

פיתוח פרוטוקול גידול מסחרי של אצות

יאיר כהן, זיגי ווינטרס, סיגל שגב - מו"פ ערבה תיכונה וצפונית תמר

כתובת המחבר: yairk@arava.co.il

תקציר

מו"פ ערבה תיכונה וצפונית עוסק בשנתיים האחרונות במחקר במיקרו אצות במטרה לקדם את התחום ולספק לחקלאים אלטרנטיבה לגידולים הקיימים. הניסויים שנערכו במהלך 2016 התמקדו בגידול הציאנובקטריה ספירולינה (*Arthrospira platensis*) המשמשת בעיקר כתוסף מזון בריאותי. ספירולינה גודלה בהצלחה בתחנת יאיר בתנאי מעבדה ובבריכות גידול קטנות המהוות דגם לגידול מסחרי. בתצפיות שנערכו נבדקו סוגי מים שונים במדיות גידול שונות במטרה להוזיל את הגידול. נמצא כי ספירולינה גדלה היטב במדיום המקובל בגידול סטנדרטי ובמדיום מינימלי ללא מיקרו-נוטריינטים. כמו-כן נראה כי ספירולינה גדלה גם במים שמקורם במכלי דגים (מים אלה מכילים נתון וזרחן בריכוזים גבוהים מאלה שקיימים במי התהום של הערבה). בנוסף, נערכו בדיקות שמטרתן שיפור דיוק מדידת הביומסה בכדי לנתר באופן רציף ומדויק את קצב הגידול של האצה. ככוונת מו"פ ערבה לפתח את הנושא בשנים הבאות ולצבור ידע שיאפשר גידול אצות ע"י חקלאי הערבה.

1. רקע, תיאור הבעיה ומטרות המחקר

השימוש באצות התרחב מאוד בשנים האחרונות בעיקר בהקשר של "אנרגיה ירוקה" אך גם כמקור למזון, תוספי מזון, פיגמנטים, תרופות טבעיות וחומרים בתעשיית קוסמטיקה. אצות משובטות יכולות לשמש גם כיחידה יצרנית לחומרים חשובים אשר המידע הגנטי שלהם מוחדר לאצה. זהו אחד התחומים המבטיחים והמתפתחים ביותר בעולם. בישראל קיימים כבר מספר אתרים בהם מגדלים אצות בקנה מידה מסחרי, שניים מהם באזורים מדבריים (קיבוץ קטורה ואילת). מחקרים בנושא אצות נערכו במו"פ ערבה תיכונה וצפונית התחלנו לעסוק בתחום בשנתיים האחרונות. בזמן זה, הוקמה מעבדת לגידול תרביות נקיות של אצות וחדר גידול המשמש להגדלת נפחי הגידול (ממספר ליטרים בודדים למאות ליטרים). חדר הגידול הוקם בהדרכתה של ד"ר מיכל אוקן וצוות המעבדה שלה במרכז לחקר ימים (מלח"י). מו"פ ערבה ערך יום עיון לחקלאי הערבה בנושא ולנוכח ההיענות הרבה הוחלט בהקמת מיזם לגידול ספירולינה. המיזם יצא לדרך בתחילת 2016. בחודשים האחרונים התווספה מערכת של בריכות גידול אצות בנפח כולל של 3 מ"ק וכיום מערכת זו מספקת נתונים על גידול אצות בתנאים הדומים לתנאי גידול מסחרי.

מטרת המחקר הכללית: פיתוח פרוטוקול לגידול מסחרי של אצות לחקלאי הערבה.

2. מהלך המחקר ושיטות העבודה

2.1 גידול ספירולינה בבריכות raceway

גידול הספירולינה נעשה בבריכות raceway פתוחות. לאורך הגידול נבדקו הפרמטרים הבאים: pH, טמפרטורה, ריכוז הניטרט (NO_3), ריכוז הניטריט (NO_2), ריכוז הפוספט וביומסת האצה. בריכות ה race way נמצאות בתוך חממית המקורה באופן קבוע ברשת מש ומעליה רשת צל שחורה 80% הצללה למשך חודשי הקיץ. עוצמת ההארה בתנאים הנ"ל $300 \mu\text{E}$. בתאריך 10/10/16 הוסרה רשת הצל והמבנה כוסה ביריעת פוליאאתילן למשך חודשי החורף ועוצמת ההארה השתנתה כתלות בתנאי מזג האוויר ($1000-350 \mu\text{E}$ בגובה פני המים). שתיים מבריכות ה- raceway שבמבנה אוכלסו בזמנים שונים ובמים ממקורות שונים בתוספת נוטריינטים הנחוצים לאצה.

2.1.1 בריכה 1

בתאריך 13.11.16 הוכנסו 20 ליטר תרבית ספירולינה שגודלה במדיום מינימלי בתוך שרוולים במעבדה (50: 1) לבריכת 1 raceway שהכילה 1000 ליטר מדיום גידול מינימלי (טבלה 1) של מים שמקורם בגידול דגים (טבלה 2). תנאי הגידול במעבדה היו בטמפרטורת חדר של 26°C , עוצמת הארה $150 - 300 \mu\text{E}$, תנאי יום ארוך, 16 שעות הארה ו-8 שעות חושך, ואספקת אוויר קבועה. רמת ה-pH בזמן אכלוס הבריכה באצות היה 9.67 והושג באמצעות NaHCO_3 . עוצמת ההארה הייתה בגובה פני המים $300-800 \mu\text{E}$. האצות גודלו בבריכה במשך 38 ימים.

האיזוי מהבריכה הושלם במים מזוקקים באופן אוטומטי. 3 פעמים בשבוע נלקחה דגימה מהבריכה לקביעת ביומסת האצה ואחת לשבוע נלקחה דגימה לקביעת איכות המים. קביעת הביומסה היבשה נעשתה ע"י סינון הדגימה דרך פילטר זכוכית GF- prefilter 47mm (חברת sartorius), ייבוש במיקרוגל 7 דקות, שקילת הביומסה היבשה וחישוב המשקל היבש במ"ל.

2.1.2 בריכה 2

בתאריך 13.9.16 הוכנסו 35 ליטר תרבית ספירולינה שגודלה במדיום Zarrouk בתוך שרוולים במעבדה לבריכת 2 raceway שהכילה 1000 ליטר מדיום גידול מינימלי (טבלה 1) של מים מותפלים. תנאי הגידול במעבדה היו בטמפרטורת חדר של 26°C , עוצמת הארה $150 - 300 \mu\text{E}$, תנאי יום ארוך, 16 שעות הארה ו-8 שעות חושך, אספקת אוויר קבועה. רמת ה-pH בזמן איכלוס הבריכה באצות היה 9.2 והושג באמצעות NaHCO_3 . עוצמת ההארה הייתה $300 \mu\text{E}$. האצה גודלה במשך 93 ימים. האיזוי מהבריכה הושלם במים מזוקקים באופן אוטומטי. 3 פעמים בשבוע נלקחה דגימה מהבריכה לקביעת הביומסה ופעם בשבוע בדיקה לאיכות המים. הבריכה נקצרה ארבע פעמים במשך תקופת הגידול בתאריכים: 13.11.16, 17.11.16, 20.11.16, 4.12.16.

טבלה 1 : הרכב המדיום המינימלי לתרבית ה raceway

נוטריינטים	g/l	כמות, ק"ג למ"ק
NaCl	1	1
K_2HPO_4	0,1	0.1
FeSO_4	0,04	0.04
MgSO_4	0,1	0.1
KNO_3	2	2
seas salt	1	1
NaHCO_3	6	6

טבלה 2: הרכב מי הדגים בריכה 1

נוטריינטים	ריכוז
PO ₄ (ppm)	12.5
NO ₃ (ppm)	41.3
NO ₂ (ppm)	0.75
NH ₄ (ppm)	1.1
ALK (mmol)	7.5
pH	6.79

2.2 שיפור הדיוק במדידת הביומסה

בדיקות נוספות שנערכו בחודשים האחרונים עסקו בשיפור השיטות לשקילת דגימות הביומסה הנאספות בניסויים השונים. נמצא כי שימוש במלחים מסוימים עשוי לשבש את דיוק השקילה. נעשו מספר ניסויים בכדי ללמוד את הנושא.

1. בדיקת השפעת מספר השטיפות לפני קביעת ביומסת האצה: דגימות של 20 מ"ל מ-3 raceway הוכנסו למבחנות של 50 מ"ל. מבחנה 2-4 הוכנסו לצנטריפוגה וסורכו ב 4000 rpm למשך 4 דקות. הנוזל העליון הוצא, ולמשקע האצה הוספו מים מזוקקים עד להשלמת הנפח ל 20 מ"ל. מבחנות 3 ו-4 סורכו פעם נוספת והנוזל העליון הוצא. הנפח הושלם בעזרת מים מזוקקים ל-20 מ"ל. מבחנה 4 סורכה, הנוזל העליון הורחק והוספו מים מזוקקים עד להשלמת נפח ל-20 מ"ל. הדגימה מכל מבחנה סוננה דרך פילטר זכוכית 47mm. הפילטר יובש 5 דקות במיקרוגל ונשקל.

2. לימוד ההבדל בקביעת הביומסה בין מדיה מינמלי מנוטרינטים של merck לבין מדיה מינמלי מחומרים בעלי רמת ניקיון נמוכה.

בחינת התוספת של מי הדגים על הביומסה היבשה של הפילטר:

מתרבית גידול של ספירולינה על מדיום zarrouk הוצאו כ 70 מ"ל. למבחנות 1 עד 6, 13 ו-14 הוכנסו 10 מ"ל מתרבית האצה. האצות לא נשטפו בטיפולים 1-4, 13 ו-14. רק בטיפול 5 ו-6 האצה נשטפה פעם אחת לפני קביעת הביומסה.

בטיפול 13 ו-14 הוכנסו 10 מ"ל מתרבית האצה לשקיות דיאליזה. השקיות הוכנסו למים מזוקקים פעמים לסינון המלחים במשך 40 דקות.

3. בתאריך 26/12/16 נלקחו דגימות של 20 מ"ל משקיות עם stock culture של ספירולינה לקביעת הביומסה כלהלן:

שקית – תרבית סטוק	נפח (L)	ביומסה (mg/ml)
1	16	0.745
2	21	0.375

שקיות 1+2 אוחדו והריכוז הממוצע בהם חושב ונמצא 0.535 מ"ג לליטר. תוכן השקיות הועברו לבריכה של 1000 ליטר (1: 24.39) ריכוז התחלתי מחושב בבריכה 0.02 mg/ml.

כמו כן נבדקו הדגימות הבאות:

1. דגימה מהבריכה לפני הכנסת האצות.
2. דגימה מיד לאחר הכנסת האצות הפעלת המשוטה ובדיקת ביומסה, ללא סירכוז.

3. דגימה מיד לאחר הכנסת האצות והפעלת המשוטה. הדגימה סורכזה 10 דקות במהירות 4000 rpm, הנוזל העליון סולק. המשקע הורחף ב 20 מ"ל מים מזוקקים פעמיים ולאחר מכן נבדקה הביומסה היבשה .
4. חזרה על טיפול 3.

3. תוצאות ביניים והתקדמות המחקר

3.1 גידול ספירולינה בבריכות raceway

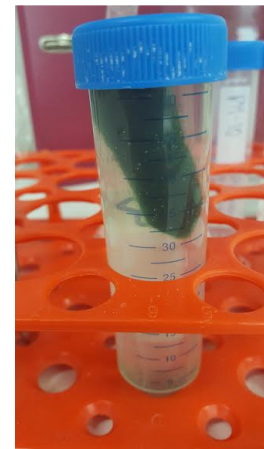
3.1.1 בריכה 1

ניתן לראות שהביומסה בתחילת הניסוי הייתה גבוהה 0.628 mg/ml. ב- 11 הימים הראשונים נצפתה עליה בביומסת האצה אולם בין היום ה- 11 (263 שעות) ל- 15 (381 שעות) הייתה ירידה חדה בביומסה ולאחר מכן שוב מגמת עליה. לאורך הגידול נצפתה התופעה הבאה: האצה שנדגמה לא שקעה לקרקעית המבחנה אלא יצרה גוש שצף (תמונה 1).

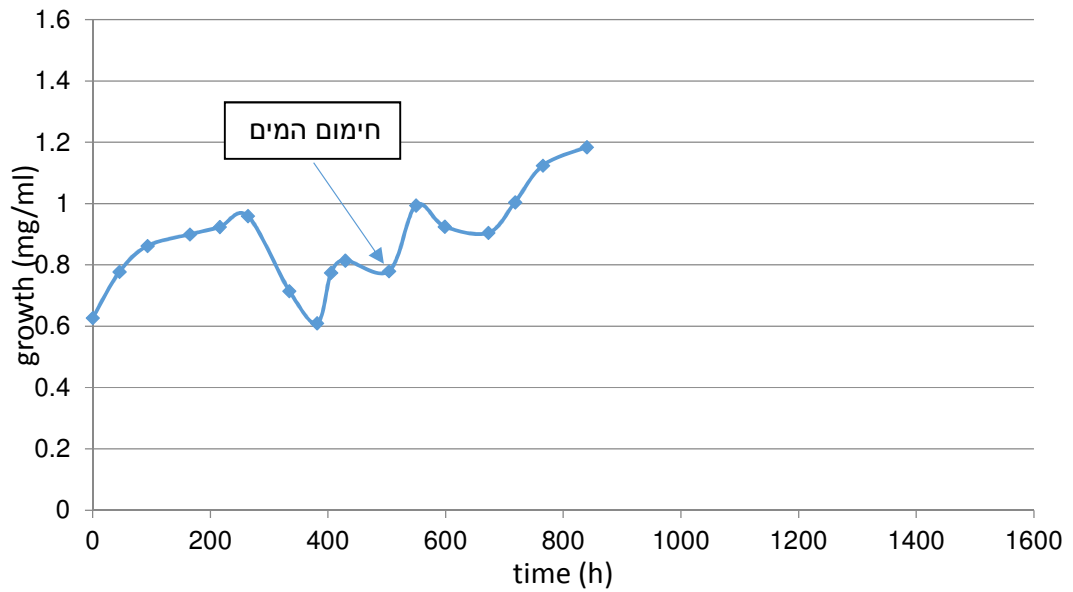
ממעקב אחר הביומסה (איור 1) בבריכה לא התקבלה עקומת גדילה טיפוסית. אולם, מהתצפית על הבריכה ניתן לראות שינוי בצבע המדיה מירקרק בהיר לירוק כהה (תמונה 2) המעיד על גידול בביומסת האצה. כמו כן בבדיקה מיקרוסקופית נצפו חוטים ארוכים ומתפתלים של ספירולינה.



תמונה 2: גידול ספירולינה בבריכות raceway



תמונה 1: דגימה מבריכה 1



איור 1: שינוי בביומסה האצה בבריכת 2 raceway במשך 38 ימים.

גורמים א-ביוטיים

pH במהלך תקופת הגידול היה בטווח 9.29-10.2.

ניטרט, NO_3 , נע בטווח בין 1100-1460 ppm.

ניטריט, NO_2 , נע בטווח בין 1.5-17 ppm.

טמפרטורה במהלך דצמבר נעה בטווח שבין $26-31^\circ\text{C}$

3.1.2 בריכה 2

ניתן לראות באיור 2 מגמת עליה בביומסת האצה במשך 61 יום, 1463 שעות, עד לגידול נטו של 1.58 mg/ml. מהיום ה- 61 (קציר ראשון) והלאה ישנה מגמת ירידה עד לביומסה נטו של 0.638 mg/ml במוצע עבור 11 הימים האחרונים המוצגים בגרף (מ 1972 שעות והלאה).

גורמים א-ביוטיים

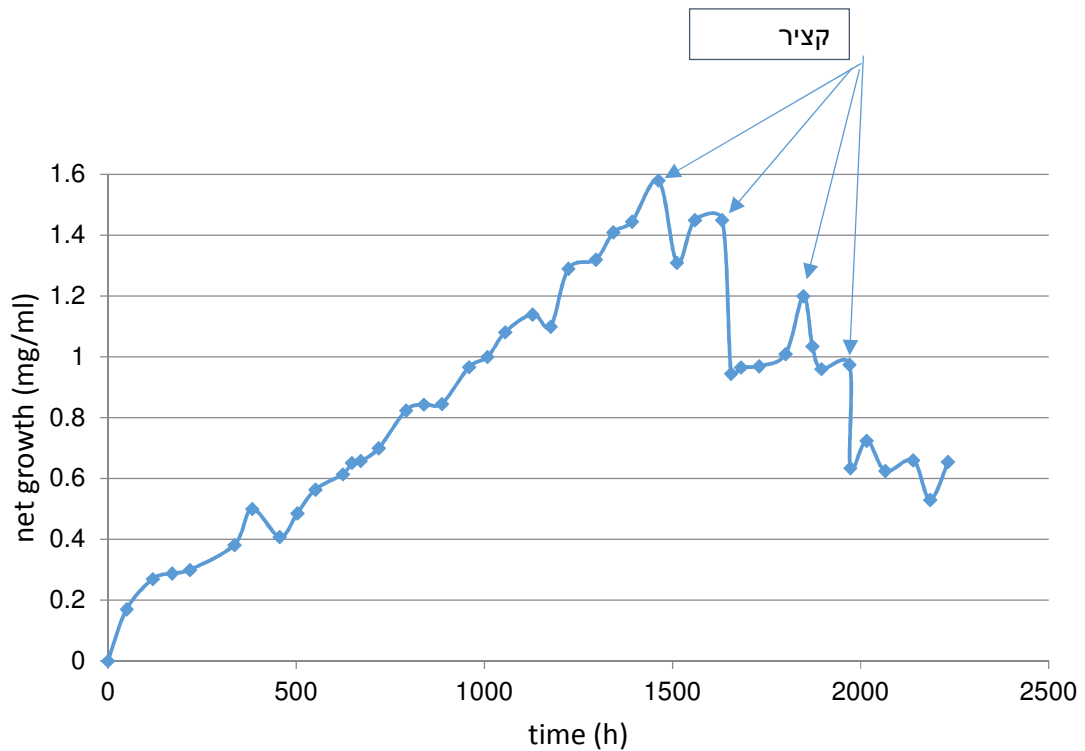
pH במהלך תקופת הגידול היה בטווח 9.92-10.5.

ניטרט, NO_3 , נע בטווח בין 113-1050 ppm.

ניטריט, NO_2 , נע בטווח בין 0.05-19.5 ppm.

טמפרטורה במהלך ספטמבר נעה בטווח שבין $20-27^\circ\text{C}$

מאוקטובר עד נובמבר טמפרטורה נעו בטווח $28-12^\circ\text{C}$ לאחר קירווי בפלסטיק.



איור 2 : שינוי בביומסה האצה בבריכת 2 raceway במשך 93 ימים.

3.2 שיפור הדיוק במדידת הביומסה

הדגימה שלא סורכזה (דגימה 2, טבלה 3) לפני מדידת הביומסה נתנה תוצאה הגבוהה פי 24.4 בממוצע בהשוואה לדגימות 3 ו-4. דגימה 1 מראה ביומסה הגבוהה בהרבה מזו של דגימות 3 ו-4 אך נמוכה יותר מזו של טיפול 2 למרות שהן בסדרי גודל דומים. ההבדל נובע מכך שהדגימה (1) נלקחה מיד עם הפעלת המשוטה כאשר חלק מהמלחים עדין היה על קרקעית הבריכה.

דגימות 3 ו 4 קרובות מאוד זו לזו מבחינת ביומסה והם באותו סדר גודל בהשוואה לריכוז ההתחלתי שחושב. ההבדל בין הריכוז ההתחלתי שחושב לתוצאה שנמדדה יכול להיות מכך שנפח המים בבריכה היה גבוה מעט מ 1000 לליטר והנפח בשקיות 1 ו- 2 חושב ולא נמדד.

טבלה 3 : השפעת סרכוז האצה על דיוק המדידות

ריכוז mg/ml	נפח דגימה (מ"ל)	D.W פילטר	D.W פילטר + דגימה	ביומסה של הדגימה (גר)	נפח דגימה (מ"ל)	ריכוז mg/ml	דגימות	מבחנה
0.109	52	0.1256	0.1313	0.0057	52	0.109	מים + מלחים מהבריכה לפני הכנסת האצות (מיד לאחר הפעלת המשוטה) רב המלח שקוע	1
0.305	18	0.1242	0.1297	0.0055	18	0.305	דגימה מהבריכה + אצות, ללא סירכוז	2
0.015	20	0.1218	0.1221	0.0003	20	0.015	דגימה מהבריכה + אצות + סירכוז	3
0.01	20	0.1247	0.1249	0.0002	20	0.01	דגימה מהבריכה + אצות + סירכוז	4

תרומה צפויה, מסקנות והמלצות להמשך המחקר

3.3 גידול ספירולינה בבריכות raceway

קצב גידול האצה בתנאי מעבדה מהיר יותר בהשוואה לשתי בריכות ה raceway. בבריכה 1 ניתן לראות שהביומסה ההתחלתית גבוהה מאוד 0.628 mg/ml פי 15 ויותר ממה שמצופה וכן גבוהה גם ביחס לביומסה ההתחלתית של בריכה 2, 0.15 mg/ml. לא התקבלה עקומת גידול אופיינית לספירולינה. כנראה המלחים המצויים בדגימה מהבריכה לצורך קביעת הביומסה היבשה נשארים בפילטר ומשפיעים על תוצאות המדידה של ביומסת האצה. לאורך הגידול בשינוי כמות המומסים בבריכה והתוספת בביומסת האצה ממסך על הגידול האמיתי בביומסת האצה. לכן ניתן להתייחס לעקומת הגידול רק באופן יחסי (ולא במספרים אבסולוטיים). בבריכה 2 קצב הגידול בביומסה החל מהיום ה 27, (648 שעות), נובע מחשיפה לעוצמת קרינה גבוהה יותר ולשמירה על טמפרטורות בטווח הגדילה של האצה בגלל קירוי החממה בפלסטיק המונע את צניחת הטמפרטורות מתחת ל 12°C בלילה.

הירידות החדות בגידול נובעות מקצירת הבריכה מספר פעמיים בין היום ה- 61 (1463 שעות) ליום ה-82 (1972 שעות). לאחר מכן הגידול נעצר והביומסה נשארת קבועה סביב 0.64 mg/ml.

3.4 שיפור הדיוק במדידת הביומסה

בסיכום הניסויים שהתבצעו נמצא כי המשקלים הגבוהים מהצפוי ממדידות קודמות התקבלו בגלל צבירת מלחים בפילטר. סירכוז האצה וסילוק הנוזל ניקה את הדגימה ממלחים עודפים ואפשר מדידה מדויקת של הביומסה.

3.5 תרומה והמשך מחקר

מערכת הבריכות בנפח כולל של 3 מ"ק הוקמה ופועלת. בשנה הקרובה נפתח את הגידול לבריכות גדולות יותר (בנפח של 5-10 מ"ק לבריכה). כמו-כן, נעסוק בפיתוח הידע לקציר ועיבוד האצה עד להבאתה למוצר סופי. מו"פ ערבה יתמקד בפיתוח מסחרי של ספירולינה בשנים הקרובות ובריכות אלה משמשות לפיתוח פרוטוקולים ועריכת ניסויים בקנה מידה מסחרי בכדי לאפשר ייצור של אצה זו ע"י חקלאי הערבה.

הבעת תודה

תודתנו נתונה לקרן יק"א, לקרן התמיכות של משרד החקלאות ופיתוח הכפר, לתוכנית האיחוד האירופי H2020 על עזרתם במימון הניסויים. תודה לקק"ל על תמיכת במערך הניסויים במו"פ ערבה. אנו מודים לד"ר מיכל אוקו וצוות האצות במלח"י על הדרכתם בבניית חדר הגידול.

Development of a protocol for algae production

Yair Kohn, Sigi Winters, Sigal Segev – Central and Northern Arava Tamar R&D

Writer address: yairk@arava.co.il