



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 101103

(13) U

(51) МПК

C12N 1/12 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 02303**

(22) Дата подання заявки: **16.03.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **25.08.2015**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.08.2015, Бюл.№ 16**

(72) Винахідник(и):

**Марченко Михайло Маркович (UA),
Худий Олексій Ігорович (UA),
Чебан Лариса Миколаївна (UA),
Худа Лідія Вікторівна (UA),
Маліщук Ірина Володимирівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012
(UA)**

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ФІТОПЛАНКТОНУ

(57) Реферат:

Спосіб культивування фітопланктону включає вибір необхідного живильного середовища, інокуляцію живильного середовища культурою продуцента, вирощування фітопланктону та отримання приросту біомаси. Як живильне середовище використовують скидну воду із рибоводної установки замкнутого водопостачання (УЗВ). При цьому здійснюють забір води із механічного фільтру УЗВ, контролюють склад біогенних елементів до рівня загальної мінералізації ($\geq 450 \pm 5$ ррт), проводять автоклавування забраної води при 121 ± 2 °C протягом 30 ± 5 хв, інокуляцію живильного середовища продуцентом у співвідношенні 1:10 та накопичувальне культивування без підживлення впродовж 40 ± 5 діб, що призводить до збільшення кількості біомаси у 20 ± 3 рази порівняно з початковою її кількістю.

UA 101103 U

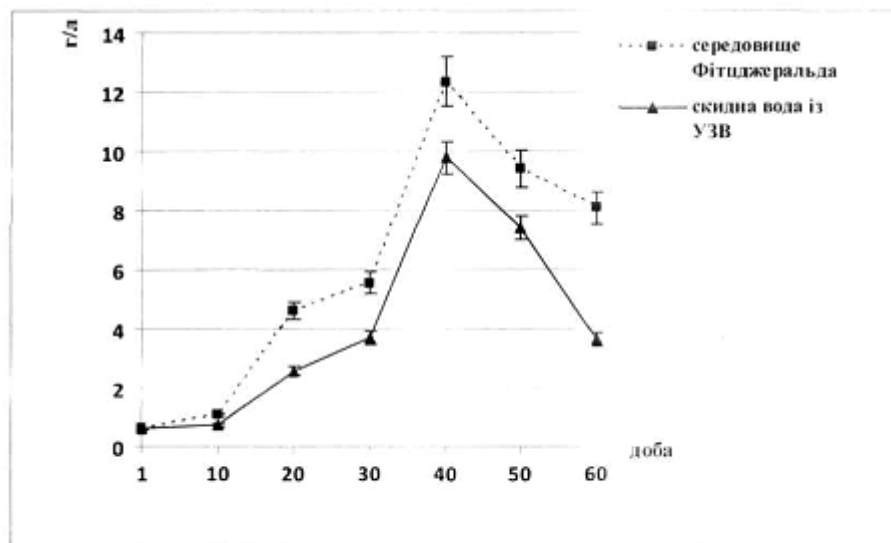


Fig. 1

Спосіб належить до біотехнології та аквакультури і може бути використаний для культивування фітопланктону як стартових живих кормів при вирощуванні зоопланктону та личинок промислово-цінних видів риб.

Для більшості представників мікроводоростей розроблені загальні рекомендації щодо культивування їх в лабораторних умовах, що включають вибір живильного середовища, інокуляцію живильного середовища культурою продуцента, накопичувальне культивування продовж певного терміну, залежно від мети експерименту [Перспективи використання мікроводоростей у біотехнології / О.К. Золотарьова, Є.І. Шнюкова, О.О. Сиваш, Н.Ф. Михайленко: Під ред. О.К. Золотарьової. - К.: Альтерпрес, 2008. - 234 с.]. Загальні підходи в біотехнології мікроводоростей передбачають використання якості живильних середовищ штучних сумішей макро- та мікроелементів. Однак, штучні живильні середовища є досить вартісними. З іншого боку, тільки при зміні складу живильного середовища можна досягти виходу біомаси мікроводоростей з покращеними продуктивними характеристиками [Чубчикова І.Н., Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Данцюк Н.В. Оптимизация состава питательной среды для выращивания микроводоросли *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. (Chlorophyceae) // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского, Серия "Биология, химия". - 2013. - Том 26 (65). - № 4. - С. 196-205.]. Тому виникає потреба пошуку альтернативних живильних середовищ, що з одного боку забезпечували б потребу альгокультури в мінеральних компонентах, а з іншого, дозволили б зменшити собівартість технології отримання біомаси водоростей.

Найбільш близьким (найближчим аналогом) є спосіб культивування мікроводоростей за використання стічних вод та екстрактів різного походження [Голуб Н.Б. Культивування мікроводоростей за використання відходів // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. - 2-13. - № 6/10 (66). - С. 4-9.], де за основу середовища культивування для *Clorella vulgaris* вибрано екстракти посліду свійської птиці або відходи при виробництві цукру. Даний підхід дозволив підвищити швидкість приросту біомаси у 3 рази від початкового її вмісту 0,05 г/л. Однак недоліками найближчого аналога є необхідність внесення у живильне середовище глюкози у концентрації 0,01-0,05 моль/л та постійного барботування середовища CO₂, що може призвести до закислення середовища, а також необхідність підтримання концентрації загального нітрогену на рівні 0,035 моль/л. Недотримання всіх цих параметрів призводить до зменшення кількості біомаси до початкового рівня, припинення росту та поступової загибелі культури. Також в даному способі не враховується склад біомаси, отриманої в результаті застосування наведених живильних середовищ, а саме ці параметри визначають ефективність розробленого способу культивування та цінність отриманої біомаси.

Технічний результат полягає в розробці ефективної методики культивування деяких представників фітопланктону на скидній воді із рибоводної установки замкнутого водопостачання (УЗВ), яка характеризується високим виходом біомаси, збагаченої основними нутрієнтами, та зниженням собівартості середовищ культивування.

Суть корисної моделі полягає в тому, що для культивування фітопланктону як живильного середовища використовують скидну воду із рибоводної установки замкнутого водопостачання (УЗВ), яка збагачена біогенними елементами, заявлений спосіб включає вибір як живильного середовища скидної води із УЗВ, забір води із механічного фільтру із рибоводної установки та контроль складу біогенних елементів до рівня загальної мінералізації ($\geq 450 \pm 5$ ppm), автоклавування забраної води при 121 ± 2 °C протягом 30 ± 5 хв, інокуляцію живильного середовища продуцентом (*Clorella vulgaris* або *Anabaena hassalii*) у співвідношенні 1:10 та накопичувальне культивування без підживлення впродовж 40 ± 5 діб.

В результаті реалізації способу вдається збільшити вихід біомаси у 20 ± 3 рази порівняно з початковою її кількістю.

Розроблений спосіб дозволяє отримати активно ростучу культуру, що характеризується максимальною кількістю біомаси (близько 10 тіл), збільшенням загальної чисельності клітин альгокультури (16000 шт./мл), незначною часткою мертвих клітин (близько 5 %) та вмістом білка у сухій масі на рівні 23-29 %.

Насичення скидної води із рибоводних установок біогенними елементами, зокрема різними формами азоту, дозволяє її використання як живильного середовища для культивування фітопланктону.

Забір води із механічного фільтру дозволяє з одного боку отримати скидну воду очищену від механічних завислих часток, з іншого - з оптимальним співвідношенням різних форм нітрогену, що є необхідною умовою при культивуванні фітопланктону.

Автоклавування води при температурі 121 ± 2 °C протягом 30 ± 5 хв дозволяє отримати стерильну скидну воду, позбавлену мікрофлори, уникнути повторної контамінації фітопланктону та зберегти стерильність в процесі усього терміну культивування.

5 Як продуцент запропоновано використовувати культури мікроводоростей *Clorella vulgaris* або *Anabaena hassalii*, що підтверджує перспективність даної моделі, як для зелених, так і для синьо-зелених мікроводоростей.

Інокуляція живильного середовища культурами продуцентів у співвідношенні 1:10 є оптимальним співвідношенням для забезпечення альгокультури біогенними елементами та дозволить зменшити тривалість адаптації фітопланктону до нового живильного середовища.

10 Використання скидної води із УЗВ як живильного середовища для культивування фітопланктону дозволяє отримати високий вихід біомаси, культивованих організмів та значно знизити затрати на середовища культивування.

На фіг. 1 приведена динаміка біомаси мікроводорості *Anabaena hassalii* в процесі культивування на скидній воді із УЗВ.

15 На фіг. 2 приведена динаміка біомаси мікроводорості *Clorella vulgaris* в процесі культивування на скидній воді із УЗВ.

20 Спосіб здійснюють наступним чином. Із рибоводної установки замкнутого водопостачання (механічний фільтр) вилучають аліквоти води, які аналізують одразу за показниками загальної мінералізації ($\geq 450 \pm 5$ ррт) та pH (7-8). Внаслідок життєдіяльності риб та застосування штучних кормів у скидній воді із УЗВ локалізується значна кількість біогенних елементів, зокрема різні форми азоту та фосфору.

Воду переносять у термостійкі ємкості з притертими корками. Розподілені за об'ємом проби надалі автоклавують при температурі 121 ± 2 °C протягом 30 ± 5 хв у паровому стерилізаторі. Після стерилізації воду охолоджують до кімнатної температури.

25 На охолоджену стерильну воду в умовах ламінар-боксу висівають культури фітопланктону *Clorella vulgaris* або *Anabaena hassalii* у співвідношенні інокулят: живильне середовище 1:10. Ємкості закупорюють та поміщають в кліматичну кімнату для нарощування біомаси протягом 40 діб.

30 В кліматичній кімнаті підтримують наступні показники: температура 21 ± 2 °C, 16-ти годинний фотоперіод, інтенсивність освітлення близько 2,5 клк.

Розвиток та нормальна життєдіяльність мікроводоростей, у штучних водоймах, тісно пов'язані із мінеральним складом води як середовища культивування. Більшість мікроводоростей здатні використовувати іони нітрату або амонію. Вміст NH_4^+ в середовищі призводить до інгібування нітрату та репресування його поглинання. Нестача нітрогену 35 призводить до уповільнення росту біомаси культури, що відображається на збільшенні вмісту в її складі ліпідів та жирних кислот. Однак, показано, що споживання нітрогену в нітратній формі позитивно впливає на приріст біомаси мікроводоростей, в той час як іони амонію інгібують розвиток культури.

40 Мікроводорості *C. vulgaris* чи *A. hassalii* культивували на стерильній скидній воді із рибоводної установки замкнутого водопостачання. Як середовище порівняння використовували класичне середовище Фітцджеральда. В процесі культивування аналізували гідрохімічні показники культурального середовища (загальну мінералізацію та pH). Кожних 10 діб в динаміці культивування визначали гідрохімічні показники стану середовищ культивування, динаміку біомаси, кількість білка та фотосинтезуючих пігментів.

45 Впродовж перших п'яти діб культивування на скидній воді з УЗВ та на середовищі Фітцджеральда було відмічено низьку ростову активність обох культур, що, очевидно, спричинено адаптацією мікроводорості до нових умов середовища. Найінтенсивніший ріст біомаси спостерігався у період з 10-ї до 40-ї доби культивування (фіг. 1, 2). На пізніх термінах культивування кількість біомаси монокультури як *C. vulgaris*, так і *A. hassalii* починає 50 знижуватися. Це пояснюється тим, що альгокультури переходить у фазу відмирання, за рахунок зменшення живильних елементів та накопичення продуктів метаболізму в культуральній рідині. Нами показано можливість культивування монокультури *C. vulgaris* чи *A. hassalii* на скидній воді із рибоводної установки, при цьому темпи виснаження середовищ суттєво не відрізнялись для обох дослідів. За показниками рівня pH, загальної мінералізації та темпами приросту культури 55 визначено оптимальну тривалість культивування, що складає 40 діб. Таким чином отримують продуктивну культуру, що характеризується високим приростом біомаси і, яку можна використовувати для подальшої переробки чи продовжувати пасажувати на свіжому живильному середовищі (табл. 1).

Таблица 1

Показники ефективності культивування мікроводоростей
на різних живильних середовищах

Показники	C. vulgaris (прототип)	C vulgaris	A. hassalii
		Скидна вода із УЗВ	
РН	6	7-8	
Кількість нітрогену	0,035 моль/л	0,02 ммоль/л	
Кількість глюкози	0,01-0,05 моль/л	немає потреби	
Приріст біомаси, lg m/m ₀	0,857	1,35	1,41
Кількість біомаси	1,5 г/л	9,05 г/л	9,82 г/л

- 5 В процесі культивування мікроводоростей може суттєво змінюватись нутрієнтний склад біомаси. Щоб оцінити продуктивність культури визначають кількість отриманої біомаси, загального білка та основних фотосинтезуючих пігментів. Було визначено, що максимальна продуктивність культур C. vulgaris та A. hassalii, вирощених на скидній воді із УЗВ також припадає на 40 добу культивування (табл. 2).

Таблица 2

Показники продуктивності мікроводоростей, культивованих на скидній воді із УЗВ

Вид середовища	Біомаса, г/л	Кількість білка, %	Кількість хлорофілу а, мг/г	Кількість хлорофілу b, мг/г	Кількість каротиноїдів, мг/г
A. hassalii					
Скидна вода із УЗВ	9,82±0,37	22,51±0,22	15,62±0,11	-	5,75±0,14
Середовище Фітцджеральда	12,36±0,09	23,62±0,29	17,85±0,32	-	6,05±0,54
C. vulgaris					
Скидна вода із УЗВ	9,05±0,23	22,71±0,15	17,26±0,11	6,47±0,13	2,96±0,07
Середовище Фітцджеральда	13,44±0,34	29,17±0,06	16,94±0,21	8,69±0,15	3,31±0,16

- 10 Так, максимальні показники вмісту білка в культурі A. hassalii, вирощеній на штучному середовищі Фітцджеральда на 40 добу становили - 23,6 % на 1 г сухої маси, а на скидній воді із установки замкненого водопостачання - 22,6 % на 1 г сухої маси. Впродовж всього терміну культивування відмічене поступове зростання рівня хлорофілу а та каротиноїдів, що на 40 добу сягали своїх максимальних значень на обох середовищах культивування.
- 15 При апробації даного підходу для C vulgaris вміст білка на обох середовищах культивування знаходився у межах 23-29 % на 1 г сухої маси, кількість основних пігментів біомаси достовірно не відрізнялася як за умов застосування скидної води із УЗВ, так і середовища порівняння.
- Отже, культивування C. vulgaris чи A. hassalii на скидній воді із рибоводної установки дозволяє отримати активно ростучу монокультуру, що характеризується постійним приростом біомаси та високим вмістом основних фотосинтезуючих пігментів. При цьому ефективність культивування обох мікроводоростей на скидній воді достовірно не відрізняється від такої за умови використання штучного середовища Фітцджеральда.
- 20 Застосування які живильного середовища скидної води із рибоводної установки дасть можливість значно знизити собівартість біотехнології отримання альгомаси та при цьому
- 25 дозволить звільнити скидні води рибоводних систем від біогенних елементів.

Джерела інформації:

1. Голуб Н.Б. Культивування мікроводоростей за використання відходів // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. - 2013. - № 6/10 (66). - С. 4-9.

2. Перспективи використання мікроводоростей у біотехнології / О.К. Золотарьова, Є.І. Шнюкова, О.О. Сиваш, Н.Ф. Михайленко: Під ред. О.К. Золотарьової. - К.: Альтерпрес, 2008. - 234 с.

3. Чубчикова И.Н., Минюк Г.С., Дробецкая И.В., Данцюк Н.В. Оптимизация состава питательной среды для выращивания микроводоросли *Scotiellopsis rubescens* Vinatz. (Chlorophyceae) // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского, Серия "Биология, химия". - 2013. - Том 26 (65). - № 4. - С. 196-205.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб культивування фітопланктону, що включає вибір необхідного живильного середовища, інокуляцію живильного середовища культурою продуцента, вирощування фітопланктону та отримання приросту біомаси, який **відрізняється** тим, що як живильне середовище використовують скидну воду із рибоводної установки замкнутого водопостачання (УЗВ), при цьому здійснюють забір води із механічного фільтру УЗВ, контролюють склад біогенних елементів до рівня загальної мінералізації ($\geq 450 \pm 5$ ppm), проводять автоклавовання забраної води при 121 ± 2 °C протягом 30 ± 5 хв, інокуляцію живильного середовища продуцентом (*Clorella vulgaris* або *Anabaena hassalii*) у співвідношенні 1:10 та накопичувальне культивування без підживлення впродовж 40 ± 5 діб, що призводить до збільшення кількості біомаси у 20 ± 3 рази порівняно з початковою її кількістю.

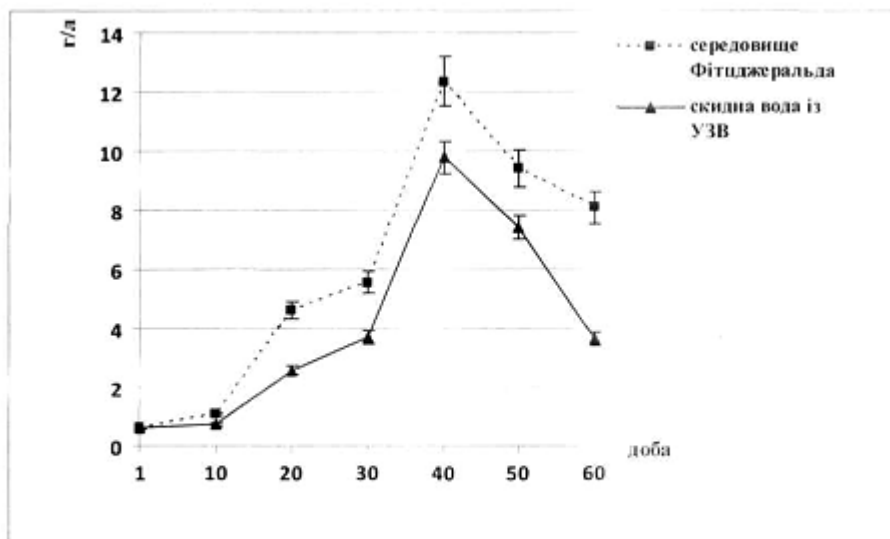


Fig. 1

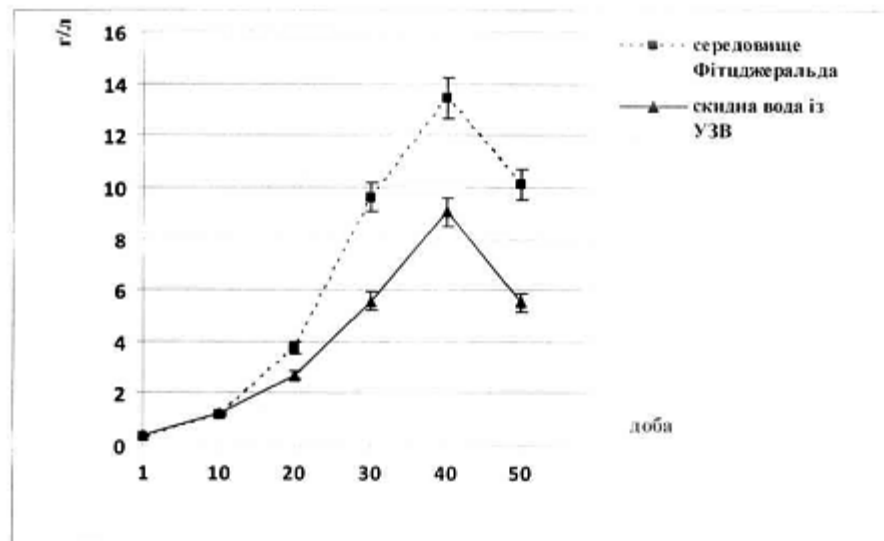


Fig. 2

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601