

А. В. БОРОДИНА, И. Н. ГУДВИЛОВИЧ

СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *SPIRULINA (ARTHROSPIRA) PLATENSIS*

Предложен способ культивирования *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler, при котором из питательной среды Заррука исключается сода, основной компонент определяющий стоимость среды, и вводится 0,2 г/л NaOH. Источником углерода для микроводорослей при определенной скорости барботажа служат гидрокарбонат-ионы, образованные из CO₂ воздуха. Приведены ростовые характеристики и основные биохимические показатели спирулины, при выращивании на «щелочной» среде и среде Заррука.

Для получения интенсивной плотной культуры спирулины наиболее часто используют питательную среду Заррука [12]. Однако недостатком этой среды является высокая стоимость гидрокарбоната натрия (16,8 г/л). Известно, что процесс роста спирулины сопровождается повышением pH до 11,5. Ранее нами было установлено, что при повышении pH в течение первых 2-х суток происходит снижение уровня гидрокарбонатов почти вдвое и накопление в среде большого количества карбонатов [1]. Процесс снижения основного источника углерода для спирулины – гидрокарбонат-иона происходит не только в результате его использования микроводорослью, но и из-за сдвига карбонатного равновесия и перехода значительной части гидрокарбонатов в карбонаты. Только за счет этого перехода потери соды могут составить до 40 % при pH ≈ 10 В то же время, при смещении pH среды в щелочную сторону в условиях непрерывного барботажа дополнительным источником углерода становится CO₂ воздуха благодаря образованию в среде дополнительных гидрокарбонатов [1, 2].

Ранее нами был проведен эксперимент по оценке возможности роста спирулины при использовании в качестве источника углерода только CO₂ барботируемого воздуха [3, 4]. При замене NaHCO₃ (16,8 г/л) в среде Заррука на 0,2 г/л NaOH в условиях непрерывного барботажа воздухом ростовые характеристики спирулины были сходны с контролем (на среде Заррука). Однако модифицированная таким образом среда (в дальнейшем «щелочная») требовала дальнейшей доработки, а именно: установления оптимальных концентраций щелочи, ЭДТА и скорости барботажа. Также необходимо было учесть содержание основных биохимических показателей: белка, с-фикоцианина, хлорофилла *a* и каротиноидов у спирулины при выращивании на стандартной среде Заррука и щелочной среды.

Целью данной работы являлось: создание питательной среды для выращивания *Spirulina (Arthrospira) platensis* альтернативной среде Заррука с более экономичным источником неорганического углерода.

Материал и методы. Объектом исследований являлась *S. platensis* штамм IBSS – 33 из коллекции ИнБЮМ НАН Украины. Культуру предварительно адаптировали к среде Заррука и «щелочной» среде.

Опыты проводили в 1-литровых колбах с объемом суспензии 550 мл при барботаже воздухом с различной скоростью (260 мл · мин⁻¹ и 700 мл · мин⁻¹), температуре 25 - 27°C, освещенности 3,7 - 4,0 клк. Содержание абсолютно сухого вещества (АСВ) в литре суспензии определяли фотометрическим методом [8]. Для проведения биохимических анализов биомассу *S. platensis* промывали проточной водой и высушивали в сушильном шкафу при температуре 55°C. При определении С-фикоцианина образцы сухого порошка спирулины растирали в фосфатном буфере и центрифугировали при 3000 об/мин на лабораторной центрифуге ОПН – 3. Содержание пигмента определяли спектрофотометрически, измерения экстрактов проводили на длинах волн 620 и 750 нм по стандартной

методике [10]. Содержание суммарных каротиноидов и хлорофилла *a* определяли из одной навески [6]. Навеску предварительно высушенной биомассы (15 мг) заливали 3 – 5 мл ацетона, центрифугировали при 3000 об./мин. на лабораторной центрифуге; супернатанты сливали в мерную пробирку. Операцию проводили до тех пор, пока экстракт не становился бесцветным. Экстракты пигментов промеряли на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения на спектрофотометре СФ – 16. Количество суммарных каротиноидов и хлорофилла *a* рассчитывали по формулам [11]. В осадке после отмывки пигментов определяли белок по методу Лоури [9]. Массовую долю влаги в воздушно-сухой биомассе спирулины определяли путем высушивания навесок биомассы (около 1 г) при 105⁰С в течение 24 ч [11].

Результаты и обсуждение. При расчетах необходимого количества комплексообразователя (ЭДТА) учитывался рН среды (10,8), и образование комплексов с ионами Ca^{2+} и Fe^{2+} , а также Mg^{2+} [5], т.к. осаждение последнего начинается при рН выше 9,5 [7]. В разработанную «щелочную» среду были внесены следующие изменения: была снижена концентрация щелочи, увеличена исходная концентрация ЭДТА и изменен порядок растворения солей при приготовлении питательного раствора. Полученная среда имеет следующий состав (г/л водного раствора):

Компоненты	г/л
NaOH	0,2
K_2HPO_4	0.5
NaNO_3	2.5
K_2SO_4	1.0
NaCl	1.0
EDTA	0.25
CaCl_2	0.04
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.2

} эти соли растворяют отдельно

Раствор микроэлементов (мл/л) 1,0 (как в среде Заррука)

После внесения инокулята в «щелочную» среду в течение первых суток наблюдается снижение рН до 10,4. Период адаптации культуры сопровождался 1 - 2 дневной лаг-фазой, морфологическими изменениями клеток (небольшое удлинение и изгибание трихом).

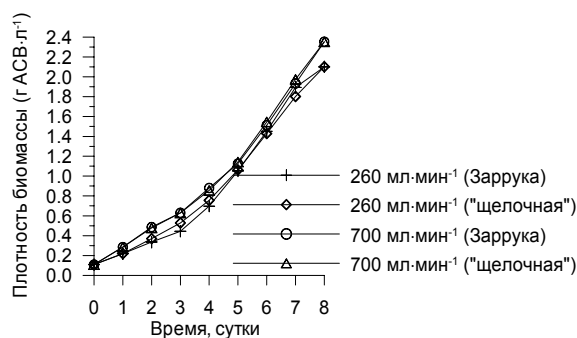


Рисунок 1. Динамика плотности биомассы *S. platensis*, на среде Заррука и «щелочной» среде при различной скорости барботажа.

Figure 1. Dynamics of biomass density of *S. platensis*, on the Zarrouk medium and the "alkaline" medium at various speed bubbling.

Источником углерода для микроводорослей в «щелочной» среде является углекислый газ воздуха, переходящий в раствор, благодаря щелочной реакции последнего. Динамика гидрокарбонатов и карбонатов при выращивании спирулины на «щелочной» среде была описана ранее [1 - 3]. Известно, что ионная форма уголекислоты (гидрокарбонат- или карбонат-ион) определяется величиной рН, а концентрация непосредственно связана с площадью соприкосновения питательной среды с воздухом, т.е. со скоростью барботажа. Было установлено, что при скорости барботажа 260 мл·мин⁻¹ культуры и на

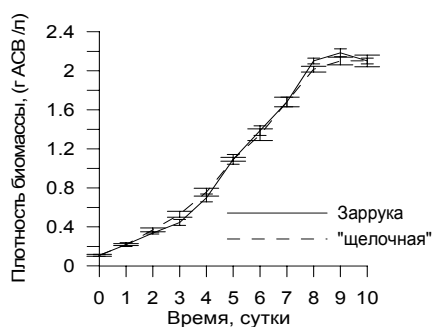


Рисунок 2. Динамика плотности биомассы *S. platensis* в накопительной культуре на двух типах сред.
Figure 2. Dynamics of biomass density of *S. platensis* in culture batch on two types of medium: Zarrouk and "alkaline".

среде Заррука и на «щелочной» среде росли, практически одинаково (рис. 1). Увеличение количества пропускаемого воздуха через суспензию микроводорослей (до 700 мл·мин⁻¹) мало сказывалось на средней продуктивности спирулины, которая во всех вариантах составляла 0,26 - 0,28 г АСВ·л⁻¹·сут⁻¹. При уменьшении скорости барботажа наблюдалось снижение продуктивности спирулины относительно контроля.

Учитывая полученные данные по скорости барботажа, нами был поставлен отдельный эксперимент по сравнительной оценке ростовых и биохимических показателей спирулины при выращивании на двух сравниваемых средах (рис. 2).

Ростовые характеристики спирулины, выращенной на обеих средах были сходными.

Максимумы биомассы и продуктивности на обеих средах были близки по значениям (2,10 – 2,18 г АСВ ·л⁻¹ и 0,30 - 0,33 г АСВ ·л⁻¹ · сут⁻¹, соответственно).

О биологической ценности получаемой биомассы можно судить по таким биохимическим показателям как содержание белка и пигментов антиоксидантного комплекса (хлорофилла *a*, С-фикоцианина и каротиноидов (табл. 1).

Таблица 1. Содержание белка и пигментов в биомассе *S. platensis* в зависимости от состава питательной среды

Table 1. The contents of protein and pigments in biomass *S. platensis* depending on structure of a nutrient medium

Компоненты химического состава	Концентрация в биомассе (% АСВ)	
	Среда Заррука	«щелочная» среда
Белок	46,58 ± 0,440	45,94 ± 0,770
Хлорофилл <i>a</i>	1,11 ± 0,007	0,92 ± 0,002
С-фикоцианин	7,20 ± 0,080	6,81 ± 0,004
Каротиноиды	0,45 ± 0,036	0,40 ± 0,017

Вывод. При использовании «щелочной» среды для культивирования *Spirulina (Arthrospira) platensis* показатели роста и биологической ценности биомассы сравнимы с получаемыми на среде Заррука. В то же время, себестоимость продукции снижается на 30 – 40 %.

1. Бородин А. В. Динамика содержания гидрокарбонатов и карбонатов в среде Заррука при выращивании микроводорослей *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler в накопительной культуре // Экология моря. – 2002. - Вып. 60. – С. 48 – 52.
2. Бородин А. В. Ростовые характеристики *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler в условиях замены гидрокарбонатов на карбонаты в среде Заррука // Ученые записки Таврического национального университета им. Вернадского. – 2003. – Том. 16 (55), №1. Биология, химия. – С. 128 – 132.
3. Бородин А. В. Ростовые характеристики цианобактерии *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler при использовании различных источников неорганического углерода в питательных средах // Бот. исслед. в азиатской России: Матер. XI съезда РБО (18 - 22 августа 2003 г., Нов. - Барнаул). Т. 1. – Барнаул: Изд-во «АзБука», 2003. – с. 84.
4. Бородин А. В. Углеродный баланс в культуре цианобактерии *Spirulina platensis* при выращивании на различных источниках углерода // Экология моря.-2003. -Вып. 64.- С.78 - 81.

5. Бородина А. В., Капранов С. В. Модификация среды Заррука для выращивания *Spirulina (Arthrospira) platensis* // Экология моря. – 2006. – Вып. 70. – С. 14 – 19.
6. Дивавин И. А., Копытов Ю. П. Динамика изменений биохимического состава отдельных органов мидии *Mytilus galloprovincialis* при интоксикации соляром // Экология моря. – 1988. – Вып. 26. – С. 80 – 86.
7. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии // Москва: Химия, 1979. – 480 с.
8. Минюк Г. С., Тренкениу Р. П., Алисиевич А. В., Дробецкая И. В. Влияние селена на рост *Spirulina platensis* (Nordst.) в накопительной и квазинепрерывной культурах // Экология моря. – 2000. – Вып. 54. – С. 42 – 49.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**. – P. 265 – 275.
10. Vonshak A. *Spirulina platensis (Arthrospira)*: Physiology, Cell – biology and Biotechnology /Taylor & Francis. – 1996. – 233 p.
11. Wettstein D. Experimental Cell Research. – 1957. – **12**. – № 3. – 427 p.
12. Zarrouk C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Stech. et Gardner) Geitler // Ph.D. thesis. - Paris, 1966. – 138 p.

Институт биологии южных морей НАН Украины,
г. Севастополь

Получено 30.09.2005

A. V. BORODINA, I. N. GUDVILOVITCH

THE METHOD OF THE *SPIRULINA (ARTHROSPIRA) PLATENSIS* CULTIVATION

Summary

The method of cultivation *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler at which soda as the basic connection influencing on cost of medium is excluded from nutrient medium Zarrouk is offered, and to be entered 0,2 g/l NaOH (the "alkaline" medium) which at the certain speed bubbling provides education of hydrocarbonate-ions from CO₂ air, sufficient for a feed algae. Are resulted by dynamics of biomass density and the basic biochemical parameters in culture of *S. platensis*, at cultivation on the "alkaline" medium and Zarrouk medium.