

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 579.222
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-4-426-436>

Поступила в редакцию 13.06.2018
Received 13.06.2018

Е. В. Вязов, Е. Е. Мананкина, Е. А. Филипчик, Р. Г. Гончарик, Н. В. Шалыго

Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПОВТОРНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ЗАРРУКА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СПИРУЛИНЫ (*SPIRULINA PLATENSIS*)

Аннотация. Изучена эффективность повторного использования модифицированной среды Заррука для культивирования спирулины (*Spirulina platensis* IBCE S-2). Показано, что продуктивность, содержание общего белка и каротиноидов, а также активность фотосистемы 2, определенная по параметрам индукции флуоресценции хлорофилла, не снижаются при однократном повторном использовании модифицированной среды Заррука, в которой 16,8 г/л NaHCO_3 заменено на 8,4 г/л NaHCO_3 и 0,1 г/л NaOH , по сравнению с контролем – свежеприготовленной средой. Установлено, что для сохранения содержания хлорофилла и фикоцианина в биомассе на уровне контроля следует применять смесь свежеприготовленной и повторно используемой модифицированной среды Заррука в соотношении 1:1 по объему.

Ключевые слова: *Spirulina platensis*, среда Заррука, пигменты, продуктивность, фотосистема 2

Для цитирования: Эффективность повторного использования модифицированной питательной среды Заррука для культивирования спирулины (*Spirulina platensis*) / Е. В. Вязов [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2018. – Т. 63, № 4. – С. 426–436. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-4-426-436>

Y. V. Viazau, E. E. Manankina, E. A. Filipchik, R. G. Goncharik, N. V. Shalygo

Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

EFFECTIVENESS OF REPEATED USAGE OF THE MODIFIED ZARROUK CULTURE MEDIUM FOR CULTIVATION OF *SPIRULINA PLATENSIS*

Abstract. *Spirulina (Arthrospira) platensis* biomass has a wide range of applications in several industries. One of the key issues for its production is the reduction of the culture medium cost. Here we have shown the possibility of a single recycling (repeated usage) of the modified Zarrouk nutrient medium (MZM; which contains 8.4 g/l of NaHCO_3 and 0.1 g/l of NaOH instead of 16.8 g/l of NaHCO_3) for spirulina cultivation without altering culture productivity, photosynthetic pigments and protein contents in its biomass given that technological approach consisting in application of a mixture of a freshly prepared and once recycled modified Zarrouk medium in a ratio of 1:1 by volume is used. The obtained results can be applied for further reduction of costs of spirulina biomass production compared to methods described in previous studies.

Keywords: *Spirulina platensis*, Zarrouk medium, pigments, productivity, photosystem 2

For citation: Viazau Y. V., Manankina E. E., Filipchik E. A., Goncharik R. G., Shalygo N. V. Effectiveness of repeated usage of modified Zarrouk culture medium for cultivation of *Spirulina platensis*. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2018, vol. 63, no. 4, pp. 426–436 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2018-63-4-426-436>

Введение. Спирулина (*Spirulina platensis*) представляет собой нитевидную сине-зеленую водоросль (цианобактерию). Ее клетки образуют трихомы длиной в несколько сотен микрометров, которые при выращивании в естественных условиях закручены в спирали. Являясь прокариотом, спирулина не имеет оформленного ядра и хлоропластов, однако содержит прилегающие к клеточной мембране тилакоиды, не образующие у нее, в отличие от высших растений, гран. Пигмент-белковые комплексы фотосинтетического аппарата спирулины, во многом схожего с растительным фотосинтетическим аппаратом, включают хлорофилл *a* (хлорофилл *b* отсутствует), ряд каротиноидов, фикоцианин и аллофикоцианин. Каротиноиды спирулины представлены широким спектром молекул, в том числе такими уникальными для цианобактерий, как миксоксантофилл, эхиненон [1, 2]. Фикоцианин, основной фикобилин спирулины, локализован исключительно в фикобилисомах, служащих периферийными светособирающими антеннами для фотосистем (ФС) цианобактерии [3]. Биомасса спирулины активно используется в качестве пищевой

и кормовой добавки, в производстве косметики, а также в фармакологии и помимо пигментов содержит белок высокого качества, в состав которого входят незаменимые аминокислоты, а также липиды, ненасыщенные жирные кислоты (в том числе ω -3), витамины, антиоксиданты и другие соединения, обладающие высокой биологической активностью [4–6]. Высокое содержание хлорофилла *a* при отсутствии хлорофилла *b* делает биомассу спирулины наиболее перспективным источником феофитина *a*, используемого в фармакологической промышленности для получения фотосенсибилизатора хлорина e_6 и его производных, которые применяются в фотодинамической терапии онкологических заболеваний и в офтальмологии [7].

Одним из наиболее актуальных вопросов для биотехнологического производства биомассы спирулины является снижение стоимости питательной среды. Как правило, спирулину выращивают в среде Заррука, содержащей большое количество (16,8 г/л) NaHCO_3 [8]. Исследователи разных стран предпринимают попытки модифицировать среду Заррука с целью ее удешевления, а также ведут работы по определению возможности повторного использования среды культивирования [9–11]. При этом зачастую для эффективного выращивания спирулины в новых условиях требуется усложнение технологического процесса, а получаемая биомасса не всегда имеет оптимальный биохимический состав.

Проведенные нами опыты по определению эффективности повторного использования стандартной питательной среды Заррука для выращивания спирулины показали, что однократное повторное использование среды не приводит к снижению продуктивности культуры, в отличие от двух-, трех- и четырехкратного повторного использования. Содержание хлорофилла *a* и общего белка при однократном повторном использовании среды Заррука не отличалось от контроля – свежеприготовленной среды [12]. Ранее нами было показано, что частичная замена NaHCO_3 на NaOH в среде Заррука не влияет на количество хлорофилла *a*. Установлено, что оптимальной с точки зрения соотношения величины затрат на реактивы и качества получаемой биомассы является модифицированная среда Заррука, содержащая 8,4 г/л NaHCO_3 и 0,1 г/л NaOH [13]. Опыты по эффективности культивирования спирулины при повторном использовании такой модифицированной среды не проводились.

Цель исследования – изучить влияние повторного использования модифицированной среды Заррука для культивирования спирулины на ее продуктивность, содержание пигментов, активность фотосистемы 2 и морфометрические показатели.

Объект и методы исследования. В опытах использовали спирулину (*Spirulina platensis* IBCE S-2) из альгологической коллекции Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси. Суспензию спирулины выращивали в стеклянных колбах в течение 7 сут при температуре 23 ± 2 °С с фотопериодом 14 ч на модифицированной среде Заррука (МСЗ), содержащей 8,4 г/л NaHCO_3 и 0,1 г/л NaOH и в остальном полностью идентичной стандартной среде Заррука [8]. Среду для повторного использования получали следующим образом: спирулину выращивали в МСЗ (конечная оптическая плотность суспензии составляла в среднем около 1,0) в течение 7 сут, затем трихомы спирулины отделяли от среды культивирования путем фильтрации. Полученный фильтрат применяли в дальнейших опытах в качестве повторно используемой среды (ИС). В варианте «100 % ИС» спирулину выращивали в повторно используемой МСЗ. В варианте «50 % ИС» спирулину выращивали в смеси свежеприготовленной и повторно используемой МСЗ в соотношении 1:1 по объему. В качестве контроля использовали спирулину, выращенную на свежеприготовленной МСЗ. Для освещения применяли белые люминесцентные лампы Philips TD-36/765, освещенность на поверхности суспензии составляла 4500 лк. Все пробы продували (барботировали) атмосферным воздухом в течение фотопериода, используя воздушные компрессоры для аквариумов Atman AP-35C (Китай) и силиконовые трубки.

Продуктивность спирулины определяли по накоплению сухой биомассы в процессе ее роста. Для этого измеряли величину оптической плотности суспензии при 560 нм на спектрофотометре РВ 2201 (SOLAR, Беларусь). Сухую массу рассчитывали, принимая во внимание данные о том, что оптическая плотность культуры спирулины при 560 нм, равная 1, эквивалентна содержанию 699 мг сухой биомассы в 1 л суспензии [14].

Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов определяли спектрофотометрическим методом. Для этого в каждом варианте отбирали по 4 мл суспензии спирулины и, предварительно добавив 40 мкл насыщенного раствора CaCl_2 , центрифугировали в течение 10 мин при 13 000 г, используя центрифугу с охлаждением (Sigma, Германия). Полученный после центрифугирования осадок промывали путем ресуспендирования в 4 мл дистиллированной воды с последующим центрифугированием при 17 000 г в течение 10 мин, переносили в фарфоровую ступку и растирали в 2 мл 100 %-ного ацетона. Далее гомогенат количественно переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали при 17 000 г 10 мин. Супернатант сливали в мерные стеклянные пробирки, а осадок вновь ресуспендировали в ацетоне и центрифугировали при тех же условиях. Процедуру повторяли до получения бесцветного супернатанта. Супернатанты объединяли, после чего измеряли оптическую плотность при 452,5; 663 и 720 нм на спектрофотометре Uvikon-931 (Kontron Instruments, Германия).

Содержание хлорофилла *a* и каротиноидов в экстрактах рассчитывали с помощью модифицированных формул Шлыка для 100 %-ного ацетона [15].

Концентрацию фикоцианина в биомассе спирулины определяли согласно методике, описанной в работе [15]. Для этого осажденную путем центрифугирования и промытую дистиллированной водой биомассу спирулины растирали в ступке в K^- , Na -фосфатном буфере (50 мМ, рН 7,0). Полученный гомогенат выдерживали в холодильнике в течение 10 ч, затем центрифугировали в течение 5 мин при 13 000 г. Оптическую плотность супернатанта определяли на приборе Uvikon 931 фирмы Kontron (Германия) при 615, 652 и 720 нм и рассчитывали содержание фикоцианина в полученных экстрактах по формуле

$$C_{\text{фик}} = (\text{ОП}_{615} - \text{ОП}_{720} - 0,474(\text{ОП}_{652} - \text{ОП}_{720}))/5,34,$$

где $C_{\text{фик}}$ – содержание фикоцианина, мг/мл экстракта; ОП – оптическая плотность экстракта при длине волны 615, 652 и 720 нм соответственно.

Активность ФС2 определяли с помощью метода индукции флуоресценции хлорофилла [16] в пробах суспензии спирулины, адаптированных в течение 30 мин к темноте. Для этого был использован РАМ-флуориметр Dual-РАМ-100 (Heinz Walz, Германия), позволяющий возбуждать фоновую флуоресценцию хлорофилла F_0 измерительным светом низкой интенсивности ($0,092 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, 460 нм), модулированным с частотой 20 Гц. При включении актиничного света ($126 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, 635 нм) интенсивность флуоресценции достигала максимальной величины F_m , а затем снижалась за счет дезактивации по фотохимическому и диссипационному пути. Применение вспышки насыщающего света ($10\,000 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$, 635 нм) на фоне действия актиничного света приводило к увеличению интенсивности флуоресценции с величины F до F'_m . После вспышки насыщающего света выключали актиничный свет и включали источник дальнего красного света, возбуждающий только первую ФС. При этом пул переносчиков электронов быстро и полностью окислялся. Величина флуоресценции достигала значения F'_0 . По полученным значениям F_0 , F'_0 , F_m , F'_m и F рассчитывали величину потенциального (F_v/F_m) и эффективного ($\Phi_{\text{ФС2}}$) квантового выхода фотохимических реакций ФС2, показатель фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла qP , показатели нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла qN и NPQ , показатель доли открытых реакционных центров qL и квантовые выходы нерегулируемого (Φ_{NO}) и регулируемого (Φ_{NPQ}) нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла по следующим формулам [16, 17]:

$$\begin{aligned} F_v/F_m &= (F_m - F_0)/F_m, \\ \Phi_{\text{ФС2}} &= (F'_m - F)/F'_m, \\ qP &= (F'_m - F)/(F'_m - F_0'), \\ qN &= (F_m - F'_m)/(F_m - F_0'), \\ NPQ &= (F'_m - F'_m)/F'_m, \\ qL &= (F'_m - F)/(F'_m - F_0') F'_0' F, \\ \Phi_{\text{NO}} &= 1/(NPQ + 1 + qL (F'_m/F_0' - 1)), \\ \Phi_{\text{NPQ}} &= 1 - \Phi_{\text{ФС2}} - \Phi_{\text{NO}}. \end{aligned}$$

Для расчета эффективности функционирования электрон-транспортной цепи или скорости транспорта электронов ETR использовали следующую формулу:

$$ETR = \varphi_{\text{ФС2}} \cdot PAR \cdot \alpha \cdot d,$$

где PAR – интенсивность фотосинтетически активной радиации ($126 \text{ мкмоль квантов} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$); α – часть поглощенного света; d – часть фотосинтетически активной радиации, приходящейся на ФС2 [16].

Для определения белка сырую биомассу спирулины (100 мг) заливали 0,2 мл 1 М гидроксида натрия и экстрагировали белок в течение 10 мин, используя термошейкер Thermomixer Comfort (Eppendorf, Германия) при $80 \text{ }^\circ\text{C}$ и 500 об/мин. Экстракт разбавляли 1,8 мл дистиллированной воды и центрифугировали 15 мин при 15 000 g. Экстракцию, разбавление и центрифугирование повторяли еще 2 раза. Экстракты объединяли, отбирали 10 мкл для определения белка по методу Бредфорда [18]. Оптическую плотность при 595 нм измеряли на приборе Uvikon 931 фирмы Kontron (Германия). Количество белка определяли с помощью калибровочной кривой, построенной с использованием коммерческого бычьего сывороточного альбумина (Sigma, США).

Содержание пигментов и белка в конечном итоге пересчитывали на 1 г сухой массы.

Длину трихомов спирулины регистрировали с помощью светового микроскопа МБИ-6 (Ленинградское оптико-механическое объединение, СССР) и окуляра с микрометром при 400-кратном увеличении.

В работе приведены средние арифметические значения не менее чем трех независимых опытов и их стандартные ошибки среднего.

Результаты и их обсуждение. Известно, что интенсивность накопления сухой массы в суспензии водорослей характеризует их продуктивность. Проведенные нами эксперименты показали, что содержание сухой массы спирулины (в 1 мл суспензии) при применении повторно используемой среды МСЗ («50 % ИС» и «100 % ИС») достоверно не отличалось от контроля в течение всего времени выращивания (рис. 1). Так, на 7-е сутки культивирования сухая масса была выше контроля (свежая МСЗ) на 3 % в варианте «50 % ИС» и на 4 % в варианте «100 % ИС». Это свидетельствует о том, что в таких условиях культура спирулины не испытывает недостатка ключевых питательных веществ в среде культивирования, а накопившиеся в культуральной среде метаболиты в целом не оказывают стрессового воздействия на цианобактерию.

В то же время в варианте «100 % ИС» после 7 сут выращивания выявлено снижение содержания хлорофилла a и фикоцианина на 27 и 26 % соответственно по сравнению с контролем (табл. 1;

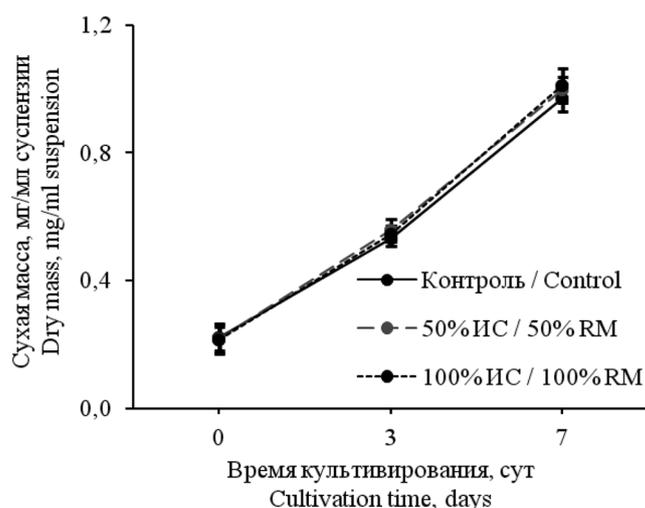


Рис. 1. Динамика накопления сухой массы в суспензии спирулины при выращивании в повторно используемой МСЗ. ИС – повторно используемая МСЗ. Варианты приведены в описании методики

Fig. 1. Dynamics of the dry mass accumulation in suspension of spirulina during cultivation in recycled MZM. RM – once recycled MZM. For variants, see the description of the methods

для большей наглядности часть данных представлена также в виде диаграммы на рис. 2). В варианте «50 % ИС» не обнаружено достоверных отличий от контроля по содержанию как хлорофилла *a*, так и фикоцианина (см. табл. 1). Более низкое содержание хлорофилла *a* и фикоцианина при выращивании в 100 %-ной повторно используемой МСЗ может быть вызвано снижением в ней количества ионов магния и железа, необходимых для биосинтеза этих пигментов [19–22]. Активное потребление ионов магния и железа при культивировании *Spirulina platensis* показано в работе [23]. Известно, что в метаболическом пути биосинтеза тетрапирролов как у растений, так и у цианобактерий магний и железо играют ключевую роль. На этапе, следующем за образованием протопорфирина IX, включение ионов Mg^{2+} в конечном итоге приводит к образованию хлорофиллов, а включение ионов Fe^{2+} – к образованию гема и билиновых пигментов, в том числе фикоцианобилина, входящего в пигмент-белковый комплекс фикоцианина [19–22]. Учитывая то, что в состав МСЗ, как и стандартной среды Заррука, входит существенно большее количество магния, чем железа (оба в виде сульфатов), а также то, что содержание железа, в отличие от магния, регулирует синтез и активность ряда ферментов биосинтеза тетрапирролов на этапах до образования протопорфирина IX (т. е. на общем участке для хлорофиллов и фикоцианов) [19, 22], можно предположить, что негативный эффект повторного использования МСЗ на накопление хлорофилла и фикоцианина связан именно с недостатком ионов Fe^{2+} .

В отличие от хлорофилла и фикоцианина, содержание каротиноидов в вариантах «100 % ИС» и «50 % ИС» достоверно не отличалось от контроля (см. табл. 1). Это может быть обусловлено тем, что каротиноиды синтезируются по совершенно иному пути [24, 25].

Т а б л и ц а 1. Содержание пигментов в биомассе спирулины при повторном использовании МСЗ, мкг/г сухой массы

Table 1. Pigment contents in the biomass of spirulina cultivated in reused MZM, mkg/g dry mass

Вариант	0-е сутки	3-и сутки	7-е сутки
Хлорофилл <i>a</i>			
Контроль	5,72 ± 0,40	5,31 ± 0,59	8,55 ± 0,57
50 % ИС	6,28 ± 0,78	5,34 ± 0,44	7,99 ± 0,47
100 % ИС	5,87 ± 0,50	5,24 ± 0,65	6,28 ± 0,87
Фикоцианин			
Контроль	40,13 ± 9,41	39,30 ± 12,45	69,97 ± 7,42
50 % ИС	49,22 ± 10,62	45,40 ± 13,00	66,30 ± 6,37
100 % ИС	44,66 ± 8,02	42,25 ± 11,58	50,52 ± 7,47
Каротиноиды			
Контроль	1,38 ± 0,09	1,36 ± 0,17	1,39 ± 0,13
50 % ИС	1,50 ± 0,21	1,33 ± 0,15	1,32 ± 0,10
100 % ИС	1,35 ± 0,23	1,48 ± 0,11	1,50 ± 0,25

Для изучения эффективности функционирования фотосинтетического аппарата спирулины проведен анализ параметров индукции флуоресценции хлорофилла ФС2. Ни один из определенных параметров – $\Phi_{\text{ФС2}}$, F_v/F_m , Φ_{NO} , Φ_{NPQ} , NPQ , qP , qN , qL и ETR (см. описание методики) – в опытных вариантах достоверно не отличался от контроля после 7 сут культивирования спирулины (рис. 3). Другими словами, повторное использование МСЗ не сказывается на работе ФС2 цианобактерии, в частности на эффективности электронного транспорта и величине нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла. Несмотря на относительно небольшое количество комплексов ФС2 на фотосинтетических мембранах спирулины по сравнению с комплексами ФС1 [3], это позволяет предположить нормальное функционирование фотосинтетического аппарата цианобактерии в целом, так как в противном случае электронный транспорт внутри ФС2 также был бы замедлен.

Отдельного рассмотрения заслуживает динамика ряда параметров флуоресценции хлорофилла ФС2 во времени (табл. 2). Так, потенциальный (F_v/F_m) и эффективный ($\Phi_{\text{ФС2}}$) квантовый выход фотохимии ФС2, показатель фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла qP , а также показатели доли открытых реакционных центров qL и эффективности электронного

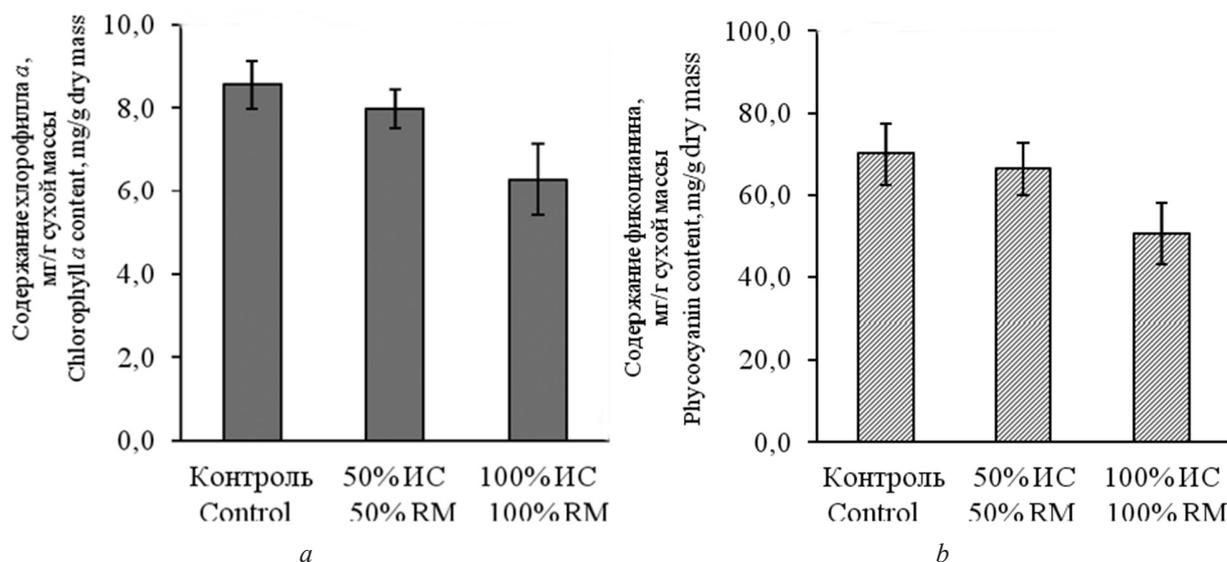


Рис. 2. Содержание хлорофилла *a* (а) и фикоцианина (b) в суспензии спирулины на 7-е сутки выращивания в повторно используемой МЗЗ

Fig. 2. Contents of chlorophyll *a* (a) and phycocyanin (b) in the suspension of spirulina on the 7th day of cultivation in reused MZM

транспорта *ETR* увеличивались по мере накопления биомассы. Три из четырех параметров, связанных с нефотохимическим тушением флуоресценции хлорофилла (ϕ_{NPQ} , NPQ , qN), также в конечном итоге имели значения выше начальных. При этом квантовый выход нерегулируемого нефотохимического тушения флуоресценции ϕ_{NO} , описывающий не адаптивное, а потенциально деструктивное тушение флуоресценции, в первую очередь связанное с образованием триплетной формы хлорофилла и последующей генерацией синглетного кислорода [26], снижался в течение 7 сут эксперимента. Такая динамика на фоне достаточно высокой продуктивности свидетельствует об успешной адаптации культуры к условиям выращивания при применении как свежей, так и повторно используемой МЗЗ.

Из представленных выше данных следует, что снижение содержания хлорофилла *a* и фикоцианина в варианте «100 % ИС» не связано с регуляцией фотосинтеза или с серьезным нарушением метаболизма спирулины вследствие недостатка ключевых питательных веществ. Это подтверждается не только значениями продуктивности, содержания каротиноидов и параметров индукции флуоресценции хлорофилла, но и, что также важно, содержанием общего белка в биомассе

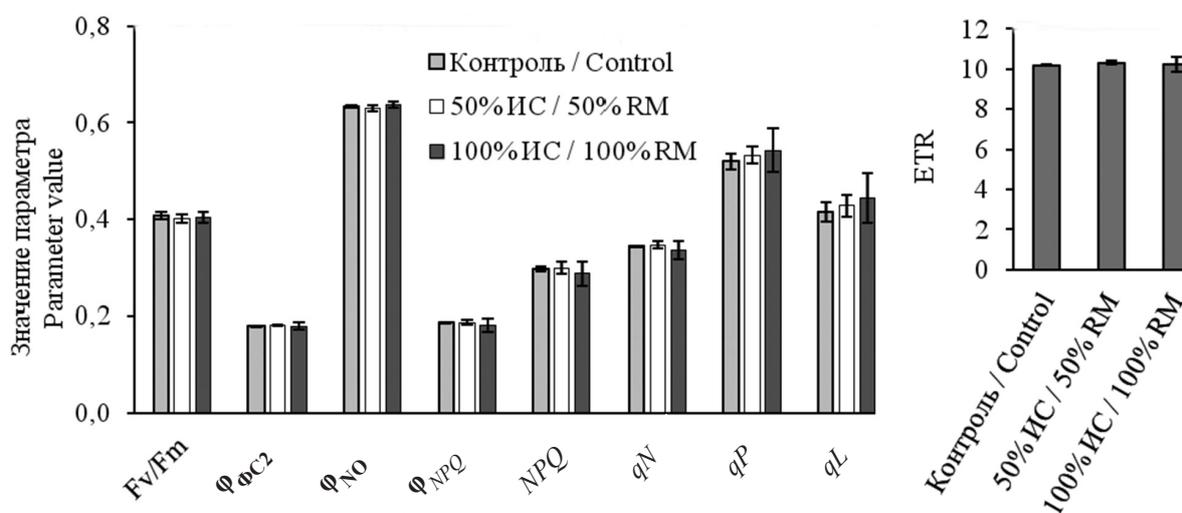


Рис. 3. Параметры индукции флуоресценции хлорофилла ФС2 в суспензии спирулины после 7 сут выращивания
 Fig. 3. Parameters of photosystem 2 chlorophyll fluorescence induction in suspension of spirulina after 7 days of cultivation

цианобактерии, которое оставалось на уровне контроля спустя 7 сут культивирования как в варианте «50 % ИС», так и в варианте «100 % ИС» (рис. 4).

Т а б л и ц а 2. Параметры индукции флуоресценции хлорофилла ФС2 в суспензии спирулины
Table 2. Parameters of photosystem 2 chlorophyll fluorescence induction in suspension of spirulina

Параметр	Контроль	50 % ИС	100 % ИС
0-е сутки			
F_v/F_m	0,309 ± 0,020	0,311 ± 0,015	0,303 ± 0,016
$\Phi_{\text{ФС2}}$	0,082 ± 0,005	0,083 ± 0,001	0,090 ± 0,013
Φ_{NO}	0,751 ± 0,030	0,741 ± 0,016	0,740 ± 0,017
Φ_{NPQ}	0,167 ± 0,025	0,177 ± 0,017	0,170 ± 0,004
NPQ	0,225 ± 0,043	0,239 ± 0,028	0,231 ± 0,011
qN	0,294 ± 0,040	0,309 ± 0,025	0,302 ± 0,008
qP	0,333 ± 0,003	0,331 ± 0,015	0,365 ± 0,027
qL	0,274 ± 0,007	0,271 ± 0,016	0,303 ± 0,303
ETR	4,64 ± 0,26	4,67 ± 0,03	5,13 ± 0,72
3-и сутки			
F_v/F_m	0,366 ± 0,012	0,370 ± 0,008	0,371 ± 0,007
$\Phi_{\text{ФС2}}$	0,135 ± 0,005	0,153 ± 0,002	0,146 ± 0,002
Φ_{NO}	0,718 ± 0,026	0,697 ± 0,015	0,692 ± 0,016
Φ_{NPQ}	0,146 ± 0,021	0,150 ± 0,017	0,162 ± 0,018
NPQ	0,206 ± 0,036	0,217 ± 0,029	0,235 ± 0,031
qN	0,266 ± 0,038	0,277 ± 0,029	0,294 ± 0,03
qP	0,443 ± 0,017	0,490 ± 0,002	0,462 ± 0,002
qL	0,356 ± 0,016	0,398 ± 0,001	0,371 ± 0,001
ETR	7,67 ± 0,30	8,65 ± 0,13	8,28 ± 0,09
7-е сутки			
F_v/F_m	0,406 ± 0,007	0,401 ± 0,010	0,403 ± 0,011
$\Phi_{\text{ФС2}}$	0,180 ± 0,001	0,182 ± 0,002	0,180 ± 0,007
Φ_{NO}	0,633 ± 0,003	0,630 ± 0,007	0,638 ± 0,007
Φ_{NPQ}	0,187 ± 0,002	0,188 ± 0,005	0,182 ± 0,014
NPQ	0,296 ± 0,005	0,299 ± 0,012	0,287 ± 0,024
qN	0,343 ± 0,002	0,346 ± 0,007	0,336 ± 0,019
qP	0,519 ± 0,016	0,532 ± 0,018	0,543 ± 0,045
qL	0,414 ± 0,020	0,428 ± 0,023	0,443 ± 0,051
ETR	10,18 ± 0,04	10,32 ± 0,12	10,23 ± 0,36

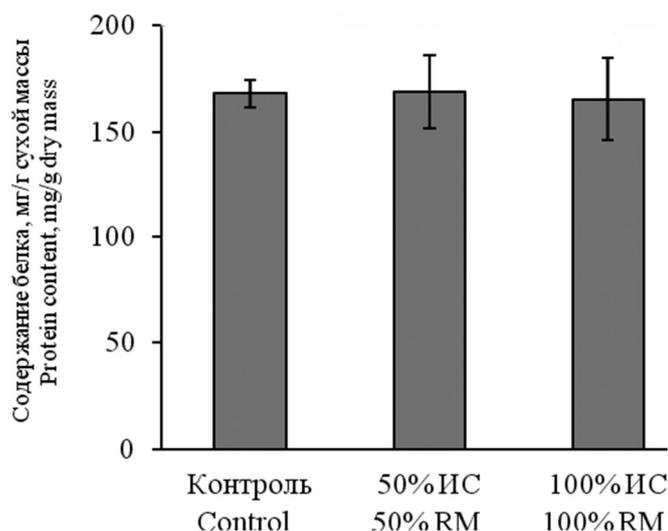


Рис. 4. Содержание общего белка в суспензии спирулины после 7 сут выращивания на повторно используемой МСЗ
Fig. 4. Total protein content in the suspension of spirulina after 7 days of cultivation in reused MZM

Следует отметить, что и средняя длина трихомов (нитей) спирулины также заметно не отличалась от контроля при повторном использовании МСЗ (см. табл. 3). Трихомы данной цианобактерии, как правило, распадаются на более мелкие фрагменты при действии различных стрессоров, а также в ходе старения культуры. Отсутствие различий по средней длине трихомов в наших опытах не только подтверждает предположение о том, что культивирование в повторно используемой МСЗ не вызывает стресса у спирулины, но имеет также практическое значение. Дело в том, что в случае фрагментирования трихомов спирулины, даже при высоком содержании промышленно важных соединений, использование ее биомассы существенно осложнено в силу затруднения фильтрации трихомов из суспензии (нужно применять более мелкие фильтры, время фильтрации увеличивается, в случае не очень чистой культуры велик риск отфильтровать другие микроорганизмы вместе с трихомами спирулины). По-видимому, небольшое увеличение длины трихомов по мере выращивания во всех вариантах, как и описанная выше динамика параметров индукции флуоресценции хлорофилла, указывает на успешную адаптацию культуры к условиям выращивания.

Т а б л и ц а 3. Средняя длина трихомов *Spirulina platensis* при выращивании на повторно используемой МСЗ, мкм

T a b l e 3. The average length of *Spirulina platensis* trichomes during growth in reused MZM, μm

Вариант опыта	0-е сутки	3-и сутки	7-е сутки
Контроль	541 ± 31	558 ± 13	639 ± 16
50 % ИС		578 ± 63	615 ± 33
100 % ИС		558 ± 66	687 ± 38

Заключение. Таким образом, культивирование сине-зеленой водоросли (цианобактерии) спирулины (*Spirulina platensis* IBCE S-2) в повторно используемой МСЗ, в которой 16,8 г/л NaHCO_3 заменено на 8,4 г/л NaHCO_3 и 0,1 г/л NaOH , не приводит к снижению продуктивности цианобактерии, содержания общего белка и каротиноидов, а также активности ФС2 по сравнению с контролем – свежеприготовленной МСЗ. Динамика изменения параметров индукции флуоресценции хлорофилла ФС2 и длины трихомов спирулины в течение 7 сут эксперимента на фоне достаточно высокой продуктивности свидетельствует об успешной адаптации культуры сине-зеленой водоросли к условиям выращивания в повторно используемой МСЗ. Учитывая снижение затрат на приготовление питательной среды по сравнению с применением только свежей стандартной среды Заррука или свежей МСЗ, очевидна эффективность такого подхода к оптимизации процесса выращивания спирулины с целью получения ее биомассы. Однако при выращивании спирулины в повторно используемой МСЗ наблюдается снижение в ее биомассе количества хлорофилла *a* и фикоцианина на 26–27 % по сравнению с контролем. Чтобы этого избежать, следует применять смесь свежеприготовленной и повторно используемой МСЗ в соотношении 1:1 по объему. Отмеченное выше снижение содержания хлорофилла *a* и фикоцианина может быть обусловлено недостатком в повторно используемой МСЗ ионов Fe^{2+} , играющих ключевую роль в биосинтезе тетрапирролов. В дальнейшем нами планируется проведение серии опытов с повторным использованием для культивирования спирулины МСЗ, в которую будут вводиться катионы Fe^{2+} .

Благодарности. Работа финансирована в рамках Государственной программы Республики Беларусь «Наукоемкие технологии и техника» (мероприятие 33, 2016–2020 гг.).

Acknowledgements. This work was supported by the State Program of the Republic of Belarus “Science-intensive technologies and equipment”, grant 33 (2016–2020).

Список использованных источников

1. Carotenoid biosynthesis in cyanobacteria: structural and evolutionary scenarios based on comparative genomics / C. Liang [et al.] // Int. J. Biol. Sci. – 2006. – Vol. 2, N 4. – P. 197–207. <https://doi.org/10.7150/ijbs.2.197>
2. Olaizola, M. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis* / M. Olaizola, E. O. Duerr // J. Appl. Phycol. – 1990. – Vol. 2, N 2. – P. 97–104. <https://doi.org/10.1007/bf00023370>

3. Interaction of phycobilisomes with photosystem II dimers and photosystem I monomers and trimers in the cyanobacterium *Spirulina platensis* / M. G. Rakhimberdieva [et al.] // *Biochemistry*. – 2001. – Vol. 40, N 51. – P. 15780–15788. <https://doi.org/10.1021/bi010009t>
4. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina / A. Belay [et al.] // *J. Appl. Phycol.* – 1993. – Vol. 5, N 2. – P. 235–241. <https://doi.org/10.1007/bf00004024>
5. Henrikson, R. Earth food spirulina: how this remarkable blue-green algae can transform your health and our planet / R. Henrikson. – California : Ronore Enterprises, 1989. – 174 p.
6. Santillan, C. Mass production of Spirulina / C. Santillan // *New trends in research and utilization of solar energy through biological systems* / ed. : H. Mislin, R. Bachofen. – Basel, 1982. – P. 46–49.
7. Фотолон – современный фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии: обзор результатов фармацевтических, фармакологических и клинических исследований / Т. В. Трухачева [и др.]. – Минск : Парадокс, 2013. – 103 с.
8. 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* : Ph. D. thesis / C. Zarrouk. – Paris, 1966. – 138 p.
9. Pumas, P. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using low cost medium supplemented with lac wastewater / P. Pumas, C. Pumas // *Chiang Mai J. Sci.* – 2016. – Vol. 43, N 5. – P. 1037–1047.
10. Бородина, А. В. Способ культивирования *Spirulina (Arthrospira) platensis* / А. В. Бородина, И. Н. Гудвилович // *Экология моря*. – 2005. – Вып. 70. – С. 20–23.
11. Influence of culture medium recycling on the performance of *Arthrospira platensis* cultures / O. Depraetere [et al.] // *Algal Res.* – 2015. – Vol. 10. – P. 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.014>
12. Эффективность повторного использования среды Заррука при культивировании спироулины / Н. В. Шалыго [и др.] // *Биотехнология: достижения и перспективы развития* : сб. материалов II междунар. науч.-практ. конф., г. Пинск, 7–8 дек. 2017 г. / Полес. гос. ун-т ; редкол. : К. К. Шебеко (гл. ред.) [и др.]. – Пинск, 2017. – С. 115–117.
13. Продуктивность и пигментный комплекс сине-зеленой водоросли *Spirulina platensis* при частичной замене бикарбоната натрия на гидроксид натрия в среде культивирования / Е. В. Вязов [и др.] // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук*. – 2017. – № 4. – С. 7–12.
14. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the growth and photosynthesis of *Spirulina platensis* / K. Sasaki [et al.] // *J. Fermentation and Bioengineering*. – 1995. – Vol. 79, N 5. – P. 453–457. [https://doi.org/10.1016/0922-338x\(95\)91261-3](https://doi.org/10.1016/0922-338x(95)91261-3)
15. Влияние чередования световых и темновых периодов на продуктивность *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Nordst.) Geitler / С. С. Мельников [и др.] // *Альгология*. – 2012. – Т. 22, № 2. – С. 121–130.
16. A State of PSI and PSII photochemistry of sunflower yellow-green plastome mutant / M. S. Makarenko [et al.] // *OJBS*. – 2016. – Vol. 16, N 4. – P. 193–198. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2016.193.198>
17. New fluorescence parameters for the determination of QA Redox state and excitation energy fluxes / D. M. Kramer [et al.] // *Photosynth. Res.* – 2004. – Vol. 79, N 2. – P. 209–218. <https://doi.org/10.1023/b:pres.0000015391.99477.0d>
18. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72, N 1–2. – P. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
19. Аверина, Н. Г. Биосинтез тетрапирролов в растениях / Н. Г. Аверина, Е. Б. Яронская. – Минск : Беларус. навука, 2012. – 413 с.
20. Fujita, Y. Evolutionary aspects and regulation of tetrapyrrole biosynthesis in cyanobacteria under aerobic and anaerobic environments / Y. Fujita, R. Tsujimoto, R. Aoki // *Life*. – 2015. – Vol. 5, N 2. – P. 1172–1203. <https://doi.org/10.3390/life5021172>
21. Brzezowski, P. Regulation and function of tetrapyrrole biosynthesis in plants and algae / P. Brzezowski, A. S. Richter, B. Grimm // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. – 2015. – Vol. 1847, N 9. – P. 968–985. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.05.007>
22. Шалыго, Н. В. Биосинтез хлорофилла и фотодинамические процессы в растениях / Н. В. Шалыго. – Минск : Право и экономика, 2004. – 155 с.
23. Veiga, N. F. M. Recycling of the culture medium for pilot scale production of *Arthrospira platensis (Spirulina)*. Thesis to obtain the Master of science degree in biological engineering / N. F. M. Veiga. – Lisbon : Instituto Superior Técnico, 2016. – 76 p.
24. Carotenoid biosynthesis in cyanobacteria: structural and evolutionary scenarios based on comparative genomics / C. Liang [et al.] // *Int. J. Biol. Sci.* – 2006. – Vol. 2, N 4. – P. 197–207. <https://doi.org/10.7150/ijbs.2.197>
25. Ruiz-Sola, M. Á. Carotenoid biosynthesis in arabidopsis: a colorful pathway / M. Á. Ruiz-Sola, M. Rodríguez-Concepción // *Arabidopsis Book*. – 2012. – Vol. 10. – P. e0158. <https://doi.org/10.1199/tab.0158>
26. Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria / ed. : B. Demmig-Adams [et al.]. – Dordrecht : Springer, 2014. – 649 p.

References

1. Liang C., Zhao F., Wei W., Wen Z., Qin S. Carotenoid biosynthesis in cyanobacteria: structural and evolutionary scenarios based on comparative genomics. *International Journal of Biological Sciences*, 2006, vol. 2, no. 4, pp. 197–207. <https://doi.org/10.7150/ijbs.2.197>
2. Olaizola M., Duerr E. O. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 1990, vol. 2, no. 2, pp. 97–104. <https://doi.org/10.1007/bf00023370>

3. Rakhimberdieva M. G., Boichenko V. A., Karapetyan N. V., Stadnichuk I. N. Interaction of phycobilisomes with photosystem II dimers and photosystem I monomers and trimers in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biochemistry*, 2001, vol. 40, no. 51, pp. 15780–15788. <https://doi.org/10.1021/bi010009t>
4. Belay A., Ota Y., Miyakawa K., Shimamatsu H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *Journal of Applied Phycology*, 1993, vol. 5, no. 2, pp. 235–241. <https://doi.org/10.1007/bf00004024>
5. Henrikson R. *Earth Food Spirulina: how this remarkable blue-green algae can transform your health and our planet*. California, Ronore Enterprises, 1989. 174 p.
6. Santillan C. Mass production of *Spirulina*. *New trends in research and utilization of solar energy through biological systems*. Basel, 1982, pp. 46–49.
7. Trukhacheva T. V., Shlyakhtin S. V., Isakov G. A., Istomin Y. P. *Fotonol – modern photosensitizer for photodynamic therapy: review of pharmaceutical, pharmacological and clinical research results*. Minsk, Paradoks, 2013. 103 p. (in Russian).
8. 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*: Ph. D. thesis. Paris, 1966. 138 p.
9. Pumas P., Pumas C. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using low cost medium supplemented with lac wastewater. *Chiang Mai Journal of Science*, 2016, vol. 43, no. 5, pp. 1037–1047.
10. Borodina A. V., Gudvilovich I. N. *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivation method. *Ekologiya morya = Sea ecology*, 2005, iss. 70, pp. 20–23 (in Russian).
11. Depraetere O., Pierre G., Noppe W., Vandamme D., Foubert I., Michaud P., Muylaert K. Influence of culture medium recycling on the performance of *Arthrospira platensis* cultures. *Algal Research*, 2015, vol. 10, pp. 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.014>
12. Shalygo N. V., Manankina E. E., Vyazov E. V., Goncharik R. G., Filipchik E. A. Effectiveness of repeated usage of Zarrouk medium for growth of spirulina. *Biotekhnologiya: dostizheniya i perspektivy razvitiya: sbornik materialov II mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Pinsk, 7–8 dekabrya 2017 g.)* [Biotechnology: achievements and development prospects: materials of II international scientific conference (Pinsk, December 7–8, 2017)]. Pinsk, 2017, pp. 115–117 (in Russian).
13. Vyazov E. V., Manankina E. E., Filipchik E. A., Goncharik R. G., Shalygo N. V. Productivity and pigment complex of blue-green alga *Spirulina platensis* upon partial substitution of sodium bicarbonate for sodium hydroxide in culture medium. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2017, no. 4, pp. 7–12 (in Russian).
14. Sasaki K., Marquez F. J., Nishio N., Nagai S. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on the growth and photosynthesis of *Spirulina platensis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, vol. 79, no. 5, pp. 453–457. [https://doi.org/10.1016/0922-338x\(95\)91261-3](https://doi.org/10.1016/0922-338x(95)91261-3)
15. Mel'nikov S. S., Samovich T. V., Manankina E. E., Budakova E. A. Influence of light and dark periods alternation on production of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Nordst.) Geitler. *Al'gologiya = Algologia*, 2012, vol. 22, no. 2, pp. 121–130 (in Russian).
16. Makarenko M. S., Kozel N. V., Usatov A. V., Gorbachenko O. F., Averina N. G. A state of PSI and PSII photochemistry of sunflower yellow-green plastome mutant. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 2016, vol. 16, no. 4, pp. 193–198. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2016.193.198>
17. Kramer D. M., Johnson G., Kiirats O., Edwards G. E. New fluorescence parameters for the determination of QA Redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research*, 2004, vol. 79, no. 2, pp. 209–218. <https://doi.org/10.1023/b:pres.0000015391.99477.0d>
18. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
19. Averina N. G., Yaronskaya E. B. *Biosynthesis of tetrapyrroles in plants*. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2012. 413 p. (in Russian).
20. Fujita Y., Tsujimoto R., Aoki R. Evolutionary aspects and regulation of tetrapyrrole biosynthesis in cyanobacteria under aerobic and anaerobic environments. *Life*, 2015, vol. 5, no. 2, pp. 1172–1203. <https://doi.org/10.3390/life5021172>
21. Brzezowski P., Richter A.S., Grimm B. Regulation and function of tetrapyrrole biosynthesis in plants and algae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 2015, vol. 1847, no. 9, pp. 968–985. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.05.007>
22. Shalygo N. V. *Biosynthesis of chlorophyll and photodynamic processes in plants*. Minsk, Pravo i ekonomika Publ., 2004. 155 p. (in Russian).
23. Veiga N. F. M. *Recycling of the culture medium for pilot scale production of Arthrospira platensis (Spirulina)*. Thesis to obtain the Master of science degree in biological engineering. Lisbon, Instituto Superior Técnico, 2016. 76 p.
24. Liang C., Zhao F., Wei W., Wen Z., Qin S. Carotenoid biosynthesis in cyanobacteria: structural and evolutionary scenarios based on comparative genomics. *International Journal of Biological Sciences*, 2006, vol. 2, no. 4, pp. 197–207. <https://doi.org/10.7150/ijbs.2.197>
25. Ruiz-Sola M. Á., Rodríguez-Concepción M. Carotenoid biosynthesis in arabidopsis: a colorful pathway. *Arabidopsis Book*, 2012, vol. 10, p. e0158. <https://doi.org/10.1199/tab.0158>
26. Demmig-Adams B., Garab G., Adams III, Govindjee W. W. (eds.). *Non-Photochemical Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae and Cyanobacteria*. Dordrecht, Springer, 2014. 649 p.

Информация об авторах

Вязов Евгений Викторович – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: viazau@yahoo.com

Мананкина Елена Евгеньевна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: room454@mail.ru

Филипчик Елена Александровна – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: lenafil050494@mail.ru

Гончарик Руслан Геннадьевич – мл. науч. сотрудник. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: rusgon@mail.ru

Шальго Николай Владимирович – член-корреспондент, д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: shalygo@ibp.org.by

Information about the authors

Yauhen V. Viazau – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: viazau@yahoo.com

Elena E. Manankina – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: room454@mail.ru

Elena A. Filipchik – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lenafil050494@mail.ru

Ruslan G. Goncharik – Junior researcher. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rusgon@mail.ru

Nikolai V. Shalygo – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory. Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: shalygo@ibp.org.by