

УДК 579.582.26/27:576.31:577.1

Г.С. МИНОК, Н.В. ТЕРЕНТЬЕВА, И.В. ДРОБЕЦКАЯ

Ин-т биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАН Украины,

99011 Севастополь, пр. Нахимова, 2, Украина

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ТРЕХ ШТАММОВ *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* FLOTOW (*CHLOROPHYTA, CHLAMYDOMONADALES*)

Исследованы особенности морфологии и химического состава вегетативных клеток и апланоспор у трех штаммов *Haematococcus pluvialis* Flotow в условиях двухстадийной накопительной культуры. Показано, что штаммы *H. pluvialis*, имеющие различное географическое происхождение и историю хранения в коллекциях культур микроводорослей, могут существенно различаться по ряду морфологических и физиолого-биохимических признаков: по форме и размерам клеток, оптическим характеристикам культур, скорости роста на вегетативной фазе жизненного цикла, а также интенсивности метаболических процессов, обеспечивающих формирование апланоспор.

Ключевые слова: *Haematococcus pluvialis*, морфометрия клеток, рост культуры, химический состав, вторичный каротиногенез.

Введение

Haematococcus pluvialis Flotow – повсеместно распространенная зеленая одноклеточная водоросль, обитающая в мелких, пересыхающих в летнее время мезосапробных водоемах. Вегетирует ранней весной в течение короткого промежутка времени и в структуре пресноводного фитопланктона ведущей роли не играет (Elliot, 1934; Proctor, 1957; Almgren, 1966). Поэтому до начала 90-х гг. XX ст. в альгологических исследованиях этому виду принадлежало весьма скромное место. Однако в последние 10-15 лет в связи с интенсивным развитием химии каротиноидов и расширением их использования в медицине интерес к *H. pluvialis* существенно возрос как к перспективному источнику природного астаксантина (3,3'-дигидрокси-4,4'-дикето-β-каротина) и модельному объекту для исследования механизмов вторичного каротиногенеза и функциональных свойств гидрокси- и кетокаротиноидов у *Chlorophyta* (Grung et al., 1992; Krishna, Mohanty, 1998; Kobayashi, Sakamoto, 1999; Boussiba, 2000; Grünevald et al., 2001; Eonseon et al., 2003). На млекопитающих в системах *in vitro* и *in vivo*, а также в ходе клинических испытаний показана более высокая эффективность природного астаксантина, по сравнению с его синтетическим аналогом, при профилактике и лечении ряда заболеваний человека и животных (Naguib, 2000; Krinsky et al., 2004). Особую значимость приобрели вопросы разработки эффективных методов массового культивирования *H. pluvialis* (Borowitzka et al., 1991; Kobayashi et al., 1997; Boussiba, 2000; Fabregas et al., 2000; Cifuentes et al., 2003). Несмотря на многочисленные исследования и определенные успехи в этой области (Lorenz,

© Г.С. Минок, Н.В. Терентьева, И.В. Дробецкая, 2007

Cysewski, 2000), объем мирового производства астаксантина из *H. pluvialis* незначительный, и основные проблемы, сдерживающие его рост, – низкая продуктивность культур и существенные потери биомассы на стадии формирования апланоспор по-прежнему остаются актуальными (Margalith, 1999; Cifuentes et al., 2003). Одним из подходов при решении указанных задач может быть, по аналогии с другими видами микроводорослей, поиск и введение в культуру новых штаммов, обладающих более высокими скоростями роста и более широким диапазоном толерантности к действию факторов среды, стимулирующих каротиногенез. Однако сведения, характеризующие вариабельность морфофизиологических и биохимических признаков у различных штаммов *H. pluvialis* при одних и тех же условиях выращивания, весьма ограничены (Pringsheim, 1966; Borowitzka et al., 1991) и не позволяют на данном этапе сделать достоверный прогноз фактической результативности исследований такого плана.

Поэтому целью данной работы было сравнительное исследование особенностей морфологии клеток, темпов роста культур и химического состава вегетативных клеток и апланоспор (содержания белка, липидов, углеводов, хлорофиллов и каротиноидов) у трех штаммов *H. pluvialis*, имеющих различное географическое происхождение и историю хранения в коллекциях культур микроводорослей.

Материалы и методы

В работе использовали три штамма *H. pluvialis*: IPPAS H-239 (Visher), LABIK 927-1 (Mainx) и IBSS (Минюк, Галатонова). Их выращивали методом накопительной культуры в конических колбах объемом 370 мл на минеральной среде ОНМ (Fabregas et al., 2000) при естественном освещении (1,3-2,8 клк), температуре среды 22-27 °С и непрерывной продувке стерильным воздухом со скоростью 100 мл·мин⁻¹. Для получения инокулятов 10-дневные культуры штаммов фильтровали через планктонное сито (20 мкм), фильтрат, содержащий только монадные клетки, центрифугировали (1000 об/мин, 2 мин), осадок клеток промывали свежей питательной средой, снова центрифугировали и полученную суспензию использовали для засева экспериментальных колб. Каждый штамм культивировали в трех повторностях. Контроль за ростом осуществляли по изменению численности клеток (N , кл·мл⁻¹) (с помощью камеры Горяева), оптической плотности культур в области 750 нм (D_{750}) (на фотозлектроколориметре КФК-2) и содержания абсолютно сухого вещества (АСВ, г·л⁻¹) (на нитроцеллюлозных мембранных фильтрах «Sartorius» 3 и 8 мкм). Линейные размеры клеток определяли под световым микроскопом PZO (Польша) с помощью калиброванного окуляр-микрометра на живом материале, обездвиженном раствором Люголя (Schoen, 1988). Объемы клеток рассчитывали по формуле: $V = 0,5236 \cdot D^2 \cdot H$, где V – объем, мкм³; D , H – длина и ширина клетки (мкм) соответственно (Брянцева, Курилов, 2003). Численность выборок (n) для определения характера распределения клеток в культурах по объему и соотношению H/D составляла 100 экземпляров. Содержание белка в биомассе анализировали по Лоури (Lowry et al., 1951), углеводов – при помощи фенольного и сернокислотного reagentов (Strickland, Parsons, 1968), липидов – фосфованилиновым методом (Ahlgren, Merino, 1991). Пигменты экстрагировали 90 %-м

ацетоном. Для определения концентрации хлорофиллов (ХЛ) и каротиноидов (КР) использовали уравнения: $XLa, \text{мг}\cdot\text{л}^{-1} = 11,93 D_{664} - 1,93 D_{647}$; $XLb, \text{мг}\cdot\text{л}^{-1} = 20,36 D_{647} - 5,50 D_{664}$ (Jeffrey, Humphrey, 1975); $KP, \text{мг}\cdot\text{л}^{-1} = 4,1 D_{450} - 0,0435 XLa - 0,367 XLb$ (Rowan, 1989). Отбор проб для исследования химического состава монадных клеток проводили на 21-е сутки эксперимента, зрелых апланоспор – на 35-е сутки. Среднюю скорость накопления каротиноидов в клетках на единицу клеточного АСВ за этот период (v , $\text{пг КР}\cdot\text{нг}^{-1} \text{ АСВ}\cdot\text{сут}^{-1}$) рассчитывали следующим образом: $v = (C_{KP2} - C_{KP1}) / t$, где C_{KP1} и C_{KP2} – среднее содержание каротиноидов ($\text{пг КР}\cdot\text{нг}^{-1}$ АСВ) на 21-е и 35-е сутки соответственно; t – промежуток времени между определениями, равный 14 суткам. Все измерения выполняли в 3-кратной повторности, за исключением счета клеток, при котором число определений для каждой точки варьировало от 4 до 8. Приведенные количественные данные являются средними из значений, полученных для отдельных параллелей каждого варианта эксперимента.

Результаты и обсуждение

В биотехнологии для характеристики индивидуальных штаммов микроводорослей-продуцентов биологически активных веществ с целью их идентификации, паспортизации или патентования используют ряд признаков, в число которых в качестве обязательных входят следующие: происхождение (источник и место выделения штамма), морфологическая и физиологическая (в т.ч. культуральная) характеристики, а также такие биотехнологические свойства, как условия культивирования и скорость продуцирования полезного вещества (Методы ..., 1975; Правила ..., 2003). Эти критерии были использованы нами для сравнительного исследования штаммов *H. pluvialis*, имеющихся в коллекции ИнБЮМ НАНУ.

Происхождение штаммов и условия их хранения. Существенной особенностью штаммов, использованных в данной работе, являлось то, что два из них были выделены в культуру несколько десятилетий тому назад и длительное время поддерживались в разных коллекциях при разных условиях, что в определенной мере могло отразиться на их свойствах. В связи с этим мы сочли необходимым привести сведения, касающиеся происхождения и условий хранения штаммов *H. pluvialis* в период, предшествовавший выполнению данного исследования.

Штамм IPPAS H-239 (Vischer) получен в 2004 г. из коллекции культур микроводорослей Ин-та физиологии растений (ИФР) РАН. Выделен в Швейцарии (г. Базель) в 1923 г. В ИФР поступил из коллекции Чехословацкой академии наук (ЧСАН) в 1958 г. (А-63) и поддерживался на агаризованной среде Прата при температуре 11-12 °С в постоянном освещении 2-4 клк (Владимирива и др., 1991). Идентичен штаммам CALU 333, CAUP G1002, ССАР 34/1D, SAG 34-1d.

Штамм LABIK 927-1 (Mainx) получен в 2002 г. из коллекции культур зеленых водорослей лаборатории альгологии Ботанического ин-та им. В.Л. Комарова (БИН) РАН. Выделен в бывшей Чехословакии (точное время и место выделения неизвестны). В БИН поступил из коллекции профессора Б.В. Громова (БиНИИ СПбГУ) в 1977 г., куда, в свою очередь, был передан в 1964 г. из

коллекции ЧСАН (А-93) как *Chlorococcum wimmeri* Rabenh. Str. Mainx. В коллекции LABIK до начала 90-х гг. хранился как *Neochloris wimmeri* (Rabenh.) Archibald et Bold. Mainx. В БиНИИ СПбГУ содержался на агаризованной среде № 6а (Громов, Титова, 1991) при 25 °С, искусственном освещении 2 клк и фотопериоде 8С:16Т, в БИН – на агаризованных средах F и 3N BBM при 23-26 °С и искусственном освещении 2,5-3,0 клк, 9С:15Т. Идентичен штаммам CALU-79, UTEX 113, ССАР 213/4, SAG 213-4.

Штамм IBSS выделен нами весной 2003 г. в окрестности г. Адлера в состоянии апланоспоры из сухого налета на стенках пустого бассейна для пресной воды. Первоначальную смешанную (накопительную) культуру получали на среде Прата при комнатной температуре и естественном освещении 1,0-1,5 клк. Прорастание апланоспор отмечено на 4-е сутки после посева.

В коллекции ИнБИОМ НАНУ все штаммы *H. pluvialis* содержатся на жидкой и агаризованной (1,5 %) среде ОНМ при естественном освещении и температуре 16-18 °С.

Морфометрические характеристики клеток. У всех трех штаммов *H. pluvialis* монадные клетки имеют форму эллипсоида или шара. Соотношение клеток различной формы в культурах зависит от их возраста и природы штаммов (рис. 1, А).

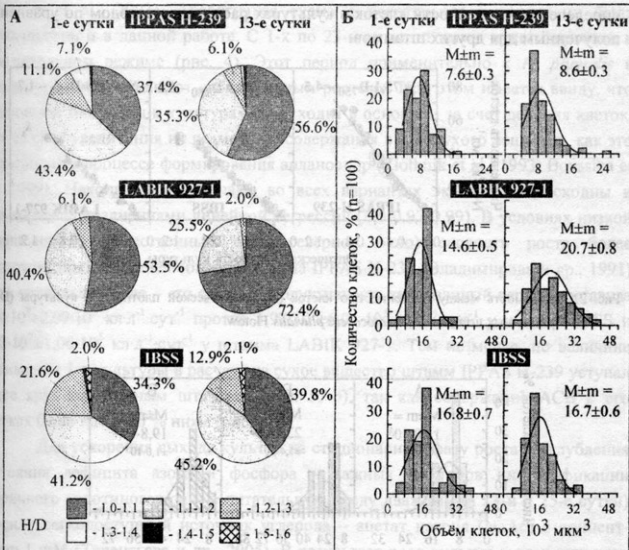


Рис. 1. Распределение вегетативных клеток в культурах трех штаммов *Haematococcus pluvialis* Flotow: А – по соотношению линейных размеров (H/D); Б – по объёму.

Так, у штамма IBSS в период активного роста преобладали удлиненные клетки с $H/D > 1,1$. Их доля в случайных выборках составляла 61-66 %, но только у этого штамма отмечены клетки с H/D , равным 1,6. У штамма LABIK 927-1, наоборот, большинство клеток имели форму, близкую к шару ($H/D=1,0-1,1$), а удлиненные клетки с $H/D > 1,3$ отсутствовали. Штамм IPPAS H-239 по данному признаку занимает промежуточное положение. По мере старения культур клетки *H. pluvialis* округлялись и увеличивались в объеме, причем это явление наиболее выражено у штамма LABIK 927-1, у которого в 1-е сутки численность клеток, имевших объем более $20 \cdot 10^3$ мкм³, составляла 8 %, а на 13-е сутки – около 50 % (рис. 1, Б). Различия в размерах клеток у исследованных штаммов не связаны с географической широтой местности, где они были выделены. Средние объемы монад у субтропического IBSS и наиболее северного в данном ряду LABIK 927-1 близки, тогда как у центрально-европейского штамма IPPAS H-239 клетки почти в два раза мельче (см. рис. 1, Б). Максимальная их длина не превышает 35 мкм, у двух других штаммов она достигает 57-60 мкм.

Мелкие клетки поглощают и рассеивают свет в меньшей степени, чем крупные, в результате чего коэффициент пропорциональности в уравнении линейной регрессии между численностью вегетативных клеток и оптической плотностью культур для штамма IPPAS H-239 в 1,5 раза выше, чем для штаммов IBSS и LABIK 927-1 (рис. 2). Это обстоятельство следует учитывать при определении численности клеток в культурах расчетным методом по уравнениям, полученным для других штаммов.



Рис. 2. Зависимость между численностью клеток (N) и оптической плотностью культуры (D_{750}) у различных штаммов *Haematococcus pluvialis* Flotow.



Рис. 3. Распределение зрелых апланоспор по объёму в культурах различных штаммов *Haematococcus pluvialis* Flotow на 35-е сутки эксперимента: А - IPPAS H-239; Б - IBSS; В - LABIK 927-1.

В процессе созревания апланоспор, имеющих шаровидную форму, численность крупноразмерных классов в вариационных рядах всех трех штаммов и верхняя граница размаха варьирования объема клеток возрастали.

На 35-е сутки эксперимента средний объем зрелых апланоспор во всех вариантах увеличился, по сравнению с монадами (13-е сутки), на 30-40 % (рис. 3), хотя, по литературным данным, у *H. phuvialis* этот показатель может возрастать более чем в 6 раз (Zlothnik et al., 1993). При этом в культурах (особенно у штаммов IBSS и LABIK 927-1) встречались единичные, очень крупные клетки ($V = 76\text{-}96 \cdot 10^3 \text{ мкм}^3$), превышающие по размерам модальные группы в 3-8 раз. Клетки штамма IPPAS-239 и на этой стадии клеточного цикла оставались самыми мелкими – около 45 % апланоспор в его культурах имели объем $(8\text{-}10) \cdot 10^3 \text{ мкм}^3$, а численность размерного класса с объемом более $20 \cdot 10^3 \text{ мкм}^3$, характерного для штаммов IBSS (38 %) и LABIK 927-1 (23 %), составляла лишь 2 % (см. рис. 3).

Физиолого-биохимические признаки. При массовом культивировании с целью получения астаксантина *H. phuvialis*, как правило, выращивают в два этапа. На первом этапе создают условия для размножения вегетативных клеток, на втором – культуры подвергают стрессорному воздействию, приводящему к образованию апланоспор и накоплению в них вторичных каротиноидов (Bogowitzka et al., 1991; Kobayashi et al., 1997; Boussiba, 2000; Fabregas et al., 2001; Cifuentes et al., 2003). Аналогичная схема с некоторыми изменениями была использована и в данной работе. С 1-х по 23-и сутки штаммы культивировали в накопительном режиме (рис. 4). Этот период применительно к *H. phuvialis* в литературе часто называют «вегетативным ростом». При этом имеется ввиду, что увеличение биомассы в культурах происходит в основном за счет деления клеток, а не за счет увеличения их размеров и содержания в них сухого вещества, как это происходит в процессе формирования апланоспор (Zlothnik et al., 1993; Boussiba et al., 1999). Накопительные кривые во всех вариантах эксперимента сходны и описываются уравнениями линейной регрессии ($r = 0,97\text{-}0,99$). В условиях низкой освещенности (естественный свет, северное окно) скорость роста более мелкоклеточного и тенелюбивого штамма IPPAS H-239 (Владимирова и др., 1991) была несколько выше – его средняя продуктивность за указанный период составила $2,74 \cdot 10^7 \pm 2,09 \cdot 10^5 \text{ кл} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ против $1,97 \cdot 10^7 \pm 6,01 \cdot 10^5 \text{ кл} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ у штамма IBSS и $2,02 \cdot 10^7 \pm 1,06 \cdot 10^5 \text{ кл} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ у штамма LABIK 927-1. Тем не менее, по величине биомассы в 1 л культуры в расчете на сухое вещество штамм IPPAS H-239 уступал более крупноклеточным штаммам (рис. 5, а), так как содержание АСВ в его клетках было на 60-70 % ниже (рис. 5, в).

Для ускорения выхода культуры на стационарную фазу роста и углубления состояния дефицита азота и фосфора – важных факторов интенсификации вторичного каротиногенеза – в питательную среду дважды (на 23-и и 25-е сутки) вносили легкодоступный источник углерода – ацетат натрия (NaAc) в концентрации 1 mM (Терентьева и др., 2005). В результате рост культур у всех штаммов приостанавливался, часть клеток утратила жгутики и перешла в пальмеллевидное состояние. В этот период в перинуклеарном пространстве цитоплазмы многих монад (особенно в культурах штамма IPPAS H-239) отчетливо просматривались

области, окрашенные каротиноидами. По общепринятому мнению (Elliot, 1934; Borowitzka et al., 1991; Kobayashi et al., 1997; Boussiba, 2000), накопление вторичных каротиноидов у *H. pluvialis* происходит только в апланоспорах, и лишь немногие авторы наблюдали этот процесс в подвижных клетках (Lee, Ding, 1994; Hagen et al., 2001).

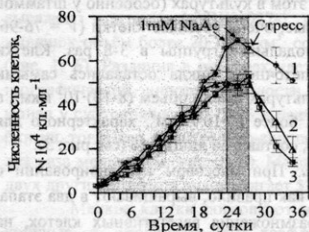


Рис. 4. Динамика численности клеток в культурах различных штаммов *Haematococcus pluvialis* Flotow при двухстадийном культивировании: 1 – IPPAS H-239; 2 – LABIK 927-1; 3 – IBSS.

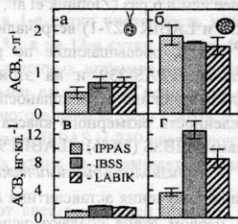


Рис. 5. Содержание сухого вещества в культурах (а, б) и клетках (в, г) различных штаммов *Haematococcus pluvialis* Flotow на стадиях вегетативного роста и зрелых апланоспор.

На 27-е сутки все культуры были подвергнуты жесткому стрессорному воздействию (45 mM NaAc + 17 mM NaCl + непрерывное двухстороннее освещение лампами «Daylight» FL 36W, $\approx 5,5$ клк + $t = 28-30$ °C), в результате которого часть клеток погибла, а часть перешла к образованию апланоспор, сопровождавшемуся интенсификацией вторичного каротиногенеза. Накопление каротиноидов происходило от центра клеток к периферии, и через 7-8 дней клетки во всех культурах были полностью окрашены в красный цвет эфирами астаксантина.

Наименьшие потери биомассы (19-23 %) наблюдались у штамма IPPAS H-239. У двух других штаммов сохранить жизнеспособность и образовать апланоспоры сумели лишь 30 % вегетативных клеток. Такой результат, по нашему мнению, связан не столько со специфическими особенностями конкретных штаммов, сколько с физиологическим состоянием культур в момент стресс-воздействия. На 27-е сутки эксперимента культуры штамма IPPAS H-239 на 51-63 % состояли из пальмелл и апланоспор на ранней стадии развития, а в параллельных штаммах IBSS и LABIK 927-1 их количество не превышало 13 %. В предварительном эксперименте при аналогичном методе воздействия на активно растущие культуры, состоявшие на 95-99 % из клеток монадной структуры, характер ответной реакции у всех трех штаммов был одинаковым – во всех случаях происходила массовая гибель клеток (75-82,8 %). В то же время, по нашим данным, при стрессировании миксотрофной культуры штамма LABIK 927-1 на поздней стационарной фазе роста при доминировании пальмелл над монадами (> 75 %) отход клеток составил лишь 4 % (Минюк и др., 2005). Эти сопоставления

позволяют предположить, что для сохранения биомассы, полученной на этапе вегетативного роста, интенсификацию каротиногенеза необходимо проводить после специального подготовительного периода, в течение которого водоросли следует постепенно перевести в пальмеллевидное состояние.

Несмотря на то, что на заключительном этапе эксперимента численность клеток в культурах штамма IBSS была минимальной, выход биомассы в расчете на сухое вещество у этого штамма был практически таким же, как и двух других (рис. 5, б), так как содержание АСВ в его апланоспорах ($12,7 \pm 1,1$ $\mu\text{г}\cdot\text{кл}^{-1}$) было в 3,5 и 1,5 раза выше, чем у IPPAS H-239 и LABIK 927-1 соответственно (рис. 5, з).

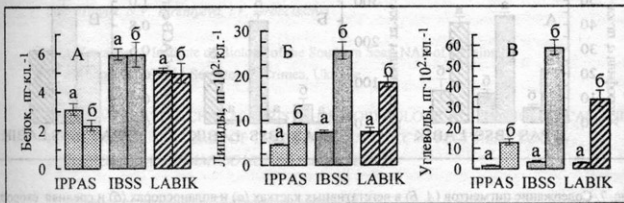


Рис. 6. Содержание белка (А), липидов (Б) и углеводов (Б) в вегетативных клетках (а) и апланоспорах (б) у различных штаммов *Haematococcus pluvialis* Flotow.

Установленные различия лишь частично связаны с тем, что у адлерского штамма доля крупных апланоспор в культурах была несколько выше. Более важно то, что содержание АСВ в расчете на единицу объема клетки здесь также самое высокое – $55 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{г}/\text{мкм}^3$ (против $33 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{г}/\text{мкм}^3$ у IPPAS H-239 и $43 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{г}/\text{мкм}^3$ у LABIK 927-1) и, следовательно, интенсивность метаболических процессов, обеспечивавших переход вегетативных клеток в фазу покоя, у штамма IBSS была выше. Накопление сухого вещества при созревании апланоспор происходило в основном за счет увеличения уровня углеводов (рис. 6, Б), что у *H. pluvialis* отмечалось и другими авторами (Boussiba, 2000). При этом абсолютное содержание углеводов в клетках штамма IBSS возросло в 15 раз (до $46,7 \pm 1,1$ % АСВ), у близкого по размерам LABIK 927-1 – в 10 раз (до $44,1 \pm 0,3$ % АСВ), а у мелкоклеточного IPPAS H-239 – лишь в 7 раз (до $37,3 \pm 1,5$ % АСВ) (см. рис. 6, Б). Содержание суммарных липидов в апланоспорах (в расчете на клетку) также существенно выше, чем в монадах (см. рис. 6, Б). Особенно четко это различие выражено у штамма IBSS – запасы липидов в его спорах за время их созревания увеличились в 3,5 раза, а у IPPAS H-239 и LABIK 927-1 – в 2 и 2,4 раза соответственно.

По содержанию белка в расчете на клетку монады и зрелые апланоспоры у каждого из исследованных штаммов практически не различались (см. рис. 6, А). В то же время его массовая доля в сухом веществе (% АСВ) в период формирования апланоспор у всех штаммов существенно снизилась с 32-35 до 5-6% (достоверные различия между штаммами не выявлены).

Ведущим фактором, определившим в данном эксперименте характер изменений в химическом составе водоросли на разных стадиях клеточного цикла,

был NaAc, игравший при высокой концентрации (45 mM) роль ингибитора фотосинтеза (рис. 7, А) и, одновременно с этим, источника углерода для миксотрофного биосинтеза запасных веществ и вторичных каротиноидов (Droop, 1961; Pringsheim, 1966; Kobayashi et al., 1997; Cifuentes et al., 2003). В отсутствие ацетата даже при высокой освещенности и глубоком дефиците биогенов продолжительность периода созревания апланоспор у *H. pluvialis*, по литературным данным, достигает 2-4 недель (Zlothnik et al., 1993; Boussiba et al., 1999; Fábregas et al., 2001).

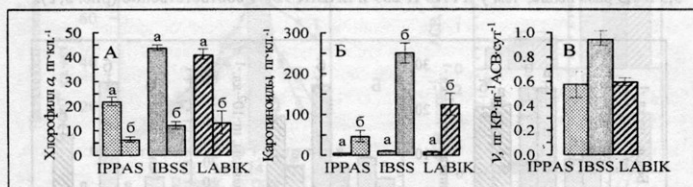


Рис. 7. Содержание пигментов (А, Б) в вегетативных клетках (а) и апланоспорах (б) и средняя скорость накопления каротиноидов (Б) у различных штаммов *Haematococcus pluvialis* Flotow.

Характерно, что и по интенсивности каротиногенеза, наиболее важному для данного вида признаку, также лидировал штамм IBSS. Абсолютное содержание суммарных каротиноидов в его клетках за 8 суток с момента стрессорного воздействия увеличилось с 11 до 250 $\mu\text{г}\cdot\text{кл}^{-1}$ (т.е. в 23 раза) (рис. 7, Б), а средняя скорость накопления КР в клетках (в расчете на ACB) была на 60-66 % выше, чем у коллекционных штаммов (рис. 7, В). Содержание КР в сухой биомассе штамма IBSS составило 2 % ACB против 1,3 % у штамма IPPAS H-239 и 1,5 % у штамма LABIK 927-1. В конечном итоге, несмотря на высокую гибель клеток в постстрессорный период в культурах штамма IBSS, выход каротиноидов из 1 л культуры ($34,5 \pm 1,2 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$) в данном варианте был выше, чем в других на 42-47 %.

Заключение

В условиях накопительной двухстадийной культуры исследованные штаммы *Haematococcus pluvialis* различаются между собой как по некоторым морфометрическим признакам (соотношению длины и ширины монадных клеток, среднему объему монад и апланоспор, размерной структуре популяций клеток на одних и тех же стадиях развития культур), так и по ряду физиолого-биохимических черт (продуктивности культур на вегетативной стадии роста, скорости накопления основных компонентов сухого вещества и вторичных каротиноидов при формировании апланоспор). Наиболее интенсивно индуцированный вторичный каротиногенез протекает в клетках штамма IBSS. При оптимизации способа и времени применения стрессорного воздействия на культуру этот штамм может представлять интерес для массового культивирования.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю признательность ведущему инженеру отдела экологической физиологии водорослей ИнБИОМ НАНУ Галатоновой О.А. за помощь в получении монокультуры штамма IBSS, а также ведущему инженеру Ин-та ботаники им. Н.Г. Холодного Лилицкой Г.Г. за экспертную оценку правильности его видовой идентификации. Работа выполнена в рамках конкурсного проекта № 0104U005011 по целевой комплексной программе НАН Украины «Новые медико-биологические проблемы и окружающая среда человека», раздел «Биологически активные вещества для здоровья человека».

G.S. Mityuk, N.V. Terentyeva, I.V. Drobetskaya

A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, NAS of Ukraine,
2, Nakhimov St., 99011 Sevastopol, Crimea, Ukraine

THE COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL AND
BIOCHEMICAL FEATURES OF THREE *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* FLOTOW
(*CHLOROPHYTA, CHLAMYDOMONADALES*) STRAINS

The features of morphology and chemical composition of vegetative cells and aplanospores in three *Haematococcus pluvialis* Flotow (*Chlorophyta*) strains under conditions of two stage batch culture were investigated. It is shown that *H. pluvialis* strains with various geographical origin and history of storage in microalgae collections may differ significantly in a number of morphological, physiological and biochemical features: cell shape and sizes, optical characteristics of cultures, growth rate on a vegetative phase of life cycle and intensity of the metabolic processes providing transformation of vegetative cells to resting stage and accumulation of secondary carotenoids.

Key words: *Haematococcus pluvialis*, cell morphometry, culture growth, chemistry, secondary carotenogenesis.

Андреева В.М., Стрелкова Л.А. Коллекция культур водорослей в лаборатории альгологии Ботанического института им. В.Л. Комарова АН СССР // Культивирование коллекционных штаммов микроводорослей. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1983. – С. 92-104.

Бранцева Ю.В., Курилов А.В. Расчет объемов клеток микроводорослей и планктонных инфузорий Черного моря. – Севастополь, 2003. – 20 с.

Владимирова М.Г., Барцевич Е.Д., Жолдаков И.А., Елифанова О.О., Маркелова А.Г., Маслова И.П., Куцова Е.С. IPPAS – коллекция культур микроводорослей Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева АН СССР // Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. – М.: ИФР, 1991. – С. 8-56.

Грамов Б.В., Титова Н.Н. CALU – коллекция культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института Санкт-Петербургского университета // Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. – М.: ИФР, 1991. – С. 76-125.

Грамов Б.В., Титова Н.Н. Коллекция культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института Ленинградского университета // Культивирование коллекционных штаммов микроводорослей. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1983. – С. 3-27.

Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – Киев: Наук. думка, 1975. – С. 228-230.

Митюк Г.С., Дробецкая И.В., Ерохин В.Е., Гордиенко А.П., Солоничина О.Р. Особенности роста и каротиногенеза у *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyta, Volvocales*) при автотрофном и миксотрофном питании // Актуальные проблемы современной альгологии: Мат. III междунар. конф. (Харьков, 20-23 апр. 2005 г.) – Харьков, 2005. – С. 100-101.

- Правила складання і подання заявки на винахід та заявки на корисну модель // <http://ukrpat.com.ua>
- Терентьева Н.В., Чубчикова И.Н., Дробежкая И.В., Минюк Г.С. Влияние освещенности на рост автотрофных и миксотрофных культур *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta, Volvocales) // Актуальные проблемы современной альгологии: Мат. III междунар. конф. (Харьков, 20-23 апр. 2005 г.) – Харьков, 2005. – С. 155.
- Ahlgren G., Merino L. Lipid analysis of freshwater microalgae: A method study // Arch. Hydrobiol. – 1991. – 121, N 3. – P. 295-306.
- Almgren K. Ecology and distribution in Sweden of algae, belonging to *Haematococcaceae* // Svensk. Bot. Tidskr. – 1966. – 60, N 1. – P. 49-73.
- Borowitzka M.A., Huisman J.M., Osborn A. Culture of the astaxanthin-producing green algae *Haematococcus pluvialis*. Effect of nutrients on growth and cell type // J. Appl. Phycol. – 1991. – 3. – P. 295-304.
- Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response // Physiol. Plant. – 2000. – 108. – P. 111-117.
- Boussiba S., Bing W., Yuan J.-P., Zarka A., Chen F. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stress // Biotechnol. Lett. – 1999. – 21. – P. 601-604.
- Cifuentes A.S., Conzáles V.A., Vargas S., Maritza H., González N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions // Biol. Res. – 2003. – 36. – P. 343-357.
- Droop M.R. *Haematococcus pluvialis* and its allies. III. Organic nutrition // Rev. Algol. – 1961. – 4. – P. 247-259.
- Elliot F.M. Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis* // Arch. Protistenk. – Jena: G. Fischer Verlag, 1934. – P. 250-273.
- Eonseon J., Polle J.E.W., Lee H.K., Hyun S.M., Chang M. Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application // J. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – 13, N 2. – P. 165-174.
- Fábregas J., Domínguez A., Regueiro M., Maseda A., Otero A. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – 53. – P. 530-535.
- Fábregas J., Otero A., Maseda A., Domínguez A. Two stage for production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* // J. Biotechnol. – 2001. – 89. – P. 65-71.
- Grünwald K., Hirschberg J., Hagen C. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* // J. Biol. Chem. – 2001. – 276, N 8. – P. 6023-6029.
- Grung M., D'Souza F.M.L., Borowitzka M., Llaaen-Jensen S. Algae carotenoids 51. Secondary Carotenoids 2. *Haematococcus pluvialis* aplanospores as source of (3S, 3'S)-astaxanthin esters // J. Appl. Phycol. – 1992. – 4. – P. 165-171.
- Hagen C., Grünwald K., Kyländer M., Rothe E. Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis* // Ibid. – 2001. – 13. – P. 79-87.
- Jeffrey S.W., Humphrey G.F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁, and c₂ in higher plants, algae and natural populations // Biochem. Physiol. Pflanz. – 1975. – N 167. – P. 191-194.
- Kobayashi M., Sakamoto Y. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis* // Biotechnol. Lett. – 1999. – 21. – P. 265-268.
- Kobayashi M., Kurimura Y., Kakizono T., Naomichi N., Tsuji Y. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis* // J. Ferment. Bioeng. – 1997. – N 1. – P. 94-97.
- Krinsky N.I., Mayne S.T., Sies H. Carotenoids in Health and Disease. – New York: Marcel Dekker Inc, 2004. – 425 p.
- Krishna K. B. Mohanty P. Secondary carotenoid production in green algae // J. Sci. Ind. Res. – 1998. – 57, N 2. – P. 51 – 63.
- Lee Y.K., Ding S.Y. Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta) // J. Phycol. – 1994. – 30. – P. 445-449.
- Lorenz R.T., Cysewski G.R. Commercial potential for *Haematococcus pluvialis* as a natural source of astaxanthin // Tibtech. Appl. – 2000. – N 18. – P. 160-167.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Faar A.L., Randall R.J. Protein measurement with folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193. – P. 265-275.

- Margalith P.Z. Production of ketocarotenoids by microalgae // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – 51. – P. 431-438.
- Naguib Y.M.A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids // J. Agric. Food. Chem. – 2000. – 48. – P. 1150-1154.
- Pringsheim E.G. Nutritional requirements of *Haematococcus pluvialis* and related species // J. Phycol. – 1966. – 2. – P. 1-7.
- Proctor V.W. Some controlling factors in the distribution of *Haematococcus pluvialis* // Ecol. 1957. – 38, N 3. – P. 457-462.
- Rowan K. S. Photosynthetic pigments of algae. – Cambridge: Univ. Press, 1989. – 334 p.
- Schoen S. Cell counting // Experimental phyecology: a laboratory manual. – Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1988. – P. 16-22.
- Strickland J.D.H., Parsons T.R. Determination of carbohydrate // A practical handbook of seawater analysis. – Ottawa: Fish. Res. Board Can., 1968. – P. 173-174.
- Zlotnik I., Sukenik A., Dubinsky Z. Physiological and photosynthetic changes during the formation of red aplanospores in the Chlorophyte *Haematococcus pluvialis* // J. Phycol. – 1993. – 29. – P. 463-469.

Получена 17.11.05

Подписала в печать Н.П. Масюк

Введение

Для получения водорослей культуры в лабораторных условиях необходимо использовать различные источники водорослей. Одним из наиболее распространенных источников являются водоросли, выращенные в естественных условиях. Однако, получение водорослей из естественных источников сопряжено с рядом трудностей, связанных с загрязнением культуры патогенными микроорганизмами, наличием в среде водорослей различных химических веществ, а также с необходимостью длительного хранения культуры. В связи с этим, одним из наиболее перспективных направлений является использование водорослей, выращенных в лабораторных условиях. В настоящее время в мире существует несколько лабораторий, занимающихся выращиванием водорослей в лабораторных условиях. Однако, большинство из них ориентировано на выращивание водорослей, имеющих промышленное значение. В то же время, в нашей стране существует несколько лабораторий, занимающихся выращиванием водорослей в лабораторных условиях. Однако, большинство из них ориентировано на выращивание водорослей, имеющих научное значение. В связи с этим, одним из наиболее перспективных направлений является использование водорослей, выращенных в лабораторных условиях. В настоящее время в мире существует несколько лабораторий, занимающихся выращиванием водорослей в лабораторных условиях. Однако, большинство из них ориентировано на выращивание водорослей, имеющих промышленное значение. В то же время, в нашей стране существует несколько лабораторий, занимающихся выращиванием водорослей в лабораторных условиях. Однако, большинство из них ориентировано на выращивание водорослей, имеющих научное значение.