

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
И МОДЕЛИРОВАНИЕ РОСТА МИКРОВОДОРОСЛЕЙ  
ШТАММА *CHLORELLA VULGARIS* ИФР № С-111 \***

**Д. С. Дворецкий, Е. В. Пешкова, М. С. Темнов**

*Кафедра «Технологии и оборудование пищевых и химических производств»,  
ФГБОУ ВПО «ТГТУ»; dvoretsky@tambov.ru*

**Ключевые слова и фразы:** внутриклеточные неполярные липиды; математическое моделирование роста биомассы; микроводоросль *Chlorella vulgaris*; состав питательной среды; условия культивирования.

**Аннотация:** Проведено экспериментальное исследование условий культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111 с повышенным содержанием липидов. Произведен подбор питательных сред, установлена концентрация нитрата натрия как фактора, лимитирующего образование внутриклеточных неполярных липидов, изучено влияние температуры культивирования на прирост биомассы штамма. На основании результатов проведенных экспериментальных исследований получены кинетические коэффициенты математической модели роста биомассы микроводоросли с повышенным содержанием внутриклеточных неполярных липидов.

---

**Введение**

В современном мире ведутся активные поиски новых экологически безопасных видов сырья и способов их трансформации в новые продукты и дружелюбные экологии источники энергии. Одним из самых перспективных сырьевых ресурсов в настоящее время является биомасса микроводорослей. Работы со штаммами *Chlorella vulgaris* активно велись на протяжении последних 50 лет, но тем не менее не утратили своей актуальности.

В работе [1] обосновано, что микроводоросли станут основным сырьевым возобновляемым источником технических липидов для производства биотоплива. В работе [2] изучены штаммы *Chlorella vulgaris* 2714 и два различных выделенных штамма *Microcystis aeruginosa* LB2238 и LB2061. Клетки штаммов выращивались на средах BG11, TAP и TP. В результате было определено, что при выращивании штаммов на среде BG11 наибольшую продуктивность имеет *Chlorella vulgaris* 2714 на 15 день культивирования 38 миллионов клеток в 1 мл суспензии, *Microcystis aeruginosa* LB2238 и LB2061 – 8 миллионов клеток в 1 мл суспензии и 30 миллионов клеток в 1 мл суспензии соответственно. При выращивании штамма *Chlorella vulgaris* 2714 на средах BG11, TAP и TP наибольший прирост биомассы составил на среде TAP. Возможность культивирования *Chlorella vulgaris* Buitenzorg для получения биомассы с повышенным содержанием липидов как сырья для производства биотоплива изучена в работе [3]. Штамм культивиру-

---

\* По материалам доклада на конференции ММТТ-2014.

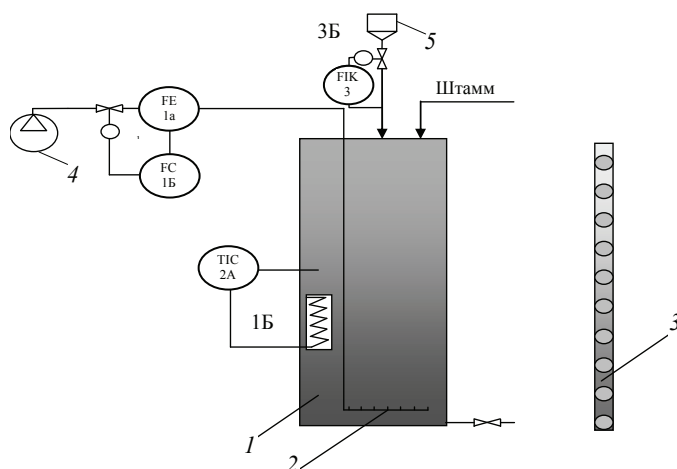
вался на среде *Benneck*, в результате было определено, что питательная среда *Benneck* с растворенным азотом является наиболее оптимальным питанием для производства липидов до 0,42 г/г биомассы (контроль осуществлялся по источнику азота – нитрату калия). При наличии мочевины, в качестве источника азота, наблюдалось снижение роста клеток на 30 %, при этом создавались условия для производства белка до 0,54 г/г биомассы. Выяснено, что использование сточных вод, содержащих аммиак, позволяет увеличить на 55...60 % скорость роста хлореллы и увеличить количество внутриклеточных липидов на 8,5 %.

### Экспериментальное исследование условий культивирования биомассы *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111

Цель настоящего исследования заключалась в определении условий культивирования микроводорослей с повышенным содержанием липидов для дальнейшего их использования при производстве биотоплива. Для достижения указанной цели поставлены и решены следующие задачи: 1) определение количественного и качественного состава питательной среды для получения максимального прироста биомассы; 2) оптимизация условий культивирования биомассы микроводорослей *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111 для производства биотоплива (толщина слоя суспензии, освещенность, температура); 3) получение уравнений математической модели роста биомассы и его констант.

Эксперименты проводились при следующих фиксированных условиях: 1) посевной материал составлял 20 % от общего объема суспензии; 2) рН = 6,2...8; 3) барботаж суспензии для всех экспериментов осуществлялся газовой смесью с содержанием углекислого газа 0,04 % и расходом 80 л/ч для интенсивного перемешивания слоев суспензии; 4) фотопериод составлял 24 ч; 5) каждые четверо суток в суспензию добавлялся источник азота в том же соотношении, в котором он вносился для приготовления питательной среды. Определение концентрации клеток осуществлялось путем прямого подсчета в камере Горяева [4].

Культивирование осуществлялось в лабораторной установке с реактором цилиндрической формы объемом 2 литра из прозрачного материала (рис. 1). В реак-



**Рис. 1. Лабораторный фотореактор для культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris*:**

- 1 – реактор в форме цилиндра ( $h = 400$  мм,  $D = 80$  мм); 2 – барботажное устройство;  
3 – панель с энергосберегающими лампами; 4 – компрессор;  
5 – емкость для подачи питательной среды

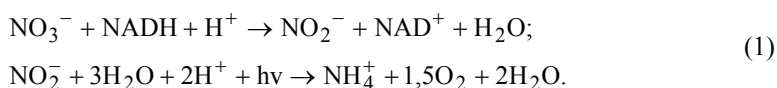
тор 1 с помощью питателя 5 добавлялись питательные вещества и вносились штамм микроводорослей. С помощью барботажного устройства 2, соединенного с компрессором 4, осуществлялось перемешивание суспензии и подача газовой смеси. На расстоянии 150 мм от реактора расположена панель с энергосберегающими лампами, которые освещают суспензию в течение 24 часов в сутки. Температура реакционной среды поддерживается с помощью терморегулятора.

На первом этапе эксперимента изучалась возможность по культивированию штамма на питательных средах Тамийя [5], А-5 [6] и ТАР [2] при освещенности  $10^4$  лк и начальной концентрации посевного материала 3...5 % от объема питательной среды.

На пятый день культивирования концентрация биомассы на среде Тамийя составила  $14,1 \cdot 10^6$  кл./мл, на среде ТАР –  $2,1 \cdot 10^6$  кл./мл и на среде А-5 –  $0,2 \cdot 10^6$  кл./мл (рис. 2, а). Таким образом, для культивирования данного штамма в большей степени подходит среда Тамийя.

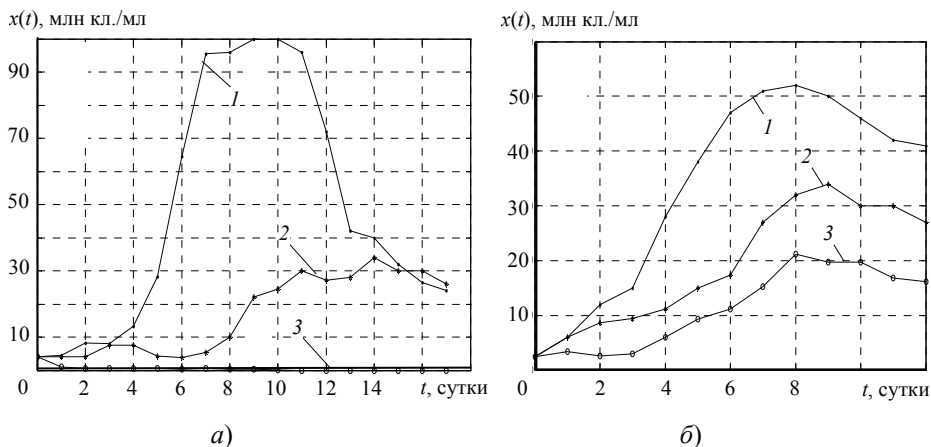
На втором этапе эксперимента сравнивалась динамика прироста биомассы микроводоросли при использовании в питании различных источников азота: нитрата калия (5 г/л), хлорида аммония (2,64 г/л) и мочевины (1,5 г/л). Уровень освещенности поддерживался на уровне  $7 \cdot 10^3$  лк. В качестве источника азота в накопительном периоде роста наилучший результат получился при использовании нитрата калия (рис. 2, б) –  $23,8 \cdot 10^6$  кл./мл на 7-й день.

При ассимиляции нитрата в клетке происходит межклеточное превращение нитрат-иона, для которого необходим ферментативный кофактор NADH [3]:

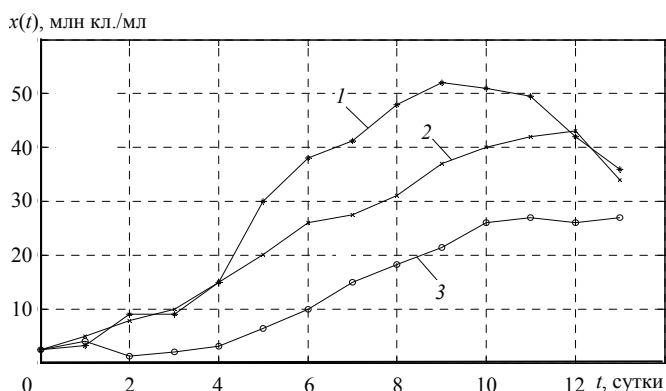


Недостаток нитрата калия состоит в том, что он является щелочной солью, которая во время культивирования повышает рН до 8,5...9, что приводит к ингибированию процесса накопления биомассы [6].

Установлено [6], что при культивировании штамма и использовании в качестве источника азота мочевины, на 4–5 день культивирования аммонийная форма азота может достигать в среде 40...60 % от общего содержания азота, что подкисляет среду и вызывает угнетение роста клеток.



**Рис. 2. Динамика прироста биомассы штамма *Chlorella vulgaris* ИФП №С-111:**  
 а – на различных питательных средах (1 – Тамийя; 2 – ТАР; 3 – А-5);  
 б – на модернизированных средах Тамийя (4 – нитрат калия; 5 – мочевины;  
 6 – хлорид аммония)



**Рис. 3. Динамика прироста биомассы штамма *Chlorella vulgaris* ИФР №С-111 в зависимости от температуры: 1 – 27 °С; 2 – 30 °С; 3 – 35 °С**

Ионы аммония могут быть использованы клетками микроводоросли для синтеза белков и хлорофилла, что напрямую связано с приростом клеток. Применение хлорида аммония снижает прирост биомассы, поскольку в жидкой питательной среде он гидролизруется, снижая уровень pH и угнетая размножение клеток.

Изучалось влияние температуры культивирования на прирост биомассы штамма. Культивирование осуществлялось на среде Таммийа, при толщине слоя суспензии 80 мм, уровне освещенности  $7 \cdot 10^3$  лк, в качестве источника азота использовался нитрат калия, температура культивирования варьировалась: 27 °С – для первого образца; 30 °С – для второго; 35 °С – для третьего.

Максимальный прирост биомассы штамма был при температуре суспензии 30 °С, и составил  $52 \cdot 10^6$  кл./мл на 14 день культивирования (рис. 3).

### Математическое моделирование процесса культивирования биомассы

Анализ экспериментальной зависимости накопления биомассы микроводоросли показал, что характер кривой соответствует логистическому уравнению Ферхюльста для ограниченного роста популяции [7]

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \left(1 - \frac{x}{K}\right), \quad (4)$$

где  $K$  – емкость популяции, млн кл./мл;  $\mu$  – удельная скорость роста, сутки<sup>-1</sup>.

Аналитическое решение уравнения Ферхюльста имеет вид

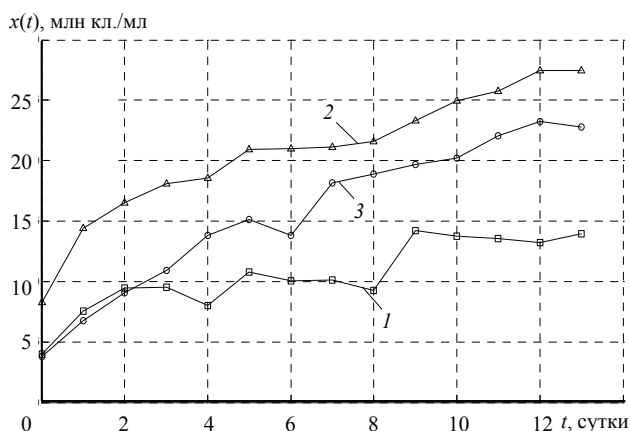
$$x(t) = \frac{x_0 K e^{\mu t}}{K - x_0 + x_0 e^{\mu t}}. \quad (5)$$

Для вычисления удельной скорости роста в многофакторном процессе целесообразно использовать универсальную мультипликативную зависимость [8], в которой каждый фактор автономен

$$\mu = \mu(S_1)\mu(S_2)\dots\mu(S_n),$$

где  $S$  – концентрация субстратных компонентов в биореакторе, г/л.

Для стимулирования накопления внутриклеточных липидов микроводоросли необходимо создать стрессовые условия – дефицит азотсодержащих веществ. Субстрат, находящийся в наименьшей доступности и определяет скорость раз-



**Рис. 4.** Динамика накопления штамма *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111 на среде Тамийя с различным содержанием нитрата калия:  $S_1$  – 2,5 г/л;  $S_2$  – 7 г/л;  $S_3$  – 15 г/л (экспериментальные)

множения, поэтому были взяты питательные среды с различным содержанием нитрата калия 0,85...65 г. Культивирование осуществлялось в течение 13 суток, уровень освещенности составлял  $7 \cdot 10^3$  лк, температура культивирования 30 °С.

Анализ графика рис. 4 позволяет сделать вывод, что емкость популяции зависит от величины внесенного лимитирующего субстрата – нитрата калия. Модель, учитывающую ингибирование повышенными концентрациями субстрата, предложил Эндрюс [8]

$$\mu(S) = \frac{\mu_{\max} S}{K_S S \left(1 + \frac{S}{K_i}\right)}, \quad (6)$$

где  $\mu(S)$  – удельная скорость роста популяции, сутки<sup>-1</sup>;  $S$  – концентрация лимитирующего субстрата, г/л;  $\mu_{\max}$  – максимальная удельная скорость роста, сутки<sup>-1</sup>;  $K_S$  – константа насыщения для данного субстрата, г/л;  $K_i$  – константа ингибирования, г/л.

Обработка экспериментальных данных проводилась с использованием уравнений нелинейной регрессии (метод Гаусса–Ньютона) в среде MATLAB. Получены кинетические коэффициенты уравнения  $\mu_{\max} = 0,533$  сутки<sup>-1</sup>,  $K_S = 1,076$  г/л,  $K_i = 30,3$  г/л.

Таким образом, уравнение, характеризующее прирост биомассы, будет иметь вид

$$\frac{dx}{dt} = 0,4x \left(1 - \frac{x}{55}\right). \quad (7)$$

### Заключение

Для культивирования штамма *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111 рекомендована среда Тамийя, содержащая в составе в качестве источника азота нитрат калия (231 мг азота на 1 л среды), при использовании фотобиореактора с толщиной слоя суспензии порядка 80 мм и уровне освещенности  $10^4$  лк, температуре суспензии

30 °С, что позволяет достигнуть стационарной фазы к 8–9 суткам культивирования при концентрации клеток  $55 \cdot 10^6$  кл./мл.

Вид кривой динамики роста биомассы штамма *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111 соответствует графику решения логистического уравнения Ферхюльста, уравнение, позволяющее определить удельную скорость роста, соответствует уравнению Эндриуса, учитывающему ингибирование повышенными концентрациями лимитирующего субстрата.

#### *Список литературы*

1. Gouveia, L. Microalgae as a Feedstock for Biofuels / L. Gouveia. – Springer, 2011. – 68 p.
2. Held, P. Determination of Algal Cell Lipids Using Nile Red – Using Microplates to Monitor Neutral Lipids in Chlorella Vulgaris / P. Held, K. Raymond. – URL : <http://www.biotek.com/resources/articles/nile-red-dye-algal.html>.
3. Wijanarko, A. Effect of the Presence Of Substituted Urea and Also Ammonia as Nitrogen Source in Cultivied Medium on Chlorella Lipid Content, Progress in Biomass and Bioenergy Production / A. Wijanarko ; Dr. Shahid Shaukat (Ed.) ; InTech. – URL : <http://www.intechopen.com/books/progress-in-biomass-and-bioenergy-production/effect-of-the-presence-of-substituted-urea-and-also-ammonia-as-nitrogen-source-in-cultivied-medium-o>.
4. Владимирова, М. Г. Интенсивная культура одноклеточных водорослей / М. Г. Владимирова, В. Е. Семененко. – М. : Изд-во Акад. наук СССР, 1962. – 61 с.
5. Богданов, Н. И. Суспензия хлореллы в рационе сельскохозяйственных животных / Н. И. Богданов. – Волгоград : Здоровье и экология, 2007. – 48 с.
6. Упитис, В. В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей / В. В. Упитис. – Рига : Зинатне, 1983. – 240 с.
7. Самодуров, А. А. Аналитическое и компьютерное решение дифференциальных и разностных уравнений Ферхюльста / А. А. Самодуров, Н. А. Воронкина // Информатизация обучения математике и информатике: педагогические аспекты : материалы Междунар. науч. конф., посвященной 85-летию Белорусского государственного университета, Минск, 25 – 28 окт. 2006 г. / Белорус. гос. ун-т. – Минск, 2006. – С. 406 – 411.
8. Бирюков, В. В. Основы промышленной биотехнологии : учеб. пособие / В. В. Бирюков. – М. : КолосС, 2004. – 296 с.

---

### **Experimental Research and Modeling of Growth of Microalgae *Chlorella Vulgaris* IGF No. C-111**

**D. S. Dvoretzkiy, E. V. Peshkova, M. S. Temnov**

*Department “Technologies and Equipment  
for Food and Chemical Industries”,  
TSTU; [dvoretzkiy@tambov.ru](mailto:dvoretzkiy@tambov.ru)*

**Key words and phrases:** composition of nutrient medium; cultivation conditions; intracellular non-polar lipids; mathematical modeling of biomass growth; microalgae *Chlorella vulgaris*.

**Abstract:** Cultivation conditions of microalgae *Chlorella vulgaris* IGF No. C-111 with a high content of lipids were studied experimentally. Nutrient media were selected; the concentration of sodium nitrate as a factor limiting the formation of intracellular non-polar lipids was calculated; the effect of cultivation temperature on the growth of strain biomass was studied. Based on the results of these experimental studies the kinetic coefficients of a mathematical model of biomass growth of microalgae with high content of intracellular non-polar lipids were obtained.

#### References

1. Gouveia L. *Microalgae as a Feedstock for Biofuels*, Springer, 2011, 68 p.
2. Held P., Raymond K. *Determination of Algal Cell Lipids Using Nile Red – Using Microplates to Monitor Neutral Lipids in Chlorella Vulgaris*, available at: <http://www.biotech.com/resources/articles/nile-red-dye-algal.html> (accessed 20 November 2014).
3. Anondho Wijanarko, Dr. Shahid Shaukat (Ed.), InTech. *Effect of the Presence Of Substituted Urea and Also Ammonia as Nitrogen Source in Cultivated Medium on Chlorella Lipid Content, Progress in Biomass and Bioenergy Production*, available at: <http://www.intechopen.com/books/progress-in-biomass-and-bioenergy-production/effect-of-the-presence-of-substituted-urea-and-also-ammonia-as-nitrogen-source-in-cultivated-medium-o> (accessed 20 November 2014).
4. Vladimirova M.G., Semenenko V.E. *Intensivnaya kul'tura odnokletochnykh vodoroslei* (Intensive culture of unicellular algae), Moscow: Izdatel'stvo Akademii nauk SSSR, 1962, 61 p.
5. Bogdanov N.I. *Suspenziya khlorelly v ratsione sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh* (Chlorella suspension in the diet of farm animals), Volgograd: Zdorov'e i ekologiya, 2007, 48 p.
6. Uпитis V.V. *Makro- i mikroelementy v optimizatsii mineral'nogo pitaniya mikrovdoroslei* (Macro- and microelements in mineral nutrition optimization of microalgae), Riga: Zinatne, 1983, 240 p.
7. Samodurov A.A., Voronkina N.A. *Informatizatsiya obucheniya matematike i informatike: pedagogicheskie aspekty* (Computerization of teaching mathematics and computer science: pedagogical aspects), Proceedings of the International scientific conference devoted to the 85th anniversary of the Belarusian State University, Minsk, 25-28 October 2006, pp. 406-411.
8. Biryukov V.V. *Osnovy promyshlennoi biotekhnologii* (Fundamentals of Industrial Biotechnology), Moscow: KolosS, 2004, 296 p.

---

### Experimentelle Forschung und Modellierung des Wachens der Mikrowasserpflanzen *Chlorella Vulgaris* IFR № C-111

**Zusammenfassung:** Es ist die experimentale Forschung der Bedingungen der Pflege der Mikrowasserpflanze *Chlorella Vulgaris* IFR № C-111 mit dem erhöhten Inhalt der Lipide angeführt. Es ist die Auswahl der Nährböden gemacht, es ist die Konzentration des Nitrats des Natriums als Faktors bestimmt, der die Bildung der intrazellularen nicht polaren Lipide limitiert, es ist der Einfluss der Temperatur der Pflege auf die Zunahme der Sctammbiomasse studiert. Aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten experimentalen Forschungen sind die kinetischen Koeffizienten des mathematischen Modells der Größe der Biomasse der Mikrowasserpflanze mit dem erhöhten Inhalt der intrazellularen nicht polaren Lipide erhalten.

## Étude expérimentale et modélage de la croissance des micro-algues *Chlorella vulgaris* JFR № C-111

**Résumé:** Est réalisée une étude expérimentale des conditions de la culture des micro-algues *Chlorella vulgaris* JFR № C-111 avec le contenu élevé des lipides. Est effectué le choix des milieux nutritifs, est établie la concentration du nitrate de sodium comme facteur limitant la formation des lipides intercellulaires non polaires, est étudiée l'influence de la température de la culture sur l'accroissement de la biomasse du souche. Sont obtenus les coefficients cinétiques du modèle mathématique de l'accroissement de la biomasse des micro-algues avec le contenu élevé des lipides.

---

**Авторы:** *Дворецкий Дмитрий Станиславович* – доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой «Технологии и оборудование пищевых и химических производств»; *Пешкова Евгения Владимировна* – кандидат технических наук, доцент кафедры «Технологии и оборудование пищевых и химических производств»; *Темнов Михаил Сергеевич* – аспирант кафедры «Технологии и оборудование пищевых и химических производств», ФГБОУ ВПО «ТГТУ».

**Рецензент:** *Нагорнов Станислав Александрович* – доктор технических наук, профессор, заместитель директора по научной работе, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт использования техники и нефтепродуктов в сельском хозяйстве», г. Тамбов.

---