

П. Царенко, О. Борисова, Я. Блюм

МІКРОВОДОРОСТІ ЯК ОБ'ЄКТ БІОЕНЕРГЕТИКИ

Види колекції IBASU-A — перспективні продуценти біомаси як джерела сировини для біопалива

Пошук джерел сировини для виробництва біодизельного палива становить загально визнану світову проблему, на подолання якої спрямовано зусилля біологів різного профілю і промисловців низки індустріально розвинених країн. Мікрородорості розглядають як перспективні об'єкти для біоенергетики, а скринінг колекцій живих культур зі світових альгологічних зібрань, що дасть можливість виявити види-гіперпродуценти біомаси, які здатні бути сировиною для виробництва біопалива, зробить промислові дослідження результативними. Такі роботи розпочато в Україні на базі однієї з найбільших колекцій водоростей — колекції культур мікрородоростей Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (IBASU-A).

Біодизельне паливо виготовляють шляхом хімічного процесу із сировини біологічного походження. У Європі нею слугує переважно ріпакова олія, у США — соя, в Індонезії та на Філіппінах — плоди олійної пальми, у Бразилії — рицинова олія. Застосовують також відпрацьовану рослинну олію, риб'ячий і тваринний жир тощо. Однак, вирощування сировини для виробництва біопалива потребує відчуження великих земельних площ, інтенсивна експлуатація котрих, у свою чергу, чинитиме величезне навантаження на ґрунти, підриваючи їх родючість. Крім того, вважають, що використання врожаю сільськогосподарських культур як сировини для випуску біопалива в перспективі може призвести до глобальної продовольчої кризи [7]. Тому останнім часом у пошуках енергомістких екологічних і природо-економічних об'єктів

увагу дослідників і промисловців зосереджено на мікроскопічних водоростях. Потенційно висока продуктивна здатність окремих видів, швидке накопичення біомаси, відносна простота вирощування, високий (до десятка разів більший, ніж у квіткових (вищих) рослин) вміст ліпідної фракції — лише деякі з привабливих сторін і переваг використання мікрородоростей як об'єктів для виробництва біопаливної сировини [7, 13–17, 21].

Більше ніж півсторіччя у різних країнах мікрородорості вирощують в індустріальних масштабах, щоб одержати біомасу і використати її в сільському господарстві, харчовій промисловості, парфумерії, фармакології, медицині тощо. Але в цілому культивовані види водоростей — це лише незначна частина світової альгофлори, яка нараховує близько 40 тис. видів (понад 5 тис. в Украї-

© ЦАРЕНКО Петро Михайлович. Доктор біологічних наук, професор. Завідувач відділу фікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

БОРИСОВА Олена Володимирівна. Кандидат біологічних наук. Старший науковий співробітник відділу фікології Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України.

БЛЮМ Ярослав Борисович. Академік НАН України. Директор ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України» (Київ). 2011.

ні) [10, 11, 22]. Найрентабельнішими вважають представників родів *Chlorella* Beijer. s.l., *Dunaliella* Teod., *Scenedesmus* Meyen s.l., *Spirulina* Turpin ex Gomont [6]. Перспективні види і штами одноклітинних водоростей вивчають і застосовують у багатьох країнах (США, Німеччина, Китай, Індія, Японія). Для пошуків та аналізу об'єктів промислового культивування, важливе значення має використання матеріалу з великих колекцій водоростевих культур.

Саме тому ця робота має на меті проведення скринінгу колекції культур мікроводоростей Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (IBASU-A), щоб виявити види-гіперпродуценти біомаси як потенційні джерела сировини для виробництва біопалива.

Колекція IBASU-A — це найбільша вітчизняна колекція галофільних і прісноводних мікроводоростей, яка нараховує близько 500 штамів 86 видів, що належать до 6 класів, 9 порядків, 40 родів. Її започаткували понад 50 років тому для проведення таксономічних, біохімічних, екологічних, біогеографічних досліджень галофільних видів роду *Dunaliella* — гіперпродуцентів β -каротину, а з часом значно розширили культурами прісноводних кокоїдних зелених водоростей, представників флори України, а також Росії, Грузії, Німеччини, Ізраїлю та ін. До 75% культур оригінальні, ізольовані з різних місцезростань і біотопів, а решту, одержану з колекцій зарубіжних установ, представлено типовими, мутантними, цінними для виробництва штамми. Культури водоростей альгологічно чисті або аксенічні. Деякі види зберігаються одночасно у вигляді альгологічно чистих і аксенічних культур. За умов колекційного зберігання культури водоростей підтримують на рідких і агаризованих живильних середовищах різного мінерального складу залежно від таксономічної належності організму, його фізіолого-екологічних особливостей [2, 3, 12].

Відбір штамів-продуцентів біомаси здійснювали на підставі літературних та оригінальних даних за такими критеріями: здатність накопичувати ліпіди, інтенсивність росту, стійкість до стресових чинників і контамінації різного виду. Експериментальні дослідження ростових характеристик відібраних штамів проводили за умов екстенсивного й інтенсивного культивування. В екстенсивних умовах водорості вирощували з використанням стандартних методів протягом 30–40 діб [5]. Інтенсивне культивування відбувалося 10 діб на люміностації з цілодобовим освітленням лампами ЛБ-40 (3–4 тис. лк), контролем температурного фактора (28–30°C), барботуванням.

Водорості вирощували в конічних колбах об'ємом 1000 мл за напівстерильних умов. Використовували живильні середовища Тамія, Чу-13, Бурреллі, Болда [5]. Для видів роду *Euglena* Ehrenb. — мінеральне середовище з ацетатом і дріжджовим екстрактом [7]. Приріст біомаси водоростей оцінювали підраховуючи кількість клітин у камері Горяєва і за допомогою вагового методу [5]. Продуктивність досліджуваних штамів водоростей порівнювали з відомим високопродуктивним штамом *Chlorella vulgaris* Beijer. CALU 246 (*Chlorella* sp. k) [11].

Оскільки для відбору штамів-продуцентів біомаси важливий високий вміст ліпідів у біомасі (не менш ніж 20% від сухої речовини), з урахуванням цього чинника було складено список 33 штамів 12 видів родів *Acutodesmus* (E. Hegew.) P. Tsarenko (6), *Botryococcus* Kütz. (1), *Chlorella* Beijer. (6), *Chloroidium* Nadson (2), *Desmodesmus* (Chodat) An et al. (7), *Enalax* Pascher (1), *Monoraphidium* Komárk.-Legn. (2), *Parachlorella* Krienitz et al. (6), *Euglena* Ehrenb. (2) (див. табл.).

За літературними даними найвищий вміст ліпідів притаманний колоніальній водорості *Botryococcus braunii* Kütz., яка може накопичувати понад 70% рідких вуглеводнів від сухої речовини [7]. Цей вид трапляється в різних

Список перспективних високопродуктивних штамів біомаси

№	Вид	Штам (IBASU-A)	Сприятливі умови культивування			Приріст а.с.б./ доба, г/л
			Живильне середовище	pH середовища	Температура, С°	
1	2	3	4	5	6	7
1–5	<i>Acutodesmus dimorphus</i> (Turp.) P. Tsarenko	251–254, 344	Бурреллі	6,5–8,5	26–30	0,6–1,2
6	<i>A. obliquus</i> (Turp.) P. Tsarenko	473	Бурреллі	6,5–8,5	26–30	0,34
7	<i>Botryococcus braunii</i> Kütz.	504	Чу-13	8,5–9	26–30	1,3
8	« <i>Chlorella</i> » <i>mirabilis</i> V. Andr.	445	Тамія	6,5–8,5	30–32	0,56
9–13	<i>Chlorella vulgaris</i> Beijer.	189–190, 192, 452, 326	Тамія	6,5–8,5	30–32	0,5–1,6
14–15	<i>Chloroidium saccharophilum</i> (W. Krüger) Darienko et al.	186, 187	Тамія	6,5–8,5	30–32	0,48–0,86
16	<i>Desmodesmus armatus</i> (Chodat) E. Hegew.	270	Бурреллі	6,5–8,5	26–30	0,39
17	<i>D. lunatus</i> (West et G.S. West) E. Hegew.	341	Бурреллі	6,5–8,5	26–30	0,44
18	<i>D. panonicus</i> (Hortob.) E. Hegew.	381	Бурреллі	6,5–8,5	26–30	0,34
19	<i>D. curvatocornis</i> (Proschk.-Lavr. E. Hegew.	384	Бурреллі	6,5–8,5	26–30	0,38
20	<i>Desmodesmus sp.</i>	398	Бурреллі	6,5–8,5	26–30	0,58
21–22	<i>D. magnus</i> (Meyen) P. Tsarenko	401, 402	Бурреллі	6,5–7,5	26–30	0,98–1,2
23	<i>Enallax costatus</i> (Schmidle) Pascher	342	Бурреллі	6,5–8,5	26–30	0,72
24	<i>Euglena viridis</i> Ehrenb.	489	A.10.2	7–8	30–32	0,3
25	<i>Euglena sp.</i>	490	A.10.2	7–8	30–32	0,38
26	<i>Monoraphidium contortum</i> Komárk.- Legn.	365	Болда	6–7,5	26–30	0,29
27	<i>Monoraphidium sp.</i>	165	Болда	6–7,5	26–30	0,31
28–33	<i>Parachlorella kessleri</i> (Fott et Novák.) Krienitz et al.	197–201, 444	Тамія	6,5–8,5	30–32	0,95

кліматичних зонах (від помірних до тропіків) і має відносно широку екологічну амплітуду. В Україні досить поширений у водоймах Полісся і Лісостепу, де масово розвивається й інколи викликає «цвітіння» води. Для видів *Botryococcus* характерна ботриїдна організація клітин, поєднаних променезаломним матриксом, що містить ліпіди. Проте за природних умов та в лабораторних культурах спостерігають значну мінливість морфологічних

ознак, особливо за розмірами і формою клітин [16]. Вони також відзначаються біохімічною варіабельністю. Зокрема, для *B. braunii* відомо три хімічні раси (A, B, L), які відрізняються вмістом і структурою вуглеводнів. Водорості раси A містять 0,4–61% вуглеводнів [4, 18], раси B – 30–40% [19], раси L – 0,1–8% від сухої речовини.

Серед одноклітинних водоростей найбільший вміст ліпідів мають примнезієві,

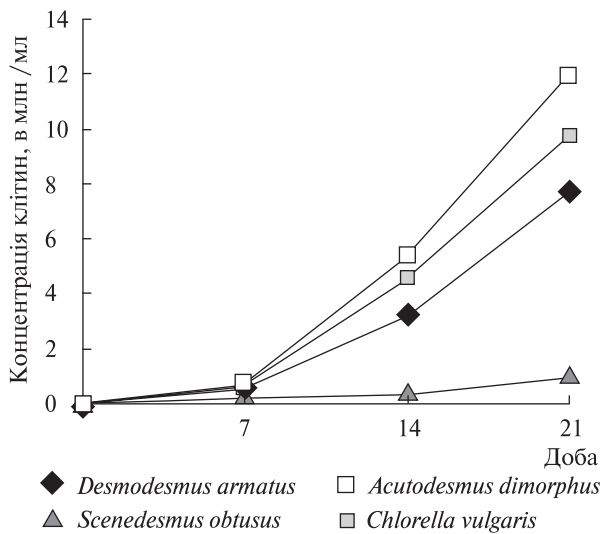


Рис. 1. Характер росту деяких видів водоростей за стандартних умов культивування

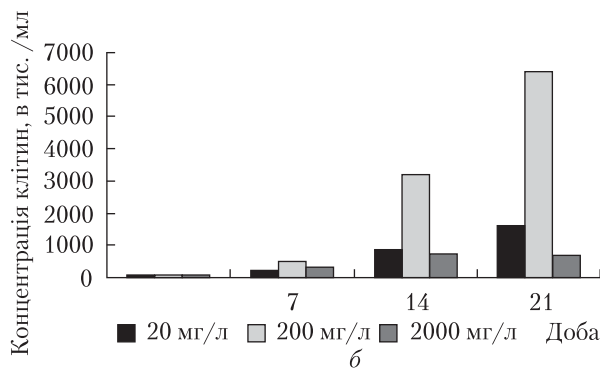
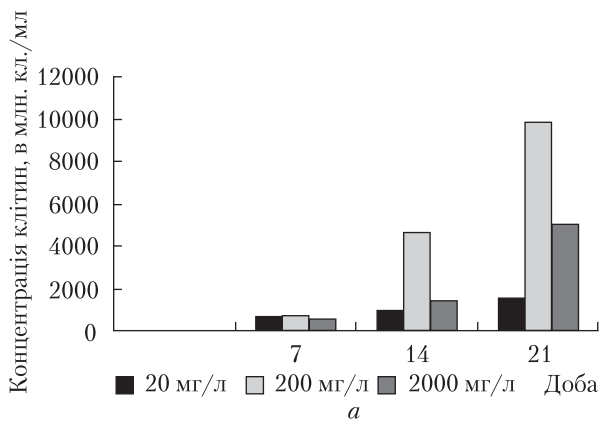


Рис. 2. Вплив різних концентрацій азоту на ріст водоростей: а – *Acutodesmus dimorphus* шт. 251; б – *Desmodesmus armatus* шт. 270

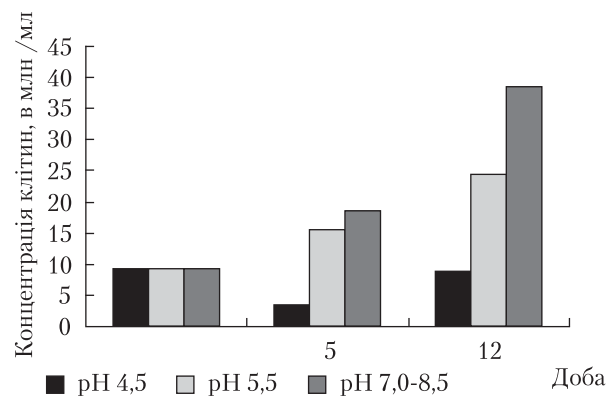


Рис. 3. Вплив значення рН на ріст водоростей *Acutodesmus dimorphus* шт. 251

зелені, евгленові. Найбагатші на ці речовини *Prymnesium parvum* Carter (22–38%), *Acutodesmus* (= *Scenedesmus*) *dimorphus* (Turpin) P. Tsarenko (16–40%), *Chlorella vulgaris* (14–22%), *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. (21%), *Euglena gracilis* G.A. Klebs (14–20% від сухої речовини). Доречно зазначити, що, незважаючи на значний уміст ліпідів у біомасі й високу продуктивність, види роду *Chlamydomonas* не включено до списку перспективних штамів, тому що вони виявилися схильними до контамінації іншими видами водоростей та грибів.

Туди, як свідчить таблиця, потрапили культури, котрі можна оцінити як продуктивні перспективні штами. За сприятливих умов культивування (цілодобове освітлення, температура – 30–32°C, освітлення – 3–4 тис. лк, барботування тощо) приріст біомаси різних видів водоростей за добу дорівнював 0,34–1,6 г/л абсолютно сухої маси (а.с.б.). Більшість культур відзначалась укороченими періодами лаг-фази (1–2 доби), найшвидшим збільшенням обсягу в період активного росту. Найбільш продуктивними з досліджуваних водоростей були *A. dimorphus* шт. 251, *D. magnus* шт. 401, *Ch. vulgaris* шт. 189, *P. kessleri* шт. 444 з приростом біомаси 0,9–1,6 г/л а.с.б. за добу.

Відомо, що для отримання високопродуктивних культур водоростей за тривалого інтенсивного культивування необхідно стабілізувати умови їх фотосинтезу і росту (склад поживних середовищ, температуру, рН, освітленість, перемішування тощо). Для вирощування прісноводних зелених та евгленових водоростей використовують різні поживні середовища, зокрема для зелених кокоїдних водоростей удалим вибором стануть мінеральні середовища Болда, Бурреллі, Тамія. Перше з них [1] використовують для екстенсивного культивування більшості прісноводних зелених нерухливих водоростей, а з додаванням вітамінів — і діатомових. Середовище Тамія з оптимізованим мікроелементним складом еталонне, наприклад, відносно штамів *Chlorella vulgaris* [8], а середовище Бурреллі, збагачене вітамінами, найбільш придатне для вирощування сценедесмусових водоростей [20].

Але під час уведення в інтенсивну культуру певних видів цих організмів постає питання про підбір оптимального поживного середовища. Разом з цим, велике значення має здатність водоростей розвиватися за високих концентрацій солей, толерантність до змін хімічного складу і рН. Тому на прикладі водоростей *A. dimorphus* шт. 251 і *D. armatus* шт. 270 ми зробили порівняльне дослідження приросту біомаси на середовищі з різним умістом нітратного азоту (20, 200, 2000 мг/л KNO_3). Виявлено, що обидва штамми ростуть за всіх трьох концентрацій, але найінтенсивніше — на середовищі, яке містить 200 мг/л KNO_3 (рис. 1).

Максимальна кількість клітин при цьому досягає 10,4 млн/мл, а за концентрації 2000 мг/л — 5,8 млн/мл. Ріст водорості за концентрації 20 мг/л порівняно з ростом у присутності 200 мг/л KNO_3 на 7-му добу практично однаковий за кількістю клітин, далі вповільнюється, що відповідає літературним даним [20].

Для культивації зелених водоростей на середовищі з нітратним азотом, а також під час використання в ролі середовища стічних вод деяких виробництв важливе значення має рН. Тому досліджено вплив цього фактора на ріст *A. dimorphus* шт. 251. У ході порівняння приросту біомаси на середовищі Бурреллі з різним рН (4,5–8,5) встановлено, що рН 6,5–8,5 оптимальний для росту *A. dimorphus* 251, і тільки коли рН 4,5–5,5, спостерігають інгібування водорості (рис. 2).

Таким чином, за результатами скринінгу колекції культур мікроводоростей Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (IBASU-A) сформовано попередній список 33 штамів водоростей — перспективних видів-продуцентів біомаси як джерела сировини для біопалива. Для відбору штамів використано такі критерії, як здатність накопичувати значну кількість ліпідів, висока продуктивність, стійкість до стресових чинників і біологічної контамінації. Сформована колекція стане базою для подальших досліджень, націлених на вивчення потенціалу мікроводоростей для виробництва біодизельного палива.

Роботу виконано за проектами № 50-09 і № 19-10 цільової комплексної програми наукових досліджень НАН України «Біомаса як паливна сировина» («Біопаливо»).

1. Андреева В.М. Почвенные и аэрофильные зеленые водоросли (*Chlorophyta: Tetrasporales, Chlorococcales, Chlorosarcinales*). — СПб.: Наука, 1998. — 352 с.
2. Борисова О.В., Царенко П.М. Колекція культур водоростей Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного (IBASU-A) // Укр. ботан. журн. — 2001. — № 5. — С. 627–633.
3. Водоросли. Справочник / Отв. ред. С.П. Васер. — К.: Наук. думка, 1989. — 608 с.
4. Волова Т.Г., Калачева Г.С., Жила Н.О., Плотникова В.Ф. Исследование физиолого-биохимических свойств зеленой водоросли *Botryococcus braunii* // Докл. РАН. — 1998. — № 2. — С. 256–259.

5. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике / Отв. ред. А.В. Топачевский. — К.: Наук. думка, 1975. — 247 с.
6. Музафаров А.М., Таубаев Т.Т. Культивирование и применение микроводорослей. — Ташкент: ФАН, 1984. — 136 с.
7. Перспективи використання микроводорослей у біотехнології / Під ред. О.К. Золотарьової. — К.: Альтерпрес, 2008. — 234 с.
8. Упитис В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей. — Рига: Зинатне, 1983. — 240 с.
9. Урмыч Е.М., Бердыкулов Х.А., Эшпулатова М.Б. Продуктивность микроводорослей в интенсивных условиях культивирования // Альгология. — 2008. — № 3. — С. 347–352.
10. Царенко П.М., Вассер С.П. Краткий анализ альгофлоры Украины / Разнообразие водорослей Украины (под ред. С.П. Вассер, П.М. Царенко). — К., 2000. — 309 с.
11. Цоглин Л.Н., Пульц О., Шторандт Р., Акыев А. Выбор продуктивных форм микроводорослей для массового культивирования // Альгология. — 1999. — № 3. — С. 73–81.
12. Borisova E.V., Tsarenko P.M. Microalgae Culture Collection of Ukraine (IBASU-A): traditions and modern directions // Nova Hedwigia. — 2004. — № 1–2. — P. 127–134.
13. Chisti Y. Biodiesel from microalgae // Biotechnol Adv. — 2007. — № 25. — P. 294–306.
14. Dismukes G.Ch., Carrieri D., Bennette N., Ananyey G.M., Posewitz M.C. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels // Current Opinion in Biotechnology. — 2008. — № 19. — P. 235–240.
15. Huang G.H., Chen F., Wei D., Zhang X.W., Chen G. Biodiesel production by microalgal biotechnology // Appl. Energy. — 2010. — № 87(1). — P. 38–46.
16. Komárek J., Marvan P. Morphological differences in natural populations of the genus *Botryococcus* (*Chlorophyceae*) // Arch. Protistenkd. — 1992. — № 141. — P. 65–100.
17. Xin M., Yang J., Xu X., Zhang L., Nie Q., Xian M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms // Renewable Energy. — 2009. — № 34. — P. 1–5.
18. Metzger P., Allard B., Casadevall E., Berkaloff C. Structure and chemistry of a new chemical race of *Botryococcus braunii* that produces lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon // J. Phycol. — 1990. — № 2. — P. 258–266.
19. Okada S., Murakami M., Yamaguchi K. Hydrocarbon composition of newly isolated strains of the green microalga *Botryococcus braunii*, race B // J. Appl. Phycol. — 1995. — № 6. — P. 555–559.
20. Soeder C.J., Hegewald E. *Scenedesmus* / Micro-algal biotechnology. — New-York: Cambridge Univ. Press, 1988. — P. 59–84.
21. Spoloare P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isamberi A. Commercial application of microalgae // Biosci. Bioeng. — 2006. — № 101. — P. 87–96.
22. Tsarenko P.M., Wasser S.P., Nevo E. Brief analysis of diversity of algae of Ukraine / Algae of Ukraine: diversity, nomenclature, taxonomy, ecology and geography. Vol. 1 (Eds. P.M. Tsarenko, S.P. Wasser, E. Nevo). — Ruggell: Gantner Verlag, 2006. — P. 17–25.

П. Царенко, О. Борисова, Я. Блюм

МІКРОВОДОРОСТІ ЯК ОБ'ЄКТ БІОЕНЕРГЕТИКИ

Види колекції IBASU-A — перспективні продуценти біомаси як джерела сировини для біопалива

Резюме

Проведено скринінг колекції культур микроводорослей Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України (IBASU-A) щодо видів-гіперпродуцентів біомаси як сировини для біопалива. Відібрано 18 видів (33 штами) з родів *Acutodesmus* (E. Hegew.) P. Tsarenko, *Desmodesmus* (Chodat) An et al., *Botryococcus* Kütz., *Chloroidium* Nadson, *Chlorella* Beijer., *Monoraphidium* Komárk.-Legn., *Parachlorella* Krienitz et al., *Euglena* Ehrenb. Критеріями до відбору слугували: здатність водорослей до накопичення значної кількості ліпідів, висока продуктивність культур, їхня стійкість до стресових чинників і біологічної контамінації. Сформована колекція становить базу для подальших біотехнологічних досліджень.

Ключові слова: микроводорості, колекція культур, штами, біомаса, біопаливо.

P. Tsarenko, O. Borisova, Ya. Blum

MICROALGAS AS BIOENERGETICS OBJECT
IBASU-A collection species — perspective producers
of biomass as the source of raw stuff for biofuel

Abstract

The screening of microalgas cultures collection of Mykola H. Kholodnyj Botanic institute of Ukrainian NAS (IBASU-A) is hold in regard to species hyperproducing biomass as the raw stuff for biofuel. From genera *Acutodesmus* (E. Hegew.) P. Tsarenko, *Desmodesmus* (Chodat) An et al., *Botryococcus* Kütz., *Chloroidium* Nadson, *Chlorella* Beijer., *Monoraphidium* Komárk.-Legn., *Parachlorella* Krienitz et al., *Euglena* Ehrenb. 18 species (33 breeds) are chosen. The algas' ability to accumulate a significant number of lipins, high productiveness of cultures, their durability to stress factors and biology contamination were the choice criteria. That collection is a base for further biotechnology studies.

Keywords: microalgas, culture collection, breeds, biomass, biofuel.