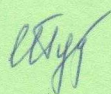


НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЮЖНЫХ МОРЕЙ им. А.О. КОВАЛЕВСКОГО

ГУДВИЛОВИЧ
ИРИНА НИКОЛАЕВНА



УДК 579:582.261.27:639.64

ПРОДУКЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ
DUNALIELLA SALINA TEOD. И *PORPHYRIDIVM PURPUREUM* (BORY) ROSS
ПРИ ИНТЕНСИВНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

03.00.17 – гидробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание научной степени
кандидата биологических наук

Севастополь – 2011

4
Диссертация является рукописью

Работа выполнена в Институте биологии южных морей
им. А.О. Ковалевского НАН Украины, г. Севастополь

Научный руководитель: кандидат биологических наук
старший научный сотрудник
Тренкеншу Рудольф Павлович
Институт биологии южных морей НАН Украины,
заведующий отделом биотехнологий и фиторесурсов

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Костиков Игорь Юрьевич
Киевский национальный университет им. Т. Шевченко,
заведующий кафедрой ботаники

доктор биологических наук, профессор
Самышев Эрнест Зайнуллинович
Институт биологии южных морей НАН Украины,
заведующий отделом функционирования морских
экосистем

_____ 2011 г. в _____ часов

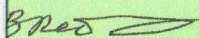
ста Д 50.214.01

раины

2.

еке Института биологии южных морей
, пр. Нахимова, 2.

_____ 2011 г.



Рябушко В.И.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последние десятилетия интерес к пигментам микроводорослей, в частности к фикобилипротеинам и каротиноидам, существенно возрос, что объясняется получением информации об их высокой антиоксидантной активности (Higata, 2000; Abd El-Baky, 2003; Ефремова, 2010). Широкое распространение получили производства по выращиванию микроводорослей для последующего выделения из них биологически ценных веществ (Borowitzka, 1999; García-González, 2003; 2005; Минюк, 2008). Такие технологии, как правило, многостадийны, так как процессы интенсивного роста культуры и накопления пигментов в клетках микроводорослей не всегда совпадают. В любом случае – одностадийной или двухстадийной технологии – определяющим является создание условий для получения культуры микроводоросли с максимальными продукционными характеристиками. Решение вопросов, связанных с управлением процессами роста биомассы и синтеза пигментов в клетках микроводорослей, является основой для получения максимального количества ценных веществ. Управление этими процессами сводится к созданию контролируемых условий, позволяющих реализовать потенциальные возможности культур. Большинство известных технологий выращивания микроводорослей основаны на методе периодических культур, который является наиболее изученным и разработанным на сегодняшний день. Возможности квазинепрерывного культивирования, как способа управления процессами биосинтеза ценных веществ, изучены недостаточно (García-González, 2002; García-González, 2005; Zhu, 2008), что вызывает трудности в разработке промышленных технологий культивирования микроводорослей на основе данного способа для последующего получения БАВ. Не выявлены закономерности изменения продуктивности культур микроводорослей, а также режимы, позволяющие получать максимальную продукцию как по биомассе, так и по биологически ценным веществам. В связи с этим актуальным представляется выявить особенности изменения продукционных характеристик и содержания пигментов в интенсивной культуре микроводорослей при квазинепрерывном и накопительном режимах выращивания.

Связь работы с программами, темами, планами. Диссертационная работа выполнена в отделе биотехнологий и фиторесурсов ИнБИОМ НАН Украины в рамках исследований по следующим темам: «Изучение функционирования морских биотехнологических комплексов и их взаимодействия с окружающей средой» (№ 0106U001586, 2006 – 2010 гг.); «Системный анализ и комплексная оценка современного состояния изученности биологических ресурсов Азово-Черноморского бассейна и перспектив развития марикультуры, ресурсных, био- и нанобиотехнологий» (№ 0107U008034, 2007 – 2009 гг.); «Разработка промышленной технологии интенсивного выращивания морских галобных микроводорослей» (№ 0105U007493, 2005 г.). В перечисленных темах диссертант участвовал в качестве исполнителя.

Цель и задачи исследования. Цель работы – установить влияние условий выращивания на продуктивность культур и содержание пигментов *Dunaliella salina* Teod. и *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. В соответствии с поставленной целью решали следующие задачи:

БИБЛИОТЕКА
№ 145 а/р

- исследовать ростовые характеристики и динамику содержания пигментов микроводорослей в условиях интенсивной культуры на примере *D. salina* и *P. purpureum*;
- оценить скорость роста и химический состав *D. salina* и *P. purpureum* при накопительном и различных режимах квазинепрерывного культивирования;
- установить влияние уровня углеродного обеспечения на продукционные характеристики микроводорослей на примере *D. salina*;
- определить оптимальные условия для реализации максимального накопления и максимальной продукции пигментов зелёных и красных микроводорослей в квазинепрерывной плотной культуре;
- оценить накопление каротиноидов микроводорослью *D. salina* в солёных водоёмах западной части Крыма;
- предложить схему получения водного экстракта В-фикоэритрина из биомассы *P. purpureum*.

Объект исследования. Управление ростом и метаболизмом микроводорослей в условиях интенсивного культивирования.

Предмет исследования. Ростовые и биохимические показатели *D. salina* и *P. purpureum* в зависимости от условий культивирования.

Методы исследования. В работе использовали фотоколориметрические и спектрофотометрические методы (для определения оптической плотности культур микроводорослей, содержания белка, фикобилипротеинов, хлорофиллов и суммарных каротиноидов), объёмно-весовой метод (для определения плотности культуры), расчётные методы определения скорости роста культур микроводорослей, методы математической статистики и математического моделирования.

Научная новизна полученных результатов. Впервые определены продукционные характеристики квазинепрерывных культур двух видов микроводорослей (*D. salina* и *P. purpureum*), являющихся перспективными объектами биотехнологии. Установлен характер изменения содержания пигментов *D. salina* и *P. purpureum* в квазинепрерывной культуре и показана возможность регулирования химического состава данных микроводорослей с помощью варьирования удельной скорости потока среды. Впервые для *D. salina* и *P. purpureum* выявлены оптимальные режимы для получения наибольшей продукции по биомассе и пигментам при квазинепрерывном способе культивирования, что позволяет использовать его при промышленном получении β-каротина и В-фикоэритрина. Впервые показана принципиальная возможность повторного использования культуральной среды при квазинепрерывном выращивании микроводоросли *P. purpureum*. Предложена технологическая схема получения фикобилипротеинов из *P. purpureum*, а также разработаны рекомендации по промышленному использованию солёных водоёмов Крыма для получения природного β-каротина. Экспериментально установлена зависимость продуктивности культуры *D. salina* по фотосинтетическим пигментам от углеродного питания.

Практическое значение полученных результатов. Исследование особенностей роста культур *D. salina* и *P. purpureum* и биосинтеза пигментов и белка при квазинепрерывном способе культивирования послужило научной основой для усовершенствования методов их массового выращивания и разработки рекомендаций применения данного способа для различных стадий технологий получения β-каротина и В-фикоэритрина. Экспедиционные исследования определили особенности распространения *D. salina* в естественных и искусственных солёных водоёмах Крыма, что позволило оценить возможность их промышленного использования для получения природного β-каротина. Разработанная комплексная схема получения фикобилипротеинов, включающая интенсивное культивирование *P. purpureum*, а также способы обработки биомассы микроводоросли и последующее выделение пигментов в виде водного экстракта, является основой для получения нетоксичных пищевых красителей. Полученные экспериментальные данные по динамике содержания пигментов и продуктивности культур микроводорослей важны для оптимизации условий культивирования и максимизации выхода пигментов в производственных условиях.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием. Разработка задач и выбор методов исследований, основной комплекс экспериментальных работ (постановка экспериментов, определение ростовых характеристик культур, динамики содержания белка, фикобилипротеинов, хлорофиллов, каротиноидов в биомассе микроводорослей, изменений pH и температуры, статистическая обработка полученных данных), обобщение, анализ и интерпретация полученных данных выполнены автором самостоятельно.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на Международной конференции молодых ученых-ботаников: Актуальные проблемы ботаники и экологии (г. Киев, 2007 г.), Международной конференции молодых ученых: Биология: от молекулы до биосферы (г. Харьков, 2007 г.), Международной научно-практической конференции и X зоологической конференции: Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов (г. Минск, 2009 г.), Conferința științifică națională cu participare internațională consacrată celei de-a 50 aniversări de la fondarea Secției de Microbiologie «Probleme actuale ale microbiologiei și biotehnologiei» (Chișinău, Republica Moldova, 2009 г.), научно-практической конференции «Биоразнообразие и устойчивое развитие» (г. Симферополь, 2010 г.), XI конференции молодых ученых «Научные, прикладные и образовательные аспекты физиологии, генетики, биотехнологии растений и микроорганизмов» (г. Киев, 2010 г.), Международной конференции молодых ученых-ботаников: Актуальные проблемы ботаники и экологии (г. Ялта, 2010 г.), Международной научной конференции «Каразинские естественнонаучные студии» (г. Харьков, 2011 г.), Всеукраинской научной конференции «Ботаника и микология: проблемы и перспективы на 2011 – 2020 гг.», (г. Киев, 2011 г.), VII Международной научно-практической конференции молодых ученых по проблемам водных экосистем Понт Эвксинский (г. Севастополь, 2011 г.), семинарах отдела биотехнологий и фиторесурсов ИнБЮМ НАНУ (2007 – 2011 гг.).

Публикации. По теме диссертации опубликована 21 научная работа (две без соавторов), из которых: 10 статей в специализированных научных изданиях, рекомендованных ВАК Украины, 10 работ в сборниках статей, материалах и тезисах национальных и международных конференций, 1 патент на изобретение. Из статей, опубликованных в соавторстве, в диссертации использованы данные, полученные автором самостоятельно. Права соавторов публикаций не нарушены.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста, состоит из введения, шести разделов, выводов, списка литературы (250 наименований, в том числе 160 зарубежных), иллюстрирована 24 таблицами и 35 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Проанализированы литературные данные по интенсивному культивированию микроводорослей, влиянию минерального питания и световых условий на продукционные характеристики и содержание пигментов в клетках микроводорослей. Изучены и обобщены методы выделения и очистки фикобилипротеинов. Подчеркнута необходимость подбора условий и режимов культивирования как способа управления процессами роста микроводорослей и синтеза биологически ценных веществ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Методы и условия выращивания. Экспериментальные работы выполняли на базе отдела биотехнологий и фиторесурсов ИнБЮМ НАНУ. Исследованы пробы рапы, отобранные в солёных водоёмах западной части Крымского п-ова.

Работы проводили в двух направлениях:

- определение продуктивности культур микроводорослей и исследование особенностей накопления в них пигментов и при различных режимах интенсивного культивирования;
- разработка технологических рекомендаций по промышленному получению пигментов из биомассы микроводорослей.

Экспериментальные исследования проводили с двумя культурами низших фотофитов: дуналиелла – *Dunaliella salina* Teod. (штамм IBSS-2), порфиридиум – *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross (синоним *Porphyridium cruentum* Näg.) (штамм IBSS-70) из коллекции ИнБЮМ НАНУ. В работе использовали модифицированные питательные среды Тренкеншу (Тренкеншу, 1979) и Ben-Amotz (Shaish, Avron, Ben-Amotz, 1990). Выращивание микроводорослей осуществляли методами накопительного и квазинепрерывного культивирования. Инокулят вносили в культиваторы с таким расчетом, чтобы начальная плотность культуры во всех вариантах опыта была одинаковой. Культуры микроводорослей выращивали в установках, которые состояли из культиваторов плоскопараллельного типа, системы подачи газовой смеси, термостабилизирующей системы и системы освещения. В процессе выращивания культуры *D. salina* и *P. purpureum* непрерывно снабжали газовой смесью с

концентрацией углекислоты от 1 до 3 %, pH среды поддерживали на уровне 8 – 9 ед. В качестве источника света использовали вертикальную световую решетку, состоящую из 10 – 15 ламп ЛБ-80, размещённых максимально близко друг к другу или лампу ДРЛ-750, в обоих случаях поверхностная освещённость культиваторов составляла около 80 Вт/м². Температуру среды стабилизировали на заданном уровне скоростью протока охладителя в водяной рубашке культиваторов.

Методы измерений и анализов. Рост культур регистрировали фотометрическим методом по изменению оптической плотности суспензии микроводорослей в области 750 нм, измеряемой на фотоэлектроколориметре КФК-2. Число клеток микроводорослей определяли в камере Горяева. Освещённость на поверхности культиваторов измеряли при помощи люксметра Ю-116, pH среды контролировали при помощи иономера pH-150. Определения содержания в среде нитратов производили в соответствии со стандартными гидрохимическими методиками (Методы ..., 1988). Содержание сухого вещества (СВ) определяли объёмно-весовым методом (Тренкеншу, 1979). Определяемые показатели химического состава выражали в пересчете на органическое вещество (ОВ). Массовую долю зольного остатка в сырой биомассе микроводорослей определяли путем предварительного высушивания навесок при 105°C в течение 24 ч и последующего сжигания в муфельной печи при $t = 500^\circ\text{C}$ до постоянного веса (Методы ..., 1975). Количественное определение белка проводили по методу Лоури (Lowry, 1951), а содержания пигментов – спектрофотометрическим методом (Методы ..., 1975). Пигменты экстрагировали из клеток микроводорослей 100 % ацетоном. Спектры экстрактов пигментов промеряли на регистрирующем спектрофотометре СФ-2000 в диапазоне длин волн 400 – 800 нм с шагом 0,1 нм. Расчет концентраций пигментов проводили по формулам, предложенным Jeffrey и Rowen (Jeffrey, 1975; Rowen, 1989) по значениям оптической плотности на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения пигментов. Надежность результатов определений обеспечивало проведение экспериментов с использованием стандартных методик отбора проб, подготовки их к анализу, проведения аналитических исследований и обработки результатов. Общее количество аналитических определений – 2530.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РОСТА И МЕТАБОЛИЗМА *DUNALIELLA SALINA* В УСЛОВИЯХ КУЛЬТУРЫ

Ростовые и биохимические показатели *Dunaliella salina* в условиях накопительной и квазинепрерывной культуры. Плотность культуры *D. salina* за 11 суток накопительного культивирования возросла в 35 раз по сравнению с первоначальной (от 0,12 до 4 г ОВ · л⁻¹ (грамм органического вещества на 1 л)) (рис. 1). При накопительном культивировании массовые доли пигментов и белка для всех вариантов опыта на всех фазах роста культуры практически совпадали, при этом содержание пигментов на начало выращивания в среднем (для 4 биологических повторностей) составило: хлорофилла $a - 0,65 \pm 0,06$ % ОВ, хлорофилла $b - 0,10 \pm 0,02$ % ОВ, каротиноидов – $0,50 \pm 0,05$ % ОВ, белка – $26,3 \pm 2,5$ % ОВ, а к началу стационарной фазы (на 10-е сутки) – $2,19 \pm 0,25$ % ОВ, $0,53 \pm 0,07$ % ОВ, $0,90 \pm 0,06$ % ОВ, $32,8 \pm 3,1$ % ОВ, соответственно (рис. 2).

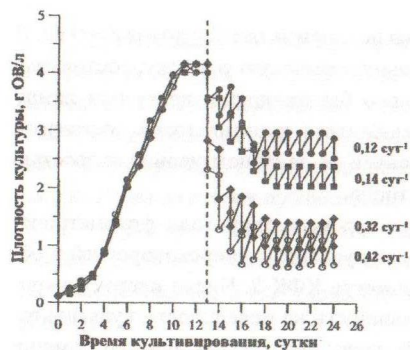


Рис. 1. Динамика плотности накопительной и квазинепрерывной культуры *Dunaliella salina* при различной скорости протока среды

Таким образом, за 11 суток накопительного культивирования относительное содержание хлорофилла *a* увеличилось в 3,4 раза, хлорофилла *b* – в 5,3 раза, каротиноидов – в 1,8 раза, а белка – в 1,3 раза. Динамика содержания фотосинтетических пигментов и белка в накопительной культуре дуналиеллы имела вид S-образной кривой (рис. 2), в целом соответствуя накопительной кривой плотности культуры. Сроки начала стабилизации относительного содержания пигментов в клетках *D. salina* совпадали, с моментом истощения в среде нитратов (8–9 сутки), а относительное содержание белка в этих условиях начало снижаться.

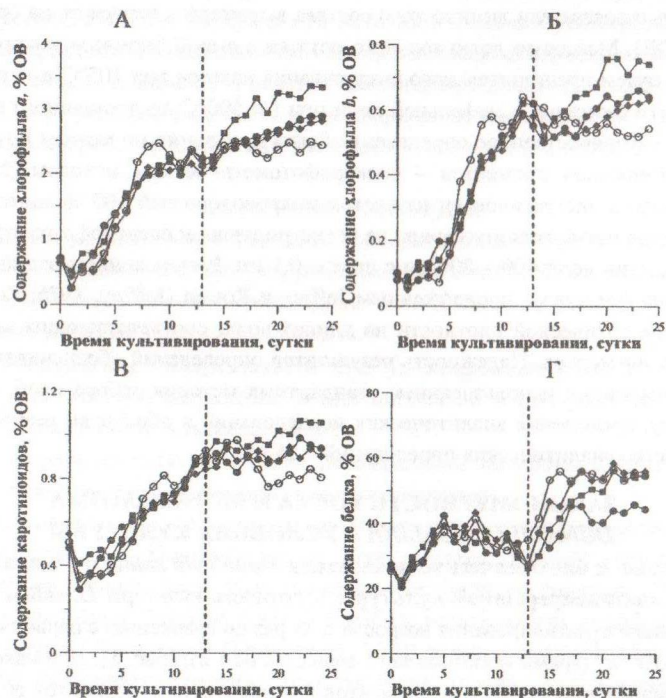


Рис. 2. Динамика относительного содержания хлорофилла *a* (А), хлорофилла *b* (Б), каротиноидов (В) и белка (Г) в накопительной и квазинепрерывной культуре *Dunaliella salina* при различных удельных скоростях протока среды: ● – 0,12 сут⁻¹, ■ – 0,14 сут⁻¹, ◆ – 0,32 сут⁻¹, ○ – 0,42 сут⁻¹; пунктирная линия – граница накопительного и квазинепрерывного культивирования

Таким образом, максимумы накопления пигментов в клетках *D. salina* (2,19; 0,53 и 0,90 % ОВ % для хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов, соответственно) совпадали с фазой замедления роста накопительной культуры микроводоросли. Максимальное содержание белка (38,9 % ОВ) отмечено в середине линейной фазы роста культуры.

Для каждой фазы роста накопительной культуры *D. salina* рассчитаны удельные скорости синтеза и продуктивность по биомассе, пигментам и белку (табл. 1).

Таблица 1

Кинетические характеристики синтеза биомассы клеток, хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, белка и суммарных каротиноидов накопительной культуры *Dunaliella salina*

Параметр	μ_m , сут ⁻¹	P_m , г·л ⁻¹ ·сут ⁻¹	C_0 , г·л ⁻¹	C_m , г·л ⁻¹
Биомасса	0,49	0,53	0,12	4,09
Белок	0,59	0,20	0,03	1,37
Хл <i>a</i>	0,64	0,0144	0,0008	0,0941
Хл <i>b</i>	0,67	0,0039	0,0001	0,0260
Каротиноиды	0,51	0,0044	0,0006	0,0369

Примечание. μ_m – максимальная удельная скорость синтеза, P_m – максимальная продуктивность, C_0 – концентрация на начало логарифмической фазы роста культуры, C_m – максимальная концентрация, соответствующая стационарной фазе роста культуры.

Сравнение удельных скоростей синтеза пигментов и белка относительно плотности культуры показало, что при её низкой плотности, когда рост микроводоросли не ограничен минеральным обеспечением (логарифмическая фаза роста), удельная скорость синтеза изученных компонентов максимальна. В дальнейшем, при повышении плотности культуры все эти показатели снижаются, достигая нулевых значений при максимально возможной для данных условий плотности культуры (рис. 3). Рассчитанные максимальные удельные скорости синтеза пигментов, белка и роста биомассы *D. salina* близки и варьируют в узком диапазоне (0,5 – 0,7 сут⁻¹), кроме того, соответствуют плотности культуры в интервале 0,12 – 1,5 г ОВ·л⁻¹ (рис. 3 А).

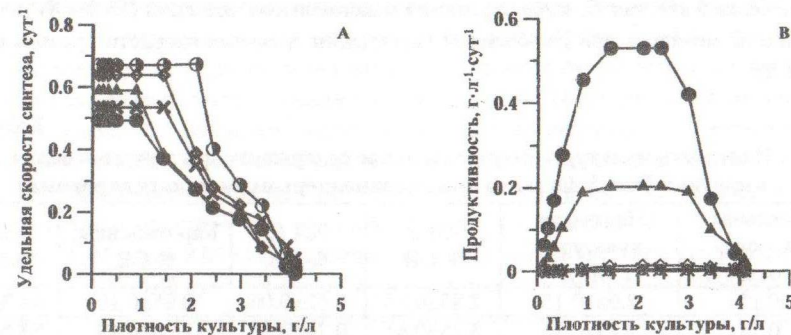


Рис. 3. Зависимость удельной скорости синтеза (А) и продуктивности (В) биомассы (●), белка (▲), хлорофилла *a* (◇), хлорофилла *b* (○) и каротиноидов (×) от плотности культуры *Dunaliella salina*

Максимальная продуктивность культуры по биомассе, белку и фотосинтетическим пигментам соответствует диапазону плотности культуры 1,5 – 3 г ОВ · л⁻¹ (рис. 3 В).

Таким образом, при организации биотехнологического производства *D. salina* с использованием накопительного культивирования нет необходимости полностью реализовывать классическую S-образную накопительную культуру, так как на фазах замедления и стационарной абсолютная и относительная скорости синтеза белка, хлорофилла *a*, хлорофилла *b*, суммарных каротиноидов и биомассы снижаются до нулевых значений. На основании проведённых расчётов была определена область плотности культуры, в которой как абсолютная так и удельная скорости синтеза культуры *D. salina* максимальны для данных условий (около 1,5 г ОВ · л⁻¹), тем самым получен оптимальный диапазон для максимальной производительности промышленных систем по получению БАВ.

С началом культивирования в квазинепрерывном режиме систематически усилили элементы минерального питания в среду, их количество пропорционально увеличивалось с увеличением удельной скорости протока. Плотность культуры при этом уменьшалась и достигала стационарного динамического равновесия (рис. 1, табл. 2), которое характеризуется равенством удельных скоростей роста культуры и скорости протока среды (Перт, 1978; Тренкеншу, 2005).

Относительное содержание хлорофилла *a* и хлорофилла *b* в клетках *D. salina* при квазинепрерывном культивировании зависит от двух основных факторов: количества биогенных элементов, поступающих при обмене и световых условий в культуре (изменения средней пространственной облучённости клеток при различной плотности культуры) (табл. 2). При отсутствии лимитирования по биогенам при низких скоростях протока среды относительное содержание пигментов в клетках микроводоросли максимально (при $\omega = 0,14$ сут⁻¹), при увеличении скорости протока от 0,14 до 0,42 сут⁻¹ оно снижалось на 30 %, что объясняется усиливающимися процессами фотодеструкции при уменьшении плотности культуры. На относительное содержание белка значительное влияние оказывало только количество элементов минерального питания, так, при увеличении количества биогенов, поступающих в культуру, содержание белка в клетках *D. salina* достигало максимальных значений (55 % ОВ) и существенно не менялось при дальнейшем увеличении удельной скорости протока среды (табл. 2).

Таблица 2

Плотность культуры и относительное содержание пигментов и белка в клетках *Dunaliella salina* при квазинепрерывном культивировании

Удельная скорость протока, сут ⁻¹	Плотность культуры, г ОВ · л ⁻¹	ХЛ <i>a</i> , % ОВ	ХЛ <i>b</i> , % ОВ	Каротиноиды, % ОВ	Белок, % ОВ
0,12	2,96±0,15	2,89±0,23	0,62±0,06	0,95±0,10	44,3±2,8
0,14	2,39±0,15	3,25±0,41	0,74±0,18	1,08±0,19	54,6±3,9
0,32	1,42±0,11	2,77±0,15	0,60±0,06	0,92±0,07	55,9±5,8
0,42	1,14±0,11	2,34±0,24	0,52±0,06	0,79±0,14	54,7±5,6

Полученные результаты соответствуют литературным данным для активно растущей культуры дуналиеллы (Пахомова, 1964; Vasquez-Suarez, 2007). Азот не входит в состав молекул каротиноидов, тем не менее, прослеживается связь между уровнем накопления суммарных каротиноидов (табл. 2) и условиями азотного обеспечения. В проведённом эксперименте при всех заданных режимах протока среды динамика относительного содержания каротиноидов соответствовала динамике содержания хлорофиллов (рис. 2). Таким образом, показана принципиальная возможность регулирования относительного содержания пигментов и белка в клетках *D. salina* с помощью варьирования удельной скорости протока среды.

При культивировании микроводорослей в промышленных условиях большое значение имеет продуктивность, которая может значительно изменяться при использовании различных режимов культивирования. В связи с этим была рассчитана средняя продуктивность *D. salina* для квазинепрерывного (на стационаре) и накопительно-го культивирования за 11 дней (до начала стационарной фазы роста) (табл. 3).

Таблица 3

Продуктивность культуры *Dunaliella salina* по биомассе, пигментам и белку при накопительном и квазинепрерывном режимах культивирования

Удельная скорость протока, сут ⁻¹	Продуктивность				
	Биомасса, г ОВ · л ⁻¹ · сут ⁻¹	ХЛ <i>a</i> , мг · л ⁻¹ · сут ⁻¹	ХЛ <i>b</i> , мг · л ⁻¹ · сут ⁻¹	Каротиноиды, мг · л ⁻¹ · сут ⁻¹	Белок, мг · л ⁻¹ · сут ⁻¹
0	0,33±0,02	8,56±0,86	2,30±0,22	3,17±0,31	119,7±11,9
0,12	0,35±0,01	9,61±0,69	2,20±0,21	3,17±0,23	157,9±10,1
0,14	0,33±0,01	10,82±0,69	2,48±0,22	3,43±0,37	181,8±13,1
0,32	0,46±0,02	12,42±0,63	2,72±0,22	4,15±0,38	252,7±8,0
0,42	0,48±0,04	11,22±1,02	2,39±0,24	3,96±0,29	263,5±9,3

Выявлено, что накопительный и квазинепрерывный методы выращивания при низких удельных скоростях протока среды (0,12 и 0,14 сут⁻¹) имели близкую продуктивность, но более низкую, чем при высоких скоростях протока (табл. 3). Эта тенденция характерна для продуктивности культуры не только по биомассе, но и для других исследованных параметров. Квазинепрерывное выращивание *D. salina* основано на том, что культура длительное время находится в рамках линейного роста, когда продуктивность, должна быть одинакова и максимальна. Поэтому наблюдающиеся на практике (табл. 3) отклонения могут объясняться протекающими адаптационными процессами, а также лимитом биогенных элементов во второй половине накопительного культивирования и при низких скоростях протока среды. Статистически значимое снижение продуктивности культуры *D. salina* по пигментам ($t = 5,81 > t_{05} = 2,07$ (ХЛ *a*); $t = 5,07 > t_{05} = 2,07$ (каротиноиды)) при увеличении удельной скорости протока среды от 0,32 до 0,42 сут⁻¹ объясняется уменьшением относительного содержания пигментов, так как для продуктивности культуры по биомассе и белку аналогичная динамика отсутствует ($t = 2,17 < t_{05} = 2,26$ (биомасса); $t = 2,07 < t_{05} = 2,15$ (белок)).

Таким образом, наибольшая продуктивность по биомассе, пигментам и белку реализуется для исследованного вида при квазинепрерывном культивировании с удельной скоростью протока среды $0,32 \text{ сут}^{-1}$ и достигает: по биомассе – $0,45 \text{ г ОВ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, суммарным каротиноидам – $4 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, а белку – $0,25 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, что соответствует ранее рассчитанным значениям максимально возможной продуктивности культуры *D. salina* для данных условий. Средняя продуктивность при накопительном выращивании в 1,5 – 2 раза ниже. Высокие скорости роста культуры *D. salina*, полученные при квазинепрерывном культивировании ($\omega = 0,32 \text{ сут}^{-1}$), позволяют рекомендовать его для накопления биомассы микроводоросли на 1-ом этапе двухстадийного выращивания, направленного на получение β -каротина.

Ростовые и биохимические показатели *Dunaliella salina* в условиях квазинепрерывной культуры при различном уровне минерального обеспечения. При культивировании микроводорослей с практической точки зрения важны количество получаемой биомассы, её качество и рентабельность применяемого метода, поэтому для оптимизации состава и увеличения выхода получаемой биомассы существенное значение имеет подбор сред и режимов выращивания. В эксперименте с *D. salina* применяли две среды (Тренкеншу и Ben-Amotz), причём в последней для повышения рабочей плотности культуры использовали удвоенное количество биогенов. Первоначально проводили накопительное культивирование. В результате предварительных расчётов были определены скорости протока квазинепрерывного культивирования, таким образом, чтобы рабочая плотность культуры на обеих средах была около $1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$: $0,2 \text{ сут}^{-1}$ для *D. salina*, выращиваемой на среде Тренкеншу, и $0,1 \text{ сут}^{-1}$ – на среде Ben-Amotz. Плотности культуры через 6 суток после смены режима культивирования практически совпали и составили: $1,25 \text{ г ОВ} \cdot \text{л}^{-1}$ – на среде Тренкеншу и $1,21 \text{ г ОВ} \cdot \text{л}^{-1}$ – на среде Ben-Amotz (табл. 4).

Таблица 4

Плотность культуры *Dunaliella salina* и её продуктивность при накопительном и квазинепрерывном режимах культивирования

Питательная среда	Режим культивирования	Плотность культуры, г ОВ · л ⁻¹	Продуктивность по биомассе, г ОВ · л ⁻¹ · сут ⁻¹	Продуктивность по каротиноидам, мг · л ⁻¹ · сут ⁻¹
Тренкеншу	Накопительный	3,66±0,11	0,31±0,01	0,77±0,04
Ben-Amotz	Накопительный	0,89±0,08	0,07±0,01	0,45±0,02
Тренкеншу	Квазинепрерывный, 0,2 сут ⁻¹	1,25±0,10	0,25±0,02	1,38±0,1
Ben-Amotz	Квазинепрерывный, 0,1 сут ⁻¹	1,21±0,08	0,12±0,01	0,45±0,02

Для культуры микроводоросли, выращиваемой на среде Ben-Amotz, переход к квазинепрерывному режиму ($\omega = 0,1 \text{ сут}^{-1}$) не привёл к значительному изменению содержания каротиноидов. Их содержание лишь снизилось от $0,46 \pm 0,05 \%$ ОВ на стационарной фазе накопительного до $0,38 \pm 0,01 \%$ ОВ при квазинепрерывном, что, в основном, соответствовало динамике содержания хлорофиллов. По-видимому, изменение

содержания пигментов отражало процессы адаптации клеток *D. salina* при изменении условий культивирования. Показательно, что ни на одной из сред накопления каротиноидов в клетках не происходило, что объясняется периодическим внесением минеральных элементов в культуру при обмене среды.

Для сравнения продукционных характеристик *D. salina* рассчитаны продуктивности накопительной (средняя за 10 суток) и квазинепрерывной культуры по биомассе и каротиноидам (табл. 4). Продуктивность культуры, выращиваемой на среде Тренкеншу, при накопительном и квазинепрерывном режимах отличалась незначительно. Так, продуктивность *D. salina* при скорости протока $\omega = 0,2 \text{ сут}^{-1}$ составляла $0,25 \text{ г ОВ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, что несколько ниже, чем при накопительном культивировании. Снижение продуктивности культуры при 20 % ежесуточном обмене не может быть связано с лимитированием по биогенным элементам, так как при ежесуточном обмене вносится около 70 мг минерального азота на 1 л культуры, а отбирается 0,25 г ОВ биомассы. Известно, что для синтеза 0,25 г биомассы в пересчёте на органическое вещество необходимо 20 – 25 мг минерального азота (Упитис, 1983; Лелеков, 2009). Наблюдаемое понижение продуктивности культуры на 18 % может объясняться действием другого лимитирующего фактора, например, углеродного обеспечения. Отсутствие различий продуктивности *D. salina* по каротиноидам при накопительном и квазинепрерывном выращивании на среде Ben-Amotz объясняется сопоставимыми значениями как продуктивности по биомассе, так и относительного содержания каротиноидов.

Таким образом, при квазинепрерывном культивировании *D. salina* на среде Ben-Amotz накопления каротиноидов в клетках не происходит, что вероятно связано с периодическим внесением минеральных элементов в культуру при обмене среды. Продуктивность культуры *D. salina* по биомассе и каротиноидам при выращивании в квазинепрерывном режиме на среде Тренкеншу в 2 – 3 раза выше, чем на среде Ben-Amotz (при рабочей плотности $1,2 \text{ г ОВ} \cdot \text{л}^{-1}$).

Ростовые и биохимические характеристики квазинепрерывной культуры *Dunaliella salina* в условиях пониженного уровня обеспечения углекислотой. В эксперименте была определена продуктивность квазинепрерывной культуры *D. salina* по биомассе, хлорофиллам *a*, *b* и каротиноидам при концентрации углекислоты в подаваемой газовой смеси 1 и 2 % по объёму (v/v). Было установлено, что с увеличением скорости протока среды (от 0,1 до 0,3 сут⁻¹) и концентрации CO₂ в газовой смеси 1 % (v/v) плотность культуры выросла (от 0,26 до 0,48 г ОВ · л⁻¹) и повысилась относительное содержание хлорофилла *a* и хлорофилла *b* в биомассе на 30 и 60 % соответственно (рис. 4). Дальнейшее увеличение скорости протока среды до 0,4 сут⁻¹ приводило к снижению плотности культуры до 0,34 г ОВ · л⁻¹ и к уменьшению относительного содержания пигментов на 30 %, что, вероятно, связано с изменением световых условий в культуре *D. salina*. Четкой зависимости относительного содержания каротиноидов от удельной скорости протока среды не выявлено: для всех скоростей протока оно изменялось в диапазоне от 0,90 до 1,07 % ОВ (рис. 4). Проведён расчёт продуктивности квазинепрерывной культуры микроводоросли *D. salina* по биомассе и пигментам для различных скоростей протока среды при концентрации CO₂



Рис. 4. Относительное содержание хлорофилла *a*, хлорофилла *b* и суммарных каротиноидов в клетках *Dunaliella salina* при квазинепрерывном культивировании (1 % CO₂)

раз соответственно. Относительное содержание суммарных каротиноидов в этих же условиях незначительно снизилось (табл. 5).

Таблица 5

Плотность квазинепрерывной культуры и относительное содержание фотосинтетических пигментов в клетках *Dunaliella salina* ($\omega = 0,4$ сут⁻¹) при различной концентрации CO₂

Концентрация CO ₂ , %	ХЛ <i>a</i> , % ОВ	ХЛ <i>b</i> , % ОВ	Каротиноиды, % ОВ	Плотность культуры в конце периода, г ОВ · л ⁻¹
1	0,46±0,04	0,13±0,02	0,95±0,06	0,34±0,04
2	1,86±0,07	0,55±0,05	0,80±0,06	0,65±0,05

Продуктивность культуры по биомассе увеличилась в 2 раза, по хлорофиллам – в 8 раз, по суммарным каротиноидам – в 2 раза при увеличении концентрации углекислоты от 1 до 2 % (табл. 6). Улучшение условий углеродного питания оказывало наиболее значительное влияние на продуктивность культуры *D. salina* по хлорофиллу *a* и хлорофиллу *b*, поскольку обусловлено как ростом продуктивности культуры, так и увеличением их относительного содержания в биомассе в 4 раза (табл. 5, 6). Рост продуктивности по каротиноидам определялся, в основном, скоростью роста культуры, поскольку содержание каротиноидов при увеличении концентрации CO₂ значительно не изменялось.

Таблица 6

Продуктивность культуры *Dunaliella salina* по биомассе и пигментам при квазинепрерывном культивировании ($\omega = 0,4$ сут⁻¹) при различной концентрации CO₂

Концентрация CO ₂ , %	Продуктивность			
	Биомасса, г ОВ · л ⁻¹ · сут ⁻¹	Хл <i>a</i> , мг · л ⁻¹ · сут ⁻¹	Хл <i>b</i> , мг · л ⁻¹ · сут ⁻¹	Каротиноиды, мг · л ⁻¹ · сут ⁻¹
1	0,13±0,02	0,61±0,05	0,17±0,02	1,21±0,05
2	0,26±0,02	4,87±0,26	1,45±0,12	2,13±0,08

в газовой смеси 1 %. Наибольшая продуктивность *D. salina* получена при удельной скорости протока среды 0,3 сут⁻¹ и составила: по биомассе – 0,15 г ОВ · л⁻¹ · сут⁻¹, хлорофиллу *a* – 0,8 мг · л⁻¹ · сут⁻¹, хлорофиллу *b* – 0,28 мг · л⁻¹ · сут⁻¹, суммарным каротиноидам – 1,2 мг · л⁻¹ · сут⁻¹. При повышении концентрации углекислого газа в газовой смеси до 2 % (v/v) при $\omega = 0,4$ сут⁻¹ наблюдали увеличение

плотности культуры в 2 раза и рост относительного содержания в её клетках хлорофиллов *a* и *b* в 3,9 и 4,5

Таким образом, установлено, что углеродное обеспечение оказывает существенное влияние как на продуктивность культуры *D. salina*, так и на содержание пигментов в её клетках. Однако, полученные значения продуктивности культуры *D. salina* по биомассе и пигментам при 1 и 2 % CO₂ в 3,5 – 15 раз ниже показателей, полученных для 3 % CO₂ при такой же поверхностной освещённости и сопоставимой удельной скорости протока среды (табл. 3). По-видимому, лимитирование по углеродному питанию определяло низкую продуктивность культуры в эксперименте, поскольку углерод составляет ~ 50 % сухого вещества (СВ) клеток микроводорослей (Упитис, 1983). Проведённые исследования показали, что оптимальная концентрация углекислого газа для интенсивного культивирования *D. salina* должна составлять около 3 %.

DUNALIELLA SALINA В СОЛЁНЫХ ВОДОЁМАХ ЗАПАДНОЙ ЧАСТИ КРЫМА

На основании проведённых анализов по определению плотности озёрной рапы, численности клеток *D. salina*, а также характеристики преобладающей стадии её жизненного цикла солёные водоёмы западной части Крыма были разделены на три группы. Установлено, что накопление каротиноидов в клетках *D. salina*, выполняющих защитные функции в экстремальных условиях существования микроводоросли, начинается при плотности рапы свыше 1100 кг · м⁻³. В озёрах Панское, Джарылгач, Ярлыгач и Бакальское с меньшей минерализацией воды ($\rho = 1015 - 1100$ кг · м⁻³) численность клеток дуналиеллы относительно невысокая (0 – 40 тыс. кл. · см⁻³), что, вероятно, объясняется её низкой конкурентоспособностью в условиях среды с пониженной солёностью. Здесь преобладала зелёная «форма» *D. salina*, клетки находились в вегетативном состоянии (делились и были подвижны). В оз. Сасык плотность рапы составляла 1155 кг · м⁻³, а *D. salina* была представлена вегетативными подвижными клетками, окрашенными в жёлто-оранжевый цвет. Численность дуналиеллы здесь достаточно низкая (20 – 40 тыс. кл. · см⁻³), что, по-видимому, связано с массовым развитием ракообразных (*Artemia salina*), для которых *D. salina* является основным кормовым объектом (Голубков, 2010). Массовое развитие *D. salina* наблюдалось в соляно-садовых бассейнах солепромыслов при плотности рапы 1200 – 1300 кг · м⁻³, в которых численность клеток составила 120 – 970 тыс. кл. · см⁻³. В этих водоёмах клетки имели красно-оранжевую окраску, они утрачивали подвижность и переходили в покоящуюся стадию в условиях начавшегося осаждения хлористого натрия. Максимальная численность клеток *D. salina* зарегистрирована в работающих солепромыслах, где происходит периодическое заполнение бассейнов свежей морской водой, с которой поступают биогенные элементы, необходимые для восстановления популяции. Содержание каротиноидов в клетках *D. salina*, обитающей в искусственных озерах солепромыслов, составляет 10 % в пересчете на сухое вещество, или 75 мг · дм⁻³ в пересчете на объём озёрной рапы (Гудвилович, 2010), что соответствует содержанию каротиноидов в клетках этого же вида в озёрах Австралии (Aasen, 1969).

На примере одного соляно-садового бассейна произведён расчёт запасов каротиноидов. Исходя из рассчитанного содержания каротиноидов в пробах (2,5 – 75 мг · дм⁻³),

площади водоёма (1 га) и толщины слоя рапы (5 см) с наибольшей концентрацией клеток *D. salina*, общий запас каротиноидов в бассейне составлял 1,3 – 38 кг. Такое количество β -каротина может быть получено за счёт накопления каротиноидов в клетках микроводоросли при естественном повышении солёности в летний период, а последующее восстановление её популяции происходит после закачки свежей морской воды в зимний период. Способ не требует значительных материальных затрат для выращивания биомассы *D. salina*, однако не может гарантировать стабильных урожаев ввиду сильной зависимости от погодных условий.

Переход к интенсивному культивированию *D. salina* неизбежно сопровождается внесением значительных количеств минеральных удобрений, что может негативно сказаться на структуре естественных сообществ микроводорослей, а также привести к ограниченному использованию добываемой морской соли за счёт накопления в ней нитратов и фосфатов. В связи с этим, желательно организовывать специальные тепличные хозяйства, в которых культивирование *D. salina* осуществляется в бетонированных или плёночных бассейнах для исключения контакта высококонцентрированных сред с почвой. Для приготовления питательной среды возможно использовать рапу из солесадочных бассейнов (Масюк, 1967). Полученные данные по промышленному культивированию *D. salina* в условиях теплиц Крыма свидетельствуют о высокой продуктивности активно растущей культуры ($6 \text{ г м}^2 \cdot \text{сут}^{-1}$) (Тренкеншу, 2005). При осуществлении двухстадийного культивирования *D. salina* и накоплении 10 % β -каротина в биомассе его выход составит 900 кг/га в год.

Исследования по возможности восстановления в гипергалинных озёрах Крыма, являющихся уникальными природными объектами, популяции *D. salina* после промышленного отбора не проводили, потому переход к их интенсивному использованию может нанести непоправимый ущерб природным сообществам микроводорослей. В связи с этим, мы считаем невозможным рекомендовать солёные озёра Крыма для промышленной добычи *D. salina*.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РОСТА И МЕТАБОЛИЗМА *PORPHYRIDIDIUM PURPUREUM* В УСЛОВИЯХ КУЛЬТУРЫ

Ростовые и биохимические характеристики *Porphyridium purpureum* в условиях накопительной и квазинепрерывной культуры. Водоросли культивировали в накопительном и квазинепрерывном режимах. Вариант опыта А являлся контрольным (начальная концентрация азота составляла $119 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, фосфора – $50 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$), для варианта В концентрация азота составляла $238 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, фосфора – $50 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, для С – $59,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ и $50 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ соответственно. Для варианта опыта D концентрация азота соответствовала контролю, а фосфора была уменьшена в 2 раза ($25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$). Первоначальная плотность культуры составляла $0,48 \text{ г ОВ} \cdot \text{л}^{-1}$. На 6-е сутки, когда она была переведена на квазинепрерывный режим, плотность её составляла $2,6 \text{ г ОВ} \cdot \text{л}^{-1}$ для варианта с минимальной начальной концентрацией азота и $3,1 \text{ г ОВ} \cdot \text{л}^{-1}$ – для остальных вариантов, таким образом, увеличившись за 6 суток накопительного культивирования в 5,5 – 6,5 раз по сравнению с первоначальной (рис. 5). Для варианта опыта В

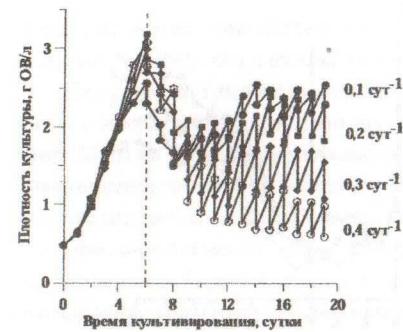


Рис. 5. Динамика плотности накопительной и квазинепрерывной культуры *Porphyridium purpureum*. ■ – вариант А, $0,2 \text{ сут}^{-1}$; ◆ – вариант В, $0,3 \text{ сут}^{-1}$; ● – вариант С, $0,1 \text{ сут}^{-1}$; ○ – вариант D, $0,4 \text{ сут}^{-1}$; пунктирная линия – граница между накопительным и квазинепрерывным культивированием

концентрация нитратного азота в среде достигла границы чувствительности электрода ($< 1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) на четвертые сутки, С – на вторые, а для А и D – на третьи сутки после начала культивирования. После изменения режима на квазинепрерывный, при котором обмен осуществляли модифицированной средой Тренкеншу с удвоенной концентрацией азота и фосфора, через 8 суток во всех культиваторах установилось стационарное динамическое равновесие с различной плотностью культуры *P. purpureum* (в зависимости от установленных удельных скоростей протока среды) (рис. 5). Полученные экспериментальные данные позволили рассчитать продуктивность культуры *P. purpureum* по биомассе при различных удельных скоростях протока среды (табл. 7).

Таблица 7

Плотность и продуктивность культуры *Porphyridium purpureum* при квазинепрерывном культивировании

Режим культивирования, вариант	Плотность культуры, $\text{г ОВ} \cdot \text{л}^{-1}$	Продуктивность по биомассе, $\text{г ОВ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$
$0,1 \text{ сут}^{-1}$ (С, $59,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \text{ N}$)	$2,55 \pm 0,19$	$0,26 \pm 0,02$
$0,2 \text{ сут}^{-1}$ (А, $119 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \text{ N}$)	$2,44 \pm 0,19$	$0,49 \pm 0,04$
$0,3 \text{ сут}^{-1}$ (В, $238 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \text{ N}$)	$1,83 \pm 0,18$	$0,55 \pm 0,05$
$0,4 \text{ сут}^{-1}$ (D, $119 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \text{ N}$)	$1,20 \pm 0,09$	$0,48 \pm 0,04$

С повышением удельной скорости протока среды от $0,1$ до $0,2 \text{ сут}^{-1}$ и, соответственно, пропорциональным увеличением подачи биогенных элементов в культуру наблюдается возрастание продуктивности культуры *P. purpureum* в 1,9 раза ($t = 63,18 > t_{05} = 2,23$). Для диапазона скоростей протока $0,2 - 0,4 \text{ сут}^{-1}$ значимых изменений продуктивности исследуемой культуры не выявлено ($t = 0,96 < t_{05} = 2,45$). Таким образом, количество биогенных элементов, поступающее в культуру при 20 % обмене среды достаточно для поддержания максимально высоких скоростей роста *P. purpureum* для этих условий, при дальнейшем повышении доли обмениваемой среды увеличения продуктивности не выявлено.

Содержание В-фикоэритрина (В-ФЭ), R-фикоцианина (R-ФЦ) и аллофикоцианина (АФЦ) в клетках *P. purpureum* на начало эксперимента составляло: $3,58 \pm 0,32$, $0,45 \pm 0,13$ и $0,18 \pm 0,04$ % ОВ соответственно (рис. 6). За период накопительного культивирования в условиях азотного лимитирования (варианты опыта А, С и D) относительное содержание фикобилипидов резко снизилось, при этом содержание R-ФЦ для вариантов А, С и D составляло, в среднем, $0,19 \pm 0,04$ % ОВ, а АФЦ – $0,12 \pm 0,03$ % ОВ.

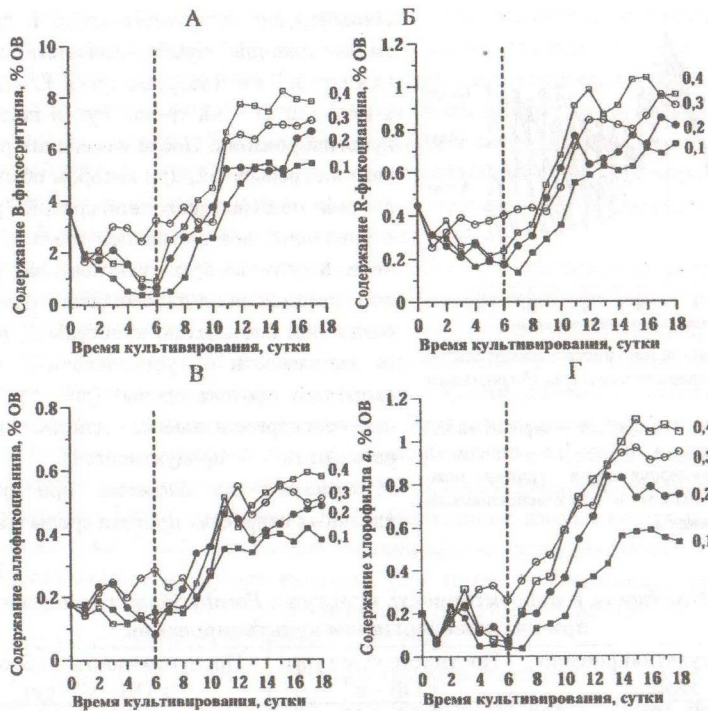


Рис. 6. Динамика относительного содержания В-фиксоэритрина (А), R-фикоцианина (Б), аллофикоцианина (В) и хлорофилла *a* (Г) в клетках *Porphyridium purpureum* в накопительной культуре при различной начальной концентрации азота и квазинепрерывной культуре при различной скорости протока: ● – вариант А, 0,2 сут⁻¹; ○ – вариант В, 0,3 сут⁻¹; ■ – вариант С, 0,1 сут⁻¹; □ – вариант D, 0,4 сут⁻¹; пунктирная линия – граница между накопительным и квазинепрерывным культивированием

Минимальное содержание В-ФЭ регистрировали в варианте опыта С ($0,4 \pm 0,1$ % ОВ). При отсутствии выраженного лимитирования по минеральному азоту (вариант В), к шестым суткам эксперимента относительное содержание всех фикобилиновых пигментов восстанавливалось практически до уровня инокулята – $3,2 \pm 0,30$; $0,4 \pm 0,13$; $0,3 \pm 0,06$ % ОВ для В-ФЭ, R-ФЦ и АФЦ, соответственно. Максимальное снижение относительного содержания регистрировали для В-ФЭ (в 4 – 9 раз), а минимальное – для АФЦ (на 25 %). Динамика относительного содержания хлорофилла *a* и суммарных каротиноидов при накопительном культивировании, в основном, коррелировала с динамикой содержания фикобилипротеинов (рис. 6). Резкое уменьшение содержания пигментов в клетках микроводоросли в первые два дня после начала эксперимента, вероятно, можно рассматривать как метаболический сбой – ответную реакцию на одновременное скачкообразное изменение сразу нескольких факторов среды: концентрации биогенов, освещённости, pH, солёности и др. (Дробецкая, 2005). Известно, что причиной снижения клеточного уровня пигментов может быть не только деградация по-

следних, но и угнетение пигментного синтеза на фоне ускоренного клеточного деления (Grossman A., 1994), что и отмечалось в первые два дня культивирования.

Последующее снижение относительного содержания всех фикобилиновых пигментов и хлорофилла *a* при дефиците нитратного азота в среде (Лелеков, 2009; Гудвилович, 2010) на фоне продолжающегося активного роста культуры свидетельствует об использовании данных пигментов в качестве источника азота. В ходе эксперимента наиболее интенсивно использовался В-ФЭ (снижение составило 90 % первоначального содержания пигмента). Фаза замедления роста при накопительном выращивании микроводоросли *P. purpureum* наступала, по-видимому, только после уменьшения относительного содержания фикобилиновых пигментов и хлорофилла *a*, до некоторого физиологически критического уровня, который составляет: 0,4 % ОВ для В-ФЭ и 0,04 % ОВ для хлорофилла *a*. Рост культуры осуществлялся за счёт внутренних резервов азота в клетках, что подтверждается результатами варианта опыта В, имеющего повышенную концентрацию минерального азота в среде, где на фоне продолжающегося активного роста культуры регистрировали восстановление содержания фикобилипротеинов до первоначального уровня (рис. 6).

Недостаток азота в среде отражался не только на содержании всех типов фикобилипротеинов, но и на их индексах. Уменьшение индексов В-ФЭ/R-ФЦ и В-ФЭ/АФЦ в 2 – 4 раза, наблюдаемое при развитии азотного дефицита у *P. purpureum* (варианты А, С и D), свидетельствует о преимущественной деградации В-ФЭ по сравнению с R-ФЦ и АФЦ, находящимися ближе к сердцевине антенных структур, что согласуется с литературными данными об упорядоченном характере редукции фикобилисом (Yamaoka, 1980; Collier, 1992). Содержание в клетках *P. purpureum* фотосинтетических пигментов, особенно В-ФЭ ввиду его значительного содержания, является чувствительным индикатором истощения азота в среде, позволяющим выявить недостаток азота в среде раньше, чем ростовые характеристики. Однонаправленные изменения содержания пигментов характеризуются высокой степенью корреляции (коэффициенты корреляции для всех вариантов были близки к 0,9).

Относительное содержание пигментов в клетках *P. purpureum* при переходе к квазинепрерывному культивированию повысилось для всех вариантов опыта, что связано с изменением освещённости и минерального обеспечения (рис. 6, табл. 8).

Таблица 8

Относительное содержание пигментов в клетках *Porphyridium purpureum* при квазинепрерывном культивировании

Удельная скорость протока, сут ⁻¹	В-ФЭ, % ОВ	R-ФЦ, % ОВ	АФЦ, % ОВ	ХЛ <i>a</i> , % ОВ	Каротиноиды, % ОВ
0,1	5,25±0,37	0,70±0,08	0,40±0,06	0,57±0,05	0,24±0,04
0,2	6,42±0,27	0,81±0,07	0,48±0,08	0,76±0,05	0,29±0,03
0,3	7,27±0,45	0,98±0,11	0,52±0,07	0,95±0,10	0,36±0,04
0,4	7,63±0,75	0,98±0,09	0,51±0,07	1,02±0,07	0,37±0,04

Институт биологии
морей АН УССР
БИБЛИОТЕКА
№ 145а/р

Установлено, что с увеличением удельной скорости протока среды от 0,1 до 0,4 сут⁻¹ относительное содержание пигментов в клетках *P. purpureum* возрастает (ФБП на 30–45 %) (рис. 6, табл. 8), что объясняется улучшением условий минерального обеспечения. Известно, что содержание пигментов в клетках микроводорослей определяется разностью скоростей их синтеза и деструкции, как для переходных, так и для стационарных процессов (Тренкеншу, 1984; Finenko, 2003; Боровков, 2008). Фотодеструкция детерминирована количеством поглощенной световой энергии. При уменьшении плотности культуры средняя пространственная облученность клеток возрастает, пигменты поглощают большее количество энергии, что усиливает процессы фотодеструкции. В эксперименте при увеличении скорости протока среды от 0,1 до 0,4 сут⁻¹ плотность культуры снижается в 2 раза. Следовательно, удельная освещенность клеток должна была увеличиться, вызывая уменьшение относительного содержания пигментов (Cunningham, 1990; Lee, 1991; Финенко, 2008), однако наблюдается противоположная тенденция. Известно, что к особенностям биосинтеза *P. purpureum* относятся продуцирование значительных количеств полисахаридов (Arad, 1985; Adda, 1986; Singh, 2000), что могло нивелировать действие фактора освещенности за счёт изменения оптических свойств культуры микроводоросли.

Поскольку *P. purpureum* используют для получения фикобилиновых пигментов, рассчитана средняя продуктивность культуры микроводоросли для 6-ти суток накопительного культивирования и для последних 5 суток квазинепрерывного (табл. 9).

Таблица 9

Продуктивность накопительной и квазинепрерывной культуры *Porphyridium purpureum* по пигментам

Режим культивирования, вариант	Средняя продуктивность, мг · л ⁻¹ · сут ⁻¹		
	В-ФЭ	Хл <i>a</i>	Каротиноиды
Накопительный, (вариант опыта В)	11,7±0,58	1,25±0,06	0,52±0,03
Квазинепрерывный, 0,1 сут ⁻¹	13,2±1,10	1,39±0,07	0,60±0,04
Квазинепрерывный, 0,2 сут ⁻¹	30,1±2,08	3,58±0,20	1,37±0,15
Квазинепрерывный, 0,3 сут ⁻¹	38,8±1,68	4,96±0,40	1,74±0,16
Квазинепрерывный, 0,4 сут ⁻¹	37,7±2,97	4,30±0,43	1,54±0,11

Продуктивность квазинепрерывной культуры *P. purpureum* по пигментам с возрастанием скорости протока от 0,1 до 0,3 сут⁻¹ увеличивалась в 3,5–4 раза, что объясняется улучшением минерального питания и удалением метаболитов в процессе обмена среды. Таким образом, интенсивное культивирование микроводоросли *P. purpureum* для получения максимальной продукции наиболее важного компонента – В-ФЭ необходимо осуществлять в квазинепрерывном режиме, поскольку, при накопительном выращива-

нии после исчерпания элементов минерального питания в среде относительное содержания фикобилипротеинов резко уменьшается (практически до нулевых значений), что вызывает снижение продуктивности культуры по пигментам (табл. 9).

Таким образом, наибольшая продуктивность по биомассе и пигментам для исследованного вида реализуется при обмене среды 0,3 сут⁻¹: такой режим позволяет получать около 0,5 г биомассы (ОВ) и 40 мг В-фикоэритрина с 1 л культуры в сутки. Полученные результаты по продуктивности в 1,4–3 раза выше, чем при накопительном и других исследованных режимах квазинепрерывного культивирования, что позволяет рекомендовать этот режим для технологической схемы получения В-фикоэритрина.

Ростовые и биохимические характеристики *Porphyridium purpureum* в квазинепрерывной культуре при повторном использовании культуральной среды. Культивирование осуществляли в квазинепрерывном режиме с удельной скоростью протока среды 0,2 сут⁻¹. Культиватор № 1 являлся контрольным, обмен в нём осуществляли средой Тренкеншу с удвоенной концентрацией минерального азота и фосфора. Для культиваторов №№ 2–5 при осуществлении обмена часть среды Тренкеншу заменяли культуральной средой, полученной при центрифугировании соответствующей культуры. В культиваторе № 2 доля супернатанта составляла 20 %, в № 3 – 40 %, № 4 – 60 %, а в № 5 – 80 %. На 2 этапе эксперимента после проведения обмена в культиваторах №№ 2–5 проводили корректировку минерального азота и фосфора до уровня контрольного. Отмечено, что плотность культуры в вариантах опыта – контроль, возврат 20 и 40 % культуральной среды – статистически значимо не отличалась на протяжении эксперимента и составила в среднем 2,3–2,5 г ОВ · л⁻¹ для первого этапа и 1,2–1,4 г ОВ · л⁻¹ для второго. При замене питательной среды на 60 и 80 % наблюдалось снижение плотности культуры *P. purpureum* в 2 раза (от 2,3 ± 0,2 до 1,1 ± 0,3 г ОВ · л⁻¹), что, по-видимому, вызвано дефицитом биогенных элементов и более высокой концентрацией экзометаболитов в среде по сравнению с предыдущими вариантами. В случае отсутствия лимитирования по элементам минерального питания (на 2 этапе) повышение содержания метаболитов в среде не оказывало выраженного влияния на плотность квазинепрерывной культуры *P. purpureum*.

Экспериментально показано, что с увеличением доли культуральной среды (от 0 до 80 %), возвращаемой в культиватор при обмене (и пропорциональном снижении количеств вносимых биогенных элементов), относительное содержание В-ФЭ в клетках *P. purpureum* снижалось в 7,3 раза (от 9,6 ± 0,81 до 1,3 ± 0,15 % СВ), а при ежесуточной корректировке концентрации биогенных элементов до уровня контрольного варианта, только в 1,7 раза (от 9,6 ± 0,78 до 5,7 ± 0,48 % СВ). Таким образом, накопление В-ФЭ в биомассе *P. purpureum*, в основном, определялось концентрацией биогенных элементов, поступающих в культуру. При увеличении доли возвращаемой культуральной среды от 0 до 80 % продуктивность культуры *P. purpureum* снижалась (рис. 7): по В-ФЭ – в 8,4 раза (от 25,0 ± 2,3 до 3,0 ± 0,1 мг · л⁻¹ · сут⁻¹), а по биомассе – в 2,3 раза (от 0,46 ± 0,05 до 0,20 ± 0,07 г · л⁻¹ · сут⁻¹).

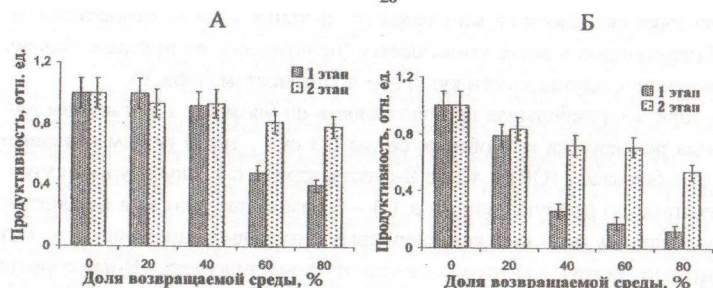


Рис. 7. Продуктивность квазинепрерывной культуры *P. purpureum* по биомассе (А) и В-фикоэритрину (Б), нормированная по максимальным значениям, на 1 и 2 этапах культивирования

Несмотря на то, что с увеличением доли возвращаемой культуральной среды от 0 до 40 % скорость роста культуры не снижалась (рис. 7 А), уменьшение продуктивности по В-ФЭ в 3,8 раза (рис. 7 Б) не позволяет рекомендовать данный режим для получения биомассы *P. purpureum* с повышенным содержанием этого пигмента. На 2 этапе эксперимента с увеличением доли возвращаемой культуральной среды от 0 до 80 % (в отсутствие лимитирования по биогенным элементам) продуктивность *P. purpureum* по биомассе изменялась незначительно (от $0,23 \pm 0,05$ до $0,20 \pm 0,02 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$), в то время как продуктивность по В-ФЭ уменьшалась в 2 раза (от $13,0 \pm 2,4$ до $6,9 \pm 1,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$), что обусловлено снижением относительного содержания пигмента в клетках микроводоросли.

Таким образом, показана возможность использования при выращивании *P. purpureum* культуральной среды, изымаемой в процессе её квазинепрерывного культивирования, для снижения расхода химических реактивов и объёмов используемой воды. Однако из-за снижения продуктивности культуры по В-фикоэритрину апробированный режим культивирования не может быть рекомендован для технологии производства этого пигмента из биомассы *P. purpureum*. Тем не менее, после дополнительных исследований возможно комплексное применение этого режима выращивания для получения биомассы микроводоросли как источника фикобилипротеинов и культуральной жидкости для получения экзополисахаридов.

КОМПЛЕКСНАЯ СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ ФИКОЭРИТРИНА ИЗ БИОМАССЫ *PORPHYRIDIDIUM PURPUREUM*

Предложенная комплексная схема получения пигмента В-фикоэритрина из биомассы *P. purpureum* включает лабораторное культивирование микроводоросли, получение и хранение биомассы клеток, дезинтеграцию клеточных стенок, экстракцию пигмента и получение водного экстракта (рис. 8). В основу схемы лёг ряд экспериментов, в ходе которых определены: режим культивирования, позволяющий получать высокую продуктивность *P. purpureum* и значительное содержание В-фикоэритрина в биомассе; способы хранения биомассы *P. purpureum*, позволяющие максимально сохранить пигмент В-фикоэритрин; режимы дезинтеграции клеточных стенок сырой и

высушенной биомассы *P. purpureum*, способствующие повышению степени экстракции пигмента; методические приёмы экстракции В-фикоэритрина.



Рис. 8. Комплексная схема получения водного экстракта В-фикоэритрина из биомассы клеток красной микроводоросли *Porphyridium purpureum*

Схема успешно апробирована в лаборатории отдела биотехнологий и фиторесурсов ИнБЮМ.

ВЫВОДЫ

1. Впервые определены продукционные характеристики *D. salina* и *P. purpureum*, являющихся перспективными объектами биотехнологии, при квазинепрерывном культивировании и показана принципиальная возможность регулирования содержания ценных компонентов микроводорослей при варьировании удельной скорости протока среды.
2. Максимальные удельные скорости синтеза биомассы, фотосинтетических пигментов и белка для накопительной культуры *D. salina* близки и варьируют в диапазоне $0,5 - 0,7 \text{ сут}^{-1}$, а максимальная продуктивность культуры по биомассе, белку и каротиноидам составляет: $0,53 \text{ г} \cdot \text{ОВ} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$, $0,20 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ и $4,4 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{сут}^{-1}$ соответственно. Экспериментально определена область плотности культуры *D. salina*, для которой абсолютная и удельная скорости синтеза максимальны (около $1,5 \text{ г} \cdot \text{ОВ} \cdot \text{л}^{-1}$).
3. Продуктивность культур *D. salina* и *P. purpureum* возрастает с увеличением удельной скорости протока среды. Наибольшая продуктивность по биомассе, фотосинтетическим пигментам и белку реализуется в диапазоне скоростей протока среды

- 0,3 – 0,4 сут⁻¹ и достигает: по биомассе – 0,5 г ОВ · л⁻¹ · сут⁻¹ (для двух исследованных видов), В-фикоэритрину – 40 мг · л⁻¹ · сут⁻¹ (*P. purpureum*), суммарным каротиноидам – 4 мг л⁻¹ · сут⁻¹, белку – 0,25 г · л⁻¹ · сут⁻¹ (*D. salina*).
4. Для двух исследованных видов (*D. salina* и *P. purpureum*), изменение относительного содержания пигментов при увеличении удельной скорости протока среды имеет разнонаправленный характер. Содержание пигментов в биомассе *D. salina* в диапазоне скоростей протока среды от 0,14 до 0,42 сут⁻¹ снижается на 30 %, а для *P. purpureum* возрастает на 50 % в диапазоне от 0,1 до 0,4 сут⁻¹. Максимальное содержание фотосинтетических пигментов в биомассе *D. salina* отмечено при скорости протока среды 0,14 сут⁻¹, а для *P. purpureum* – 0,4 сут⁻¹.
 5. Продуктивность квазинепрерывных культур *D. salina* и *P. purpureum* по биомассе и пигментам в 1,5 – 3 раза выше, чем их продуктивность при накопительном выращивании, что подтверждается полученными экспериментальными данными.
 6. Продуктивность культуры *D. salina* и содержание пигментов в клетках существенно зависят от углеродного обеспечения. При повышении концентрации углекислого газа в газовой смеси от 1 до 3 % продуктивность *D. salina* по биомассе возрастает в 4 раза, по каротиноидам – в 3,3 раза, по хлорофиллам – в 14 – 18 раз.
 7. Повторное использование питательной среды не оказывает выраженного влияния на скорость роста квазинепрерывной культуры *P. purpureum* и приводит к понижению продуктивности по пигментам.
 8. Предложенная комплексная схема получения В-фикоэритрина из красной микроводоросли *P. purpureum* включает этапы её культивирования, подготовки биомассы и выделения пигмента.
 9. Максимальная численность клеток *D. salina* в естественных популяциях выявлена в соляно-бассейнах соляных промыслов. Количество каротиноидов в искусственных озёрах Сакских соляных промыслов достигает 75 мг · дм⁻³, а запас каротиноидов – до 38 кг/га.

СПИСОК ОСНОВНЫХ НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гудвилевич И. Н. Динамика суммарных каротиноидов и хлорофилла-а в клетках *Dunaliella salina* в квазинепрерывной культуре / И. Н. Гудвилевич, Н. М. Береговая, А. Б. Боровков // Экология моря. – 2005. – Вып. 67. – С. 52 – 55. (Вклад автора – проведение исследований, обработка и анализ результатов, совместное написание текста статьи).
2. Боровков А. Б. Светозависимое содержание пигментов в клетках *Dunaliella salina* в хемостате / А. Б. Боровков, И. Н. Гудвилевич, Р. П. Тренкеншу // Актуальні проблеми ботаніки та екології : матеріали міжнародної конф. молодих учених-ботаніків, (Київ, 17–20 верес. 2007 р.). – К., 2007. – С. 6 – 7. (Вклад автора – проведение исследований, обработка и анализ результатов, совместное написание текста статьи).

3. Боровков А. Б. *Dunaliella salina* Teod. IBSS-2 – перспективный штам для промышленного культивирования / А. Б. Боровков, И. Н. Гудвилевич, Р. П. Тренкеншу // Актуальні проблеми ботаніки та екології [зб. наук. праць / гол. ред. Я. П. Дідух]. – 2008. – Вып. 2. – С. 25 – 27. (Вклад автора – проведение исследований, обработка и анализ результатов, совместное написание текста статьи).
4. Гудвилевич И. Н. Влияние различных концентраций минерального азота в среде на содержание В-фикоэритрина в клетках *Porphyridium cruentum* Nag. / И. Н. Гудвилевич, А. С. Лелеков // Экология моря. – 2008. – Вып. 76. – С. 45 – 49. (Вклад автора – проведение исследований, обработка и анализ результатов, совместное написание текста статьи).
5. Гудвилевич И. Н. Комплексная схема получения фикоэритрина из биомассы *Porphyridium purpureum* / И. Н. Гудвилевич, А. Б. Боровков, Р. П. Тренкеншу // Экология моря. – 2009. – Вып. 79. – С. 44 – 49. (Вклад автора – проведение исследований, обработка и анализ результатов, совместное написание текста статьи).
6. Гудвилевич И. Н. Влияние условий культивирования на рост и содержание фиколипидов красной микроводоросли *Porphyridium purpureum* (обзор) / И. Н. Гудвилевич // Экология моря. – 2010. – Спец. вып. 81: Биотехнология водорослей. – С. 28 – 36.
7. Гудвилевич И. Н. Продуктивность культуры *Dunaliella salina* на различных питательных средах / И. Н. Гудвилевич, А. Б. Боровков, Р. П. Тренкеншу // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол. – 2010. – № 3 (44). – С. 62 – 65. (Вклад автора – проведение исследований, обработка и анализ результатов, совместное написание текста статьи).
8. Гудвилевич И. Н. *Dunaliella salina* солёных водоёмов западной части Крыма / И. Н. Гудвилевич // Геополитика и экогеодинамика регионов. – 2010. – Т.6. – Вып. 1 – 2. – С. 44 – 48.
9. Лелеков А. С. Продукционные характеристики роста и биосинтеза квазинепрерывной культуры зелёной микроводоросли *Dunaliella salina* Teod. / А. С. Лелеков, И. Н. Гудвилевич // Экология моря. – 2010. – Спец. вып. 80: Биотехнология водорослей. – С. 59 – 66. (Вклад автора – проведение исследований, обработка и анализ результатов, совместное написание текста статьи).
10. Пат. 93796 С2 UA, МПК С12N1/12. Спосіб одержання фикоэритрину з червоної микроводорослі / Гудвілович І. М. (UA), Боровков А. Б. (UA), Тренкеншу Р. П. (UA); заявитель и патентообладатель Інститут біології південних морів ім. О.О.Ковалевського НАН України (UA). – № а200907911; заявлено 27.07.2009; опубл. 10.03.2011, Бюл. № 5.

АННОТАЦІЯ

Гудвиллович И. Н. Продукционные характеристики микроводорослей *Dunaliella salina* Teod. и *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. при интенсивном культивировании. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.17 – гидробиология. – Институт биологии южных морей НАН Украины, Севастополь, 2011.

Впервые определены продукционные характеристики квазинепрерывных культур двух видов микроводорослей (*D. salina* и *P. purpureum*), являющихся перспективными объектами биотехнологии. Установлен характер изменения содержания пигментов *D. salina* и *P. purpureum* в квазинепрерывной культуре и показана возможность регулирования химического состава данных микроводорослей с помощью варьирования удельной скорости протока среды. Выявлены оптимальные режимы для получения наибольшей продукции по биомассе и фотосинтетическим пигментам *D. salina* и *P. purpureum* при квазинепрерывном способе культивирования, что позволяет использовать его при промышленном получении β-каротина и В-фикоэритрина. Экспериментально установлена зависимость продукции фотосинтетических пигментов микроводоросли *D. salina* от углеродного питания. Получены данные по динамике роста, содержанию пигментов и продуктивности квазинепрерывной культуры *P. purpureum* при повторном использовании культуральной среды. Предложена технологическая схема получения фикобилипротеинов из *P. purpureum*, а также разработаны рекомендации по промышленному использованию солёных водоёмов Крыма для получения природного β-каротина.

Ключевые слова: *Dunaliella salina*, *Porphyridium purpureum*, квазинепрерывная культура, плотность культуры, продуктивность, относительное содержание пигментов, хлорофилл, каротиноиды, фикобилипротеины.

АНОТАЦІЯ

Гудвілович І. М. Продукційні характеристики микроводоростей *Dunaliella salina* Teod. і *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. при інтенсивному культивуванні. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.17 – гідробіологія. – Інститут біології південних морів НАН України, Севастополь, 2011.

Вперше визначені продукційні характеристики квазібезперервних культур для двох видів микроводоростей, *D. salina* і *P. purpureum*. Виявлений характер зміни вмісту пігментів *D. salina* і *P. purpureum* в квазібезперервній культурі і показана можливість регулювання вмісту пігментів і білка в клітинах микроводоростей за допомогою варіювання швидкості протока середовища. Виявлені оптимальні умови для одержання максимальної продукції за біомасою і вмістом фотосинтетичних пігментів в квазібезперервних культурах *D. salina* і *P. purpureum*. Експериментально встановлена залежність продукції фотосинтетичних пігментів микроводорості *D. salina* від вуг-

лецевого забезпечення. Отримані дані по динаміці росту, вмісту пігментів і продуктивності культури *P. purpureum* при квазібезперервному способі культивування і повторному використанні культурального середовища. Запропоновано технологічну схему виділення фикобіліпротеїнів з микроводорості *P. purpureum*, а також розроблені рекомендації щодо промислового використання солоних водоемів Криму для отримання природного β-каротину.

Ключові слова: *Dunaliella salina*, *Porphyridium purpureum*, квазібезперервна культура, щільність культури, продуктивність, відносний вміст пігментів, хлорофіл, каротиноїди, фикобіліпротеїни.

SUMMARY

Gudvilovich I. N. Production characteristics of the microalgae *Dunaliella salina* Teod. and *Porphyridium purpureum* (Bory) Ross. under intensive cultivation. – Manuscript.

The dissertation on of scientific degree of a Cand. Biol. Sci. competition at a speciality 03.00.17 – hydrobiology. – Institute of Biology of the Southern Seas, National Academy of Science of Ukraine, Sevastopol, 2011.

Production characteristics of semicontinuous cultures *D. salina* and *P. purpureum* have been defined for the first time. The type of change of pigments content *D. salina* and *P. purpureum* has been determined under semicontinuous cultivation; the possibility of regulation of these microalgae chemical composition with the help of varying the specific flow rate has been shown. Optimal conditions for getting the biggest production of *D. salina* and *P. purpureum* biomass and photosynthetic pigments have been explored under semicontinuous cultivation. The dependence of production of microalgae *D. salina* photosynthetic pigments on carbon nutrition has been experimentally found. The principal repeated use possibility of culture medium has been shown under semicontinuous cultivation of *P. purpureum* microalgae. The technological scheme of phycobiliproteins recovery from *P. purpureum* has been suggested; and industrial use recommendations for the Crimean brine lakes have been developed for the natural β-carotin extraction.

Keywords: *Dunaliella salina*, *Porphyridium purpureum*, semicontinuous culture, the density of the culture, productivity, the relative content of pigments, chlorophyll, carotenoids, phycobiliproteins.

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание научной степени
кандидата биологических наук
Гудвилевич Ирины Николаевны

Издательство и типография ООО «Рибэст»
Ответственный за издание
Федюшин В.В.
Свидетельство о внесении субъекта издательской
деятельности в государственный реестр
ДК № 190 от 20.09.2000 г.
Подписано в печать 10.10.2011 г.
Формат 84x108/32. Объем 1,26 авт. л.
Тираж 100 экз. Заказ № 202

99058, г. Севастополь, ул. Б. Михайлова, 23
Тел/факс (0692) 42 – 84 – 01