

## Выращивание *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler на сточных водах птицефабрик

© 2020. С. Ю. Горбунова, к. б. н., с. н. с.,

И. Н. Гудвилевич, к. б. н., с. н. с.,

Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей  
им. А. О. Ковалевского» Российской академии наук,  
299011, Россия, г. Севастополь, пр. Нахимова, д. 2,  
e-mail: svetlana\_8423@mail.ru, gudirina2008@yandex.ru

Проведено исследование роста цианобактерии *Spirulina (Arthrospira) platensis* на вытяжке куриного помёта (ВКП). Показано, что концентрации ВКП 20–30% позволяют увеличить урожай культуры на 10–20% по сравнению с контролем и получить биомассу *S. platensis*, содержащую значительные количества биологически активных веществ. Экспериментально установлено, что содержание белка, хлорофилла *a* и С-фикоцианина в клетках *S. platensis* увеличивается на линейной стадии роста культуры в 2,5–6 раза при повышении объёмной доли ВКП в питательной среде от 5 до 30%. Получаемая при таком способе культивирования биомасса *S. platensis* по содержанию белка, хлорофилла *a*, каротиноидов и С-фикоцианина, в основном, соответствует критерию качественной биомассы (51; 1,1; 0,4 и 5,5% соответственно). Подход, предложенный в работе, позволяет снизить материальные затраты на приготовление классических минеральных питательных сред для культивирования микроводорослей.

**Ключевые слова:** *Spirulina (Arthrospira) platensis*, микроводоросли, куриный помёт, биологически активные вещества.

## Cultivation of *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler on waste water of poultry farms

© 2020. S. Yu. Gorbunova ORCID: 0000-0003-2770-1221\*

I. N. Gudvilovich ORCID: 0000-0001-7412-8283\*

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS,  
2, Nakhimova Prospekt, Sevastopol, Russia, 299011,  
e-mail: svetlana\_8423@mail.ru, gudirina2008@yandex.ru

The investigation of cyanobacteria *Spirulina (Arthrospira) platensis* growth in the chicken manure extract (MCE) was carried out. The content of nitrogen and phosphorus in 1 liter of nutrient medium prepared on the basis of chicken manure extract is calculated. It is experimentally shown that the extraction of chicken manure in a concentration of 5–15% causes serious violations of the pigments biosynthesis processes. In this case, the protein and photosynthetic pigments contents in the cells of the *S. platensis* is significantly reduced by the 6th days and leads to the culture death. Increasing the volume fraction of the MCE in the nutrient medium has a significant impact on the pigments contents and total protein in the cyanobacteria biomass. Optimum concentrations of extract (20–30%), which provide a high rate of spirulina growth and the accumulation of biologically active substances in the obtained biomass, were determined. It was shown that 20–30% of MCE concentration allows to increase culture yield by 10–20% compared to control sample and to obtain the *S. platensis* biomass containing significant amounts of biologically active substances. It was found that the content of protein, chlorophyll *a* and C-phycoyanin in the *S. platensis* cells increased 2.5–6 times at the linear stage of culture growth at the increase of the volume fraction of MCE in the nutrient medium from 5 to 30%. *S. platensis* biomass, produced from such cultivation process, meets the criteria of high-quality biomass contents of protein, chlorophyll *a*, carotenoids and C-phycoyanin (51, 1.1, 0.4 and 5.5% correspondingly). The approach proposed in the paper allows to reduce material costs for the traditional mineral media preparation for microalgae cultivation.

**Keywords:** *Spirulina (Arthrospira) platensis*, cyanobacteria, chicken manure, biologically active substances.

Высокая эффективность и популярность культивирования цианобактерии *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler (синоним *Arthrospira platensis* (Nordst.) Gomont) объясняется её способностью накапливать значительное количество белка (до 60–70%), содержащего все незаменимые аминокислоты, а также пигменты С-фикоцианин (до 10%) и β-каротин (до 1%), являющиеся антиоксидантами [1–4]. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о способности микроводорослей и цианобактерий (ЦБ) (в том числе, и *S. platensis*) поддерживать стабильно высокую скорость деления клеток как на традиционных минеральных питательных средах, так и на средах, содержащих отходы сельскохозяйственных комплексов, в частности, птицефабрик [5–8]. Куриный помёт содержит все необходимые вещества, обеспечивающие рост культуры, ценнейшие микроэлементы: медь, марганец, цинк, кобальт, бор, а также биоактивные вещества (в том числе, ростовые вещества – ауксины), что позволяет значительно снизить затраты на приготовление питательных сред для выращивания спирулины [8, 9]. Биомасса микроводорослей, полученная в ходе биологической очистки стоков, позволяет обогатить основной рацион сельскохозяйственных животных благодаря находящемуся в её составе большому количеству белка, незаменимых аминокислот, углеводов, макро- и микроэлементов, витаминов, что позволит решить ряд ветеринарных проблем, получить дополнительные привесы и улучшить качество продукции животноводства [10, 11]. Кроме того, подобный подход позволяет решить острую проблему утилизации отходов сельскохозяйственных производств, которые накапливаются в огромных количествах и наносят ущерб экосистемам [8, 9, 12].

В связи с вышеизложенным, актуальным становится разработка основ культивирования *S. platensis* на средах, приготовленных на основе вытяжки куриного помёта (ВКП).

Целью данной работы являлся подбор оптимальных концентраций ВКП, обеспечивающих высокую скорость роста спирулины и накопление биологически активных веществ в получаемой биомассе.

### Объекты и методы исследования

Эксперименты выполняли на базе Отдела биотехнологий и фиторесурсов Федерального исследовательского центра «Института био-

логии южных морей им. А.О. Ковалевского» (ФИЦ ИнБЮМ) г. Севастополь. Объектом исследования являлась культура ЦБ *S. platensis* (Nordst.) Geitler (*Arthrospira platensis* (Nordstedt) Gomont) штамм IMBR-31 из коллекции Научно-образовательного ЦКП ФГБУН ИМБИ «Коллекция гидробионтов Мирового океана». Культуру выращивали накопительным способом в стеклянных культиваторах плоскопараллельного типа с рабочим объёмом 3 л [13]. Интенсивность освещения составляла в среднем 16 кЛк, температура питательной среды – 27–30 °С, pH – 8–11 ед. В качестве органической питательной среды использовали ВКП в концентрациях 5, 10, 15, 20, 25 и 30% по объёму; в качестве контроля – минеральную среду Заррук [14]. Вытяжку получали путём сбраживания в течение трёх сут куриного помёта молодняка вязко-сыпучей консистенции влажностью 46% (домашняя птица) и водопроводной воды в соотношении 1:9 [9, 10]. В питательную среду дополнительно вносили гидрокарбонат натрия в количестве, соответствующем его концентрации в среде Заррук (16,8 г/л). Содержание сухого вещества (СВ) в культуре (СВ) определяли фотометрическим методом [15]. Содержание С-фикоцианина (С-ФЦ), хлорофилла *a* (Хл *a*) и каротиноидов (Кар) определяли спектрофотометрическим методом [3, 16], белка – по [17] на различных фазах роста культуры. Хл *a* и Кар экстрагировали из клеток ЦБ ацетоном. Для количественного определения содержания С-ФЦ в биомассе *S. platensis* проводили её экстракцию фосфатным буфером (0,05М; pH = 7–7,5 ед.). Расчёт концентраций пигментов проводили по формулам, предложенным в работах [3, 16]. Все расчёты проводили для уровня значимости  $\alpha = 0,05$ . В таблицах и на графиках представлены средние значения и рассчитанные доверительные интервалы ( $\bar{x} \pm \Delta \bar{x}$ ).

### Результаты и обсуждение

Предварительно, опираясь на данные по химическому составу куриного помёта [9, 10], был проведён расчёт содержания азота и фосфора в 1 л питательной среды, приготовленной на основе ВКП (табл. 1). При расчёте принимали, что первоначальное содержание азота в помёте 1,5%, а фосфора – 1%, потери азота в процессе сбраживания составляют 30% [9, 10].

Эксперимент по выращиванию *S. platensis* на среде с ВКП концентрацией 5–30% длился 14 сут (рис. 1).

Таблица 1 / Table 1

Расчётная концентрация N и P в питательной среде при выращивании *S. platensis*  
 Estimated concentration of N and P in the culture medium for *S. platensis* growth

Варианты / Variants	Концентрация / Concentration		
	ВКП, % / МСЕ, %	N, мг/л / mg/L	P, мг/л / mg/L
А – контроль / control	0	412	90
В	5	52,5	50
С	10	105	100
Д	15	157,5	150
Е	20	210	200
F	25	262,5	250
G	30	315	300

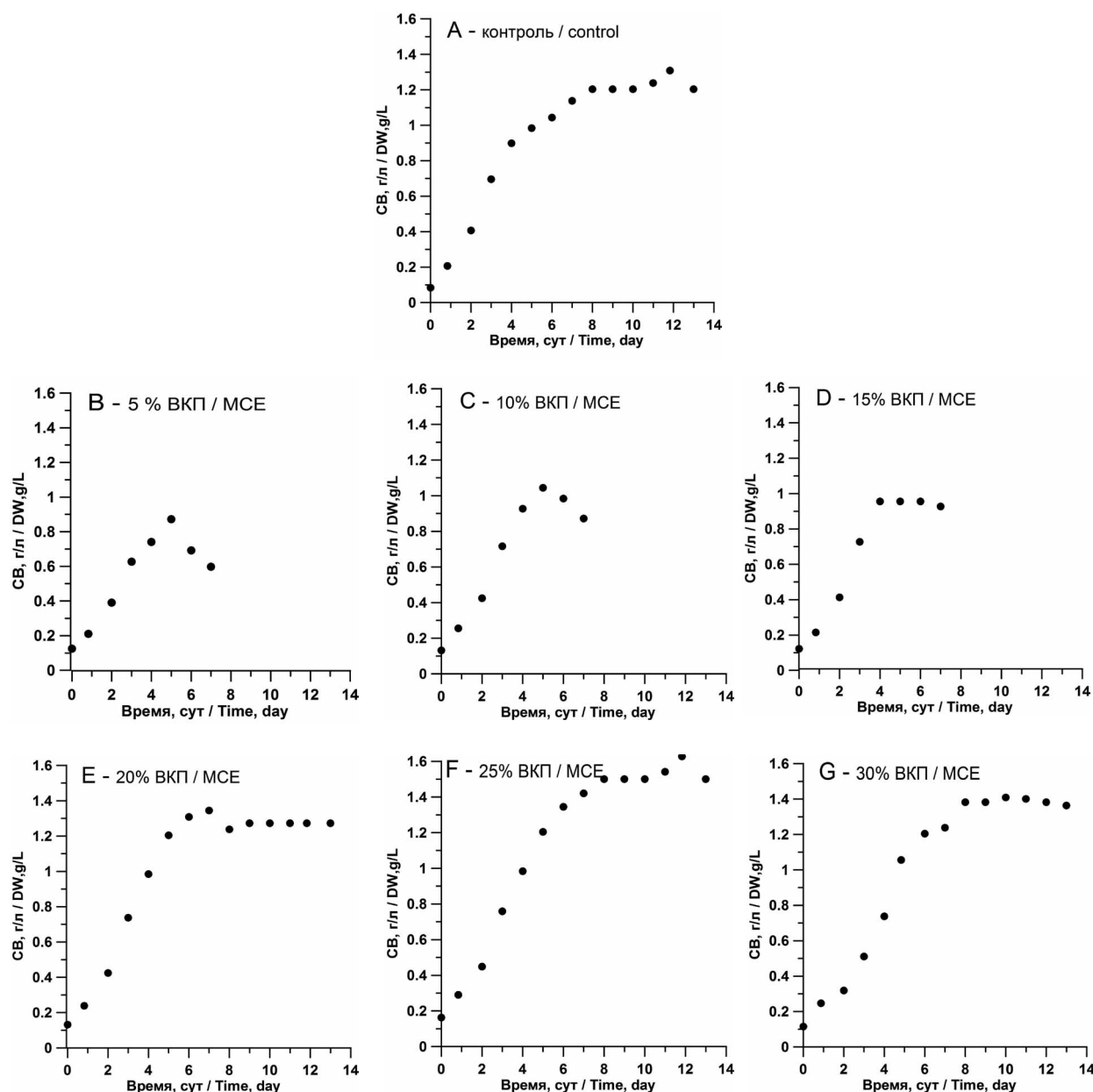


Рис. 1. Динамика плотности культуры *S. platensis*  
 (CB – сухое вещество, ВКП – вытяжка куриного помёта)  
 Fig. 1. Dynamics of *S. platensis* crop density  
 (DW – dry weight, МСЕ – the chicken manure extract)

На среде с концентрацией ВКП 5–15% (варианты В, С, D) максимальная плотность культуры *S. platensis* была на 30% ниже, а на среде с концентрацией ВКП 25–30% (варианты F, G) – на 10% выше, чем в контрольном варианте (рис. 1). Для синтеза 1 г биомассы *S. platensis* (при оптимальных условиях) с содержанием белка 60–65% необходимо около 100 мг азота [18], поэтому рост культуры в варианте эксперимента В был ограничен начальной концентрацией азота в среде (53 мг/л) (рис. 1В). В вариантах эксперимента С и D концентрация азота по предварительным расчётам (105–158 мг/л) была достаточной для синтеза 1 г и выше биомассы спирулины с нормальным содержанием белка и пигментов. Тем не менее, на 6-е сут эксперимента было отмечено замедление роста спирулины и жёлтая окраска трихом, что, как правило, свидетельствует о лимитировании роста клеток и биосинтеза пигментов микроводорослей азотом (рис. 1В, С, D). По-видимому, культура *S. platensis* израсходовала минеральный азот, находящийся в наиболее предпочтительной азотнокислой форме, составлявший только часть от общего количества азота в питательной среде, т. е. для вариантов эксперимента с концентрацией ВКП 5–15% ограничивающим фактором (учитывая прирост биомассы) являлась концентрация доступных форм неорганического азота в среде. Питательная среда Заррук рассчитана для синтеза около 4 г биомассы *S. platensis*, однако прирост биомассы в контрольном варианте составил около 1,2 г/л, по-видимому, рост культуры был ограничен интенсивностью освещения, поскольку все остальные условия были оптимальны. Более высокий прирост плотности культуры *S. platensis* (до 10%) по сравнению с контролем при концентрации

ВКП в среде 25–30%, вероятно, объясняется наличием в курином помёте биостимуляторов, перешедших в водный раствор ВКП [9, 10].

При концентрации ВКП 5% все рассчитанные ростовые характеристики были значительно ниже, чем в контрольном варианте: максимальная скорость роста – на 17%, средняя продуктивность культуры (за 6 сут) и максимальный урожай – на 40% (табл. 2).

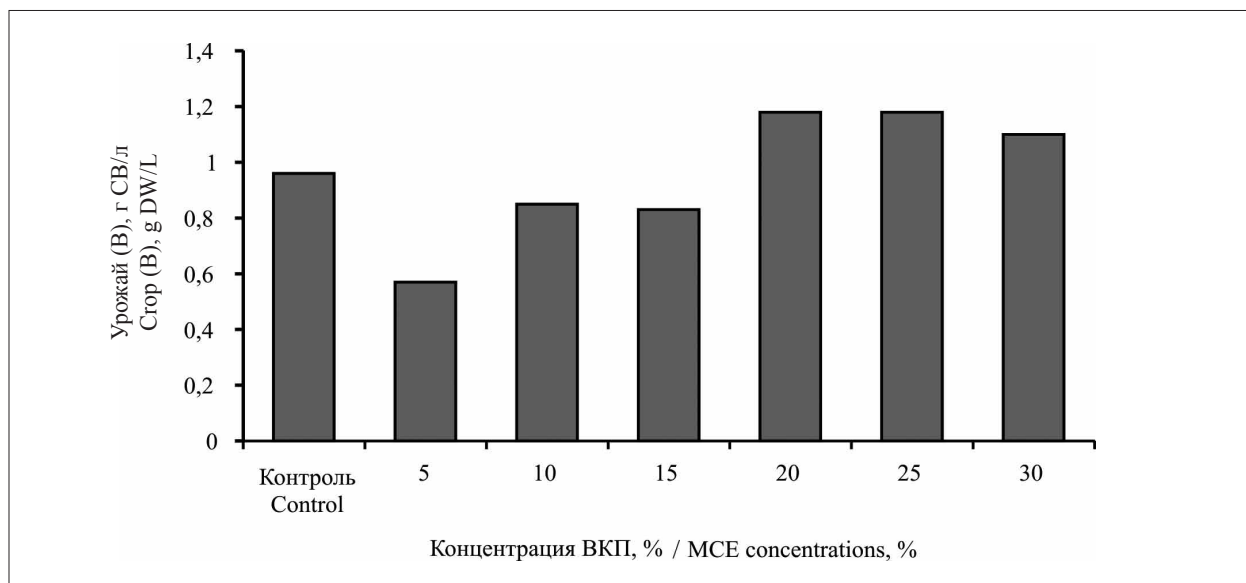
Максимальный урожай и средняя скорость роста при концентрации ВКП 10–15% также оказались ниже контрольного варианта (на 30 и 13% соответственно), что, по-видимому, свидетельствовало о всё ещё недостаточном обеспечении культуры элементами минерального питания. Концентрации ВКП 20–30% оказались оптимальными, они обеспечивали наиболее интенсивный рост спирулины. При этом урожай культуры (как средний за 6 сут, так и максимальный), в основном, был выше, чем в контроле, на 10–20%. Повышение концентрации ВКП в среде от 5 до 30% оказывало значительное влияние на ростовые характеристики *S. platensis*, вызывая увеличение как средней скорости роста, так и урожая за 6 суток в 2 раза (рис. 2).

Содержание белка, Хл а и С-ФЦ в клетках *S. platensis* в процессе культивирования для всех вариантов эксперимента уменьшалось (рис. 3). В вариантах эксперимента с ВКП 5–15% содержание белка и фотосинтетических пигментов в клетках *S. platensis* к 6-м сут снизилось до крайне низких величин; максимальное снижение отмечено для С-ФЦ: к 3-м сут его количество уменьшилось на 80–90% от первоначального содержания, а к 6-м – ещё дополнительно на 25–50%. Такие изменения вызвали серьёзные нарушения процессов биосинтеза, что привело к гибели культуры после семи суток.

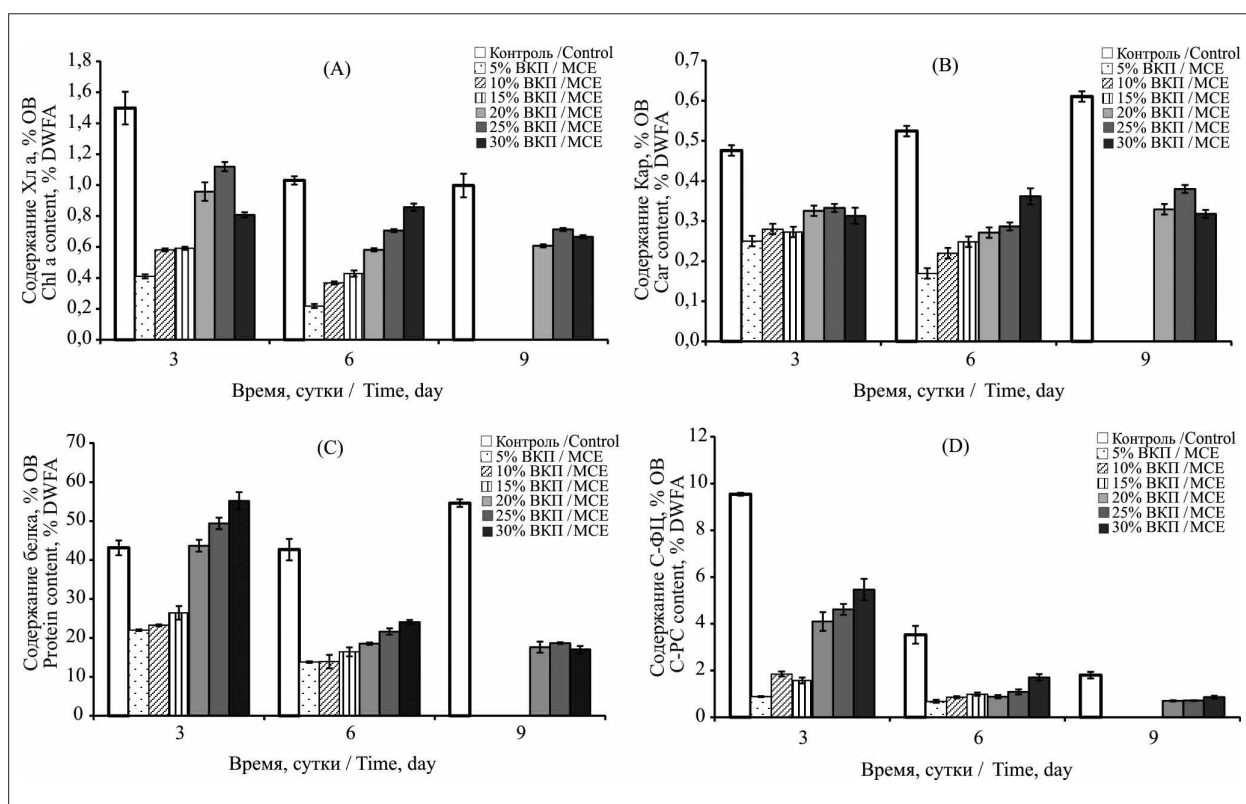
Таблица 2 / Table 2

Параметры роста *S. platensis* / Parameters of *S. platensis* growth

№	Концентрация вытяжки, % Extract concentration, %	Максимальная продуктивность, г СВ/л сут Maximal productivity, g DW/L day	Средняя скорость роста за 6 сут, г СВ/л сут Average growth rate for 6 day, g DW/L day	Максимальный урожай, г СВ/л Maximum crop, g DW/L
A	0 (контроль/control)	0,23	0,16	1,22
B	5	0,19	0,10	0,75
C	10	0,26	0,14	0,85
D	15	0,28	0,14	0,83
E	20	0,27	0,20	1,22
F	25	0,28	0,20	1,34
G	30	0,24	0,18	1,27



**Рис. 2.** Зависимость урожая (B) *S. platensis* за 6 суток от концентрации вытяжки куриного помета в питательной среде  
**Fig. 2.** Dependence of the *S. platensis* crop for 6 days on the chicken manure extract concentrations in the nutrient medium



**Рис. 3.** Изменение химического состава культуры *S. platensis* при выращивании на ВКП: А – Хл а; В – Кар; С – белка; D – С-ФЦ  
**Fig. 3.** Changes in the chemical composition of *S. platensis* cultures at the growing on MCE: A – chlorophyll a (Chl a); B – carotenoids (Car); C – protein; D – C-phycoerythrin (C-PC)

Таблица 3 / Table 3

Химический состав *S. platensis* (линейная фаза роста)  
Chemical composition of *S. platensis* (linear growth phase)

Параметр Parameter	Концентрация ВКП в питательной среде, % The concentration of MCE in the nutrient medium, %						
	0	5	10	15	20	25	30
Белок, % Protein, %	43,1±1,9	22,0±0,2	23,3±0,3	27,8±1,7	43,7±1,5	49,4±1,5	55,2±2,2
Хл <i>a</i> , % Chl <i>a</i> , %	1,50±0,11	0,41±0,01	0,58±0,01	0,59±0,01	0,96±0,06	1,12±0,03	0,86±0,02
Кар, % Car, %	0,48±0,01	0,25±0,01	0,27±0,01	0,28±0,01	0,33±0,01	0,37±0,01	0,36±0,02
С-ФЦ, % С-РС, %	9,5±0,1	0,9±0,1	1,8±0,1	1,6±0,1	4,1±0,4	4,6±0,2	5,5±0,4

Следует отметить, что содержание Хл *a* и С-ФЦ в процессе роста культуры снижалось и в контрольном варианте эксперимента, однако, снижение проходило медленнее, чем в экспериментальных вариантах. Так, к 3-м сут выращивания *S. platensis* содержание Хл *a* и С-ФЦ в контроле оставалось на уровне первоначальных значений, значительное снижение отмечено к 6-м сут: на 15 и 60% (Хл *a* и СФЦ соответственно). Что касается суммарных каротиноидов, то их содержание для экспериментальных вариантов было, в среднем, в 1,5–2 раза ниже, чем в контроле, и на протяжении всего эксперимента оставалось более стабильным.

Повышение объёмной концентрации ВКП в среде оказывало значительное влияние на содержание пигментов, образующих пигмент-белковые комплексы и, собственно, общего белка в клетках *S. platensis*. Так, на 3-и сут эксперимента с ростом концентрации ВКП в среде от 5 до 30% отмечалось увеличение содержания Хл *a* в 2,7 раза, С-ФЦ – в 6,2 раза, а белка – в 2,3 раза (рис. 3). Полученные данные об изменении содержания белка и пигментов в клетках спирулины при увеличении объёмной доли ВКП в среде согласуются с общепринятыми представлениями о прямой зависимости количества белковых соединений в биомассе ЦБ от концентрации азота в питательной среде [1, 18]. Однонаправленные изменения содержания пигментов с ростом ВКП в среде характеризовались высокой степенью корреляции (коэффициенты корреляции для всех вариантов были близки к 0,9).

В первую очередь, в биомассе *S. platensis* определяли содержание белка и пигментов, являющихся антиоксидантами (табл. 3). Так, с повышением объёмной доли ВКП в питательной среде от 5 до 30% на линейной стадии роста культуры содержание белка

и Хл *a* увеличивается в 2,5 раза, а С-ФЦ в 6 раз (табл. 3). Известно, что в клетках активно растущей ЦБ *S. platensis* содержание сбалансированного по аминокислотному составу белка составляет 50–60%, пигмента С-ФЦ – 8–10%, а Хл *a* и Кар до 1,5 и 1% соответственно [1, 18]. Полученная биомасса *S. platensis*, выращенная при концентрации ВКП 20–30%, по содержанию белка и пигментов, в основном, соответствует качественной, согласно [1].

### Заключение

Определены оптимальные концентрации ВКП (20–30%) для выращивания *S. platensis*, которые обеспечивают урожай, превышающий контрольные показатели на 10–20% и позволяют получать биомассу *S. platensis*, содержащую значительные количества биологически активных веществ. Экспериментально показано, что повышение объёмной доли ВКП в питательной среде от 5 до 30% оказывало значительное влияние на содержание белка, Хл *a* и С-ФЦ в клетках *S. platensis*: содержание белка и Хл *a* увеличивалось на линейной стадии роста культуры в 2,5 раза, а С-ФЦ – в 6 раз. Химический состав получаемой биомассы спирулины по содержанию белка и пигментов, в основном, соответствовал требованиям, предъявляемым к её качественной биомассе (содержание белка, Хл *a*, Кар и С-ФЦ – 51; 1,1; 0,4 и 5,5% соответственно). Апробированный способ выращивания *S. platensis* на среде, содержащей оптимальные концентрации ВКП, позволяет снизить материальные затраты на приготовление классических питательных сред с использованием минеральных солей, увеличить урожай ЦБ с единицы объёма и получать биомассу, по своему химическому составу пригодную для кормовых целей.

Исследования выполнены в рамках Госзадания ФИЦ ИнБЮМ № АААА-А18-118021350003-6.

### References

1. Vonshak A. Spirulina: Growth, Physiology and Biochemistry // *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997. 235 p.
2. Demmig-Adams B., Adams W. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition // *Science*. 2002. V. 298. No. 5601. P. 2149–2153. doi: 10.1126/science.1078002
3. Stadnichuk I.N. Fikobiliproteiny. Biological chemistry. Moskva: Mir, 1990. 196 p. (in Russian).
4. Gudvilovich I.N., Borovkov A.B. The biological value of dietary supplements based on *Spirulina* // *Byulleten GNBS*. 2012. No. 105. P. 130–133 (in Russian).
5. Gorbunova S.Yu., Zhondareva Ya.D. Using poultry farms wastewater to increase *Arthrospira platensis* (Nordst.) Geitler. // *Vestnik Sankt-Peterburgskogo Universiteta. Seriya 3: Biologiya*. 2015. No. 1. P. 64–70 (in Russian).
6. Dobrojan S. Ob inerea substanțelor biologice active din biomasa microalgei *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler crescută pe ape reziduale // *Mediul Ambient. Scientif. J. of Inform. and Ecol. Cult*. 2010. No. 2 (50). P. 24–28.
7. Markou G. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* and *Chlorella* in ammonia-rich wastewater: optimization of nutrient removal and biomass production // *Biores. Technol*. 2015. V. 193. P. 35–41. doi: 10.1016/j.biortech.2015.06.071.
8. Kazmiruk V.D., Kazmiruk T.N. Modern trends in the use of phytotechnologies for water purification and protection // *Theoretical and Applied Ecology*. 2016. No. 3. P. 76–81 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2016-3-076-081
9. Lysenko V.P., Titov O.N. Processing of manure in poultry farms // *Ptitsevodstvo*. 2014. No. 7. P. 48–52 (in Russian).
10. Teuchezh A.A. Application of poultry manure as organic fertilizers // *Scientific journal of KubGAU*. 2017. No. 128 (04) [Internet resource] <https://ej.kubagro.ru/2017/04/pdf/61.pdf> (Accessed: 01.09.2016) (in Russian). doi: 10.21515/1990-4665-128-061
11. Gramko L.N., Podolnikov V.E., Ufimtsev D.K. Suspension of microalgae in the rations of young pigs on rearing // *Veterinariya i kormlenie*. 2008. No. 6. P. 15 (in Russian).
12. Sivakumar G., Xu J., Thompson R.W., Yang Y., Randol-Smith P., Weathers P.J. Integrated green algal technology for bioremediation and biofuel // *Biores. Technol*. 2012. V. 107. P. 1–9. doi: 10.1016/j.biortech.2011
13. Trenkenshu R.P., Lelekov A.S., Borovkov A.B., Novikova T.M. Unified installation for laboratory testing of microalgae // *Voprosy sovremennoy algologii*. 2017. No. 1 (13) [Internet recourse] <http://algology.ru/1097> (Accessed: 01.10.2017) (in Russian).
14. 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* (Stech. Et Gardner) Geitler: dissertation. Paris, 1966. 138 p. (in French).
15. Methods of physiological and biochemical studies of algae in hydrobiological practice. Kiev: Naukova dumka, 1975. 247 p. (in Russian).
16. Rowan K.S. Photosynthetic pigments of algae. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1989. 334 p.
17. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem*. 1951. V. 193. P. 265–275.
18. Drobetskaya I.V., Minyuk G.S., Trenkenshu R.P., Vyalova O.Yu. Growth and biochemical characteristics of *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitler under the different mineral nutrition conditions // *Ekologiya morya*. 2001. V. 56. P. 41–46 (in Russian).