

*Н. Д. Шамаев, П. А. Курынцева,  
С. Ю. Селивановская*

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИЗОЛЯТОВ  
МИКРОВОДОРОСЛЕЙ *CHLORELLA SP.*  
С ОЦЕНКОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ БИОМАССЫ**

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Поступила в редакцию 05.07.2024 г.

Принята к публикации 18.09.2024 г.

doi: 10.5922/vestniknat-2024-4-10

**Для цитирования:** Шамаев Н. Д., Курынцева П. А., Селивановская С. Ю. Культивирование изолятов микроводорослей *Chlorella sp.* С оценкой продуктивности биомассы // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. Сер.: Естественные и медицинские науки. 2024. №4. С. 135–145. doi: 10.5922/vestniknat-2024-4-10.

*Зеленые микроводоросли относятся к филетической категории, организмы которой приспособились к широкому спектру экологических условий. В качестве возможной платформы для производства биомассы в настоящей работе рассматривается новый изолят пресноводных микроводорослей под названием *Chlorella sp.* В1. В данном исследовании была оценена способность изолята развиваться в миксотрофных средах. Результаты демонстрируют связь между скоростью роста и динамическими изменениями состава биомассы. Использование гранулированных форм питательной среды удобрения «Фертика универсал» значительно повышает оптическую плотность начального раствора до 0.087, что больше чем в два раза по сравнению с другими общепринятыми средами и выгоднее в условиях промышленного выращивания. Рекомендуется использование уменьшенного количества клеток *Chlorella sp.* В1 в начальных концентрациях в инокуляте с последующим культивированием при 32°C при усиленной освещенности (52 Вт) с внесением углекислого газа 0,9 г/л за трое суток на 500 мл объема фотобиореактора планшетного типа.*

**Ключевые слова:** изоляты микроводорослей, *Chlorella sp.*, подбор условий культивирования

### **Введение**

Успешная концентрация, сбор и хранение солнечного света остается серьезной проблемой, несмотря на его достаточное количество для обеспечения всех мировых потребностей в энергии. В глобальном масштабе фотоавтотрофные организмы, такие как водоросли и цианобактерии, накапливают солнечную энергию посредством процесса кислородного фотосинтеза, который использует свет и воду для преобразования CO<sub>2</sub> в



восстановленные молекулы углерода. В результате помимо эффективно улавливания  $\text{CO}_2$  из крупных источников выбросов, таких как перерабатывающие комплексы и электростанции, экстенсивное выращивание фотосинтезирующих организмов может использовать солнечный свет и  $\text{CO}_2$  для производства различных органических молекул и биомассы [1]. Например, энергоёмкое сырьё, которое становится все более популярным для коммерческого производства в закрытых фотобиореакторах, — это биомасса микроводорослей, которая может быть переработана для получения биологически активных химикатов, биотоплива или органических удобрений, биостимуляторов, кормов для животных. Принимая во внимание, что основная часть этих видов не идентифицирована, становится ясно, что описание культуральных и продуктивных качеств изолятов микроводорослей представляет собой источник метаболического разнообразия, имеющего высокую прикладную значимость. Целью данной работы было выделение микроводорослей и подбор оптимальных условий для культивирования.

### Материалы и методы

**Выделение микроводорослей.** Объектом исследования являлись микроводоросли, отобранные в водоемах Казани (Республика Татарстан). После получения образцов были выделены микроводоросли, осуществлен подбор оптимальных условий культивирования и оценена эффективность культивирования микроводорослей.

Для выделения монокультуры микроводорослей образцы высевали на твердую агаризованную среду Тамия. Для этого дозатором 100 мкл жидкого образца помещали в центр чашки Петри, распределяли равномерным слоем шпателем Дригальского по всей площади чашки Петри и ставили в термостат при температуре  $28^\circ\text{C}$  на 1–3 сут до появления наращенной культуры. Из тех чашек Петри, где были заметны наращенные микроводоросли, делали пересев для выделения монокультуры. Для этого выращенные культуры пересевали микробиологической петлей в новые чашки Петри с агаризованной средой методом параллельных штрихов [1] и также ставили в термостат при температуре  $28^\circ\text{C}$  на 1–3 сут. Из 15 вариантов изолятов микроводорослей для дальнейших исследований был отобран 1 вариант изолятов (рис. 1, с, с. 134).

**Приготовление питательных сред, культивирование микроводорослей и измерение оптической плотности.** Для эффективного процесса культивирования микроводорослей важно обеспечивать необходимые условия их роста. К важнейшим параметрам относят наличие питательной среды, свет, температура, источник  $\text{CO}_2$ , pH культуральной среды [2]. Штамм микроводорослей выращивали на нескольких вариантах сред (среда Тамия, BG11, «Фертика универсал») при разном освещении и температурах с целью установления оптимальных условий культивирования. Увеличение числа клеток микроводорослей определяли по изменению оптической плотности. На основании этих данных строили кривые роста.



Для среды Тамия сначала готовили концентрат объемом 200 мл:  $\text{KNO}_3$  – 20,0 г,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 10,0 г,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  – 5,0 г,  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$  – 0,6 г; затем с расчетом на 1 л среды добавляли количество концентрата:  $\text{KNO}_3$  – 2,5 мл,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 2,5 мл,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  – 2,5 мл,  $\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$  – 0,1 мл, а также 0,1 мл раствора А (на 1 л:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 2,86 г,  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  – 1,8 г,  $\text{ZnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,222 г) и раствор Б (на 1 л:  $\text{MoO}_3$  – 17,64 г,  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  – 22,96 г) и доводили объем до метки. Среду BG11 готовили путем добавления  $\text{NaNO}_3$  – 1,50 г,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 (\times 3\text{H}_2\text{O})$  – 0,04 (0,051) г,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,075 г,  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,05 г,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – 0,02 г, лимонной кислоты – 0,006 г, ЭДТА  $\text{Na}_2$  – 0,001 г,  $\text{Fe}^{3+}/\text{NH}_4^+$ -цитрат – 0,006 г, раствора микроэлементов – 1,0 мл, 0,5 М раствора НЕРЕС с pH 7,5 – 40 мл, долить дистиллированной водой до 1 литра. Среду с использованием комплексного гранулированного удобрения «Фертика Универсал» готовили путем растворения 2,5 г удобрения в 500 мл дистиллята. Состав среды отвечает требованиям культивирования *Chlorella* sp. (табл. 1).

Таблица 1

## Состав среды «Фертика Универсал»

Название	Формула	Содержание	
		%	мг
Азот	N	12	300
Оксид фосфора	$\text{P}_2\text{O}_5$	8	200
Оксид калия	$\text{K}_2\text{O}$	14	350
Оксид магния	MgO	2	50
Сера	S	8	200
Бор	B	0,1	2,5
Медь	Cu	0,1	2,5
Железо	Fe	0,1	2,5
Марганец	Mn	0,2	5
Молибден	Mo	0,01	0,25
Цинк	Zn	0,1	2,5

Для построения кривых роста культуру микроводорослей отбирали каждый день в течение четырех суток и измеряли оптическую плотность. Поглощение света определяли стационарным методом. Он является классическим и характеризуется поглощением света клетками микроводорослей при длине волны 680 нм (А 680) на спектрофотометре Ultrospec 3300 pro UV/Visible UV (Amersham Biosciences, Кембридж, Великобритания).

**Оценка эффективности культивирования микроводорослей и определение их сухой биомассы.** Помимо обеспечения необходимых условий роста, важно оценить, как влияют условия на прирост и состав биомассы микроводорослей с целью анализа эффективности процесса культивирования. Для определения сухого веса биомассы измеряли



начальную массу фильтрующей мембраны толщиной 0,45 мкм после нагревания в печи при 105 °С в течение 2 ч. Аликвоту (140 мл) образца биомассы отбирали во время экспоненциальной фазы и фильтровали в вакууме через фильтрующую мембрану, которую промывали дистиллированной водой 3 раза, чтобы смыть химические вещества, прилипшие к поверхности. Фильтрующую мембрану вместе с биомассой сушили в течение 2 ч при 105 °С и рассчитывали сухой вес биомассы на объем следующим образом:

138

$$\text{Сухая биомасса (г/мл)} = \frac{m_2 - m_1}{V},$$

где  $m_2$  — масса фильтра после фильтрования культуры микроводорослей;  $m_1$  — масса фильтра до фильтрования культуры микроводорослей;  $V$  — объем культуры, пошедшей на фильтрование [3].

### Результаты и обсуждение

**Конструирование фотобиореактора.** Исследование возможности включения хлореллы в небольшие замкнутые экологические циклы требует тщательного анализа ее культуры в лабораторных условиях. Основные требования к методике исследований хлореллы в лаборатории заключаются в интенсивном изучении культуры, стабилизации всех параметров среды и получении данных о ее состоянии с определенной частотой. Это требует создания специальных лабораторных культиваторов, способных обеспечить стандартные условия для роста хлореллы, прежде всего стабилизировать состав питательной среды, температуры, освещенности и уровня углекислого газа. Однако стабилизация среды — лишь первый шаг в разработке культиваторов. Вторым важным этапом для определения оптимальных условий роста является возможность управления окружающей средой. Для этого необходимо разработать культиватор, имеющий возможность поддерживать определенное состояние факторов культивирования, а также регулировать их [4; 5]. Фотобиореактор в данном эксперименте представляет собой емкость прямоугольной формы, состоящую из прозрачного органического стекла толщиной 1 см. Съёмная крышка имеет отверстия для вентиляции, конструкцию для крепления перемешивающего устройства и источников света. В крышке реактора предусмотрено отверстие с трубкой для подачи углекислого газа. Напротив реактора установлена LED лампа с универсальным спектром и индивидуальной системой отключения. Освещенность регулируется ее включением и отключением. Температура поддерживается теплом, излучаемым источниками света. CO<sub>2</sub> подается по вмонтированной в крышку реактора трубке. В работе использовались планшетные фотобиореакторы (рис. 1, а, б).

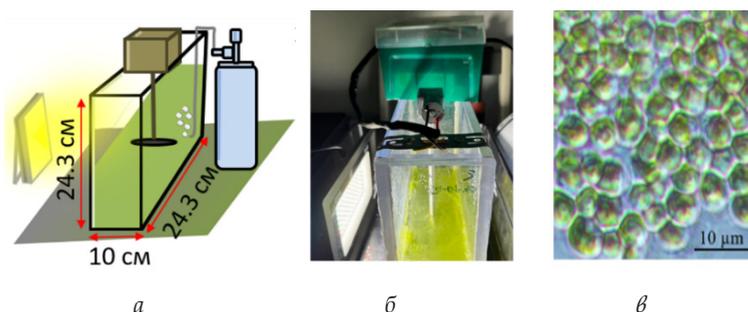


Рис. 1. Конструирование фотобиореактора и визуальная идентификация водорослей: а – схема фотобиореактора; б – внешний вид фотобиореактора; в – Морфометрическая идентификация изолята микроводорослей *Chlorella* sp. B1

**Питательная среда.** Выбор оптимальной питательной среды является одним из основополагающих этапов исследования и регулируется рядом факторов. Она должна подходить исследуемому штамму микроводоросли, а также быть экономически и технологически целесообразной. Для исследования выбраны три различных среды: Тамия, BG11 и гранулированное удобрение «Фертিকা универсал». Культивирование осуществлялось в биореакторах при поддержании температуры 25 °С и освещенности лампами мощностью 13 Вт без дополнительной подачи CO<sub>2</sub> на протяжении 3 дней. Оптическая плотность отражена в таблице 2. Кривые роста отчетливо показывают слабое нарастание биомассы образцов при использовании среды Тамия и BG11. В свою очередь, использование удобрения «Фертилика универсал» в качестве питательной среды показало значительный рост оптической плотности на 0,35 ОЕ. При сравнении сухой биомассы также наблюдаются существенные различия. Так, вес сухой биомассы выросшей на среде BG11 составил 0,031 г, когда на среде «Фертিকা универсал» этот показатель составил 0,087 г. Также важно отметить, что использование гранулированной формы позволяет оптимизировать временные и экономические затраты, что очень важно в условиях промышленного культивирования.

Таблица 2

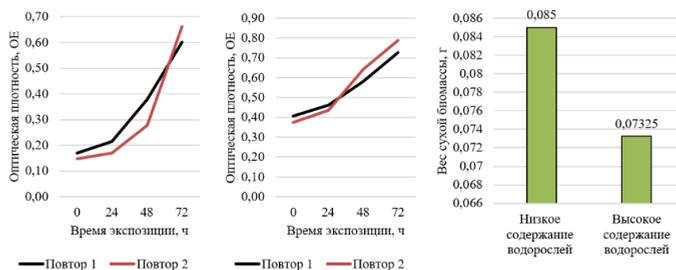
**Показатели оптической плотности при подборе условий для культивирования изолята микроводорослей *Chlorella* sp. B1**

Условия культивирования	Разновидность питательной среды и повторности	Оптическая плотность, ОЕ			
		0 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Питательная среда	BG11	0,135	0,139	0,17	0,225
	Тамия	0,17	0,192	0,203	0,238
	«Фертিকা универсал»	0,135	0,203	0,294	0,499

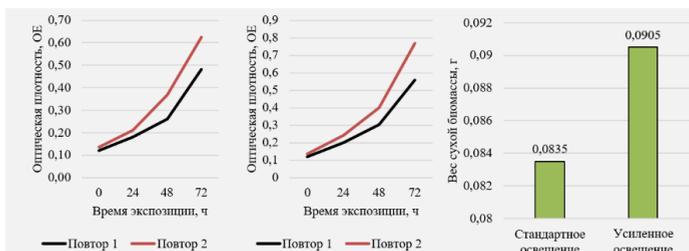


Условия культивирования	Разновидность питательной среды и повторности	Оптическая плотность, ОЕ			
		0 ч	24 ч	48 ч	72 ч
Низкое содержание водорослей в инокуляте, в повторностях	1	0,17	0,22	0,38	0,60
	2	0,148	0,17	0,2785	0,661
Высокое содержание водорослей в инокуляте, в повторностях	1	0,41	0,46	0,58	0,73
	2	0,38	0,434	0,641	0,788
Стандартное освещение (13 Вт), в повторностях	1	0,12	0,18	0,26	0,48
	2	0,14	0,21	0,37	0,63
Усиленное освещение (52 Вт), в повторностях	1	0,12	0,202	0,304	0,56
	2	0,14	0,24	0,40	0,77
Температура 25 °С, в повторностях	1	0,18	0,37	0,53	0,87
	2	0,18	0,36	0,67	0,84
Температура 32 °С, в повторностях	1	0,18	0,26	0,37	0,64
	2	0,18	0,23	0,49	0,62
Дополнительное поступление CO <sub>2</sub> , в повторностях	1	0,16	0,34	1,10	2,53
	2	0,15	0,53	1,73	2,94
Отсутствие дополнительного поступления CO <sub>2</sub> , в повторностях	1	0,16	0,22	0,53	0,68
	2	0,15	0,29	0,60	0,86

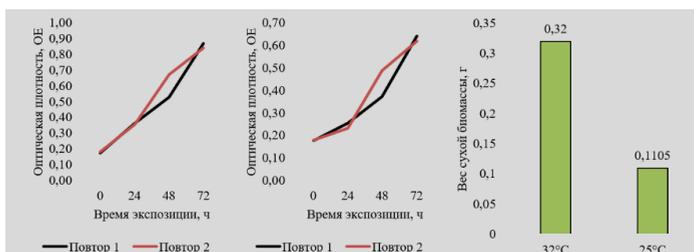
**Концентрация микроводорослей в инокуляте.** Объем инокулята, может оказывать значительное влияние на нарастание биомассы микроводоросли. Увеличение объема инокулята может способствовать более быстрому началу роста *Chlorella* sp. Однако слишком высокая его концентрация способна привести к конкуренции за питательные вещества и пространство, что может замедлить рост хлореллы или даже вызвать ее гибель. В работе исследовались две концентрации микроводоросли в инокуляте. В первом повторе поглощение света на начальном этапе культивирования составляло 0,16–0,17 ОЕ, во втором – 0,38–0,41 ОЕ (табл. 2). Культивирование осуществлялось в биореакторах при поддержании температуры 25 °С и освещенности лампами мощностью 52 Вт без дополнительной подачи CO<sub>2</sub> на протяжении 3 дней. Результаты эксперимента показали незначительные отличия в весе сухой биомассы (рис. 2, а), однако скорость нарастания микроводоросли при низкой концентрации клеток *Chlorella* sp. в инокуляте значительно выше, чем при более высокой, что позволяет сделать вывод о целесообразности использования низкой концентрации микроводоросли.



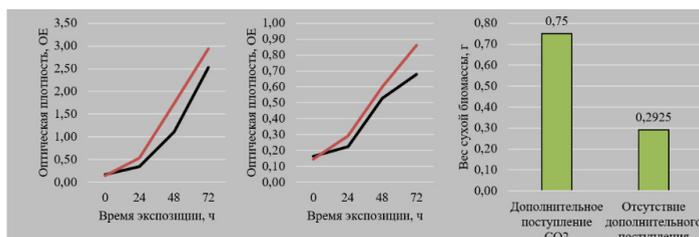
а



б



в



г

Рис. 2. Результаты подбора условий для культивирования изолята микроводорослей *Chlorella* sp. В1: а – объем инокулята (слева направо: низкое содержание водорослей, высокое содержание водорослей, вес сухой биомассы); б – освещенность (слева направо: стандартное освещение (13 Вт), усиленное освещение (52 Вт), вес сухой биомассы); в – температура инкубации (слева направо: 25 °С, 32 °С; вес сухой биомассы); г – дополнительное поступление CO<sub>2</sub> (слева направо: присутствует, отсутствует, вес сухой биомассы). Составлено с использованием данных таблицы 2



**Интенсивность света.** Интенсивность освещения является одним из ключевых факторов, оказывающих влияние на нарастание биомассы. *Chlorella* sp., как и другие водоросли, использует свет для фотосинтеза, процесса, при котором световая энергия преобразуется в химическую, необходимую для роста и развития. Интенсивность освещения напрямую влияет на скорость фотосинтеза и, следовательно, на скорость роста биомассы хлореллы. Слишком низкая интенсивность может привести к замедлению роста из-за недостаточной энергии для фотосинтеза. С другой стороны, слишком высокая может вызвать стресс у *Chlorella* sp. из-за переизбытка света и повреждения клеток. Контроль интенсивности и длительности освещения может быть важным аспектом культивирования хлореллы в промышленных масштабах. Регулирование освещения позволяет оптимизировать условия для максимального роста биомассы *Chlorella* sp. В эксперименте использовалось стандартное (13 Вт) и усиленное освещение (52 Вт). Кривые роста, а также вес сухой биомассы показывают, что увеличенное освещение способствует более эффективному культивированию (рис. 2, б). Оптическая плотность увеличилась с 0,55 ОЕ до 0,66 ОЕ (см. табл. 2). Полученные данные позволяют сделать вывод о положительном влиянии увеличенной интенсивности света для исследуемого штамма *Chlorella* sp. В1.

**Температура (25 °С, 32 °С).** Температура играет важную роль в росте и развитии хлореллы, поскольку она влияет на метаболические процессы и скорость фотосинтеза. Оптимальная температура для роста *Chlorella* sp. В1 составляет около 25–30 °С. При этих условиях данный изолят может эффективно использовать свет и питательные вещества для активного роста и накопления биомассы. Однако высокие адаптивные способности этого рода позволяют организмам приспосабливаться к условиям, отличным от нормы. При критическом повышении температуры выше оптимального уровня хлорелла может начать страдать от стресса, что приведет к замедлению роста или даже гибели. С другой стороны, при снижении температуры скорость роста микроводоросли также может снизиться из-за замедления метаболических процессов. При культивировании поддерживалась температура 25 и 32 °С (см. табл. 2). Согласно полученным данным оптической плотности (рис. 2, в), культивирование при температуре 32 °С показывает большее нарастание клеток микроводорослей. Вес сухой биомассы при температуре 32 °С составил 0,32 г, а при температуре 25 °С – 0,11 г.

**CO<sub>2</sub>.** Углекислый газ является источником углерода, необходимого для синтеза органических соединений. Увеличение концентрации CO<sub>2</sub> в среде культивирования может способствовать повышению скорости фотосинтеза и роста *Chlorella* sp. Подача углекислого газа значительно увеличила концентрацию водорослей в среде с 0,77 ОЕ до 2,74 ОЕ. Вес сухой биомассы также вырос на 0,46 г (рис. 2, г). Если сопоставить объем культуры в фотобиореакторе (500 мл) и использованный в течение трех дней объем газа (1,8 г), то расход получается 0,9 г/л в сут.



## Заключение

На основании исследования установлено, что использование гранулированного удобрения «Фертика универсал» значительно повышает оптическую плотность начального раствора в отличие от среды Тамия и BG11, которые не дают такого же значительного улучшения показателей производства биомассы. Ее рост также различается больше чем в два раза — 0,087 и 0,031 г. Гранулированные формы питательной среды будут выгоднее в условиях промышленного выращивания микроводорослей, поскольку они минимизируют временные и финансовые затраты. Кроме того, предлагается использовать уменьшенное количество клеток *Chlorella* sp. В1, поскольку микроводоросли развиваются быстрее при низких начальных концентрациях в инокуляте. При культивировании с усиленной освещенностью рост биомассы ускоряется с соответственным увеличением оптической плотности с 0,55 ОЕ до 0,66 ОЕ, а культивированные при 32 °С, в отличие от комнатной температуры, показывает увеличение в биомассе, доходя до 0,32 г на 500 мл объема. Концентрация водорослей в среде также значительно увеличивается при внесении углекислого газа в количестве 0,9 г/л в течение трех дней на указанный объем.

143

*Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности, проект № FZSM-2024-0004.*

## Список литературы

1. Benedetti M., Vecchi V., Barera S., Dall'Osto L. Biomass from microalgae: The potential of domestication towards sustainable biofactories // Microbial. Cell. Factories. 2018. Vol. 17.
2. Fernandes B.D., Mota A., Teixeira J.A., Vicente A.A. Continuous cultivation of photosynthetic microorganisms: approaches, applications and future trends // Biotechnol. Adv. 2015. Vol. 33. P. 1228–1245. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.03.004.
3. Hu W. Dry weight and cell density of individual algal and cyanobacterial cells for algae research and development. Columbia, 2014.
4. Лисовский Г. М. Управляемое культивирование микроводорослей. М., 2013.
5. Cuaresma M., Janssen M., Vilchez C., Wijffels R. H. Horizontal or vertical photobioreactors? How to improve microalgae photosynthetic efficiency // Bioresour. Technol. 2011. Vol. 102. P. 5129–5137. doi: 10.1016/j.biortech.2011.01.078.

## Об авторах

Николай Дмитриевич Шамаев — канд. биол. наук, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия.

E-mail: nikolai.shamaev94@mail.ru

ORCID: 0000-0002-0575-3760

SPIN-код: 2602-2764



Полина Александровна Курынцева — канд. биол. наук, доцент, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия.

E-mail: polinazwerewa@yandex.ru

ORCID: 0000-0002-9274-7077

SPIN-код: 7028-8557

Светлана Юрьевна Селивановская — доктор. биол. наук, проф., Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия.

E-mail: svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru

ORCID: 0000-0001-6379-7166

SPIN-код: 4867-6900

144

*N. D. Shamaev, P. A. Kuryntseva, S. Yu. Selivanovskaya*

## CULTIVATION OF CHLORELLA SP. MICROALGAE ISOLATES WITH BIOMASS PRODUCTIVITY ASSESSMENT

Kazan (Volga Region) Federal University, Russia

Received 15 July 2024

Accepted 18 September 2024

doi: 10.5922/vestniknat-2024-4-10

**To cite this article:** Shamaev N. D., Kuryntseva P. A., Selivanovskaya S. Yu., 2024, Cultivation of Chlorella sp. microalgae isolates with biomass productivity assessment, *Vestnik of Immanuel Kant Baltic Federal University. Series: Natural and Medical Sciences*, №4. P. 135 – 145. doi: 10.5922/vestniknat-2024-4-10.

*Green microalgae belong to a phyletic category of organisms that have adapted to a wide range of ecological conditions. This study explores a novel freshwater microalgae isolate, Chlorella sp. B1, as a potential platform for biomass production. The research evaluated the isolate's ability to grow in mixotrophic media. The results reveal a relationship between growth rate and dynamic changes in biomass composition. The use of granulated forms of the fertilizer "Fertika Universal" as a nutrient medium significantly increased the optical density of the initial solution to 0.087, more than doubling the results compared to other conventional media and proving advantageous for industrial-scale cultivation. The study recommends using a reduced initial cell concentration of Chlorella sp. B1 in the inoculum, followed by cultivation at 32°C with enhanced illumination (52 W) and the addition of 0.9 g/L of carbon dioxide for three days in a 500 mL flat-panel photobioreactor.*

**Keywords:** microalgae isolate, *Chlorella* sp., cultivation conditions

### The authors

Dr Nikolai D. Shamaev, Kazan (Volga Region) Federal University, Russia.

E-mail: nikolai.shamaev94@mail.ru

ORCID: 0000-0002-0575-3760

SPIN-код: 2602-2764



Dr Polina A. Kuryntseva, Associate Professor, Kazan (Volga Region) Federal University, Russia.

E-mail: polinazwerewa@yandex.ru

ORCID: 0000-0002-9274-7077

SPIN-код: 7028-8557

Prof. Svetlana Yu. Selivanovskaya, Kazan (Volga Region) Federal University, Russia.

E-mail: svetlana.selivanovskaya@kpfu.ru

ORCID: 0000-0001-6379-7166