

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач випускової кафедри

_____ Барановський М.М

«___» _____ 2020 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА

(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА
ЗА НАПРЯМОМ 6.051401 «БІОТЕХНОЛОГІЯ»

**Тема: «Вплив лазерного опромінення на рівень накопичення фікобіліпротейнів
у культурі *Microcystis pulverea*»**

Виконавець: студентка 603 гр. ФЕБІТ

Вовченко Вікторія Олегівна

Керівник: к.м.н., доцент

Васильченко Ольга Анатоліївна

Консультант з розділу «Охорона праці»:

доцент кафедри безпеки життєдіяльності

Павлиш В. Д.

Консультант з розділу «Охорона навколишнього середовища»:

доцент кафедри екології

Бовсуновський Є.О.

Нормоконтролер

Лазарєв В.Г.

КИЇВ 2020

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Напрям (спеціальність) 6.051401 «Біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

Барановський М.М. _____

«__» _____ 2020р.

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Вовченко Вікторії Олегівни

1. Тема дипломної роботи: «Вплив лазерного опромінення на накопичення фікобіліпротеїнів у культурі *Microcystis pulverea*» затверджена наказом ректора від «__» _____ 2019 р. № ____/ст.

2. Термін виконання роботи: з 14 жовтня по 3 лютого 2020 року.

3. Вихідні дані до роботи: власні експериментальні дані зроблені на базі Національного технічного університету «КПІ ім. І. Сікорського» та кафедри біотехнології НАУ, літературні джерела щодо визначення зміни вмісту фікобіліпротеїнів у ціанобактерій; зразки ціанобактерій з Інституту біохімії.

4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ; РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ; РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.

5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: схема проведення експериментального дослідження.

6. Календарний план–графік

№ пор.	Завдання	Термін виконання
1.	Літературний огляд та збір інформації за темою дипломної роботи	14.10.2019– 27.10.2019
2.	Складання плану досліджень. Підбір та відпрацювання методик дослідження фікобіліпротеїнів ціанобактерій	28.10.2019– 03.11.2019
3.	Підготовка посуду та обладнання для дослідів	04.11.2019– 06.11.2019
4.	Проведення експериментальних досліджень	07.11.2019– 22.12.2019
5.	Аналітична обробка результатів експериментальних досліджень	23.12.2019– 27.12.2019
6.	Підготовка розділу з охорони навколишнього середовища. Підготовка розділу з охорони праці	13.01.2020– 20.01.2020
7.	Формування висновків та оформлення дипломної роботи	27.01.2020– 03.02.2020

7. Консультанти роботи з окремих розділів роботи

Розділ	Консультант	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці	Павлиш В.Д.		
Охорона навколишнього середовища	Бовсуновський Є.О.		

8. Дата видачі завдання: «14» жовтня 2019р.

Керівник дипломної роботи _____ /Васильченко О.А./
(підпис керівника)

Завдання прийняв до виконання _____ /Вовченко В.О./
(підпис випускника)

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Вплив лазерного опромінення на накопичення фікобіліпротеїнів у культурі *Microcystis pulvereae*»: 75 сторінок, 17 рисунків, 1 таблиця, 31 використаних джерел.

Мета роботи – визначити оптимальний час дії лазерного опромінення, за якої накопичення фікобіліпротеїнів у культурі *Microcystis pulvereae* буде максимальним.

Об'єкт дослідження – накопичення фікобіліпротеїнів у культурі *Microcystis pulvereae* під впливом лазерного опромінення.

Предмет дослідження – культура *Microcystis pulvereae*, лазерне опромінення.

Методи дослідження – мікробіологічні, біохімічні, фізико– хімічні та математичні.

ЦІАНОБАКТЕРІЇ, ФІКОБІЛІПРОТЕЇНИ, НАКОПИЧЕННЯ ВМІСТУ,
ЛАЗЕРНЕ ОПРОМІНЕННЯ

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ.....	7
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	10
1.1. Загальна характеристика ціанобактерії та їх поширення.....	10
1.2. Характеристика фікобіліпротеїнів як пігментної складової ціанобактерій.....	16
1.3. Локалізація фікобіліпротеїнів у клітинах ціанобактерій.....	20
1.4. Використання фікобіліпротеїнів.....	22
1.5. Фактори, які впливають на вміст фікобіліпротеїнів у клітинах ціанобактерій.....	23
1.6. Характеристика лазерного опромінення.....	31
1.7. Висновки до розділу.....	36
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	37
2.1. Матеріали досліджень.....	37
2.2. Характеристика та підготовка поживного середовища.....	39
2.3. Методи досліджень.....	40
2.4. Висновки до розділу.....	40
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ.....	41
3.1. Культивування ціанобактерій.....	42
3.2. Вплив на культуру <i>Microcystis pulverea</i> лазерного опромінення.....	43
3.3. Вивільнення пігментів та дослідження на наявність фотоелектроколориметром.....	46
3.4. Вміст фікобіліпротеїнів у біомасі після лазерного опромінення на культуру <i>Microcystis pulverea</i>	47
3.5. Висновки до розділу.....	50

РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ.....	51
4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори у процесі технічної експлуатації дослідницької лабораторії відділу фізіології водоростей.....	51
4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів дослідницької лабораторії відділу фізіології водоростей.....	52
4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки у процесі технічної експлуатації дослідницької лабораторії відділу фізіології водоростей.....	61
РОЗДІЛ 5.ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА.....	63
5.1. Шляхи утилізації біомаси ціанобактерій та отримання палива.....	63
5.2. Енергетичний баланс культивування та виробництва біопалива.....	64
5.3. Висновки до розділу.....	71
ВИСНОВКИ.....	72
СПИСОК БІБЛЮГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	73

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ

ЛО – лазерне опромінення;

С– ФЦ – С– фікоціанін;

С– ФЕ – С– фікоеретрин;

АФЦ – алофікоціанін.

ВСТУП

Актуальність роботи. Ціанобактерії – це найбільша та найважливіша за впливом на біосферу група живих організмів на Землі – 90% живої маси всієї біосфери. Будучи значною складовою частиною океанічного планктону, ціанобактерії стоять на початку більшої частини харчових ланцюгів і виробляють більшу частину кисню. Практичний аспект використання ціанобактерій пов'язаний з тим, що вони можуть слугувати джерелом низки цінних хімічних, біологічно-активних та поживних речовин, пігментів, вітамінів, агароподібних полісахаридів, які використовуються в медицині й харчовій промисловості. Ціанобактерії, завдяки великій різноманітності, лабільності пігментів та їх молекулярній організації в клітинах, часто використовують у якості біологічного об'єкту при вивченні ролі окремих пігментів фотосинтезу.

Характерною особливістю ціанобактерій є те, що крім хлорофілу та каротиноїдів, вони містять водорозчинні фотосинтетичні фікобілінові пігменти (або фікобіліпротеїни) – фікоеритрини, фікоціаніни та алофікоціаніни. Основною функцією цих пігментів є поглинання та передача енергії світла хлорофілу а. Їх смуги поглинання перекривають спектральну область 490–660 нм, в якій інші фотосинтетичні пігменти малоефективні. Деякі автори вважають, що основна роль в уловлюванні енергії світла належить саме фікобіліпротеїнам. Вміст та співвідношення цих пігментів сильно варіює у різних видів ціанобактерій і залежить від зовнішніх чинників середовища.

Фікобіліпротеїни широко використовують у харчовій промисловості. Фікоціаніни і фікоеритрини є найпоширенішими серед природних барвників, які випускаються промисловістю. Роль цих речовин зростає у зв'язку із застосуванням їх у фармакології, а також у медицині. До комплексу фізіологічних ефектів, що викликаються С-фікоціаніном (фікобіліпротеїн ціанобактерій), можна віднести наступні: пригнічення проліферації пухлинних клітин, зниження концентрації фактора некрозу пухлини в тканинах, інгібування окисного стресу в організмі,

запобігання перекисного окиснення ліпідів, пошкодження ДНК, руйнування клітинних мембран і загибелі клітин. Завдяки здатності накопичуватися в атеросклеротичних бляшках і новоутвореннях С–фікоціанін може застосовуватися в медицині для діагностичних цілей.

Збільшення інтенсивності біосинтезу фікобілінових пігментів ціанобактеріями є одним з актуальних завдань сучасної біотехнології. Регулювання біосинтезу пігментів мікродоростей, динаміки росту культури можливо завдяки впливу фізичних факторів.

Мета роботи – визначити оптимальний час дії лазерного опромінення, за якого накопичення фікобіліпротеїнів у культурі *Microcystis pulverea* буде максимальним.

Для досягнення мети були поставлені наступні **завдання**:

- Проаналізувати літературні дані щодо ціанобактерій, що здатні накопичувати фікобіліпротеїни.
- З'ясувати, фактори, які впливають на збільшення кількості фікобіліпротеїнів у клітинах ціанобактерій.
- Дослідити зміну кількості фікобіліпротеїнів при дії лазерного опромінення на культуру *Microcystis pulverea*.

Об'єкт дослідження – накопичення фікобіліпротеїнів у культурі *Microcystis pulverea* під впливом лазерного опромінення.

Предмет дослідження – фікобіліпротеїни культури *Microcystis pulverea*.

Методи дослідження – мікробіологічні, фізико–хімічні, біохімічні, математичні.

Наукова новизна отриманих результатів – встановлено, що вплив лазерного опромінення на збільшення рівня накопичення фікобіліпротеїнів у культурі *Microcystis pulverea* відбувається за експозиції часу 2хв, 3хв, 5хв, 7хв в порівнянні з контролем.

РОЗДІЛ 1

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Загальна характеристика ціанобактерій та їх поширення

Ціанобактерії, або синьо– зелені водорості (лат. *Cyanobacteria*) – обширна група грамнегативних бактерій великих розмірів, відмітною особливістю яких є здатність до фотосинтезу. Застаріла назва синьо– зелені водорості основана на зовнішньому вигляді та екологічній ніші ціанобактерій, проте зараз термін «водорості» зазвичай обмежується еукаріотичними представниками групи. Ціанобактерії – це найбільш складно влаштовані і диференційовані прокариоти. Так як ці організми по своїй фізіології мають багато спільних рис з еукаріотичними водоростями, то згідно з деякими класифікаціями, ціанобактерії розглядаються у складі рослин як синьо– зелені водорості. В даний час в альгології відомо більше 150 родів і близько 1000 видів ціанобактерій, бактеріологи налічують близько 400 штамів [1].

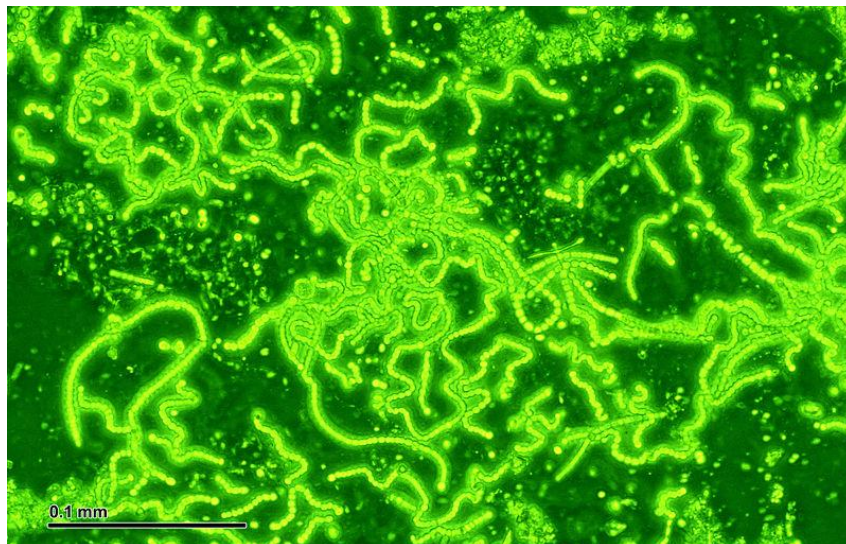


Рис.1.1 Ціанобактерії

Ціанобактерії поширені в морях і прісних водоймах, ґрунтовому покриві, можуть брати участь в симбіозі (лишайники). Вагому частину фітопланктону водойм складають водорості даної групи. Вони здатні утворювати товсті багат шарові покриви на субстраті. Рідкісні види токсичні та умовно–патогенні для людини. Ціанобактерії – основні елементи, що викликають «цвітіння» води, яке призводить до масової загибелі риб, отруєнь тварин та людей. Для деяких видів характерна рідкісна комбінація властивостей: здатність до фотосинтезу і одночасно фіксації азоту з атмосферного повітря.

Ціанобактерії відрізняються різноманітною морфологією. Загальне в структурі будь–якого виду ціанобактерій – це слизова оболонка (глікокалікс із пептидогліканів), що виконує захисну та рухову функції і відсутність джгутиків. Слизову оболонку покриває зовнішня мембрана. Розміри клітин ціанобактерій можуть бути від 1 мкм до 100 мкм. Колір різних видів міняється від салатого до темно–синього у зв'язку зі здатністю змінювати співвідношення фотосинтетичних пігментів в клітці відповідно спектральному складу світла.

Ціанобактерії являють собою одноклітинні та багатоклітинні (нитчасті) організми. Деякі види утворюють колонії – значні скупчення у вигляді кірочок або кущиків висотою до 20 см. Розмножуються поділом (одноклітинні), спорами, фрагментами ниток (нитчасті форми), мають такі самі пігменти, як і водорості, що спричиняють синьо– зелене, рожеве забарвлення. Поширені в найрізноманітніших умовах у воді і на суші. Можуть вступати у симбіотичні відносини з іншими організмами: одноклітинними водоростями, які втратили хлоропласти, найпростішими, грибами, лишайниками, мохоподібними, папоротеподібними тощо. Здатні до фіксації азоту. Тривалість життєвого циклу при сприятливих умовах становить 6–12 годин [2].

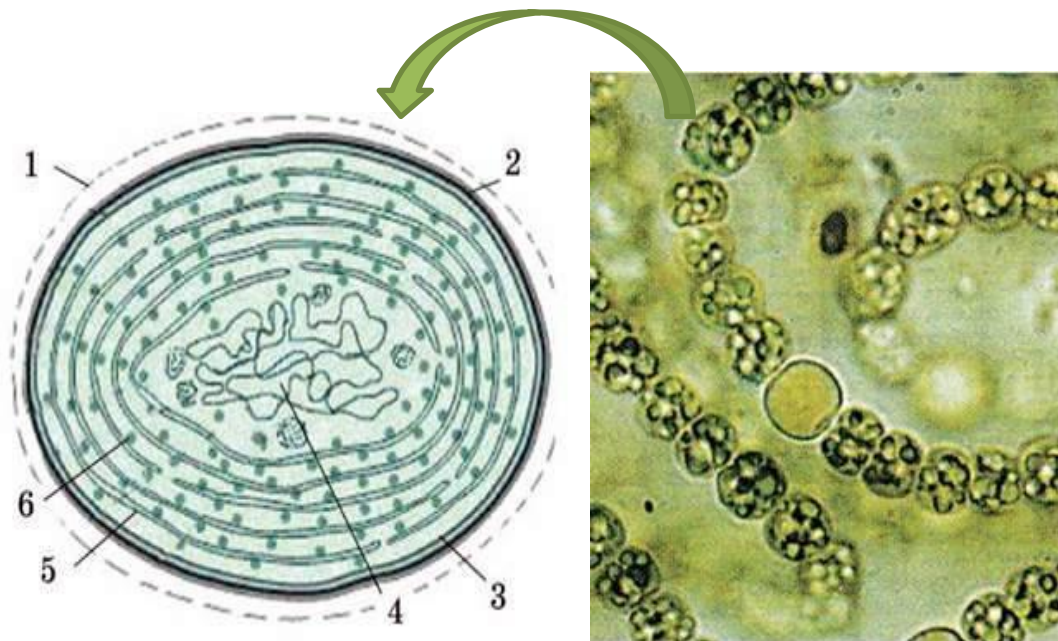


Рис. 1.2 Будова клітини ціанобактерій:

- 1) слизова капсула; 2) клітинна оболонка; 3) клітинна мембрана; 4) ділянка цитоплазми з молекулою ДНК; 5) мембранні отвори з хлорофілом; 6) вклучення

Цитоплазма має два шари: фотосинтезуючий і спадковий. Зовнішній фотосинтезуючий шар містить пігменти, які здійснюють фотосинтез. У центрі клітини розташована спадкова речовина. Ще є вакуоля із запасними речовинами й так звані «газові вакуолі», заповнені азотом (рис. 1.2). Завдяки їм уся маса водоростей спливає на поверхню, ближче до сонячних променів. Забарвлення ціанобактерій визначається зеленими та особливими синіми пігментами. Завдяки такому набору фотосинтезуючих пігментів ціанобактерії заселили навіть глибокі печери, де вдовольняються слабенькими проблесками світла. Фотосинтез у цих організмів, як і в рослин, супроводжується виділенням кисню, тоді як фотосинтезуючі бактерії його не виділяють [3].

Фотосинтетичний апарат представлений здвоєними мембранами (рис. 1.3), їх називають тилакоїдами. Кількість тилакоїдів та характер їх розміщення в клітині різні у різних видів. На поверхні тилакоїдів розміщені фікобілісоми – структури, які уловлюють фотони та передають їх реакційним центрам фотосинтетичного апарату. Клітина містить також поліедральні тіла або карбоксіоми (рис. 1.3), створенні

молекулами ключового ферменту фотосинтезу рибулезодифосфаткарбоксилази. В клітинах ціанобактерій, які живуть у воді в планктоні, звичайно присутні газові везикули. Вони виглядають як шестигранники на поперечному розрізі, а на повздовжньому мають вигляд ромбу. Газові везикули створюють більш–менш великі скупчення, у світловому мікроскопі вони виглядають як світлі сяючі зерна. Газові везикули містять газ та надають клітинам кращу плавучість.

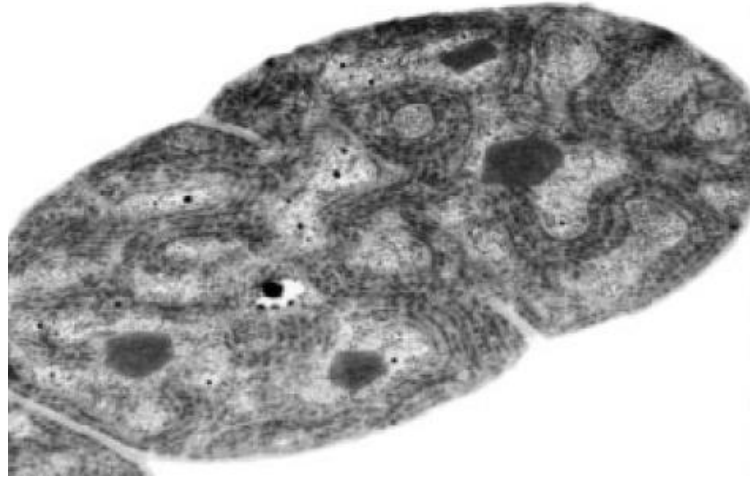


Рис. 1.3 Фотографія ультратонкого зрізу клітини *Nostocsp.* Видні тилакоїди – мембрани фотосинтетичного апарату з фікобілісомами, які знаходяться на їх поверхні. Електронний мікроскоп $\times 2$

Ціанобактерії за типом живлення є автотрофами. Для багатьох видів характерний мішаний тип живлення: за наявності світла – вони фотосинтезують, а за відсутності – поглинають з довкілля готові органічні речовини. Джгутиків і війок ціанобактерії не мають, але все ж здатні переміщуватися. Вони ковзають опорною поверхнею, обертаються навколо довгої осі внаслідок виділення слизу. На відміну від рослин і більшості бактерій, ціанобактерії здатні до азотфіксації. Фіксація азоту відбувається в гетероцистах – великих клітинах, які утворюються в нитчастих форм (рис 1.4). Розмножуються ціанобактерії, як і бактерії, поділом клітин навпіл або частинами колоній. Поділ ниток на частини здійснюється за участю гетероцист, по яких відбувається розрив. Отже, найхарактернішими особливостями ціанобактерій є будова клітини, здатність до фотосинтезу й азотфіксації [5].



Рис 1.4 Ціанобактерії з гетероцистами

Енергія, отримана ціанобактеріями за допомогою фотосинтезу, використовується для продукування органічних речовин з CO_2 . Переважна більшість ціанобактерій являються облігатними фототрофами. Але вони можуть протягом короткого періоду часу існувати за рахунок витрачання накопиченого на світлі глікогену.

Ціанобактерії як одна зі стародавніх груп мікроскопічних організмів довгий період зазнавали впливу різноманітних зовнішніх умов та поступово пристосовувалися до них. Вони зберегли риси примітивної організації і здобули велику функціональну лабільність до різних умов існування, що відобразилося на специфіці їхньої біохімічної організації. У багатьох з них сформувалася спроможність адаптуватися до екстремальних умов існування. Цим пояснюється факт їх виняткової пристосованості та повсюдного поширення в природі. Вони відіграють суттєву роль у житті природних екосистем, у кругообігу речовин у природі. За їх рахунок здійснюється майже весь об'єм фотосинтезу в морській воді і значна його частина в прісноводних водоймах.

Особливості метаболізму ціанобактерій – висока стійкість до різких коливань вологості і температури, нестачі та надлишку світла, засолення, тощо обумовлюють їх широке розповсюдження в різних екологічних нішах у багатьох регіонах [7].

Ціанобактерії розповсюджені в різноманітних кліматичних зонах, зберігаючи свою життєздатність як в умовах тропіків, гейзерів, так і зонах крайньої мерзлоти, зокрема в Антарктиді, де окремі з них розвиваються на снігових покривах та льодовиках. Завдяки особливому колоїдному стану протоплазми ціанобактерії можуть поселятися в гарячих джерелах.

Водне середовище для них є сприятливим і природним місцезнаходженням. Ціанобактерії розвиваються в прісноводних і морських водоймах, рівномірно розподіляючись у товщі води, концентруючись біля або на її поверхні, що найбільш характерно для ставків або слабо проточних ділянок рік і озер.

Найчастіше ціанобактерії зустрічаються в прісній воді ставків і калюж, інколи у великій кількості, забарвлюючи воду і створюючи неприємний запах.

У спекотний період літа внаслідок забруднення внутрішніх водойм стоками з удобрених полів, зарегулювання стоку річок у водосховищах підвищується рівень азоту й фосфору, значно зростає їх евтрофікація. Саме за таких обставин створюються умови для масового розвитку ціанобактерій, що призводить до виникнення явища «цвітіння» води – проблеми, яка є причиною погіршення її якості. Розвитку ціанобактерій сприяє збільшення температури й сонячної радіації, тому у водосховищах південних широт вони розвиваються інтенсивніше, ніж у північних [14].

Окремі види ціанобактерій мають здатність до швидкого переходу від активного функціонування до стану спокою і навпаки. Протягом довгого часу, навіть десятиліття вони можуть зберігати життєдіяльність у висушеному стані та за умов появи вологи відразу ж переходити до активної діяльності.

Ціанобактерії широко розповсюджені в ґрунтових біоценозах, є невід'ємним компонентом ґрунтових екосистем, складовою частиною ґрунтової мікрофлори. Вони тісно пов'язані з усіма компонентами цих систем, з ґрунтом та з вищими рослинами. Неабияку роль у цьому відіграють азотфіксуючі ціанобактерії, оскільки з ними пов'язано підвищення родючості ґрунтів.

Цілий ряд ціанобактерій росте на суші, утворюючи плівки зеленого або синьо-зеленого кольору не тільки на поверхні ґрунту і в самій його товщі, але й на інших субстратах, на камінні, поверхні скель або на корі дерев. Деякі з них розвиваються всередині вапнякового субстрату. Вони знаходяться в порівняно сухих місцях, за відсутності води, здебільшого в стані спокою. Ці об'єкти еволюціонували в напрямку створення механізмів утримання водного ресурсу. Необхідну для своєї життєдіяльності воду вони поповнюють з атмосферної та ґрунтової вологи [11].

Ціанобактерії при фотосинтезі можуть використовувати сонячну енергію в більш широкому спектрі, ніж інші фотосинтетики, що обумовлено особливостями їх пігментної системи. Склад пігментів і їх кількість можуть різко змінюватися в залежності від умов освітлення, наявності в середовищі речовин, що визначають енергетичні і конструктивні процеси ціанобактерій [6].

Хлорофіл *a* виявлений у всіх фотосинтезуючих організмів, здатних до фотосинтезу з виділенням кисню. У клітинах ціанобактерій він є єдиним типом хлорофілу. Існує кілька варіантів цього пігменту, що відрізняються максимумом поглинання в червоній області. Згідно дослідженням С. Френча виявлено три типи хлорофілу *a* з максимумами поглинання 672– 674, 650– 684 і 690– 695 нм [18]. За результатами досліджень Томаса пігментний апарат *Anacystis nidulans* містить сім форм хлорофілу *a* з максимумами в червоній області – 660, 663, 667, 672, 694, 698 і 702 нм [6]. Кількість хлорофілу *a* в клітинах ціанобактерій не однакою для різних видів і залежить від умов культивування.

У фотосинтезуючих організмів зустрічається безліч різновидів каротиноїдів, які поглинають світло у діапазоні 400– 550 нм, захищають фотосинтезуючий апарат від пошкодження в результаті фотоокислення.

За складом каротиноїди ціанобактерій відрізняються від каротиноїдів інших фотосинтезуючих організмів. Тільки у ціанобактерій зустрічаються симетричні біциклічні каротиноїди, у яких кисень локалізований біля четвертого вуглецевого атому (C– 4).

1.2. Характеристика фікобіліпротеїнів як пігментної складової ціанобактерій

Ціанобактерії на відміну від вищих рослин і бактерій містять, крім хлорофілу і каротиноїдів, водорозчинні пігменти – фікобіліпротеїни – хромопротеїни, до складу небілкової частини яких входять хромофори фікобіліни (аналоги жовчних кислот), які володіють здатністю маскувати колір хлорофілу. Вони є основними поглинаючими світло пігментами у

ціанобактерій, а також у червоних водоростей (*Rhodophyta*) і деяких криптофітових водоростей (*Cryptophyta*) [12]. Завдяки властивості фікобілінів поглинати світло в широкому діапазоні довжин хвиль, в середині видимої області частини спектру між основними областями поглинання хлорофілу (в помаранчевій, жовтій і зеленій частинах спектра) водорості повніше використовують світло, що проникає у воду [1].

Фікобіліни – похідні тетрапіролу – ковалентно зв'язані з білком типу глобуліну (з апопротеїном). Фікобіліни складаються з чотирьох пірольних кілець, але не замкнених, як у молекулі хлорофілу. Вони мають вигляд розгорнутого ланцюга, який не містить металу (рис. 1.5).

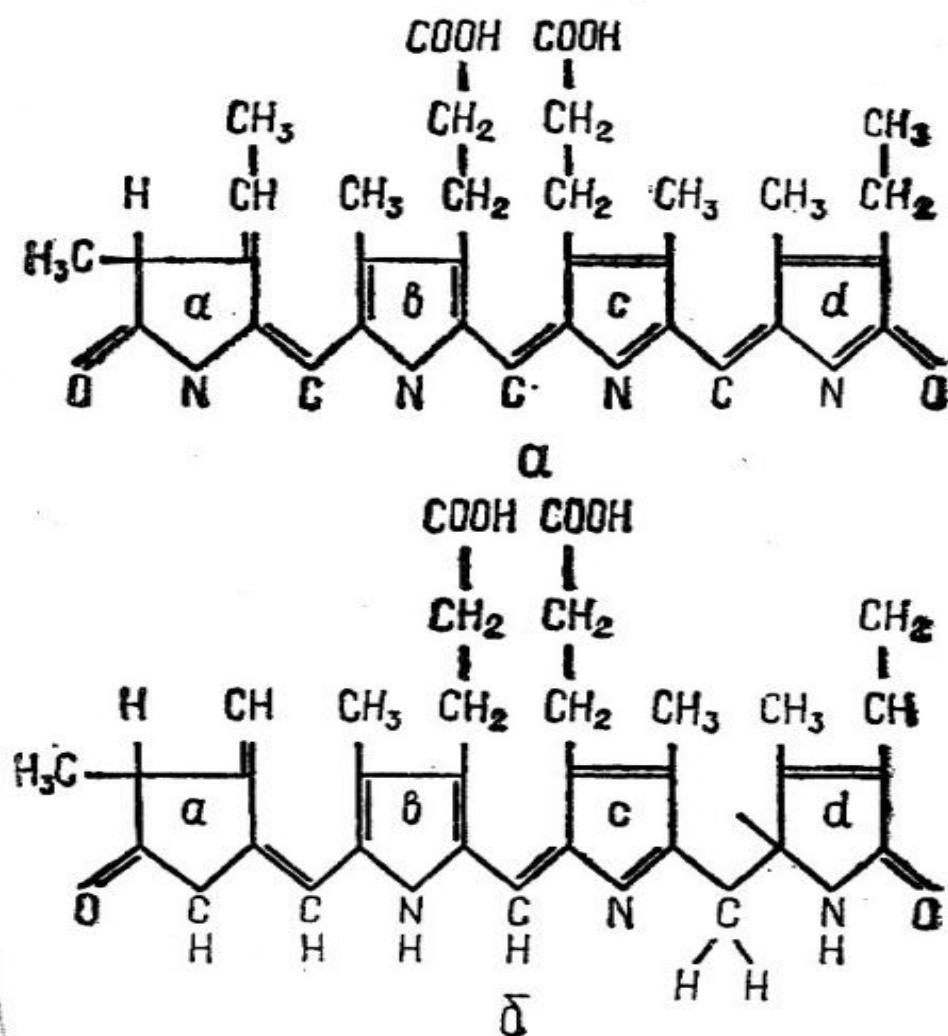


Рис. 1.5 Хімічна структура хромофорів фікобіліпротеїнів :
 а – фікоціанобілін – хромофор фікоціаніну і аллофікоціаніну, б –
 фікоеритробілін – хромофор фікоеритрину

З ціанобактерій виділені в кристалічному вигляді три фікобіліпротеїни, що відрізняються за спектрами поглинання [7]. Два блакитних пігменти (фікоціанін і аллофікоціанін) мають максимуми поглинання при 615 та 650 нм, фікоеритрин – при 540–565 нм (рис. 1.6.). Фікоеритрин не завжди наявний в клітинах ціанобактерій, він зустрічається в основному у нитчастих форм. Молекули фікобіліпротеїнів складаються з двох нековалентно зв'язаних субодиниць – а та b , до кожної з яких приєднані хромофори – фікоеритробілін і фікоціанобілін. Відмінності в спектральних властивостях фікобіліпротеїнів визначаються амінокислотою послідовністю а – та b –поліпептидів, числом і типом приєднаних до них хромофорів. Наприклад, у складі фікоціаніна *Synechococcus sp.* переважають аланін, аспарагін, гліцин, глютамінова кислота, серин, лейцин; а – субодиниця містить відносно більше тирозину, триптофану і лізину, b – субодиниця – більше аланіну, аргініну, валіну, метіоніну. Слід зазначити, що а – та b – субодиниці значно розрізняються за амінокислотним складом. В а – субодиниці багатьох видів ціанобактерій амінокислоти розташовані в наступному порядку: метіонін (валін), лізин, треонін, пролін, лейцин; в b – субодиниці – метіонін, лейцин, аспарагін, аланін, фенілаланін, лізин, валін [18].

З ціанобактерій виділено декілька форм фікобілінів, названих фікохромами: фікохром а міститься в клітинах *Tolypothrix distorta*, *Phormidium luridum*, *Nostoc muscorum*, *Anacystis nidulans*, і має дві форми, які поглинають світло при 590 і 630 нм. Дві форми фікохрому b в клітинах *Tolypothrix distorta* поглинають світло при 510– 570 нм. Фікохром з *Noctoc muscorum* штам А і *Tolypothrix tenuis* має одну форму, яка поглинає світло при 650 нм, та іншу слабопоглинаючу в зеленій області форму фікохрому [7].

Слід зазначити, що ціанобактерії володіють великим різноманіттям фікоеритринів [19]. Усі фікоеритрини мають максимум поглинання в області 540–565 нм, що обумовлено наявністю хромофору – фікоеритробіліну.

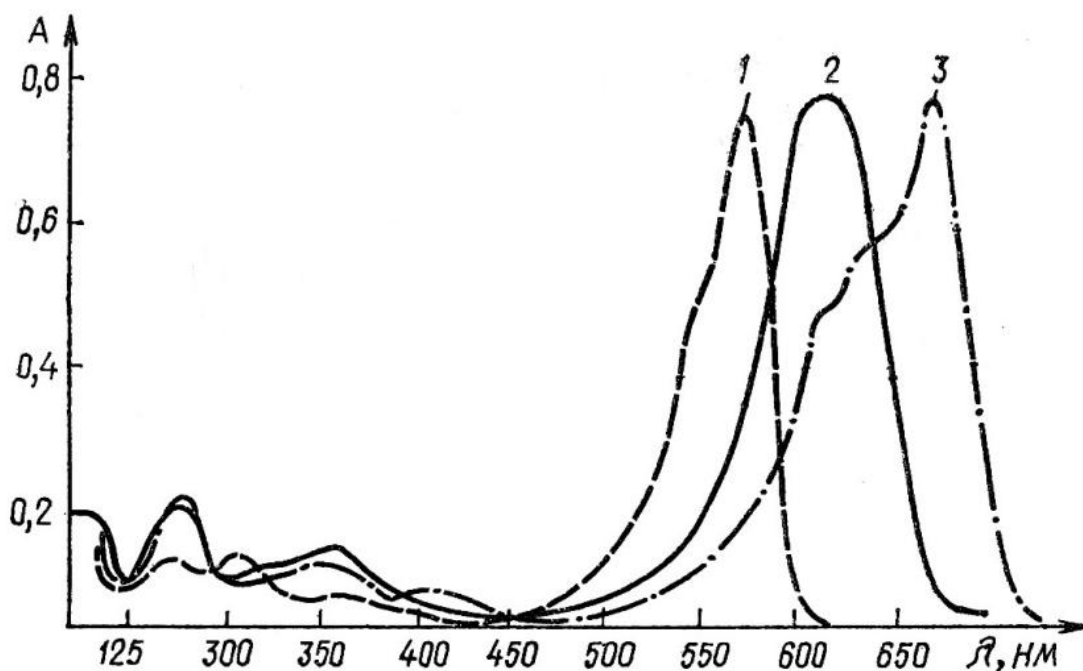


Рис. 1.6 Спектри поглинання біліхромпротеїнів, виділених з нитчастих ціанобактерій:

1 – фікоеритрин, 2 – аллофікоціанін, 3 – фікоціанін

У деяких ціанобактерій, крім фікоеритробіліну, були виявлені хромофори, які рідко зустрічаються, – фікоуробіліни – з максимумом поглинання при 498 нм. Поліпептиди усіх відомих фікоеритринів містять три або чотири молекули хромофорів. Фікоуробілін, який входить до складу *b* – субодиницьфікоеритринів, представлений однією молекулою, коефіцієнт поглинання його в 2,4 рази вищий, ніж коефіцієнт поглинання фікоеритробіліна.

Фікоуробілін виявлений у двох видів морських ціанобактерій – *Oscillatoria irriqua* і *Trichodesmium thiebautii*. З фікоеритрину безтілакоїдної ціанобактерії *Gloeobacter violaceus* виділений фікоуробілін. Він локалізований на *b* – субодиниці і має максимум поглинання при 497– 498 нм. Співвідношення кількості фікоуробіліну та фікоеритробіліну для даної ціанобактерії становить 1:6 [16].

З деяких видів ціанобактерій виділений фікоеритроціанін, який відрізняється від фікоеритрину спектральними та фізико– хімічними характеристиками: максимум поглинання – 568– 577 нм, максимум флюоресценції – 625 нм. Спектри поглинання і

флюоресценції *b* – субодиниці фікоеритроціаніну, *b* – субодиниці фікоціаніну і аллофікоціаніну ідентичні.

Відмічено велику схожість цих субодиниць за амінокислотою послідовністю, що може вказувати на їх спільне походження.

Ціанобактерії містять або фікоеритрин, або фікоеритроціанін, який виявлений у більшості нитчастих форм ціанобактерій, і майже повністю відсутній у одноклітинних. Фікоеритрин широко представлений серед ціанобактерій і особливо часто зустрічається у видів роду *Nostoc*, *Calothrix*, *Gloethece* і *Gloeocapsa*. Кількість цих пігментів значно варіює *in vivo* при зміні умов культивування ціанобактерій [1].

Фікобіліпротеїни є основними компонентами клітин ціанобактерій. У деяких видів, наприклад, у *Anacystis nidulans*, вони можуть складати до 40 % клітинного білка [7].

Ціанобактерії, володіючи таким набором пігментів, здатні найбільш повно, порівняно з іншими організмами, використовувати видиму частину спектру сонячного світла. Здатність до змін у співвідношенні світопоглинальних пігментів у відповідь на зміну розподілу світла з метою більш ефективної абсорбції різних довжин хвиль називається хроматичною адаптацією [1].

1.3. Локалізація фікобіліпротеїнів

Пігменти ціанобактерій фікобілінів локалізуються в специфічних структурах – фікобілісомах (рис. 1.7). Вони являють собою високоорганізовані білкові комплекси, прикріплені до зовнішньої поверхні мембрани. Відстань між рядками фікобілісом 40 – 50 нм.

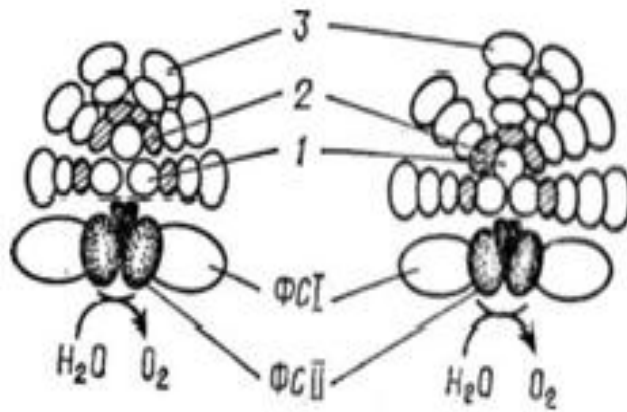


Рис. 1.7 Схематичний розподіл фікобіліпротеїнів у фікобілісомах у ціанобактерій:

1 – алофікоціанін, 2 – фікоціанін, 3 – фікоеритрин, ФС I – фотосистема I, ФС II – фотосистема II.

Кількість пігментів і фікобілісом може змінюватися і не залежати від природи пігментів та вікових культур ціанобактерій.

За даними Е. Ганта і С. Конті [16], багато фікобілісом ціанобактерій мають сферичне тіло діаметром 40 нм.

Лише одна ціанобактерія *Gloeobacter violaceus* зовсім не утворює тілакоїдів і фікобілісом, а має єдину унітарну мембрану (плазмолему), в якій локалізовані хлорофіл *a* та каротиноїди; за нею електронно щільний шар товщиною 80 нм, в якому, ймовірно, розташовуються всі фікобіліпротеїни [13]. До теперішнього часу подібне явище не було виявлено у ціанобактерій, і *Gloeobacter violaceus* є єдиним видом, не утворюючим тілакоїдів і фікобілісом.

Організація фікобіліпротеїнів в фікобілісомах представлена на рис. 1.4. Молекули аллофікоціаніну складають внутрішнє ядро фікобілісоми. До нього примикають розбіжні в різні сторони паличкоподібні утворення, побудовані з молекул фікоціаніну і фікоеритрину, останній розташовується на периферичній частині цієї структури. У видів, що не містять фікоеритрин, паличкоподібні утворення складаються тільки з фікоціаніну.

1.4. Використання фікобіліпротеїнів

Фікоціаніни добувають з мікродоростей *Spirulina platensis* (Nordst.)

Geitler. У складі біомаси спіруліни фікоціаніни представлені декількома ізоформами, такими як аллофікоціанін і С– фікоціанін [11]. Його вміст може становити в середньому від 4 до 9 % від маси сухих речовин спіруліни [4]. С–фікоціанін є активним антиоксидантом. С–фікоціанін здатний пригнічувати проліферацію пухлинних клітин, знижувати концентрацію фактора некрозу пухлини в тканинах, інгібувати окисний стрес в організмі, запобігати перекисному окисненню ліпідів, пошкодженню ДНК, руйнуванню клітинних мембран і загибелі клітин. Він здатний відновлювати нормальне кровотворення і підвищувати імунітет. Фікоціанін дозволяє отримувати так званий анатомічний портрет людини (він селективно накопичується в атеросклеротичних бляшках і новоутвореннях, локалізація яких визначається ультразвуковим скануванням) [8].

Фікоціанін відомий також як харчовий барвник [11]. Він володіє інтенсивним максимумом поглинання у видимій області спектра при довжині хвилі 620 нм. Розчини фікоціаніна високого ступеня очищення мають інтенсивний синій колір. Однак інші пігменти спіруліни (хлорофіли, каротиноїди) погіршують чистоту кольору, зрушуючи його в бік жовто–зеленого. Для використання в якості натурального харчового барвника С–фікоціанін повинен бути в достатній мірі очищений. Ступінь очищення визначається показником, що вимірюється відношенням оптичних густин при двох довжинах хвиль: D_{620}/D_{280} . У водному екстракті цей показник становить 0,3 – 0,4. Ця величина відповідає вмісту фікоціаніна 6 – 8 % від загального білка. У фікоціаніні 100%–ї чистоти цей показник становить 4,98. Для використання в харчовій промисловості препарату С–фікоціаніна співвідношення D_{620}/D_{280} повинно бути не менше 2, що відповідає вмісту основної речовини фікобіліпротеїнів 40 % [8].

Таким чином, використання пігментів синьо–зелених водоростей є досить перспективним напрямком біотехнології, оскільки вони можуть замінити штучні барвники, а також лікарські засоби в промислових масштабах.

1.5. Фактори, які впливають на вміст фікобіліпротеїнів у клітинах ціанобактерій

1.5.1. Особливості перебігу фотосинтетичних процесів у ціанобактерій за дії світла різної інтенсивності та якості

Інтенсивність фотосинтезу первинних продуцентів залежить від умов освітлення [17]. Першочергове значення для життєдіяльності фітопланктону має фотосинтетично активна радіація, яка на поверхні води становить $\sim 40\%$ від загальної енергії світла, а її втрати на відбиття досягають 10% [90]. У мезотрофних водах пігменти морського фітопланктону поглинають тільки 5% всієї радіації, що проникає у водойму, а в евтрофних – до 60% .

Світовий оптимум у багатьох ціанобактерій лежить у діапазоні від 20 до 50% радіації, що досягає поверхні води [21]. Максимум фотосинтезу прісноводного фітопланктону мало залежить від оптичних властивостей води й визначається здебільшого освітленням, тобто пов'язаний з глибиною, де енергія сонячної радіації досягає певного рівня (~ 100 кал/см²·добу) [11].

Згідно досліджень, проведених з використанням морських водоростей, приріст їхньої біомаси спочатку є пропорційним кількості поглиненого світла (до $20 - 55$ кал/см²·добу), потім настає світлове насичення, а подальше збільшення сонячної радіації гальмує розвиток водоростей [22]. Майже такий самий характер має й модель світлозалежного росту нижчих автотрофів у керованих умовах.

Відомо, що більше сонячної радіації надходить у водойму, то ефективніший процес фотосинтезу фітопланктону й вище його продуктивність. Однак за умов освітленості, що перевищують оптимальні значення, спостерігається ефект фотоінгібування планктонних водоростей [6, 22, 29, 36]. Вивчаючи цей процес у *Anabaena variabilis* як функцію часу за високих інтенсивностей світлового потоку, дослідники дійшли висновку, що фотоінгібування є короткочасним ефектом сонячного випромінювання [27]. Проте цей процес може призводити до деструкції пігментного комплексу й загибелі клітин водоростей [17].

У дослідях з *Spirulina platensis*, яку вирощували при високій ($125 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$) і низькій ($20 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$) інтенсивностях світла, показано, що після ресуспендування клітин культури на свіжому середовищі й впливу світла високої інтенсивності (від 50 до $1000 \text{ мкмоль/м}^2 \cdot \text{с}$), спостерігалася фотоінгібування виділення кисню [25]. Культури, які росли за різної інтенсивності світла, показали різний ступінь чутливості до дії світла високої інтенсивності. Так, зокрема, за високої інтенсивності світла спостерігалася більша здатність до відновлення, ніж за умови слабого світла. Отримані дані свідчать, що фотоінгібування можна розглядати як баланс між ушкодженням і відновленням, пов'язаним із біосинтезом білку *de novo*. Рейхер (США) стверджує, що фотоінгібування зумовлене ушкодженням окиснюючої ділянки ФС II [14].

Вивчаючи вплив підвищених рівнів УФ– світла на фітопланктон Субантарктики (Аргентина) у поверхневому шарі води та в перемішуваних мезокосмах, розвиток планктонних водоростей пригнічується лише в першому випадку [12]. Зокрема, інгібування фотосинтезу зумовлювала УФ– В– радіація.

Під час дослідів з морською діатомеєю *Thalassiosira rotula*, яку протягом двох днів у період експоненційного росту опромінювали різними дозами УФ– В– світла, його високі рівні призводили до зниження кривих споживання HCO_2 у 5– 6 разів порівняно з контролем, незалежно від адаптації водоростей до світла або темряви [10].

Помітне пригнічення фотосинтезу фітопланктону УФ– В– світлом за рахунок зниження концентрації озону над водами Субантарктики й Антарктики спостерігали починаючи з 1995 р. [14]. При цьому зменшувалася відносна кількість центричних діатомей, зокрема *Skeletonema* sp. і *Thalassiosira* sp.

Наукова література свідчить і про те, що життєдіяльність полярного фітопланктону істотною мірою залежить від його спектрального складу [19].

Дана властивість виявлена також і у *Laminaria digitale*, інтенсивність фотосинтезу якої на синьому світлі була на 50 – 100% вищою, ніж на червоному, незалежно від умов вирощування, відповідно при 200 і $100 \text{ мкм/м}^2 \cdot \text{с}$ [15]. У випадку

освітленості, яка складала $10 - 20 \text{ мкм/м}^2/\text{с}$, рівень фотосинтезу був трохи вищим на червоному світлі.

Оскільки енергетичний обмін у фототрофів здійснюється за рахунок фотосинтезу, то важливим показником життєдіяльності клітин є стан їхнього пігментного комплексу [13].

Відомо, що у фотосинтезуючих рослин одночасно відбувається біосинтез пігментів та їхній розклад. У зв'язку з цим у цитоплазмі клітин й у стромі хлоропластів постійно присутня певна кількість перехідних форм пігментів, що перебувають у динамічній рівновазі [28]. Лімітуючим чинником для їх використання є енергія світла. Так, переносючи водорості в умови з підвищеним освітленням, спостерігається зміщення рівноваги в бік синтезу нативних пігментів, що свідчить про інтенсифікацію світлозалежного процесу, який супроводжується збільшенням кількості пігментів. Однак, це не може відбуватися безкінечно, оскільки кількість метаболітів обмежена. Цим можна пояснити збільшення вмісту пігментів у *Gracilaria verrucosa* в першу добу експерименту за підвищеної інтенсивності світла. Потім відбувається зниження їхньої кількості в результаті фотоокиснення [21].

Дослідниками було встановили також, що динаміка вмісту пігментів у *Gracilaria verrucosa* у різних умовах освітлення мала характерні риси: при інтенсивності світла 60 Вт/м^2 відбувалося збільшення їхньої кількості протягом перших декількох діб експерименту, а потім вміст пігментів зменшувався і до кінця експерименту залишався сталим. При зменшенні інтенсивності світла світлозалежний синтез знижується й збільшується вміст інтермедіатів, що забезпечують утворення більшої кількості пігментів.

Суттєвий вплив на кількість фотосинтетичних пігментів водоростей справляє також спектральний склад світлового потоку. Так, зокрема, дослідження, проведені з *Corallina elongata*, встановили, що спалахи червоного світла індукували синтез хлорофілу *a*, фікоціаніну й аллофікоціаніну, але не індукували утворення фікоеритрину [19]. Припускається, що єдиним сенсорним пігментом, який поглинає червоне світло, є фітохром, однак не виключають, що він чутливий до синього світла.

Наукова література свідчить про те, що за дії світла різної інтенсивності відбувається зміна вмісту пігментів у фотосинтетичному апараті *Cyanophyta*, що є одним із способів адаптації культур [3]. Для кожного виду існує певний інтервал світлової інтенсивності, у межах якого можлива фізіологічна адаптація. При цьому найбільш лабільними виявилися фікобілінпротеїни й хлорофіли. Зміну інтенсивності світла викликає адаптаційна відповідь водоростей по типу зворотної залежності між рівнем фотоактивної радіації й вмістом пігментів [13]. М.В. Гусєв та Г.Б. Гохлернер [18], також припускають, що саме шляхом регулювання внутрішньоклітинної концентрації фотосинтетичних пігментів досягається певна стабілізація кількості використаної світлової енергії за різних умов освітлення.

У дослідах з *Nostoc muscorum* й *Nostoc punctiforme*, при вивченні змін складу й вмісту пігментів в умовах різної інтенсивності освітлення, було встановлено [13], що при слабкому освітленні збільшується вміст всіх фотосинтетичних пігментів, і, особливо, додаткових пігментів фікобілінової природи. Відносно високий рівень освітлення, що сприяє активізації накопичення біомаси водоростей, призводив до значного фотовицвітання пігментів. Спостерігалось також зниження вмісту хлорофілу *a*, фікобілінпротеїнів й відносно зниження вмісту каротиноїдів. При сильному освітленні в *Nostoc muscorum* удвічі зменшувалася частка фікоеритрину.

Дослідження, проведені з *Anabaena spiroides*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *A. oscillatorioides*, *Sphacronostoc zeterstedtii* й *Hapalosiphon fontinalis*, показали, що їх тривале вирощування за наявності різних фільтрів призводило до зміни кольору водоростей: під синім і синьо– зеленим світлофільтрами вони набували темно– синього забарвлення; під зеленим – темно– зеленого; під жовтим і нейтральним – жовто– зеленого, а під червоним – синьо– зеленого [31]. Іншими словами, за дії певного світлового спектру відбувалася хроматична адаптація представників досліджуваної групи водоростей. Загальною закономірністю для всіх видів водоростей було те, що синє світло зумовлювало посилення біосинтезу пігментів білкової природи – фікоціаніну й фікоеритрину. Крім цього, синє світло істотно впливало й на ультраструктурну організацію фотосинтетичного апарату.

При вивченні впливу спектрального складу світла на адаптацію одноклітинної зеленої водорості *Chlamydomonas reinhardtii* до низького рівня CO₂ у навколишньому середовищі, встановили, що перенесення клітин на червоне й синє світло одразу ініціювало процес адаптації водорості до досліджуваного хімічного чинника [7]. У зв'язку з повним збігом адаптаційних змін при червоному й синьому світлі зроблено висновок про те, що якісний склад світла не впливає на адаптацію *Ch. reinhardtii* до низького рівня CO₂ у середовищі.

Узагальнюючи висновки матеріалів наукової літератури, доцільно зазначити, що, незважаючи на широкий спектр досліджень щодо реакції водоростей різних екологічних груп на зміни умов освітлення, даних про характер залежності їх функціональних й кількісних показників від інтенсивності світла і його якісного складу як у природних, так і в лабораторних умовах усе ще бракує, а наявні відомості у більшості випадків є суперечливими. Потребують також подальшого детального вивчення механізми адаптації прісноводних водоростей до змін фізико-хімічних умов їх існування, особливо, з огляду на тенденції посилення УФ-випромінювання, що на сьогодні розглядається екологами як один із чинників забруднення навколишнього середовища.

1.5.2. Вплив температури на вміст фікобіліпротеїнів у культурі ціанобактерій

Ціанобактеріям властиві дуже широкі діапазони температурної стійкості. Деякі їх види здатні існувати як у гарячих джерелах, температура яких близька до температури кипіння води, так і на поверхні льоду і снігу, де температури коливаються близько 0 °С.

По відношенню до температури серед водоростей виділяють: евритермні види, існуючі в широкому температурному діапазоні і стенотермні, пристосовані до дуже вузьких, іноді екстремальним температурним зонам.

Відомим фактом є те, що при температурі вище 25 °C ціанобактерії мають максимальний темп наростання біомаси. Саме ця умова і є причиною максимального наростання біомаси водоростей у водоймах в літній період. Також відомо, що ціанобактерії накопичують пігменти при комбінації оптимальних умов (освітлення, склад поживного середовища, та ін.). Згідно досліджень Єфімова найоптимальнішою температурою для накопичення хлорофілу та фікобілінів у культурі водоростей роду *Phormidium* є температура в межах 20 – 30 °C [23]. Згідно досліджень Конопки та Томаса оптимальною температурою для накопичення культур *Anabaena Microcystis*, оптимальна температура в межах 14 – 20 °C [11]. В обох дослідженнях було зазначено, що зі зменшенням температури або ж зі значним її підвищенням вміст пігментів у культурах зменшувався від 50% до 80%.

Для різних видів водоростей характерні свої температурні оптимуми, деякі максимально накопичують біомасу в межах 4 – 12 °C, або ж навіть 30 – 60 °C. При цьому накопичують пігменти не в меншій кількості [23]. Головним показником накопичення пігментів в культурі є відсоток фотосинтезу, тобто чим більша кількість пігментів тим вищий відсоток фотосинтезу.

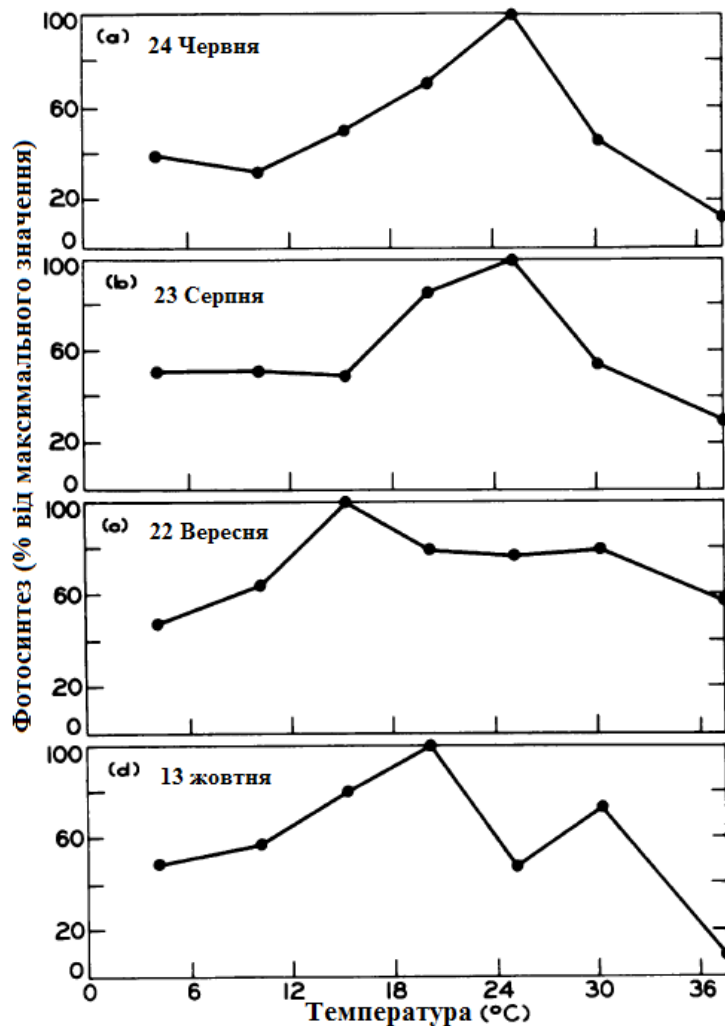


Рис. 1.8 Залежність фотосинтезу від температури

В природніх умовах приріст біомаси, а також накопичення пігментів регулюється залежно від пори року (рис. 1.8) .

Дані іншої літератури вказують, що вплив температури не значний, якщо відсутні інші умови для накопичення пігментів, зокрема світловий фактор, фактор живлення та ін.

Згідно аналізу наукової літератури можна зробити висновки, що температурним оптимумом для накопичення пігментів у культурах синьо-зелених водоростей є 15 – 30 °С, але за умови присутності інших оптимальних умов для їх наростання.

1.5.3. Залежність вмісту фікобіліпротейнів у культурі ціанобактерії від складу середовища

Життя ціанобактерій, залежить від вмісту в середовищі існування необхідних речовин, а також діапазону стійкості самих організмів щодо змін умов середовища [26, 11].

Кислотність середовища є лімітуючим фактором. Стійкість різних таксонів ціанобактерій до змін кислотності (рН) настільки ж різна, як і до змін солоності. Деякі види в ціанобактерій живуть тільки в лужних середовищах, при високому значенні рН, інші мешкають в кислих середовищах, при низькому рН.

Солоність і мінеральний склад води – це найважливіші лімітуючі фактори, що впливають на ціанобактерій.

Водорості проживають у водоймах самої різної солоності: від прісних водоймищ, мінералізація яких не перевищує зазвичай 0,5 г/л, до вкрай засолених (гіпергалінних) водойм, концентрація солей яких знаходиться в межах від 40 до 347 г/л. Незважаючи на те, що в цілому водоростям властива така широка амплітуда солестійкості, деякі види в більшості своїй стеногалові, тобто здатні мешкати лише при певному значенні солоності. Евригалових видів водоростей, здатних існувати при різній солоності, порівняно небагато [11].

Наявність у середовищі макро– і мікроелементів, які є необхідними компонентами водоростей, має вирішальне значення для інтенсивності їх розвитку.

Елементи та їх сполуки, що відносяться до макроелементів, потрібні організмам в порівняно великих кількостях. Найбільш важливі азот і фосфор, майже настільки ж необхідні калій, кальцій, сірка та магній. Мікроелементи нерідко виступають як лімітуючі фактори. До них відносяться 10 елементів: залізо, марганець, цинк, мідь, бор, кремній, молібден, хлор, ванадій і кобальт.

Майже у всіх прісноводних і морських екосистемах лімітуючим чинником є концентрація у воді нітратів і фосфатів. У прісних водоймах з низьким вмістом карбонатів до лімітуючих факторів можуть бути зараховані концентрації солей кальцію і деяких інших мікроелементів [26].

1.6. Характеристика лазерного опромінення

Термін "лазер" утворений з початкових букв наступних англійських слів: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, що означає посилення світла шляхом змушеного випромінювання. Основні процеси, що характеризують роботу оптичних квантових генераторів, – процеси взаємодії світла з електронами атомів, що описуються фундаментальними положеннями квантової механіки.

Виходячи з гіпотези Планка, випромінювання і поглинання енергії у виді електромагнітних хвиль, зокрема світла, відбувається не безупинно, а окремими порціями, квантами. Атом, взаємодіючий зі світлом, може один раз поглинути лише один світловий квант. Енергія кванта, що поглинається атомом витрачається на перехід одного з електронів атома з більш глибокої оболонки на зовнішню, більш далеку від ядра атома. При зворотному переході електронів з цієї вищої оболонки, де він має більшу енергію, на нижчу відбувається випромінювання світла, віддача поглиненого кванта енергії. Повернення атома зі збудженого стану, тобто такого стану, коли його електрон знаходиться на вищому енергетичному рівні, в основний стан можливе шляхом спонтанного перескоку електрона на нижчий рівень, що супроводжується висвітленням кванта енергії, або при зіткненні збудженого атома зі світловим квантом (фотоном) тієї ж енергії, що може висвітити даний атом при поверненні його в основний стан. Таким чином, сторонній фотон при зіткненні зі збудженим атомом вибиває з нього другий фотон. Кожний з цих двох фотонів може надалі зштовхнутися з новим збудженим атомом, у результаті чого утворяться вже чотири фотони. Розвиваючись далі, цей процес приводить до утворення лавини наростання числа фотонів.

Описаний тут принцип використовується у лазерах для одержання змушеного випромінювання. Однак, він передбачає наявність у системі активного середовища, у якому велика частина (більш половини) атомів знаходиться в збудженому стані. У протилежному випадку процес буде іти зі загасанням і ніякого посилення світла, що проходить через дане середовище, не вийде. Отже, створення такого активного середовища є однією з необхідних умов дії лазера.

Лазери на твердому тілі

З оптичних квантових генераторів цього типу в даний час використовуються в медицині рубіновий і неодимовий лазери. Рубіновий лазер складається з трьох основних частин: рубінового кристала, резонансної системи у виді двох дзеркальних пластин або покриттів, що відбивають, нанесених на торцеві сторони кристала, і системи порушення (накачування), у якості якої звичайно використовується ксенонова лампа– спалах.

Рубіновий лазер випромінює енергію в червоній частині спектра з довжиною хвилі 6943Е. Вихідна енергія рубінових лазерів варіює від десятих часток Дж до тисячі Дж і вище.

У неодимовому лазері активною речовиною є барієве скло з домішкою іонів неодиму. Неодимовий лазер випромінює енергію в інфрачервоній області спектра з довжиною хвилі 10600Е. У порівнянні з рубіновим лазером він являє собою більш економічний тип оптичного квантового генератора, тому що його ККД перевищує 4%. Рубіновий лазер має ККД 1%.

Газові лазери

Газові лазери здатні працювати в безперервному режимі. Їхнє випромінювання володіє високої монохроматичністю і когерентністю. Однак вихідна потужність газових лазерів залишається поки невеликою і значно уступає потужності твердотільних.

Першим з розроблених газових лазерів був гелій– неоновий. Він являє собою кварцову трубку, заповнену сумішшю неону і гелію. Трубка закінчується металевими камерами, у яких розміщуються плоскі відбивні пластини.

Найбільший інтерес серед газових лазерів для медико– біологічних досліджень представляють аргонний і вуглекисневий лазери. Аргонний лазер випромінює енергію в синьо– зеленій частині спектра з основними довжинами хвиль 0,4880 і 0,5145 мкм.

Углекислотний лазер випромінює в інфрачервоній області при довжині хвилі 0,106000 мкм.

Напівпровідникові лазери

У напівпровідникових лазерах як активну речовину використовують напівпровідникові матеріали, а порушення виробляється безпосередньо електричним струмом. Напівпровідникові лазери мають найвищий із усіх типів оптичних квантових генераторів ККД – 60–70%.

Напівпровідникові лазери дозволяють змінювати частоту випромінювання за допомогою магнітного поля. Напівпровідникові лазери значно менше по розміру інших типів лазерів. Однак по монохроматичності, когерентності і ступеневі розбіжності променів вони значною мірою уступають кристалічним і особливо газовим лазерам. Потужність напівпровідникових лазерів поки занадто низка для їх успішного медико–біологічного застосування.

Дія лазерного випромінювання на біоб'єкти

Характерною рисою лазерного випромінювання є монохроматичність, когерентність і спрямованість. Завдяки когерентності лазерне випромінювання має високу інтенсивність. За допомогою лазера можна досягти високих щільностей випромінювання. Так, наприклад, енергія в 100 Дж достатня лише для горіння лампочки накалювання в продовж 1 секунди, але виділяючи цю енергію протягом однієї мільйонної частки секунди, лазер у 100 Дж народжує світлові імпульси потужністю в 100 млн. Вт.

Процеси, що лежать в основі взаємодії випромінювання лазера з біологічними об'єктами мало вивчені.

Характер дії ЛВ на живі тканини і на живі об'єкти багато в чому різний. Нерідко здається парадоксальним, що промінь лазера з енергією, достатньої для того, щоб пробити отвір у металевій пластині, не викликає ніяких реакцій при дії на білу шкіру. Це значною мірою визначається властивостями шкіри, серед яких найважливішими є те, що відбиває і поглинає здатність (що залежать від колірних характеристик), теплоємність, теплопровідність, схована питома теплота перетворення (обумовлена змістом води), акустичні і механічні властивості матеріалу. Разом з тим, на цю взаємодію впливають параметри лазерного

випромінювання (довжина хвилі, щільність енергії, потужність, ступінь когерентності).

Не викликає сумніву, що термічним ефектом не обмежуються результати взаємодії лазерного випромінювання з біооб'єктами. У цю взаємодію повинні бути включені ударні ефекти, що виникає електромагнітне поле, фотоелектричні, електрохімічні й інші зміни тканини, що опромінюється.

Ланцюг процесів, що виникають у біосубстраті під впливом лазерної радіації, починається з поглинання енергії. У більшості випадків поглинається лише частина падаючого випромінювання. Відбувається відображення, переломлення, розсіювання світла частками тканини, і нарешті поляризаційні ефекти, у результаті яких змінюється спрямованість електричних і магнітних полів.

Термічний ефект є найважливішим чинником взаємодії ЛВ з тканиною. Тому поразка звичайна подібно з опіком, що особливо виникає під впливом струмів високої частоти. Відмітною рисою є різка обмеженість ураженої області від суміжної з нею, що пояснюється нетривалістю лазерного імпульсу: миттєво виділяється тепло, яке не встигає поширитися за межі опроміненої ділянки. Суворо обмеженість ділянки різкого підвищення температури зв'язана також з низькою теплопровідністю біотканин.

Дуже часто фіксується виникнення ударних хвиль механічної або акустичної природи. Можливі кілька механізмів ударних ефектів. Випар і виверження часток матеріалу з поверхні об'єкта приводить до виникнення тиску віддачі, спрямованого протилежно рухові вивержених часток, тобто по ходу променя лазера.

Інший можливий механізм виникнення ударної хвилі зв'язаний з тепловим об'ємним розширенням, що розвивається в опроміненій ділянці біоматеріала в результаті дуже швидкого і нетривалого підвищення температури, що, коли миттєво виділяється тепло не встигає поширюватися шляхом теплопровідності, конвекції й ін. Таке швидке розширення біоматеріала призводить до появи механічних напруг і ударних хвиль, що поширюються в тканинах. У результаті теплового розширення може виникнути значно більший тиск чим тиск віддачі, що зв'язаний з викидом часток речовини з поверхні тканини.

Пружна хвиля спочатку має характер ударної хвилі зі швидкістю більшої швидкості звуку, потім трансформується в акустичну зі швидкістю звуку, а потім у механічну швидкість менше швидкості звуку.

У зв'язку з утворенням ультразвукових хвиль у біооб'єкті можливе виникнення в ньому кавітації, що представляє собою процес утворення мікропорожнин, що супроводжуються появою дуже високого тиску – до 10⁶ Атм. Ушкодження, які викликані в тканині пружною хвилею можуть бути вилучені від крапки опромінення на значну відстань.

Виникнення пружної хвилі в області підвищеного тиску в замкнутому просторі (ока, череп, грудна клітка, сечовий міхур) здатне призводити до значних ушкоджень, більш глибоким, чим у випадку розвитку цих явищ на структурах, що не мають твердих границь.

Наявність у клітинах часток, що посилено поглинають лазерні промені або перевипромінюють їх при відображенні, створює крапки найбільшого підвищення температури і термічного розтягання. Тобто вони стають центрами вогнищ поразки. При зіткненні основної і відбитої пружної хвилі можуть утворюватися стоячі хвилі.

У білковому коагуляті в зонах ущільнення спостерігалася подвійна променезаломлюваність, що говорить про визначену орієнтацію часток, що утворюють ці зони.

Крім тиску віддачі і термічного об'ємного розширення в біологічних середовищах, опромінених лазером, можлива поява пружних коливань також завдяки тискові світла й ефектові електрострикції.

При низькоенергетичному опроміненні лазером швидше за усе відбувається зміна проникності поверхневої мембрани клітини. При цьому можуть спостерігатися самі різкі зміни на границях, що розділяють різні тканини.

Виходячи з експериментальних даних, було припущено, що на субклітинному рівні найбільш чутливими до лазерної радіації одиницями повинні бути мембранні компоненти клітини – у першу чергу ендоплазматический ретикулум, мембрана якого складає значну частину цитоплазми. Під дією лазерної радіації

спостерігається посилення здатності мембранних органелл до набрякання, що свідчить про зміни в їхній тонкій структурі [8].

1.7. Висновки до розділу

Отже, фікобіліпротеїни – це водорозчинні пігменти червоних водоростей та ціанобактерій, які є білками з групи хромопротеїнів. З ціанобактерій виділені в кристалічному вигляді три фікобіліпротеїни, що відрізняються за спектрами поглинання. Важливо відзначити, що інтерес до дослідження фікобіліпротеїнів обумовлений їх практичним значенням. Фікоціаніни і фікоеритрини займають провідне положення на ринку природних барвників. Роль цих речовин зростає у зв'язку з використанням їх у медицині (при діагностиці ракових захворювань), а також в фармакології та харчовій промисловості. Основними абіотичними факторами, які впливають на зміну кількості фікобіліпротеїнів є освітлення, температура та склад поживного середовища.

Лазерне опромінення – це вимушене за допомогою лазерів випускання атомами речовини порцій– квантів електромагнітного випромінювання. Ланцюг процесів, що виникають у біосубстраті під впливом лазерної радіації, починається з поглинання енергії. У більшості випадків поглинається лише частина падаючого випромінювання. Відбувається відображення, переломлення, розсіювання світла частками тканини, і нарешті поляризаційні ефекти, у результаті яких змінюється спрямованість електричних і магнітних полів. Відбувається механізм виникнення ударної хвилі зв'язаний з тепловим об'ємним розширенням, що розвивається в опроміненій ділянці біоматеріала в результаті дуже швидкого і нетривалого підвищення температури, що, коли миттєво виділяється тепло не встигає поширюватися шляхом теплопровідності, конвекції й ін. Таке швидке розширення біоматеріала призводить до появи механічних напруг і ударних хвиль, що поширюються в тканинах. У результаті теплового розширення може виникнути значно більший тиск чим тиск віддачі, що зв'язаний з викидом часток речовини з поверхні тканини.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали дослідження

Microcystis pulverea відноситься до відділу *Cyanophyta*, класу *Chroococcaceae*, порядку *Chroococcales*, родини *Microcystidaceae*, роду *Microcystis* і виду *Microcystis pulverea*. *M. pulverea* утворює щільні слизові безформні скупчення з дуже дрібних сферичних клітин [2].

Microcystis pulverea – одна з найпоширеніших планктонних ціанобактерій у прісних водоймах (рис 2.1). Зустрічається всюди, є продуцентом токсинів. Залежно від місцеперебування колонії часто варіюють, змінюючи свої обриси. Для *Microcystis pulverea* типові мікроскопічні слизові колонії, спочатку суцільні, а потім сітчасто– розірвані, округлі або слизові обриси.

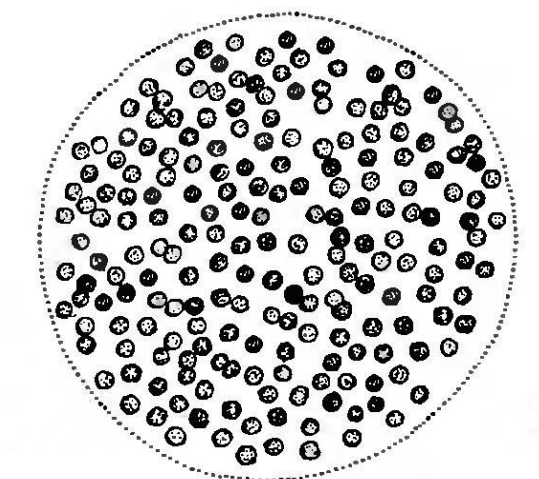


Рис. 2.1 Культура ціанобактерій *Microcystis pulverea*

Microcystis характеризується дрібними клітинами (діаметром всього в декілька мікрон), що володіють заповненими газом везикулами (також не мають окремих оболонок). Клітини зазвичай організовані в колонії (великі колонії, які можна

побачити за допомогою неозброєного ока), які починаються в сферичній формі, втрачаючи здатність когерентності ставати перфорованою або неправильною формою з плином часу. Ці колонії пов'язані густим слизом, що складається з складних полісахаридних з'єднань, включаючи ксилозу, манозу, глюкозу, фукозу, галактозу, рамнозу, серед інших з'єднань. Забарвлення протопластів світлий блакитно– зелений, існують темні або коричневі. Ці бульбашки забезпечують плавучість необхідних для *Microcystis pulverea*, щоб залишитися на рівні в товщі води, при якому вони можуть отримати оптимальне світло і рівня вуглекислого газу для швидкого росту.

Microcystis pulverea здатна призводити до великого цвітіння на поверхні шляхом поєднання швидкого регулювання поділу і плавучості шляхом виробництва заповнених газом везикул. Їх здатність регулювати плавучість є ключем до їх домінування в евтрофних водах, оптимально позиціонуючи себе в межах фотонної зони в стабільній водянній колонці.

Оскільки *Microcystis pulverea* вони можуть утворювати велике цвітіння на поверхні, вони здатні конкурувати з іншим фітопланктоном, по суті, монополізуючи світло в фотонній зоні.

Microcystis pulverea здатний до сильного поглинання фосфатів та азоту; вони сильно впливають на відношення азоту до фосфору (відношення «N: P»). [3]

У Південній Африці гребля Хартбеестпорт сильно піддається впливу *Microcystis pulverea* через підвищений рівень фосфатів і нітратів, що впливають із каналізаційних колекторів Йоганнесбурга, одного з небагатьох міст в світі, який охоплює континентальний вододіл і, отже, знаходиться вище за течією від великих гребель і річки [4].

Ціанобактерії можуть продукувати нейротоксини і гепатотоксинів, такі як мікроцистин і ціанопептолін. *Microcystis pulverea* – шкідливий колір ціанобактерій і може забруднювати питну воду мікроцистином [6].

2.2. Характеристика та підготовка поживного середовища

Середовищем для вирощування досліджуваної культури ціанобактерії було обрано середовище Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горхема. В склад даного середовища входять(г/л):

- NaNO_3 – 0,496;
- K_2HPO_4 – 0,039;
- MgSO_4 – 0,075;
- CaCl_2 – 0,036;
- Na_2SiO_3 – 0,058;
- Na_2CO_3 – 0,020;
- $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe}\cdot n\text{H}_2\text{O}$ – 0,006;
- $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ – 0,006;
- трилон Б – 0,001;
- мікроелементи – 0,08.

До мікроелементів належать такі елементи: залізо, марганець, цинк, мідь, бор, кремній, молібден, хлор, ванадій і кобальт. Замість нітрату натрію можна додати сечовину 1,054 г на 6 л. Середовище розводять до робочого об'єму (1 л). При приготуванні середовища всі солі додаються у вказаному порядку. Наступну сіль додають до середовища лише після повного розчинення попередньої.

Реактиви для приготування поживного середовища повинні бути хімічно чистими, оскільки ціанобактерії досить чутливі до забруднень. Цитрат заліза розчиняють окремо при нагріванні та додають вже до стерильного поживного середовища, після чого додають мікроелементи також в стерильних умовах.

У середовища після стерилізації перевіряють рН, воно повинне бути в межах 7,0 – 7,6. У випадку, коли середовище кисле до нього по краплях додають луг (соду Na_2CO_3 або 25 % розчин KOH), а у випадку надмірної лужності додають розбавлену сірчану кислоту [12].

2.3. Методи досліджень

Для визначення дії лазерного опромінення на накопичення фікобіліпротеїнів у ціанобактерій необхідно провести вирощування біомаси культури *Microcystis pulverea* культивуванням на поживному середовищі і вже потім проводити операції по впливу лазерного опромінення на культуру *Microcystis pulverea*.

Наступним етапом є здійснення впливу лазерного опромінювача на культуру *Microcystis pulverea* за різної експозиції опромінення.

Для виділення пігментів з ціанобактерій спочатку необхідно провести відділення культури від поживного середовища і вже потім проводити операції по виділенню пігментів.

Визначення якісного складу та кількісного вмісту пігментів складається з декількох етапів: екстракції, визначення сумарного вмісту, поділу на компоненти, виділення в чистому вигляді

Виділення пігментів (екстракція) з клітин водоростей і їх кількісне визначення мають свої особливості в залежності від об'єкта досліджень.

Здійснення того чи іншого етапу залежить від цілей і завдань досліджу.

2.4. Висновки до розділу

Отже, об'єкт дослідження культура *Microcystis pulverea* – одна з найпоширеніших планктонних ціанобактерій у прісних водоймах. Дана культура була обрана тому що вона здатна швидко накопичувати біомасу, яка легко відокремлюється від культурального середовища. Поживним середовищем для росту культури *Microcystis pulverea* є середовище Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горхема.

Схема досліджень наступна: одномодовий атомарно– газовий лазер безперервного режиму розміщують нерухомо, а досліджувана пробірка з ціанобактеріями розташовується на відстані від лазера. Дія лазерного опромінення тривала за різної експозиції – 2 хв, 3 хв, 5 хв, 7 хв, 9 хв, 12 хв, 15 хв.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

Загальна схема експериментальних досліджень, що проводились в дипломній роботі, представлена на рис. 3.1.





Рис. 3.1 Загальна схема експериментального дослідження

3.1. Культивування ціанобактерій

Культивування ціанобактерій (рис. 3.2) здійснювали в 5 колбах об'ємом 250 мл (при цьому об'єм поживного середовища складав 125 мл), температура культивування – 23 – 28 °С.



Рис 3.2 Колби з культурою *Microcystis pulvereae*

Ціанобактерії культивували на середовищі Фітцджеральда в модифікації Цендера і Горхема. рН середовища становило 7,2, освітленість 2 000 Лк.

Колби з 125 мл поживного середовища засівали суспензією водоростей об'ємом 25 мл. В якості засівної культури використовували *Microcystis pulvereae*.

Ріст ціанобактерій оцінювався за оптичною густиною у кюветах товщиною 1,07 мм на фотоелектроколориметрі за довжини хвилі 540 нм та 750 нм.

3.2. Вплив лазерного опромінення на культуру *Microcystis pulvereae*

Після 1 тижня культивування ціанобактерій відбирали проби культури в 10 пробірок.



Рис 3.3 Відібрані проби культури *Microcystis pulverea*

Далі ми здійснювали вплив лазерного опромінення на культуру *Microcystis pulverea* одномодовим атомарно– газовим лазером безперервного режиму роботи ЛГ– 78 з довжиною хвилі 0.63 мкм, призначеним для використання як джерело когерентного випромінювання.



Рис. 3.4 Блок схема лазерної установки.

Основними елементами випромінювача є: активний елемент і оптичний резонатор. Активний елемент являє собою двохелектродну газорозрядну трубку, наповнену інертним газом гелію і неону. При подачі високої напруги від джерела

живлення на електроди активного елемента в останньому виникає газовий розряд. На лицьовій панелі джерела живлення розташовані органи керування й індикації: Тумблер —вкл– выкл|| Індикація —мережа|| —Регулювання струму||

Джерело живлення являє собою високовольтний стабілізатор струму. Стабілізація струму здійснюється методом частотно– імпульсної і широко– імпульсної модуляції випрямленої напруги від мережі.

Схема досліджень наступна: одномодовий атомарно– газовий лазер безперервного режиму розміщують нерухомо, а досліджувана пробірка з ціанобактеріями розташовується на відстані від лазера. Дія лазерного опромінення тривала за різної експозиції – 2 хв, .

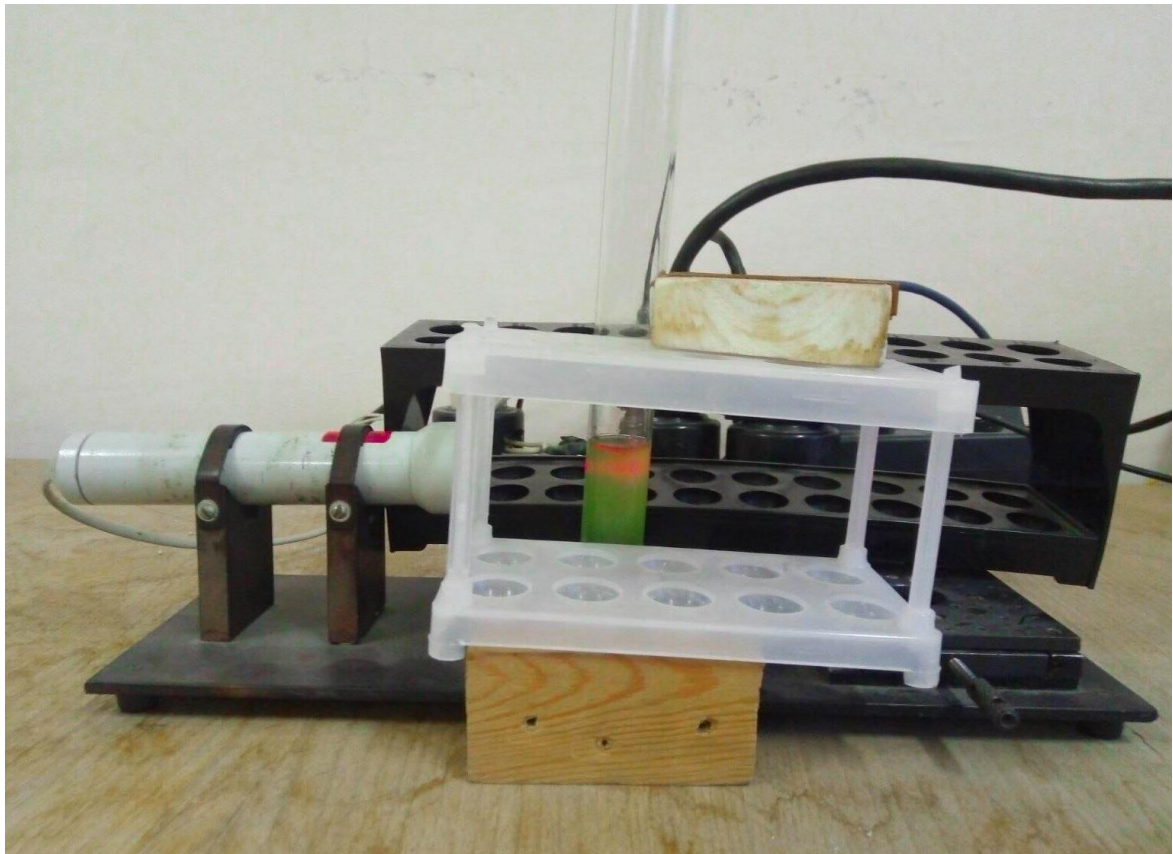


Рис 3.5 Вплив на ціанобактерії лазерного опромінювача

3.3. Вивільнення пігментів та дослідження на наявність фікобіліпротеїнів фотоелектроколориметром

Для відділення пігментів ціанобактерій спочатку необхідно провести відділення культури від живильного середовища методом фільтрації. 0,5 – 0,7 г зразків поміщали в порцеляновий розчин і розмелювали зразок скляним піском.

Для вивільнення пігментів фікобіліну з клітин ціанобактерій в пробірки додавали 5–10 мл дистильованої води (рН = 7,3 – 7,5) і поміщали на 12 годин у холод для вилучення пігментів.

Після екстракції фікобіліпротеїнів під впливом температури зразки поміщають у центрифугу при 5000 об / хв протягом 15 хвилин.

Отримані супернатанти досліджували на наявність фікобіліпротеїнів фотоелектроколориметром з довжиною хвилі: аллофікоціанін (АРС) – 650 нм, С–фікоціанін (С– РС) – 620 нм; С– фікоеритрин (С– РЕ) становить 565 нм. Супернатант – це прозора рідина, яка лежить над твердим залишком після центрифугування. Рідина зазвичай не містить осаду і має меншу щільність.

Як контроль ми використовували ціанобактерії, на які не впливали лазерним опроміненням.

Отриманні значення розраховували за такими формулами:

- Концентрація С– ФЕ

$$C_{C-ФЕ} = (0,003 \cdot D_{650} - 0,032 \cdot D_{620} + 0,079 \cdot D_{565}) \cdot \frac{V_1}{V_2}$$

де $C_{C-ФЕ}$ – концентрація С– ФЕ, мг/мл

$D_{650}, D_{620}, D_{565}$ – довжина хвилі, нм

V_1 – об'єм екстракту, мг

V_2 – об'єм проби, мг

- Концентрація С– ФЦ

$$C_{C-ФЦ} = (-0,091 \cdot D_{650} + 0,166 \cdot D_{620}) \cdot \frac{V_1}{V_2}$$

де $C_{C-ФЦ}$ – концентрація С– ФЕ, мг/мл

$D_{650}, D_{620}, D_{565}$ – довжина хвилі, нм

V_1 – об'єм екстракту, мг

V_2 – об'єм проби, мг

- Концентрація АФЦ

$$C_{АФЦ} = (0,159 \cdot D_{650} - 0,041 \cdot D_{620}) \cdot \frac{V_1}{V_2}$$

де $C_{АФЦ}$ – концентраці С– ФЕ, мг/мл

$D_{650}, D_{620}, D_{565}$ – довжина хвилі, нм

V_1 – об'єм екстракту, мг

V_2 – об'єм проби, мг

3.4. Визначення вмісту фікобіліпротеїнів у біомасі після лазерного опромінення на культуру *Microcystis pulverea*

Згідно табл. 3.1 збільшення концентрації фікобіліпротеїнів у культурі *Microcystis pulverea* після дії лазерного опромінення спостерігається за експозиції часу 2хв, 3хв, 5хв, 7хв в порівнянні з контролем. Найкращий результат показав експеримент лазерного опромінення за експозиції часу 7 хв, за якого збільшення концентрації фікобіліпротеїнів становить – С– фікоеритрини – 114,58%, С– фікоціаніни – 188,9%, аллофікоціаніни – 196,58% в порівнянні з контролем. При дії лазерного опромінення на культуру *Microcystis pulverea* за експозиції часу 9хв, 12хв, 15хв спостерігається зменшення концентрації фікобіліпротеїнів.

Таблиця 3.1.

Вміст фікобіліпротеїнів при дії лазерного опромінення за експозиції 2хв, 3хв, 5хв,
7хв, 9хв, 12хв, 15 хв

Фактори, якими впливали на культуру	Фікобіліпротеїни, мг/г сухої маси		
	С– ФЕ	С– ФЦ	АФЦ
Контроль	4,8	10,9	2,63
Вплив лазерного опромінення на культуру при експозиції 2хв	7,3	17,6	4,51
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів, %	52,08	61,46	71,48
	С– ФЕ	С– ФЦ	АФЦ
Вплив лазерного опромінення на культуру при експозиції 3хв	8,1	19,3	5,15
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів, %	68,75	77,06	95,8
	С– ФЕ	С– ФЦ	АФЦ
Вплив лазерного опромінення на культуру при експозиції 5хв	9,9	25,6	7,0
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів, %	106,25	134,86	166,16
	С– ФЕ	С– ФЦ	АФЦ
Вплив лазерного опромінення на культуру при експозиції 7хв	10,3	31,5	7,8
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів, %	114,58	188,9	196,58
	С– ФЕ	С– ФЦ	АФЦ
Вплив лазерного опромінення на культуру при експозиції 9хв	4,1	8,8	2,44
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів, %	–	–	–
	С– ФЕ	С– ФЦ	АФЦ
Вплив лазерного опромінення на культуру при експозиції 12хв	3,2	6,5	1,86
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів, %	–	–	–

	С– ФЕ	С– ФЦ	С– ФЦ
Вплив лазерного опромінення на культуру при експозиції 15хв	1,4	3,2	0,95
Підвищення вмісту фікобіліпротеїнів, %	–	–	–

Для більш наочного представлення були побудовані графіки залежності концентрації фікобіліпротеїнів у біомасі *Microcystis pulverea* від впливу лазерного опромінення за експозиції часу 2хв, 3хв, 5хв, 7хв, 9хв, 12хв, 15 хв (рис. 3.6 – 3.7).

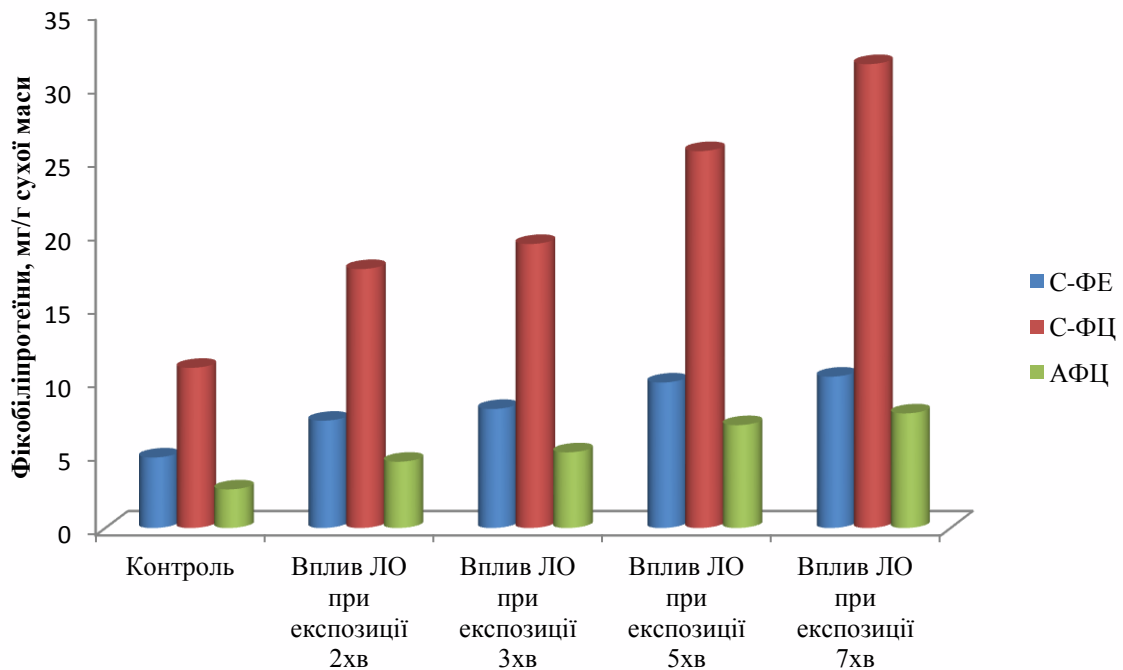


Рис. 3.6 Залежність концентрації фікобіліпротеїнів у біомасі *Microcystis pulverea* від впливу лазерного опромінення за експозиції 2хв, 3хв, 5хв, 7хв

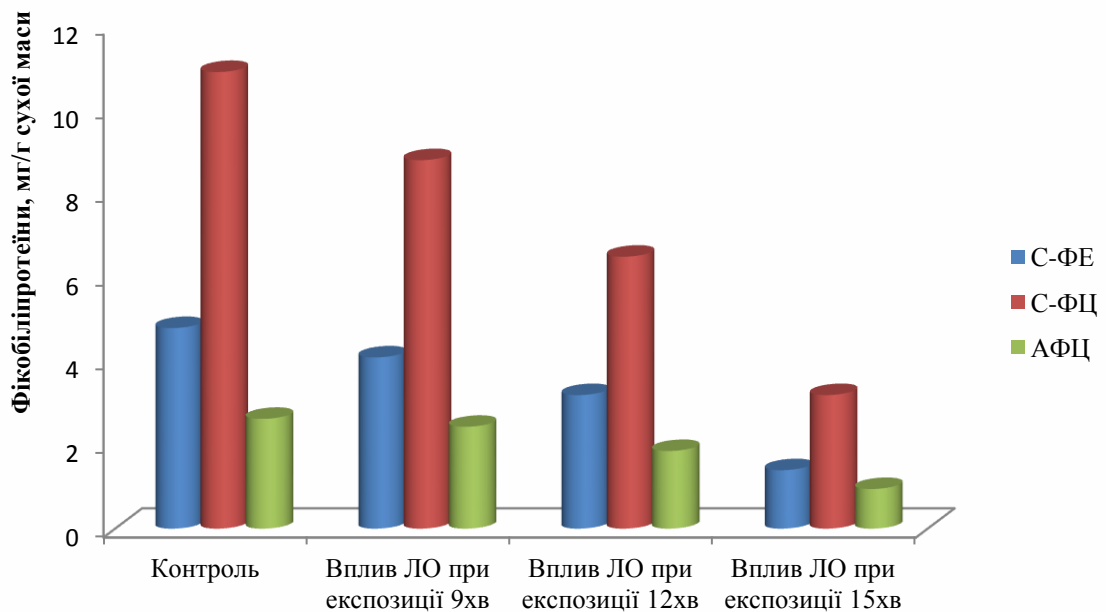


Рис. 3.7 Залежність концентрації фікобіліпротеїнів у біомасі *Microcystis pulverea* від впливу лазерного опромінення за експозиції 9хв, 12хв, 15хв

3.5. Висновки до розділу

Таким чином, вплив лазерного опромінення на рівень накопичення фікобіліпротеїнів у культурі *Microcystis pulverea* показав позитивні результати за експозиції часу 2хв, 3хв, 5хв, 7хв в порівнянні з контролем. Найкращий результат спостерігався при лазерному опроміненні за експозиції часу 7 хв, за якого збільшення концентрації фікобіліпротеїнів становить – С– фікоеритрини – 114,58%, С– фікоціаніни – 188,9%, аллофікоціаніни – 196,58% в порівнянні з контролем.

При дії лазерного опромінення на культуру *Microcystis pulverea* за експозиції часу 9хв, 12хв, 15хв спостерігається зменшення концентрації фікобіліпротеїнів.

РОЗДІЛ 4 ОХОРОНА ПРАЦІ

4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори у процесі технічної експлуатації дослідницької лабораторії відділу фізіології водоростей

Для осіб, що виконують дослідження вмісту фікобіліпротеїнів у культурі ціанобактерій в лабораторії (згідно ГОСТ 12.0.003 – 74. ССБТ. Опасные и вредные производственные факторы), небезпечні та шкідливі виробничі фактори наступні:

- рухомі частини виробничого обладнання;
- підвищений рівень вібрації;
- підвищений рівень шуму на робочому місці;
- підвищена запиленість та загазованість повітря робочої зони;
- підвищена або занижена температура повітря робочої зони;
- підвищений рівень електромагнітних випромінювань;
- недостатня освітленість робочої зони;
- токсичні;
- патогенні мікроорганізми і продукти їх життєдіяльності.

Рухомі незахищені частини механізмів та машин - потенційно небезпечний фізичний фактор у лабораторії.. Джерелом такої небезпеки стає обладнання, що має відкриті рухомі частини - центрифуги, насоси та інше. При необережному поводженні вони можуть стати причиною механічних травм працівників.

Шум і вібрація є шкідливими виробничими факторами, які викликають загальне захворювання організму людини.

Підвищення рівня шуму виникає в результаті експлуатації великої кількості обладнання, що розповсюджує коливання звукової хвилі в звуковому діапазоні. Джерелом шуму в лабораторії є вентиляційна і сушильна установки, насоси, центрифуги. Рівень шуму в таких приміщеннях коливається в межах 92 - 102 дБ при частоті 1000 Гц при нормі - 80 дБ

Підвищена температура повітря в робочій зоні - шкідливий фактор, що виникає при віддачі нагрітими частинами обладнання тепла у повітря приміщення, де працюють лаборанти. Джерелом підвищення температури в лабораторії можуть бути: автоклави, сушильні шафи, електричні плити. Внаслідок цього у людей погіршується тепловіддача тіла, підвищується втомлюваність, виникають розлади серцево-судинної та нервової системи.

Підвищена загазованість повітря робочої зони продуктами виділення мікроорганізмів та газами від поживного середовища - ще один зі шкідливих чинників у лабораторії, в якій використовують процес культивування - вирощування мікроорганізмів у біореакторах, в які завантажуються поживне середовище та з яких виділяються продукти їх метаболізму. Деякі з цих речовин з'являються у газоподібному стані, деякі мають властивість випаровуватись. Так у повітрі робочої зони накопичується суміш сторонніх газів. Це спричиняє нестачу кисню для процесу нормального дихання працівників та викликає подразнюючу дію на органи нюху .

При **недостатній освітленості робочої зони** зменшуються умови комфортної праці лаборантів за комп'ютером та з механізмами, можлива поява короткозорості, швидка втомлюваність. Причинами недостатньої освітленості є забруднені вікна, недостатня кількість світильників, неправильне розміщення робочого місця оператора відносно вікна та відносно світильників.

Дуже небезпечним фактором є робота з хімічними реактивами, які викликають **токсичність**. В лабораторії використовуються розведені розчини кислот, лугів та інші. Деякі з них мають властивість випаровуватись. Хімічні реактиви можуть викликати хімічні опіки, токсичну та подразнюючу дію.

4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів дослідницької лабораторії відділу фізіології водоростей

У лабораторії необхідно виконувати правила з охорони праці, для того щоб усунути або знизити вплив на працівників небезпечних і шкідливих виробничих

факторів. Тому для запобігання або зменшення впливу на персонал шкідливих і небезпечних виробничих факторів застосовують засоби колективного та індивідуального захисту.

Для забезпечення безпеки працівників в дослідницькій лабораторії від потенційної небезпеки рухомих незахищених частин механізмів та машин необхідно використовувати спеціальні загороджувальні конструкції. Ці конструкції обмежать доступ лаборантів до незахищених частин механізмів та машин. Рух таких механізмів чи машин обов'язково повністю зупиняють при проведенні профілактичних або налагоджувальних робіт.

Ефективними заходами щодо боротьби з шумом та вібрацією є:

- локалізація шуму – обмеження його розповсюдження;
- використання спеціальної архітектури та планування виробничих приміщень;
- використання індивідуальних засобів захисту.

Істотно знизити шум можна, якщо поставити на його шляху ізолюючі перешкоди: стіни, перегородки, перекриття, звукоізолюючі кожухи та екрани. Фізична суть звукоізоляції полягає в тому, що найбільша частина падаючої звукової енергії відбивається від спеціально виконаних огорож і тільки незначна частина проникає крізь огорожу.

Ефективним заходом щодо боротьби з шумом є зниження його в джерелі утворення. Для зниження шуму в центрифугах застосовують примусово мастило, матеріали прокладок і пружні вставки у з'єднаннях і т. п. Крім того, для боротьби з шумом в конструкцію обладнання вбудовують амортизуючі і звукогасящі пристосування. Як індивідуальні засоби захисту від впливу виробничого шуму використовують протишумні заглушки і навушники.

Засоби захисту від вібрацій у джерелах вібрацій ґрунтуються на урівноважуванні діючих сил і моментів у машинах і механізмах, балансуванні обертових деталей, застосуванні матеріалів з підвищеним внутрішнім тертям, поліпшенні технології виготовлення і т.ін. Зниження рівня вібрації на шляху її поширення досягається застосуванням віброізолюючих конструкцій та нанесення на віброуючі елементи машини в'язких або пружних матеріалів, яким притаманні значні

внутрішні втрати (антивібрит, агат, сендвічні конструкції, СКЛ-25 та інші). Зниження вібрації шляхом нанесення в'язких або пружних матеріалів досягає 2 - 10 дБ в смузі частот 31,5 – 8 000 Гц.

Для того, щоб позбутися підвищеної температури повітря в робочій зоні та підвищеної загазованості повітря необхідно встановлювати вентиляційні системи. Їх встановлюють біля апаратів та механізмів, що найбільше нагрівають (автоклави, сушильні шафи та інші), й в місцях виділення газів від мікроорганізмів, поживного середовища та готового продукту.

Для забезпечення електробезпеки в лабораторії, потрібно застосовувати окремо або в поєднанні один з одним такі технічні способи та засоби:

- захисне заземлення;
- занулення;
- захисне відключення;
- ізоляцію струмопровідних частин (робоча, додаткова, посилена, подвійна);
- компенсацію струмів замикання на землю;
- захисні пристрої;
- попереджувальну сигналізацію, блокування, знаки безпеки;
- засоби захисту й запобіжне пристосування.

Для забезпечення безпеки під час проведення робіт зі зняттям напруги в діючих електроустановках або поблизу них мають виконуватися такі технічні заходи:

- відключення установки (частини установки) від джерела живлення електроенергією;
- механічне замикання приводів, відключення комутаційних апаратів, зняття запобіжників, роз'єднання кінців живильних ліній та інші заходи, що забезпечують неможливість помилкової подачі напруги до місця роботи;
- установка знаків безпеки й огорожування струмопровідних частин, що залишаються під напругою, до яких у процесі роботи можна торкнутися або наблизитися на неприпустиму відстань;
- огороження робочого місця і установка знаків безпеки.

Для захисту людей від ураження електричним струмом при пошкодженні ізоляції застосовується захисне занулення. Зануленню підлягають всі металеві частини електрообладнання, які не ведуть струм, металеві корпуси щитків розподілення, сталеві труби електропроводок, металеві опори освітлення.

Опір пристрою заземлення, призначеного для відводу зарядів статичної електрики, не повинний перевищувати 100 Ом.

Захист від електромагнітного випромінювання здійснюється декількома шляхами:

- захист часом – треба планувати роботу за персональним комп'ютером так, щоб обов'язково була перерва через кожні 20 хвилин роботи;

- зменшення потужності випромінювання – можна здійснити за рахунок нанесення спеціального захисного шару на екран, або встановленням захисного екрану.

З метою профілактики несприятливого впливу ЕМВ від комп'ютера на користувача необхідно:

- встановити на робочому місці монітор, що відповідає сучасним вимогам стосовно захисту від випромінювання;

- не концентрувати на робочому місці великої кількості радіоелектронних пристроїв;

- вимикати екран, якщо на ньому не працюють, але знаходяться неподалік.

Система освітлення повинна задовольняти наступним вимогам.

По відношенню до вікон робочі місця повинні розміщуватися так, щоб природне світло падало збоку, переважно зліва.

Штучне освітлення у приміщеннях з ПК повинно здійснюватися системою загального рівномірного освітлення. У випадках переважної роботи з документами рекомендується застосування системи комбінованого освітлення (до загального освітлення додатково встановлюються світильники місцевого освітлення). При виборі приміщень для розміщення робочих місць з ПК необхідно враховувати, що вікна можуть викликати значну засліпленість у людей, що сидять перед ними, особливо літом і в сонячні дні.

У якості джерел світла при штучному освітленні рекомендується застосовувати (як правило) люмінесцентні лампи, які дають рівномірне освітлення. Допускається застосування ламп накаливання у світильниках місцевого освітлення.

Загальне освітлення слід виконувати у вигляді суцільних ліній або ліній, що перериваються, та розміщувати збоку від робочих місць (переважно справа), паралельно лінії зору робітників.

Застосування світильників без розсіювачів і екрануючих решіток забороняється.

Для профілактики захворювання очей під впливом зорового дискомфорту у першу чергу необхідно звернути увагу на дотримання режимів праці та відпочинку, на правильне розміщення монітору ПК. Необхідно, щоб центр екрана дисплея був нижчий від кута зору людини. Треба забезпечувати раціональне освітлення робочого місця та використовувати по можливості монітори з покращеними характеристиками.

Робота з хімічними реактивами передбачає виконання наступних вимог безпеки.

- Під час роботи слід точно дотримуватись порядку і послідовності операцій, вказаних у відповідних методичних вказівках. Тара з реактивами загального користування повинна знаходитись на визначеному місці.

- Працювати слід обережно, без зайвої квапливості, не проливати і не просипати реактиви. Надлишки реактивів забороняється зсипати назад у тару з чистими реактивами.

- При роботі з токсичними речовинами або такими, що мають неприємний запах, необхідно включати вентиляцію.

- Використовувати реактиви в такій кількості та такому хімічному посуді і приладах, як це вказано у відповідних методичних вказівках.

- Зливати залишки кислот, лугів, вогнєнебезпечних рідин та рідин з сильним запахом тільки в спеціальну тару.

- Категорично забороняється пробувати на смак або запах хімічні речовини, пити воду з хімічного посуду. Зі всіма речовинами слід поводитись як з більш-менш

шкідливими.

- Під час нагрівання рідин та твердих речовин забороняється нахилитись над тарою та обладнанням, щоб уникнути нещасного випадку в разі можливого викиду нагрітої речовини.

- При роботі з небезпечними леткими реактивами необхідно одягати спеціальні респіратори.

- При всіх роботах, коли можливе розбризкування їдких речовин (переливання кислот, лугів, або подрібнення чи розтирання в ступках, сплавлення та ін.) необхідно одягати захисні окуляри та спецодяг.

- Роботи зі скляними трубками, капілярами та посудом необхідно виконувати обережно, застерігатися поранень. Вставляти скляні трубки в отворискляного посуду слід без надмірних зусиль.

- Під час розведення концентрованих кислот, особливо сульфатної, слід лити її у воду, а не навпаки.

- На робочому місці категорично забороняється вживати їжу, пити воду, курити. Після закінчення роботи необхідно як слід вимити руки.

- У разі нещасного випадку слід негайно звернутися до санітарного пункту.

- По закінченню роботи необхідно привести в порядок своє робоче місце.

Всі працівники зобов'язані дотримуватись наступних правил, які забезпечують стерильність в роботі з мікробіологічним матеріалом і попереджують можливість зараження як на виробництві, так і в лабораторії.

- До приміщення мікробіологічної лабораторії заборонено заходити без спеціального одягу.

- Забороняється заносити до лабораторії сторонні речі.

- Не дозволяється виходити за межі лабораторії в халатах або одягати верхній одяг на халат.

- Двері мікробіологічної лабораторії повинні бути постійно зачиненими.

- В приміщенні мікробіологічної лабораторії категорично заборонено палити, вживати їжу, зберігати продукти харчування.

- Весь матеріал, який потрапляє до мікробіологічної лабораторії для аналізу

повинен трактуватися як інфікований.

- При використанні біологічного матеріалу не дозволяється ставити посуд, який містить матеріал для дослідження, безпосередньо на стіл. Для цього використовуються підноси або кювети, посуд попередньо протирають ззовні дезінфікуючим розчином.

- Переливання рідин, які містять патогенні мікроорганізми, здійснюють над посудиною з дезінфікуючим розчином.

- У випадках пошкодження посуду з мікробіологічним матеріалом або його витоку слід негайно повідомити відповідальну особу і провести заходи для обеззараження забрудненого одягу, частин тіла, предметів робочого місця.

- При роботі з мікробіологічним матеріалом необхідно використовувати загальноприйняті технічні прийоми, які виключають можливість контакту рук з мікробіологічним матеріалом.

- По закінченні роботи непотрібний біологічний матеріал та культури мікроорганізмів повинні бути знищені. Інструменти, які використовувалися в роботі, та поверхню робочого столу необхідно дезінфікувати.

- Необхідно також пильно слідкувати за чистотою рук. По закінченні роботи руки дезінфікуються.

- Необхідно обережно вносити мікробіологічний матеріал та культури мікроорганізмів у біореактор.

Специфіка мікробіологічних робіт вимагає, щоб приміщення лабораторії було ізольованим від інших кімнат. До мікробіологічної лабораторії належать: приміщення для бактеріологічних досліджень; стерильний бокс для виконання робіт в стерильних умовах; передбокс, де знаходиться стерильний матеріал; автоклав для стерилізації посуду, поживних середовищ та знешкодження відпрацьованого матеріалу; приміщення для миття посуду та приготування середовищ. Бокс повинен бути обладнаним бактерицидною лампою, стіни і підлога вистелені плиткою або лінолеумом, що забезпечує можливість використання дезінфікуючих розчинів при прибиранні кімнати. До необхідних інструментів та обладнання мікробіологічної лабораторії відносять: термостати, центрифуги, мікроскопи з освітлювачами, шафи

сушильні, спиртівки або газові пальники, піпетки пастерівські, шпатель скляні та металеві, пінцети, ножиці, предметні та покривні скельця, петлі бактеріологічні.

4.2.1. Розрахунок освітлення дослідницької лабораторії відділу фізіології водоростей

Освітлення є одним із головних факторів на робочу місці працівника. Адже недостатність освітлення приводить до напруги зору, ослаблює увагу, приводить до настання передчасної стомленості, а також впливає на синтез фікобіліпротейнів у ціанобактерій. Всі ці причини можуть привести до небажаних помилок дослідника та отримання невірних результатів від культури ціанобактерій, тому важливо правильно розрахувати освітленість приміщення. Існує три види освітлення - природне, штучне і комбіноване (змішане, тобто природне і штучне разом).

Для розрахунку штучного освітлення використовують три методи:

- метод коефіцієнта використання світлового потоку;
- метод питомої потужності;
- крапковий метод.

Для розрахунків загального рівномірного освітлення чистих приміщень застосовують метод коефіцієнта використання світлового потоку.

Світловий потік однієї лампи F визначаються за формулою:

$$F_p = \frac{E_n * S * K * Z}{n * \eta}, \text{ лм} \quad (4.1)$$

де E_n – нормоване значення освітленості, лк;

K – коефіцієнт запасу при проектуванні штучного освітлення ($K=1,3-1,8$);

S – площа приміщення, м²;

Z – коефіцієнт нерівномірності освітлення ($Z=1,1-1,15$);

n – кількість ламп;

η – коефіцієнт використання світлового потоку.

Коефіцієнт використання світлового потоку η залежить від:

- кофіцієнту відбиття стелі, стін та робочої поверхні ρ_n, ρ_c, ρ_p відповідно;
- індекса приміщення i , який дорівнює

$$i = \frac{a * b}{(a + b) * H_p}$$

H_p – висота підвісу світильників над робочою поверхнею;

H_l – висота робочої поверхні над рівнем підлоги.

- від групи світильників.

Вихідні дані:

Довжина $a = 11$ м; ширина $b = 7$ м; $h = 3,3$ м.

$K = 1,5$.

$\rho_n = 70\%$, $\rho_c = 50\%$, $\rho_p = 10\%$;

$Z = 1,14$;

$H_p = 2$ м; $E_n = 300$ лк.

Розрахуємо висоту підвісу світильників над робочою поверхнею:

$$i = \frac{11 * 7}{(11 + 7) * 2} = \frac{77}{36} = 2,14 \approx 2,25$$

Коефіцієнт використання світлового потоку $\eta = 38\% = 0,38$.

Площа приміщення $S = 11 \cdot 7 = 77$ (м²).

Якщо 1 лампа приходить на 4 м², то кількість ламп n дорівнює:

$$n = \frac{77}{4} = 19$$

Світловий потік однієї лампи F :

$$F = \frac{300 * 77 * 1,5 * 1,14}{19 * 0,38} = \frac{39501}{7,22} = 5471,053, \text{лм}$$

За розрахунковими значеннями світлового потоку добирають найближчу стандартну лампу, потік якої може відрізнятись від розрахункового не більше як на 10–20%, звідси:

5471,053 – 100 %

x_1 – 20 %

$$x_1 = 5471,053 \cdot 0,2 = 1094,211$$

$$5471,053 - 100 \%$$

$$x_2 - 10 \%$$

$$x = 5471,053 \cdot 0,1 = 547,105$$

$$5471,053 - 547,105 = 4923,948$$

$$5471,053 - 1094,211 = 6565,254$$

Отже, межі світлового потоку стандартної лампи: 4923,948...6565,254

Лампа ЛБ-80-4; $F = 5220$

З формули 4.1 знайдемо кількість ламп n :

$$n = \frac{E_H * S * K * Z}{F * \eta} = \frac{300 * 77 * 1,5 * 1,14}{5220 * 0,38} = 19,914 \approx 20, \text{ лм}$$

Отже, кількість ламп $n = 20$.

4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки у процесі технічної експлуатації дослідницької лабораторії відділу фізіології водоростей

Зазвичай причинами виникнення пожежної та вибухової небезпеки можуть стати: невірне розташування, несправність або порушення режимів роботи опалювальних систем, електрообладнання, вентиляційних систем, технічного обладнання; самозапалення і самозаймання матеріалів при неправильному їхньому зберіганні; розряди статичної виробничої і атмосферної електрики; необережне поводження з вогнем; відсутність чи несправність блискавковідводів на спорудах.

Небезпечних факторами, які спричиняють пожежу є: відкритий вогонь чи іскри; підвищена температура повітря, предметів і т.п.; токсичні продукти горіння; дим (високодисперсна аерозоль із твердими частками); знижена концентрація кисню; обвалення чи ушкодження будівель, споруд; вибух.

Для забезпечення пожежної та вибухової безпеки у процесі технічної експлуатації дослідницької лабораторії відділу фізіології водоростей, необхідні наступні заходи.

- Заходи, що усувають безпосередні чи можливі причини пожеж та вибухів (ведення технологічного процесу з урахуванням його пожежної та вибухової небезпеки, правильний вибір та використання електрообладнання, вентиляції, опалення).

- Заходи направлені на локалізацію (обмеження розмірів і розповсюдження) можливих пожеж та вибухів. Правильне планування і розміщення будівель і споруд з урахуванням рози вітрів, протипожежні розриви).

- Заходи, що забезпечують безпечну евакуацію людей і майна з будівлі, що горить (наявність і правильне утримання запасних виходів, розміщення виробництв по поверхам з урахуванням їхньої пожежної та вибухової небезпеки).

- Заходи направлені на успішне розгортання дій по гасінню пожеж: пожежний зв'язок; засоби сповіщення і пожежогасіння; водосховища; під'їзди до будинків; достатня навченість персоналу.

Для гасіння пожеж передбачається застосування вогнегасників, бочок з водою. Необхідно мати запас води для постачання на випадок пожежі, евакуаційні виходи – безпосередньо назвні та пожежні виходи на дах [20].

РОЗДІЛ 5

ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1. Шляхи утилізації біомаси ціанобактерій та отримання палива

Ціанобактеріальна біомаса містить багато цільових продуктів, цінних для різноманітних галузей сучасної біоекономіки: харчової, фармацевтичної та парфумерної промисловості. У наш час багато зусиль докладається у сфері генної інженерії задля модифікації фототрофних мікроорганізмів, особливо ціанобактерій, – продуцентів нових корисних речовин (цільових продуктів), які ними природним шляхом не синтезуються.

Актуальним напрямком сучасних досліджень також є екологічна біотехнологія та біоенергетика, які передбачають пряме використання багатотоннажної біомаси ціанобактерій та інших масових форм гідробіонтів як сировини для виробництва біопалива (біометану, біоетанолу і біодизелю) та мінералорганічного добрива. Для виробництва біоетанолу використовують метод дріжджової ферментації. У цьому випадку метою біотехнології є створення штамів ціанобактерій, синтезуючих велику кількість бактеріокрохмалю, або бактеріоглікогену, які є субстратом для спиртового бродіння. У випадку даної стратегії утилізації біомаси, ціанобактерії мають певні переваги над еукаріотами, оскільки їх клітинна стінка містить пептидоглікановий шар [24], вона здатна до лізису, на відміну від більшості водоростей, стінки яких складаються з полісахаридів та протеогліканів [25]. Крім того форма зберігання вуглеводів є дуже важливою, якщо біомаса використовується як субстрат для грибів, зокрема дріжджів під час спиртового бродіння.

Дієвим методом зниження рівня екологічної небезпеки від неконтрольованого розвитку ціанобактерій може бути збір ціанобактерій і використання їх як сировини для виробництва кондиційного біогазу.

Хоча універсального методу збирання та концентрування мікроводоростей не існує, для кожного конкретного виду водоростей можна розробити оптимальні

економні способи і методи. Після концентрування у більшості випадків застосовують зневоднення біомаси, в результаті збільшується максимальний термін її зберігання. Для мікродоростей застосовують такі способи зневоднення як барабанне, розпилююче, сублімаційне або сонячне сушіння. Екстрагування ліпідів та жирних кислот із біомаси здійснюється безпосередньо із ліофілізованої біомаси. Для екстрагування можуть бути використані такі розчинники як гексан, етанол, або суміш гексану і етанолу, що дозволяє вилучити до 98 % очищених ліпідів та жирних кислот. Також, встановлено, що у випадку порушення клітинної стінки водоростей за допомогою ультразвукової обробки вилучення цільового продукту збільшується з 4,8 % до 25,9 %. Із отриманої сировини біодизель виробляють за традиційною технологією – переетиризацією рослинних масел. Ліпідна сировина складається із 90–98 % (вагових) тригліцеридів та невеликої кількості моно- та дигліцеридів, містить вільні жирні кислоти (1–5 %) і невеликі кількості фосфоліпідів, фосфатидів, каротинів, токоферолів, сполук сірки та сліди води.

5.2. Енергетичний баланс культивування та виробництва біопалива

Традиційна технологія виробництва біодизелю з мікродоростей включає культивування, збирання врожаю, зневоднення та сушіння біомаси, вилучення олій з біомаси, як правило, за допомогою гексану, процес трансестерифікації та подальша переробка з отриманням метилестерів та гліцеролу. Залишкова біомаса (після відбирання олій) містить значну частину органічних сполук і може бути використана для виробництва біогазу. Це значно підвищує енергетичну цінність мікродоростей. Оцінювання енергетичної ефективності проведено відповідно до схеми, наведеної на рис. 5.1.

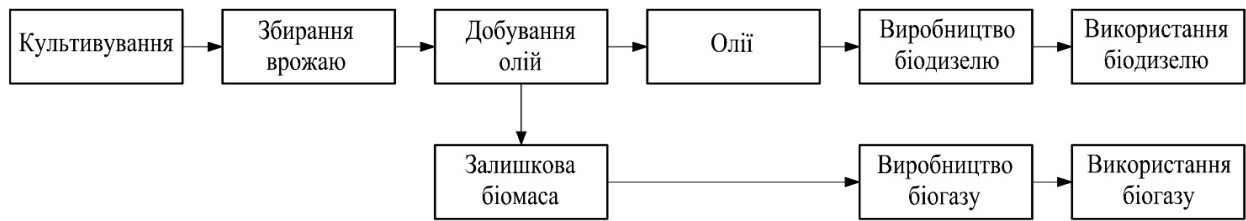


Рис. 5.1 Схема виробництва біопалива з мікродоростей

Для забезпечення процесів культивування необхідними є затрати енергії, перш за все електроенергії. За умови застосування існуючих технологій, питома витрата електроенергії на одиницю площі культиватора під час культивування у відкритих фотобіореакторах складає біля 1 Вт/м². Під час культивування у закритих фотобіореакторах витрата електроенергії складає 100 Вт/м³ корисної ємкості фотобіореактора. Для співставлення енергетичних витрат для відкритого в закритого фотобіореакторів потрібно питомі витрати привести до однакових одиниць. Враховуючи той факт, що товщина шару культуральної рідини у сучасних фотобіореакторів складає не більше $20 \cdot 10^{-2} \dots 30 \cdot 10^{-2}$ м (для забезпечення достатньої освітленості мікродоростей), приймаємо, що одному метру кубічному культуральної рідини відповідає 5 метрів квадратних площі культиватора (товщина шару рідини $20 \cdot 10^{-2}$ м). Тобто співвідношення між площинною та об'ємною питомою витратою електроенергії на культивування складає

$$W_{культ}^{площ} = 0,05 * W_{культ}^{об'ємн}$$

де $W_{культ}^{площ}$ – питомі площинні витрати електроенергії на культивування, Вт/м²;

$W_{культ}^{об'ємн}$ – питомі об'ємні витрати електроенергії на культивування, Вт/м³.

Відповідно питомі площинні витрати електроенергії для закритих фотобіореакторів складуть $W_{закриті\ ФБР}^{площ} = 0,05 \times 100 = 5$, Вт/м².

Після закінчення культивування клітини мікродоростей мають бути зібрані і піддані зневодненню. У процесі зневоднення видаляється переважно міжклітинна рідина (біля 90%), а переважна більшість внутрішньоклітинної рідини (більше 80%) залишається. Для збирання мікродоростей можна використовувати фільтрування

або центрифугування. Оскільки необхідність зневоднення мікроорганізмів часто виникає в різних сферах господарської діяльності, на ринку є достатня кількість обладнання для виконання цього процесу. Фільтр-преси є одним з найбільш розповсюджених типів обладнання для порівняно невеликих об'ємів зневоднення, наприклад для зневоднення осадів СВ. Головна складність під час експлуатації такого обладнання це те, що на фільтруючій тканині утворюється kek високої щільності, який важко з неї видаляти. Можна виділити два шляхи вирішення цієї проблеми. Перший – створення конструкцій фільтрів, у яких створюються сили, направлені тангенційно до площини фільтрування, і які запобігають налипанню кеку на фільтрувальній тканині. Другий – фільтрування через фільтрувальні тканини у вигляді неперервних стрічок з неперервним видаленням кеку, що налипає .

Для середніх та великих об'ємів одним з найбільш ефективних методів зневоднення можна вважати центрифугування. Але ефективність цього методу суттєво залежить від розміру клітин мікроорганізмів та особливо від їх питомої ваги. Центрифугування є ефективним для збирання врожаю під час вирощування дріжджів, питома вага яких складає біля $1,1 \text{ кг/м}^3$. Питома вага мікрородоростей залежить від вмісту олій у їх клітинах і може бути близькою, і навіть меншою ніж питома вага води. Це суттєво ускладнює центрифугування. Останнім часом для збирання мікрородоростей застосовують центрифуги зі стековими дисками Їх виробники декларують досить низькі питомі експлуатаційні витрати електроенергії (менше $1 \text{ кВт}\cdot\text{год/м}^3$).

Для полегшення процесу зневоднення, можна здійснювати попереднє ущільнення культурального середовища з мікрородоростями, використовуючи флокуляцію. Як флокулянти можуть використовуватися різні мінеральні солі (сульфат алюмінію, хлорид заліза тощо). Але додавання таких речовин може у подальшому ускладнювати зневоднення, є дорогим, та може негативно впливати на НПС .

Замість додавання флокулянтів можна використовувати автоматичну флокуляцію шляхом припинення аерації та швидкої зміни рН середовища. Такий метод не має згаданих попередньо недоліків .

Споживання електроенергії декларується всіма виробниками обладнання з прив'язкою до 1 м³ переробленого культурального середовища. Проте, це не можна вважати задовільним показником для вирощування мікробудростей. Набагато кориснішим показником є витрати енергії на 1 кг сухої біомаси. З огляду на це та на задекларовані енергозатрати виробниками, затрати енергії на одиницю сухої біомаси можуть відрізнятися залежно від способу і технології культивування. Відповідно до даних середні значення енергетичних затрат приведених до 1 м³ культурального середовища складають:

- фільтр-преси – $1,8 \cdot 10^6$ Дж/м³ (ступінь зневоднення 80%);
- центрифугування – $3,6 \cdot 10^6$... $14,4 \cdot 10^6$ Дж/м³ (ступінь зневоднення 90%).

Полегшення зневоднення може досягатися також біологічними методами, наприклад культивуванням на біоплівці або з використанням спеціальних гелів, з яких клітини мікробудростей видаляються легше.

Мікробудрості містять переважно два види ліпідів: полярні та нейтральні. Полярні включають переважно фосфоліпіди та гліколіпіди. Нейтральні включають моногліцериди, дигліцериди, тригліцериди, ізопреноїди, парфіни тощо. Вміст останніх у біомасі збільшується за стресових умов (недостатня кількість азоту у культуральному середовищі) і є бажаними компонентами для виробництва біопалива. Загалом світовий досвід свідчить, що за створення умов культивування, коли вміст ліпідів у біомасі росте, сам приріст біомаси зменшується. Для усунення такого протиріччя необхідним є розроблення специфічних технологій культивування з розділенням усього процесу у просторі на фази: початкові – з оптимальними умовами для приросту біомаси; кінцеві – з оптимальними умовами для збільшення у біомасі вмісту ліпідів. Ефективність видалення олій із зневодненої біомаси мікробудростей складає 90%.

Енергія, необхідна на добування олій із зневодненої біомаси за великих об'ємів виробництва, може бути прийнята за аналогом добування ріпакової олії з початкової біомаси. За даними середні питомі витрати на один кілограм отриманої олії складають: $0,35 \cdot 10^6$ Дж/кг електричної енергії і $1,75 \cdot 10^6$ Дж/кг теплової енергії.

Енергетична ефективність перероблення отриманих з мікроводоростей олій у біодизель складає 90%. За великих об'ємів виробництва середні питомі енергетичні витрати на виробництво одного кілограму біодизеля можна оцінити також за існуючими традиційними технологіями: $0,043 \cdot 10^6$ Дж/кг електричної енергії і $0,75 \cdot 10^6$ Дж/кг теплової енергії.

Енергетична ефективність перероблення залишкової біомаси мікроводоростей (після видалення олій) у біогаз складає 90%. За великих об'ємів виробництва середні питомі енергетичні витрати на виробництво одного нормального кубічного метра біогазу, оцінені за існуючими традиційними технологіями складають: $0,48 \cdot 10^6$ Дж/м³ електричної енергії і $1,5 \cdot 10^6$ Дж/м³ теплової енергії.

Розрахуємо можливу річну кількість отриманої енергії біопалива з одного квадратного метра культиватора для середніх погодних умов України під час використання фотобіореакторів відкритого і закритого типів.

Відповідно до попереднього розрахунку кількість біомаси мікроводоростей, що може бути отримана з одного квадратного метра культиватора у середньому по Україні складає $11,26 \text{ кг/м}^2$ у рік під час культивування у закритому фотобіореакторі і $3,22 \text{ кг/м}^2$ у рік під час культивування у відкритому фотобіореакторі.

За умови використання центрифугування з ефективністю 90% для збирання урожаю річна кількість зібраної біомаси складе:

$$P_{\text{центриф}}^{\text{біом}} = 0,9 * P_{\text{отрим}}^{\text{біом}} \cdot \frac{\text{кг}}{\text{м}^2}.$$

Таким чином:

- для закритого ФБР

$$P_{\text{центриф}}^{\text{біом.закр ФБР}} = 0,9 * 11,26 = 10,13, \frac{\text{кг}}{\text{м}^2};$$

- для відкритого ФБР

$$P_{\text{центриф}}^{\text{біом.відкр ФБР}} = 0,9 * 3,22 = 2,90, \frac{\text{кг}}{\text{м}^2}.$$

За умови вмісту олій у біомасі мікроводоростей на рівні 50% їх кількість у зібраній центрифугуванням біомасі складе:

$$P_{\text{олій центриф}}^{\text{олій}} = 0,5 * P_{\text{центриф}}^{\text{біом}} \frac{\text{кЗ}}{\text{м}^2}$$

Таким чином:

- для закритого ФБР

$$P_{\text{центриф}}^{\text{олій.закр ФБР}} = 0,5 * 10,13 = 5,06, \frac{\text{кЗ}}{\text{м}^2};$$

- для відкритого ФБР

$$P_{\text{центриф}}^{\text{олій.відкр ФБР}} = 0,5 * 2,90 = 1,45, \frac{\text{кЗ}}{\text{м}^2}$$

За умови ефективності відокремлення олій з біомаси мікроводоростей на рівні 90% кількість отриманої олії як сировини для виробництва біодизелю складе:

$$P_{\text{сировин}}^{\text{олій}} = 0,9 * P_{\text{центриф}}^{\text{біом}} \frac{\text{кЗ}}{\text{м}^2}$$

Таким чином:

- для закритого ФБР

$$P_{\text{сировин}}^{\text{олій.закр ФБР}} = 0,9 * 5,06 = 4,56, \frac{\text{кЗ}}{\text{м}^2};$$

- для відкритого ФБР

$$P_{\text{сировин}}^{\text{олій.відкр ФБР}} = 0,9 * 1,45 = 1,30, \frac{\text{кЗ}}{\text{м}^2}$$

За умови ефективності перероблення сировинної олії у біодизель на рівні 90% кількість отриманого біодизелю складе:

$$P_{\text{біодиз}} = 0,9 * P_{\text{сировин}}^{\text{олій}} \frac{\text{кЗ}}{\text{м}^2}$$

Таким чином:

- для закритого ФБР

$$P_{\text{біодиз}}^{\text{закр ФБР}} = 0,9 * 4,56 = 4,10, \frac{\text{кЗ}}{\text{м}^2};$$

- для відкритого ФБР

$$P_{\text{біодиз}}^{\text{відкр ФБР}} = 0,9 * 1,30 = 1,17, \frac{\text{кЗ}}{\text{м}^2}$$

Враховуючи, що теплота згорання біодизеля складає 37·106 Дж/кг, кількість потенційно отриманої енергії, запасеної у біодизелі складе:

$$E_{\text{біом. залиш}} = 23 \cdot 10^6 \cdot P_{\text{біом. залиш}}, \frac{\text{Дж}}{\text{м}^2}.$$

Таким чином:

- для закритого ФБР

$$E_{\text{біом. залиш}}^{\text{закр. ФБР}} = 23 \cdot 10^6 \cdot 5,57 = 121,11 \cdot 10^6, \frac{\text{Дж}}{\text{м}^2};$$

- для відкритого ФБР

$$E_{\text{біом. залиш}}^{\text{відкр. ФБР}} = 23 \cdot 10^6 \cdot 1,60 = 36,80 \cdot 10^6, \frac{\text{Дж}}{\text{м}^2}.$$

За умови ефективності перероблення залишкової біомаси у біогаз на рівні 90% кількість потенційно отриманої енергії, запасеної у біогазі складе:

$$E_{\text{біогаз}} = 0,9 \cdot E_{\text{біом. залиш}}, \frac{\text{Дж}}{\text{м}^2}.$$

Таким чином:

- для закритого ФБР

$$E_{\text{біогаз}}^{\text{закр. ФБР}} = 0,9 \cdot 128,11 \cdot 10^6 = 115,30 \cdot 10^6, \frac{\text{Дж}}{\text{м}^2};$$

- для відкритого ФБР

$$E_{\text{біогаз}}^{\text{відкр. ФБР}} = 0,9 \cdot 36,80 \cdot 10^6 = 33,12 \cdot 10^6, \frac{\text{Дж}}{\text{м}^2}.$$

Враховуючи, що середня теплота згорання біогазу складає $20 \cdot 10^6$ Дж/м³, кількість потенційно отриманого біогазу з залишкової біомаси складе:

$$P_{\text{біогаз}} = \frac{E_{\text{біом. залиш}}}{20}, \frac{\text{м}^3}{\text{м}^2},$$

Таким чином:

- для закритого ФБР

$$P_{\text{біогаз}}^{\text{закр. ФБР}} = \frac{115,30}{20} = 5,77, \frac{\text{м}^3}{\text{м}^2};$$

- для відкритого ФБР

$$P_{\text{біогаз}}^{\text{відкр. ФБР}} = \frac{33,12}{20} = 1,66, \frac{\text{м}^3}{\text{м}^2}.$$

Загальна кількість потенційно отриманої енергії запасеної в енергоносіях, виготовлених з культивованих мікроводоростей складе:

$$E_{\text{запас. МКВ.}} = E_{\text{біодиз.}} + E_{\text{біогаз.}} \cdot \frac{\text{Дж}}{\text{м}^2}.$$

Таким чином:

- для закритого ФБР

$$E_{\text{запас. МКВ.}}^{\text{закр. ФБР}} = (151,80 + 115,30) * 10^6 = 267,10 * 10^6, \frac{\text{Дж}}{\text{м}^2};$$

- для відкритого ФБР

$$E_{\text{запас. МКВ.}}^{\text{відкр. ФБР}} = (43,29 + 33,12) * 10^6 = 76,41 * 10^6, \frac{\text{Дж}}{\text{м}^2}.$$

5.3. Висновки до розділу

Отже, біомаса ціанобактерій, виділена від культурального середовища, може бути використана для виробництва малотоннажних цінних продуктів із унікальними властивостями. Багатотонажну біомасу природного походження можна використовувати для виробництва палива (біометану, біоетанолу та біодизелю). Загальна кількість потенційно отриманої енергії запасеної в енергоносіях, виготовлених з культивованих мікроводоростей складає для відкритого фотобіореактора – $267,10 * 10^6$ Дж/м², для закритого фотобіореактора – $76,41 * 10^6$ Дж/м².

ВИСНОВКИ

1. Фікобіліпротеїни – це водорозчинні пігменти червоних водоростей та ціанобактерій, які є білками з групи хромопротеїнів. З ціанобактерій виділені в кристалічному вигляді три фікобіліпротеїни, що відрізняються за спектрами поглинання.

2. З'ясовано, що на збільшення рівня накопичення фікобіліпротеїнів у ціанобактерії впливає дія світла різної інтенсивності і якості, температура та склад поживного середовища.

3. Досліджено вплив лазерного опромінення на рівень накопичення фікобіліпротеїнів у культурі *Microcystis pulverea*, який показав позитивні результати за експозиції часу 2хв, 3хв, 5хв, 7хв в порівнянні з контролем. Найкращий результат спостерігався при лазерному опроміненні за експозиції часу 7 хв, за якого збільшення концентрації фікобіліпротеїнів становить – С– фікоеритрини – 114,58%, С– фікоціаніни – 188,9%, аллофікоціаніни – 196,58% в порівнянні з контролем. При дії лазерного опромінення на культуру *Microcystis pulverea* за експозиції часу 9хв, 12хв, 15хв спостерігається зменшення концентрації фікобіліпротеїнів.

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Андріюк Є. І. Ціанобактерії / Є. І. Андріюк, Ж. П. Коптева, В. В. Заніна. – Київ: Наукова думка, 2007. – 325 с.
2. Багнюк В. М. Літичні бактерії в активному мулі станції біохімічної очистки стічних вод / В. М. Багнюк, Л. С. Ноженко, О. А. Закордонець. – Київ: Мікробіологія, 2003. – 36 с.
3. Ефимов А. А. Синезеленые водоросли гидротерм Камчатки как сырье для получения биологически активных веществ / А. А. Ефимов, М. В. Ефимова // Фундаментальные исследования. – 2007. – № 10. – С. 71–72.
4. Борисова К. В. Видовий склад бактерій, мікрководоростей в культурі / К. В. Борисова. – Харків: Альгологія, 2006. – 320 с.
5. Лось С. И. Влияние мочевины на спектральные свойства фикобилиновых пигментов водорослей / С. И. Лось // Альгология. – 2009. – Том 19, № 1. – С. 25–33.
6. Борисова К. В. Бактерії роду *Rhodococcus*, відповідні зеленим водоростям в природі і при лабораторному культивуванні / К. В. Борисова, Т. М. Ногіна. – Київ: Гідробіологія, 2007. – 61 с.
7. Поспелова Н. В. Содержание фикобилипротеинов в некоторых видах красных водорослей Черного моря / Н. В. Поспелова, М. В. Нехорошев // Экология моря. – 2002. – Вып. 61. – С. 78–80.
8. Плетнева С. Д. Лазеры в клинической медицине / С. Д. Плетнева. – Москва: Медицина, 2006. – 332 с.
9. Ефимов А. А. Обоснование использования синезеленых водорослей для выделения хлорофилла и фикобилипротеинов как пищевых красителей и биологически активных веществ/ [А. А. Ефимов, Т. П. Белова, М. В. Ефимова] //Фундаментальные исследования. – 2007. – №11. – С. 77–80.

10. Бухарін О. В. Патогенні бактерії в природних екосистемах / О. В. Бухарін, В. Ю. Литвин. – Львів: УрОРАН, 2004. – 276 с.
11. Бухарін О. В. Взаємодія популяцій мікродоростей і бактерій в модельній системі / О. В. Бухарін, В. Ю. Немцева. – Тернопіль: Успіхи сучасної біології, 2008. – 47 с.
12. Безуглий П. О. Фармацевтична хімія: Підручник / П. О. Безуглий. – Вінниця: Нова Книга, 2008. – 560 с.
13. Нековаль І. В. Фармакологія: підручник (ВНЗ I–III р. а.) / І. В. Нековаль, Т. В. Казанюк., 2016. – 552 с.
14. Гусев М. В. Биология синезеленых водорослей / Гусев Михаил Викторович. – М.: Изд. МГУ, 2008. – 128 с.
15. Костяев В. Я. Биология и экология азотфиксирующих синезелёных водорослей пресных вод / В. Я. Костяев. – Ленинград : Наука, 2006. – 135 с.
16. Сорокина К. Н. Потенциал применения микроводорослей в качестве сырья для биоэнергетики / К. Н. Сорокина, В. А. Яковлев, А. В. Пилигаев., 2012. – 156 с.
17. Мусієнко М. М. Фізіологія рослин: Підручник / М. М. Мусієнко. – Київ : Либідь, 2005. – 808 с.
18. Никитина К. А. Влияние некоторых органических веществ на рост на свету и отмирание в темноте сине-зеленой водоросли *Microcystis pulverea* / Никитина К. А., Гусев М. В. // Физиология растений. – 2007. – 23, № 6. – С. 1219 – 1224
19. Горюнова С. В. Синезеленые водоросли: биохимия, физиология, роль в практике / Горюнова С. В., Ржанова Г. Н., Орлеанский В. К. – М: Наука, 2009. – 228 с.
20. Запорожець О. І. Основи охорони праці / О. І. Запорожець, В. А. Яковлев, А. В. Пилигаев. – Київ: Центр учбової літератури, 2009. – 259 с.
21. Винберг Г. Г. Первичная продукция водоемов / Г. Г. Винберг– Минск: Изд-во АН БССР, 2010. – 301 с.

22. Демецкий А. М. Введение в медицинскую магнитологию / А. М. Демецкий, В. Н. Чернов, Л. И. Попов. – Ростов на Дону: Рост. ун-та, 2011. – 96 с.
23. Соловьев Г. Р. Магнитотерапевтическая аппаратура / Г. Р. Соловьев. – Москва: Медицина, 2008. – 174 с.
24. Пресман А. Е. Электромагнитные поля и живая природа / А. Е. Пресман. – Москва: Наука, 2006. – 296 с.
25. Carmichael W.W. The toxins of cyanobacteria // *Sci. Amer*, 2004. – P.104
26. Fritsch F. E. The structure and reproduction of the Algae.– Cambridge : Univ. press, 2005.–Vol. 1.–791 p.
27. Y. Chen, J. Wang, W. Zhang, L. Chen, L. Gao, T. Liu. Forced Light/Dark Circulation Operation of Open Pond for Microalgae Cultivation. *Biomass and Bioenergy*. 2013. Vol. 56. PP. 464–470.
28. Kreitlow S., Mundt S., Lindequist U. Cyanobacteria—a potential source of new biologically active substances // *Journal of Biotechnology*. – 1999. – Vol. 70 (1 – 3). – P. 61 – 63.
29. Rito –Palomares, Nunez L., Amador D. Practical application of aqueous two–phase systems for the development of a prototype process for c–Phycocyanin recovery form *Spirulina maxima* // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2001. – № 76. – P. 1273 –1280
30. Namikoshi M. Bioactive compounds produced by cyanobacteria / M. Namikoshi, K. L. Rinehart // *J. Industr. Microbiol. Biotechn*, 2006. – N. 17. – P. 373– 384.
31. Kreitlow S., Mundt S., Lindequist U. Cyanobacteria—a potential source of new biologically active substances // *Journal of Biotechnology*, 2009. – Vol. 70 (1 – 3). – P. 61– 63