

УДК 581.1

Влияние солености среды на рост и биохимический состав зеленой микроводоросли *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252

Н.О. Жила^{а,б*}, Г.С. Калачёва^а, Т.Г. Волова^{а,б}

^а Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биофизики Сибирского отделения
Российской академии наук,
Россия 660036, Красноярск, Академгородок

^б Сибирский федеральный университет,
Россия 660041, Красноярск, пр. Свободный 79¹

Received 2.09.2011, received in revised form 9.09.2011, accepted 16.09.2011

Исследовано влияние солености на рост одноклеточной водоросли Botryococcus braunii Kütz IPPAS H-252, содержание общего азота и липидов, а также состав жирных кислот (ЖК), каротиноидов и углеводов в биомассе. Показано, что присутствие в среде NaCl (0,3 М и 0,7 М) в течение первых трех суток ингибировало рост водоросли, приводило к снижению содержания общего азота и увеличению доли триацилглицеринов. Кроме того, в присутствии NaCl на третьи сутки произошли значительные изменения в составе ЖК водоросли, заключающиеся в снижении содержания полиненасыщенных кислот (ПНЖК) (до 29,4 и 12,8 % от суммы ЖК), увеличении доли олеиновой кислоты (до 20,0 и 21,8 %) и длинноцепочечных насыщенных ЖК (до 5,3 и 14,1 %) при 0,3 и 0,7 М NaCl соответственно. На 7 и 12-е сутки (при 0,3 М NaCl) содержание ПНЖК было таким же, как и в фазе активного роста водоросли. Увеличение доли ПНЖК при 0,7 М NaCl было менее значительным, но так же, как и при 0,3 М NaCl, увеличивались биомасса культуры и концентрация общего азота в клетках, что свидетельствует о возможности адаптации данной водоросли к исследованным концентрациям NaCl.

Ключевые слова: Botryococcus, биохимический состав, жирные кислоты, углеводы, соленость.

Введение

В настоящее время внимание исследователей привлекает зелёная одноклеточ-

ная колониальная водоросль *Botryococcus braunii*, обладающая способностью к синтезу жидких углеводов, встречающаяся

* Corresponding author E-mail address: nzhila@mail.ru

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

как в пресных, так и в солоноватых водоемах. Состав углеводов, прямыми предшественниками которых являются жирные кислоты, зависит от принадлежности к определенной расе водоросли (А, В или L), а их содержание определяется штаммовыми особенностями и условиями выращивания (Metzger, Largeau, 1999). Однако число работ, посвященных исследованию влияния условий культивирования на биохимический состав *B. braunii*, включая состав и содержание ЖК и углеводов, весьма ограничено (Vazquez-Duhalt, Arredondo-Vega, 1991, Dayanada et al., 2007, Rao et al., 2007, Choi et al., 2011).

Одним из факторов, влияющих на метаболизм липидов водорослей, является солёность среды (Thompson, 1996). Однако данные по влиянию солёности на липиды *B. braunii* немногочисленны и противоречивы, что, по-видимому, связано со штаммовой спецификой водоросли. Так, в работе Ben-Amotz et al. (1985) показано, что в клетках штамма *B. braunii* Austin, выросших при 0,5 М NaCl, содержание липидов практически не отличалось от такового в контрольной культуре. Отсутствие изменений в содержании липидов у двух штаммов *B. braunii* Austin и Göttingen в присутствии NaCl показано и в работе Vazquez-Duhalt, Arredondo-Vega (1991). Однако изменения в содержании углеводов у этих двух штаммов носили разнонаправленный характер. С увеличением в среде концентрации NaCl в клетках *B. braunii* Göttingen содержание углеводов увеличивалось, тогда как у *B. braunii* Austin его значение практически не изменялось. Культивирование *B. braunii* LB 572 в присутствии невысоких концентраций NaCl (0,17-0,85 мМ) приводило к увеличению содержания липидов, включая фракцию углеводов (Rao et al., 2007).

Данные о влиянии солёности на состав жирных кислот (ЖК) водоросли также немногочисленны. Так, у *B. braunii* LB 572 с увеличением концентрации NaCl в среде происходило снижение доли линолевой кислоты, увеличение доли олеиновой и пальмитиновой кислот и появление длинноцепочечных ЖК, 22:0 и 24:0 (Rao et al., 2007). Напротив, состав ЖК общих липидов у штаммов *B. braunii* Austin и Göttingen практически не менялся в присутствии в среде NaCl (Vazquez-Duhalt, Arredondo-Vega, 1991).

Целью настоящей работы было исследование влияния NaCl на содержание общего азота, липидов, углеводов, пигментов, распределение классов липидов, состав ЖК и углеводов водоросли *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252.

Материалы и методы

В работе использовали штамм *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252 (зелёная разновидность), полученный из коллекции культур одноклеточных водорослей Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Однако, как показано нами ранее, данный штамм по ключевым показателям (составу углеводов и ЖК) более соответствует другому виду *Botryococcus*, а именно *Botryococcus sudeticus* (Kalacheva et al., 2002).

Культивирование водоросли проводили в конических колбах объемом 1 л при 25±1 °С. Режим освещения (1,36 кЛк) включал чередование периодов “свет-темнота”, 14:10 ч. Культуру непрерывно аэрировали смесью воздуха и углекислоты (1 % по объему) со скоростью 1 л/мин. Культивирование проводили на модифицированной среде Прата (Kalacheva et al., 2002). Исследовано влияние двух концентраций NaCl (0,3 и 0,7 М) на рост и биохимический состав водоросли. Пробы из контроль-

ной и опытных культур отбирали на 3, 7 и 12-е сутки.

Для определения прироста биомассы водорослей в культурах, аликвоты фильтровали на мембранные фильтры “Владипор” с диаметром пор 0,85 – 0,95 мкм. Фильтры с биомассой промывали дважды дистиллированной водой, высушивали при 70 °С до постоянного веса и взвешивали.

Количественное содержание пигментов определяли спектрофотометрией этанольных экстрактов; регистрацию оптической плотности проводили при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения определяемых пигментов. Концентрацию хлорофилла *a*, *b* и каротиноидов в 96 %-ном этаноле рассчитывали по формулам, рекомендованным ЮНЕСКО (Сиренко и др., 1975) при длинах волн 663, 645 и 440,5 нм, соответственно, с поправкой на рассеивание и неспецифическое поглощение при 730 нм.

Содержание общего азота определяли методом Кьельдаля, углеводы – антроновым методом (Ермаков и др., 1972). Липиды определяли гравиметрическим методом после экстракции из сырой биомассы смесью хлороформ-изопропанол (1:1, по объему) (Новицкая, Рущкая 1976). Для определения углеводов липидные экстракты разделяли тонкослойной хроматографией в системе для нейтральных липидов гексан – диэтиловый эфир – уксусная кислота (85:15:1, по объему). Фракцию, соответствующую углеводам, элюировали с силикагеля диэтиловым эфиром и после упаривания проводили количественное определение бихроматным методом, используя для калибровки гексадекан.

Для анализа жирных кислот получали их метиловые эфиры, которые анализировали на хромато-масс-спектрометре GCD Plus (“Hewlett Packard”, США) с использованием капиллярной колонки HP-5S (“Hewlett Packard”,

США) длиной 30 м и внутренним диаметром 0,25 мм. Условия анализа: газ-носитель – гелий, скорость 1 мл/мин; температура ввода пробы 230 °С; начальная температура хроматографирования 100 °С, подъем температуры до 230 °С со скоростью 8 °С в минуту; температура детектора 230 °С. Ввод пробы проводили с делением потока 1:50. Идентифицировали ЖК по масс-спектрам и сравнением их времен удерживания с таковыми имеющихся стандартов (“Serva” и “Sigma”). Положение двойных связей моноеновых кислот определяли по масс-спектрам диметилдисульфидных производных соответствующих метиловых эфиров ЖК. Условия хроматографирования диметилдисульфидных производных такие же, как и метиловых эфиров жирных кислот. Содержание ЖК приведено в мол. %.

Анализ состава углеводов проводили газовой хроматографией (“GCD Plus, Hewlett Packard”, США). Условия хроматографирования: газ-носитель – азот, скорость 1 мл/мин, температура ввода пробы 280 °С, начальная температура хроматографирования 150 °С, подъем температуры до 280 °С со скоростью 10 °С в минуту. Идентификацию углеводов проводили по масс-спектрам исходных веществ. Подробное описание методов идентификации углеводов приведено в работе (Kalacheva et al., 2002).

Эксперименты проведены в трёх повторностях. Достоверность различий средних оценивали с использованием критерия Стьюдента. Для оценки влияния на состав ЖК исследуемого штамма длительности культивирования и солености среды выполнен двухфакторный дисперсионный анализ.

Результаты

Выращивание исследуемого штамма *B. braunii* в среде, содержащей NaCl, через 12 суток приводило к снижению урожая био-

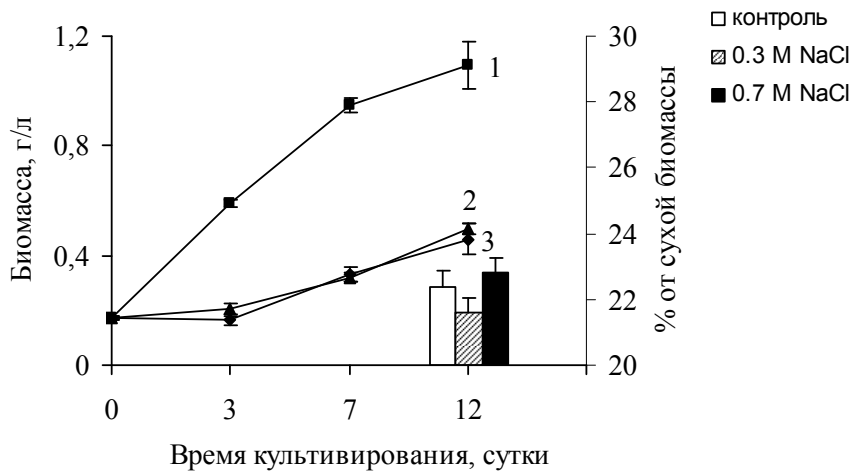


Рис. 1. Накопление биомассы *B. braunii* при различных концентрациях NaCl в среде: 1 – контроль, 2 – 0,3 М NaCl, 3 – 0,7 М NaCl; Столбцы – содержание углеводов на 12-е сутки культивирования

массы практически в 2,5 раза по сравнению с контролем (рис. 1). В лаг-фазе (первые 3-е суток) происходило снижение азотсодержащих веществ в 1,6 и 1,3 раза при 0,3 и 0,7 М NaCl по сравнению с контролем (рис. 2а). Суммарные концентрации хлорофиллов *a* и *b* были ниже в 3,0-3,4 раза по сравнению с контролем (рис. 3а). Содержание каротиноидов при этом практически не изменялось (рис. 3б). На 7-12-е сутки на средах, содержащих NaCl, произошло увеличение доли азотсодержащих веществ до значений, сопоставимых с контролем. Суммарная концентрация хлорофиллов *a* и *b* при 0,3 и 0,7 М NaCl также возрастала к 12-м суткам до 1,54 и 1,27, соответственно. Содержание углеводов на 12-е сутки достоверно не отличалось от контроля и составляло 21,6-22,8 % от сухой биомассы (рис.1).

Содержание липидов, включая фракцию углеводов, на 3-и сутки в контроле и в средах с NaCl составляло 14-20 % от сухого веса (рис. 2б). К концу эксперимента содержание липидов достоверно снижалось как в контроле (с 20 до 9 %) ($t=4,1, n=3, p < 0,05$), так и в присутствии 0,3 и 0,7 М NaCl (с 14 до 9 %, $t=3,45, p < 0,05$ и с 20 до 15 %, $t=2,83, p < 0,05$,

соответственно). Анализ липидов водоросли, культивируемой в оптимальных условиях и в присутствии NaCl в среде, не выявил различий в их качественном составе, представленном полярными липидами, диацилглицеринами, триацилглицеринами, спиртами, свободными ЖК, стеринами, эфирами стерина, углеводородами. Отмечены значительные изменения в содержании триацилглицеринов. В присутствии 0,3 и 0,7 М NaCl уже на 3-и сутки содержание триацилглицеринов было существенно выше, чем в контроле и составляло 19 % ($t=8,6, n=3, p < 0,05$) и 27,9 % от суммы липидов ($t=15,52, n=3, p < 0,05$), соответственно (рис. 2в) и сохранялось на таком уровне до конца эксперимента. В контрольной культуре содержание триацилглицеринов равнялось 3,8-5,5 % от суммы липидов в течение всего эксперимента.

Влияния NaCl на накопление углеводов, составляющих 10-12 % от суммы липидов, у исследуемого штамма выявлено не было. Результаты анализа состава углеводов водоросли в контроле и в присутствии NaCl приведены в табл. 1. Углеводороды в основном представлены алифатическими со-

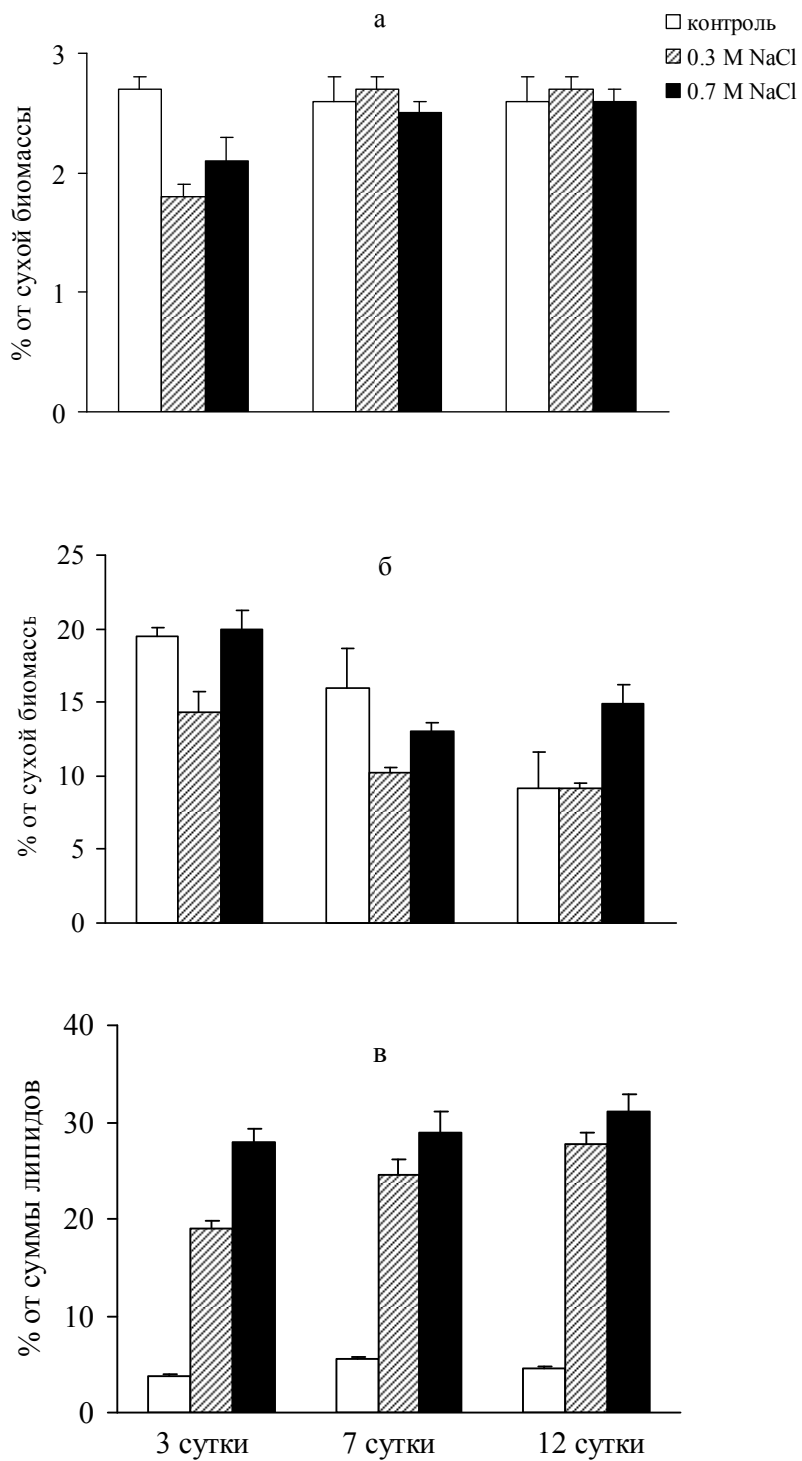


Рис. 2. Содержание общего азота (а), липидов (б) и триацилглицеринов (в) в клетках *B. braunii*, культивируемого при различных концентрациях NaCl в среде

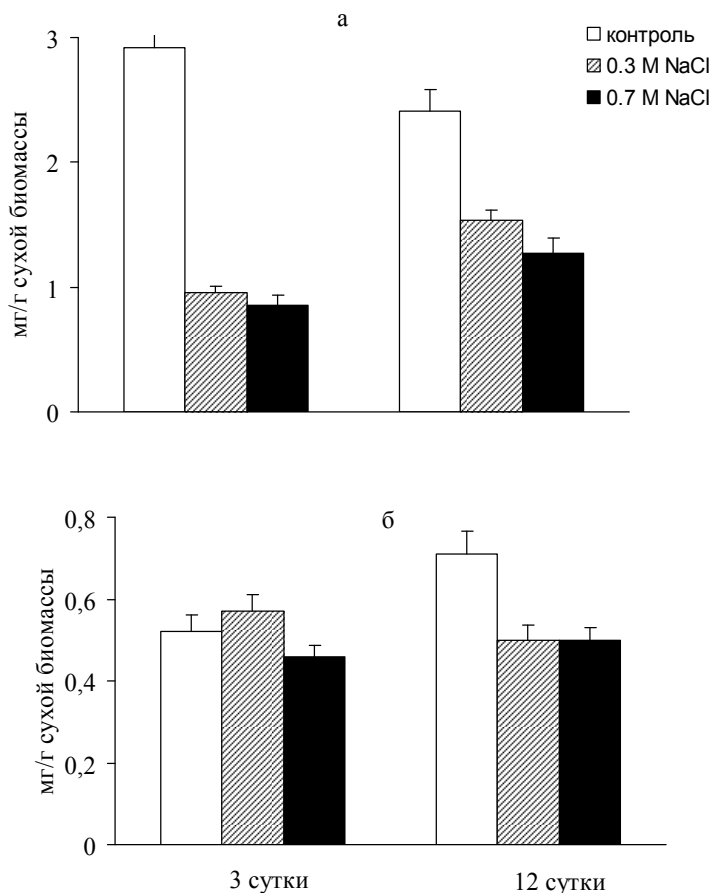


Рис. 3. Концентрация хлорофиллов *a* и *b* (а) и каротиноидов (б) в клетках *B. braunii*, культивируемого при различных концентрациях NaCl в среде

единениями с длиной углеродной цепи 14-27 атомов и тремя разветвленными: 2,6,10,14-тетраметилпентадеканом, 2,6,10,14-тетраметилгексадеканом и 2,6,10,14-тетраметилгексадекадиеном (табл. 1). Содержание отдельных углеводов существенно менялось в присутствии NaCl: произошло увеличение доли углевода с нечетным количеством атомов углерода – гептадекана ($t=5,9$, $n=3$, $p<0,05$ и $t=4,21$, $n=3$, $p<0,05$) и снижение долей тетракозана ($t=5,53$, $n=3$, $p<0,05$ и $t=9,5$, $n=3$, $p<0,05$) и пентакозана ($t=3,61$, $n=3$, $p<0,05$ и $t=4,8$, $n=3$, $p<0,05$) при 0,3 и 0,7 М NaCl соответственно.

Состав ЖК *B. braunii*, культивируемой при разных концентрациях NaCl, представ-

лен в табл. 2. При проведении данного эксперимента мы учитывали влияние на состав ЖК двух факторов (солёности среды и времени культивирования). Выполненный двухфакторный дисперсионный анализ позволил определить степень влияния на состав ЖК исследуемой водоросли как длительности культивирования, так и солёности среды. Установлено, что степень влияния фактора солёности была статистически достоверна и более значима по сравнению с влиянием возраста культуры (табл. 3).

Состав ЖК *B. braunii* в контроле на 3-и сутки характеризовался высоким содержанием C16-18 ПНЖК (62 % от суммы ЖК), при

Таблица 1. Состав углеводов *B.braunii* Kütz IPPAS H-252 (% от суммы углеводов, среднее±стандартная ошибка, n=3) на 12-е сутки культивирования

Углеводород	Контроль	0,3 М NaCl	0,7 М NaCl
14:0	1,0 ± 0,6	1,4 ± 0,3	2,4 ± 0,5
15:0	1,6 ± 0,3	3,8 ± 1,1	2,7 ± 0,3
16:0	5,4 ± 0,3	-	-
неидент.	1,5 ± 0,3	0,9 ± 0,4	5,7 ± 1,4
17:0	4,0 ± 0,5	38,8 ± 5,8	29,2 ± 5,9
2,6,10,14-CH ₃ - 15:0	2,7 ± 0,2	5,7 ± 0,7	3,9 ± 0,3
18:0	3,3 ± 0,8	4,2 ± 0,4	4,2 ± 0,8
8-CH ₃ – 17:0	3,0 ± 0,2	2,6 ± 2,5	2,4 ± 0,9
2,6,10,14-CH ₃ - 16:0	4,1 ± 0,9	7,0 ± 0,6	5,7 ± 0,4
2,6,10,14-CH ₃ - 16:2	22,7 ± 1,2	4,4 ± 1,0	15,1 ± 6,7
19:0	2,4 ± 0,6	6,9 ± 1,8	6,2 ± 0,8
20:0	3,0 ± 0,2	3,6 ± 0,8	3,6 ± 0,7
21:0	3,6 ± 0,8	4,0 ± 0,8	3,7 ± 0,8
22:0	3,7 ± 1,0	3,1 ± 0,6	2,8 ± 0,5
23:0	8,5 ± 1,0	3,4 ± 1,0	3,1 ± 0,5
24:0	11,3 ± 0,8	3,6 ± 1,3	2,9 ± 0,7
25:0	9,9 ± 0,4	3,3 ± 1,1	2,7 ± 0,4
26:0	5,3 ± 0,4	2,2 ± 0,8	2,4 ± 0,7
27:0	2,9 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,5 ± 0,3

этом содержание мононенасыщенных жирных кислот (МНЖК) было 8,4 %. Соотношение МНЖК/ПНЖК, а также МНЖК/диненасыщенные ЖК было низким. В течение роста контрольной культуры зафиксировано значительное снижение доли ПНЖК с тремя двойными связями и увеличение доли олеиновой кислоты. Относительное содержание линолевой кислоты почти не менялось, тогда как доля другой диеновой ЖК (16:2) снижалась практически в 2 раза. При этом соотношение МНЖК/ПНЖК увеличивалось в 6,3 – 9,5 раза, а соотношение МНЖК/диеновые ЖК – в 5,2 – 5,6 раза.

По сравнению с контрольной культурой на среде с 0,3 М NaCl на 3-и сутки снизилось относительное содержание суммы диеновых и триеновых кислот на фоне возрастания доли

МНЖК, главным образом, за счёт олеиновой кислоты. В целом, соотношения МНЖК/ПНЖК и МНЖК/диненасыщенные ЖК возрастали соответственно в 6 и в 5,6 раза относительно контроля. Однако на 7-е сутки культивирования относительное содержание ПНЖК увеличилось до 43 %, главным образом, за счёт α -линоленовой кислоты. Вместе с этим относительное содержание олеиновой кислоты снижалось до 13,64 %, поэтому соотношение ненасыщенные ЖК/насыщенные ЖК в целом не менялось и оставалось на таком же уровне до конца эксперимента (табл. 2).

Более выраженный характер изменений в составе ЖК зарегистрирован при культивировании водоросли на среде с 0,7 М NaCl. На 3-и сутки обнаружено еще более сильное

Таблица 2. Состав жирных кислот водоросли *V. bryatii* Kütz IPPAS H-252, выращенной при различных концентрациях NaCl в среде (% от суммы ЖК, среднее±стандартная ошибка, n=3)

ЖК	Контроль				0.3 М NaCl				0.7 М NaCl			
	3-и сутки	7-е сутки	12-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	12-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	12-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	12-е сутки
12:0	0,8±0,0	0,1±0,1	0,2±0,0	0,4±0,1	0,3±0,1	0,4±0,1	0,3±0,2	0,3±0,2	0,3±0,2	0,3±0,2	0,3±0,2	0,1±0,0
14:0	1,6±0,2	0,6±0,2	0,8±0,1	1,8±0,0	2,1±0,4	2,3±0,5	2,0±0,6	2,0±0,6	2,0±0,6	2,0±0,6	2,0±0,2	0,9±0,1
15:0	0,5±0,1	0,2±0,1	0,4±0,0	1,1±0,1	1,0±0,0	1,0±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1	1,3±0,1	0,3±0,1
16:0	23,1±4,1	24,8±2,1	26,5±0,5	29,8±1,0	27,5±2,0	29,0±2,5	35,7±2,7	32,6±1,9	35,7±2,7	32,6±1,9	32,6±1,9	30,8±1,95
16:2	6,6±0,3	3,5±0,4	3,7±0,5	3,0±0,1	1,7±0,1	3,0±0,4	2,1±0,3	1,7±0,1	2,1±0,3	1,7±0,1	1,7±0,1	3,5±0,1
16:3	13,1±0,7	5,3±1,1	5,7±0,5	6,1±1,2	6,1±0,2	7,8±1,9	2,2±0,2	3,1±0,2	2,2±0,2	3,1±0,2	3,1±0,2	5,6±0,4
18:0	3,0±0,5	5,9±0,3	5,2±0,2	7,0±0,6	7,1±0,2	6,0±0,8	6,9±0,3	8,1±0,6	6,9±0,3	8,1±0,6	8,1±0,6	5,5±0,0
18:1ω9	3,6±3,1	32,1±5,5	25,8±1,2	20,0±2,1	9,3±1,5	13,6±2,9	21,5±1,7	20,4±0,3	21,5±1,7	20,4±0,3	20,4±0,3	20,6±2,8
18:2ω6	12,5±0,9	13,0±2,1	10,5±2,0	6,9±0,1	9,4±2,2	7,9±0,5	5,1±0,3	7,6±0,7	5,1±0,3	7,6±0,7	7,6±0,7	11,3±2,9
18:3ω3	29,7±5,8	6,5±1,1	14,0±2,0	13,4±2,7	25,7±1,6	20,3±4,1	3,4±0,3	11,5±1,3	3,4±0,3	11,5±1,3	11,5±1,3	15,6±2,0
20:0	0,2±0,0	1,0±0,1	0,5±0,2	1,0±0,1	0,7±0,1	0,6±0,1	1,0±0,1	0,7±0,1	1,0±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1
22:0	0,1±0,0	0,4±0,1	0,2±0,1	0,8±0,1	0,6±0,2	0,5±0,2	1,2±0,3	0,8±0,2	1,2±0,3	0,8±0,2	0,8±0,2	0,3±0,1
24:0	0,3±0,0	1,0±0,5	0,5±0,2	3,0±0,4	2,0±0,7	2,4±1,6	9,4±1,1	2,6±0,8	9,4±1,1	2,6±0,8	2,6±0,8	0,4±0,1
26:0	-	-	-	0,6±0,6	0,1±0,1	0,2±0,1	2,6±0,8	0,4±0,4	2,6±0,8	0,4±0,4	0,4±0,4	0,6±0,6
Прочие*	4,9	5,6	6,1	5,1	6,3	6,0	6,1	6,8	6,1	6,8	6,8	4,2
Σ ненасыщенные/Σ насыщенные	2,51±0,49	1,95±0,24	1,89±0,01	1,19±0,11	1,41±0,11	1,39±0,26	0,67±0,07	1,03±0,07	0,67±0,07	1,03±0,07	1,03±0,07	1,54±0,06
Σ МНЖК/Σ ПНЖК	0,15±0,06	1,41±0,36	0,94±0,07	0,89±0,20	0,36±0,01	0,57±0,19	2,13±0,10	1,14±0,12	2,13±0,10	1,14±0,12	1,14±0,12	0,72±0,16
Σ МНЖК/Σ диненасыщенные	0,45±0,15	2,51±0,81	2,29±0,26	2,51±0,25	1,45±0,19	1,98±0,33	3,78±0,15	2,93±0,29	3,78±0,15	2,93±0,29	2,93±0,29	1,83±0,46
Σ длинноцепочечные	0,55±0,06	2,35±0,56	1,21±0,45	5,30±0,88	3,45±0,81	3,74±1,86	14,13±1,86	4,64±1,57	14,13±1,86	4,64±1,57	4,64±1,57	1,54±0,26

* 16:1ω7, 16:1ω6, 16:1ω13tr, 17:0, 18:1ω7.

Таблица 3. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа жирных кислот водоросли *B. braunii* Kütz IPPAS H-252, выращенной при различных концентрациях NaCl

ЖК	F_a	F_b	F_{ab}	η_a^2	η_b^2
12:0	1,32	8,00	5,05	4,65	28,14
14:0	1,56	9,09	3,00	6,07	35,45
15:0	9,63	47,27	17,72	9,51	46,65
16:0	0,30	10,11	0,82	1,41	48,03
16:2	21,55	54,91	13,61	19,12	48,73
16:3	5,08	18,66	11,72	9,05	33,21
18:0	10,14	20,65	5,51	19,96	40,64
18:1 ω 9	3,74	5,36	15,09	7,75	11,10
18:2 ω 6	1,24	6,14	1,96	6,12	30,25
18:3 ω 3	0,41	9,04	13,34	0,90	20,04
20:0	2,85	5,24	7,94	8,63	15,90
22:0	4,32	10,12	3,47	14,21	33,31
24:0	3,44	4,21	3,11	15,03	18,40
26:0	5,98	6,05	3,87	20,80	21,02

F_a – критерий Фишера для фактора возраста культуры,

F_b – критерий Фишера для фактора солёности,

F_{ab} – критерий Фишера для возрастного фактора и фактора солёности,

η_a^2 – показатель степени влияния фактора возраста культуры (%),

η_b^2 – показатель степени влияния фактора солёности (%),

число степеней свободы $n_a=2$, $n_b=2$, $n_{ab}=4$,

жирным шрифтом выделены значения, достоверные при $p \leq 0,01$.

снижение содержания ПНЖК, главным образом, триеновых ЖК, 16:3 и 18:3 ω 3. Соотношение ненасыщенные ЖК/насыщенные ЖК при этом заметно снижалось (табл. 2). При дальнейшем культивировании относительное содержание ПНЖК увеличивалось до 36,0 %, поэтому соотношение ненасыщенные ЖК/насыщенные ЖК возрастало до 1,54. Это ниже, чем в контроле, но сопоставимо с влиянием 0,3 М NaCl. Содержание МНЖК, доминирующей среди которых была олеиновая кислота, практически не менялось в ходе культивирования. Соотношение МНЖК/ПНЖК в ходе культивирования снижалось практически в 3 раза за счёт увеличения доли ПНЖК.

Существенные изменения обнаружены в содержании длинноцепочечных насыщенных ЖК. В лаг-фазе при 0,3 М NaCl доля 20:0, 22:0

и 24:0 по сравнению с контролем увеличилась в 8-10 раз ($t=6,5$, $n=3$, $p<0,01$), а при 0,7 М NaCl их суммарное содержание возрастало до 14,1 % от суммы ЖК, что в 25 раз превышало уровень этих кислот в контроле ($t=5,4$, $n=3$, $p<0,01$). По мере адаптации культуры к солевому стрессу происходило снижение содержания этих кислот до уровня, характерного для контроля. Кроме того, в спектре ЖК водоросли, выросшей в присутствии NaCl, зафиксировали появление кислоты 26:0, содержание которой также снижалось к концу эксперимента.

Обсуждение

Культивирование *B. braunii* Kütz IPPAS H-252 водоросли в присутствии NaCl приводило к задержке роста и появлению лаг-фазы

(3 суток) и сопровождалось снижением содержания азотсодержащих веществ и хлорофиллов. Снижение содержания белка при 0,5 М NaCl отмечено и для других штаммов *B. braunii*: Austin и Göttingen (Ben-Amotz et al., 1985; Vazquez-Duhalt, Arredondo-Vega, 1991). Кроме того, Hagemann с соавторами показали, что сразу же после добавления NaCl в среду практически полностью блокируется общий синтез белка у сине-зеленой водоросли *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Hagemann et al., 1990); репрессия синтеза некоторых белков у других сине-зеленых водорослей *Anabaena* sp. L-31 и *Anabaena torulosa* наблюдается даже при невысоких концентрациях NaCl (Fernandes et al., 1993).

Первоначальное снижение концентрации хлорофилла в клетках исследованной нами культуры в присутствии NaCl согласуется с данными Ben-Amotz с соавторами (1985). Однако в изученной культуре *B. braunii* дальнейшее культивирование приводило к увеличению содержания общего азота и концентрации хлорофиллов. Отсутствие различий в содержании углеводов в клетках водоросли, выращенной нами с добавлением NaCl, согласуется с результатами для штаммов *B. braunii* Austin и Göttingen, также выращенных при различной солёности среды (Vazquez-Duhalt, Arredondo-Vega, 1991).

Отсутствие достоверных отличий в содержании липидов *B. braunii* Kütz IPPAS H-252, культивируемой в оптимальных условиях и на средах с NaCl, также согласуется с данными, полученными для штаммов *B. braunii* Austin и Göttingen (Vazquez-Duhalt, Arredondo-Vega, 1991). Однако известно, что NaCl оказывает различное влияние на содержание липидов у других видов водорослей. Так, увеличение солёности среды приводит к снижению синтеза липидов у диатомовой водоросли *Nitzschia*

frustulum (Renaud, Parry, 1994), зеленой водоросли *Cladophora vagabunda* (Elenkov et al., 1996) и у галофильной зеленой водоросли *Dunaliella salina* (Al-Hasan et al., 1987), способной, как и *B. braunii*, синтезировать углеводороды. Напротив, синтез липидов у золотистой водоросли *Isochrysis* sp. и зеленой водоросли *Nannochloropsis oculata* усиливается при увеличении солёности среды (Renaud, Parry, 1994).

Данных о влиянии NaCl на состав и содержание углеводов у *Botryococcus braunii* в имеющейся литературе практически нет. Присутствие NaCl стимулирует синтез углеводов у штаммов *B. braunii* Göttingen и LB 572, но не влияет на их содержание у *B. braunii* Austin (Vazquez-Duhalt, Arredondo-Vega, 1991), как и у исследуемого штамма *B. braunii* Kütz IPPAS H-252. Дефицит азота и температура также не влияли на состав углеводов изученной водоросли (Kalacheva et al., 2002).

Известно, что при неблагоприятных условиях содержание триацилглицеринов может увеличиваться, что показано для зеленой водоросли *Cladophora* spp. (Napolitano, 1994), красной водоросли *Tichocarpus crinitus* (Khotimchenko, Yakovleva, 2005) и диатомеи *Thalassiosira pseudonana* (Brown et al., 1996). Мы наблюдали усиление синтеза триацилглицеринов в изученной культуре в присутствии NaCl уже на 3-и сутки культивирования (рис. 2в, табл. 2). При этом в составе ЖК значительно возрастала доля олеиновой кислоты, являющейся основной ЖК триацилглицеринов у данной водоросли (Жила и др., 2005). Подобное влияние оказывали дефицит азота и изменение (отклонение от оптимальной) температуры (Калачева и др., 2002; Жила и др., 2005).

Степень ненасыщенности липидов мембран является важным показателем процесса

адаптации водорослей к окружающей среде. Изменения в составе ЖК, связанные с повышенной солёностью среды, необходимы для поддержания текучести мембраны и обеспечения её целостности.

Повышение концентрации NaCl в среде у золотистой водоросли *Isochrysis* sp. приводит к увеличению C18 и C22 ПНЖК (Ben-Amotz et al., 1985). Напротив, в работе Renaud and Parry (1994) увеличение солёности среды сопровождается снижением доли ЖК 18:5 и 22:6 у той же водоросли *Isochrysis* sp. Уменьшение ненасыщенности липидов при более высоком содержании NaCl показано и для зеленых водорослей *Dunaliella* sp, *Nannochloropsis* sp. и диатомовой водоросли *Nitzschia frustulum* (Renaud, Parry, 1994; Xu, Beardall, 1997; Hu, Gao, 2006).

Одним из факторов противоречивости данных результатов, по всей видимости, является анализ состава ЖК водорослей на разных фазах роста. В литературе мы встретили лишь работу Lee с соавторами (1989), в которой исследовано влияние NaCl на состав ЖК красной водоросли *Porphyridium cruentum* в разных фазах роста периодической культуры. В работе показано, что в стационарной фазе роста происходит увеличение доли 18:0 и снижение содержания 20:4 независимо от концентрации NaCl в среде.

Снижение концентрации хлорофиллов при добавлении NaCl на 3-и сутки культивирования *B. braunii* Kütz IPPAS H-252 может быть связано с частичной деградацией мембран хлоропластов. Нарушение структуры мембран хлоропластов влечет за собой перераспределение синтеза некоторых гликолипидов – главных липидов фотосинтезирующих мембран (Harwood, Jones, 1989). Так, у сине-зеленой водоросли *Synechococcus* 6311 при более высокой солёности показано снижение

содержания моногалактозилдиацилглицеринов, но увеличение – дигалактозилдиацилглицеринов (Huflejt et al., 1990).

Повышение доли длинноцепочечных насыщенных ЖК в присутствии NaCl, по видимому, связано с накоплением данных кислот в триацилглицеринах. Присутствие этих ЖК во фракции триацилглицеринов показано нами ранее (Калачева и др., 2001). Усиление синтеза длинноцепочечных ЖК (22:0 и 24:0) в присутствии NaCl показано и у штамма *B. braunii* LB 572 (Rao et al., 2007), а также у сине-зеленой водоросли *Synechococcus* 6311 (Huflejt et al., 1990).

Интересно отметить, что с увеличением времени культивирования на среде с добавлением NaCl скорость роста культуры увеличивалась до значений, близких таковым контрольной культуры в период активного роста, что сопровождалось повышением синтеза C18 ПНЖК. При этом состав ЖК на 7-е сутки при 0,3 М практически не отличался от такового у контрольной культуры в период активного роста (3-и сутки). При 0,7 М NaCl синтез ПНЖК не восстановился до значений, характерных для фазы активного роста. Однако в целом, увеличение соотношения ненасыщенные ЖК/насыщенные ЖК липидов, а также увеличение содержания белка и концентрации хлорофиллов, как при 0,3, так и при 0,7 М NaCl, свидетельствует об адаптации водоросли к NaCl.

Таким образом, показано, что присутствие 0,3 и 0,7 М NaCl в среде ингибировало рост *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252 на ранней стадии культивирования, что сопровождалось значительными изменениями в составе ЖК, а именно снижением доли ПНЖК, увеличением относительного содержания олеиновой и насыщенных длинноцепочечных ЖК, однако не влияло на состав и содержание углеводов. Вместе с тем, увеличение био-

массы водоросли и ненасыщенности липидов, главным образом, за счёт восстановления синтеза ПНЖК при дальнейшем культивировании свидетельствует о возможности адаптации водоросли к солёности среды в изученном диапазоне.

Список литературы

Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.И., Ярош Н.П., Луковникова Г.А. (1972) Методы биохимического исследования растений. Л.: Колос, 306 с.

Жила Н.О., Калачева Г.С., Волова Т.Г. (2005) Влияние дефицита азота на рост и состав липидов зелёной водоросли *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. Физиология растений 52: 357-365.

Калачева Г.С., Жила Н.О., Волова Т.Г. (2001) Липиды зелёной водоросли *Botryococcus* в ходе стадийного развития в периодической культуре. Микробиология 70: 305-312.

Калачева Г.С., Жила Н.О., Волова Т.Г., Гладышев М.И. (2002) Влияние температуры на состав липидов *Botryococcus*. Микробиология 71: 336-344.

Новицкая Г.В., Рущая Л.А. (1976) Количественное определение липидов мембран хлоропластов. Физиология растений 23: 899-905.

Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф., Лукина Л.Ф., Кузьменко М.И., Козицкая В.Н., Величко И.М., Мыслович В.О., Гавриленко М.Я., Арндарчук В.В., Кирпенко Ю.А. (1975) Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев: Наукова Думка, 247 с.

Al-Hasan R.H., Ghannoum M.A., Sallal A.-K., Abu-Elteen K.H., Radwan S.S. (1987) Correlative changes of growth, pigmentation and lipid composition of *Dunaliella salina* in response to halostress. J. Gen. Microbiol. 133, 2607-2616.

Ben-Amotz A., Tornabene T.G., Thomas W.H. (1985) Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. J. Phycol. 21: 72-81.

Brown M.R., Dunstan G.A., Norwood S.J., Miller K.A. (1996) Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. J. Phycol. 32:64-73.

Choi G.-G., Kim B.-H., Ahn C.-Y., Oh H.-M. (2011) Effect of nitrogen limitation on oleic acid biosynthesis in *Botryococcus braunii*. J. Appl. Phycol. 23: 1031-1037.

Dayananda C., Sarada R., Usha Rani M., Shamala T.R., Ravishankar G.A. (2007) Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. Biomass and Bioenergy. 31: 87-93.

Elenkov I., Stefanov K., Dimitrova-Konaklieva S., Popov S. (1996) Effect of salinity on lipid composition of *Cladophora vagabunda*. Phytochemistry 42: 39-44.

Fernandes T.A., Iyer V., Apte S.K. (1993) Differential responses of nitrogen-fixing cyanobacteria to salinity and osmotic stresses. Appl. Environ. Microbiol. 59: 899-904.

Hagemann M., Wolfel L., Kruger B. (1990) Alterations of protein synthesis in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 after a salt shock. J. Gen. Microbiol. 136: 1393-1399.

Harwood J.L., Jones A.L. (1989) Lipid metabolism in algae. Adv. Bot. Res. 10: 1-53.

Hu H., Gao K. (2006) Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO₂ concentration. Biotechnol. Lett. 28: 987-992.

Huffeijt M.E., Tremolieres A., Pineau B., Lang J.K., Hatheway J., Packer L. (1990) Changes in membrane lipid composition during saline growth of the fresh water cyanobacterium *Synechococcus* 6311. *Plant Physiol.* 94: 1512-1521.

Kalacheva G.S., Zhila N.O., Volova T.G. (2002) Lipid and hydrocarbon compositions of a collection strain and a wild sample of the green microalga *Botryococcus*. *Aquat. Ecol.* 36: 317-330.

Khotimchenko S.V., Yakovleva I.M. (2005) Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry.* 66:73-79.

Lee Y-K., Tan H-M., Low C-S. (1989) Effect of salinity of medium on cellular fatty acid composition of marine alga *Porphyridium cruentum* (Rhodophyceae). *J. Appl. Phycol.* 1: 9-23.

Metzger P., Largeau C. (1999) Chemicals of *Botryococcus braunii*. In: Chemicals from Microalgae. Ed. Cohen Z. London: Taylor and Francis, p. 205-260.

Napolitano G.E. (1994) The relationship of lipids with light and chlorophyll measurement in freshwater algae and periphyton. *J. Phycol.* 30: 943-950.

Renaud S.M., Parry D.L. (1994) Microalgae for use in tropical aquaculture II: effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *J. Appl. Phycol.* 6: 347-356.

Rao R.A., Dayananda C., Sarada R., Shamala T.R., Ravishankar G.A. (2007) Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresource Technol.* 98: 560-564.

Thompson G.A. Jr. (1996) Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta.* 1302: 17-45.

Vazquez-Duhalt R., Arredondo-Vega B.O. (1991) Haloadaptation of the green alga *Botryococcus braunii* (race A). *Phytochemistry* 30: 2919-2925.

Xu X-Q., Beardall J. (1997) Effect of salinity on fatty acid composition of a green microalga from an antarctic hypersaline lake. *Phytochemistry* 45: 655-658.

Influence of Salinity on Growth and Biochemical Composition of Green Alga

***Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252**

**Natalia O. Zhila^{a,b},
Galina S. Kalachova^a and Tatiana G. Volova^{a,b}**
^a *Institute of Biophysics
Siberian Branch of Russian Academy of Science,
50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia*
^b *Siberian Federal University,
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia*

*The effect of 0,3 and 0,7 M NaCl on biomass yield, total nitrogen content, intracellular lipid content, hydrocarbons and fatty acid profile of the lipids of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252 in different phases of the culture cycle was studied. The presence of sodium chloride in the medium*

inhibited the growth of algal cells for the first three days of the experiment, causing a decrease in total nitrogen, enhanced synthesis of triacylglycerols. In addition, considerable changes in the lipid fatty acid profile were found, i.e. decrease in polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels (29,38 % and 12,8 %) and levels of long-chain saturated acids (5,3 % and 14,13 % of the total) at 0,3 M NaCl and 0,7 M NaCl, respectively. In later phases of the culture, at 0,3 M NaCl, the PUFA content increased up to the values characteristic of the active growth phase of the alga. At 0,7 M NaCl, the proportion of PUFA enhanced at less extent, but biomass concentration and total nitrogen increased, similarly to the experiment with 0,3 M NaCl, that may also be indicative of adaptation of the alga to the studied concentrations of NaCl.

Keywords: Botryococcus, biochemical composition, fatty acids, hydrocarbons, salinity.
