

РЫБНОЕ ХОЗЯЙСТВО, АКВАКУЛЬТУРА И ПРОМЫШЛЕННОЕ РЫБОЛОВСТВО

Научная статья

УДК 639.3(075.8)

**Выращивание хлореллы открытым способом
для повышения продуктивности рыбоводных прудов**

Елена Николаевна Гинатуллина¹, Камол Сабирович Туйчиев², Эльмаз Хакимжановна Рахимджанова³

^{1,2,3} НИИ рыбоводства, Ташкентская область, Янгиюльский район, Узбекистан

¹ ginatullina@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-3462-0908X>

² toychiyevkamoliddin4@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-3104-6867X>

Аннотация. Приведены результаты культивирования хлореллы в открытых фотобиореакторах для улучшения качества воды в рыбоводных прудах. Установлено, что только адаптированные к природным водам штаммы хлореллы можно использовать для массового культивирования хлореллы в открытых системах.

Ключевые слова: *Chlorella*, адаптированный штамм, массовое культивирование, открытые фотобиореакторы, плотность культуры

Благодарности: авторы выражают благодарность за предоставление штамма *Chlorella vulgaris* сотруднику Бухарского государственного университета Эльбеку Джалолову, организатору коммерческого канала в Узбекистане Chlorella Excel Group.

Для цитирования: Гинатуллина Е.Н., Туйчиев К.С., Рахимджанова Э.Х. Выращивание хлореллы открытым способом для повышения продуктивности рыбоводных прудов // Научные труды Дальрыбвтуза. 2022. Т. 61. № 3. С. 50–56.

FISHERIES, AQUACULTURE AND INDUSTRIAL FISHERIES

Original article

Growing *Chlorella* species in the open ponds to increase of fish productivity

Elena N. Ginatullina¹, Kamol S. Toychiyev², Elmaz Kh. Rachimjanova³

^{1,2,3}Institute of Fishery, Tashkent region, Yangiyul province, Uzbekistan

¹ ginatullina@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-3462-0908X>

² toychiyevkamoliddin4@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-3104-6867X>

Abstract. In the paper showed the results of cultivating *Chlorella vulgaris* in the open type of photo bioreactors to improve the water quality of fish ponds productivity. It was established, that for large-scale cultivation of chlorella in open systems we should use some strains adapted to natural waters can be used.

Keywords: Chlorella, adapted strain, mass cultivation, open photo bioreactors, culture density

Acknowledgments: we express our gratitude for a provision of *Chlorella vulgaris* strain by Elbek Jalolov, an employee of the Bukhara State University and an organizer of one commercial channel in Uzbekistan «Chlorella Excel Group».

For citation: Ginatullina E.N., Toychiyev K.S, Rachimjanova E.Kh. Growing *Chlorella* species in the open ponds to increase of fish productivity. *Scientific Journal of the Far Eastern State Technical Fisheries University*. 2022; 61(3): 50–56. (in Russ.).

Введение

Известно, что одноклеточная протококковая водоросль хлорелла содержит большое количество белка – 55 %, и он превосходит по качеству известные растительные белки, так как содержит все необходимые аминокислоты, в том числе незаменимые. Клетки хлореллы в зависимости от их генетических свойств и применяемых воздействий могут быть превращены в системы, направленно синтезирующие белки, углеводы или жиры, что открывает принципиальные возможности управления не только интенсивностью, но и качественной стороной биосинтеза у микроводорослей [2, 8, 9].

Хлорелла имеет большое значение при культивировании естественных кормов, используемых для выращивания растительноядных рыб. Так, применение хлореллы в рыбоводстве обосновано по многим причинам, так как приводит к уменьшению условно-патогенной микробиоты, увеличивает иммунитет рыб, увеличивает кормовую ценность и биомассу зоо- и фитопланктона, и поэтому в целом увеличивает выход товарной рыбы на всех этапах развития (малек, личинка, сеголетка, годовик).

Наш эксперимент по культивированию хлореллы проводился в НИИ рыбоводства Янгиюльского района Ташкентской области. Основная исследовательская цель – научиться выращивать хлореллу в открытых фотобиореакторах, оптимизировать технологию её культивирования, чтобы эффективно использовать суспензию в рыбоводных прудах для выращивания поликультуры карповых рыб.

Объекты и методы исследований

Эксперименты с двумя штаммами хлореллы проводили весной и летом 2022 г. (апрель–июнь). В нашем исследовании мы использовали 2 разных штамма *Chlorella* sp.2. Штамм *Chlorella* sp.2 выращивали первоначально как маточную культуру в 20 л стеклянных баллонах на среде Тамия (при концентрации азота 2,5 и 5 г/л) на дистиллированной воде; при этом подавали для хлореллы через компрессор воздух (концентрация CO₂ 0,03 %). В лабораторных условиях штамм *Chlorella* sp.2 очень хорошо и быстро развивался при температуре от 22–26 °С. Начальная концентрация клеток хлореллы в маточной культуре в наших экспериментах на среде Тамия составила 110–130 тыс. клеток на 1 мл.

Для измерения рН культурной среды *Chlorella* sp.2 использовали сенсорный мультипараметр (Biobase 900). Водородный показатель составлял в начальной стадии эксперимента рН=4,8, в конце эксперимента – рН=6,5 для среды Тамия 5 г/л азота и от 8 до 9 для среды Тамия 2,5 г/л азота. Для внешнего освещения культуры использовали лампы полного светового спектра с преобладанием синего (400–500 нм) и красного (600–700 нм) цветов.

Для массового культивирования хлореллы на открытом воздухе и при естественном свете мы использовали другой штамм хлореллы *Chlorella vulgaris* (полученный от владельца группы Chlorella excel group, Бухарский государственный университет). С этим штаммом мы проводили эксперименты в таких открытых фотобиореакторах из искусственных непрозрачных материалов, как 400-литровые еврокубы, 7-тонный полиуритановый бассейн и система закольцованных бетонных бассейнов. Температура среды во время эксперимента составляла

от 24 и выше 33 °С. Для этого эксперимента мы использовали смесь удобрений: селитры, мочевины, аммофоса и коровьего перепревшего навоза. В этом случае рН суспензии хлореллы также возрастала от 6,5 в начале эксперимента, до 8,9 – на седьмой день эксперимента. Начальная концентрация клеток *Chlorella vulgaris* составила 110 тыс. клеток на 1 мл.

На полный объем питательной среды во всех экспериментах добавляли 10 % суспензии хлореллы.

Результаты и их обсуждение

Для получения высокой продуктивности микроводоросли важную роль играет совместное действие нескольких факторов среды: концентрация биогенных элементов, перемешивание культуры, рН среды (концентрация углекислого газа), температура, интенсивность и качество освещения, высота слоя в фотобиореакторе, технологичность процесса [1, 4, 6].

Эксперименты с маточной культурой. Результаты параметров маточной культуры *Chlorella* sp.2 при выращивании в закрытом 20 л стеклянном фотобиореакторе (искусственное освещение) были следующие. Начальная концентрация культуры хлореллы на среде Тамия 5 г/л составила 130 тыс., а в конце эксперимента на 21-й день – 8 млн 300 тыс. клеток/мл. Максимальная плотность клеток хлореллы в этом эксперименте была зарегистрирована на 16-й день культивирования при температуре водной среды 24 °С и рН=6,5–13 млн 250 тыс. клеток в 1 мл суспензии. Нужно отметить, что продуктивность исследуемого нами штамма хлореллы не является сама по себе высокой. Однако снижение продуктивности хлореллы в этом эксперименте могло ограничиваться несколькими факторами. В первую очередь, это световое насыщение культуры, вероятнее всего, оно стало недостаточным после достижения максимальной плотности культуры. В этом эксперименте рН среды на 16-й день составляла 6,5, т.е. в питательной среде в это время все еще не наблюдалось недостатка питательных веществ. Насыщение углекислым газом культуры при такой низкой концентрации клеток хлореллы не является лимитирующим фактором. Кроме того, фактором, снижающим продуктивность хлореллы, могло быть перенасыщение суспензии кислородом, которое приводит к фотоокислению и повреждению рецепторов.

Второй эксперимент с маточной культурой *Chlorella* sp.2 мы провели, используя культурную среду Тамия с концентрацией азота 2,5 г/л. Начальная концентрация культуры хлореллы составила в этом случае 110 тыс. клеток/мл. Эксперимент в этом случае продолжался 20 дней, культура росла медленнее, чем в первом случае, и максимальная плотность клеток наблюдалась в конце эксперимента и составила 5 млн 540 тыс. клеток. Вероятнее всего, ограничивающим фактором для роста *Chlorella* sp.2 была недостаточная концентрация азота, что и ограничило рост культуры с самого начала. В пользу этого фактора свидетельствует высокий рН среды с самого начала эксперимента.

Несмотря на то, что клетки штамма *Chlorella* sp.2 хорошо чувствовали себя в дистиллированной воде на среде Тамия, культура неоднократно погибала через каждые три дня культивирования на грунтовой воде, которая обладала повышенной минерализацией и жесткостью по сравнению с дистиллированной водой. Таким образом, все наши попытки адаптации культуры к грунтовой воде приводили к отрицательному результату.

Поэтому на следующем этапе исследования мы экспериментировали с адаптированным к природной воде штаммом *Chlorella vulgaris* (штамм, полученный от *Chlorella excel* group, г. Бухара). Маточную культуру *Chlorella vulgaris* получали способом описанным выше. Далее для массового культивирования хлореллы использовали в качестве фотобиореакторов открытого типа 400-литровые “еврокубы”.

При культивировании хлореллы для использования в рыбоводных прудах лучше всего выращивать штаммы, выделенные из водоемов и адаптированные многолетним культивированием к природным водам с повышенной минерализацией и жесткостью и

недостатку углекислого газа. Адаптированная хлорелла от *Chlorella excel group* легко культивируется на грунтовых водах нашего НИИ рыбоводства, но следует отметить, что токсикологические параметры прудовой воды все же очень важны для выращивания хлореллы, т.е. вода не должна содержать токсичных веществ, таких, как тяжелые металлы, СПАВы и остатки нефтепродуктов [5, 10].

Для культивирования адаптированного штамма хлореллы на грунтовых водах мы использовали различные питательные среды: Тамия, Кнопа, Тамия, Чу 13. Для массового культивирования хлореллы мы остановились на использовании питательной смеси из нескольких минеральных удобрений, которые были достаточно эффективны и бюджетны для ее культивирования в открытых системах. Такую питательную среду готовили путем растворения 0,4 г селитры, 0,2 г мочевины и 0,1 г аммофоса и коровьего перепревшего навоза 150 мг на 1 л дистиллированной воды. При этом позволяли смеси отстояться и использовали 3-дневный питательный раствор.

Первоначальное количество клеток хлореллы, размещенных снаружи в еврокубе, составляло около 100 тыс., но, используя раствор вышеуказанных солей и органического навоза, количество клеток хлореллы в среде увеличивалось до 1 млн в течение 3 дней. Температура воды во время эксперимента в еврокубе составляла от 24–31 °С. Результаты 7-дневного эксперимента с выращиванием хлореллы двух штаммов с разными параметрами культурной среды и условиями культивирования показаны в таблице.

Параметры культивирования двух штаммов: *Chlorella* sp.2 на питательной среде Тамия 5 г/л азота (дистиллированная вода и искусственное освещение, 20 л) и *C. vulgaris* на среде из мочевины, селитры, аммофоса (грунтовая вода и естественное освещение)

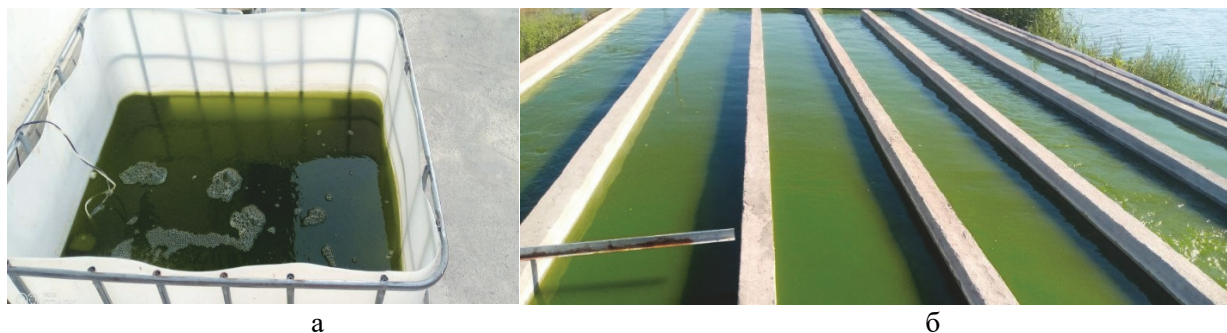
Cultivation parameters of 2 strains: *Chlorella* sp.2 on a nutrient medium of Tamium 5 g/l of nitrogen (distilled water and artificial lighting, 20 l) and *C. vulgaris* on a medium of urea, saltpeter, ammophos (ground water and natural lighting)

Продолжительность эксперимента	Температура, °С	pH	Концентрация клеток в 1 мл среды <i>C. vulgaris</i>	Температура, °С	pH	Концентрация клеток в 1 мл среды <i>Chlorella</i> sp.2
1-й день	24	6,5	110000	22	4,5	130000
2-й день	24,7	7,3	376000	23	4,5	450000
3-й день	25,6	7,5	570000	24	5,0	980000
4-й день	26,7	8,0	840000	24,5	5,4	1.940000
5-й день	27,5	8,2	986000	24	6,0	2.925000
6-й день	30	8,5	1.350000	26	6,2	3.568000
7-й день	31,3	8,9	1.460000	26	6,5	4.020000

В эксперименте со штаммом *Chlorella vulgaris* происходило очень быстрое повышение pH среды, так что на 7-й день pH воды составляла около 9. Кроме того, происходило быстрое повышение температуры питательной среды, которая на 7-й день была выше 31 °С, что и вызывало в дальнейшем не только снижение скорости роста хлореллы, но и ее гибель. Так, авторы [5, 6] указывают, что повышение температуры увеличивает темп роста микроводорослей. Однако, если температура превышает критическое значение, темп роста идет на спад. Критическое значение температуры различно для разных штаммов водорослей; рост ее, как и всех микроводорослей, прекращается совсем при температуре ниже +5 и выше +30 °С. Для *Chlorella vulgaris* диапазон оптимальных температур составляет 20–26 °С.

Использование больших объемов для выращивания хлореллы, таких, как 7-тонный порлиуритановый бассейн, наполненный 5 т воды, в условиях высокой летней радиации (бассейн был выставлен на солнечной стороне для лучшего освещения культуры, а для перемешивания суспензии использовались водяные насосы; высота слоя культуры составила 70 см) уже на третьи сутки привело к повышению температуры воды в дневное время свыше 33 °С, что вызвало быструю гибель клеток хлореллы.

Далее мы провели эксперименты с культивированием *Chlorella vulgaris* в бетонных бассейнах, которые показали, что хлорелла здесь размножается лучше, чем в еврокубах или любых других объемах из искусственного материала, несмотря на то, что в еврокубе высота слоя культуры составляла 45 см, а в бетонных бассейнах – 70 см. Более высокой продуктивности культура хлореллы достигается не только благодаря лучшему освещению, но и разным видам создаваемого течения: создаваемого аэратором – турбулентному в еврокубе, и ламинарному, создаваемого насосом, в бетонных бассейнах (рисунок, а, б). Кроме того, культура хлореллы в бетонном бассейне не подвергается сильному перегреву и токсичному влиянию выделяющихся из-за высокого солнечного излучения токсичных веществ, к которым хлорелла очень чувствительна.



Выращивание хлореллы в открытом 400-литровом биореакторе из искусственного непрозрачного материала (а), в системе бетонных каналов (б)

Chlorella cultivation in an open 400 l bioreactor made of artificial opaque material (a),
in a system of concrete channels (б)

При получении первоначальной суспензии хлореллы в 400-литровом еврокубе, когда количество клеток превышает 1 млн (см. таблицу), уже через 1 неделю можно брать половину суспензии и выливать в бетонные бассейны, при этом каждые 3 дня добавлять ½ объема питательных веществ. На 1 т суспензии каждые 3 дня мы использовали следующие соли: селитра – 400 г, мочевины – 200 г, аммофос – 100 г. Внесение питательного раствора в суспензию каждые 3 дня приводит к более быстрому росту клеток.

Для более высокой продуктивности в литературе рекомендуется подавать углекислый газ в концентрации 5 % [5]. Естественно, в наших экспериментальных условиях концентрация CO₂ составляла 0,03 % (подавалась вместе с воздухом компрессора) и это ограничивало достижение более высокой продуктивности, однако для выращивания хлореллы в открытых условиях рыбоводных хозяйств эта продуктивность достаточна, чтобы насытить пруды кислородом и обеспечить доминирование зеленых водорослей над комплексом синезеленых водорослей. Так, при внесении полученной суспензии хлореллы в пруды с поликультурой растительноядных и бентосоядных карповых рыб в количестве 200 л/га содержание кислорода в прудах с 4 повышалось до 7 мг/л. Если превышение концентрации углекислого газа не критично для микроводорослей, то концентрация кислорода не должна превышать точку перенасыщения, иначе это приводит к фотоокислению; причиняет вред световым рецепторам

микроводорослей, вследствие чего их продуктивность снижается [7]. Эта проблема решается путем установки газообменных камер в систему фотобиореактора [3].

Заключение

При выращивании маточной культуры хлореллы на среде Тамия лучше использовать среду с нормальным содержанием азота – 5 г/л, так, среда с концентрацией азота 2,5 г/л лимитирует рост культуры. Что касается технологии массового выращивания адаптированных к природным водам штаммов хлореллы, то мы бы рекомендовали следующее. Наиболее эффективно для повышения рыбопродуктивности прудов технология культивирования штамма *Chlorella vulgaris* состоит в том, чтобы на первом этапе в течение 7 дней использовать фотобиореакторы средних объемов (для нас подходящим объемом стал 400-литровый еврокуб); наилучшая позиция для установки еврокубов – это, когда солнце попадает на культуру только в утренние часы, а в дневное и вечернее время, когда температура воздуха превышала 40 °С, он оставался в тени и не подвергался перегреву. На втором этапе культивирования хлореллы очень хорошо подходят бетонные бассейны или система каналов, откуда вода непосредственно поступает в рыбоводные пруды.

Список источников

1. Аманов Ч.А. Температурный и радиационный режим промышленных фотореакторов по производству хлореллы. Д.: Ылым, 1989. 308 с.
2. Бондаренко, Е.В. Перспективы использования полостных фотобиореакторов в замкнутых системах жизнеобеспечения / Е.В. Бондаренко, П.А. Гладышев, В.А. Жаворонков, Д.А. Казенин // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы 11-й Междунар. конф. Ялта, 2003. С. 225–226.
3. Глушук Л.П. Аппаратурно-технологическое оформление процесса культивирования спирулины: дис. ... канд. техн. наук: 03.00.23 / Глушук Леонид Павлович. М., 2000. 130 с.
4. Гончаров, А.Ю. Зависимость удельной продукции микроводорослей от обеспеченности поверхности клеток биогенными элементами / А.Ю. Гончаров, А.Б. Зотов // Экология моря. 2003. Вып. 64. С. 51–55.
5. Мещерякова Ю.В. Разработка технологического процесса получения биодобавок из липидных компонентов микроводоросли хлорелла для улучшения свойств дизельного топлива: дис. ... канд. техн. наук. Тамбов, 2016. 165 с.
6. Музафаров, А.М. Культивирование и применение микроводорослей: монография / А.М. Музафаров, Т.Т. Таубаев. УзССР: Фан, 1984. 136 с.
7. Plyushina T.Yu., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. // Photosynthesis Research for Sustainability-2016: тезисы 7th International Conference. Пущино, Московская область, Россия, 19–25 июня 2016.
8. Сифери О. Удивительная водоросль – перспективный источник белка // За рубежом. 1981. № 49(1118). С. 21
9. Шмигель В.В., Суховский Н.А. Выращивание микроводоросли *Chlorella vulgaris* под воздействием электростатического поля. Ярославль, 2020. С. 9–10.
10. Упитис В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей: монография. Рига: Зинатне, 1983. 239 с.

References

1. Amanov Ch.A. Temperature and radiation regime of industrial photoreactors for the production of chlorella. D.: Ylym, 1989. 308 p.

2. Bondarenko, E.V. Prospects for the use of cavity photobioreactors in closed life support systems / E.V. Bondarenko, P.A. Gladyshev, V.A. Zhavoronkov, D.A. Kazenin // *New information technologies in medicine, biology, pharmacology and ecology: materials of the 11th International Conference*. Yalta, 2003. P. 225–226
3. Glushchuk L.P. Hardware and technological design of the spirulina cultivation process: dis. ...Candidate of Technical Sciences: 03.00.23 / Leonid Pavlovich Glushchuk. M., 2000. 130 p.
4. Goncharov, A.Yu. The dependence of the specific production of microalgae on the provision of the cell surface with biogenic elements / A.Yu. Goncharov, A.B. Zotov // *Ecology of the sea*. 2003. Issue 64. P. 51–55.
5. Meshcheryakova Yu.V. Development of a technological process for obtaining dietary supplements from lipid components of chlorella microalgae to improve the properties of diesel fuel: dis. ... Candidate of Technical Sciences. Tambov, 2016. 165 p.
6. Muzafarov, A.M. Cultivation and application of microalgae: monograph / A.M. Muzafarov, T.T. Taubaev. UzSSR: Fan, 1984. 136 p.
7. Plyushina T.Yu., Riznichenko G.Yu., Rubin A. B. // *Photosynthesis Research for Sustainability-2016: abstracts 7th International Conference*. Pushchino, Moscow Region, Russia, June 19–25, 2016.
8. Siferi O. Amazing algae – a promising source of protein // *Abroad*. 1981. № 49(1118). P. 21.
9. Shmigel V.V., Sukhovskiy N.A. Cultivation of microalgae chlorella vulgaris under the influence of an electrostatic field. Yaroslavl, 2020. P. 9–10.
10. Uptis V.V. Macro- and microelements in the optimization of mineral nutrition of microalgae: monograph. Riga: Zinatne. 1983. 239 p.

Информация об авторах

Е.Н. Гинатулина – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, зав. лабораторией «Рыбоводство в естественных водоемах», Scopus AuthorID: 56520274600;
К.С. Туйчиев – свободный соискатель PhD, и.о. зав. лабораторией «Корма и кормление рыб»;
Э.Х. Рахимжанова – лаборант лаборатории химического анализа, бакалавр Аграрного университета.

Information about the authors

E.N. Ginatullina – PhD in Biological Sciences, Senior scientific researcher, Head of the Laboratory «Fishery in the natural water bodies», Scopus AuthorID: 56520274600;
K.S. Tuychiev – free PhD applicant, acting Head of the Laboratory «Fodder and feeding of fish»;
E.Kh. Rakhimzhanova – Assistant of Laboratory of Chemical Analysis, Bachelor's degree student of Agrarian University.

Статья поступила в редакцию 27.09.2022; одобрена после рецензирования 02.10.2022; принята к публикации 06.10.2022.

The article was submitted 27.09.2022; approved after reviewing 02.10.2022; accepted for publication 06.10.2022.