Биолог. журн. Армении, 3-4 (53), 2001

УДК 576.8.664

О СОВМЕСТНОМ ВЫРАЩИВАНИИ МИКРОВОДОРОСЛИ *SPIRULINA* И ФОТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

А.Х. ПАРОНЯН, Э.К. АФРИКЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г.Абовян

Установлено значительное стимулирующее действие фототрофных бактерий на рост и биосинтез пигментов микроводоросли *Spirulina platensis* при смешанном культивировании этих микроорганизмов. Показано, что при определенном соотношении культур посевного материала и компонентов среды можно существенно увеличить выход биомассы *S.platensis* по сравнению с монокультурой. Подобраны оптимальные условия выращивания смешанных культур.

Հաստատվել է ֆոտոտրոֆ բակտերիաների նկատելի խթանիչ ազդեցությունը *Spirulina platensis* միկրոջրիմուռի աճի և գունանյութերի կենսասինթեզի վրա այդ միկրոօրգանիզմների համատեղ կուլտիվացիայի պայմաններում: Ցույց է տրվել, որ ցանքսանյութի կուլտուրաների և միջավայրի կոմպոնենտների որոշակի փոխհարաբերության դեպքում զգալի ավելանում է *S.platensis*-ի կենսազանգվածի ելքը մոնոկուլտուրայի հետ համեմատած: Գտնվել են խառը կուլտուրաների աճեցման օպտիմալ պայմանները:

The significant stimulation action of phototrophic bacteria on the growth and biosynthesis of pigments of microalgae *Spirulina platensis* during their joint cultivation has been shown. Under certain relation of cultures applied and the components of media, the biomass yield of *S.platensis* increased in comparison with its monoculture. The optimal growth conditions of joint cultures were developed.

Спирулина - фототрофные бактерии - пигменты

Фототрофные бактерии и микроводоросли с высокой эффективностью конвертируют солнечную энергию в энергию химическую и имеют важное значение для получения белка и различных биологически активных веществ [8, 10, 11, 14]. Выращивание фотосинтезирующих микроорганизмов на разных доступных дешевых питательных средах (промышленные и с.-х. отходы, стоки, минеральные воды) не требует больших расходов. Однако при этом выход биомассы микробов не всегда удовлетворительный [4].

В последние годы при микробиологическом получении многих биологически активных веществ с успехом используется смешанное культивирование [2, 6, 9]. В литературе имеются данные о совместном выращивании разных видов фототрофных бактерий, фототрофных и гетеротрофных бактерий, однако данные о совместном выращивании микроводорослей и фототрофных бактерий отсутствуют [12, 14].

Цель настоящей работы состояла в подборе культур фототрофных бактерий для совместного культивирования с микроводорослью *Spirulina platensis* для достижения высокого выхода полноценной биомассы.

Материал и методика. В работе использовали чистую культуру *S.platensis* и фототрофных бактерий *Rhodobacter capsulartus* ИНМИА В-6504 и *Ectothiorhodospira sp.*, шт. Ал-1, выделенных из минеральных источников Джермука и содовых солончаков Араратской равнины соответственно [3, 5]. Все перечисленные микроорганизмы депонированы в

Республиканском Центре депонирования микробов (РЦДМ). Культура *S.platensis* получена от проф. Чифери из Италии (Университет Флоренции) и является основным производственным штаммом для производства белково-витаминных концентратов из этой микроводоросли.

В качестве посевного материала использовали 5-6-суточные культуры фототрофных бактерий, выращенные в люминостате в анаэробных условиях на среде Ормеруда [15]. В случае *Ectothiorhodospira sp.*, шт. Ал-1 к среде добавляли бикарбонат в количестве 2,5 г/л. Микроводоросли выращивали в стационарных условиях на среде Заррука [7]. Для смешанного культивирования использовали модифицированную среду Заррука, а также ранее разработанную питательную среду на основе минеральной воды Бжни [4]. Посевной материал состоял из смеси суспензий микроводоросли и фототрофных бактерий, оптические плотности которых перед смешиванием приравнивали к показателю 0,5 на спектрофотометре СФ-26 при длинах волн 540 и 660 нм соответственно. Посевной материал вносили в среду из расчета 5 мл на 100 мл питательной среды. pH среды 9,5-9,8. Совместное культивирование проводили в конических колбах емкостью 250 мл (объем питательной среды - 100 мл) в стационарных условиях в люминостате при освещенности 1500-2000 и температуре 30-32° в течение 15 суток.

Биомассу собирали пропусканием культуральной жидкости через мембранные фильтры с порами 0,17 мкм. Биомассу определяли по сухому весу - высушиванием при 90° до постоянного веса.

О состоянии культур судили по цвету культуральной жидкости, по микроскопии клеток под фазовым контрастом, а также по спектрам поглощения целых клеток культуры, которые снимали на спектрофотометре "Specord" UV-Vis. Содержание белка в биомассе определяли по Лоури [13].

Результаты и обсуждение. Используемая в опытах минеральная вода Бжни по химическому составу относится к углекислым гидрокарбонатно-хлоридно-натриевым. Химический состав воды по формуле Курлова следующий:

$$CO_2 0{,}7 M_{4,7} \frac{HCO_3 73 \cdot Cl 37}{(Na + K)84} T°35°C$$

Дебит воды составляет 2,0 л/сек [1]. Как уже отмечали, на средах, разработанных на основе минеральных вод Армении, в том числе и на Бжни, выход бимассы спирулины невелик [4]. В целях ее повышения нами использовано совместное выращивание спирулины с фототрофными бактериями, с учетом их физиологических особенностей, основных компонентов среды и условий выращивания [6]. Выбор фотосинтезирующих бактерий в основном определяется физиологическими особенностями испытанных культур (табл. 1).

Для оптимизации сред при смешанном культивировании вносили органический источник углерода - малат (0,5 г/л) и дрожжевой экстракт (0,02%). Рост культур изучали как при раздельном, так и совместном выращивании. Сравнительное изучение динамики роста монокультур на контрольных средах и на среде с минеральной водой показало, что все изучаемые культуры лучше растут на контрольных средах, причем у спирулины выход биомассы уступает таковому у фототрофных бактерий (рис. 1).

Однако при совместном выращивании спирулины с фототрофными бактериями картина полностью меняется. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 1. **Основные физиологические особенности *S.platensis* и использованных фототрофных бактерий**

Показатели	Микроорганизмы		
	S.platensis	*Rh.capsulatus*, шт. D-4	*Ectothiorhodospira sp.*, шт. Ал-1
Температура роста, С°	30-32°	28-30°	28-35°
Оптимум pH	9,5-10,0	7,0-8,0	9,0-9,5
Тип питания	Фотоавтотроф	Фотогетеротроф	Фотомиксотроф
Тип фотосинтеза	Оксигенный	Аноксигенный	Аноксигенный
Основные доноры электронов	Вода	Орг.источники углерода	Орг.источники углерода, восстановленные соед. серы
Основные светосвязывающие пигменты	Фикоцианин, аллофикоцинин, b-каротин	Сфероиден, гидроксисфероиден	Спириллоксантин, ликопин

Данные таблицы свидетельствуют о заметном стимулирующем действии фототрофных бактерий на рост *S.platensis*. Влияние фототрофных бактерий заметно при освещении различной интенсивности, однако выход биомассы выше всего при освещении 2000 люкс.

Нами было также изучено влияние содержания отдельных культур указанных микроорганизмов и компонентов среды в изучаемых ассоциациях на рост и развитие *S.platensis*.

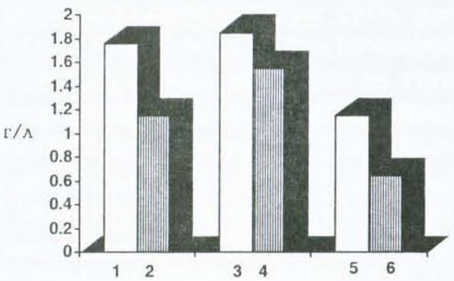

Рис. 1. Рост спирулины и фототрофных бактерий на средах с минеральной водой Бжни:
1- шт. D-4 на ср. Ормеруда;
2 - шт. D-4 на мин. воде;
3 - шт. Ал-2 на модифицированной ср. Ормеруда;
4 - шт. Ал-2 на мин. воде;
5 - *S.platensis* на среде Заррука;
6 - *S.platensis* на мин. воде;

На основании полученных данных можно заключить, что стимулирующее действие фототрофных бактерий на рост спирулины более эффективно при соотношении культур в посевном материале 1:0,5 (табл. 3).

Таблица 2. **Накопление биомассы *S.platensis* в монокультуре и при смешанном культивировании с фототрофными бактериями при освещении разной интенсивности (рост в стационарных условиях)**

Интенсивность освещения, люкс	Биомасса, г/л				
	Монокультура (*S.platensis*)	Смешанная культура (*S.platensis* + шт.D-4)	Прирост биомассы	Смешанная культура (*S.platensis* + шт.Ал 1)	Прирост биомассы
1000	0,39	0,54	0,15	0,59	0,2
1500	0,48	0,69	0,21	0,81	0,33
2000	0,63	0,99	0,36	1,19	0,56
2500	0,6	0,96	0,36	1,16	0,56
3000	0,53	0,64	0,11	0,88	0,35

Таблица 3. **Влияние соотношения *S.platensis* и фототрофных бактерий в смешанной культуре на выход биомассы**

Смешанные культуры	Биомасса, г/л				
	2:1	1:2	1:1	1:0,5	1:0,25
S.platensis + *Rh.capsulatus*, шт.D-4	0,56	0,35	0,78	0,99	0,7
S.platensis + *Ectothiorhodospira sp.*, шт. Ал-1	0,59	0,47	1,05	1,19	0,95

Микроскопические исследования смешанных популяций испытанных культур показали, что при таком соотношении культур-компонентов в конце роста в поле зрения микроскопа обнаруживаются лишь единичные клетки фототрофных бактерий. Это подтверждается также и ярко-зеленым цветом биомассы. Сравнительно больше клеток фототрофов можно наблюдать в случае, когда партнером спирулины является *Ectothiorhodospira sp.*, шт. Ал-1. Это, по-видимому, объясняется алкалофильностью шт. Ал-1. Морфологические наблюдения показали, что присутствие фототрофов не влияет на состояние клеток спирулины. В поле зрения наряду с прямыми клетками спирулины попадает множество клеток, закрученных в спираль.

Сравнительное изучение белка в биомассе монокультуры и смешанной культуры показало, что по количеству белка они почти идентичны (табл. 4).

Таблица 4. **Выход биомассы и содержание белка при раздельном и совместном выращивании спирулины с фототрофными бактериями**

Культуры	Биомасса, г/л	Прирост биомассы, %	Белок, % на сухой вес
S.platensis	0,63	-	42,45
S.platensis + шт. D-4	0,99	57	42,45
S.platensis + шт. Ал-1	1,19	88,8	42,85

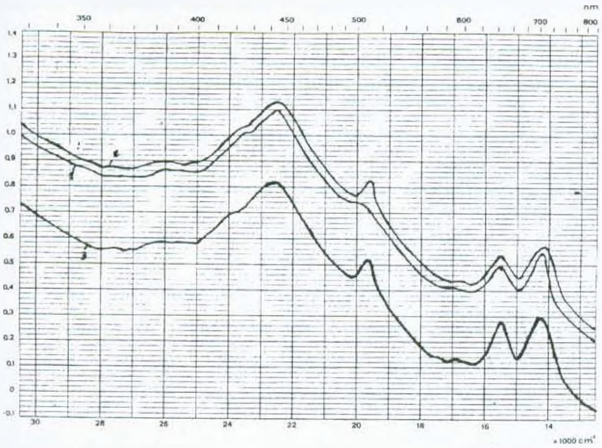

Рис. 2. Спектры поглощения целых клеток монокультуры и смешанных культур:
1 - *S.platensis*; 2 - *S.platensis* + шт. D-4; 3 - *S.platensis* + шт. Ал-1

Сравнение спектров поглощения клеток монокультур и смешанных популяций выявляет количественные различия в пигментном составе. Спектр поглощения смешанной культуры отличается от такового у монокультуры, где каротиноидные пигменты представлены в виде плеча около 500 нм. К концу культивации смешанной культуры проявляется заметный

пик в зоне поглощения каротиноидов. С другой стороны, партнерство спирулины со шт. Ал-1 приводит к значительному увеличению пика в зоне 623 нм, что соответствует фикоцианину. Со штаммом D-4 это явление выражено достаточно слабо (рис. 2).

Таким образом, в процессе совместного культивирования имеет место количественное и качественное изменение биомассы *S.platensis* по сравнению с ее монокультурой. Учитывая нетоксичность фототрофных бактерий [12], можно полагать, что их использование в совместной популяции со спирулиной может обеспечить как интенсификацию ее роста, так и определенное усиление биосинтеза продуцируемых этой микроводорослью многих ценных биологически активных веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Агаджанян Г.И., Топчян Ж.С.* Курортная зона Арзакан-Агверан, Ереван, 9-13, 1973.
2. *Ландау Н.С., Милованова И.И., Егоров Н.С.* Микробиология, *54*, 4, 529-532,1985.
3. *Паронян А.Х.* Биолог. журн. Армении, *53*, 1-2, 41-45, 2001.
4. *Паронян А.Х., Африкян Э.К.* Биолог. журн. Армении, *52*, 2, 117-124, 1999.
5. *Паронян А.Х., Габаева Т.А., Малатян М.Н.* Биолог. журн. Армении, 35, 10, 803-809, 1982.
6. *Печуркин Н.С.* Смешанные проточные культуры микроорганизмов. Новосибирск, 1981.
7. *Пиневич В.В., Верзилин Н.Н., Михайлов А.А.* Физиология растений, *15*, 3, 1037-1046, 1970.
8. *Элиазян А.А., Паронян А.Х., Африкян Э.К.* Биотехнология, 6, 51-54, 1997.
9. *Яковлева Е.П.* Прикл. биохимия и микробиология, *19*, 3, 330-346, 1983.
10. *Balloni W., Filip C., Florenzano G.* Algae Biomass. Elsevier. North-Holland Biomedical Press, 217-227, 1980.
11. *Buiton G.* Carotenoides, chemistry and biology. Plenum Press, 168-186, 1990.
12. *Kobayashi M., Kurata Sh.* Process Biochemistry, *13*, 2, 27-29, 1978.
13. *Lowry O.H., Rosebrough H.J., Farr A.L. et al.* J. Biol. Chemistry, *193*, 1, 265-276, 1951.
14. *Noparatnaraporn, N. Traculnaleumsali, S., Silveria, R. et al.* Ferment. Technology, *65*, 1, 11-16, 1987.
15. *Ormerod I.J., Ormerod S.F., Gest H.* Arch. Biochem. and Biophys., *94*, 2, 449-463, 1961.

Поступила 02.VII.2001