

Г. С. МИНЮК, И. В. ДРОБЕЦКАЯ, Р. П. ТРЕНКЕНШУ,
О. Ю. ВЯЛОВА

РОСТОВЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ *SPIRULINA (ARTHROSPIRA) PLATENSIS* (NORDST.) GEITLER ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ АЗОТНОГО ПИТАНИЯ

Исследовано влияние различных концентраций нитрата натрия в среде Заррука на рост и химический состав *Spirulina (Arthrospira) platensis* при ее выращивании в культиваторах открытого типа в квазинепрерывном режиме. Показана положительная корреляция между уровнем азота в среде, с одной стороны, и продуктивностью культуры, содержанием белка и пигментов фотосинтетического комплекса, с другой.

Среди культивируемых в промышленных масштабах микроводорослей *Spirulina platensis* является одним из наиболее изученных видов. При этом подавляющее большинство работ, выполненных за более чем тридцатилетний период исследований этого объекта, было сфокусировано на двух главных биотехнологических направлениях: разработке эффективных, экономически оправданных методов выращивания водоросли и оценке перспектив ее использования в пищевых, медицинских и технических целях. [7, 13, 19, 21]. В то же время, многие эколого-физиологические аспекты роста и питания *S. platensis* в условиях интенсивной культуры, в том числе и особенности азотного метаболизма при различных режимах культивирования, до сих пор остаются не вполне ясными.

Известно, что для микроводорослей одним из наиболее важных компонентов питательной среды, определяющим интенсивность биосинтеза белков и фотосинтетических пигментов, является азот. Особенности культивирования (конструкция культиваторов, соотношение биогенных элементов в среде, освещенность, температура и др.) существенным образом влияют на избирательность и скорость ассимиляции водорослями различных химических форм азота, величины их оптимальных и лимитирующих концентраций, а также характер изменений в метаболизме, вызванных дефицитом или избытком биогена [1, 3, 16]. Сведения такого рода, имеющиеся в литературе для *S. platensis*, ограничиваются, в основном, работами, выполненными в накопительной культуре [4, 5, 6, 17]. Квазинепрерывный режим выращивания спироулины, принятый на ряде предприятий Украины и России, представляет собой промежуточный вариант между периодической и проточной культурами и обладает рядом особенностей. Основная цель данной работы заключалась в исследовании влияния концентрации нитратного азота в среде на продуктивность и химический состав спироулины (содержание белка, хлорофилла *a*, С-фикоцианина и суммарных каротиноидов) при промышленном выращивании водоросли методом квазинепрерывной культуры.

Материал и методы. Работа выполнена в мае 2000 г. на базе производственно-го предприятия «Агро-Виктория» (г. Сочи, Россия). Водоросли выращивали на модифицированной среде Заррука, содержащей 500, 200, 100, 60, 30 и 10 мг N/л в форме NaNO_3 (варианты № 1 - 6, соответственно). Квазинепрерывную культуру получали путем периодической замены (с интервалом в 24 ч) 10 % суспензии водорослей равноценным объемом свежеприготовленной среды, содержащей соответствующее каждому варианту опыта количество нитратов. Инокулят, конструкция культиваторов, температурные и световые условия, методы определения абсолютно сухой биомассы (АСБ) в литре суспензии водорослей, содержания нитратов в среде, белка и пигментов в спироулине описаны в [2].

Начальная плотность культуры во всех вариантах опыта была одинаковой и составляла 0,22 - 0,23 г АСБ/л. Продуктивность (в г АСБ/л-сут.) оценивали по разнице между величиной биомассы, измеренной сразу после 10 % обмена в текущий день эксперимента, и через 24 ч (после компенсации испарения) в последующий день перед очередным обменом. Продолжительность эксперимента составляла 18 сут. Каждый вариант

опыта выполнялся одновременно в двух повторностях, и все приведенные количественные данные являются средними из значений, полученных в каждой параллели.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования влияния концентрации нитратного азота в среде на рост и продуктивность *S. platensis* при выращивании в квазинепрерывном режиме представлены на рис. 1 и 2. На кривых роста приведены все значения плотности культур, регистрировавшиеся ежедневно до и после обмена суспензии водорослей на свежую питательную среду, что одновременно дает представление как о ди-

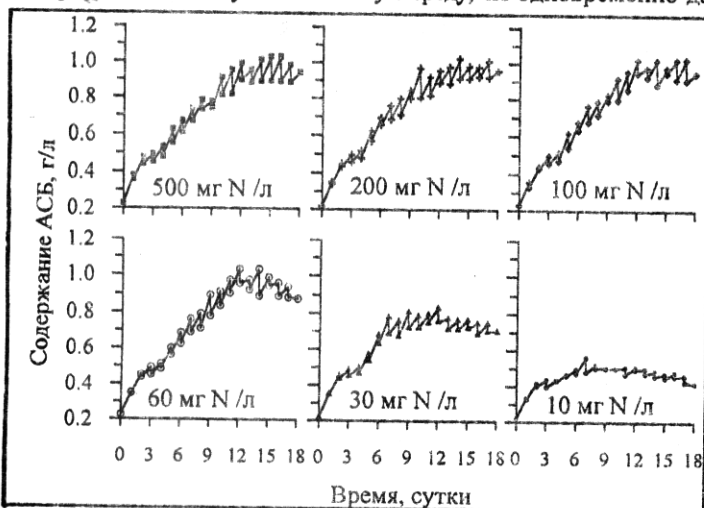


Рисунок 1. Кривые роста *Spirulina platensis* в зависимости от концентрации азота в среде Заппука

Figure 1. Growth responses of *Spirulina platensis* in dependence on the nitrogen concentration in Zarrouk's medium

концентрации азота до 60 мг/л привело к снижению средней продуктивности до 7,8 г АСБ/м²·сут., хотя различия между этим и предыдущими вариантами были статистически недостоверны. В вариантах 30 и 10 мг N/л ежесуточные приросты были заметно ниже, продолжительность логарифмической стадии роста сократилась до 9 и 7-х суток, соответственно, а средняя урожайность за 12 сут. равнялась 6,6 и 2,95 г АСБ/м² · сут.

Падение средней продуктивности на стационарной фазе роста (по отношению к экспоненциальной стадии) (см. рис. 2Б) положительно коррелировало с концентрацией



Рисунок 2. Средняя продуктивность *Spirulina platensis* ($M \pm m$) на логарифмической (А) и стационарной (Б) фазах роста в зависимости от концентрации азота в среде

Figure 2. Mean productivity *Spirulina platensis* ($M \pm SE$) on logarithmic and stationary growth phases in dependence on the nitrogen concentration in the medium

динамике накопления биомассы в ходе эксперимента, так и о величинах ежесуточных приростов. На экспоненциальной стадии развития культур в вариантах 500 - 100 мг N/л характер кривых, продолжительность периода активного роста клеток (12 сут.) и средние продуктивности практически не различались. Плотность культур во всех трех случаях на 12-е сутки была близкой к 1 г АСБ/л, а средняя урожайность составила 8,6 - 8,5 г АСБ/м² · сут. Уменьшение начальной

нитратов в среде и составило в варианте №1 - 15 %, вариантах №2 и №3 - 30,5 и 38,3 %, а в условиях острого дефицита азота - 62,6 и 78,0 %. В среднем за весь период эксперимента урожайность спироулины в вариантах 500 - 100 мг N/л равнялась 7,9 - 7,2 г/м² · сут., при 60 мг N/л - 6,5 г/м² · сут., а в вариантах 30-10 мг N/л - 5,1 и 2,2 г/м² · сут.

Особо следует подчеркнуть факт близости ростовых характеристик спироулины в вариантах №1 - 3, существенно различающихся по обеспеченности клеток важнейшим биогенным элементом. В варианте №3 содержание нитратов упало до нижней границы чувствительности ионоселективного электрода (около 1 мг/л) уже на 11-е сутки

эксперимента, в то время как в вариантах № 1 и 2 в конце эксперимента оставалось еще около 50 и 20 % их начального уровня (рис.3).

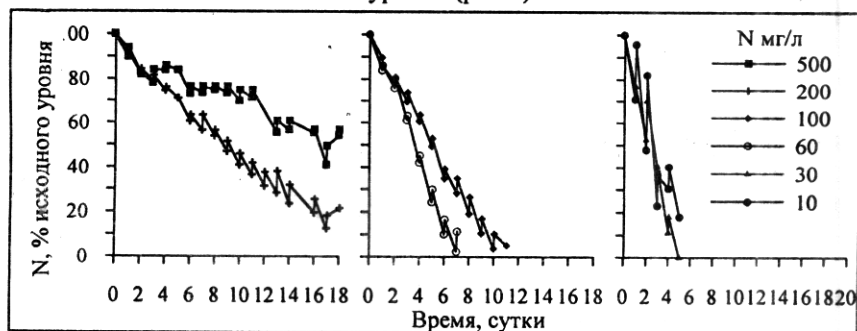


Рисунок 3. Динамика содержания нитратов в питательной среде
Figure 3. The nitrate content dynamics in nutrient medium

Аналогичное сохранение продуктивности *S. platensis* на фоне уменьшения содержания нитратов в среде Заррука в 1,7 раза (с 412 до 247 мг N/л) отмечали и другие авторы при промышленном культивировании водоросли в накопительном режиме [6]. Сходные результаты получены также для близкого спиролине вида *Oscillatoria limnetica* в пределах концентраций нитратного азота 356 - 139 мг/л. [10].

Продолжение активного роста культуры при резком снижении содержания нитратного азота в среде, вплоть до его полного «выедания», можно объяснить несколькими причинами. Прежде всего, следует указать на способность спиролины достаточно эффективно использовать, помимо нитратов, и другие источники азота [5, 6, 19]. В данном случае это могут быть продукты бактериальной деструкции отмерших клеток спиролины и ее собственные вторичные метаболиты, такие как аминокислоты, низкомолекулярные пептиды и нитриты. Нитриты образуются в процессе нитратредукции, экскретируются водорослями в среду, где накапливаются в значительных количествах [3, 12, 16]. Хотя в работе [5] показано ингибирование роста спиролины при использовании нитрита натрия в качестве единственного источника азота, вероятность ассимиляции клетками этой химической формы азота в условиях лимита биогена все же нельзя не принимать во внимание. В противном случае трудно было бы объяснить наличие у *Cyanobacteria* общего механизма активного транспорта нитрат- и нитрит-ионов через наружную клеточную мембрану [11], а также высокие кинетические характеристики нитритредуктазы *S. platensis*, сопоставимые с аналогичными характеристиками эукариот [3, 20]. Немаловажную роль в компенсации дефицита азота может играть и мобилизация внутриклеточных резервов: полипептидов цианофициновых гранул [18] и фикоцианина, значительные запасы которого сосредоточены в фикобилисомах [8].

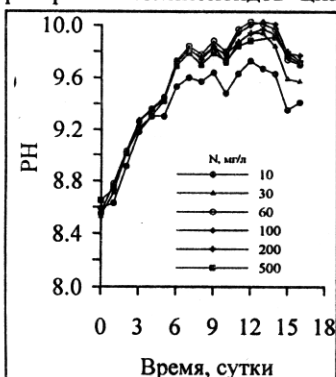


Рисунок 4. Динамика pH при различных концентрациях нитратов в среде

Figure 4. The pH dynamics at different medium nitrate concentrations

Накопление биомассы сопровождалось характерным для спиролины защелачиванием среды [6, 13] (рис. 4). При этом рост pH практически не зависел от концентрации нитратов в растворе.

На фоне высокой продуктивности спиролины в первые дни эксперимента содержание белка и пигментов во всех вариантах опыта через сутки после внесения инокулята в питательную среду резко упало, по сравнению с исходной культурой, и продолжало снижаться в течение вторых суток (рис. 5). По всей вероятности, такой метаболический сбой является ответной реакцией водоросли на одновременное скачкообразное изменение сразу нескольких факторов среды: концентраций биогенов, освещенности, pH, солености, и др. При достаточной обеспеченности азотом и его активном поглощении водорослями из среды нарушение метаболизма могло произойти, по нашему мнению, на уровне ферментативной регуляции процессов нитритредукции

или

трансаминирования

органических

кислот.

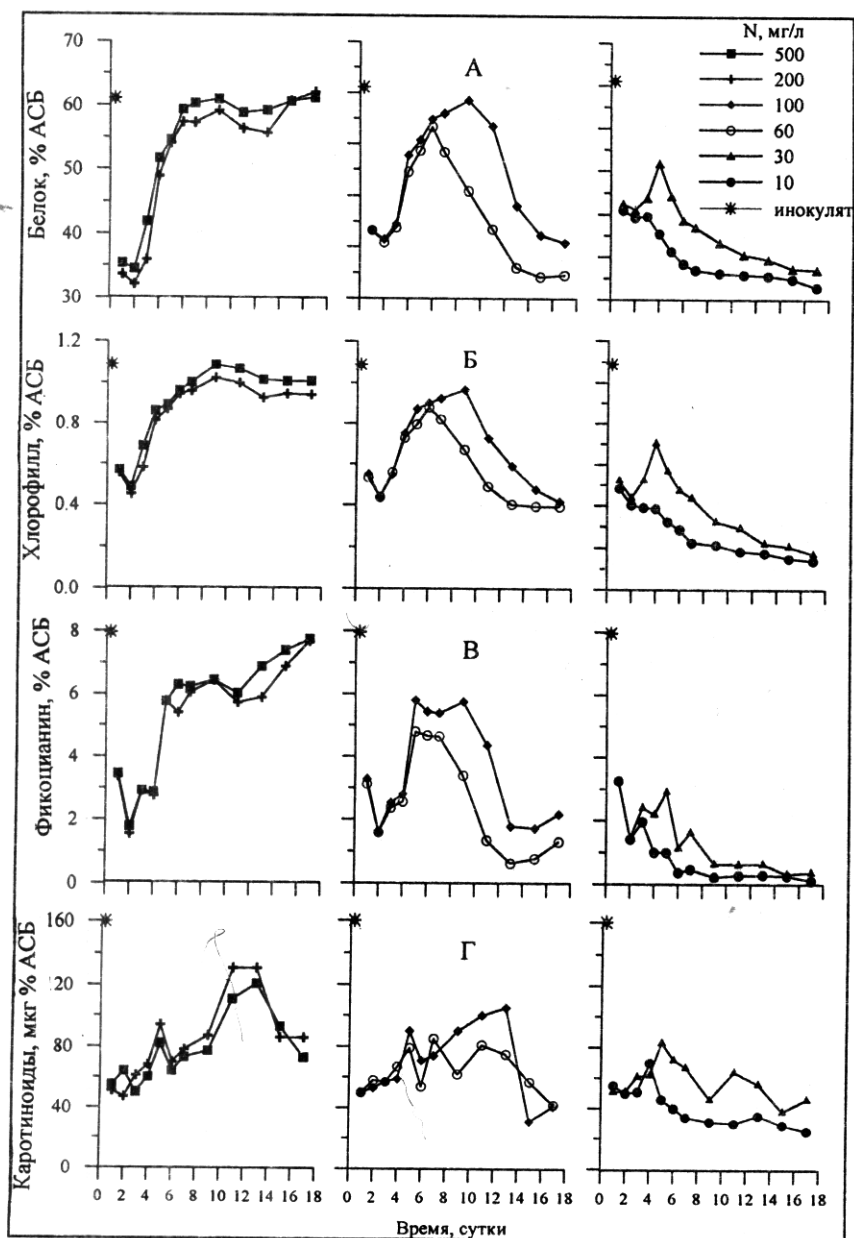


Рисунок 5. Динамика содержания белка (А), хлорофилла *a* (Б), С-фикоцианина (В) и суммарных каротиноидов (Г) в сухой биомассе спироулины в зависимости от концентрации азота в питательной среде

Figure 5. The dynamics of protein (А), chlorophyll *a* (Б), C-phycocyanin (В) and total carotenoid (Г) content in dry spirulina biomass depending on nitrate concentration in nutrient medium

Характер изменений, происходивших в последующие дни, существенно различался в зависимости от концентрации нитратов в среде. В вариантах 500 и 200 мг N/л уровень белка быстро восстанавливался и, начиная с 6-х суток, оставался до конца опыта неизменным (см. рис.5 А). В вариантах 100 и 60 мг N/л темпы накопления белка были заметно ниже, и через 9 и 6 суток его содержание начало неуклонно снижаться (до 30,9 и 24,6 % АСБ). Еще более глубокие нарушения белкового синтеза отмечены в вариантах 30 и 10 мг N/л. В последнем случае восстановления запасов белка в ходе роста культуры не наблюдалось, а его уровень в конце эксперимента составлял всего лишь

12,9 % АСБ.

Вторым серьезным последствием ухудшения условий питания клеток явилось ингибирование биосинтеза азотсодержащих фотосинтетических пигментов, что легко определялось визуально по изменению цвета культур от сине-зеленого через различные оттенки зеленого до оранжево-желтого цвета. Кривые динамики концентрации хлорофилла *a* и *C*-фикоцианина практически параллельны аналогичным кривым белка (рис. 5 Б, В). Коэффициенты корреляции между уровнем общего белка и этих пигментов во всех вариантах опыта очень близки и составляют около 0,9. При этом доля фикоцианина в общем белке при высоком уровне азота в среде в ходе эксперимента увеличивалась, а в условиях среднего и острого дефицита биогена сокращалась (см. табл.).

Таблица. Относительное содержание *C*-фикоцианина в общем белке, %
Table. Percentage of *C*- phycoyanin in crude protein.

Сутки	Начальная концентрация азота в питательной среде, мг/л					
	500	200	100	60	30	10
1	9,76	10,03	9,85	9,37	9,89	10,51
5	10,54	10,69	11,41	9,84	8,51	4,70
11	10,24	10,16	8,15	3,99	3,00	1,77
17	12,67	12,39	7,02	5,28	2,21	0,95

Однонаправленность изменений указанных характеристик объясняется сопряженностью биосинтеза аминокислот, порфириновых пигментов (хлорофиллов) и линейных тетрапирролов (фикоцианобилина) в рамках метаболического пути δ -аминолевулиновой кислоты [15]. Что касается каротиноидов, то для их биосинтеза не нужен азотсодержащий предшественник [9, 14] и, видимо, поэтому снижение содержания этих пигментов в биомассе в условиях данного эксперимента выражено в меньшей степени, чем у хлорофилла и фикоцианина (рис. 5Г). Однако при острой нехватке азота ингибирование белкового синтеза не могло не сказаться на активности ферментных систем, отвечающих за образование изопrenoидов и трансформацию их в каротиноидные пигменты, что четко проявилось в вариантах с низкими концентрациями нитратов в среде.

Заключение. При выращивании *Spirulina platensis* на среде Заррука в квазине-прерывном режиме уменьшение концентрации нитратного азота в среде в диапазоне 500 - 100 мг N/л практически не сказывается на продуктивности водоросли в период экспоненциальной стадии роста. В то же время уровень белка, хлорофилла *a*, *C*-фикоцианина и каротиноидов – наиболее важных метаболитов, определяющих физиологическое состояние культур, – заметно снижается по мере ухудшения обеспеченности клеток биогенным элементом. Более низкие концентрации нитратов (60, 30 и 10 мг N/л) существенно ингибируют как рост водоросли, так и функционирование метаболических циклов. Концентрации 30 - 10 мг N/л, по-видимому, близки к нижней границе диапазона толерантности спироулины к дефициту азота при ее выращивании указанным способом. Содержание белка и фотосинтетических пигментов падает до крайне низких величин, указывающих на серьезные нарушения обмена веществ. Однако даже в этих условиях культуры оставались в жизнеспособном состоянии, что свидетельствует о высоких адаптационных возможностях вида.

1. Гусев М. В. Сравнительная физиология синезеленых водорослей // Успехи микробиологии. - 1966. - № 3. - С. 74 - 103.
2. Дробецкая И. В., Минюк Г. С., Тренкенш Р. П., Вялова О. Ю. Рост и биохимические характеристики *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler при различных условиях минерального питания // Экология моря. - 2001. - Вып. 56. - С. 41 - 46.
3. Кретович В. Л. Усвоение и метаболизм азота у растений. - Москва: Наука, 1987. - 486 с.
4. Менджул М. И., Колтукова Н. В., Лысенко Т. Г. Влияние некоторых физико-химических факторов на рост *Spirulina platensis* (Gom.) Geit. (Cyanophyta) // Альгология. - 1991. - 1, №4. - С. 40 - 45.
5. Baldia S. F., Nishijima T., Hata Y., Fukami K. Growth characteristics of a blue-green alga *Spirulina*

- platensis* for nitrogen utilization // Nippon Suisan Gakkaishi. - 1991. - 57, No 4. - P. 645 - 654.
6. Becker E W. Development of *Spirulina* Research in a Developing County India // *Spirulina-Algae of Life*. - Bull. Inst. Oceanogr. - 1993. - NS, No 12. - P. 141 - 155.
 7. Belay A., Kato T., Ota Y. *Spirulina* (*Arthrospira*): Potential application as an animal feed supplement // J. Appl. Phycol. - 1996. - 8, № 4 - 5. - P. 303 - 311.
 8. Boussiba S., Richmond A. C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis* // Arch. Microbiol. - 1980. - No 125. - P. 143 - 147.
 9. Goodwin T. W. The Biochemistry of the Carotenoids: in 2 Vol. - London: Chapman and Hall, 1980. - Vol. 1. - 377 p.
 10. Faintuch B. L., Sato S., Aquarone E. Use of different nitrogen sources in the production of biomass of *Oscillatoria limnetica* // Afrev. Microbiol. - 1992. - 23, No 1. - P. 32 - 36.
 11. Maeda S., Omata T. Substrate-binding lipoprotein of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 involved in the transport of nitrate and nitrite // J. Biol. Chem. - 1997. - 272, No 5. - P. 3036 - 3041.
 12. Ohmory H. Nitrite excretion by blue-green alga *Oscillatoria rubensis* D.C. // Arch. Hydrobiol. - 1978. - 83, No 4. - P. 485 - 493.
 13. Richmond A. Handbook of microalgal mass culture. - Boca Raton: CRC Press, 1986. - 528 p.
 14. Rowan K. S. Photosynthetic Pigments of Algae. - Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1989. - 334 p.
 15. Sasaki K., Marquez F. J., Nishio N., Nagai S. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the growth and photosynthesis of *Spirulina platensis* // J. Ferment. Bioeng. - 1995. - 79, No 5. - P. 453 - 457.
 16. Syrett P. J. Nitrogen metabolism of microalgae // Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. - 1981. - 210. - P. 182 - 210.
 17. Tedesco M. A., Duerr E. O. Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928 // J. Appl. Phycol. - 1989. - 1, No 3. - P. 201 - 209.
 18. Tomasseli L. Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* // *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-biology and Biotechnology. - London: Taylor & Francis, 1997. - P. 1 - 15.
 19. Wonshak A. Outdoor Mass Production of *Spirulina*: The Basic Concept // *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-biology and Biotechnology. - London: Taylor & Francis, 1997. - P. 79 - 101.
 20. Yabuki Y., Mori E., Tamura G. Nitrite reductase in the cyanobacterium *Spirulina platensis* // Agric. Biol. Chem. - 1985. - 49, No 10. - P. 3061 - 3062.
 21. Yamaguchi K. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: A review // J. Appl. Phycol. - 1996 - 1997. - 8, No 6. - P. 487 - 502.

Институт биологии южных морей НАН Украины,
г. Севастополь

Получено 25. 04. 2002

G. S. MINYUK, I. V. DROBETSKAYA, R. P. TRENKTNESHU, O. Y. VYALOVA

GROWTH AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF *SPIRULINA PLATENSIS* (NORDST.) GEITLER UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF NITROGEN NUTRITION

Summary

The influence of different medium nitrate concentrations on the growth and chemical composition (the content of protein, chlorophyll *a*, C-phycocyanin and total carotenoids) of *S. platensis* at industrial semicontinuous cultivation was investigated. Medium nitrate content reduction in the range from 500 to 100 mg N/l had no effect on algal productivity at exponential growth stage. But for all that the percentage of protein and photosynthetic pigments (most important metabolites determining a physiological state of culture) in biomass decreased significantly. Protein and pigments content values were the lowest at 30-10 mg N/l, when normal functioning of metabolic cycles was limited. Such N concentrations seem to be close to the lower nitrogen tolerance limit for spirulina at the specified cultivation method. Nevertheless culture was in a viable state even in these conditions due to high adaptation potential of this species.