

УДК 639.64

Л.Г. ГНАТЧЕНКО, И.И. ПИСАРЕВСКАЯ, А.П. ИВАНЮТА

ОПЫТ ИНТЕНСИВНОГО ВЫРАЩИВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛИ СПИРУЛИНЫ (SPIRULINA PLATENSIS)

В последние годы в мире значительно возрос интерес к морским и пресноводным водорослям как к дополнительному источнику получения продуктов для животноводства, фармацевтической, парфюмерной, пищевой, микробиологической и других видов промышленности. По выходу биомассы и белка, содержанию микроэлементов, витаминов и β -каротина водоросли во много раз превосходят многие наземные растения. Крупномасштабным культивированием микроводорослей в Крыму никто не занимается, однако, учитывая его климатические условия, он является одним из самых перспективных районов Украины для их производства.

Настоящая работа выполнена в связи с разработкой современных технологий массового культивирования микроводорослей для нужд народного хозяйства Украины.

При выборе объекта выращивания основное внимание обращали на химический и биохимический состав и возможность использования сырья и его компонентов. Спирулина известна у нас и за рубежом высокой продуктивностью и ценностью, сравнительно доступными формами её культивирования в полупромышленных условиях. Эта микроводоросль относится к видам с типично белковой направленностью биосинтеза, содержит до 75% белка, имеет большие размеры клеток (до 500 мкм).

Для массового выращивания была использована альгологически чистая культура, полученная в Институте рыбной промышленности (г. Бургас, Болгария).

Учитывая мировой опыт культивирования этого объекта, возможности и техническую оснащённость экспериментальной базы, мы остановились на комбинированном выращивании, когда часть процесса (ведение маточных культур, получение инокулята) проводят в контролируемых условиях с использованием искусственных источников света, а наращивание производственных культур — в оранжерее и на открытом воздухе с использованием скваженных вод и с/х удобрений. Выбор такого варианта технологии экономически целесообразен в условиях Крыма, где культивирование микроводоросли возможно с апреля по октябрь.

Технологический процесс выращивания спирулины включал в себя несколько обязательных этапов: содержание маточных культур, подготовку инокулята, приготовление питательных сред и корректировку их состава, выращивание водорослей в культиваторах, сбор культуры.

В зимний период колбы с маточными культурами содержали при температуре 16,8-20,8°C при фотопериоде, соответствующем естественному, и освещении лампами дневного света интенсивностью от 2,5 до 8 тыс. лк, а с мая по сентябрь — на экспериментальной базе в специально оборудованном кондиционерами помещении, в котором поддерживали температуру в пределах 18-20°C. Культуральную среду для поддержания маточной культуры готовили по прописи Зарукка на пастеризованной

трижды при 75°C дистиллированной воде. В зависимости от интенсивности роста культуры каждые 15-25 дней проводили её пересев.

Выращивание инокуляционного материала начинали в апреле-мае вначале в стеклянных бутылках объёмом 20 л в контролируемых условиях, затем, когда температура воздуха достигала 22°C, культуру переносили в оранжерею в открытый пластиковый лоток (объём среды 50 л, толщина слоя 5-7 см) и продолжали выращивание сначала в накопительном, затем в полупроточном режиме на химически чистых солях.

При достижении культурой плотности не менее 1 г сухого вещества часть суспензии использовали для засева культиваторов большего объёма.

Питательную среду для массового выращивания спирулины готовили на пресной и солёной скваженной воде, добываемой с глубины более 10 м. Основное преимущество использования глубинных вод — отсутствие необходимости их обеззараживания и фильтрации. К тому же, как показали результаты анализа солёной воды, в её состав входил почти весь набор макро- и микроэлементов, в связи с чем отпала необходимость их дополнительного внесения, что, таким образом, позволило ещё более удешевить стоимость питательной среды. Питательную среду готовили исходя из потребностей водоросли в необходимых элементах минерального питания. В качестве углеродного питания вносили NaHCO_3 из расчёта 10-12 г/л, а также добавляли солёную скваженную воду, как источник микроэлементов с таким расчётом, чтобы плотность среды в ёмкостях была не ниже 1,011 и не превышала 1,023. Скваженные воды бедны биогенами. Необходимый для роста водорослей азот вносили в виде технической мочевины из расчёта 300-500 мг/л и фосфора в виде гранулированного суперфосфата в количестве 250-300 мг/л, предварительно, за двое суток, растворённого в воде, которую в отстоянном виде и содержащую P_2O_5 добавляли в культуральную среду. Перед засевом ёмкостей инокулятами водорослей в среду добавляли витамины В и В₁₂.

Известно, что в период выращивания водорослей содержание биогенов в питательных средах непостоянно. Во время активного роста клеток среду необходимо корректировать ежедневно, т.е. вносить или не вносить дополнительный азот и фосфор в оптимальных для роста концентрациях так, чтобы полученная биомасса имела один и тот же биохимический состав, а приросты водорослей были оптимальными.

С целью осуществления контроля и управления непрерывным процессом выращивания микроводорослей было изучено влияние режима культивирования на скорость выедания культурой основных биогенных элементов питательных сред допустимых и пороговых значений их содержания. Специально для этих целей было проведено несколько циклов выращивания спирулины, в течение каждого из которых периодически определяли содержание азота и фосфора в среде с одновременной регистрацией плотности клеток. Результаты культивирования спирулины при дневном диапазоне температур от 16,5 до 28,5°C и освещённости от 2 до 45 тыс. лк представлены в таблице (см.). Как видно, в течение 9 суток культивирования отмечалось снижение валового фосфора с 361,31 до 167,75 мкг-ат/дм³, фосфатов с 352,73 до 138,00 мкг-ат/дм³. При этом коэффициент оптической плотности для цветности увеличивался с 0,230 до 0,810, а масса сухого вещества с 0,20 до 0,62 г/дм³, т.е. в 3 раза. Скорость изменения валового фосфора, выраженная в % потребления, увеличивается с 2,23% в первые сутки культивирования до 22,60% на пятые сутки, при этом сухая биомасса водоросли продолжает увеличиваться до 0,62 г/дм³. Из данных, приведенных в таблице, следует, что на 4-5 сутки при массе сухого вещества 0,38-0,46 г/дм³ происходит увеличение органического фосфора до 51,66-53,76 мкг-ат/дм³, очевидно высвобождаемого клетками в процессе их жизнедеятельности или отмирания. В то же время при культивировании спирулины в диапазоне температур от 23 до 35°C при естественном фоне

освещения отмечено значительное снижение валового фосфора до 5,16 мкг-ат/дм³, валового азота до 212,8 мкг-ат/дм³ уже на 5 сутки опыта, после чего наблюдали массовую гибель культуры.

Изменение состава питательной среды при культивировании спирулины (температура 16,5-28,5°C; освещённость 2-45 тыс. лк)

Продолж. опыта, суток	рН	Цветность, по фф. оптич. плотност.	Фосфор, мкг-ат/куб. дм			Азот, мкг-ат/куб. дм				Масса сухого вещества, г/куб. дм
			валовый	минеральный	органический	валовый	нитритный	нитратный	органический	
-	8,32	-	258,08	221,59	36,49	5491,70	0,71	976,53	4514,46	-
1	8,80	0,230	311,31	312,73	8,68	5491,70	0,71	2275,82	3215,17	0,20
2	8,95	0,225	333,25	345,52	7,73	5358,44	9,38	2744,66	2604,40	0,16
3	8,70	0,300	335,50	291,48	44,02	5425,07	11,62	2786,84	2626,61	0,29
4	8,00	0,400	319,37	267,71	51,66	4892,03	14,68	2761,17	2111,78	0,38
5	8,15	0,510	298,41	244,65	53,76	5425,07	16,41	2770,95	2637,71	0,46
6	9,76	0,120	230,98	184,13	46,85	2115,78	54,91	1011,19	1049,68	0,47
7	9,80	0,560	203,88	198,14	5,34	2160,20	19,40	1006,70	1064,10	0,48
9	9,6	0,110	167,75	138,00	29,75	2204,62	14,16	1078,57	1111,80	0,62

Содержание валового азота в питательной среде снижается с 5,49 г-ат/дм³ в первые сутки до 2,20 г-ат/дм³ на девятые сутки выращивания. При этом отмечаются заметные колебания данных.

В результате проведения такой методической работы были исследованы корреляции между содержанием биогенов и продуктивностью культуры, что позволило выйти на индивидуальный режим работы с культурой при разных условиях выращивания, определять оптимальные сроки внесения азота и фосфора, когда их концентрации в среде начинали приближаться к лимитирующим. При оптимальных условиях выращивания спирулины (температуре 30-35°C) подкормку мочевиной и суперфосфатом осуществляли через каждые 3-4 дня сразу после съёма урожая в дозах, равных половине исходных. Через 2 недели непрерывного культивирования питательную среду обновляли на 2/3 свежим раствором, содержащим полные дозы удобрений и витаминов.

В сентябре-октябре, когда отмечалось замедление роста и деления спирулины, подкормку удобрениями проводили через 6-8 дней после съёма урожая.

Учёт продукции проводили путём прямого подсчёта клеток в счётной камере под микроскопом (окуляр 7X, объектив 20X) ежедневно, по измерению оптической плотности суспензии на фотоэлектрокалориметре КФК-2, на основании определения мутности и цветности при длине волны 315 и 400 нм и толщине слоя кюветы 5 мм. На основании полученных в 1992 г. измерений была построена градуировочная кривая, отражающая зависимость между коэффициентом оптической плотности среды обитания и массой сухого вещества, позволявшая быстро оценивать биомассу и ежесуточные приросты клеток, определять сроки массового сбора, вовремя корректировать процесс культивирования (рис. 1). При высоких плотностях суспензии биомассу спирулины оценивали по содержанию сухого вещества в единице объёма, рассчитанную в г/л суспензии.

Сбор продукции проводили, когда концентрация водоросли в культиваторах достигала не менее 0,6 г/л. Спирулину собирали сачком из газа или плотной ткани, промывали чистой водой и сушили в тени на воздухе. Продукцию в виде сухо-воздушной массы передавали для дальнейших исследований и получения продукции лечебно-профилактического назначения.

Массовое культивирование спирулины осуществляли в июне-октябре 1992 и 1993 гг. в условиях оранжереи и на открытом воздухе в культиваторах открытого типа с применением барботажа и минеральных удобрений.

Для этой цели использовали пластиковые бассейны с площадью водного зеркала от 1,2 до 4 м², общей площадью 25 м², при толщине слоя питательной среды от 7 до 40 см.

В предварительно проведенной серии опытов было установлено, что при выращивании спирулины в условиях оранжереи и на воздухе большое влияние на её биопродуктивность оказывают температура и освещённость, которые в течение светового дня испытывают значительные колебания. В итоге, разница в продуктивности спирулины, выращиваемой в разных условиях оранжереи, может составлять от 0,1 до 0,3 г/дм³. При культивировании спирулины на открытом воздухе зависимость её продуктивности от исследованных факторов проявляется ещё чётче. В 1992 г. наибольший прирост биомассы спирулины отмечен в пластиковом бассейне площадью 3,2 м² при толщине слоя среды 25 см. При температурах ниже оптимальных для этого вида (16-27°C), за четверо суток культивирования был снят урожай, равный 15 г/м², что по литературным данным превышает средние показатели для данного вида, получаемые в специализированных фотореакторах. За 15 суток непрерывного культивирования спирулины в оранжерее на площади 20 м² был получен урожай в среднем равный 5 г/м², а в бассейнах, установленных на южной и западной сторонах оранжереи, — до 25 г/м². Полученные данные свидетельствуют о реальных возможностях управления продуктивностью данного вида в существующих условиях.

В 1993 г. в период массового выращивания объекта тщательно следили за чистотой культуры и условиями её выращивания, своевременностью корректировки среды по основным элементам питания, физиологическим состоянием культуры, что позволило значительно улучшить результаты её выращивания. На рис. 2 приведены результаты полупроточного культивирования спирулины в условиях оранжереи в течение июля-сентября.

Как видим, в течение всего периода выращивания предельные плотности культуры в бассейнах значительно варьировали от 0,7 до 2,5 г/л, что связано, прежде всего, с неоптимальными для роста спирулины условиями. Лето 1993 г. отмечалось большим количеством облачных, холодных дней, значительным перепадом ночных и дневных температур. Тем не менее, урожайность данного вида в условиях оранжереи составила в среднем 19,2 г/м² с предельными значениями от 8,7 до 33,0 г/м².

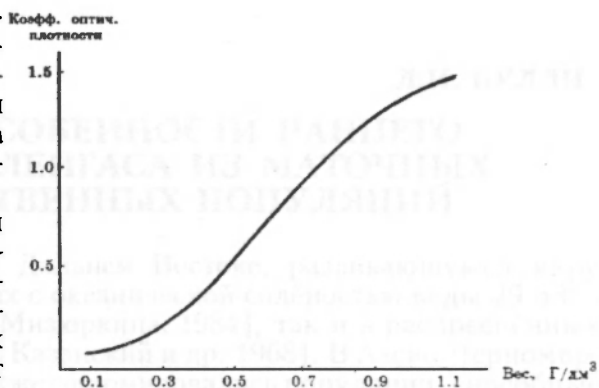


Рис. 1. Градуировочная характеристика сухой массы спирулины относительно оптической плотности среды, замеренной при длине волны 315 нм в кювете К 5 мл

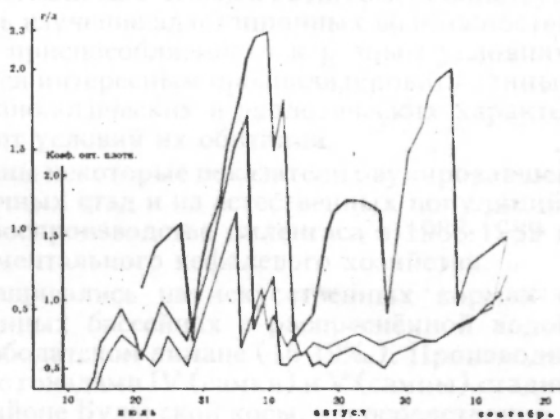


Рис. 2. Выращивание спирулины на среде с минеральными удобрениями в условиях оранжереи в июле-сентябре 1993 г.

