

УДК 54.051:582.26-022.53:57.083.1 (045)

## НАКОПИЧЕННЯ БІОМАСИ МІКРОВОДОРОСТЕЙ ДЛЯ ВИРОБНИЦТВА БІОПАЛИВА

**А. О. Кирилова, І. В. Матюхін, В. І. Карпенко**

*Національний авіаційний університет, м. Київ*

*Відпрацьовано методики виділення з природних водних екосистем та методики культивування культур асоціацій зелених водоростей. За культуральними, морфологічними ознаками з використанням методів пересіву клітин водоростей на твердих середовищах, виділено чисті альгологічні клітини зелених водоростей: *Chlorella vulgaris* та *Monoraphidium tortile*. Проведено культивування чистих культур в періодичних умовах глибинним та поверхневим методами. Встановлено, що для *Chlorella vulgaris* питома швидкість росту складає –  $0,28 \times 10^6$  кл./мл за добу, максимальна продуктивність –  $43,8 \times 10^6$  кл. за добу, ліпідна складова – 14–22 % на суху масу відповідно. Для *Monoraphidium tortile* питома швидкість росту –  $0,30 \times 10^6$  кл./мл за добу, продуктивність –  $65,1 \times 10^6$  кл./мл за добу, ліпідна складова складає – 56,8 % на суху масу. Порівнявши вказані характеристики виявили, що досліджені культури відповідають критеріям відбору водоростей для виробництва біопалива.*

**Ключові слова:** водорості, біопаливо, культура, виділення, культивування, ліпіди.

Робота виконувалась за підтримки зав. відділу фікології Царенко П.М. та Борисової О. В. Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України.

**Вступ.** Сучасна авіація є одним з основних споживачів палив нафтового походження у вигляді авіабензинів та реактивних палив. Більша частина парку

цивільної авіації оснащена повітряно-реактивними двигунами (ПРД), що працюють на реактивному паливі. Упродовж десяти років (1992–2002 рр.) рівень споживання палив для ПРД зріс на 21 %. Авіаційні судна є відповідальними за більш ніж 2 % світової емісії CO<sub>2</sub>. Окрім CO<sub>2</sub>, відпрацьовані гази літальних апаратів (ЛА) містять низку інших компонентів, що негативно впливають як на здоров'я людини, так і на глобальні зміни клімату на планеті. До 2050 року повітряний транспорт буде джерелом 20 % усіх шкідливих речовин, що викидаються у повітря в світі. У зв'язку з цим, в останні роки досить гостро постало питання екологізації авіаційної галузі, а саме зменшення викидів парникових газів, таких як CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> та інших, а також зниження токсичності відпрацьованих газів ЛА. Одним зі шляхів вирішення даної проблеми є пошук та впровадження в авіації альтернативних біопалив. Інтенсивне використання нафти і газу в ХХ ст. викликало гостру необхідність у створенні нових поновлюваних та екологічно безпечних альтернативних джерел енергії та палива. Вченими у всьому світі проводяться дослідження зі створення біопалива, зокрема біодизеля, як найбільш перспективного джерела енергії. В якості рослинної сировини для виробництва біодизеля використовуються ліпіди олійних рослин, бактерій, дріжджів, міцеліальних грибів і мікроводоростей. Перевагою мікроводоростей-продуцентів біомаси як сировини є високий вміст ліпідів, велика швидкість росту, можливість спрямованого біосинтезу, використання для їх вирощування фотобіореакторів і відкритих водойм, технічних вод різних промислових виробництв. Однак з 45 тис. відомих видів мікроводоростей лише близько 30 видів здатні накопичувати в клітинах підвищену кількість ліпідів (20–80 % маси сухої речовини) [1].

**Матеріали та методи досліджень.** Основні критерії відбору водоростей:

- здатність до накопичення підвищеної кількості ліпідів;
- продуктивність культури;
- висока швидкість росту;
- контамінантність культури.

Відбір альгопроб з води відбувався поблизу о. Труханів (м. Київ), з оз. Бабине. Для більш повного якісного вивчення видового і таксономічного (кількість родів, родин, порядків, класів, відділів) різноманіття водоростей, а також аналізу рідкісних видів, проводили відбір проб за допомогою планктонної сітки. Застосовували сітку Апштейна (мала) – довжина конусу 55 см, діаметр вхідного отвору – 25 см. Матеріалом сітки є шовковий або млиновий газ. Через планктонну сітку проціджували певний об'єм води (100 дм<sup>3</sup>). Об'єм проби визначали за інтенсивністю розвитку фітопланктону [2].

Проаналізували альгопробу під мікроскопом і з'ясували які види мікроводоростей знаходяться у пробі води. Для культивування нами були обрані штами двох видів зелених водоростей – *Chlorella vulgaris* та *Monoraphidium tortile* (рис. 1). Ліпідний склад: *Chlorella vulgaris* – 14–22 % та *Monoraphidium tortile* – 56,8 % [3]. Виділення та культивування водоростей проводили на середовищах Болда та Тамія [4]. Склад середовищ представлено в табл. 1 та 2.



**Рис. 1. Сформовані клітини культури *Monoraphidium tortile* представлені в червоних квадратах (×400)**

Виділення культури проводили шляхом посіву на агар взятої альгопроби методом Дригальського в чашки Петрі: спочатку на поверхню середовища в чашці Петрі піпеткою або петлею наносили досліджуваний матеріал, а потім, за допомогою металевого або скляного шпателя, його ретельно втирали у середовище (рис. 2), а також методом штрихового посіву: матеріал, який містить мікроорганізми, набирали бактеріологічною петлею і наносили на поверхню живильного середовища біля краю чашки, потім знімали надлишок

матеріалу і проводили його посів паралельними штрихами від краю до краю чашки (рис. 3).

Таблиця 1

Склад середовища Болда

Компонент	Вміст, мг/л
$\text{NaNO}_3$	750
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	75
$\text{NaCl}$	25
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	175
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,5
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2,86
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,81
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,15
$\text{NH}_4\text{VO}_3$	2,3
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01

Таблиця 2

Склад середовища Тамія

Компонент	Вміст, мг/л
$\text{KNO}_3$	5000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2500
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1250
ЕДТА (трилон Б)	37
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2,86
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,15
$\text{NH}_4\text{VO}_3$	2,3
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01

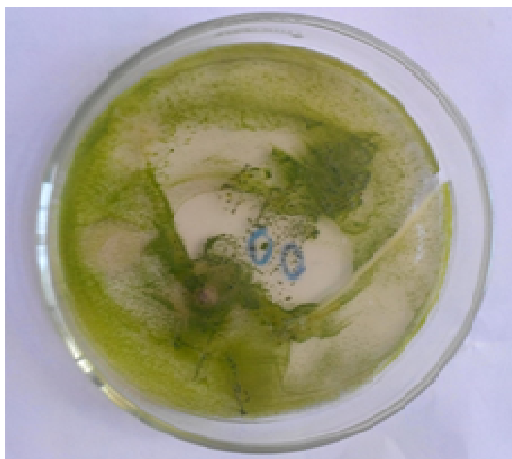


Рис. 2. Культури альгопроби шляхом посіву на агар взятої методом Дригальського

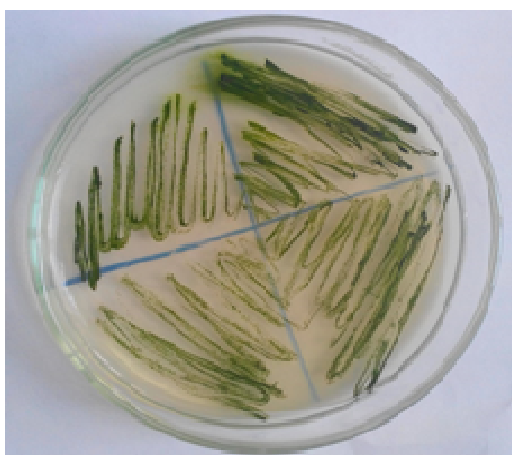
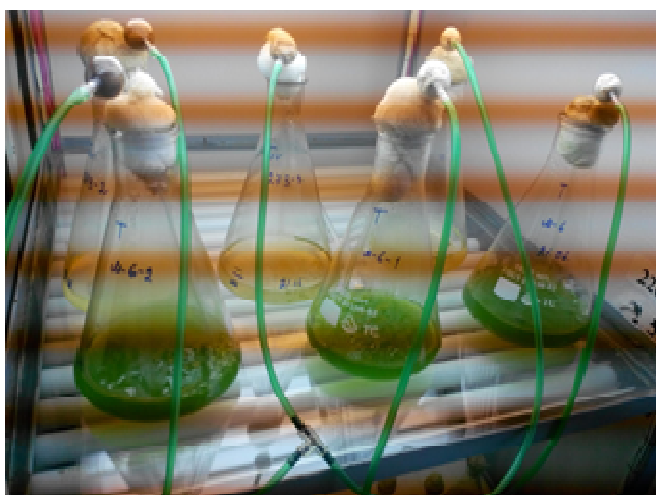


Рис. 3. Виділення культури *Monoraphidium tortile* методом посіву штрихом

Інокулят відібраної культури *Monoraphidium tortile*, готували шляхом культивування в періодичних умовах з подачею CO<sub>2</sub> на середовищі Болда (рис. 4). Альгопробу вирощували в конічних колбах об'ємом 1000 мл (об'єм середовища 200 мл) на люміностації при цілодобовому освітленні за температури 26–32 °С, інтенсивності світла становила 100 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> і за постійного барботування. Культивування проводили при люмінесцентному освітленні з безперервною подачею CO<sub>2</sub> через компресор [5]. Вихідна кількість посівного матеріалу складала 5 млн кл./мл. Приріст біомаси оцінювали щоденно прямим підрахунком кількості клітин в камері Горяєва.



**Рис. 4. Приготування інокуляту відібраної культури *Monoraphidium tortile* та її культивування в періодичних умовах з подачею CO<sub>2</sub> на середовищі Болда**

**Результати досліджень та їх обговорення.** Результати проведеного експерименту з культивування водоростей в періодичних умовах для визначення динаміки зростання кількості клітин в 1 мл середовища представлені в табл. 3 та рис. 5.

Динаміка зростання кількості клітин при культивуванні *Monoraphidium tortile* та *Chlorella vulgaris* глибинним методом в періодичних умовах ( $\times 10^6$  кл/мл)

Проба №	Вихідна кількість посівного матеріалу	Доба культивування			
		1	2	3	4
I <i>Monoraphidium tortile</i>	5	7,75	35,2	93,5	171,0
II <i>Monoraphidium tortile</i>	5	17,05	45,0	111,0	192,0
III <i>Monoraphidium tortile</i>	5	16,50	40,4	127,0	212,0
IV <i>Chlorella vulgaris</i> (um. 189)	5	11,83	20,5	83,1	152,0

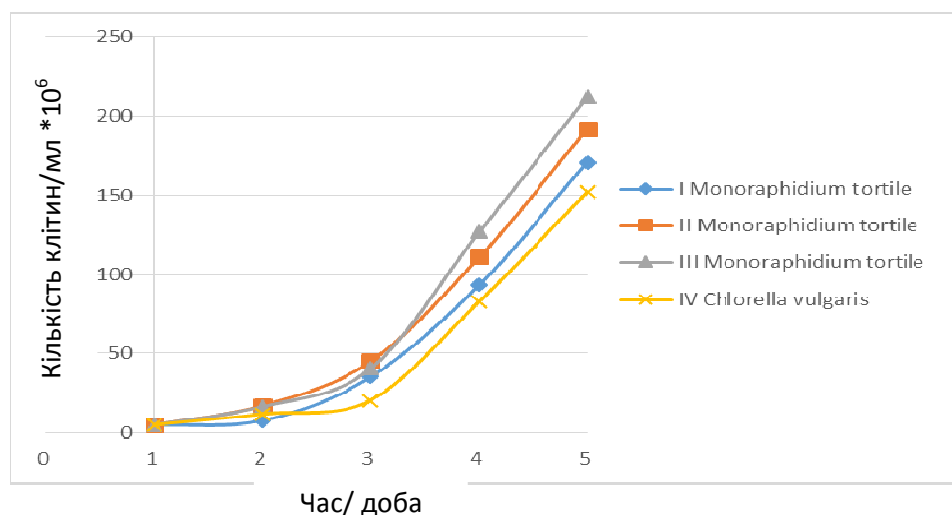


Рис. 5. Динаміка зростання кількості клітин водоростей

В логарифмічній фазі (лог-фаза) зростання кількості клітин, величина питомої швидкості росту клітин, в залежності від світлових умов, при низькій густині культури, були незмінні. Цей період характеризується сталістю питомої швидкості росту ( $\mu_m = \text{const}$ ). Отже, для логарифмічної фази росту застосована залежність щільності культури від часу, для необмеженого зростання біомаси:

$$\mu_m = \frac{I}{t - t_{ln}} \times \ln \frac{n}{n_{ln}} = \ln n - \ln n_{ln},$$

де  $\mu_m$  – питома швидкість росту (кл/мл за добу);  $n$  – загальна кількість клітин;  $I$  – щільність культури в мл;  $t$  – повний час росту культури;  $t_{ln}$  – час лог-фази.

Під час лінійного зростання можна знайти величину максимальної продуктивності, яка дорівнює тангенсу кута нахилу лінійної ділянки кривої зростання:

$$P_m = \frac{B - B_e}{t - t_l},$$

де  $P_m$  – максимальна продуктивність (клітин за добу);  $B$  – біомаса (кількість клітин);  $B_e$  – щільність культури в момент початку лінійної фази  $t_l$ .

Питому швидкість росту культури вираховували за формулою:

$$\mu = \frac{P_m}{B},$$

де  $\mu_m$  – питома швидкість росту (кл/мл за добу);  $P_m$  – максимальна продуктивність (клітин за добу);  $B$  – біомаса (кількість клітин).

Ця ділянка кривої у логарифмічній фазі зростання дозволяє простежити зміну питомої швидкості росту культури за часом [ 6 ].

Кінетичні характеристики росту культури *Monoraphidium tortile* за умов вирощування в інтенсивних режимах (температура, концентрація середовища, освітленість) представлені в табл. 4.

Таблиця 4

**Питома швидкість росту і продуктивність культури *Monoraphidium tortile* та *Chlorella vulgaris***

Альгопроба, №	Логарифмічна фаза зростання		Фаза лінійного зростання	
	Питома швидкість росту, $\mu$ , кл $\times 10^6$ /мл·добу	Максимальна продуктивність культури, $P_m$ , клітин $\times 10^6$	Питома швидкість росту, $\mu$ , кл $\times 10^6$ /мл·добу	Максимальна продуктив- ність культури, $P_m$ , клітин $\times 10^6$
I <i>Monoraphidium tortile</i>	0,43	4,43	0,95	54,6
II <i>Monoraphidium tortile</i>	1,20	13,23	0,30	58,3
III <i>Monoraphidium tortile</i>	1,04	21,54	0,30	65,1
IV <i>Chlorella vulgaris (um.189)</i>	0,86	7,20	0,28	43,8

Таким чином, дослідження показали, що штам водоростей *Monoraphidium tortile* добре росте і розвивається при заданих умовах культивування. Штам характеризується мінімальними термінами адаптації, високою швидкістю росту та продуктивністю, в ході фотосинтезу краще поглинає вуглекислий газ з атмосфери, ніж *Chlorella vulgaris* (um.189).

В результаті проведення експериментів та при порівнянні досліджених штамів ми визначили, що *Monoraphidium tortile* є більш перспективним та високопродуктивним штамом-продуцентом біомаси для отримання біопалива, ніж *Chlorella vulgaris* (um.189), оскільки ліпідний склад *Chlorella vulgaris* – 14–22 %, а у *Monoraphidium tortile* – 56,8 %.

## ВИСНОВОКИ

Відпрацьовані методики виділення з природних водних екосистем та методики культивування культур асоціацій зелених водоростей.

За культуральними, морфологічними ознаками з використанням методів пересіву клітин водоростей на твердих середовищах, виділені чисті альгологічні клітини зелених водоростей: *Chlorella vulgaris* та *Monoraphidium tortile*.

Проведено культивування чистих культур в періодичних умовах глибинним та поверхневим методами. Встановлено, що для *Chlorella vulgaris* питома швидкість росту складає –  $0,28 \times 10^6$  кл./мл за добу, максимальна продуктивність –  $43,8 \times 10^6$  кл. за добу, ліпідна складова – 14–22 % на суху масу відповідно. Для *Monoraphidium tortile* питома швидкість росту –  $0,30 \times 10^6$  кл./мл за добу, продуктивність –  $65,1 \times 10^6$  кл./мл за добу, ліпідна складова складає – 56,8 % на суху масу.

Порівнявши вказані характеристики виявили, що досліджені культури відповідають усім критеріям для виробництва біопалива.



## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Царенко П.М. Коллекция культур микроводорослей IBASU-A – потенциальный ресурс биосырья для производства биодизеля / П.М. Царенко, Е.В. Борисова // Альгология. – 2014. – Т. 24, № 3. – С. 409–412.
2. Щербак В.І. Методи досліджень фітопланктону // Методичні основи гідробіологічних досліджень водних екосистем. – К.: 2002. – С. 41–42.
3. Царенко П. Микроводорості як об'єкт біоенергетики. Види колекції IBASU-A – перспективні продуценти біомаси як джерел асировини для біопалива / Царенко П., Борисова О., Блюм Я. // Вісн. НАН України. – 2011. – № 5. – С. 49–54.
4. Борисова О.В. Коллекция культур водоростей Института ботаники ім. М.Г. Холодного (IBASU-A) / П.М. Царенко, Е.В. Борисова // Укр. ботан. журн. – 2001. – Т. 58, № 5. – С. 627–633.
5. Генетична диференціація штамів *Monoraphidium tortile* – продуцентів ліпідів за допомогою RAPD / [Корховий В.І., Пірко Я.В., Царенко П.М., Блюм Я.Б.] // Доп. НАН України. – 2011. – № 2. – С. 144–149.
6. Тренкеншу Р.П. Простейшие модели роста микроводорослей. 1. Периодическая культура / Р.П. Тренкеншу // Экол. моря. – 2005. – № 67. – С. 89–97.

### **НАКОПЛЕНИЕ БИОМАССЫ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОТОПЛИВА**

А. А. КИРИЛОВА, И. В. МАТЮХИН, В. И. КАРПЕНКО

*Национальный авиационный университет, г. Киев*

*Отработаны методики выделения из природных водных экосистем и методы культивирования культур ассоциаций зеленых водорослей. По культуральным, морфологическим признакам с использованием методов пересева клеток водорослей на твердых средах, выделены альгологично чистые*

клетки зеленых водорослей: *Chlorella vulgaris* и *Monoraphidium tortile*. Проведено культивирование выделенных культур в периодических условиях глубинным и поверхностным методами. Установлено, что для *Chlorella vulgaris* удельная скорость роста –  $0,28 \times 10^6$  кл./мл за сутки, продуктивность  $43,8 \times 10^6$  кл./мл за сутки и липидный состав равны 14–22 % соответственно, а для *Monoraphidium tortile* удельная скорость роста –  $0,30 \times 10^6$  кл./мл за сутки, продуктивность  $65,1 \times 10^6$  кл./мл за сутки, липидный состав 56,8 %. Сравнив указанные характеристики обнаружили, что исследованные культуры подходят по всем критериям по отбору водорослей для производства биотоплива.

**Ключевые слова:** водоросли, культура, выделение, культивирование, липиды.

## **BIOMASS ACCUMULATION OF MICROALGAE FOR BIOFUEL PRODUCTION**

A. O. KIRILOVA, I. V. MATYUKHIN, V. I. KARPENKO

*National Aviation University, Kiev*

*Techniques of microalgae isolation from natural water sources and methods of green algae associations cultivation were tested. Pure cultures of green algae *Chlorella vulgaris* and *Monoraphidium tortile* were isolated by cultural and morphological characteristics using spread plate and streak plate techniques. Batch culture of isolated algae was performed. It was established that *Chlorella vulgaris* specific growth rate –  $0,28 \times 10^6$  cells/ml-day,  $43,8 \times 10^6$  cells/ml-day performance, and lipid composition equal to 14–22 %, respectively, and for *Monoraphidium tortile* specific growth rate –  $0,30 \times 10^6$  cells/ml-day, productivity –  $65,1 \times 10^6$  cells/ml-day, lipid composition equal to 56,8 %. By comparing these characteristics it was found that research culture fit all criteria for the selection of algae for biofuel production.*

**Key words:** algae, biofuel, culture, isolation, cultivation, lipids.