



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 1/12 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2021106546, 14.03.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.03.2021

Дата регистрации:
17.06.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.03.2021

(45) Опубликовано: 17.06.2022 Бюл. № 17

Адрес для переписки:

167000, Республика Коми, г. Сыктывкар, ул.
Первомайская, 119, кв. 101, Лихановой Надежде
Владимировне

(72) Автор(ы):

Турьева Мария Максимовна (RU),
Лужикова Светлана Алексеевна (RU),
Вальковец Ольга Александровна (RU),
Лиханова Надежда Владимировна (RU),
Щемелинина Татьяна Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Турьева Мария Максимовна (RU),
Лужикова Светлана Алексеевна (RU),
Вальковец Ольга Александровна (RU),
Лиханова Надежда Владимировна (RU),
Щемелинина Татьяна Николаевна (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2727257 C1, 21.07.2020. RU
2176667 C1, 10.12.2001. RU 2644653 C1,
13.02.2018. RU 2504578 C2, 20.01.2014. GB
2214928 A, 13.09.1989. RU 2542374 C2, 20.02.2015.
RU 2703499 C1, 17.10.2019. RU 2685955 C1,
23.04.2019.

(54) Способ культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer. f. *globosa* V. Andr. IPPAS C-2024 в природных условиях с использованием воды из пруда

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Изобретение представляет собой способ культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS C-2024, отличающийся тем, что включает в себя аэрацию суспензии микроводорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS C-2024 с помощью компрессора AQUAEL OXYBOOST

300 plus на питательной среде Люка с водой чистой, взятой из пруда естественного водоема, при средних температуре 12,7°C и освещенности 39,6 кЛк в естественных условиях окружающей среды. Способ позволяет накопить максимальное количество клеток микроводорослей *Chlorella vulgaris*. 2 пр., 2 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C12N 1/12 (2021.08)(21)(22) Application: **2021106546, 14.03.2021**(24) Effective date for property rights:
14.03.2021Registration date:
17.06.2022

Priority:

(22) Date of filing: **14.03.2021**(45) Date of publication: **17.06.2022 Bull. № 17**

Mail address:

**167000, Respublika Komi, g. Syktyvkar, ul.
Pervomajskaya, 119, kv. 101, Likhanovoj Nadezhde
Vladimirovne**

(72) Inventor(s):

**Tureva Mariya Maksimovna (RU),
Luzhikova Svetlana Alekseevna (RU),
Valkovets Olga Aleksandrovna (RU),
Likhanova Nadezhda Vladimirovna (RU),
Shchemelinina Tatyana Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Tureva Mariya Maksimovna (RU),
Luzhikova Svetlana Alekseevna (RU),
Valkovets Olga Aleksandrovna (RU),
Likhanova Nadezhda Vladimirovna (RU),
Shchemelinina Tatyana Nikolaevna (RU)****(54) METHOD FOR CULTIVATING MICROALGAE CHLORELLA VULGARIS BEIJER. f. GLOBOSA V.
ANDR IPPAS C-2024 IN NATURE USING POND WATER**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention constitutes a method for cultivating *Chlorella vulgaris* microalgae IPPAS C-2024, characterised by including aeration of a suspension of *Chlorella vulgaris* microalgae IPPAS C-2024 using an AQUAEL OXYBOOST 300 plus compressor on a Luke nutrient medium with clean water

taken from a natural pond, at an average temperature of 12.7°C and illumination of 39.6 klx in natural environmental conditions.

EFFECT: method allows for accumulation of the maximum amount of cells of *Chlorella vulgaris* microalgae.

1 cl, 2 ex, 2 tbl

RU 2 774 314 C1

RU 2 774 314 C1

Изобретение относится к защите окружающей среды и предназначено для получения в мобильных, стрессовых, природных условиях биотехнологического препарата - деструктора нефтепродуктов.

В настоящее время оценен вклад микроводорослей как эффективных деструкторов углеводов. Поиск решений на получение необходимого объема биомассы микроводорослей для решения задач экологической биотехнологии при минимальной себестоимости состава и процесса приготовления, сокращении сроков роста и повышении выхода биомассы становится особо актуальным в настоящее время, когда загрязнения, в том числе, нефтепродуктами приводят к экологическим катастрофам.

Важным 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.

Известны синтетические питательные среды Тамия, Болда, наиболее применимые для наработки биомассы микроводорослей. Недостатками их является большое количество макро- и микроэлементов в их составе, обязательная стерилизация и культивирование в условиях комнатных температур.

Известен способ культивирования микроводорослей на основе штамма *Chlorella vulgaris* ИФР №с-111 (Патент РФ №2176667). Способ предусматривает розлив питательной среды в емкости, инокуляцию суспензии штаммом, освещение культуральной жидкости в процессе роста микроводорослей и поддержание необходимой температуры суспензии. Емкости представляют собой сосуды из прозрачного материала, и для освещения используют источник искусственного света.

Известен способ культивирования микроводорослей *Chlorella* (Патент РФ №2668162). Способ включает культивирование суспензии микроводоросли в фотобиореакторе, в котором суспензию микроводоросли перемешивают в течение 13-17 минут с частотой вращения 500 об./мин. через каждые 120 минут. При этом культивирование осуществляют, также при непрерывной продувке воздухом с помощью барботирующего устройства с расходом 1,2-1,8 л/мин. при температуре 26-30°C, непрерывном воздействии инфракрасного излучения 10900-11300 Лк и при поверхностной освещенности 2200-2800 Лк с фотопериодом 12 часов.

Известен способ (Патент РФ №2508398), когда культивирование штамма микроводорослей *Chlorella vulgaris* А1 123 проводят в лабораторных условиях при температуре 25°C на среде ВВМ рН 6.8 в лимитированных по азоту условиях в течение 7 дней, в объеме среды 200 мл в колбах на 500 мл, при непрерывном барботировании суспензии стерильным воздухом со скоростью 200 мл/мин, при освещенности 120 Вт/м с фотопериодом 16 часов.

Известен способ культивирования хлореллы на питательной среде, содержащей марганцовокислый калий, хлористый кобальт и зерно-картофельную барду, которая образуется при производстве спирта (Патент РФ №2685955). Готовую питательную среду стерилизуют в течение 30 минут. В период светового выращивания водорослей культуру перемешивают воздухом.

Известен способ (Патент РФ №2643256). Культивирование выполняют в различных режимах с использованием отдельных планктонных штаммов: *Chlorella vulgaris* ИФР С-111, *Chlorella vulgaris* BIN, *Chlorella kessleri* ВКПМ А1-12. В способе выращивают штаммы хлореллы с использованием источника света, оптимальной питательной среды и температурных условий. Достижение оптимального освещения в начальный период культивирования осуществляют путем включения вертикально расположенных ламп,

находящихся между аквариумами. В процессе роста клеток и увеличения оптической плотности культуры подключают горизонтальные лампы, расположенные над центральным аквариумом.

Известен способ искусственного культивирования микроводорослей и установка для его осуществления (Патент РФ №2175013). Культивирование микроводорослей осуществляется путем фотосинтеза при воздействии на них радиолюминесцентного излучения и тепла, возбуждаемого проникающими ядерными излучениями, при этом спектр радиолюминесцентного излучения может быть выбран резонансно совпадающим со спектром действия фотосинтеза. Искусственным источником энергии служит источник проникающих ядерных излучений, источником люминесцентного оптического излучения - радиолуминофор, тепло генерируется в среде источника ядерных излучений. В качестве источника ядерных излучений используется ядерный реактор, в том числе, реактор-размножитель с уран-ториевым циклом, в том числе, в виде решетки из ядерных радиолюминесцентных ламп, которые со всех сторон окружены светоприемными кюветами с суспензией культивируемых микроводорослей.

Недостатками этих способов является трудоемкость, высокие энергозатраты, культивирование не в природных условиях на полигонах.

Задачей заявленного изобретения является разработка способа культивирования суспензии микроводорослей *Chlorella vulgaris* в природных условиях с использованием воды из пруда.

Технический результат достигается тем, что способ культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* включает в себя штамм микроводорослей *Chlorella vulgaris*, воду, взятую из пруда, компоненты питательной среды Люка, режим культивирования: аэрация с помощью компрессоров AQUAEL OXYBOOST 300 plus, климатические условия окружающей среды ($t_{cp}=13^{\circ}\text{C}$).

Описание штамма микроводорослей *Chlorella vulgaris* Beijer. f. *globosa* V. Andr. UPAS C-2024 из коллекции Института биологии Коми НЦ УрО РАН ФИЦ.

Вид *Chlorella vulgaris* относится к роду *Chlorella*. Зеленые одноклеточные водоросли имеют сферическую форму, размером от 2 до 4 мкм, без жгутиков. Хлоропласт широкопоясковидный незамкнутый зеленого цвета, содержащий хлорофилл-а и хлорофилл-б. Клетки делятся на 2-8, редко на 16 автоспор.

Маточную культуру *Chlorella vulgaris* нарабатывали на среде Тамия в ферментере Biostat® A MO UniVessel® Glass BB-8822000 2L 230V 3-5 суток в условиях жидкофазной ферментации при 350 об./мин, температуре 25-27°C, pH 5,5-6,5, освещении фитолампой 175-250 В 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, KH₂PO₄ × 3H₂O - 1,25 г, MgSO₄ × 7H₂O - 2,5 г, растворы микроэлементов - по 1 см³. В исходном штамме содержалось 8,34 млн. кл./мл.

Согласно патента РФ №2556126 «Питательная среда Люка для культивирования микроводорослей» экономически выгодной является экологичная органо-минеральная питательная среда Люка. Состав питательной среды Люка: вода - 99,75%; минеральный ионит «Ionsorb™» - 0,2%. Минеральный ионит включает в себя следующий состав компонентов - ((K, Ca, Na)_{0,84}(Al_{0,47}FeO, 66Mg_{0,40})(SiAl)₄O₁₀(OH)₂); стабилизированный гашеной известью и минеральным ионитом «Ionsorb™» куриный помет - 0,005%.

Для оценки режима культивирования провели наработку суспензии микроводорослей в разных условиях.

Пример 1.

В емкости 18 л вносили воду из пруда, добавляли состав среды Люка, перемешивали и вносили маточную культуру микроводорослей. Аэрацию осуществляли с помощью компрессоров AQUAEL OXYBOOST 300 plus. Культивирование суспензии микроводорослей проводилось на улице в климатических условиях окружающей среды ($t_{cp}=13^{\circ}\text{C}$) (уличные условия). Эксперимент был поставлен на 10 суток в 2-х повторностях (образец 1 и образец 2). Производился ежедневный отбор проб для определения общего количества клеток микроводорослей в суспензии и определения оптической плотности суспензии (Таблица 1).

Подсчет количества клеток *Chlorella vulgaris* проводили 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.

Определения оптической плотности суспензии микроводорослей *Chlorella vulgaris* микроводорослей *Chlorella vulgaris* проводили на спектрофотометре ПЭ-5400УФ, толщина кюветы 10 мм.

Таблица 1

Количество клеток микроводорослей *Chlorella vulgaris* и показатели оптической плотности при длине волны 680 Нм при культивировании в уличных условиях

| День эксперимента | Уличные условия | | | |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Образец 1 | | Образец 2 | |
| | Количество клеток, кл./мл | Оптическая плотность, Нм | Количество клеток, кл./мл | Оптическая плотность, Нм, |
| 1 | 210 000 | 0,004 | 80 000 | 0,02 |
| 2 | 560 000 | 0,009 | 530 000 | 0,005 |
| 3 | 1500 000 | 0,028 | 980 000 | 0,01 |
| 4 | 870 000 | 0,019 | 980 000 | 0,012 |
| 5 | 2000 000 | 0,04 | 1560 000 | 0,039 |
| 6 | 2620 000 | 0,029 | 2910 000 | 0,037 |
| 7 | 2090 000 | 0,039 | 2080 000 | 0,044 |
| 8 | 800 000 | 0,04 | 580 000 | 0,018 |

Пример 2.

В емкости 18 л вносили воду из пруда, добавляли состав среды Люка, перемешивали и вносили маточную культуру микроводоросли. Аэрацию осуществляли с помощью компрессоров AQUAEL OXYBOOST 300 plus. Культивирование суспензии микроводорослей проводилось в теплице ($t_{cp}=24^{\circ}\text{C}$) (тепличные условия). Эксперимент был поставлен на 10 суток в 2-х повторностях (образец 3 и образец 4). Производился ежедневный отбор проб для определения общего количества клеток микроводорослей в суспензии и определения оптической плотности суспензии (Таблица 2).

Подсчет количества клеток *Chlorella vulgaris* проводили 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.

Определения оптической плотности суспензии микроводорослей *Chlorella vulgaris*

микроводорослей *Chlorella vulgaris* проводили на спектрофотометре ПЭ-5400УФ, толщина кюветы 10 мм.

Таблица 2

Количество клеток микроводорослей *Chlorella vulgaris* и показатели оптической плотности при длине волны 680 нм при культивировании в тепличных условиях

| День эксперимента | Тепличные условия | | | |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Образец 3 | | Образец 4 | |
| | Количество клеток, кл./мл | Оптическая плотность, Нм | Количество клеток, кл./мл | Оптическая плотность, Нм, |
| 1 | 50 000 | 0,007 | 60 000 | 0,003 |
| 2 | 410 000 | 0,016 | 810 000 | 0,006 |
| 3 | 1080 000 | 0,013 | 1730 000 | 0,015 |
| 4 | 1950 000 | 0,028 | 840 000 | 0,024 |
| 5 | 2070 000 | 0,048 | 680 000 | 0,031 |
| 6 | 2260 000 | 0,049 | 1800 000 | 0,031 |
| 7 | 2290 000 | 0,04 | 1860 000 | 0,028 |
| 8 | 560 000 | 0,022 | 700 000 | 0,02 |

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.

(57) Формула изобретения

Способ культивирования микроводорослей *Chlorella vulgaris* IPPAS C-2024, отличающийся тем, что в 18-литровые емкости вносят воду из пруда, добавляют состав среды Люка, перемешивают и вносят маточную культуру микроводорослей, при этом аэрацию осуществляют с помощью компрессоров AQUAEL OXYBOOST 300 plus, а культивирование суспензии микроводорослей проводят на улице в климатических условиях окружающей среды при $t_{cp}=13^{\circ}\text{C}$.