

ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛИ ХЛОРЕЛЛА В ТРУБЧАТОМ ФОТОБИОРЕАКТОРЕ

С. А. Нагорнов, Ю. В. Мещерякова

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
использования техники и нефтепродуктов в сельском хозяйстве», г. Тамбов;
yulya-belova@yandex.ru

Ключевые слова: микроводоросль; оптическая плотность; освещение; питательная среда; прирост биомассы; температура; углекислый газ; условия культивирования; фотобиореактор.

Аннотация: Представлено накопительное и непрерывное культивирование микроводоросли *Chlorella vulgaris* в трубчатом фотобиореакторе. Проведена оценка прироста биомассы по показаниям оптической плотности и определен коэффициент светопоглощения. Экспериментально подобраны оптимальные условия культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris* в целях использования ее в синтезе биодизельного топлива.

Введение

Культивирование микроводорослей в современном мире приобретает все больший интерес. В качестве объекта массового культивирования используют зеленые микроводоросли (*Chlorella* и *Scenedesmus*), которые стали наиболее популярными в прикладных исследованиях. Так готовую суспензию хлореллы используют в качестве корма животным, источника витаминов и полезных микроэлементов, сырья для получения биотоплива третьего поколения. В настоящее время производится все больше продукции из водорослей. Несмотря на это, вопрос продуктивности биомассы остается актуальным.

Продуктивность хлореллы зависит от следующих факторов: конструкции фотобиореактора, питательной среды, концентрации углекислого газа, pH, температуры, освещенности [1]. Оптимальное сочетание все этих параметров позволит получить максимальный выход биомассы.

Экспериментальное исследование культивирования микроводорослей

Исходный штамм *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111 использовали для посева в чашки Петри со средой Тамийя. Предварительная оценка прироста клеток в суспензии осуществляли методом прямого подсчета клеток в камере Горяева. Число клеток в исходном штамме составило $2 \cdot 10^6$ кл./мл. Засеянные чашки освещались люминесцентной лампой в течение 5 суток. При достижении концентрации клеток $5 \cdot 10^6$ кл./мл их постепенно пересевали в фотобиореактор. Посевной материал для фотобиореактора составлял 25 % от общего объема. Фотопериод составлял: 12 ч свет, 12 ч темнота; pH поддерживался на уровне 7...8; температура 34...36 °С.

Технология получения биодизельного топлива из микроводорослей состоит из следующих этапов: культивирование микроводоросли в фотобиореакторе, отделение биомассы от воды (фильтрация, сепарирование), сушка полученного растительного сырья, экстракция растительного сырья, разрушение клеточной оболочки хлореллы [2].

Культивирование хлореллы осуществляли в циркулирующем трубчатом фотобиореакторе (ФБР) (рис. 1), который изготовлен из прозрачного оргстекла в виде трубы, вмещающей объем суспензии 10 литров. Из емкости E1 питательная среда Тамийя 1 подается в ФБР для культивирования. Через входной патрубок суспензию микроводоросли 3 с помощью центробежного насоса Н вводят в фотобиореактор ФБР. Через выходной патрубок суспензия микроводоросли 2 отправляется в смеситель газов С, где происходит ее насыщение газовой воздушной смесью. Газовоздушная смесь (воздух 6 и углекислый газ 5) подается компрессором К и углекислотным баллоном Б. Насыщенная газовоздушная смесь суспензия 3 микроводорослей отправляется ФБР. Для освещения используются светодиодные ленты. Часть итоговой суспензии микроводорослей 4 отправляется в емкость E2, а другая часть используется как посевной материал для последующего культивирования. Отработанные газы 7 через штуцер удаляются в верхней части реактора. Для циркуляции и перемешивания служит насос. Перемешивание суспензии осуществляется за счет барботирования газовой воздушной смесью. Температура поддерживается терморегулятором. Биомассу в емкости E2 микроводоросли 8 подвергают физическому воздействию в аппарате вихревого слоя ABC, создающем вращающееся электромагнитное поле с хаотически движущимися ферромагнитными частицами, воздействующими на сырье, в результате чего происходит разрушение клеточных оболочек. Полученную биомассу 9 подвергают экстракции органическим растворителем в трехступенчатом аппарате А с закрученным потоком инертных тел.

В ФБР созданы оптимальные условия культивирования [3]: питательная среда Тамийя, температура поддерживается на уровне 34...36 °С, освещенность 20...25 клк, осуществляется подача углекислого газа 2...10 % и перемешивание суспензии. Установлен рН-метр, который управляет ростом микроводорослей. Отклонение значения рН от заданного, вызывает подачу питательной среды. Расход углекислого газа и воздуха определяли, выражая из формулы (1):

$$P = \left(\frac{V}{0,785d^2} \right)^2 \frac{\rho}{2}, \quad (1)$$

где P – давление газов, показания манометров на редукторе и компрессоре, Па; d – внутренний диаметр трубопровода, по которому осуществляется подвод газов к ФБР, м; ρ – плотность газов, кг/м³; V – расход газов, м³/с,

$$V = 1,11d^2 \sqrt{\frac{P}{\rho}}. \quad (2)$$

Плотность газов ρ определяли по уравнению Менделеева–Клайперона

$$\rho = \frac{M P}{R T}. \quad (3)$$

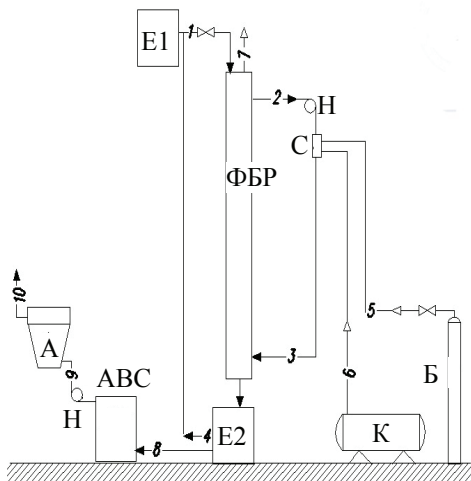


Рис. 1. Схема экспериментальной установки для выращивания микроводорослей

Необходимую концентрацию углекислого газа в газозудной смеси устанавливали с помощью регулирования давления на выходе из баллона и компрессора. Культивирование осуществляли в двух режимах: накопительном (периодическом) и непрерывном. При *накопительном* (периодическом) культивировании посевной материал вносится в питательную среду в начале процесса и дальнейшее культивирование идет без отбора биомассы до выхода ее на стационарный уровень. Накопительное культивирование проведено однократно пока культура не достигла максимальной концентрации и не перешла к фазе отмирания.

В течение семи суток осуществляли накопительное культивирование микроводоросли хлореллы в ФБР. Параллельно измеряли оптическую плотность суспензии и определяли концентрацию микроводорослей в суспензии.

Определение концентрации микроводорослей в суспензии производили по показателю оптической плотности на фотоэлектроколориметре КФК-2 по методике [4]. Выбор кювет проводили визуально, соответственно интенсивности окраски раствора. Были выбраны кюветы 0,3075; 0,504; 1,085 и 3,105 см. Для сопоставления результатов измерений все расчеты вели в пересчете на кювету 0,504 см, используя соответствующий коэффициент пропорциональности. Если оптическая плотность культуры превышала 0,6 ед., то измеряли долю пропускания T_{750} с последующим пересчетом $D_{750} = -\lg T_{750}$. Для слабо поглощающих проб использовали кюветы с большим номинальным значением. Пробы с оптической плотностью выше единицы предварительно разбавляли свежей питательной средой, подбирая коэффициент разбавления таким образом, чтобы показания КФК-2 попадали в диапазон наименьшей погрешности (0,2...0,6 ед.). Выбор светофильтра также проводили по методике [4], выбран светофильтр $\lambda = 490$ нм.

На основе полученных экспериментальных данных построен калибровочный график для определения массы сухих микроводорослей (рис. 2), полученной фильтрованием под вакуумом на бумажных фильтрах в колбе Бунзена и воронке Бюхнера. Фильтр высушивали в сушильном шкафу и взвешивали. По разнице масс сухих фильтров до и после фильтрования определяли сухую массу водорослей. В таблице представлена некоторая выборка данных значения оптической плотности суспензии микроводоросли.

График (см. рис. 2) сопоставим со стандартной кривой роста периодической культуры микроорганизмов. Прослеживаются лаг-фаза, фазы экспоненциального роста и отмирания. Происходит непрерывное изменение физиологического состояния клеток, концентрация микроорганизмов нарастает и останавливается. Это происходит либо из-за недостатка питательной среды, либо накопления продуктов жизнедеятельности.

Методом наименьших квадратов определен коэффициент светопоглощения ε , $\text{дм}^3/(\text{моль}\cdot\text{см})$

$$\varepsilon = \frac{n \sum_{i=1}^n D_i m_i - \sum_{i=1}^n D_i \sum_{i=1}^n m_i}{n \sum_{i=1}^n m_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n m_i \right)^2} \quad (4)$$

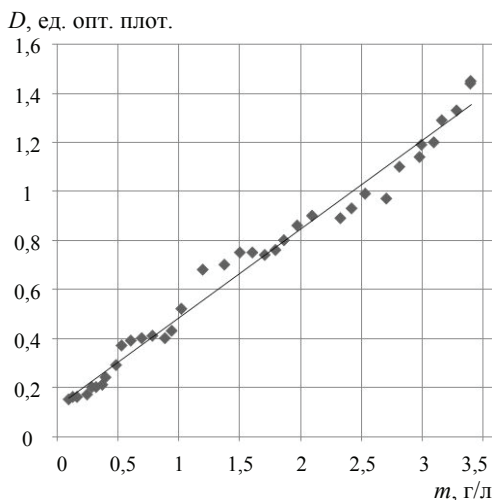


Рис. 2. Калибровочный график для определения массы сухих микроводорослей

Оптическая плотность суспензии микроводорослей

Масса сухих водорослей $m_{\text{сух.в.}}$, г/л	Оптическая плотность D , ед. опт. плот.
0,098	0,15
0,375	0,21
0,787	0,41
1,025	0,52
1,978	0,86
1,201	0,68
2,100	0,90
2,537	0,99
2,819	0,90
3,101	1,02

где m – масса сухих водорослей, г/л; n – число опытов ($n = 35$); D – оптическая плотность; $\varepsilon = 0,36 \text{ дм}^3/(\text{моль}\cdot\text{см})$.

В дальнейшем осуществлялись замеры лишь оптической плотности. Затем либо по калибровочному графику, либо исходя из коэффициента светопоглощения определяли сухую массу микроводорослей в суспензии.

При накопительном культивировании культуры находятся в неустойчивом состоянии, в связи с этим установка работает в непрерывном режиме. Проведены эксперименты по подбору оптимальных условий культивирования микроводорослей в ФБР в непрерывном режиме:

регулярно подавалась питательная среда и регулярно удалялась биомасса и продукты ее жизнедеятельности. Этот режим характеризуется постоянством концентрации микроорганизмов и удельной скорости роста популяции. На данном этапе в задачу непрерывного культивирования не входило получение максимального выхода биомассы, анализировалось лишь влияние внешних факторов на ее прирост.

Для получения максимального прироста биомассы важную роль играют вещества с содержанием азота. Увеличение в питательной среде азотных компонентов приводит к увеличению концентрации вещества в суспензии [5], проводилось *непрерывное* культивирование на питательной среде Тамийя. Культивировали хлореллу при различной концентрации нитрата калия в растворе, так как основным азотным компонентом в питательной среде является нитрат калия.

Анализ графика (рис. 3) позволяет установить, что достижение максимальной концентрации микроводорослей происходит быстрее на среде с увеличенным содержанием азотного компонента, чем на среде обедненной источником азота.

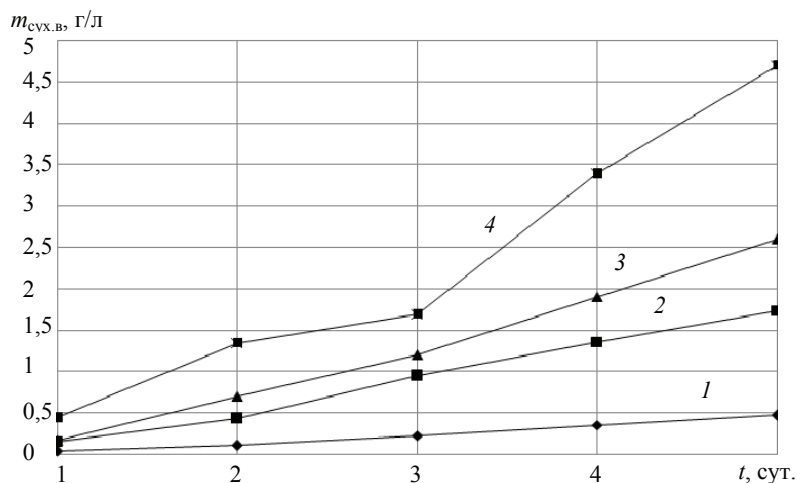


Рис. 3. График изменения массы сухих микроводорослей при разной концентрации нитрата калия, г/л:
1 – 1,25; 2 – 2,5; 3 – 5; 4 – 10

При увеличении содержания азотных компонентов в два раза в среде наблюдается прирост биомассы в среднем на 45 %, а при сокращении рост хлореллы замедляется.

Следующий фактор повышения урожайности – температура. Штамм *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111 растет при температуре в пределах 26...36 °С [3].

Исходя из графика (рис. 4, а) можно сделать вывод, что с увеличением температуры прирост биомассы увеличивается, снижение температуры не оказывает существенного воздействия на урожайность. Однако изменение температуры более 5 °С отрицательно влияет на урожайность. Оптимальная освещенность хлореллы находится в пределах $(0,7...20) \cdot 10^3$ лк, порог светового насыщения – $(1...90) \cdot 10^3$ лк. Это объясняется тем, что хлорелла может адаптироваться к различной интенсивности света, а также значение оптимальной освещенности тесно связано с конструкцией ФБР. В серии экспериментов освещенность трубчатого ФБР составила $10 \cdot 10^3$ лк.

Оптимальная концентрация углекислого газа по разным данным должна составлять от 0,8 до 10 % [6]. Такой разброс данных объясняется зависимостью продуктивности микроводорослей параллельно от других условий (освещенности, толщины просвечиваемого слоя, насыщенности углекислым газом и др.)

Из графика (рис. 4, б) видно, что ускорение прироста биомассы наблюдается при 4...7 % концентрации углекислого газа. Необходимо подобрать другие факторы, чтобы дальнейшее ускорение культивирования было возможным.

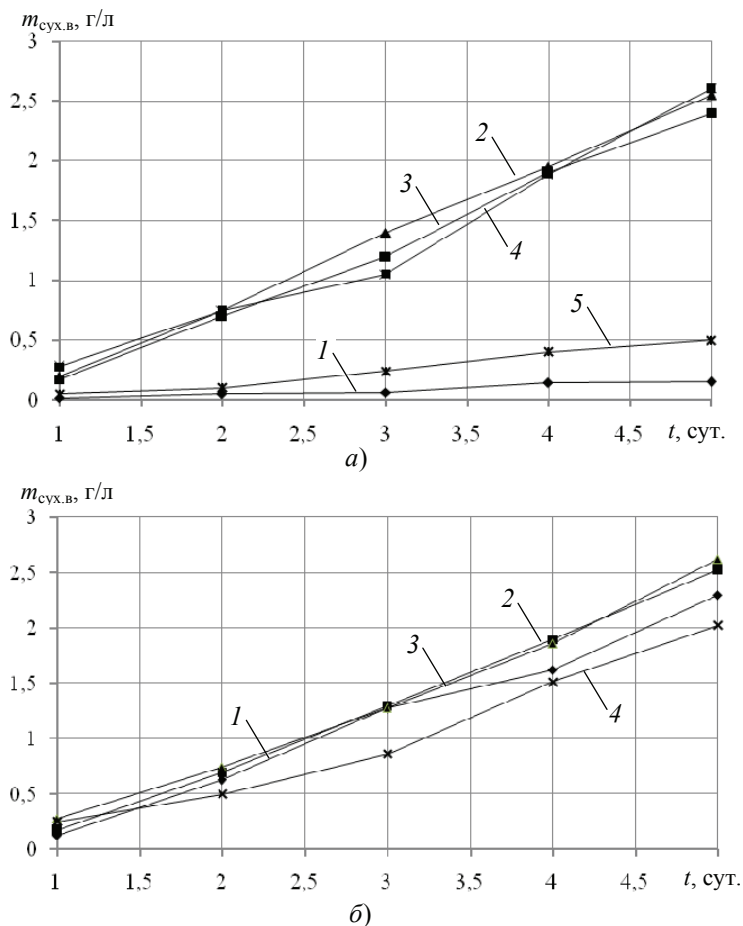


Рис. 4. Графики изменения сухой массы микроводорослей:

а – при различной температуре культивирования, °С: 1 – 20; 2 – 26; 3 – 31; 4 – 36; 5 – 40;
б – при различной концентрации углекислого газа в смеси, %: 1 – 1; 2 – 4; 3 – 7; 4 – 10

Заключение

Таким образом, установлена прямопропорциональная линейная зависимость между величиной оптической плотности и сухой массой микроводорослей. Исходя из рассчитанного коэффициента светопоглощения, дальнейшее определение сухого веса микроводорослей заключается в измерении оптической плотности. В предложенной конструкции (см. рис. 1) циркулирующего трубчатого фотобиореактора подобраны оптимальные условия культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris* ИФР № С-111: питательная среда Тамийя с увеличенным содержанием нитрата калия, температурой 31...36 °С при концентрации углекислого газа 4...7 % и освещении 10·10³ лк.

Список литературы

1. Мещерякова, Ю. В. Культивирование микроводоросли хлорелла с целью получения биотоплива / Ю. В. Мещерякова, С. А. Нагорнов // *Вопр. соврем. науки и практики*. Ун-т им. В. И. Вернадского. – 2012. – № 12. – С. 33 – 36.
2. Мещерякова, Ю. В. Технология получения биодизельного топлива из биомассы микроводоросли / Ю. В. Мещерякова // *Наука в центральной России*. – 2013. – № 3. – С. 76 – 79.
3. Богданов, Н. И. Суспензия хлореллы в рационе сельскохозяйственных животных / Н. И. Богданов. – Волгоград : Здоровье и экология, 2007. – 48 с.
4. Лебедева, М. И. Практикум по аналитической химии / М. И. Лебедева, Б. И. Исаева, И. В. Якунина. – Тамбов : Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2002. – 80 с.
5. Соловченко, А. Е. Физиологическая роль накопления нейтральных липидов эукариотическими микроводорослями при стрессах / А. Е. Соловченко // *Журн. физиология растений*. – 2012. – Т. 59, № 2. – С. 192 – 202.
6. Грачева, И. М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и биоэнергия / И. М. Грачева, Л. А. Иванова, В. М. Кантере. – М. : Колос, 1992. – 383 с.

Research into Conditions of *Chlorella Vulgaris* Microalgae Cultivation in a Tubular Photobioreactor

S. A. Nagornov, Yu. V. Meshcheryakova

All-Russian Research Institute of Equipment and Oil Products in Agriculture;
yulya-belova@yandex.ru

Keywords: carbon dioxide; conditions of cultivation; culture medium; growth of biomass; lighting; microalgae; optical density; photobioreactor; temperature.

Abstract: We conducted cumulative and continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* microalgae in a tubular photobioreactor. The estimation of biomass growth by optical density readings is produced and the coefficient of absorption is determined. The optimal conditions of *Chlorella vulgaris* microalgae cultivation for the synthesis of biodiesel have been selected experimentally.

References

1. Meshcheryakova Yu.V., Nagornov S.A. *Voprosy sovremennoi nauki i praktiki. Universitet im. V.I. Vernadskogo*, 2012, no. 12, pp. 33-36.
2. Meshcheryakova Yu.V. *Nauka v tsentral'noi Rossii*, 2013, no. 3, pp. 76-79.

3. Bogdanov N. I. *Suspenziya khlorelly v ratsione sel'skokhozyaistvennykh zivotnykh* (The suspension of chlorella in the diet of farm animals), Volgograd: Zdorov'e i ekologiya, 2007, 48 p.

4. Lebedeva M.I., Isaeva B.I., Yakunina I.V. *Praktikum po analiticheskoi khimii* (Workshop on Analytical Chemistry), Tambov: Izdatel'stvo Tambovskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta, 2002, 80 p.

5. Solovchenko A.E. *Zhurnal fiziologiya rastenii*, 2012, vol. 59, no. 2, pp. 192-202.

6. Gracheva I.M., Ivanova L.A., Kantere V.M. *Tekhnologiya mikrobykh belkovykh preparatov, aminokislot i bioenergiya* (Technology of microbial protein preparations, amino acids and bio-energy), Moscow: Kolos, 1992, 383 p.

Untersuchung der Bedingungen der Pflege der Mikrowasserpflanze Chlorella im Rohrphotobioreaktor

Zusammenfassung: Es ist die Speicher- und Ununterbrochenpflege der Mikrowasserpflanze *Chlorella vulgaris* im Rohrphotobioreaktor durchgeführt. Es ist die Einschätzung der Zunahme der Biomasse nach den Angaben der optischen Dichte durchgeführt und es ist der Koeffizient der Lichtaufnahme bestimmt. Es sind die optimalen Bedingungen der Pflege der Mikrowasserpflanze *Chlorella vulgaris* zwecks ihrer Nutzung in der Synthese des Biodiesels experimentell ausgewählt.

Étude des conditions de la culture de la microalgue chlorella dans un photobioréacteur à tube

Résumé: Est réalisée la culture continue et cumulative de la microalgue *Chlorella vulgaris* dans un photobioréacteur à tube. Est effectuée l'estimation de la croissance de la biomasse selon les indications sur la densité optique; est défini le coefficient de l'absorption de la lumière. Expérimentalement sont choisies les conditions optimales pour la culture de la microalgue *Chlorella vulgaris* afin de l'utiliser dans la synthèse de biodiesel.

Авторы: *Нагорнов Станислав Александрович* – доктор технических наук, профессор, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «ВНИИТиН»; *Мецержкова Юлия Владимировна* – младший научный сотрудник лаборатории № 7, ФГБНУ «ВНИИТиН», г. Тамбов.

Рецензент: *Зазуля Александр Николаевич* – доктор технических наук, профессор, директор ФГБНУ «ВНИИТиН», г. Тамбов.