных ингредиентов питательного раствора, особенно стойкость к высоким дозам азота, является большим преимуществом *Dunaliella* как объектов массового культивирования.

Источником фосфора для видов *Dunaliella*, как и для большинства других зеленых водорослей, служат фосфаты. Из них наиболее благоприятным для роста оказался калий фосфорнокислый двузамещенный, так как большинство видов *Dunaliella* предпочитает щелочную реакцию среды [19, 43]. Ростовой оптимум концентрации фосфатов для *D. salina* находится в пределах, известных для других водорослей (0,02—0,25 г /л  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) [19, 44]. Рост видов *Dunaliella* наблюдался в широких концентрационных пределах 0,004 — 5 г /л  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , хотя последняя доза угнетала рост водорослей [19].

Сера принадлежит к элементам, входящим в состав всех живых организмов. Минимальные дозы сульфата магния, необходимые для нормального развития видов *Dunaliella*, находятся в пределах до 2 г/л [11, 40, 43]. В естественных эвгалинных и гипергалинных водоемах сернокислый ион имеется в достаточном количестве, обеспечивающем нормальный рост и размножение клеток *Dunaliella*. Концентрация калия и магния в воде эвгалинных и гипергалинных водоемов намного превышает минимальные потребности водорослей [41]. Литературные данные относительно потребности водорослей в кальции довольно противоречивы. По [14], хлористый кальций в концентрации 0,02 – 2 г/л стимулирует рост культуры *D. salina* на питательной среде Артари, ускоряя темп деления клеток. Однако большинство исследователей считает, что следовых концентраций Са вполне достаточно.

Потребность в  $\text{Na}^+$  у видов *Dunaliella* оказалась специфической, так как другие одновалентные ионы не могут заменить натрий в питательной среде [45]. Специфиче-

ская потребность в натрии, по-видимому, является общим феноменом для обитателей эв- и гипергалинных вод. У видов *Dunaliella* минимальная потребность в натрии значительно выше, чем в других элементах морской воды [44].

Хлор является основным галогеном в составе большинства, если не всех, водорослей. Галобионтный вид *D. salina* не может расти без Cl [11]. А. П. Артари также заметил, что «в крепких растворах  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  рост *D. salina* лучше в том случае, когда защитную роль выполняет NaCl, а не  $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$ , т. е. тогда, когда анионы разные» [14]. Ростовый оптимум Cl/SO<sub>4</sub> для *D. salina* составляет 3,2, а оптимум накопления каротина — 8,6 [11].

Микроэлементы являются одним из решающих факторов распространения водорослей в природе. Считают, что изготовление карт распределения ростовых веществ и микроэлементов в водоемах с учетом их сезонной периодичности позволит установить закономерности в распространении и сроках возникновения «цветения» воды [44]. Существует многочисленная литература, в которой проблема микроэлементов в жизни водорослей освещается с разных точек зрения. Однако данные, касающиеся непосредственно представителей рода *Dunaliella*, очень скудны.

Спектральный анализ солей Сакского и Сасык-Сивашского солепромыслов в Крыму [14] показал, что марганец и медь в этих образцах представлены в следовых количествах, а цинк, бор, кобальт и молибден отсутствуют. Обогащение естественной рапы из Сакских водоемов раствором микроэлементов по Гютнеру в опытах увеличивало урожай двухнедельной культуры *D. salina* в два раза.

Искусственные питательные среды, рекомендованные для выращивания *Dunaliella*, содержат более или менее разнообразный набор микроэлементов [19, 40, 42, 43], однако эти рекомендации в большинстве случаев не базируются на точном эксперименте.

Согласно В. В. Упитису [39] существуют микроэлементы с широкой амплитудой оптимума концентрации в среде (Mn, Mo, Co, Cr, Fe, V) и узкой амплитудой (Cu, Zn, Ni, Ti, V, W). Кроме теоретических выкладок он приводит и конкретные экспериментальные данные (свои и других исследователей). Эксперименты Р. П. Тренкеншу и В. Н. Белянина [38] показывают, что при отсутствии лимитирования по макроэлементам развитие культуры определяется соотношением микроэлементов.

Жизнедеятельность каждого организма возможна в определенных пределах концентрации H и OH-ионов. Кроме непосредственного влияния на жизнеспособность, скорость вегетативного деления или зооспорообразование водорослей, pH играет опосредованную регуляторную роль в их питании, определяя количество доступного железа в среде, соотношение различных форм азотного и углеродного, автотрофного и гетеротрофного питания.

Минерализованные эв- и гипергалинные воды благодаря наличию карбонатно-бикарбонатной системы характеризуются устойчивыми буферными свойствами и нейтрально-щелочной активной реакцией. При этом суточные и сезонные колебания pH очень незначительны. Поэтому большинство представителей рода *Dunaliella*, обитая в гипер- и эвгалинных водоемах, являются стеноионными организмами, предпочитающими нейтрально-щелочную реакцию среды и не выдерживающими резких изменений.

Типичный гипергалоф *D. salina* в естественных условиях встречается в диапазоне pH 6,5 — 9,5 [11]. Согласно [19], рост *D. salina* не зависит от pH равного 7 — 9. По [17], этот вид сохраняет жизнедеятельность при pH 6 — 10,5, по данным Милько — при pH 5,5 — 10. Однако Е. В. Юрина [40] свидетельствует, что при pH 10,8 *D. salina* еще продолжает фотосинтезировать. Ростовый оптимум pH для этого вида 8 — 9 [17].

Минерализованные водоемы характеризуются своеобразным температурным режимом. Летом температура рапы достигает 80°C, зимой, благодаря высокой концентрации солей, снижающих точку ее замерзания, охлаждается до 30—32°C ниже нуля.

Таким образом, амплитуда сезонных температурных колебаний соленых водоемов может достигать 110°C и более. Амплитуда суточных температур также достаточно велика. Поэтому виды *Dunaliella*, обитающие в этих водоемах, характеризуются исключительной термотолерантностью и могут служить прекрасными модельными объектами для исследования механизмов морозоустойчивости, жароустойчивости и стойкости к резким температурным сдвигам.

Таким образом, гиперглобные виды *Dunaliella* характеризуются более высокой жароустойчивостью по сравнению с большинством других зеленых водорослей, приближаясь в этом отношении к некоторым термофильным организмам. Как известно, высокий температурный максимум является ценным свойством водорослей — объектов массового культивирования, в частности потому, что термофильные организмы обладают более высокой потенциальной продуктивностью по сравнению с мезофильными.

Характеризуясь значительной теневыносливостью, виды *Dunaliella* вместе с тем являются гелиофильными организмами [11]. Так, в условиях Сакского и Сасык-Сивашского водоемов при 65 000 лк/с красные клетки *D. salina* скапливаются в поверхностном слое рапы, образуя пленку [11]. Аналогичная картина наблюдалась и при более высокой освещенности порядка 100 тыс. лк и выше.

Таким образом, *Dunaliella salina* выдерживает широкую амплитуду экстремальных значений различных факторов внешней среды (общей солености, содержания и соотношения отдельных осмотически действующих и биогенных элементов, температуры, освещенности). Следует подчеркнуть, что оптимальные для этих водорослей значения некоторых параметров (например, освещенности, температуры) близки к тем, которые известны для других Chlogophyta, однако по своей устойчивости к их крайним, экстремальным значениям виды *Dunaliella* намного их превосходят. Кроме того, представители этого рода характеризуются исключительной устойчивостью к резким и глубоким изменениям абсолютных значений этих факторов.

Пределы устойчивости, обнаруженные в экспериментальных условиях, как правило, хорошо согласуются с экологической амплитудой этих организмов, наблюдаемой в природе. Однако в отдельных случаях экспериментальные границы устойчивости к крайним значениям некоторых факторов среды оказались более широкими по сравнению с наблюдаемыми в естественных условиях.

**Пигментный состав.** Согласно [16], анализ пигментного состава дуналиелл на примере 12 штаммов и видов показал, что на долю хлорофилла *a* приходится 50 - 59 % присутствующих в клетке пигментов, на долю хлорофилла *b* 19 - 25 % суммы последних. Еще меньше доля каротиноидов, в том числе с учетом лютеина, антраксантина, входящих в их состав. На долю каротиноидов приходится 8 - 16 % всех пигментов. Соотношения содержания различных пигментов у дуналиеллы находятся в следующих пределах:

Хлорофиллы / каротиноиды	2,8 - 4,4
Ксантофиллы / каротин	1,3 - 4,2
Хлорофилл <i>a</i> / хлорофилл <i>b</i>	2,1 - 3,0

В целом, эти показатели соответствуют пигментным соотношениям других зеленых водорослей, хотя степень изученности пигментного состава представителей разных отделов отличается. У наиболее распространенных водорослей идентифицированы все изомеры каротина ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ), а также представлен более широкий набор ксантофиллов (зеаксантин, неоксантин, виолаксантин, микронон, сифонксантин, сифонеин, астаксантин, ликопин). При этом следует отметить, что отдельные показатели соотношения пигментов отличаются даже для различных штаммов. При этом абсолютное содержание пигментов и их суммы коррелирует со средними объемами клеток, а степень вариабельности — с экологическими особенностями видов.

По сравнению с другими морскими водорослями, дуналиеллы характеризуются

более низкими соотношениями хлорофиллы/каротиноиды и ксантофиллы/каротиноиды. К сказанному следует добавить, что в отличие от пигментных характеристик, другие биохимические показатели дуналиелл в благоприятных условиях нахождения вида между собой не отличаются. Это свидетельствует об определенной пластичности пигментного комплекса водоросли в зависимости от условий ее выращивания. Хотя, как считают Н. П. Масюк и М. И. Радченко, пигментный набор зеленых водорослей помогает в идентификации вида при установлении его систематической принадлежности.

**Влияние различных факторов на образование каротина клетками *Dunaliella salina*.** Имеющиеся материалы свидетельствуют [21, 23, 22], что уровень содержания каротина в технологическом процессе очень изменяется в зависимости от особенностей его расчета. Содержание  $\beta$ -каротина выражают в мг/мл суспензии, в мг/клетку, в % на сухое вещество. Во всех случаях получают разноплановые данные (табл. 1).

Например, в эксперименте с подбором концентрации соли в среде были получены следующие данные [21].

**Таблица 1. Количественные показатели содержания  $\beta$ -каротина при пересчете на различные единицы**  
**Table 1. Quantity indicators of a content  $\beta$ -carotinum at recalculation on various unities**

Концентрация соли	Концентрация $\beta$ -каротина
2 М	$3,0 \times 10^{-9}$ мг/клетку
	$3,1 \times 10^{-3}$ мг/мл
3 М	$4,8 \times 10^{-9}$ мг/клетку
	$2,9 \times 10^{-3}$ мг/мл
4 М	$12,6 \times 10^{-9}$ мг/клетку
	$5,3 \times 10^{-3}$ мг/мл
5 М	$14,0 \times 10^{-9}$ мг/клетку
	$3,6 \times 10^{-3}$ мг/мл

Как видно из представленных данных, в зависимости от особенностей расчета, концентрация  $\beta$ -каротина различается в 1,5 - 3 раза. Это в значительной мере затрудняет точную оценку продуктивности и получение прогнозируемых цифр выхода  $\beta$ -каротина. Поэтому при промышленном культивировании одноклеточных водорослей с целью осуществления биологического синтеза ценных химических соединений на их основе важнейшую роль играет параметрическое управление процессами жизнедеятельности продуцентов.

Принцип управления биохимическим составом базируется не только на создании оптимальных условий культивирования, но и на различных способах разобщения (в основном, химического) клеточных функций деления и фотосинтеза. Таким разобщением вызывается явление биохимической адаптации фотосинтезирующих клеток к осуществлению определенного пути биосинтеза заданного продукта.

Физиологической основой этого метода является различная чувствительность (устойчивость) к экстремальным воздействиям функции хлоропласта и процессов, связанных с прохождением митотического цикла, развитием и делением клеток [33, 30, 46, 35]. Благодаря этому при определенных сочетаниях напряженности физико-химических факторов внешней среды (температура, свет, минеральное питание и др.) имеет место блокирование деления клеток при сохранении фотосинтеза. Это приводит к переключению альтернативных путей преобразования продуктов восстановления углерода в сторону накопления запасных веществ (триглицеридов, полисахаридов), природа которых обусловлена генетическими свойствами штамма [9, 30, 33].

Показано также, что переориентация биосинтеза фототрофных клеток водорослей сопровождается сложной цепью внутриклеточных событий и регуляторных актов [46], связанных с активацией протеолитических ферментов [35] на начальных этапах перестройки биосинтеза, с индукцией и синтезом *de novo* белков, необходимых для конденсации продуктов фотосинтеза в запасные вещества.

В связи с этим особый интерес представляют полученные лабораторные данные по параметрическому управлению биосинтезом  $\beta$ -каротина в клетках *Dunaliella salina* в условиях интенсивной культуры [1]. Указанными авторами исследована зависимость накопления  $\beta$ -каротина в клетках и его валового выхода от концентрации хлористого натрия, интенсивности света, температуры, при исключении из среды азота или магния. Показана высокая эффективность сочетания факторов “субоптимальная температура + высокая интенсивность света” в отношении скорости накопления в клетках и валового выхода  $\beta$ -каротина, что может быть использовано для параметрического управления биосинтезом этого соединения в условиях интенсивной культуры дуналиеллы.

Исследование биологии *D. salina* и экологических факторов, вызывающих ее переход к активному накоплению  $\beta$ -каротина в естественных условиях, показало, что биосинтез этого соединения является приспособительной реакцией организмов в ответ на экстремальные условия среды. К ним относят изменения солености, минерального состава среды, температуры и освещенности, а также сочетания комплекса указанных параметров.

Одним из факторов, влияющих на накопление  $\beta$ -каротина в клетках дуналиеллы в естественных условиях, является изменение концентрации хлористого натрия в водоемах, в особенности при испарении воды в летне-осенний период. Оптимальной концентрацией хлористого натрия в среде для роста и развития дуналиеллы в культуре является 2 М [1, 14]. Увеличение концентрации хлористого натрия приводит к изменению пигментообразования и повышению содержания  $\beta$ -каротина в интенсивной культуре. Типичная реакция на изменение солености проявляется и при уменьшении концентрации хлористого натрия. При этом обращает на себя внимание обратная корреляция между накоплением  $\beta$ -каротина в клетках и скоростью роста культуры. Это указывает на то, что действие хлористого натрия на биосинтез  $\beta$ -каротина не является специфическим, и, очевидно, связано с нарушением развития и размножения клеток опосредовано.

Как свидетельствуют данные [21], повышение содержания хлористого натрия в среде культиватора от 2 до 5 М замедляет деление клеток и изменяет соотношение пигментов. При этом количество хлорофилла уменьшается, каротинов увеличивается, интенсивность фотосинтеза падает, интенсивность дыхания при повышении содержания соли от 2 до 4 М не изменяется, а от 4 до 5 М падает.

**Влияние азотного голодания на накопление  $\beta$ -каротина в клетках *Dunaliella salina*.** Исключение азота из питательной среды изменяет направленность биосинтеза водорослей (например, у хлореллы), вызывая усиленный синтез запасных веществ углеводной или липидной природы. Недостаток азота приводит также к увеличению содержания  $\beta$ -каротина в клетках *D. salina* в условиях экстенсивной культуры более чем в 2 раза [20].

Исключение азота из среды в условиях интенсивной культуры также приводит к увеличению содержания  $\beta$ -каротина в клетках дуналиеллы почти в 3 раза по сравнению с контрольным вариантом. При этом увеличение освещенности вызывает дополнительное повышение содержания  $\beta$ -каротина. Однако, суммарное количество  $\beta$ -каротина в единице объема суспензии (валовый выход продукта) оказывается одинаковым как в контрольном, так и в опытных вариантах, что обусловлено большой скоростью роста в условиях интенсивной культуры (увеличение численности клеток) *D. salina* на полной питательной среде. При этом в одном случае суммарный выход  $\beta$ -каротина обусловлен

повышением содержания его в индивидуальной клетке, во втором – достаточно большой скоростью увеличения численности клеток с обычным содержанием в них  $\beta$ -каротина.

Таким образом, изменение состава питательной среды и условий минерального питания (повышение концентрации хлористого натрия, исключение азота и магния из среды) приводит к существенному повышению содержания  $\beta$ -каротина в клетках дуналиеллы солоноводной.

Однако такой способ управления биосинтезом  $\beta$ -каротина, очевидно, приемлемый для экстенсивной культуры дуналиеллы солоноводной, оказывается недостаточно эффективным из-за малой скорости процесса для параметрического управления биосинтезом  $\beta$ -каротина у этих организмов в условиях интенсивной культуры. Но при организации двухфазного процесса культивирования дуналиеллы, когда на первом этапе осуществляют наращивание зеленой биомассы водоросли, а на втором – индуцирование синтеза и накопления  $\beta$ -каротина, мероприятия по изменению условий минерального питания остаются актуальными.

**Зависимость биосинтеза  $\beta$ -каротина от интенсивности света и температуры.** Свет является ведущим экологическим фактором в отношении накопления  $\beta$ -каротина в клетках дуналиеллы [14, 20]. Повышение освещенности в области интенсивностей света, превышающих насыщение световых кривых роста культуры *D. salina* (200 тыс. эрг/(см<sup>2</sup> x сек) и более), вызывает существенное увеличение скорости синтеза (прироста в клетках)  $\beta$ -каротина. При этом максимальные величины суточного прироста  $\beta$ -каротина в клетках наблюдаются при субоптимальных температурах и составляют при 22°C и освещенности 370 тыс. эрг/(см<sup>2</sup> x сек) более 220 мкг/10<sup>9</sup> клеток в сутки при плотности культуры 15 млн./мл и толщине слоя суспензии 3 см. Уменьшение толщины слоя суспензии до 1 см способствует дальнейшему увеличению скорости синтеза  $\beta$ -каротина, прирост которого возрастает до 1370 мкг/10<sup>9</sup> клеток в сутки даже при плотности культуры 55 млн. клеток/мл. При этом и валовый выход  $\beta$ -каротина с единицы объема суспензии в сутки превышает почти в 3 раза его выход при оптимальных для роста культуры условиях и составляет около 90 мг/л культуры в сутки.

На жизнедеятельность клеток дуналиеллы существенное влияние оказывает спектральный состав света. Исследование влияния УФ-излучения на параметры фотодвижения двух видов дуналиелл (*D. salina*, *D. viridis*) показало, что в отличие от фототопотаксиса и относительной подвижности клеток скорость поступательного движения клеток обоих видов не зависит от интенсивности, длины волны УФ-излучения и продолжительности облучения [27]. Это свидетельствует о различиях в механизмах, управляющих этими параметрами движения (с одной стороны, скоростью поступательного движения, с другой – фототопотаксиса и относительной подвижностью клеток) на клеточном уровне. Впервые обнаружено преобразование положительного фототопотаксиса обоих видов водорослей в отрицательный под воздействием ультрафиолетового облучения с последующим ингибированием фототопотаксиса при увеличении продолжительности облучения.

Наиболее сильное ингибирующее действие на фототопотаксис оказывает ультрафиолетовое излучение в области 248 - 334 нм, где, возможно, находятся максимумы спектров поглощения белков, связанных с двигательным аппаратом и с фоторецепторной системой водорослей. Важно отметить, что влияние УФ излучения на фотодвижение исследованных видов *Dunaliella* имело обратимый характер: фотоориентация клеток восстанавливалась до контрольных значений на всех исследуемых длинах волн (кроме 248 нм) через 2 ч после прекращения облучения интенсивностью 2 Вт/м<sup>2</sup>.

По [27], зависимость фототопотаксиса и подвижности клеток водорослей от интенсивности длины волны ультрафиолетового излучения и продолжительности облучения свидетельствует о возможности использования этих водорослей в качестве биотестов уровня и характера природного ультрафиолетового излучения. Отмеченный момент,

на наш взгляд, следует иметь в виду при установке фотобиореакторов на солнечном свете в условиях степного Крыма, чтобы в периоды доминирования соответствующего УФ облучения защищать клетки (экранированием света) от отрицательного излучения.

В пользу сказанного свидетельствуют и данные А. И. Божкова, В. П. Комаристой [2], показавших, что при стандартных условиях культивирования (освещенность 6,5 клк, температура 25 - 27°C) в процессе культивирования 2 видов дуналиеллы с 4-х по 24-ые сутки роста (при исходной концентрации клеток 1,3 млн/мл) в клетках *D. salina* содержалось в 1,5 - 2 раза больше  $\beta$ -каротина и нейтральных липидов (неэтерифицированные жирные кислоты, триацилглицериды, стероиды), чем в клетках *D. viridis*. По мнению авторов, в процессе культивирования водорослей в накопительном режиме содержание каротиноидов может изменяться ритмически или же оставаться на постоянном уровне, а характер этих изменений определяется исходным уровнем содержания каротиноидов в клетках. При этом комплексное изменение условий культивирования (увеличение температуры до 38 - 40°C, освещенности до 8 клк, исходной концентрации клеток до 5 - 10 млн/мл) сопровождается увеличением содержания  $\beta$ -каротина в клетках водорослей в 2 - 3 раза. Однако различия между исследованными видами по этим показателям не были обнаружены, в отличие от стандартных условий культивирования. Следовательно, комплексное влияние таких факторов, как исходная концентрация клеток, температура и освещенность, индуцируют липо- и каротиногенез. При этом содержание липидов и каротиноидов у обоих видов водорослей увеличивается в 2 - 4 раза. Это дает основание авторам говорить о том, что *D. viridis* при определенных условиях культивирования также может быть перспективным продуцентом каротиноидов и липидов.

Таким образом, индуцирующее действие субоптимальных температур на фоне высоких освещенностей является фактором, который может быть эффективно использован для параметрического управления биосинтезом  $\beta$ -каротина в условиях интенсивной культуры дуналиеллы с применением техники проточного двухфазного культивирования [37] этих водорослей.

**Влияние циклогексимида на индуцированный переход клеток *D. salina* к направленному биосинтезу каротина.** Биосинтез  $\beta$ -каротина, индуцируемый на фоне высоких освещенностей низкими субоптимальными температурами, является приспособительной защитной реакцией клетки дуналиеллы и связан с механизмами, в которых участвуют процессы индуцированного синтеза белка. Установлено, что переход клетки *D. salina* к направленному синтезу  $\beta$ -каротина, вызываемый снижением температуры до 22°C, полностью подавляется при внесении циклогексимида – специфического ингибитора синтеза белков на 80 S рибосомах. Участие рибосом в синтезе каротина доказано в опытах с *Chlamydomonas* [47]. В этом процессе участвуют регуляторные механизмы, действующие на уровне транскрипции и трансляции, а также затрагивающие фоторегуляторные механизмы. Об этом свидетельствует достаточно высокая эффективность синего света в отношении индукции синтеза  $\beta$ -каротина и существенные перестройки ультраструктуры клетки дуналиеллы [3].

Переход клеток дуналиеллы к направленному синтезу  $\beta$ -каротина наблюдается в условиях, задерживающих или блокирующих деление клеток при высоких интенсивностях света, что указывает на возможность использования принципа разобщения клеточных функций [30] для управления биосинтезом  $\beta$ -каротина. Особенно эффективным в отношении накопления в клетках и валового выхода  $\beta$ -каротина является переход от оптимальной температуры (28°C) к субоптимальной (20 - 22°C) на фоне высоких (300 - 400 тыс. эрг/(см<sup>2</sup> x сек)) освещенностей. По мнению В. Е. Семененко, такое сочетание факторов может быть эффективно использовано для параметрического управления биосинтезом  $\beta$ -каротина у *D. salina* в условиях интенсивной ее культуры.

К числу химических соединений, действующих на развитие дуналиеллы, относят и такие антибиотики, как стрептомицин и пенициллин [24]. К веществам, способст-

вующих накоплению  $\beta$ -каротина, относят этиловый спирт и глицинато-L-серинат меди в микродозах. Применение этих реактивов обеспечивает максимальную продуктивность *Dunaliella* и высокий валовый выход  $\beta$ -каротина, который более чем на 30 % выше, чем при использовании контрольных питательных сред [29].

В числе химических соединений, влияющих на метаболизм водорослей широко известен циклогексимид. Проверку его влияния многократно проводили на хлорелле [35]. При этом использовали два штамма: один из них выращивался в условиях азотного голодания, другой накапливал липиды. Оказалось, что накапливающий липиды штамм *Chlorella* полностью терял способность их синтезировать уже при концентрации циклогексимиды 3 мкг/мл суспензии. При этом несколько уменьшалось суммарное количество белка, а количество углеводов составляло 100 % от прироста биомассы. В то же время у штамма хлореллы, обладающего углеводной направленностью биосинтеза, циклогексимид не оказал никакого действия на распределение веществ, синтезируемых при азотном голодании.

Кинетический ингибиторный анализ свидетельствует, что при вызываемой экстремальным воздействием перестройке накапливающего липиды штамма имеется начальный период, длящийся 1,0 - 1,5 ч, в течение которого в цитоплазме на 80 S рибосомах начинается и завершается синтез белков, которые и обуславливают последующую способность клеток осуществлять синтез липидов. Делается вывод, что у "липидных" штаммов *Chlorella* вызываемый азотным голоданием процесс направленного образования липидов сопряжен с необходимостью предварительного синтеза соответствующих ферментов, которые относятся, вероятно, к числу индуцируемых адаптивных белков, синтез которых идет *de novo*.

Таким образом, при управлении биосинтезом фотосинтезирующих клеток посредством разобщения клеточных функций в клетке возникает сложная цепь взаимосвязанных событий. Внешнее воздействие, приводящее в конечном итоге к направленному синтезу тех или иных соединений, оказывается опосредованным многими реакциями и выступает, таким образом, в роли не прямого индуктора синтеза этих соединений, а эвекатора. В данном случае осуществляется механизм, который укладывается в схему, предложенную Уоддингтоном.

Вместе с тем исследования более поздних лет [10] свидетельствуют о возможности использования генетических методов применительно к клеткам *D. salina*. В частности, показано, что клонирование фрагментов хлоропластной ДНК *D. salina*, обладающих промоторной активностью в *E. coli*, вполне реально. При этом установлено, что хлоропластная ДНК дуналиеллы расщепляется рестриктазой Bam HI и клонируется для селекции промоторов прокариотического типа pML 4. Получаются клоны *E. coli*, которые приобрели способность расти на среде с высокой концентрацией хлорамфеникола (300 мкг/мл). Фрагменты хлДНК *D. salina*, обладающие промоторной активностью, охарактеризованы с помощью рестриктоного картирования. В результате этого сконструирован искусственный вариант плазмиды, обуславливающий максимальную скорость роста *E. coli* на среде с хлорамфениколом. Обсуждаются возможности подхода к поиску светорегулируемых промоторов хлоропластной ДНК. Показано, что клонированные фрагменты хлДНК *D. salina* обладают различной промоторной активностью в *E. coli*. Это может быть обусловлено как структурными особенностями самих промоторных сайтов, так и расстоянием между промоторной последовательностью и АТГ-инициаторным кодоном ХАТ-гена. Тем не менее, эти фрагменты хлДНК могут использоваться в экспериментах по генетическому конструированию векторов экспрессии и других плазмид, в которых необходим контроль сильного промоторного элемента. Вектор pDSc6-46 является промежуточной конструкцией такого типа.

**Заключение.** Водоросль *Dunaliella salina* – уникальный организм, способный выдерживать широкую амплитуду экстремальных значений различных абиотических фак-

торов (общей солености, содержания и соотношения отдельных осмотически действующих и биогенных элементов, температуры, освещенности). В связи с вышеперечисленным данный вид микроводорослей является прекрасным модельным объектом для исследования механизмов устойчивости к действию различного рода факторов. Большой интерес к объекту исследования объясняется также способностью водоросли синтезировать и запасать большое количество  $\beta$ -каротина – пигмента группы каротиноидов, который, как известно, является источником образования витамина А. В промышленных условиях при управляемом биосинтезе  $\beta$ -каротина *D. salina* при использовании принципа разобщения клеточных функций деления и фотосинтеза можно получить большие объемы продукта в рамках небольших интервалов времени.

1. Абдуллаев А. А., Семенов В. Е. Интенсивная культура *Dunaliella salina* Теод. и некоторые ее физиологические характеристики // Физиология растений. – 1974. - **21**, вып. 6. - С. 1145 -1153.
2. Божков А. И., Комаристая В. П. Липидно-каротиноидный обмен в клетках *Dunaliella* Теод. при различных условиях культивирования // Альгология. - 2003. - **13**, № 2. - С. 137 - 147.
3. Владимиров М. Г. Ультраструктурная организация клетки *Dunaliella salina* и ее функциональные изменения в зависимости от интенсивности света и температуры // Физиология растений. – 1978. - **25**, вып. 3. - С. 571 - 576.
4. Дрокова И. Г. Водорість *Dunaliella salina* Теод. як джерело одержання бета-каротину // Укр. бот. Журнал. - 1961. - **18**, № 4. – С. 110 – 112.
5. Дрокова И. Г. Дослідження водоростей на вміст бета-каротину // Укр. бот. журн. - 1960. - **17**, № 2. – С. 39 – 42.
6. Дрокова И. Г., Кузнецов М. В., Попова Р. Ц. Вміст каротину у водорості *Dunaliella salina* Теод. при вирощуванні на рапі в лабораторних умовах // ДАН УРСР. – 1967. – **8**, серія Б. – С. 736 – 739.
7. Дрокова И. Г., Ливецька Р. Ц. Визначення бета-каротину у водорості *Dunaliella salina* Теод. // Укр. бот. ж. – 1963. - **20**, № 3. – С. 94 – 96.
8. Дрокова И. Г., Попова Р. Ц. Вміст каротину в водорості *Dunaliella salina* Теод. в умовах масової культури // Укр. бот. журн. – 1969. - **26**, № 3. – С. 17 – 21.
9. Жукова Т. С., Клячко-Гурвич Г. Л., Владимиров М. Г., Курносова Т. А. Сравнительная характеристика роста и направленности биосинтеза различных штаммов хлореллы в условиях азотного голодания. - II. Образование углеводов и липидов // Физиология растений. – 1969. - **16**, № 96.
10. Лось Д. А., Лебедева Н. В., Семенов В. Е. Клонирование фрагментов хлоропластной ДНК *Dunaliella salina*, обладающих промоторной активностью в *E. coli*. // Физиология растений. – 1989. - **36**, вып. 4. - С. 732 - 739.
11. Масюк Н. П. Вплив йонів Na, Mg, Cl та SO<sub>4</sub> на ріст, розмноження та каротиноутворення водорості *Dunaliella salina* Теод. // Укр. бот. журн. – 1965. – **22**, № 5. - С. 3 - 9.
12. Масюк Н. П. Каротиносна водорість *Dunaliella salina* Теод. у солоних водоймах Кримської області // Укр. бот. журн. – 1961. – **18**, № 4. - С. 100 - 107.
13. Масюк Н. П. Масова культура каротиносною водорості *Dunaliella salina* Теод. // Укр. бот. журн. – 1966. – **23**, № 2. - С. 12 - 18.
14. Масюк Н. П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Теод. – К.: Наукова думка, 1973. – 244 с.
15. Масюк Н. П. Оцінка придатності ропи сакських водоймів для вирощування каротиносних водоростей // Укр. Бот. Журнал. – 1967. – **24**, № 4. - С. 37 - 43.
16. Масюк Н. П., Радченко М. И. Количественное содержание пигментов в клетках некоторых видов *Dunaliella salina* Теод. в условиях благоприятных для размножения // Гидробиол. журн. – 1971. - **7**, № 6. - С. 31 - 40.
17. Масюк Н. П., Юрченко В. В. Вплив концентрації водневих йонів на водорість *Dunaliella salina* Теод. // Укр. бот. журн. – 1962. – **19**, № 4. - С. 91 - 94.
18. Милько Е. С. Влияние освещенности и температуры на пигментообразование *Dunaliella* // Микробиология. - 1963. - **32**, № 4. – С. 590 – 597.
19. Милько Е. С. Изучение потребностей двух видов водорослей в минеральных и органических компонентах среды // Вестник МГУ. – 1962. - № 1. - С. 18 - 24.

20. Милько Е. С. Изучение физиологии и пигментообразования зеленой водоросли *Dunaliella*: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – М., 1963. – 18 с.
21. Миронюк В. И. и др. Осмотическое давление в клетках некоторых олиго- и гипергалоных водорослей и в окружающей их среде // Гидробиол. журн., - 1984, № 1. - С. 46 - 49.
22. Миронюк В. И., Эйнон Л. О. Вивчення кінетики кисневого обміну одноклітинної водорості *Dunaliella salina* Teod. // Матеріали 4-ої наукової конференції молодих вчених Ін-ту гідробіології АН УРСР. - К., 1972. – С. 95 - 99.
23. Миронюк В. И., Эйнон Л. О. Цитохромоксидаза *Dunaliella salina* Teod. // Укр. бот. журн. – 1969. - **26**, № 6. - С. 88 - 98.
24. Миронюк В. И., Скульська Т. А. Вплив стрептоміцину та пеніциліну на ріст пігментоутворення та кисневий обмін клітин *Dunaliella salina* Teod. // Укр. бот. журн. - 1972. - **24**, № 2. - С. 161-167.
25. Миронюк В. И., Эйнон Л. О. Влияние производных фенола на кислородный обмен *Dunaliella salina* Teod. // Гидробиол. журн. – 1970. - **6**, № 3. - С. 91 - 95.
26. Миронюк В. И., Эйнон Л. О. Кислородный обмен и содержание пигментов у разных форм *Dunaliella salina* Teod. в условиях повышения содержания хлористого натрия // Гидробиол. журн. – 1968. - **4**. - С. 23 - 29.
27. Посудин Ю. И., Масюк Н. П., Милицкая Г. Г. Влияние ультрафиолетового излучения на фотодвижение двух видов *Dunaliella* Teod. // Альгология. - 2004. - **14**, № 2. - С. 113 - 126.
28. Работнова И. Л., Милько Е. С. Влияние условий культивирования на образование каротина водорослью *Dunaliella salina* / Биология автотрофных микроорганизмов. Изд-во МГУ, М., 1966. – 165 с.
29. Рудик В. Ф. Условия каротинообразования у *Dunaliella salina* Teod. CALU-834 // Альгология. – 1993. – С. 86 - 89.
30. Семененко В. Е. Внутриклеточная регуляция и управление биосинтезом микроводорослей: автореф. дисс. ... докт. биол. наук. - М., 1975. – **xx** с.
31. Семененко В. Е., Абдуллаев А. А. Параметрическое управление биосинтезом бета-каротина в клетках *Dunaliella salina* в условиях интенсивной культуры // Физиология растений. – 1980. - **27**, вып. 1. - С. 31 - 41.
32. Семененко В. Е., Абдуллаев А. А., Владимировна М. Г. Введение в интенсивную культуру и управление биосинтезом *Dunaliella salina* как продуцента бета-каротина // Тезисы докл. Научного симпозиума XI Научно-координационного совещания “Изучение физиологии культивирования водорослей с высоким использованием света”. – М., 1974. – 31 с.
33. Семененко В. Е., Владимировна М. Г., Орлеанский О. Б. и др. К физиологической характеристике *Chlorella* sp. при высоких экстремальных температурах. II. Изменение биосинтеза, ультраструктуры и активности фотосинтетического аппарата хлореллы при разобщении клеточных функций экстремальной температурой // Физиология растений. - 1969, **16**. - С. 210 - 220.
34. Семененко В. Е., Зверева М. Г. Сравнительное изучение перестройки в направленности фотосинтеза у двух штаммов хлореллы при разобщении клеточных функций экстремальной температурой // Физиология растений. - 1972. - **19**. - С. 229 - 238.
35. Семененко В. Е., Рудова Т. С. Влияние циклогексимида на процесс перестройки биосинтеза клеток хлореллы, вызываемый азотным голоданием // Физиология растений. - 1975. - **22**, N 5. - С. 958 - 964.
36. Семененко В. Е., Рудова Т. С. Эндогенная регуляция фотосинтеза и сопряженных процессов. V Влияние митомицина С на деление, рост, фотосинтетическую активность и направленность биосинтеза клеток хлореллы // Мат. VII Всесоюзн. рабочего совещ. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе. – Киев: Наук. думка, 1972. – 131 с.
37. Семененко В. Е., Цоглин Л. Н. К разработке метода непрерывного культивирования хлореллы с направленным изменением химического состава // Мат. VI Всесоюзн. рабочего совещ. по вопросу круговорота веществ в замкнутой системе на основе жизнедеятельности низших организмов. - Киев, 1969.
38. Тренкенциу Р. П. Ростовые и фотоэнергетические характеристики морских микроводорослей в плотной культуре: автореф. дисс. канд. биол. наук. - Красноярск, 1984. – 37 с.
39. Упитис В. В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей. – Рига: Зинатне, 1983. – 320 с.

40. Юрина Е. В. Опыт культивирования галобионтных водорослей *Asteromonas gracilis* Artari и *Dunaliella salina* Teod // Вестник МГУ. – 1966. - № 6. - С. 76 - 83.
41. Loeblich L. A. Growth limitation of *Dunaliella salina* by CO<sub>2</sub> at high salinity // J. Phycol., 1970. - 6.
42. McLachlan J. The growth of unicellular algae in artificial and enriched sea water media. // Canad. J. Microbiol., 1959. - 5.
43. McLachlan J. The culture of *Dunaliella tertiolecta* Butcher – an euryhaline organism. // Canad. J. Microbiol., 1960. - 6.
44. Provasoli L., Pintner I. Ecological implications on in vitro nutritional requirements of algae flagellates. – Ann. N. Y. Acad. Sc., 1953. - 56.
45. Ryther J. H. Interrelation between photosynthesis and respiration in the marine flagellate, *Dunaliella euchlora*. – Nature, 1956. -178.
46. Semenenko V. E., Rudova T. S. On the mechanisms of byosynthesis reorientation in *Chlorella* under the influence of factors limiting cellular division // Arch. Hydrobiol. – 1976. - (suppl. 49), Algological studies. – 15. - 185.
47. Siverag R., Levine R. P. Transcription and translation for carotenoid Synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* // Planta. – 1973. – 111. – 73.

Институт биологии южных морей НАН Украины,  
г. Севастополь

Получено 11.05.2005

A. B. BOROVKOV

**GREEN MICROALGAE *DUNALIELLA SALINA* (A REVIEW)**

**Summary**

The analysis of literary data about the appearance, structure, reproduction, distribution, cultivation of green microalga *Dunaliella salina* Teod is given. Influence of ecological factors (salinity, nutrients, pH) on ability of cells of this alga is considered. The methods of increased synthesis and accumulation of  $\beta$ -karyotin by *Dunaliella*'s cells are analyzed.