

## ПРОБЛЕМИ БІОЛОГІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 622.767.3

Н.Б. Голуб, І.І. Левтун, Є.Д. Тимошенко

Національний технічний університет України “КПІ”, Київ, Україна

### ВПЛИВ ДЖЕРЕЛА АЗОТНОГО ЖИВЛЕННЯ НА ПРИРІСТ БІОМАСИ *CHLORELLA VULGARIS*

**Background.** Microalgae is perspective resource for biodiesel fuel production. However there is no clear data about the best nitrogen source and its contents for high biomass yield and high lipid contents in it.

**Objective.** Determination of nitrogen sources influence on *Chlorella vulgaris* biomass yield for its usage as a raw material in biofuels obtaining process.

**Methods.** Cultivation of microalgae was conducted using mediums containing:  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and  $\text{KNO}_3$  as the nitrogen source. The biomass growth dynamics measurements were based on optical density determination method.

**Results.** The highest biomass yield occurred in the culture grown with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in the medium, and a bit lower yield levels were observed in the medium containing urea, that supports the theory, which stated that more energy is needed to transform nitrogen into restored form. Consumption of ammonium ions leads to rapid decrease of pH level of the medium down to 5. The usage of urea allows keeping medium pH on the level of 7.5.

**Conclusions.** For maximum yield of *Chlorella vulgaris* biomass it is necessary to use different nitrogen sources, that allow controlling pH in cultivation process.

**Keywords:** microalgae; *Chlorella vulgaris*; nitrogen source; biomass growth; biofuel.

#### Вступ

Останнім часом перед спільнотою постало питання заміни традиційних видів палива альтернативними джерелами енергії, одним із яких є біопаливо, отримане з біомаси. Крім спалювання, біомасу використовують для видобування біогазу та дизельного біопалива, яке отримують при переробці олійних культур та відпрацьованих жирів. Основною проблемою використання технічних олійних культур для отримання біопалива є нестача орної землі та зменшення її використання під харчові культури. Тому дослідження, що спрямовані на отримання дизельного біопалива з інших джерел біомаси, є актуальною проблемою. Такою сировиною є культури мікроводоростей, які можна вирощувати на непридатних для землеробства землях цілорічно за використання фотореакторів, які характеризуються більшою швидкістю приросту біомаси та ефективнішим перетворенням сонячної енергії порівняно із сільськогосподарськими культурами [1]. При цьому в процесі росту клітин мікроводоростей можна, змінюючи умови культивування, варіювати їх метаболізм та впливати на вміст і якість ліпідної фракції – сировини для отримання дизельного біопалива. Одним із перспективних видів таких мікроводоростей є *Chlorella vulgaris* через високі показники росту, можливість накопичення ліпідної фракції до 40 %, широкий діапазон умов культивування.

Забезпеченість клітин нітрогеном визначає процеси біосинтезу. Залежно від форми і концентрації джерела нітрогену можна здійснювати направлений біосинтез речовин. Для хлорели при азотному голодуванні знижується синтез білка і підвищується синтез вуглеводів та ліпідів [2]. Як джерело нітрогену використовують нітрат калію; сульфат, нітрат і бікарбонат амонію; сечовину; амінокислоти [3]. Більшість фотосинтетичних водоростей можуть рости, використовуючи йони нітрату або амонію. У деяких видів амонійний нітроген споживається першочергово, оскільки  $\text{NH}_4^+$  є кінцевим продуктом відновлення нітрату.

Однак багато видів водоростей чутливі до  $\text{NH}_4^+$ , і їх ріст уповільнюється за концентрації, що перевищує  $1 \text{ ммоль/дм}^3$  [2]. У літературі містяться суперечливі дані щодо першочергового споживання різних форм нітрогену *Chlorella vulgaris*. Так, у праці [4] стверджується, що види хлорели краще зростають на середовищі, яке містить карбамідний і амонійний нітроген, ніж на середовищі з нітратом. У [5] показано, що споживання нітрогену у формі нітрату та сечовини позитивно впливає на приріст біомаси водоростей, в той час як йони амонію інгібують розвиток культур унаслідок зміни значення pH середовища. В.В. Упітіс стверджує, що вміст амонійного нітрогену в діапазоні концентрацій  $0,4\text{--}0,8 \text{ г/дм}^3$  ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) не чинить пригноблювальної дії на хлорелу [4]. Але швидкість приросту біомаси та накопичення ліпідів нижча, ніж за використання

сечовини [6]. Використання гідрокарбонату амонію також позитивно впливає на ріст хлорели, але частина нітрогену у вигляді аміаку при барботуванні виноситься з реактора, що є небезпечним для людини.

Споживання різних форм нітрогену призводить до зміни значення рН середовища. Так, використання нітрату калію може призвести до підлугування середовища до значення рН = 8,5–10. Інгібуючий вплив нітрату калію на продуктивність культури спостерігався за концентрації 13 г/дм<sup>3</sup> [4]. Використання нітрату амонію для хлорели може призвести до закиснення середовища до значення рН = 3,5, за якого гинуть клітини. У той же час за використання амонійних солей як джерела нітрогену спостерігаються його втрати через випаровування аміаку [7]. Також при підвищенні рН середовища відбувається дисоціація гідроксиду амонію на вільний аміак, який проявляє високу токсичність для культур зелених мікроводоростей. Пригнічення росту культури відбувається за значень рН > 8 [8]. Перевагою сечовини як джерела нітрогену є незначний вплив на значення рН, що не вимагає корекції середовища за цим показником. Проте масова частка ліпідів у хлорелі, культивованій на середовищі із сечовиною, нижча, ніж за використання інших джерел нітрогену (особливо нітратів), а вміст білків – вищий [9]. Відповідно, знижується вихід ліпідної фракції – джерела для отримання біодизельного палива.

Таким чином, ріст мікроводоростей залежить від форми надходження нітрогену до клітини. Немає однозначної відповіді щодо найбільш привабливого джерела нітрогену та його оптимальної кількості для вирощування мікроводоростей з метою одержання біодизельного палива. Також форма надходження джерела нітрогену до клітин впливає на вміст жирних кислот. У випадку використання амонію переважно синтезуються насичені та мононенасичені жирні кислоти (C14:0, C16:0, C16:1). У випадку використання нітрату та сечовини як джерела нітрогену синтезують поліненасичені жирні кислоти (C20:4 і C20:5) [10]. Кількість і склад жирних кислот залежать від штаму мікроводоростей, що використовуюється [11].

### Постановка задачі

Метою роботи є визначення впливу джерел азотного живлення на приріст біомаси *Chlorella vulgaris* для її використання як біоенер-

гетичної сировини. Для досягнення мети необхідно розв'язати такі задачі: науково обґрунтувати вплив джерела нітрогену на приріст біомаси мікроводоростей; дослідити та встановити залежність приросту біомаси від джерела нітрогену.

### Матеріали і методи дослідження

Вихідною сировиною слугували мікроводорості *Chlorella vulgaris* АСКУ531-06 із колекції Київського національного університету імені Т.Г. Шевченка. *Chlorella vulgaris* на стандартних середовищах продукує до 20 % ліпідів. За рахунок продукування антибіотика хлореліну не відбувається контамінації середовища іншими мікроорганізмами, що дає змогу не дотримуватись жорстких асептичних умов [1]. Спостереження та контроль чистоти культури *Chlorella vulgaris* здійснювали методом світлової мікроскопії за допомогою мікроскопа ТМ ХSP-139ТР (Ulab, Китай) (збільшення – від ×40 до ×1000).

Кожні 24 год проводили барботування культур СО<sub>2</sub> протягом 1 хв зі швидкістю 1 дм<sup>3</sup>/(хв·дм<sup>3</sup>).

Вирощування мікроводоростей проводили у фотореакторах об'ємом 0,5 дм<sup>3</sup>, які поміщали в термостат ІLMLabor (Німеччина) за температури 30 ± 2 °С при постійному освітленні. Освітлення здійснювали за допомогою трьох люмінесцентних ламп Sylvania Groux "Аквасвет" (РФ) потужністю 8 Вт.

Маточна культура суспензії *Chlorella vulgaris*, яку вносили до фотореактора, становила 20 % від об'єму ємності з початковою оптичною густиною  $D_{450} = 0,1 \pm 0,005$ . Початкова концентрація клітин –  $1,05 \pm 0,15 \cdot 10^6$  кл/см<sup>3</sup>.

Приготування стандартного живильного середовища для вирощування *Chlorella vulgaris* відбувалося згідно з прописом [4]. Окремо готували розчин мікроелементів, який додавали у кількості 1 см<sup>3</sup>/дм<sup>3</sup>. Середовище автоклаували протягом 1 год за температури 120 °С і тиску 250 кПа. Модифікацію середовища за сполуками, що містять нітроген, проводили, заміщуючи нітрат на еквівалентну кількість нітрогену у сполуках СО(НН<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, НН<sub>4</sub>НО<sub>3</sub>, НН<sub>4</sub>СІ. Для забезпечення клітин калієм КНО<sub>3</sub> у середовищах був замінений на еквівалентну за калієм кількість КСІ.

Дослідження динаміки приросту біомаси проводили за допомогою вимірювання оптичної густини культур на спектрофотометрі ULAB 102 при довжині хвилі 450 нм. Концентрацію клітин визначали за допомогою підрахунку клітин у камері Горяєва за формулою

$$x = \frac{(a \cdot 4000 \cdot y)}{b} 10^3, \text{ кл/см}^3,$$

де  $x$  – шукана кількість клітин у суспензії в  $1 \text{ мм}^3$ ;  $a$  – сума клітин у суспензії, підрахована у певному об'ємі камери;  $b$  – кількість підрахованих малих квадратів;  $y$  – розведення суспензії.

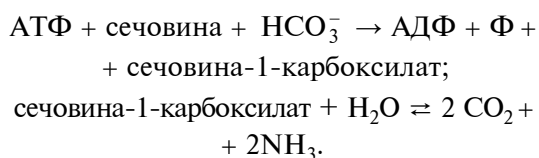
Контроль рН середовища, концентрації йонів нітрату та амонію здійснювали за допомогою іонометра МІ-150 (РФ).

### Результати і їх обговорення

#### Засвоєння клітиною різних форм нітрогену.

Нітроген має позитивний вплив на зростання мікрободоростей і негативний на накопичення ліпідної фракції. Обмін карбону та нітрогену взаємопов'язаний у мікрободоростях, оскільки вони частково беруть участь як в утворенні сполук карбону в процесі фотодихання з фіксованого  $\text{CO}_2$  за автотрофного зростання, так і в утворенні енергетичних сполук, що продукуються у циклі Кребса та електронтранспортному ланцюгу.

Йони амонію є найбільш енергетично ефективним джерелом нітрогену, оскільки вступають у реакції синтезу органічних сполук без зміни ступеня окиснення. Нітрат- та нітрит-йони, а також сечовина потребують енергетичних витрат клітини для відновлення нітрогену. Також у більшості видів *Chlorella vulgaris* відсутня уреаза. В цьому випадку засвоєння сечовини відбувається за такими реакціями:

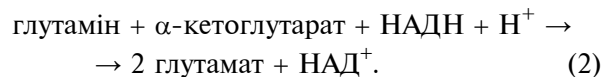


У автотрофних умовах амоній транспортується через мембрани клітини та хлоропластів за допомогою родини споріднених білків-транспортних, що кодуються генами *amt1*. Нітрат ( $\text{NO}_3^-$ ) та нітрит ( $\text{NO}_2^-$ ) йони транспортуються через мембрани за допомогою родини споріднених білків, що кодуються генами *nar1*. Білки-

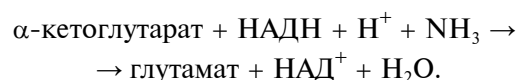
транспортні амонію поділяються на дві групи: високоспоріднені, що регулюються концентрацією нітрогену в клітині, і низькоспоріднені, активність яких лінійно збільшується при збільшенні концентрації йонів амонію. Амоній міститься в усіх компартментах клітини, його концентрація залежить від рН, електричного потенціалу між компартментами, концентрації  $\text{NH}_4^+$  у сусідньому компартменті, перебігу чи відсутності процесу метаболізму йону.

Засвоєння неорганічного нітрогену з утворенням амінокислот відбувається із застосуванням кетокислот 2-оксоглутарату та оксалоацетату за використання енергії АТФ і НАДФН. В автотрофних та гетеротрофних умовах кетокислоти, АТФ і НАДФН надходять із циклу Кребса. Для хлорели більша кількість кетокислот утворюються за використання гетеротрофних умов і азотного голодування [12].

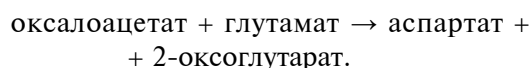
Асиміляція і метаболізм амонію прискорюються за допомогою реакцій, що каталізують глутамінсинтетаза і глутаматсинтетаза:



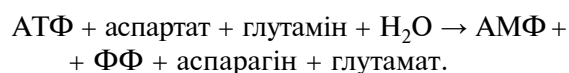
Крім цього, амоній входить до глутамату в процесі зворотного відновного амінування  $\alpha$ -кетоглутарату за допомогою глутаматдегідрогенази:



Вважається, що рівняння (1) і (2) є основними шляхами асиміляції нітрогену, а останній шлях активний в умовах стресу і відіграє роль катаболічного шунта в обміні азотистих речовин. Після включення амонію в глутамат нітроген входить до інших амінокислот, наприклад через трансамінування оксалоацетату за допомогою аспаратамінотрансферази:



Аспарагінсинтетаза каталізує АТФ-залежну реакцію:

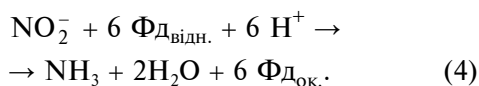
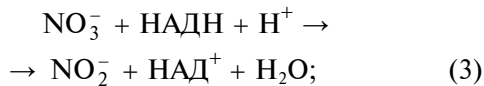


Глутамін, глутамат, аспартат, аспарагін забезпечують синтез органічних сполук азоту, та-

ких як амінокислоти, нуклеотиди, хлорофіли, поліаміни, алкалоїди тощо.

Споживання амонію призводить до зниження рН живильного середовища, і метаболізм клітини змінюється в бік споживання інших форм нітрогену, таких як нітрат-йон, сечовина та інші органічні форми нітрогену.

Засвоєння  $\text{NO}_3^-$  клітиною мікроводоростей потребує великої кількості енергії, карбону та протонів, оскільки після його перенесення до клітини відбуваються реакції відновлення за допомогою нітратредуктази у цитоплазмі та піреноїди з використанням піридинових нуклеотидів та нітритредуктази у хлоропластах з використанням ферредоксину:



У реакції (4) відбувається передача 6 електронів. Відповідно, в умовах темряви буде знижуватись поглинання нітратів. У той же час в умовах освітлення відбувається зниження концентрації таких коферментів, як флавопротеноїди, ферредоксини і піридиннуклеотиди, які використовуються як донори електронів у реакціях перетворення нітрат- та нітрит-іонів (3), (4).

Швидкість росту мікроводоростей змінюється залежно від форми нітрогену та карбону, що споживаються. Таким чином, одночасне введення амонійного та нітратного нітрогену має спричинитися до підвищення швидкості росту *Chlorella vulgaris* завдяки саморегуляції засвоєння різних форм нітрогену залежно від зміни умов (рН) у процесі зростання.

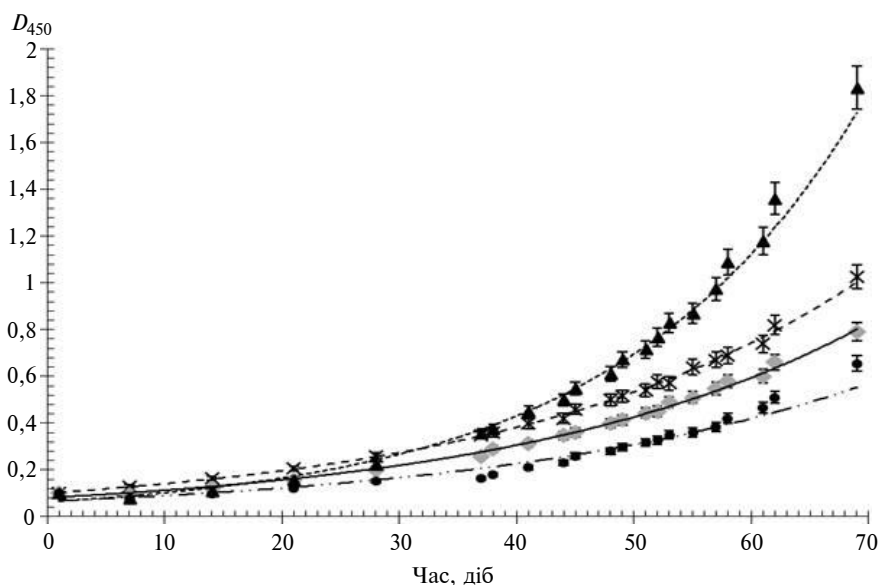
**Вплив нітрогену на приріст біомаси *Chlorella vulgaris*.** Клітини культури *Chlorella vulgaris* попередньо вирощували на середовищі Громова № 6, яке містить нітратну форму нітрогену. На рисунку наведено зміну оптичної густини, що відповідає приросту біомаси *Chlorella vulgaris* залежно від

форми нітрогену живильного середовища. Протягом 20 діб розвиток культури, вирощуваної за використання різних форм нітрогену, різняться в середньому на  $10^6$  кл/см<sup>3</sup> для  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  і  $\text{KNO}_3$ . Для середовища з  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  спочатку відбувається одночасне поглинання культурою нітратної та амонійної форми нітрогену (табл. 1). Після періоду адаптації, як видно з табл. 1, першочергово споживається амонійний нітроген.

Після 21-ї доби культивування спостерігається значний приріст біомаси мікроводоростей. Найбільший приріст біомаси характерний для середовища з  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , більш повільний – для середовища із сечовиною. Значно нижче накопичення біомаси спостерігається для середовища з  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  і стандартного середовища з  $\text{KNO}_3$  (див. рисунок).

На початкових етапах культивування (28 днів) суспензія мікроводоростей у середовищі з  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  мала найвищі показники приросту біомаси. Треба відзначити, що протягом першого тижня культивування приріст біомаси, вирощеної на середовищі із сечовиною, був найвищим, тоді як у інших середовищах приріст культур був уповільненим. Це має особливо важливе значення для найшвидшого накопичення біомаси *Chlorella vulgaris* в умовах промислового культивування.

Таку зміну приросту можна пояснити зміною рН середовища (табл. 2). Так, перші 30 діб



Зміна оптичної густини ( $D$ ) культури *Chlorella vulgaris* (приріст біомаси) залежно від терміну культивування, джерело нітрогену: ▲ –  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , × –  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , ◆ –  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , ● –  $\text{KNO}_3$

**Таблиця 1.** Зміна концентрації йонів нітрату й амонію при культивуванні *Chlorella vulgaris* на середовищах з різними джерелами нітрогену

Джерело нітрогену, мг/дм <sup>3</sup>	Доба											
	0		10		20		30		40		50	
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
KNO <sub>3</sub>	613,8	–	546,3	–	474,6	–	428,4	–	364,5	–	268,5	–
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	306,9	89,1	191,2	52,7	175,2	49,4	172,0	31,3	149,5	8,1	106,4	11,2
NH <sub>4</sub> Cl	–	178,2	–	126,1	–	95,9	–	83,7	–	74,4	–	63,4

**Таблиця 2.** Оптична густина і рН культуральних середовищ з різним вмістом джерела нітрогену на 60-ту добу культивування

Джерело азоту в середовищі	Кількість клітин, 10 <sup>6</sup> кл /см <sup>3</sup>	D <sub>450</sub>	рН середовища
CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	12 300	1,025	8,4 ± 0,05
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	6 300	0,790	6,3 ± 0,05
NH <sub>4</sub> Cl	19 150	1,834	5,5 ± 0,05
KNO <sub>3</sub>	5 900	0,656	9,2 ± 0,05

рН середовища, яке містило сечовину як джерело нітрогену, становило  $7,5 \pm 0,1$ , у той час як для інших –  $7,0 \pm 0,1$ . У процесі культивування рН середовища із сечовиною підвищувався до  $8,4 \pm 0,05$ , в той час як у середовищі з NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> знижувалося до  $6,5 \pm 0,05$ , з NH<sub>4</sub>Cl знижувалося до  $5,5 \pm 0,05$ , з KNO<sub>3</sub> підвищувався до  $9,0 \pm 0,05$ . При цьому щодобове введення однакової кількості CO<sub>2</sub> призводило до зниження значення рН на 0,5.

Таким чином, на приріст біомаси *Chlorella vulgaris* впливає як джерело нітрогену, так і значення рН. Вплив рН середовища та джерела нітрогену необхідно розглядати сукупно, оскільки, можливо, концентрація йонів гідрогену по-різному впливає на проникність мембран для різних джерел нітрогену. Зниження рН до 5,5 не впливає на розвиток *Chlorella vulgaris* при вирощуванні на середовищі з NH<sub>4</sub>Cl як джерела нітрогену. При підвищенні рН > 8, що спостерігається у випадку використання сечовини, виникає загроза пошкодження клітин мікроводоростей вільним аміаком, що утворюється. Він може без перешкод проникати всередину клітин та руйнувати фотосистему II у тилакоїдах, тим самим порушуючи процеси фотосинтезу. Також при утворенні вільного аміаку збільшуються його витрати через випаровування, що зменшує ефективність культивування.

Як видно з табл. 2, найкращим джерелом нітрогену для культивування мікроводорості *Chlorella vulgaris* з метою подальшого накопичення нею ліпідів є хлорид амонію та сечови-

на. В той же час споживання клітинами йонів амонію може призвести до закиснення середовища і загибелі клітин. Оскільки використання CO<sub>2</sub> як джерела карбону також призводить до зниження рН, то для запобігання цьому необхідно вводити як компоненти живильного середовища одночасно різні форми нітрогену, а саме – NH<sub>4</sub>Cl та сечовину. Оскільки в цьому випадку енергетичний запас клітини на відновлення нітрогену буде не витрачатись, а спрямовуватись на біосинтез.

### Висновки

Теоретично показано та експериментально підтверджено, що йони амонію та сечовини є найбільш енергетично ефективним джерелом нітрогену, оскільки вони вступають у реакції синтезу органічних сполук без зміни ступеня окиснення. Нітрат- та нітрит-йони потребують енергетичних витрат клітини для відновлення нітрогену за допомогою нітратредуктази в цитоплазмі та піреноїді з використанням піридинових нуклеотидів та нітритредуктази у хлоропластах за допомогою ферредоксину, що впливає на швидкість приросту біомаси. Найбільший приріст біомаси *Chlorella vulgaris*  $0,3 \cdot 10^4$  кл/(см<sup>3</sup>·доба) спостерігається за використання амоній хлориду.

Споживання клітинами йонів амонію спричиняє зниження рН середовища до 5,0, що може призвести до загибелі клітин за використання як джерела карбону CO<sub>2</sub>. Застосування сечовини дає змогу підтримувати рН середовища на рівні 7,5 без зниження приросту біо-

маси. Для регулювання значення рН у процесі культивування біомаси необхідно використовувати різні джерела нітрогену.

У подальшому доцільно дослідити вплив різних співвідношень хлориду амонію та сечо-

вини на приріст біомаси *Chlorella vulgaris* і вихід триацилгліцеролів – джерела для отримання біодизельного палива.

### Список літератури

1. Chisti Y. Biodiesel from microalgae // *Biotechnol. Advan.* – 2007. – 25, № 3. – P. 294–306.
2. Becker E.W. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology.* – Cambridge: Cambridge University Press, 1994. – 301 p.
3. Markou G., Vandamme D., Muylaert K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients // *Water Research.* – 2014. – 65. – P. 186–202.
4. Упитис В.В. Макро- и микроэлементы в оптимизации минерального питания микроводорослей. – Рига: Зинатне, 1983. – 239 с.
5. Usage of urina in food *Chlorella vulgaris* / I.V. Gribovskaia, G.S. Kalacheva, L.S. Tirranen, A.A. Kolmakova // J. Siberian Federal University. *Biologie.* – 2011. – № 3. – P. 243–256.
6. Su C.-H., Giridhar R., Chen C.-W., Wu W.-T. A novel approach for medium formulation for growth of a microalga using motile intensity // *Bioresource Technol.* – 2007. – 98, № 16. – P. 3012–3016.
7. О формах азотного питания хлореллы в условиях непрерывного культивирования / И. И. Гительзон, И. А. Терсков, Б. Г. Ковров и др. // Управляемое культивирование микроводорослей. – М.: Наука, 1964. – С. 47–55.
8. Azov Y., Goldman J.C. Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1982. – 43. – P.735–739.
9. Hullat C.J. Energy demands of nitrogen supply in mass cultivation of two commercially important microalgal species, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* // *Bioenerg. Res.* – 2012. – 5. – P. 669–684.
10. Wen Z.-Y., Chen F. A perfusione cell bleeding culture strategy for enhancing the productivity of eicosapentaenoic acid by *Nitzschia laevis* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – 57, № 3. – P. 316–322.
11. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella spp.* when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* / L.E. de-Bashan, Y. Bashan, M. Moreno et al. // *Can. J. Microbiol.* – 2002. – 48, № 6. – P. 514–521.
12. *Heterotrophic* cultures of microalgae: Metabolism and potential products / O. Perez-Garcia, F.M.E. Escalante, L.E. de-Bashan et al. // *Water Research.* – 2011. – 45, № 1. – P. 11–36.

### References

1. Y. Chisti, "Biodiesel from microalgae", *Biotechnol. Advan.*, vol. 25, no. 3, pp. 294–306, 2007.
2. E.W. Becker, *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, Cambridge: Cambridge University Press, 1994, 295 p.
3. G. Markou, "Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients", *Water Research*, vol. 65, pp. 186–202, 2014.
4. V.V. Utipis, *Macro- and Microelements for Optimization of Mineral Feeding of Microalgae*. Riga, Latvia: Zinatne, 1983, 239 p. (in Russian).
5. I.V. Gribovskaia et al., "Usage of urina in food *Chlorella vulgaris*", J. Siberian Federal University. *Biologie*, no. 4, pp. 243–256, 2011.
6. C.-H. Su et al., "A novel approach for medium formulation for growth of a microalga using motile intensity", *Bioresource Technol.*, vol. 98, no. 16, pp. 3012–3016, 2007.
7. I.I. Gitelzon et al., "About forms of nitrogen feeding of chlorella in continuous cultivation mode", in *Controlable Cultivation of Microalgae*, Moscow, Russia: Nauka, 1964, pp. 47–55 (in Russian).
8. Y. Azov and J.C. Goldman, "Free ammonia inhibition of algal photosynthesis in intensive cultures", *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 43, pp. 735–739, 1982.
9. C.J. Hullat, "Energy demands of nitrogen supply in mass cultivation of two commercially important microalgal species, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*", *Bioenerg. Res.*, vol. 5, pp. 669–684, 2012.
10. Z.-Y. Wen and F. Chen, "A perfusione cell bleeding culture strategy for enhancing the productivity of eicosapentaenoic acid by *Nitzschia laevis*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 57, no. 3, pp. 316–322, 2001.
11. L.E. de-Bashan et al., "Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella spp.* when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*", *Can. J. Microbiol.*, vol. 48, no. 6, pp. 514–521, 2002.
12. O. Perez-Garcia et al., "Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products", *Water Research*, vol. 45, no. 1, pp. 11–36, 2011.

Н.Б. Голуб, І.І. Левтун, Є.Д. Тимошенко

#### ВПЛИВ ДЖЕРЕЛА АЗОТНОГО ЖИВЛЕННЯ НА ПРИРІСТ БІОМАСИ *CHLORELLA VULGARIS*

**Проблематика.** Мікроводорості є перспективним джерелом отримання біодизельного палива. Проте немає однозначної відповіді щодо найбільш привабливого джерела нітрогену для одержання високого приросту біомаси та концентрації ліпідів у ній.

**Мета дослідження.** Визначення впливу джерел азотного живлення на приріст біомаси *Chlorella vulgaris* для її використання як біоенергетичної сировини.

**Методика реалізації.** Культивування мікроводоростей проводилось на середовищах, що містили  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  і  $\text{KNO}_3$  як джерело нітрогену. Дослідження динаміки приросту біомаси проводили за допомогою вимірювання оптичної густини.

**Результати дослідження.** Найбільший приріст біомаси характерний для середовища з  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , більш повільний – для середовища із сечовиною, що підтверджує теоретичне обґрунтування, оскільки не потребує енергетичних витрат клітини на переведення нітрогену у відновну форму. Споживання клітинами йонів амонію спричиняє зниження значення рН середовища до 5. Використання сечовини дає змогу підтримувати значення рН середовища на рівні 7,5.

**Висновки.** Для отримання максимального приросту біомаси *Chlorella vulgaris* необхідно використовувати різні джерела нітрогену, що дає змогу регулювати значення рН у процесі культивування.

**Ключові слова:** мікроводорості; *Chlorella vulgaris*; джерело нітрогену; приріст біомаси; біодизельне паливо.

Н.Б. Голуб, І.І. Левтун, Є.Д. Тимошенко

#### ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКА АЗОТНОГО ПИТАНИЯ НА ПРИРОСТ БИОМАССЫ *CHLORELLA VULGARIS*

**Проблематика.** Мікроводорості являються перспективним сировиною для отримання біодизельного палива. Однак немає однозначного відповіді щодо найбільш оптимального джерела азоту для отримання високого приросту біомаси та концентрації ліпідів у ній.

**Цель исследования.** Определение влияния источников азотного питания на прирост биомассы *Chlorella vulgaris* для ее использования в качестве биоэнергетического сырья.

**Методика реализации.** Культивирование микроводорослей проводилось на средах, которые содержали  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  и  $\text{KNO}_3$  в качестве источника азота. Исследования динамики прироста биомассы проводили с помощью измерения оптической плотности.

**Результаты исследования.** Наибольший прирост биомассы характерен для среды с  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , менее быстрый – для среды с мочевиной, что подтверждает теоретическое обоснование, поскольку не требуется затрат энергии клеткой для преобразования азота в восстановленную форму. Потребление клетками ионов аммония приводит к понижению значения рН среды до 5. Использование мочевины позволяет поддерживать значение рН среды на уровне 7,5.

**Выводы.** Для получения максимального прироста биомассы *Chlorella vulgaris* необходимо использовать разные источники азота, что дает возможность регулировать значения рН в процессе культивирования.

**Ключевые слова:** микроводорості; *Chlorella vulgaris*; источники азота; прирост биомассы; біодизельне паливо.

Рекомендована Радою  
факультету біотехнології і біотехніки  
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції  
2 квітня 2015 року