

Государственное автономное учреждение
дополнительного образования Республики Коми
«Республиканский центр дополнительного образования»
Детский технопарк «Кванториум»

Республика Коми

**Оценка возможности промышленного производства
микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer. f. *globosa* V. Andr.
IPAS C-2024 в полевых условиях**

Автор:

Турьева Мария Максимовна,
учащаяся 10 класса

Руководитель:

Лиханова Надежда Владимировна,
к.б.н.,
педагог дополнительного образования

Научный консультант:

Щемелинина Татьяна Николаевна,
к.б.н., старший научный сотрудник
лаборатории биохимии и биотехнологии
Института биологии Коми НЦ УрО РАН
директор ООО «БИОЭКОБАЛАНС»

Сыктывкар, 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
Краткое описание проекта.....	3
Введение.....	4
1. Теоретическая часть.....	6
2. Практическая часть.....	9
2.1. Объекты и методы.....	9
2.2. Результаты и обсуждения.....	11
Заключение.....	12
Практические рекомендации.....	12
Список литературы.....	13
Приложения 1. Дополнительные материалы. Рисунки.....	16
Приложения 2. Дополнительные материалы. Таблицы.....	19
Приложения 3. Приготовление питательной среды.....	21
Приложения 4. Сбор установки для культивирования.....	22
Приложение 5. Образцы в период эксперимента.....	23

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПРОЕКТА

Цель проекта – сравнительная оценка культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris globosa* на среде Люка при разных условиях.

Задачи:

1. Узнать о микроводорослях, особенностями культивирования, их роли в природе и жизни человека.
2. Закупить материалы для сборки установки для культивирования.
3. Провести эксперимент (приготовление питательной среды, культивирование).
4. Провести наблюдение и отбор проб
5. Получить и проанализировать результаты.
6. Разработать рекомендаций.
7. Сформировать презентацию, защитить проект (участие в конференции).

Результат проекта – промышленное производство микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer. f. *globosa* V. Andr. IPAS C-2024 в полевых условиях.

Этапы проектной работы.

№ п/п	Этапы проектной работы	Краткое содержание проделанной работы	Результаты
1.	Проработка литературных источников	Подготовлена теоретическая база по теме	Освоен теоретический материал о микроводорослях, особенностях культивирования, их роли в природе и жизни человека.
2.	Закупка материалов. Оценка материально-технического оснащения.	Приобретение материалов для сборки установки для культивирования. Оценка материально-технического оснащения.	Создана установка для культивирования. Подготовлена питательная среда (4-е 5 литровые емкости со средой Люка).
3.	Культивирование микроводоросли. Наблюдение, отбор проб.	Приготовление маточной среды. Осуществление процесса культивирования. Отбор проб. Работа на спектрофотометре и подсчет количества клеток с помощью камеры Горяева.	Подготовлена маточная среда в объеме 1 литр. Отобрано 44 пробы в период эксперимента.
4.	Анализ полученных результатов	Построение графиков. Оценка результатов.	Оценено 44 образца.
5.	Разработка рекомендаций и расчет рисков проектной работы. Подготовка заявки на патент.	Подготовка рекомендаций и расчет рисков при выполнении проектной работы.	Подготовлены рекомендации, просчитаны риски. Началась подготовка заявки на патент

ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли – уникальная группа фототрофных организмов, представленная многочисленными видами и широким ареалом распространения в природе (моря, реки, озера, почва), являющиеся источником питания для многих пресноводных, морских, почвенных простейших и высокоорганизованных животных (Кашулин и др., 2018). Богатый состав микроводорослей (белки – 55 %, хлорофилл, ферменты, витамины, липиды, макро- и микроэлементы) (Митишев и др., 2013, Суховский, 2015) определяют их использование в различных областях народного хозяйства: агробиотехнологии, медицине, косметологии, производстве продуктов питания и красителей, в химической и пищевой промышленности (Макарова и др., 2009; Мельников, Мананкина, 2010; Лукьянов, Стифеев, 2014; Лукьянов, 2015; Шалыго, 2018; Богданов, 2019; Патент РФ № 2701859, Патент РФ № 2321272; Патент РФ № 2542374; Патент РФ № 2644653; <http://algaspatium.ru/catalog/15>; <http://innosfera.by> и др.). Нашли применение микроводоросли и в экологической биотехнологии – в альголизации природных водоемов, очистке сточных вод, очистке загрязненных нефтью и нефтепродуктами почв (Михеева, 2018; Фролова и др., 2018; Гогонин и др., 2017; Щемелинина Т.Н. и др., 2019; <http://innosfera.by>; Патент РФ № 2556131; Патент РФ № 2703499).

В биорекультивации нефтезагрязненных почв применяются в основном биопрепараты, созданные на основе штаммов бактерий и дрожжей. В настоящее время оценен вклад и микроводорослей как эффективных деструкторов углеводов (Щемелинина и др., 2020; Патент РФ № 2707815). Кроме того, у микроводорослей есть преимущества перед бактериальными препаратами. Водоросли легко культивируются: они имеют небольшие размеры, поэтому требуют меньше ресурсов и питательных веществ при выращивании, чем штаммы бактерий, а также применение микроводорослей в промышленных масштабах в целях экологической биотехнологии не требует стерильных условий, особо чистых химических реагентов, напротив, актуальным сегодня является подбор компонентов, питательной среды и условий культивирования наиболее доступных и экономически выгодных. Каким образом можно получить необходимый объем биомассы микроводорослей для решения задач экологической биотехнологии при минимальной себестоимости состава и процесса приготовления, сокращении сроков роста и повышении выхода биомассы? Поиск решений на этот вопрос становится особо актуальным в настоящее время, когда загрязнения, в том числе нефтепродуктами приводят к экологическим катастрофам (<https://1prime.ru/energy/20200602/831554798.html>; <https://life.ru/p/1350499>).

Актуальным является решение задачи наработки микроводорослей *Chlorella vulgaris* в условиях не стационарных, прямо на полигонах, где произошла экологическая катастрофа – разлив нефтепродуктов с учетом климатического стресса Крайнего севера и Арктики.

Цель проекта – сравнительная оценка культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris globosa* на среде Люка при разных условиях.

Задачи:

- 1) узнать о микроводорослях, особенностями культивирования, их роли в природе и жизни человека;
- 2) закупить материалы для сборки установки для культивирования;
- 3) провести эксперимент (приготовление питательной среды, культивирование);
- 4) провести наблюдение и отбор проб;
- 5) получить и проанализировать результаты;
- 6) разработать рекомендаций;
- 7) сформировать презентацию, защитить проект (участие в конференции).

Место и сроки проведения проектной работы. Экспериментальная часть проектной работы проводилась на базе Ботанического сада ФГБОУ ВО «СГУ им. Питирима Сорокина», исследования и анализ результатов осуществлялся на базе детского технопарка «Кванториум». Даты и этапы реализации работы расписали с помощью диаграмма Ганта (Приложение 2, таблица 2).

Физико-географическая характеристика района. Ботанического сада ФГБОУ ВО «СГУ им. Питирима Сорокина» находится в 3 км от городской среды (61,64 с.ш., 50,75 в.д.). По геоботаническому районированию территория ботанического сада как часть окрестностей г. Сыктывкара включается в Вычегодско-Сысольский геоботанический округ зеленомошной полосы средней тайги (Геоботаническое районирование, 1989). На ее территории расположен искусственно созданный пруд. Нами для приготовления питательных сред была использована вода этого пруда.

Климат умеренно-континентальный, годовая амплитуда температуры составляет 32,3°C. Самым теплым месяцем года является июль (средняя месячная температура + 16,7°C), самым холодным месяцем – январь (-15,6°C). В целом за год преобладают ветры юго-западного, южного направлений. Среднегодовая скорость ветра 4 м/с. Среднегодовая влажность воздуха – 77%.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Одна из острейших экологических проблем в России является – загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами (Бурмистрова и др., 2003). По данным Росприроднадзора и независимых экспертов на территории Российской Федерации число аварий на объектах нефтедобычи и транспортировки нефти ежегодно достигает порядка 25 тысяч инцидентов, в результате чего около 1,5 млн. тонн нефти поступает в окружающую среду. Несмотря на проводимую в последнее время государством политику в области предупреждения ликвидации последствий аварийных разливов нефти и нефтепродуктов, данная проблема остается актуальной и в целях снижения возможных негативных последствий требуется особое внимание к изучению способов локализации, ликвидации и к разработке комплекса необходимых мероприятий.

Выбор способов очистки грунтов определяется многими факторами, важнейшими из которых является степень и характер загрязнения земель, природно-климатические особенности района загрязнения и нормативные требования к качеству земель. В справочнике «Технологии восстановления почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами» (2003) представлено 27 зарубежных технологий и 62 технологии России и стран СНГ. В настоящее время выделяют три основных метода очистки почв от нефти и нефтепродуктов: физические (электрохимическая и электрокинетическая), химическая (метод промывки) и биологические (фитоэкстракция, фиторемедиация и биостимулирование). Биологический метод – является наиболее универсальным (Гуславский, Канарская, 2009). Это целенаправленное усиление активности специфической микрофлоры почвы, которая занимается разложением нефти. Также, допустимо добавление определенных микробных культур в почву. В результате создаются благоприятные условия для микроорганизмов, которые осуществляют утилизацию нефтепродуктов и нефти. В настоящее время оценен вклад и микроводорослей как эффективных деструкторов углеводородов (Щемелинина и др., 2020). Обзор литературы и патентный поиск показал, что микроводоросли *Chlorella vulgaris* используются для различных целей, но в очистке нефтяных загрязнений почв в редких случаях, только в составе симбиотических комплексов. В тоже время, микроводоросли как биопрепарат превосходят по экологическим, экономическим и безопасным параметрам действующие на сегодняшний день препараты. Эксперименты, проведенные на производственной площадке рекультивации в Западной Сибири, показали эффективность использования микроводорослей в качестве биологических ремедиантов почв (Патент РФ № 2707815).

Для получения конечной качественной биомассы *Chlorella vulgaris*, предназначенной для биоремедиации необходим подбор оптимальной питательной среды и режимов культивирования.

Питательные среды. Для размножения хлореллы используют жидкие питательные среды, которые содержат азот, железо, серу, фосфор, магний и другие макро и микроэлементы, при постоянной подаче углекислого газа и отводе кислорода (Богданов Н.И., 2007).

Известен способ культивирования водоросли *Chlorella vulgaris* на питательной среде Тамия, Болда и Бенеке. Недостатком данных сред является трудоёмкий процесс приготовления с значительными временными затратами. А также возможное инфицирование в процессе хранения маточных растворов, что увеличивает ресурсо- и энергозатраты на выращивание водорослей. Во избежание инфицирования самих сред требуется стерилизация.

Кроме того, при коротких сроках культивирования на данных средах получается низкий объем биомассы, что требует увеличения сроков (Михайлюк и др., 2015). Такие среды для культивирования биомассы микроводорослей необходимы тогда, когда требуются более строгие условия стерильности при производстве косметических, фармацевтических, пищевых продуктов.

Для сравнения компонентного состава питательных сред Тамия, Болда и Бенеке нами приведена в приложение 2 таблица 1.

В среде Тамия наблюдается нехватка азота и повышенная концентрация калия, что ведет к подщелачиванию среды, что неблагоприятно влияет на микроводоросли, понижая их продуктивность. Чтобы избежать подобного явления рекомендуется применять мочевины как источник азота. Однако, применение мочевины в среде Тамия дает меньший прирост биомассы хлореллы (Мещерякова, 2016).

Среда Бенеке, содержащая нитрат калия, является оптимальной для накопления липидов до 0,42 г/г биомассы. В случаях применения мочевины как источника азота, рост клеток снижался на 30% (Аллагуватова и др., 2020).

Следует отметить, что вышеперечисленные питательные среды характеризуются использованием ограниченного числа микроэлементов. Это негативно сказывается на росте и жизнеспособности клеток *Chlorella vulgaris*. Микроэлементы особенно важны для культивирования хлореллы в течение длительного времени, так как при их нехватке со временем будет происходить угнетение их жизнеспособности и гибель.

Отличительной чертой среды Болда от других сред является использование большого числа микроэлементов, что позволяет поддерживать жизнеспособность водорослей в течение длительного времени. Однако в ряде случаев даже при использовании данной среды наблюдается замедление скорости роста водоросли, связанное с нехваткой витаминов, а также органических веществ.

Среды Тамия, Бенеке и Болда – синтетического происхождения.

Для целей экологической биотехнологии можно использовать питательные среды полусинтетического и органического происхождения. В патенте «Питательная среда для культивирования микроводорослей» (RU 2556126, 09.01.2014) предлагается среда Люка с бактерицидными, фунгицидными и противовирусными свойствами для культивирования на ней микроводорослей в большом количестве в короткие сроки. На данной среде культивирование микроводоросли происходит в типичных условиях (режим – освещение фитолампой OSRAM L 18W/77, температура – комнатная (Приложение 1, рис. 2)). От других сред она отличается использованием куриного помета, что в наших условиях является доступным и недорогим материалом. По

содержанию микроэлементов (марганец, цинк, кобальт, медь, железо, азот, калий, магний, фосфорная кислота, бор, сера) он превосходит обычный навоз.

Способы культивирования. Существуют два основных способа культивирования микроорганизмов: периодическое и непрерывное (Блажевич, 2004).

При периодическом культивировании клетки помещают в питательную среду, и задают начальные условия. При развитии культуры происходит постепенная смена условий: увеличивается плотность популяции микроорганизмов, снижается концентрация питательных веществ и накапливаются продукты обмена. Такую периодическую культуру рассматривают как замкнутую или закрытую систему. Потому что компоненты системы не могут поступать или покидать её.

При непрерывном культивировании клетки помещаются в специальный аппарат, куда постоянно добавляется питательная среда и отводится культуральная жидкость. Такую систему называют открытой.

Выделяют несколько фаз в развитии культуры (Приложение 1, рис. 1) (Асташкина, 2015). После введения в питательную среду инокулята (маточной культуры) обычно наблюдают *индукционный период (лаг-фазу) (I)*, в течение которого не происходит сколько-нибудь заметного увеличения биомассы или численности клеток. В этот период перестраивается метаболизм клетки, синтезируются ферменты, специфичные к использованию субстратов, активизируется биосинтез белка.

Индукционный период сменяется *фазой ускоренного роста (II)*, в течение которой быстро накапливается биомасса и продукты разных реакций.

Фаза линейного роста (III) – время интенсивного логарифмического (экспоненциального) размножения. В этот период размножение хлореллы идет с наибольшей скоростью, и число клеток увеличивается в геометрической прогрессии.

Фаза экспоненциального роста сменяется весьма непродолжительным периодом, в течение которого скорость культуры снижается до нуля. Это *фаза замедления роста (IV)*.

Затем рост культуры переходит в достаточно устойчивую и продолжительную *стационарную фазу (V)*. В этих условиях культура развивается в режиме постоянства общего числа клеток. Если система полностью истощается по субстрату, или накопление ингибирующих рост продуктов является значительным, то скорость прироста биомассы становится равной нулю. Происходят существенные физиологические изменения клеток и, как правило, наблюдается *фаза отмирания культуры (VI)*, сопровождаемая часто полным лизисом клеток.

Приведенные примеры способов культивирования характерны для условий лабораторных и промышленных производств в закрытых помещениях с учетом определенных режимов культивирования (температуры, влажности, аэрации и освещения).

2. ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

2.1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Для эксперимента были взяты:

1. Маточная культура микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer. f. *globosa* V. Andr. IPAS C-2024 из коллекции Института биологии Коми НЦ УрО РАН ФИЦ. Номер в коллекции - СУКОА Ch-011-10 (Новаковская, Патова, 2012).

Краткая характеристика микроводоросли *Chlorella vulgaris*. Вид *Chlorella vulgaris* относится к роду *Chlorella*. Зелёные одноклеточные водоросли рода *Chlorella* имеют сферическую форму, размером от 2 до 4 мкм, без жгутиков (Приложение 1, рис. 2). Хлоропласт широкопоясковидный незамкнутый зеленого цвета, содержащий хлорофилл-а и хлорофилл-б (Андреева, 1975). Для процесса фотосинтеза требуется вода, диоксид углерода и естественное или искусственное освещение. Клетки делятся на 2-8, очень редко на 16 автоспор. Штамм автотрофный, в производственных условиях растет на среде, содержащей минеральные, органические и растворенные газообразные вещества.

2. Вода с пруда ботанического сада ФГБОУ ВО «СГУ им. Питирима Сорокина».

3. Среда Люка (Патент РФ № 2556126). Состав питательной среды Люка, приготовленной на основе нестерильной воды с стабилизированной гашеной известью и минеральным ионитом «Ionsorb™» – куриный помёт при следующем соотношении компонентов: вода – 99,75%; минеральный ионит «Ionsorb™» – 0,2%. Минеральный ионит включает в себя следующий состав компонентов – ((K, Ca, Na)_{0,84}(Al_{0,47}Fe₀, 66Mg_{0,40})(SiAl)₄O₁₀(OH)₂); стабилизированный гашеной известью и минеральным ионитом «Ionsorb™» куриный помёт – 0,005%.

Режим культивирования. Согласно, описанию патента RU 2556126 режим культивирования микроводорослей на питательной среде Люка: освещение фитолампой OSRAM L18W 77, азирование компрессором Tetratex APS400, температура комнатная. Продолжительность опыта – 18 суток.

Мы предлагаем режим культивирования, представленный в приложение 2 таблица 3.

Процесс приготовления питательной среды Люка представлен в приложении 3.

Для культивирования штаммов *Chlorella vulgaris* сконструирована установка объемом 20 литров (приложение 1, рис. 3, приложение 4).

В ходе реализации проекта использовался спектроскопический метод анализа, который основан на избирательном поглощении электромагнитного излучения молекулами (или атомами) анализируемого вещества. Данный метод применяют для решения нескольких задач: определения спектра поглощения хлореллы и регистрации динамики оптической плотности суспензии в ходе роста и развития культуры. В соответствии с Законом Бургера-Ламберта-Бера оптическая плотность раствора, измеренная на некоторой длине волны, прямо пропорциональна концентрации растворенного вещества, поглощающего света на этой длине волны, и толщине слоя раствора (Сиренко и др. 1975).

Для измерения оптической плотности суспензии хлореллы использовали спектрофотометр ПЭ-5400.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для культивирования микроводорослей наиболее подходящие питательные среды – Тамия и Люка. Однако, согласно, наших расчетов по материально-техническому оснащению (приложение 2 таблица 3) и выводам исследований, проведенных ранее (Патент РФ № 2556126) среда Люка дешевле, чем с применением среды Тамия.

Таким образом, на основании сравнительного литературного анализа и оценки материально-технического обеспечения для эксперимента нами была выбрана питательная среда Люка для культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* с целью получения на их основе биопрепарата для биоремедиации нефтезагрязненных земель.

Маточную культуру *Chlorella vulgaris* нарабатывали на среде Тамия в ферментере Biostat® A MO UniVessel® Glass BV-8822000 2L 230V (Приложение 1. Рис. 4) 3–5 суток в условиях жидкофазной ферментации при 350 оборот в мин, температуре 25–27 °С, рН 5.5–6.5, освещении фитолампой 175–250В 50 Гц до достижения титра клеток в суспензии 8,34 млн. кл./мл. Среда Тамия (на 1 дм³ деионизированной воды) следующего состава: KNO₃ – 5 г, KN₂PO₄ × 3H₂O – 1.25 г, MgSO₄×7H₂O – 2.5 г, растворы микроэлементов – по 1 см³.

В исходном штамме содержалось около 8,34 млн. кл./мл. Постоянная подача воздуха осуществляется с помощью компрессора Triton Waco-960. Процесс постоянной подачи воздуха необходим, как источник кислорода и создания дополнительное перемешивание суспензии. Освещение осуществлялось на улице с помощью солнечной энергии, в теплице люминесцентными лампами ЛХБ-20. На улице фиксировали температуру воздуха чем, в тепличных условиях температуру с помощью гигрометра психрометрического ВИТ-2. Температуру воздуха и в помещении отмечали в журнале исследований ежедневно.

Эксперимент проводили в период с 22 июня по 1 июля (11 суток). Каждый день производился отбор проб для определения общего количества микроорганизмов в суспензии и определения оптической плотности суспензии. Подсчет количества *Chlorella vulgaris* определяли с помощью камеры Горяева. Расчет числа клеток на 1 мл осуществлялся, исходя из разведения среды и числа больших квадратов (100), по формуле:

$$X = (a \times 250) / 100,$$

где X – число клеток хлореллы в 1 мл среды; а – число клеток хлореллы, посчитанных в 100 больших квадратах камеры Горяева.

На основе полученных экспериментальных данных (приложение 2 таблица 4; приложение 5) построены графики зависимости количества клеток от температур (приложение 1 рис. 4-5).

Согласно кривой роста культуры, установлено, что в тепличных условиях экспоненциальная фаза роста наступает быстрее и на вторые сутки, тогда как кривая роста в этой фазе в условиях улицы растет постепенно и достигает этой фазы на 4-е сутки эксперимента.

В тепличных условиях фаза замедленного роста наблюдается на 3-4 день, тогда как в уличных условиях эта фаза фиксируется на 5 день. Максимальное количество клеток 2,29 млн/мл., культивируемых в тепличных условиях наблюдается на 7 день. В уличных условиях максимальное количество равно 2,91 млн/мл и наблюдается на 6 день.

Таким образом, по результатам общего количества клеток в суспензии *Chlorella vulgaris* можно сделать следующие выводы: в тепличных условиях культивирования при сравнении с уличными экспоненциальная фаза роста наступает быстрее. Максимальное количество клеток в уличных условиях культивирования наступает на 6 день и выше в 1,27 раза, чем в условиях теплицы.

Согласно, Кругликовой, Савиновой (2014) в спектральном диапазоне от 660 до 680 нм эффективность фотосинтеза микроводорослей наибольшая.

На основе полученных экспериментальных данных (приложение 2 таблица 5) построены графики роста культуры *Chlorella vulgaris* при оптической плотности суспензии 680 нм в период эксперимента (приложение 1 рис. 4-5). Результат оптической плотности прямо пропорционален накоплению биомассы.

Как в тепличных условиях, так в уличных фаза замедленного роста наблюдается на 4-5 день.

Максимальные показатели оптической плотности *Chlorella vulgaris* — 0,049, культивируемых в тепличных условиях наблюдается на 6 день. В уличных условиях максимальные показатели оптической плотности равно 0,045 и наблюдается на 6 день.

При сравнении общего количества клеток и максимального показателя оптической плотности мы приходим к следующему: В уличных условиях максимальное количество клеток *Chlorella vulgaris* равно 2,91 млн на мл и наблюдается на 6 день, что подтверждается максимальным результатом оптической плотности равным 0,045 на 6 день. Максимальное количество клеток 2,29 млн на мл. *Chlorella vulgaris*, культивируемых, в тепличных условиях наблюдается на 7 день, тогда как по результатам оптической плотности максимальный результат накопления биомассы равен 0,049 на 6 день.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при сравнении двух режимов культивирования (уличного и тепличного) было выявлено, что для накопления максимального количества клеток микроводорослей *Chlorella vulgaris* на питательной среде Люка достаточно уличных условий в температурном режиме от 9°C до 19°C за 11 суток.

В уличных условиях периодического культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* на среде Люка максимальное количество клеток наблюдается на 6 день и равно 2,91 млн./мл, что подтверждается максимальным результатом оптической плотности равным 0,045 на 6 день.

Максимальное количество клеток (2,29 млн./мл) микроводорослей *Chlorella vulgaris*, культивируемых, в тепличных условиях наблюдается на 7 день, тогда как по результатам оптической плотности максимальный результат накопления биомассы равен 0,049 на 6 день.

Материально-техническое оснащение для культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* на среде Люка дешевле, чем применение среды Тамия.

Образцы с наработанной биомассой с микроводорослями *Chlorella vulgaris* прошли испытания на промышленном предприятии ООО «ЭкоАльянс». Технология с применением альгопродукта показала высокую эффективность очистки почв от нефтяного загрязнения (приложение 1, рис. 8).

Проектная работа была проведена с участием обучающихся детского технопарка «Кванториум» ГАУДО РК «Республиканского центра дополнительного образования» – Ольги Александровны Вальковец и Светланы Алексеевны Лужиковой.

Благодарим за консультацию и предоставлении биологического объекта с фото ведущего научного сотрудника Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН Патову Е.Н.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Рекомендуем культивирование микроводорослей *Chlorella vulgaris* на среде Люка мобильно в уличных условиях непосредственно на производственных площадях биорекультивации нефтезагрязненных почв с использованием воды из местных водоемов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Аллагуватова Р. З., Гайсина Л. А., Суханова Н. В. Питательная среда для культивирования водоросли *Chlorella vulgaris* с использованием почвенной вытяжки и витаминов: Патент Российской Федерации № 2727257

Андреева В.М. Род *Chlorella*: морфология, систематика, принципы классификации: учеб. пособие. Л.: Изд-во «Наука», 1975. 110 с.

Асташкина А.П. Приготовление питательных сред и культивирование микроорганизмов: методические указания к выполнению лабораторной работы по дисциплинам «Микробиология», «Фармакология, биохимия, микробиология» и «Биотехнология» для студентов ИПР, ИФВТ дневной формы обучения. Томский политехнический университет. Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2015. 19 с.

Блажевич О. В. Культивирование клеток. Курс лекций. БГУ, 2004. 78 с.

Богданова А.А. Влияние различных концентраций питательной среды на увеличение биомассы микроводоросли штамма ИФР № С-111 // Сборник научных трудов по материалам XVI Международной научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых ФГБОУ ВПО «Ярославская ГСХА», Ярославль: Ярославская ГСХА. 2013. С. 18-22.

Богданов Н.И. Планктонная хлорелла - приоритетные направления использования // Сборник научных трудов по материалам 9-й Международной научно-практической конференции «Экологические проблемы промышленных городов». 2019. С. 369-372.

Бурмистрова Т.И., Алексеева Т.П., Перфильева В.Д., Терещенко Н.Н., Стахина Л.Д. Биодegradация нефти и нефтепродуктов в почве с использованием мелиорантов на основе активированного торфа // Химия растительного сырья. 2003. № 3. С. 69-72.

Геоботаническое районирование Нечерноземья Европейской части РСФСР. Л.: Наука, 1989. 63 с.

Гуслинский А.И., Канарский А.В. Перспективные технологии очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов // Вестник Казанского технологического университета. 2011, № 20. С. 191-199.

Гогонин А.В., Щемелинина Т.Н., Володин В.В., Патова Е.Н., Новаковская И.В. Использование микроводорослей в процессе очистки сточных вод целлюлозно-бумажного предприятия // Материалы XV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Вятский государственный университет, Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. 2017. С. 13-16

Кашулин Н.А., Скуфьина Т.П., Даувальтер В.А., Котельников В.А. Устойчивое водопользование в Арктике. Новые подходы и решения // Арктика: экология и экономика. 2018, № 4 (32). С. 15-28.

Кругликова Л. Л., Савинова Д. М. Влияние фотометрических характеристик источника излучения на эффективность выращивания микроводоросли *Chlorella Vulgaris* // Современные техника и технологии: сборник трудов XX международной научно-практической конференции

студентов, аспирантов и молодых ученых, Томск: Изд-во ТПУ, 2014. Т. 1. С. 135-136.

Лукиянов В.А., Стифеев А.И. прикладные аспекты применения микроводорослей в агроценозе. Курск: Издательство Курской государственной сельскохозяйственной академии, 2014. 182 с.

Макарова Е.И., Отурина И.П., Сидякин А.И. Прикладные аспекты применения микроводорослей – обитателей водных экосистем. Экосистемы, их оптимизация и охрана. 2009. Вып. 20. С. 120-133.

Мельников С. Мананкина Е. Использование хлореллы в кормлении сельскохозяйственных животных // Наука и инновации. 2010, № 8 (50). С. 40-43.

Мещерякова Ю.В. Разработка технологического процесса получения биодобавок из липидных компонентов микроводоросли хлорелла для улучшения свойств дизельного топлива: дис. канд. техн. наук. ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт использования техники и нефтепродуктов в сельском хозяйстве», Тамбов. 2016.

Митишев А.В. Микроводоросль хлорелла – источник резиноида // Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии: мат. международной научной интернет-конференции. Казань: ИП Синяев Д.Н. 2013. Т 2. С. 24 – 27.

Михеева Т.М. Перспективы использования культивируемых и планктонных микроскопических водорослей // Наука и инновации. Февраль 2018. № 2 (180). С. 15-19.

Новаковская И.В., Патова Е.Н. Коллекция живых штаммов микроводорослей Института биологии Коми НЦ УрО РАН и перспективы ее использования // Известия Коми научного центра УрО РАН, 2012. № 2 (10). С. 36-41.

Сиренко Л.А. и др. Методы физиолого-биологического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев: Наук. Думка, 1975. 247 с.

Суховский Н.А. Стимулирование прироста микроводоросли хлореллы электростатическим полем. Диссертация на соиск.учен. степени канд. технич. наук, Москва, 2015. 101 с.

Технологии восстановления почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. Справочник. М.: РЭФИА, НИА-Природа, 2003. 258 с.

Шалыго Н.В. Медицинские аспекты альгологии // Наука и инновации. Февраль 2018. №2 (180). С. 20-23.

Щемелинина Т.Н., Анчугова Е.М., Гогонин А.В., Тарабукин Д.В., Шапенков Д.М. Штамм микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer. f. *globosa* V. Andr. для очистки природных водоемов и сточных вод промышленных предприятий. Патент РФ № 2703499; Дата регистрации 17.10.2019, бюлл. №29; приоритет от 05.06.2018; заявка № 2018120704

Щемелинина Т.Н., Корчагина Ю.С., Анчугова Е.М. Средство для биодеструкции нефтепродуктов в загрязненных почвах. Патент РФ № 2707815; Дата регистрации 29.11.2019, бюлл. №34; приоритет от 14.05.2019; заявка № 2019114494.

Щемелинина Т.Н., Анчугова Е.М., Лаптева Е.М., Василевич Р.С., Маркарова М.Ю., Глазачева Е.Н., Успенская М.В. Моделирование технологии “контурного заводнения” в микрокосмах. Почвоведение. 2020. № 2. С. 219-229.

Фролова М.В., Комарова О.П., Московец М.В. Современная биотехнология в улучшении качества воды открытых водоемов многоцелевого назначения. Известия. № 4 (52), 2018. С. 213-218. DOI 10.32786/2071-9485-2018-04-30.

<https://1prime.ru/energy/20200602/831554798.html>

<https://life.ru/p/1350499>

<http://algaspatium.ru/catalog/15>

<http://innosfera.by>

<http://innosfera.by>

Патент РФ № 2701859

Патент РФ № 2556126

Патент РФ № 2321272

Патент РФ № 2542374

Патент РФ № 2556131

Патент РФ № 2703499

Патент РФ № 2707815

Патент РФ № 2644653 Грабарник В.Е., Карелин Н.В., Богданов Н.И. Планктонный штамм *Chlorella vulgaris* предназначенный для получения пищевой биомассы.

Дополнительные материалы. Рисунки.

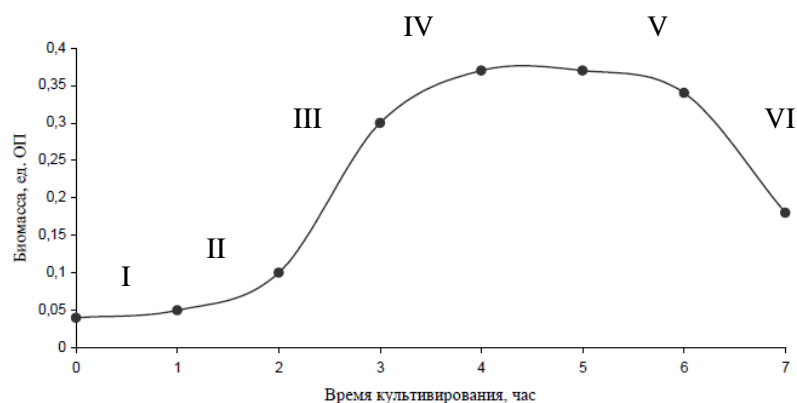


Рис. 1. Шесть фаз кривой роста культуры периодического культивирования: I - лаг-фаза; II – фаза ускоренного роста; III – фаза линейного роста; IV – фаза замедленного роста; V – стационарная фаза; VI – фаза отмирания (Асташкина А.П., 2015)

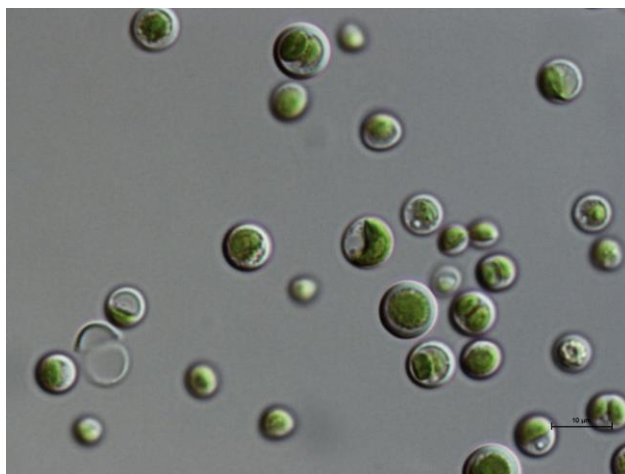


Рис. 2. Штамм микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer. F. *globosa* V. Andr. (Фото Е.Н. Патовой)



Установка на улице



Установка в теплице

Рис. 3 Установка для культивирования микроводорослей



Рис. 4. Культивирование маточной культуры *Chlorella vulgaris*

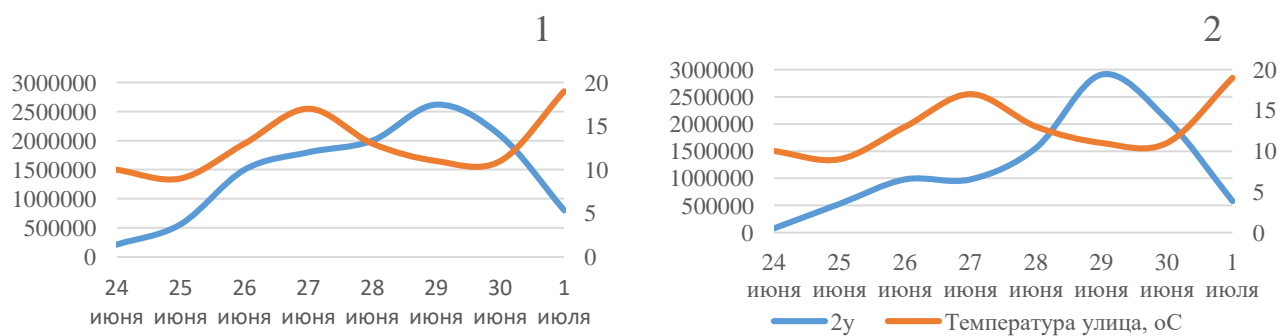


Рис. 5. Зависимость количества клеток от температуры воздуха (млн кл./мл, °C)

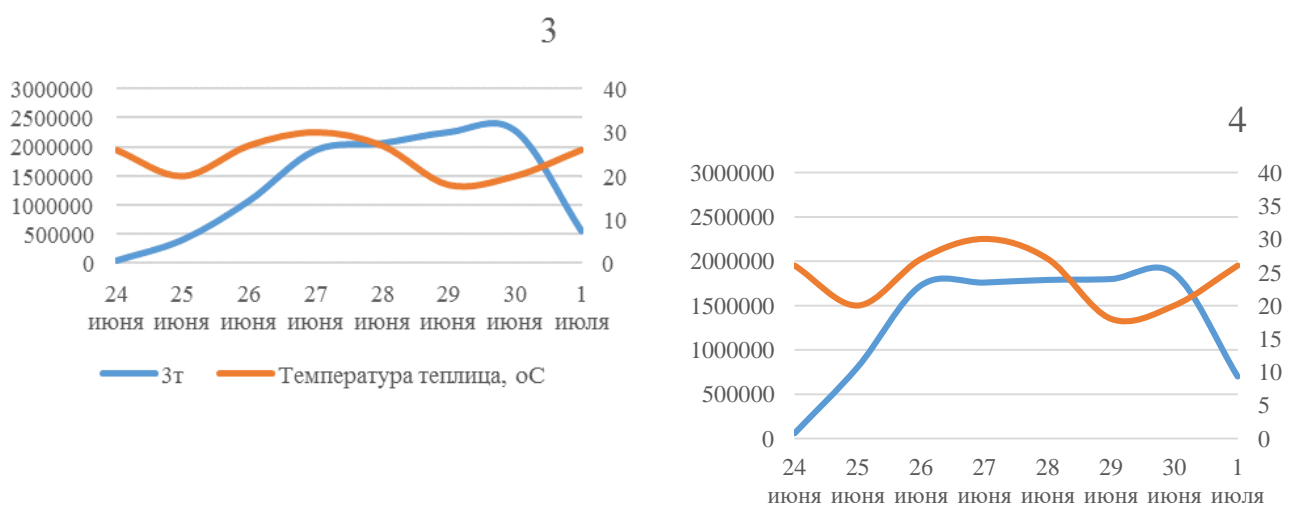


Рис. 6. Зависимость количества клеток *Chlorella vulgaris* от температуры (кл./мл, °C)

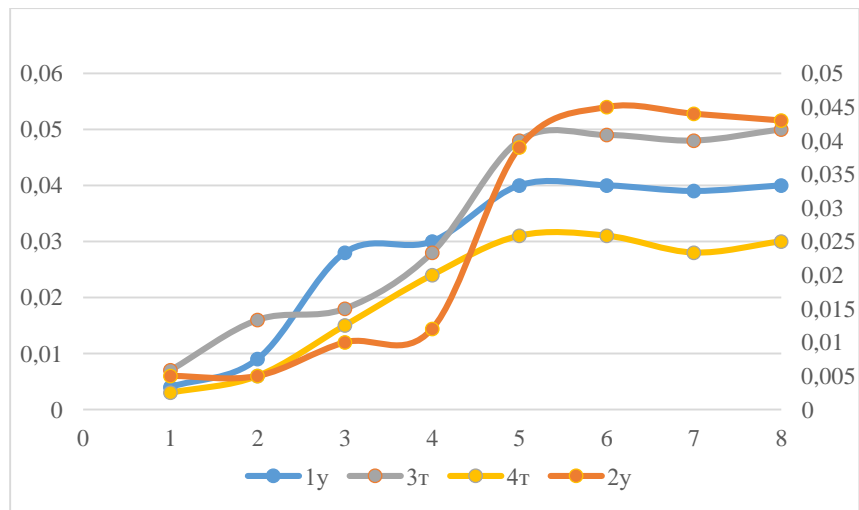


Рис. 7. Рост культуры *Chlorella vulgaris* при оптической плотности 680 нм



Рис. 8. Благодарственное письмо от руководства ООО «ЭкоАльянс»

Дополнительные материалы. Таблицы.

Таблица 1. Состав питательных сред

Компоненты	Маточный раствор (г/л дистиллированной воды)		
	Тамия	Болда	Бенеке
<i>pH</i>	6,5 — 7,5		
<i>Макроэлементы</i>			
KNO ₃	5	-	-
NaNO ₃	-	25	-
NaCl	-	2,5	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	2,5	0,1
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,003		-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,5	7,5	0,1
KH ₂ PO ₄	1,25	17,5	-
K ₂ HPO ₄	-	7,5	0,1
ЭДТА	0,037	50	-
KOH	-	31	-
FeSO ₄	-	4,98	-
Fe ₂ Cl ₆ (1%)	-	-	1 капля
FeCl ₃	-	-	-
H ₂ SO ₄	-	-	-
H ₃ BO ₃	-	11,42	-
<i>Микроэлементы</i>			
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	0,222	8,82	-
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81	1,44	-
MoO ₃	176,4 мг/л	0,71	-
H ₃ BO ₃	2,86	-	-
NH ₄ NO ₃	229,6 мг/л	-	0,2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	1,57	-
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	-	0,49	-

Таблица 2. Диаграмма Ганта

Этап проекта/Дата	18.05-21.06	18.06-21.06	22.06	22.06	22.06-01.07	02.07-01.11	01.11-31.12
Работа с литературными источниками							
Закупка материалов							
Приготовление питательной среды							
Сбор установки для культивирования							
Культивирование микроводоросли. Наблюдение, отбор проб							
Анализ результатов. Разработка рекомендаций							
Участие в конкурсе							

Таблица 3. Режим культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris*

Способ	Освещение	Аэрирование	Температура	Продолжительность
Периодический	Естественное, уличное	+	воздуха	11 суток
Периодический	Естественное, уличное	+	воздуха в теплице	11 суток

Таблица 4. Материально-техническое обеспечение

№п/п	Наименование материала	Количество	Тамия	Люка	Стоимость	
1	Бутыль 19 литров	4 шт	+	+	230 руб	
2	Компрессор	4 шт	+	+	от 1000 руб	
3	Трубки	8 шт	+	+	от 56 руб	
4	Бинт	1 упак	+	+	49 руб	
5	Резинки	1 упак	+	+	80 руб	
6	Фольга	1 рулон	+	+	59 руб	
7	Среда Люка	1 л	-	+	50 руб	
	Среда Тамия	1 л	+	-	200 руб	
8	Хлорелла (<i>Chlorella vulgaris</i>)	1 л	+	+	750 руб	
9	Стерилизация	1л	-	+	150руб	
Итого					стоимость для среды Люка стоимость для среды Тамия	6356 руб 6656 руб

Таблица 5. Число клеток (кл/мл) в разных температурных условиях

Дата	Образец		Температура °С	Образец		Температура °С
	1	2		3	4	
24 июня	210 000	80 000	10	50 000	60 000	26
25 июня	560 000	530 000	9	410 000	810 000	20
26 июня	1500 000	980 000	13	1080 000	1730 000	27
27 июня	870 000	980 000	17	1950 000	840 000	30
28 июня	2000 000	1560 000	13	2070 000	680 000	27
29 июня	2620 000	2910 000	11	2260 000	1800 000	18
30 июня	2090 000	2080 000	11	2290 000	1860 000	20
1 июля	800 000	580 000	19	560 000	700 000	26


Таблица 6. Показатели оптической плотности *Chlorella vulgaris* при длине волны 680 нм

День эксперимента	Уличные условия		Тепличные условия	
	1	2	3	4
1	0,004	0,02	0,007	0,003
2	0,009	0,005	0,016	0,006
3	0,028	0,01	0,013	0,015
4	0,019	0,012	0,028	0,024
5	0,04	0,039	0,048	0,031
6	0,029	0,037	0,049	0,031
7	0,039	0,044	0,04	0,028
8	0,04	0,018	0,022	0,02

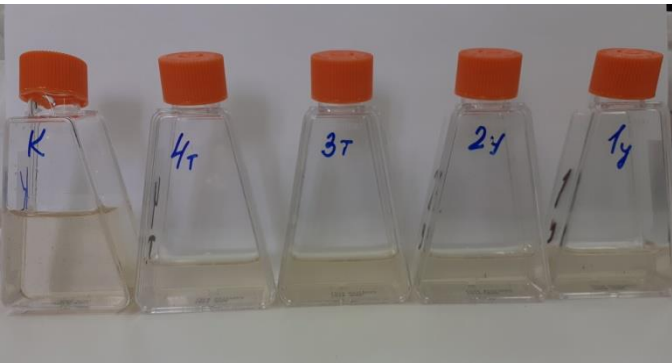
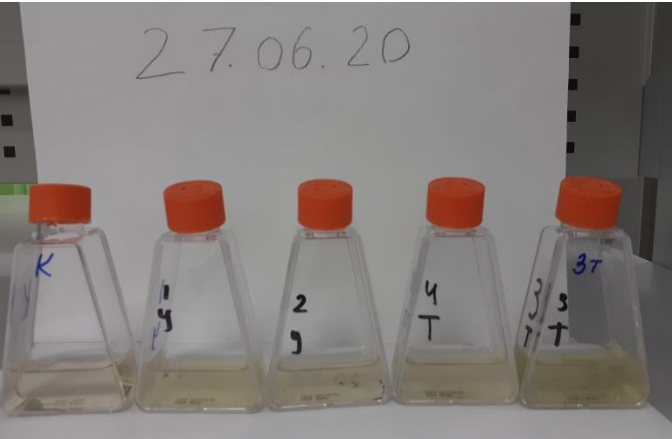

Приготовление питательной среды

Номер	Название	Фотография
Фото 1	Взвешивание минерального ионита «Ionsorb™»	
Фото 2	Взвешивание стабилизированного гашеной известью и минеральным ионитом «Ionsorb™» куриного помёта	
Фото 3	Взятие воды с пруда	
Фото 4	Добавление в воду куриного помёта и минерального ионита «Ionsorb™»	

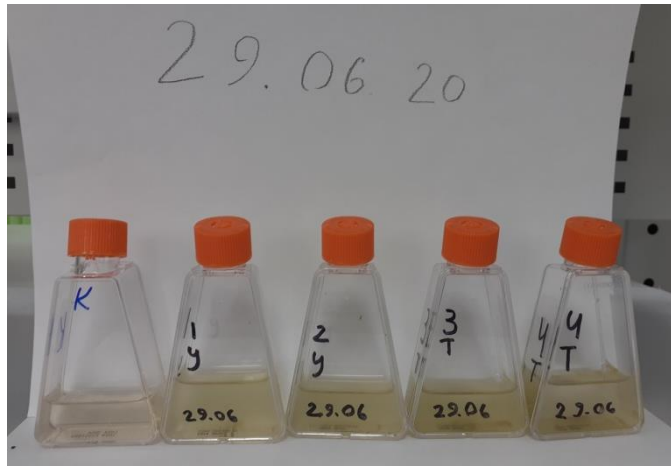
Сбор установки для культивирования

Номер	Фотография
Фото 1	 <p>A photograph showing three individuals, likely students, gathered around a table. They are focused on a task involving large plastic bottles and various pieces of equipment, possibly preparing a cultivation setup. One person in an orange jacket is actively handling a bottle.</p>
Фото 2	 <p>A photograph taken outdoors showing two individuals wearing white lab coats. They are bent over, using a collection system to gather liquid from a plant into two large, clear plastic bottles. The setting appears to be a garden or field.</p>
Фото 3	 <p>A close-up photograph of people in white lab coats and gloves. They are working with two large plastic bottles filled with a yellowish liquid. A tray containing several petri dishes is visible in the foreground, suggesting a process of sample collection or inoculation.</p>
Фото 4	 <p>A detailed close-up photograph showing a person's hands in white gloves. The person is carefully pouring a dark liquid from a small glass vial into the neck of a large plastic bottle. The background shows some green foliage.</p>

Пробы в период эксперимента

Дата	Фотографии
24.06.	
27.06.	<p data-bbox="756 763 1038 831">27.06.20</p> 
28.06.	<p data-bbox="794 1227 1082 1294">28.06.20</p> 

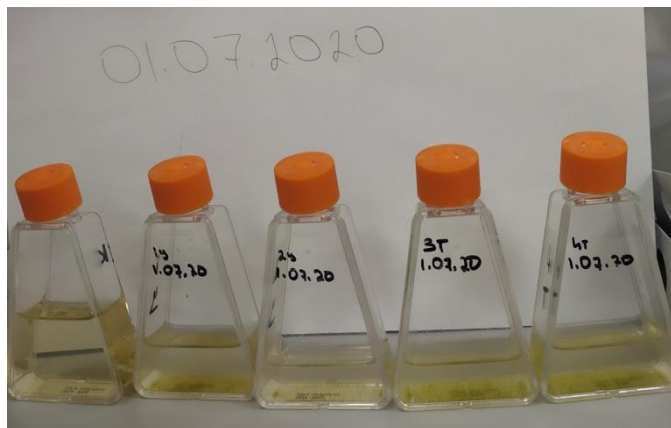
29.06.



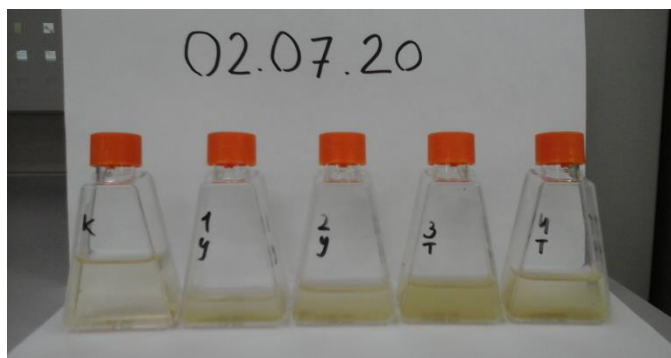
30.06.



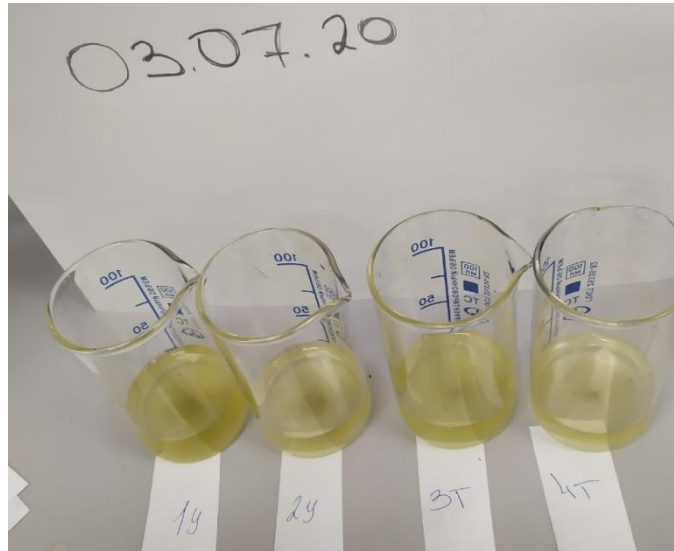
01.07.



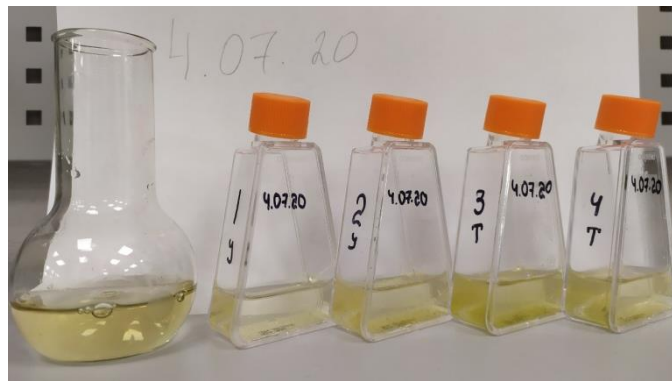
02.07.



03.07.



04.07.



06.07.

