

Monika MAKOWSKA

Instytut Technologii Eksploatacji - PIB
ul. K. Pułaskiego 6/10, 26-600 Radom
e-mail: monika.makowska@itee.radom.pl

Hodowla alg *Chlorella sp.* w bioreaktorze zbiornikowym z mieszaniem mechanicznym

Cultivation of Green Algae *Chlorella sp.* in a Stirred Tank Bioreactor

Algae, as a renewable raw materials, are valuable sources of biomass for many branches of industry. In the area of environmental protection they are used among others for biological treatment of water, removal and recovery of heavy metals from industrial wastewater, production of bio-fertilizers and fodder additives. Due to their rapid growth, they are able to efficiently use less fertile areas more than energetic plants (e.g. rapeseed, soya). To properly grow, under *in vitro* conditions, algae need access to water, nutrients (i.a. nitrogen and phosphorus) and carbon dioxide as well as appropriate temperature, pH, mixing and lighting. In our climate conditions, algal cultivation in natural water reservoirs is ineffective, due to daily and annual temperature and sunlight changes. An efficient alternative is the use of bioreactors that limit or eliminate the possibility of bacterial infection in algae culture.

The aim of the study was to investigate the biomass yield of algae *Chlorella sp.*, cultivated in BG-11 synthetic medium, inside the tank bioreactor, under the artificial lighting and aeration conditions. The periodic culture was conducted at 25°C with mechanical stirring (150 rpm). Compressed air was supplied to the suspension (in alternating cycles: 5 successive aeration days, 2 days without aeration). The process of algal cell multiplication was supported by the light exposure for 16 hours per day (8 h - dark phase). The source of light was LED lamp (30 W), suitable for stimulating the growth of chlorophyll concentration (blue light 420-480 nm, red light - 630-690 nm), located in the length of 10 cm from the culture vessel. Separation process of the dried biomass from culture medium was consisted in: sedimentation, centrifugation (8000 rpm, 10 min), freezing with liquid nitrogen and lyophilisation (-80°C, <10 Pa).

The algal growth was assessed on the basis of the changes in optical density (absorption of visible light at 686 nm) and the concentrations of biogenic compounds. The culture was carried out until the phosphorus, which was a limiting factor for algal growth in suspended form, was exhausted. Within 46 days, the algae absorbed ~12% of nitrogen by weight from the culture medium, and the final ammonium nitrogen concentration was ~0.2 mg/dm³. The efficiency of biomass production was ~3190 mg/dm³ (~63 g/dm³ per day), while optical density ~2.13. Based on the results, it was found that high efficiency of biomass production was influenced by light with a well-chosen wavelength spectrum, forced air circulation, limited evaporation of water from the vessel and sterile conditions during initiation of the culture. Further studies are needed to involve determining the concentration of different forms of nitrogen (nitrates, nitrites, ammonium nitrogen) in the culture medium and investigating the impact of process conditions on enhanced assimilation of biogenic compounds by algae, at following stages of their growth. A profound knowledge on these relationships and estimated costs will allow to continue experiments on increasing the productivity of algae biomass, which will be commonly recognized as economically reasonable.

Keywords: algae *Chlorella sp.*, algae biomass, biogenic compounds, optical density, stirred tank bioreactor

Wprowadzenie

Algi są grupą organizmów plechowych, które żyją w środowiskach wodnych lub miejscach wilgotnych, zarówno słonych, jak i słodkich. Jako organizmy autotroficzne pełnią funkcję pierwotnego producenta materii organicznej. Dzięki ich szybkiemu wzrostowi możliwe jest bardzo efektywne wykorzystanie mało żyznych terenów upraw. Jest ono wielokrotnie większe niż w przypadku roślin energetycznych, takich jak rzepak czy soja [1]. Algi (m.in. *Chlorella sp.* z gromady zielenic) charakteryzują się szybkim tempem wzrostu, wysoką wydajnością fotosyntetyczną oraz zdolnością do akumulacji dużych ilości lipidów [2]. Dzięki temu stanowią cenne źródło biomasy, wykorzystywanej jako odnawialny surowiec w wielu gałęziach przemysłu [3, 4]. Mogą one także asymilować dwutlenek węgla z zanieczyszczonego spalinami powietrza oraz pełnić rolę „bionawozów” (poprzez wiązanie azotu atmosferycznego) lub dodatków do pasz [5]. Ponadto, możliwość przyswajania związków fosforu i azotu, pochodzących ze ścieków komunalnych i przemysłowych, czyni algi przydatnymi do bioremediacji środowiska wodnego [6-8]. Algi przyczyniają się tym samym do ochrony otwartych zbiorników przed procesem eutrofizacji. Ich naturalne właściwości biosorpcyjne można również wykorzystać do usuwania jonów metali toksycznych ze ścieków oraz odzysku metali, ważnych ze względów ekonomicznych [9].

Proekologiczne technologie, w których wykorzystuje się hodowle alg, stają się coraz bardziej popularne, zarówno na świecie, jak i w kraju [10]. Największymi producentami biomasy z alg *Chlorella* są Niemcy, Japonia i Tajwan. Roczna produkcja biomasy w tych krajach w 2010 roku wynosiła 2000 ton o wartości około 36 USD/kg [11]. O innowacyjności i wysokim potencjale rozwojowym tego kierunku w Polsce świadczy jego obecność wśród Krajowych Inteligentnych Specjalizacji (m.in. KIS.6: I.2. *Biomasa i odpady jako medium do produkcji nowych narzędzi dla potrzeb biotechnologii, w tym hodowle makro- i mikroalg, bakterii, grzybów i innych organizmów*).

Do prawidłowego rozwoju alg potrzebują dostępu wody, składników odżywczych (m.in. azotu i fosforu) i dwutlenku węgla, a także zapewnienia odpowiednich warunków hodowli, takich jak: temperatura, odczyn, pH, mieszanie i naświetlanie [4, 12, 13]. Dzięki względnie dużej „plastyczności” ich metabolizmu istnieje możliwość sterowania składem biomasy alg poprzez odpowiednie dostosowanie warunków hodowli do zaplanowanych rezultatów końcowych. Otwiera to nowe, perspektywiczne kierunki wytwarzania przyjaznych środowisku produktów użytkowych na bazie metabolitów wtórnych alg, np. triacylogliceroli [14].

Lipidy alg są obiecującym surowcem energetycznym, m.in. do otrzymywania biopaliw, zwłaszcza że wykorzystywanie do tego celu jadalnych roślin oleistych budzi obawy związane z bezpieczeństwem żywności [15]. Produkcja tych lipidów na skalę przemysłową jest obecnie limitowana wysokimi kosztami. Opracowywane są jednak różne strategie, które mają na celu zwiększenie produktywności lipidów w komórkach alg. Polegają one przede wszystkim na stworzeniu specyficznych warunków hodowli, takich jak ograniczenie składników pokarmowych, zmiany

temperatury, zasolenie, suplementacja hormonami roślinnymi oraz różnicowanie natężenia światła [16-18]. W warunkach stresu, wywołanych najczęściej niedoborem azotu w podłożu hodowlanym, metabolizm alg ulega zmianie i „przestawia się” na biosyntezę i gromadzenie triacylogliceroli. Drastyczne ograniczenie stężenia azotu, który jest składnikiem m.in. białek i chlorofilu, zmniejsza jednak wydajność produkcji biomasy. Zmiany w morfologii i wzroście komórek, a także w składzie biochemicznym i wydajności fotosyntetycznej alg w warunkach niedoboru azotu nie są jednak jeszcze wystarczająco zbadane. Dlatego też odpowiedni dobór parametrów hodowli powinien być kompromisem pomiędzy wysoką produktywnością lipidów a efektywnością przyrostu biomasy [18, 19].

W naszych warunkach klimatycznych hodowla alg w otwartych zbiornikach wodnych jest nieefektywna, m.in. ze względu na charakter dobowych i rocznych zmian temperatury oraz nasłonecznienia [20]. Jedynym sposobem zapewnienia korzystnych warunków jest w takiej sytuacji zastosowanie sztucznych bioreaktorów [20, 21]. Zaletą takiego rozwiązania, poza stabilizacją kluczowych parametrów, jest także możliwość wykorzystania nieużytków rolnych do rozmieszczenia takich zbiorników. Dzięki temu hodowle nie kolidują z uprawami roślin jadalnych. Dodatkową korzyścią, wynikającą ze stosowania bioreaktorów, jest co najmniej częściowe wyeliminowanie możliwości zakażeń bakteriami, m.in. sinicami, do których często dochodzi w warunkach naturalnych [22]. Te dwie grupy organizmów (np. algi *Chlorella vulgaris* i bakterie *Rhizobium sp.*) mogą także w określonych warunkach wzajemnie stymulować swój rozwój [23, 24]. Obecność bakterii w środowisku alg jest jednak niepożądana, ponieważ mają one zazwyczaj negatywny wpływ na rozwój tych organizmów. Najczęściej konkurują z nimi o dostęp do substancji odżywczych, wydzielają algicydy, degradują polisacharydy i powodują rozkład komórek [22].

Celem pracy było zbadanie wydajności produkcji biomasy alg *Chlorella sp.* na podstawie zmian gęstości optycznej medium hodowlanego oraz stężenia związków biogennych podczas hodowli *in vitro*, prowadzonej w bioreaktorze zbiornikowym z mieszaniem mechanicznym.

1. Obiekty i metody badań

Inokulum alg *Chlorella sp.* pochodziło z Kolekcji Kultur Glonów Bałtyckich (Uniwersytet Gdański, Instytut Oceanografii w Gdyni). Podłoże hodowlane stanowił roztwór wodny pożywki syntetycznej BG-11 *Medium for Blue Green Algae* [25], bogatej w łatwo przyswajalne przez algi związki azotu i fosforu oraz inne niezbędne do ich wzrostu makro- i mikroelementy (m.in. węgiel, tlen, wodór, siarka, wapń, sód, magnez, żelazo). Początkowe stężenie biomasy alg w medium hodowlanym wynosiło 236 mg/dm³.

Hodowlę alg prowadzono przez 46 dni w bioreaktorze zbiornikowym *New Brunswick BioFlo 310* (rys. 1), wyposażonym w naczynie hodowlane ze szkła borokrzemowego o objętości czynnej 5 dm³ (całkowita objętość naczynia wynosiła 7 dm³). Przed rozpoczęciem eksperymentu naczynie poddano sterylizacji w auto-

klawie w celu uniknięcia zakażenia hodowli bakteriami, mogącymi produkować toksyny niebezpieczne dla wzrostu alg. Do roztworu doprowadzano sprężone powietrze (w naprzemiennych cyklach: 5 kolejnych dni napowietrzania, 2 dni bez napowietrzania) z wykorzystaniem bełkotki (filtr 0,2 μm). Pomiar odczynu, pH odbywał się w sposób automatyczny.

Eksperyment prowadzono w temperaturze $25\pm 0,1^\circ\text{C}$ w systemie pracy okresowej. Stosowano mieszanie mechaniczne za pomocą turbiny Rushtona (150 rpm). Obecne na ścianach naczynia przegrody zapobiegały tworzeniu się wirów. Odpowiednia cyrkulacja medium hodowlanego zmniejszała ryzyko fotoinhibicji oraz ułatwiała: utrzymywanie komórek alg w zawieszynie i ich przepływ do najlepiej naświetlonych obszarów, transport CO_2 i usuwanie z bioreaktora tlenu powstałego w wyniku fotosyntezy, a także dystrybucję składników pokarmowych i ciepła.



Rys. 1. Stanowisko do hodowli alg - bioreaktor zbiornikowy *New Brunswick BioFlo 310*

Fig. 1. Stand for the algae cultivation - tank bioreactor *New Brunswick BioFlo 310*

W związku z tym, że bioreaktor nie był standardowo wyposażony w moduł naświetlania, wykorzystano do tego celu zewnętrzne źródło światła sztucznego, umieszczone w odległości ok. 10 cm od naczynia hodowlanego. Była to lampa LED (*Neonica Growy LED 118*) o mocy 30 W, przeznaczona do efektywnej uprawy roślin. Zastosowanie odpowiednio dobranej długości fal (ok. 420÷480 nm oraz ok. 630÷690 nm) odpowiadało zapotrzebowaniu na chlorofil a i b. Proces namnażania alg prowadzono w warunkach periodycznego naświetlania, naprzemiennie: 16 h - faza światła i 8 h - faza ciemności.

Przyswajalność związków biogennych przez komórki alg oceniano na podstawie zmian stężenia azotu i fosforu w podłożu hodowlanym. W tym celu, w odstępach kilkudniowych, pobierano z reaktora próbki i poddawano je filtracji za pomocą

sączka bibułowego (0,17 mm, 75 g/mm²) do uzyskania klarownych, bezbarwnych roztworów. Następnie badano całkowite stężenie azotu w podłożu hodowlanym metodą Koroleffa z 2,6-dimetylofenolem (wg EN-ISO 11905-1), stężenie azotu amonowego metodą indofenolową (wg ISO 7150-1) oraz stężenie fosforu metodą molibdenianową (wg EN ISO 6878-1). Do tego celu zastosowano gotowe zestawy odpowiednich odczynników chemicznych, przeznaczonych do pomiaru ww. parametrów, tzw. testy kuwetowe LCK firmy *Hach Lange* (LCK 338, LCK 304, LCK 348). Detekcję fotometryczną prowadzono z wykorzystaniem spektrofotometru UV-Vis *Hach Lange DR 6000* (dokładność ± 1 nm, rozdzielczość $\pm 0,1$ nm) przy długościach fali określonych dla każdego z tych oznaczeń. Spektrofotometr wyposażony był w moduł RFID do identyfikacji testów kuwetowych LCK. Aparat automatycznie dokonywał 10 pomiarów dla każdej próbki i podawał wartość uśrednioną po uprzednim odrzuceniu wyników skrajnych.

Efektywność przyrostu biomasy alg w trakcie hodowli oceniano na podstawie gęstości optycznej (OD - ang. *optical density*), określanej metodą pomiaru absorpcji promieniowania przez próbkę medium hodowlanego w zakresie światła widzialnego [26]. Położenie maksimum absorpcji w paśmie charakterystycznym dla chlorofilu a (660÷705 nm) zależy od gatunku alg, a w badaniach *in vivo* jest ono zwykle przesunięte w kierunku dłuższych fal [27]. Ponadto, w tej samej komórce mogą występować formy chlorofilu a o różnych maksimach absorpcji. Dlatego też wartość tę wyznaczono eksperymentalnie dla badanej zawiesiny organizmów na podstawie zarejestrowanego widma przeglądowego UV-Vis i wynosiła ona 686 nm. Z literatury [28] znane są m.in. badania przyrostu biomasy *Chlorella vulgaris* w fotobioreaktorze kolumnowym, w których stosowano tę samą długość fali. W tego typu badaniach bazuje się na liniowej zależności pomiędzy gęstością optyczną a liczbą komórek alg (oraz ich suchą masą) [28, 29]. Jako „ślepią próbę” stosowano wodę destylowaną. Próbki do badań, o objętości 2,5 cm³, pobierano z bioreaktora bezpośrednio przed pomiarem i umieszczano w jednorazowych kuwetach o długości drogi optycznej 10 mm (okienko 10 x 35 mm). Jako wynik końcowy podawano średnią arytmetyczną z trzech pomiarów.

Suchą masę alg w podłożu oznaczano metodą wagową przed rozpoczęciem i po zakończeniu hodowli. Próbki o objętości 5 cm³ umieszczano na jednorazowych szalkach aluminiowych w wagosuszarce *Radwag MAC 50/1*. Stosowano standardowy profil suszenia w temperaturze 105°C. Zakończenie procesu suszenia następowało automatycznie, w przypadku braku zmiany masy o 0,001 g w ciągu 60 s.

Separacja komórek alg z podłoża hodowlanego obejmowała sedymentację i wirowanie (8000 rpm, 10 min). W kolejnym etapie przeprowadzono suszenie sublimacyjne zamrożonej ciekłym azotem biomasy z wykorzystaniem liofilizatora *Lobconco FreeZone 2.5 plus* w temperaturze -80°C pod obniżonym ciśnieniem (< 10 Pa).

2. Wyniki badań

W tabeli 1 przedstawiono charakterystykę podłoża hodowlanego, na bazie wodnego roztworu pożywki syntetycznej BG-11, przed zainicjowaniem hodowli.

Pierwszą próbkę do badań pobrano po upływie 1 h od wprowadzenia inokulum zaszczipiającego (*Chlorella sp.*) do roztworu pożywki. W tym czasie zawartość bioreaktora była mieszana z prędkością 150 rpm w temperaturze 25°C. Wyniki badania tej próbki zostały umieszczone na wykresach w dalszej części pracy jako pierwszy pomiar odpowiadający czasowi: 0 [dni].

Tabela 1. Podstawowe właściwości podłoża hodowlanego przed zainicjowaniem hodowli alg

Table 1. Basic properties of the culture medium before initiation of algae culture

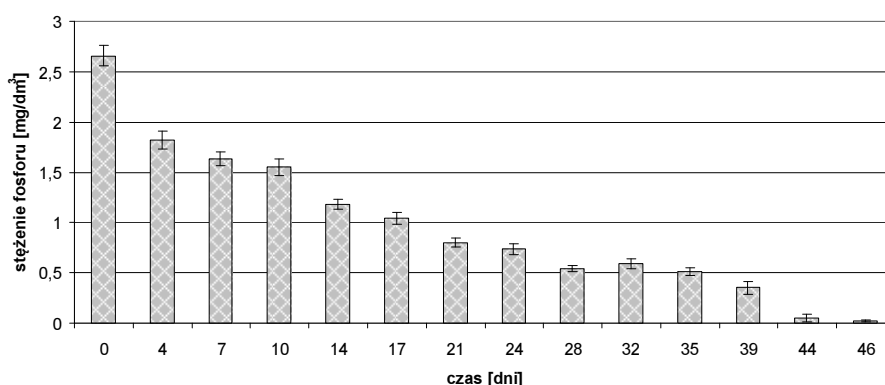
Lp.	Badana właściwość	Wartość
1	Całkowite stężenie fosforu	2,70 mg/dm ³
2	Całkowite stężenie azotu	274 mg/dm ³
3	Stężenie azotu amonowego	0,368 mg/dm ³
4	Gęstość optyczna, 686 nm	0,002
5	Odczyn	zasadowy
6	pH	7,2

Na rysunku 2 przedstawiono wyniki badania stężenia fosforu całkowitego w podłożu hodowlanym, które prowadzono w czasie trwania eksperymentu. Początkowe stężenie fosforu wynosiło 2,66 mg/dm³. W ciągu pierwszych 4 dni hodowli odnotowano maksymalny spadek wartości tego parametru (do 1,82 mg/dm³). Tak znaczący ubytek może być wynikiem tworzenia kompleksów fosforu z jonami żelaza obecnymi w podłożu hodowlanym, co powoduje, że nie jest on w pełni dostępny dla mikroorganizmów [30]. Można to także tłumaczyć, charakterystycznym dla alg, tzw. nadmiarowym przyswojeniem fosforu, będącego budulcem fosfolipidów. Algi absorbują ten pierwiastek w nadmiarze i magazynują w komórkach, aby móc go wykorzystać, gdy poziom fosforu w środowisku stanie się niewystarczający w stosunku do ich zapotrzebowania [22]. W ciągu pierwszych 14 dni stężenie tego pierwiastka w podłożu spadło o ok. 56%, a w ciągu kolejnych 14 dni o 24% (w odniesieniu do wartości wyjściowej) pomimo wzrostu populacji alg. Przeprowadzone w takim zakresie badania nie dostarczają jednak danych, na podstawie których można by dokonać oceny wpływu zmian stężenia fosforu w medium hodowlanym na syntezę lipidów przez komórki alg. Z doniesień literaturowych [31] wynika, że deficyt fosforu w podłożu (tzw. szok fosforowy) korzystnie wpływa na wydajność produkcji oleju z biomasy alg.

W ciągu pierwszych 14 dni hodowli całkowite stężenie azotu uległo natomiast nieznacznym zmianom i utrzymywało się na poziomie 270 mg/dm³, co przedstawiono na rysunku 3. W końcowej fazie eksperymentu (w ostatnim tygodniu) spadło poniżej 240 mg/dm³.

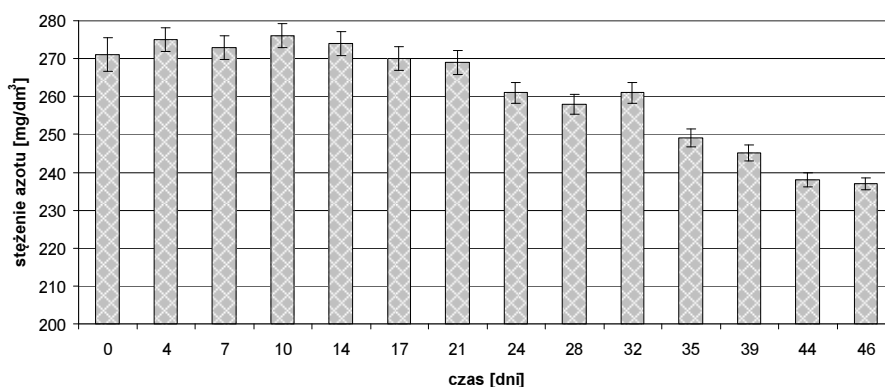
W ciągu 46 dni trwania eksperymentu algi przyswoiły ok. 34 mg azotu (rys. 3) oraz ponad 2,6 mg fosforu (rys. 2). Od momentu zainicjowania hodowli do jej zakończenia nastąpił ok. 99% spadek całkowitego stężenia fosforu (z 2,66 do 0,02 mg/dm³) oraz ok. 12% spadek stężenia azotu (z 271 do 237 mg/dm³).

We wcześniej przeprowadzonych badaniach tego samego gatunku alg, hodowanego w reaktorze zbiornikowym o objętości czynnej 2 dm³, w analogicznym medium, ale bez dodatkowego doprowadzenia powietrza, ok. 99% spadek stężenia fosforu całkowitego odnotowano już po upływie 13 dni hodowli [26]. W obydwu eksperymentach stężenie azotu kształtowało się na zbliżonym poziomie. Składnikiem limitującym wzrost alg był fosfor, po wyczerpaniu którego następuje zahamowanie przyswajania azotu przez komórki i stopniowe ich zamieranie [32].



Rys. 2. Całkowite stężenie fosforu w podłożu hodowlanym

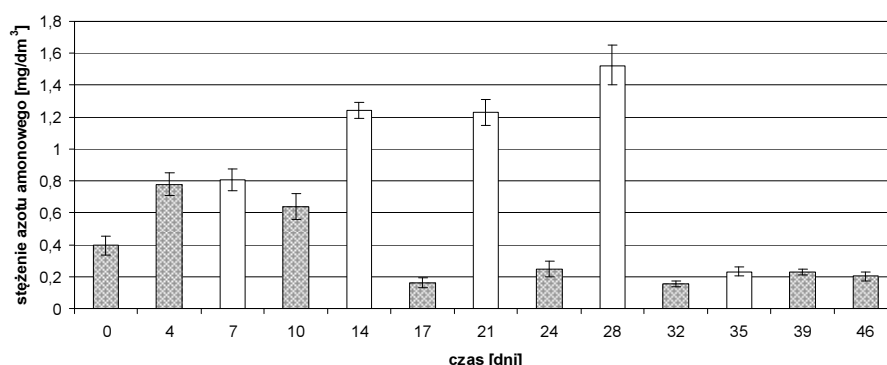
Fig. 2. Total phosphorus concentration in culture medium



Rys. 3. Całkowite stężenie azotu w podłożu hodowlanym

Fig. 3. Total nitrogen concentration in the culture medium

Brak wyraźnych zmian w stężeniu azotu całkowitego nie w pełni odzwierciedla stopień jego przyswojenia przez algi. Związki azotu obecne w podłożu hodowlanym mogą bowiem pochodzić zarówno z pożywki syntetycznej, jak i z rozkładu materii organicznej. W miarę upływu czasu trwania eksperymentu proporcje pomiędzy różnymi formami azotu (azot organiczny, amonowy, azotanowy i azotynowy) ulegają zmianie, na co wpływa wiele czynników, m.in. odczyn, pH. Świadczą o tym także różnice stężeń azotu amonowego (rys. 4).



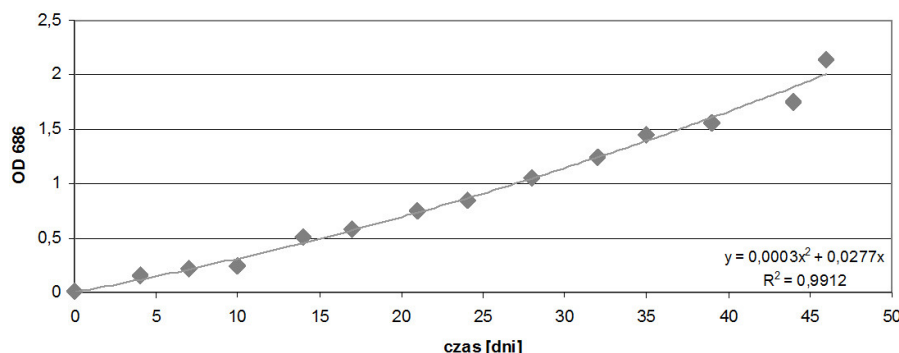
Rys. 4. Stężenie azotu amonowego w podłożu hodowlanym (słupki ciemne - badania w warunkach napowietrzania, słupki białe - badania po ok. 48 h braku napowietrzania)

Fig. 4. Concentration of ammonium nitrogen in the culture medium (dark bars - tests under aeration conditions, white bars - tests after about 48 h without aeration)

Stężenie azotu amonowego po zainicjowaniu hodowli wynosiło $0,396 \text{ mg/dm}^3$, co stanowiło ok. 0,15% całkowitego stężenia azotu. Wartość ta w ciągu pierwszych czterech dni wzrosła niemal dwukrotnie (do $0,778 \text{ mg/dm}^3$) i była to maksymalna wartość odnotowana podczas prowadzenia eksperymentu w warunkach napowietrzania. W tym przypadku wzrost stężenia jonów NH_4^+ był najprawdopodobniej związany z naturalnymi procesami rozwoju materii roślinnej w środowisku zasadowym, w którym wartość pH nie przekraczała 9. Z energetycznego punktu widzenia najbardziej korzystne odżywianie alg polega na bezpośrednim wykorzystaniu formy amonowej azotu (asymilacja amoniaku wiąże się z większym przyrostem biomasy niż w przypadku asymilacji azotanów). Wynika to z wewnątrzkomórkowego rozkładu wszystkich form azotu i/lub redukcji (azotany, azotyny), a następnie przekształcenia do postaci amonowej, w której azot jest wykorzystywany przez komórki alg do wytwarzania aminokwasów i białek [22].

Wyniki zarejestrowane po ok. 48 h po odcięciu napowietrzania (rys. 4 - białe słupki) wskazują na okresowy wzrost stężenia azotu amonowego (wartość maksymalna w tych warunkach wynosiła $1,52 \text{ mg/dm}^3$), któremu towarzyszył wzrost wartości pH do ok. 10 (w dniach 14, 21, 28 i 35). Niezależnie od tego przywrócenie dopływu powietrza do reaktora skutkowało stopniowym spadkiem wartości tego wskaźnika aż do poziomu $0,202 \text{ mg/dm}^3$ (pomiar przeprowadzony w 46 dniu hodowli) oraz spadkiem wartości pH do poziomu $8,5 \div 9$.

Przedstawione powyżej dane mogłyby wskazywać na przeciętną efektywność przyrostu alg, hodowanych w bioreaktorze zbiornikowym z mieszadłem mechanicznym. Jednak wyniki prowadzonego badania zmian gęstości optycznej OD_{686} w czasie świadczą o wysokiej produktywności ich biomasy (rys. 5) i są poparte pomiarami prowadzonymi metodą wagową. Końcowa wartość tego wskaźnika osiągnęła poziom 2,13, co odpowiadało stężeniu biomasy alg w podłożu 3190 mg/dm^3 (0,26% m/m). W wyniku przeprowadzonej hodowli uzyskano ponad 10 g zliofilizowanej biomasy (rys. 6).



Rys. 5. Zmiany gęstości optycznej zawiesiny alg

Fig. 5. Changes in the optical density of the algal suspension



Rys. 6. Zliofilizowana biomasa alg *Chlorella sp.*

Fig. 6. Freeze-dried *Chlorella sp.* biomass

Odniesienie uzyskanych wyników do danych publikowanych przez liczne ośrodki naukowe, zajmujące się tą problematyką, jest utrudnione ze względu na ilość czynników, mogących wpływać na końcową wydajność produkcji biomasy, przede wszystkim gatunek alg, rodzaj zastosowanego reaktora i podłoża oraz czas i sposób prowadzenia hodowli. Przykładowo, w pracy [33] zbadano wpływ rodzaju podłoża, w tym ścieków przemysłowych, na wydajność produkcji biomasy alg *Chlorella sp./Scenedemus sp.* w fotobioreaktorze rurowym. W przypadku standardowej pożywki syntetycznej uzyskano 3521,2 mg s.m./dm³ w ciągu 20 dni. W innej pracy [20] zestawiono wydajności wytwarzania biomasy mikroalg *Scenedesmus obliquus* w zależności od rodzaju użytego fotobioreaktora (porównano wyniki w zakresie od 0,72 do 4,40 g/dm³). W układzie typu *air-lift driven* wydajność osiągnęła wartość 4,4 g/dm³ w ciągu ok. 52 dni [20].

Średni dobowy przyrost biomasy alg w przeprowadzonym eksperymencie wynosił ok. 63 mg/dm³. Uzyskana wydajność mieściła się w zakresie charakterystycz-

nym dla wysoko wydajnej hodowli tego gatunku, czyli 20÷200 mg/dm³/d [34]. Dla porównania, w przytoczonych wcześniej badaniach *Chlorella sp.* [26] gęstość optyczna była ponad 5-krotnie niższa i w analogicznym czasie trwania eksperymentu nie przekroczyła wartości 0,4.

Uzyskanie wysokiej wydajności produkcji biomasy alg *Chlorella sp.* w warunkach laboratoryjnych było możliwe dzięki naświetlaniu światłem o specyficznej długości fali (charakterystycznej dla obu form chlorofilu, występujących w komórkach *Chlorella sp.*) oraz zintensyfikowaniu wymiany masy w badanym układzie hodowlanym. Zapewniono także sterylne warunki namnażania i wzrostu komórek alg, szczególnie na etapie ich adaptacji do warunków środowiska hodowlanego, okresowe napowietrzenie, odpowiednią temperaturę i mieszanie mechaniczne oraz ograniczono możliwość zmiany składu podłoża, związanego z odparowaniem wody.

Podsumowanie

Przeprowadzone badania spektrofotometryczne umożliwiły ocenę efektywności przyrostu biomasy alg *Chlorella sp.* w warunkach laboratoryjnych na podstawie pomiaru gęstości optycznej OD₆₈₆ oraz zmian całkowitego stężenia azotu i fosforu w podłożu hodowlanym. W ciągu 46 dni trwania eksperymentu algi przyswoiły ok. 34 g azotu (12% wag.), obecnego w medium, oraz 2,6 mg fosforu (ponad 99% wag.). Końcowe stężenie azotu amonowego wynosiło ok. 0,2 mg/dm³. Uzyskano przy tym wysoką wydajność produkcji biomasy na poziomie 3190 mg/dm³ przy średnim dobowym przyroście ponad 60 mg/dm³. Dalsze badania będą rozwijane w kierunku określenia stężenia różnych form azotu (azotany, azotyny) na poszczególnych etapach rozwoju hodowli alg oraz wpływu zmiennych warunków procesu na zintensyfikowanie przyswajania przez nie związków biogenych. Ponadto, konieczne jest zbadanie korelacji pomiędzy stężeniem komórek alg w medium hodowlanym a jej gęstością optyczną. Poznanie tych zależności oraz oszacowanie kosztów umożliwi kontynuację prac nad uzasadnionym ekonomicznie zwiększeniem produktywności biomasy alg.

Literatura

- [1] Schlarb-Ridley B., Parker B., A UK road map of algal technologies, NERC-TSB Algal Bioenergy-SIG 2013.
- [2] Young G. et al., Lipid extraction from biomass using co-solvent mixtures of ionic liquids and polar covalent molecules, *Sep. Purif. Technol.* 2015, 72, 118-121.
- [3] Schroeder G. i in., Biomasa alg słodkowodnych surowcem dla przemysłu i rolnictwa, *Przem. Chem.* 2013, 92, 7, 1380.
- [4] Bharathiraja B. et al., Aquatic biomass (algae) as a future feed stock for bio-refineries: A review on cultivation, processing and products, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2015, 47, 634-653.
- [5] Chojnacka K., Innowacyjna technologia ekstraktów glonowych, *Przem. Chem.* 2014, 93(4), 590-592.

- [6] Lu Q. et al., Growing *Chlorella sp.* on meat wastewater for nutrient removal and biomass production, *Biores. Technol.* 2015, 198, 189-197.
- [7] Kumar A. et al., Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions, *Trends Biotechnol.* 2010, 28, 371-380.
- [8] Lu Q. et al., Mitigating ammonia nitrogen deficiency in dairy wastewater for algae cultivation, *Biores. Technol.* 2016, 201, 33-40.
- [9] Urbańska M., Kłosowski G., Algi jako materiał biosorpcyjny - usuwanie i odzysk metali ciężkich ze ścieków przemysłowych, *Ochr. Środ. Zas. Nat.* 2012, 1(51), 62-77.
- [10] Piasecka A., Krzemińska I., Tys J., Physical methods of microalgal biomass pretreatment, *Int. Agrophys.* 2014, 28, 341-348.
- [11] Kim D.Y. et al., Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*, *Biores. Technol.* 2016, 199, 300-310.
- [12] Kozieł W., Włodarczyk T., Glony - produkcja biomasy, *Acta Agroph.* 2011, 17, 1, 105-116.
- [13] Makowska M., Dziosa K., Wytwarzanie biomasy mikroalg w warunkach laboratoryjnych, *Przem. Chem.* 2015, 94, 6, 982-985.
- [14] Řezanka T. et al., Production of structured triacylglycerols from microalgae, *Phytochemistry* 2014, 104, 95-104.
- [15] Arumugam M. et al., Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*, *Biores. Technol.* 2013, 131, 246-249.
- [16] Babu A., Wu X., Kabra A.N., Kim D.P., Cultivation of an indigenous *Chlorella sorokiniana* with phytohormones for biomass and lipid production under N-limitations, *Algal Res.* 2017, 23, 178-185.
- [17] Singh P. et al., Trends and novel strategies for enhancing lipid accumulation and quality in microalgae, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2016, 55, 1-16.
- [18] Li T. et al., Morphology, growth, biochemical composition and photosynthetic performance of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) under low and high nitrogen supplies, *Algal Res.* 2016, 16, 481-491.
- [19] Adams C. et al., Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae, *Biores. Technol.* 2013, 131, 188-194.
- [20] Wiczowski J., Pilarek M., Zamojska-Jaroszewicz A., Szewczyk K.W., Hodowla mikroalg w fotobioreaktorze typu *air-lift driven*, *Inż. Aparat. Chem.* 2012, 51(4), 192-194.
- [21] Lewicki A., Dach J., Janczak D., Czekala W., The experimental macro photoreactor for microalgae production, *Proc. Technol.* 2013, 8, 622-627.
- [22] Kwietniewska E., Tys J., Krzemińska I., Kozieł W., Microalgae - cultivation and application of biomass as a source of energy: A review, *Acta Agrophysica Monographiae, Instytut Agrofizyki PAN* 2012, 2.
- [23] Daniłowicz A. i in., Podczyszczanie wód osadowych pochodzących z odwadniania przefermentowanych osadów ściekowych w fotobioreaktorach glonowych, *Arch. Waste Manage. Environ. Protect.* 2016, 18(2), 45-54.
- [24] Ramanan R. et al., Algae - bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications, *Biotech. Adv.* 2016, 34, 14-29.
- [25] Belotti G. et al., Effect of *Chlorella vulgaris* growing conditions on bio-oil production via fast pyrolysis, *Biomass Bioenerg.* 2014, 61, 187-195.
- [26] Dziosa K., Makowska M.: Monitoring of *Chlorella sp.* growth based on the optical density measurement, *Probl. Eksp.* 2016, 2, 197-206.
- [27] Gumiński S., *Fizjologia glonów i sinic*, Wyd. Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 1990.
- [28] Scarsella M. et al., Study on the optimal growing conditions of *Chlorella vulgaris* in bubble column photobioreactors, *Chem. Eng. Trans.* 2010, 20, 85-90.

- [29] Rodrigues L. et al., Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*, J. Environ. Chem. Ecotoxicol. 2011, 3(8), 225-228.
- [30] Frąc M., Jezierska-Tys S., Tys J., Algi - energia jutra (biomasa, biodiesel), Acta Agroph. 2009, 13(3), 627-638.
- [31] Rokicka M. i in., Efekt zmiennej koncentracji fosforu na efektywność syntezy lipidów mikroglonów *Chlorella vulgaris*, Inż. Ekol. 2017, 18(2), 123-129.
- [32] Kozieł W., Włodarczyk T., Glony - produkcja biomasy, Acta Agrophys. 2011, 17(1), 105-116.
- [33] Dębowski M., Zieliński M., Rokicka M., Produkcja biomasy mikroglonów na bazie ścieków pochodzących z przemysłu mleczarskiego, Inż. Ekol. 2016, 47, 54-59.
- [34] Mata T.M. et al., Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, Renew. Sust. Energ. Rev. 2010, 14, 217-232.

Institute for Sustainable Technologies - National Research Institute
ul. K. Pułaskiego 6/10, 26-600 Radom
e-mail: monika.makowska@itee.radom.pl

Streszczenie

Zbadano wydajność produkcji biomasy alg *Chlorella sp.*, hodowanej na bazie pożywki syntetycznej BG-11, w zautomatyzowanym bioreaktorze zbiornikowym z mieszadłem mechanicznym w warunkach sztucznego naświetlania i napowietrzania. Kontrola hodowli polegała na spektrofotometrycznym pomiarze gęstości optycznej (OD) oraz badaniu zmian stężenia związków biogenych w podłożu hodowlanym, będących wynikiem zachodzących procesów metabolicznych. Hodowlę prowadzono przez 46 dni do momentu wyczerpania fosforu. Końcowa wydajność produkcji biomasy przekroczyła 3 g/dm³ przy jej średnim dobowym przyroście >60 mg/dm³, a OD₆₈₆ osiągnęła wartość 2,13. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że na wysoką efektywność produkcji biomasy alg kluczowy wpływ miały kontrolowane warunki hodowli, m.in. naświetlanie światłem o specyficznej długości fali (420-480 nm, 630-690 nm), wymuszony obieg powietrza, ograniczenie możliwości odparowania wody z naczynia hodowlanego oraz zapewnienie sterylnych warunków podczas inicjowania hodowli.

Słowa kluczowe: algi *Chlorella sp.*, biomasa alg, związki biogenne, gęstość optyczna, bioreaktor z mieszaniem mechanicznym