

УДК 579.66

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФИТОБИОТИКОВ НА ПРИМЕРЕ ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

*Н.А. Сидорова, А.И. Савушкин*

*Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия*

Исследованы биологические свойства перспективного фитобиотика на примере штамма зеленых микроводорослей *Chlorella vulgaris* GKO в составе коммерческого биопрепарата производства ООО «Альготек». Описаны морфологические особенности штамма, ультраструктура, концентрация хлорофилла (Chl a), биомасса, кинетика роста. Полученные данные необходимы для оптимизации технологий культивирования зеленых микроводорослей, как потенциальных биотехнологических объектов со свойствами фитобиотиков.

**Ключевые слова:** зеленые микроводоросли, морфология, кинетика роста, концентрация хлорофилла, биомасса, фитобиотики, *Chlorella vulgaris*.

## BIOLOGICAL PROPERTIES OF PHYTOBIOTICS ON THE EXAMPLE OF GREEN MICROALGAE

*N.A. Sidorova, A.I. Savushkin*

*Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia*

The biological properties of a promising phytobiotic have been studied using the example of a strain of green microalgae *Chlorella vulgaris* GKO as part of a commercial biological product manufactured by Algotek LLC. The morphological features of the strain, ultrastructure, chlorophyll (Chl a) concentration, biomass, and growth kinetics are described. The data obtained are necessary to optimize the cultivation technologies of green microalgae as potential biotechnological objects with the properties of phytobiotics.

**Keywords:** green microalgae, morphology, growth kinetics, chlorophyll concentration, biomass, phytobiotics, *Chlorella vulgaris*.

В настоящее время, к фитобиотикам или фитогеникам относят широкий спектр природных (растительных) биоактивных соединений, которые используются в качестве пищевых добавок с целью повышения резистентности организма к неблагоприятным факторам среды и улучшения качества жизни [8, с. 7489]. Биотехнологический потенциал фитобиотиков во многом связан с многообразием их противовоспалительных, антибактериальных и иммуномодулирующих свойств. Их эффективность в виде добавок к пище для человека и кормовых премиксов для животных доказана на основании улучшения показателей иммунитета, физиологических параметров, пищевого статуса, данных биохимического анализа [9, с. 12].

В практике высокопродуктивного животноводства и рыбоводства по достоинству оценены антиоксидантные свойства фитобиотиков, которые в условиях интенсивного производства вызывают снижение стрессового воздействия окружающей среды на иммунную систему и продуктивность, а также положительно влияют на качество мяса и производство высококачественной и безопасной продукции животного происхождения [4, с. 6]. Благодаря изучению причин положительного эффекта фитобиотиков обнаружено, что в их присутствии наблюдается гомеостаз нормофлоры желудочно-кишечного тракта [3, с. 446; 12, с. 639; 13, с. 142], увеличивается секреция пищеварительных ферментов, повышается перистальтика желудка и

кишечника [7, с. 120]. Использование фитобиотиков в рационе рыб улучшает показатели врожденного иммунитета за счет стимуляции выработки естественных киллеров, активации лизоцима и системы комплемента [6, с. 409].

Примером фитобиотиков могут служить представители зеленых микроводорослей. Это группа эукариотических водных микроорганизмов, способных поддерживать постоянство внутриклеточной среды, быстро адаптироваться к неблагоприятным факторам, образовывать целый пул вторичных метаболитов [10, с. 68]. Обнаружено, что такие метаболиты зеленых микроводорослей, как жирные кислоты, гликолипиды, фенолы, терпены,  $\beta$ -дикетон и индольные алкалоиды способны проявлять антибактериальную активность [11, с. 310]. Однако наибольшей антибактериальной активностью обладают длинноцепочечные ненасыщенные жирные кислоты [5, с. 10]. Виды родов *Chlorella* и *Scenedesmus* используются для получения сбалансированного кормового белка и как источники незаменимых аминокислот, омега-3 ( $\omega$ -3) полиненасыщенных жирных кислот и каротина.

Несмотря на доказанный потенциал зеленых микроводорослей как фитобиотиков, многообразие их биологических свойств остаётся ещё не до конца изученным. Актуальность подобных исследований также во многом связана с разработкой биотехнологических подходов к увеличению эффективности функционирования зеленых микроводорослей *in situ* и оптимизации культивирования *in vitro*.

Целью выполненного исследования стало изучение биологических свойств фитобиотиков на примере зеленой микроводоросли *Chlorella vulgaris*. К биологическим свойствам отнесены морфологические и ультраструктурные характеристика штамма, содержание в клетках хлорофилла «а», биомасса, кинетика роста.

*Chlorella vulgaris* Beijer относится к царству *Plantae*, отделу *Chlorophyta*, классу *Trebouxiophyceae*, порядку *Chlorellales*, семейству *Chlorellaceae*, роду *Chlorella*. Микроорганизм имеет средний размер клеток 0.05 мм и одноклеточный коккоидный тип таллома (рис. 1).

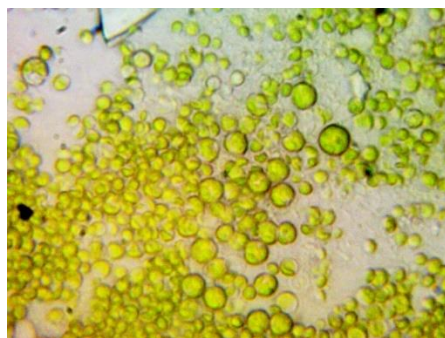


Рисунок 1. Одноклеточный коккоидный тип таллома *Ch. vulgaris* ГКО (прижизненный препарат,  $\times 1000$ )

Клетка покрыта толстой клеточной стенкой, содержит одно ядро, хроматофор – чашевидный. Клеточная стенка состоит из наружного и внутреннего слоёв и снабжена порами, через которые происходит взаимодействие клетки с внешней средой и контроль секреции экзополисахаридного матрикса. Наружный слой представляет собой полимерный каротиноид, способный к адгезии и удалению токсичных для клетки соединений. Основным компонентом внутреннего слоя клеточной стенки хлореллы является целлюлоза. Хлоропласты окружены оболочкой из двух мембран фосфолипидного происхождения; хлоропластная эндоплазматическая сеть - отсутствует. Ламеллы состоят из 2-6 тилакоидов в виде гран, возникающих при скоплении тилакоидов; периферические тилакоиды отсутствуют, генофоры рассеянные [1, с. 115].

Особенности морфологии микроводорослей оценивали микроскопически на прижизненных препаратах «раздавленная капля» и окрашенных по Нейссеру с использованием уксуснокислой синьки и хризоидина. Предварительно, для проверки чистоты культуры выполняли посев концентрата хлореллы на элективные среды Тамия и Сабуро и на основные среды - мясопептонный агар и мясопептонный бульон.

Для определения содержания хлорофилла «а» из биомассы микроводорослей готовили концентрат клеток в количестве  $10^6$  в 1 мл питательной среды с использованием центрифуги «ELMI CM-70M-09». В колбу на 250 мл добавляли 100 мл среды Тамия и 1 мл концентрированной суспензии. Из полученного объема 101 мл готовили фильтрат клеток с последующим экстрагированием фильтрата с использованием 90% ацетона. Экстракт анализировали фотоэлектроколориметрически в области красного спектра поглощения (665 нм). По полученным значениям Chl а рассчитывали биомассу микроводорослей. Для этого учитывали, что концентрация Chl а соответствует примерно 2.5 % от сухой биомассы, или 6.75 % от содержания органического углерода. В этих условиях при переходе от концентрации Chl а к биомассе, выраженной в единицах углерода (мкг С/л), допустимо использовать пересчетный коэффициент 15 [2, с. 56] согласно формуле 1.

$$B_m = 15 \text{ Chl а} \quad (1)$$

$B_m$  - биомасса микроводорослей (microalgae biomass), мг/л; 15 - пересчетный коэффициент;

Кинетику роста исследуемого штамма хлореллы оценивали в процессе периодического культивирования с использованием биореактора RTS-1С с технологией Reverse-Spin, снабженного программным обеспечением и функцией контроля роста клеток в режиме реального времени. Для культивирования микроводорослей использовали стерильные сосуды TPP TubeSpin 50 объемом 50 мл с мембранным фильтром. Объем питательной среды Тамия соответствовал 29 мл, а объем вносимой культуры микроводорослей – 1 мл. Все измерения выполняли при диапазоне OD от 0 до 8 единиц оптической плотности культурального раствора при точности измерений  $\pm 0.3$  OD,  $\lambda$  – 850 нм, температуре инкубации – 37.0 °С (стабильность температурного режима  $\pm 0.1$  °С).

### Результаты

Благодаря выполненным микроскопическим исследованиям обнаружено, что штамм *Ch. vulgaris* ГКО имеет округлые, слабоэллипсоидные клетки от  $1.2 \pm 0.6$  мкм в длину и  $1.3 \pm 0.2$  мкм в ширину. В препаратах по Нейссеру выявлено присутствие зерен волютина (рис. 2) или метополифосфатов, обеспечивающих запас питательных веществ, расходующихся при попадании микроорганизма в неблагоприятные условия обитания.

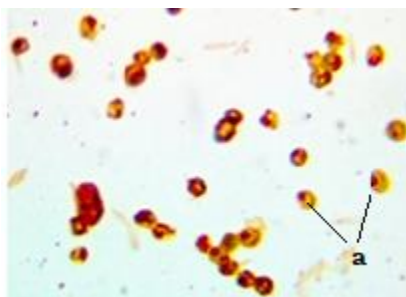


Рисунок 2. Зерна волютина (а) в клетках *Ch. vulgaris* ГКО (препарат по Нейссеру,  $\times 1000$ )

Содержание хлорофилла-а в клетках штамма *Ch. vulgaris* составило  $0.28 \pm 0.5$  мкг/мл при биомассе  $2.4 \pm 0.1$  мг/л. Благодаря измерениям оптической плотности культурального раствора и кинетики роста штамма *Chlorella vulgaris* ГКО при инкубировании в биореакторе RTS-1С

установлено, что в условиях статического культивирования исследуемый штамм хлореллы способен развиваться согласно закономерностям, отражающим изменения в биомассе клеток и в среде культивирования. За 6 суток или 144 ч культивирования было зарегистрировано две фазы экспоненциального роста, соответственно на 10 и 40 ч инкубирования штамма в биореакторе. Значения удельной скорости роста в первую фазу составили  $0.18 \text{ ч}^{-1}$ , во вторую –  $0.04 \text{ ч}^{-1}$ . Начало стационарной фазы роста соответствовало 60 ч культивирования, к этому времени культура достигла значений оптической плотности 1.4 OD, которые сохранились до завершения эксперимента. Полученные данные свидетельствуют о достаточной стабильности морфофизиологических свойств исследуемого штамма в составе коммерческого биопрепарата производства ООО «Альготек». К концу стационарной фазы роста было зафиксировано некоторое снижение доли живых клеток от 89% (60 ч культивирования) до 56% (144 ч культивирования). Подобные результаты связаны с постепенным уменьшением концентрации питательных веществ в среде культивирования и последующим сокращением количества жизнеспособных клеток исследуемого штамма хлореллы.

В заключении необходимо отметить, что биологические свойства, перспективных для целей биотехнологии, штаммов зеленых микроводорослей во многом зависят от условий культивирования микроорганизма таких, как оптимум pH, температура, источники питания. Как фитобиотик, исследуемый штамм должен быть дополнительно исследован на устойчивость к бактериальному антагонизму, включая определение выраженных антагонистических свойств при заданной плотности клеток в культуре и времени наступления гибели бактерий, вызывающих инфекции различной этиологии. Полученные биологические характеристики штамма *Chlorella vulgaris* ГКО могут быть применимы для контроля биотехнологических процессов культивирования хлореллы и получения концентратов зеленых микроводорослей с широким спектром применения.

**Благодарности.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 322-23 (Соглашение № 23-16-20026) совместно с Республикой Карелия с финансированием из Фонда венчурных инвестиций Республики Карелия (ФВИ РК).

#### Библиографический список

1. Аужанова Н. Б. Морфологическая и систематическая характеристика хлореллы. Ее производство и применение // Научный вестник. 2014. №1(1). С.113-126.
2. Федоров В. Д. О методах изучения фитопланктона и его активности: учеб. пособие. М.: Издательство МГУ, 1979. 167 с.
3. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M. Biological effects of essential oils – a review // Food and Chemical Toxicology, 2008. № 46. P. 446–475.
4. Brenes A., Roura E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action // Animal Feed Science and Technology. 2010. № 158. P.1-14.
5. Borowitzka M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. J.Appl. Phycol. 1995. № 7. P. 3–15.
6. Ferdous MdF., Arefin MdS., Rahman MdM., Ripon MdMR., Rashid MdH. Beneficial effects of probiotic and phytobiotic as growth promoter alternative to antibiotic for safe broiler production // Journal of Advanced Veterinary and Animal Research. 2019. № 6(3). P. 409-415. doi: 10.5455/javar.2019.f361.
7. Gregacevic L., Klaric I., Domacinovic M., Galovic D. and Ronta M. Fitogeni aditivi u hranidbi domacih zivotinja // Krmiva. 2014. № 56 (3). P. 117–123.
8. Hashemzadeh-Cigari F., Khorvash, G.R., Ghorbani M. et al. 2014. Effects of supplementation with a phytobiotics-rich herbal mixture on performance, udder health, and metabolic status of Holstein cows with various levels of milk somatic cell counts. J. Dairy Sci. 97:7487–7497. doi:10.3168/jds.2014-7989

9. Hashemzadeh-Cigari, F., M. Khorvash, G. R. Ghorbani, M. Kadivar, J. Riasi, and Q. Zebeli. Effects of supplementation with a phytobiotics-rich herbal mixture on performance, udder health, and metabolic status of Holstein cows with various levels of milk somatic cell counts // *J Dairy Sci.* 2014. № 97. P. 7487-7497. doi: 10.3168/jds.2014-7989
10. Houketchang Ndomou S. C., Herve M. The Use of Plants as Phytobiotics: A New Challenge // *Phytochemicals in Agriculture and Food.* 2023. P. 1-19. doi:10.5772/intechopen.110731.
11. Malik V. S. Microbial secondary metabolism // *Trends Biochem. Sci.* 1980. № 5. P. 68–72.
12. Ördög V., Stirk W. A., Lenobel R., Bancířová M., Strnad M., Van Staden J., Szigeti J. and Németh L. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites // *J. Appl. Phycol.* 2004. № 16. P. 309–314.
13. Stojkovic D., Glamoclija J., Ciric A., Nikolic M., Ristic M., Siljegovic J. and Sokovic M. Investigation on antibacterial synergism of *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris* essential oils // *Archives of Biological Sciences.* 2013. № 65 (2). P. 639–643.
14. Windisch W., Schedle K., Plitzner C. and Kroismayr A. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science.* 2008. № 86. P. 140–148.