

ТЕРМОФИЛЬНЫЕ СИНЕЗЕЛЕННЫЕ ВОДОРОСЛИ
(ЦИАНОБАКТЕРИИ) ПАРАТУНСКОГО ГЕОТЕРМАЛЬНОГО
МЕСТОРОЖДЕНИЯ. СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Кузякина Т.И., Латкин А.С., Ефимов А.А., Ефимова М.В.

Камчатский государственный технический университет

Подробная информация об авторах размещена на сайте

«Учёные России» - <http://www.famous-scientists.ru>

Приведены результаты исследований циано-бактериальных сообществ горячих источников Паратунского геотермального месторождения (Камчатка) и условий среды обитания. Представлены результаты исследований видового состава сообществ. Кратко описаны возможные направления использования биомассы цианобактерий в биотехнологии. Дан краткий анализ существующих установок для культивирования цианобактерий. Описана схема и принцип работы установки, разработанной авторами, приведены ее преимущества.

Цианобактерии – древнейшая группа среди живых организмов. Остатки организмов, близких современным цианобактериям, найдены среди строматолитов – слоистых меловых отложений, возраст которых составляет около трех миллиардов лет [15]. Морфологически цианобактерии разделяются на одноклеточные, колониальные и многоклеточные (нитчатые) формы. Размеры клеток колеблются от менее 1 до 50 мкм. Большинство цианобактерий образуют колонии или многоклеточные нити. Химический состав биомассы цианобактерий отличается высоким содержанием протеина (до 70% органического вещества) [16, 20], наличием термоустойчивых ферментов (в том числе ДНК-полимеразы) [17], пигментов, витаминов [1]. Будучи космополитами, цианобактерии являются типичными обитателями горячих источников.

Сообщества цианобактерий с другими микроорганизмами, развивающиеся в гидротермах, все более привлекают внимание с флористической и геохимической точек зрения [4, 9, 21]. Приспособленность термофильных организмов к активной жизни при высокой температуре базируется на своеобразии физико-химических, структурных и функциональных свойств всех компонентов клетки. Термофильные цианобактерии могут функционировать

при температуре до 74-80°C [22] и выше благодаря своеобразному коллоидному состоянию протоплазмы, которая очень медленно коагулирует [12, 13].

Для описания сообществ цианобактерий с другими бактериями применяют термин «циано-бактериальный», относя «циано-» к цианобактериям, а «бактериальный» – к другим бактериям. В гидротермальных проявлениях цианобактериальные сообщества могут образовывать циано-бактериальные маты («мат» от англ. «ковер»), составляющие автономные специфические биоценозы.

Целью исследований являлось изучение целесообразности культивирования термофильных цианобактерий для использования в биотехнологии.

Материалы и методы исследований

Нами были изучены циано-бактериальные сообщества гидротерм Паратунского гидротермального месторождения южной Камчатки. Для определения видового состава циано-бактериальных сообществ образцы отбирали в горячих источниках и на прилегающих к ним термальных полях. Подготовку образцов осуществляли по методикам микробиологических исследований [18]. Определение таксономической принадлежности компонентов сообществ проводили по определителям [5, 14] при использовании микро-

скопа «Zasilacz ZM 6/50». Химический состав биомассы цианобактерий исследовали стандартными методами.

Результаты исследований

Воды Паратунского геотермального месторождения могут быть отнесены к типу сульфатно-натриевых, характеризуются невысокой минерализацией. На всех участках имеет место самоизлив горячих вод из скважин. Месторождение разделяется на северный, нижний, средний и верхний участки. Термальные воды характеризуются температурой 25-80°C, в высоконагретых потоках – 100-105°C.

В исследованных гидротермах Паратунского месторождения были определены цианобактерии родов *Microcystis*, *Phormidium*, *Aphanothece*, *Gloeocapsa*, *Oscillatoria*, *Chamaesiphon*, *Lyngbya*. В источниках Верхней и Средней Паратунки

доминировали цианобактерии родов *Oscillatoria* и *Phormidium*. Они образовали пленочные и нитчато-волоконистые обрастания изумрудно-зеленого и оливково-зеленого цветов. В бассейнах Нижней Паратунки доминировали цианобактерии рода *Phormidium*, а именно *Ph. ambiguum*, образующие слоистые плавающие маты оливково-зеленого цвета толщиной до 20 мм.

Для оценки биоразнообразия и численности видов цианобактерий гидротерм Паратунского месторождения определили значение индекса разнообразия Шеннона. Результаты представлены в таблице 1. Из данных таблицы следует, что индекс видового разнообразия Шеннона, степень доминирования выше для цианобактерий рода *Phormidium*, из 17 обнаруженных видов которых девять видов относилось к данному роду.

Таблица 1. Биоразнообразие и численность видов цианобактерий гидротерм Паратунского месторождения

Рода цианобактерий	Число видов	Индекс разнообразия Шеннона (в битах)	(%) и степень доминирования
<i>Phormidium</i>	9	1,74	(53,0) 0,53
<i>Oscillatoria</i>	2	0,39	(11,8) 0,12
<i>Gloeocapsa</i>	2	0,39	(11,8) 0,12
<i>Lyngbya</i>	1	0,19	(5,9) 0,59
<i>Microcystis</i>	1	0,19	(5,9) 0,59
<i>Aphanothece</i>	1	0,19	(5,9) 0,59
<i>Chamaesi-</i>	1	0,19	(5,9) 0,59
Суммарное значение	17	3,28±0,23	–

Примечание: данные достоверны при доверительной вероятности $P = 0,99$ или уровне значимости $\alpha = 0,01$.

Для решения вопроса о целесообразности культивирования цианобактерий определяли накопление биомассы в единицу времени на единицу площади. Нами было проведено определение скорости накопления биомассы цианобактериями *Ph. ramosum* в Средне-Паратунских гидротермах в зимний и летний периоды. Накопление биомассы почти не зависело от сезона года – в зимний и летний периоды динамика прироста была практически одинаковой. Прирост биомассы происходил достаточно активно и достигал 74,6 мг/м²/ч сухого вещества. При пересчете урожайно-

сти *Ph. ramosum* в т/га/год получили 4,818 т, что близко урожайности пшеницы (4 т/га/год). В то же время при пересчете урожайности *Ph. ramosum* по белку получили 1,690 т/га/год, что ненамного ниже урожайности сои (2,4 т/га/год), так как содержание протеина в биомассе *Phormidium*, выделенных из Паратунских гидротерм, достигает 35,1% органической части [7]. Следовательно, в качестве ресурсного объекта с целью получения кормового и пищевого белка и биологически активных веществ (витаминов, ферментов, пигментов), а также биосорбентов [2] пер-

спективно промышленное культивирование цианобактерий рода *Phormidium*.

Для выбора способа культивирования нами были изучены существующие способы, применяемые для микроорганизмов и микроводорослей.

Промышленное культивирование цианобактерий и одноклеточных водорослей осуществляется в настоящее время в нескольких странах [6, 19]. При значительных различиях все современные методы культивирования фототрофов основаны на обеспечении клеток достаточным количеством света, углекислоты, питательных веществ [10, 11, 23].

В настоящее время применяются два способа получения биомассы цианобактерий и микроводорослей: массовая культура под открытым небом и интенсивное культивирование в замкнутых аппаратах в полностью контролируемых условиях.

Основным недостатком получения биомассы в открытых установках является зависимость от погодных условий, из-за чего невозможно длительное, стабильное снятие урожая. Другими серьезными недостатками являются подверженность культуры инфекциям (бактерии, личинки насекомых, различные виды водорослей), а также порой негативное влияние химического состава естественного субстрата на химический состав биомассы.

В 60-х годах прошлого века был разработан ряд установок и аппаратов высокоинтенсивного культивирования в полностью контролируемых условиях [3]. Главным преимуществом этих методов культивирования является возможность вести длительное непрерывное выращивание культуры с поддержанием постоянной плотности суспензии на оптимальных значениях. Максимальная продуктивность является главным преимуществом этого метода. Однако в связи с большими затратами электроэнергии стоимость получаемой биомассы весьма высока.

Нами предложен способ культивирования термофильных цианобактерий рода *Phormidium*, при котором регулирование температуры и химического состава субстрата осуществляется путем подачи термальных вод природных источников Паратунской геотермальной системы при обес-

печении их проточности. Использование термальных вод позволяет исключить подготовку искусственной питательной среды и выделение чистой культуры, так как в качестве питательной среды используются термальные воды природных источников Паратунской геотермальной системы, а в качестве культуры – цианобактерии рода *Phormidium*, выделенные из этих же природных высокотемпературных источников. Особенности метаболизма термофильных цианобактерий при высокой температуре (45–65°C) и слабощелочной реакции среды (рН 7,5) позволяют исключить операцию стерилизации питательной среды. Снижение энергетических затрат достигается за счет отсутствия необходимости подогрева питательной среды, а также необходимости принудительной ее проточности, так как давление термальных вод на выходе из скважин достигает 3 – 8 атм.

Предложенный способ культивирования [8] был отработан в лабораторной, а затем в пилотной установке (рис. 1).

Для запуска установки через патрубок 1 с помощью ручного открывания клапана 2 в рабочую емкость 3 подавался субстрат температурой 65°C (термальные воды), поступающий по трубопроводу за счет естественного напора. По мере прохождения субстрата по системе трубопровода, его давление снижалось. При достижении необходимого уровня субстрата в рабочей емкости 3 клапан 2 закрывали. Выключателями 4 включали мешалку с электродвигателем 6 и компрессор 7, с помощью которого через патрубок 8 субстрат непрерывно обогащался воздухом. Внесение посевного материала проводилось при открытой крышке 9 только при естественном снижении температуры субстрата до 45°C. Регулятором 10 включали люминесцентные лампы низкого давления 11. После внесения посевного материала начинался процесс ферментации. Дополнительная подача воздуха в рабочую емкость осуществлялась с помощью вентилятора 12, вмонтированного в крышку 9. Контроль температуры субстрата осуществлялся термометром 13 и датчиком 14. При понижении температуры на 2-3°C автоматически при помощи реле 15 откры-

вался клапан 16 патрубка 17, через который сливалась порция субстрата. При этом одновременно открывался клапан 2, через который в установку подавалась свежая порция термальной воды 65°C, равномерно распределяемая по объему субстрата при помощи мешалки 6 путем барботирования. При достижении необходимой температуры 45°C клапаны 2 и 16 автоматически закрывались, и процесс продолжался до оче-

редного понижения температуры. Первый отбор биомассы проводился при образовании практически на всей поверхности субстрата слизистой пленки цианобактерий через 4-5 суток. Затем биомасса регулярно 1 раз в двое суток для поддержания низкой плотности культуры во избежание ее самозатенения и деструкции отбиралась при открытой крышке 9 установки с помощью сачка в течение 1-2 минут.

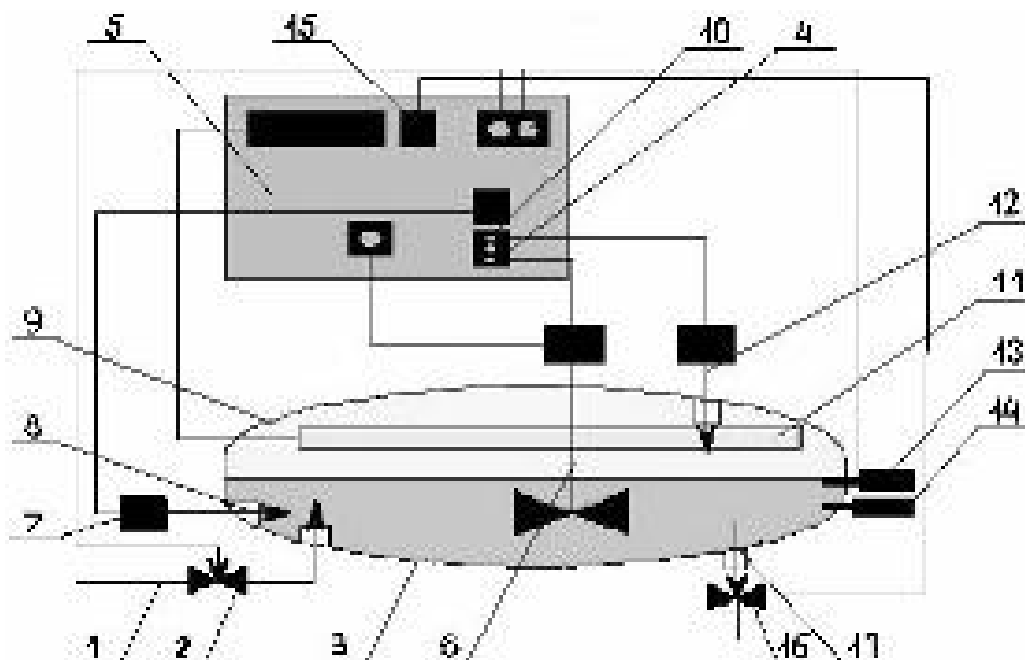


Рис. 1. Схема пилотной установки для культивирования термофильных цианобактерий: 1–патрубок подачи субстрата; 2–клапан, регулирующий подачу субстрата; 3–рабочая емкость; 4–выключатели; 5–щит управления; 6–мешалка; 7–компрессор; 8–патрубок подачи воздуха; 9–крышка; 10–регулятор освещения; 11–лампы; 12–вентилятор; 13–термометр; 14–датчик температуры; 15–реле; 16–клапан слива субстрата; 17–патрубок слива субстрата

Разработанный нами способ культивирования цианобактерий рода *Phormidium* позволяет упростить технологию получения биомассы, так как исключает закупку, доставку и предварительную подготовку субстрата. Способ предполагает снижение энергетических затрат за счет того, что проточность термальных вод позволяет поддерживать постоянство их, как субстрата, химического состава и температуры; культивирование цианобактерий при высоких температурах (45°C) позволяет исключить процесс стерилизации субстрата; для обеспечения производства используется энергия термальных вод Паратун-

ской геотермальной системы, что исключает потребность в топливе и обеспечивает возможность организации круглогодичного производства. При оптимальных условиях культивирования накопление биомассы достигало 50 мг/м²/ч сухого вещества.

Выводы

Исследованы циано-бактериальные сообщества Паратунских гидротерм и условия их обитания. Определены цианобактерии 17 видов, относящиеся к семи родам. Доминируют цианобактерии рода *Phormidium*. Предложен способ культивирования термофильных цианобактерий в установке комбинированного типа. Для

реализации поставленных задач выбраны Средне-Паратунские гидротермы и доминирующие в них цианобактерии *Ph. ramosum*. Отработаны оптимальные режимы культивирования *Ph. ramosum*, при которых накопление биомассы достигает 50 мг сухого вещества в час с 1 м² поверхности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Барашков Г.К. Сравнительная биохимия водорослей. М.: Пищ. пром-сть, 1972. 336 с.
2. Белова Т.П., Кузякина Т.И., Зернова Л.Д., Ефимова М.В. // Экономические, социальные, правовые и экологические проблемы Охотского моря и пути их решения / Матер. регион. науч.-практич. конф. 17-19 мая 2006 г. Петропавловск-Камчатский: КамчатГТУ, 2006. С. 81.
3. Владимирова М.Г., Семененко В.Е. // Жизнь растений. М.: Просвещение, 1977. Т. 3. С. 367.
4. Герасименко Л.М., Ушатинская Г.Т. // Бактериальная палеонтология. М.: ПИН РАН, 2002. С. 36.
5. Голлербах М.М., Косинская Е.К., Полянский В.И. Синезеленые водоросли // Определитель пресноводных водорослей СССР. М.: Сов. наука, 1953. Вып. 2. 665 с.
6. Грачева И.М., Иванова Л.А., Кантере В.М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и биоэнергия. М.: Колос, 1992. 375 с.
7. Ефимова М.В. Синезеленые водоросли (цианобактерии) поверхностных термопроявлений Камчатки и возможности их использования в биотехнологии: Автореф. дис. канд. биол. наук. Петропавловск-Камчатский, 2005. 26 с.
8. Ефимова М.В., Кузякина Т.И., Ефимов А.А. Способ культивирования термофильных цианобактерий: Патент РФ на изобретение № 2292389. Дата регистрации в Гос. реестре изобретений РФ 27.01. 2007 г. Бюл. № 3, 2007
9. Заварзин Г.А. Лекции по природо-ведческой микробиологии. М.: Наука, 2003. 348 с.
10. Мережко А.И. // «Цветение» воды. Киев: АН УССР, 1968. Вып. 1. С.187.
11. Мережко А.И. // «Цветение» воды. Киев: АН УССР, 1969. Вып. 2. С. 63.
12. Никитина В.Н. Синезеленые водоросли термальных источников Кавказа и Камчатки: Автореф. дис. канд. биол. наук. Л., 1977. 22 с.
13. Никитина В.Н. // Мат. XI съезда Русс. ботан. общ-ва (18-22 августа 2003 г., Новосибирск-Барнаул). Барнаул: АзБука, 2003. Т. 3. С. 129.
14. Определитель бактерий Берджи / Ред. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П., Стейли Дж., Уильямс С. М.: Мир, 1997. Т.1. 431 с.
15. Орлеанский В.К. // Бактериальная палеонтология. М.: ПИН РАН, 2002. С. 47.
16. Пахомова М.В. // Бюл. МОИП. 1964. Т. 69. Вып. 3. С. 110.
17. Попова Т.Е. Развитие биотехнологии в СССР. М.: Наука, 1988. 200 с.
18. Практикум по микробиологии / Ред. Нетрусов А.И. М.: ИЦ «Академия», 2005. 608 с.
19. Ржетовский Р. // Непрерывное культивирование микроорганизмов. Теоретические и методологические основы. М.: Пищ. пром-сть, 1968. С. 359.
20. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. М.: Мир, 1987. 416 с.
21. Bonch-Osmolovskaya E.A., Miroshnichenko M.L., Slobodkin A.I., Sokolova T.G., Karpov G.A., Kostrikina N.A., Zavarzina D.G., Prokofieva M.I., Rusanov I.I., Pimenov N.V. // Microbiology. 1999. V. 68 (3). P. 343.
22. Castenholz R.W. // Microbial Mats: Stromatolites. N.Y.: Allan R. Lees, 1984. P.101.
23. Nold S.C., Ward D.M. // Applied and Environmental Microbiology. 1996. V. 62 (12). P. 4598.

**THERMOPHILIC BLUE-GREEN ALGAE (CYANOBACTERIA)
OF PARATUNKA GEOTHERMAL DEPOSITING. THE WAYS OF CULTIVATION
AND USAGE IN BIOTECHNOLOGY**

Kuzyakina T.I., Latkin A.S., Yefimov A.A., Yefimova M.V.

The Kamchatka state technical university

In the article there are research results of Paratunka geothermal depositing hot spring cyanobacterial communities and environmental conditions. The research results of species communities composition are given. Possible directions of cyanobacterial biomass usage in biotechnology are shortus described. Brief analysys of the existing engines for cyanobacteria cultivation is given. There is the scheme and the princip of work of the engine, created by the authors, described, its advantages are shown.

