

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА**

**Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології**

**ВИКОРИСТАННЯ НЕОРГАНІЧНИХ КОАГУЛЯНТІВ НА ОСНОВІ
ФЕРУМУ ДЛЯ РЕГУЛЯЦІЇ ЧИСЕЛЬНОСТІ ЦІАНОБАКТЕРІЙ**

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Виконала:

студентка 6 курсу, 607 групи

Козак Анна-Марія Русланівна

Керівник:

кандидат біологічних наук,

доцент **Чебан Л.М.**

До захисту допущено

на засіданні кафедри

протокол №_____ від _____ 2024 р.

Зав. кафедрою _____ проф. Копильчук Г.П.

Чернівці – 2024

Анотація

Робота присвячена дослідженню ефективності коагулянтів на основі заліза у боротьбі з ціанобактеріями, зокрема *Microcystis* sp., у водному середовищі. У ході експерименту було оцінено вплив різних сполук (FeSO_4 , FeCl_3 , та Fe-EDTA) на морфологічні зміни культури ціанобактерій, зміни pH середовища та токсичність цих сполук. Встановлено, що коагулянти на основі заліза сприяють утворенню флокул і зменшенню оптичної густини культури, що вказує на ефективність осадження клітин. При цьому, застосування хелатної форми заліза (Fe-EDTA) продемонструвало найкращі результати, з мінімальними змінами pH і низьким рівнем токсичності. Отже, дослідження підтвердило перспективність використання коагулянтів на основі заліза для зниження чисельності ціанобактерій, що є важливим для покращення якості води та боротьби з водорослевими цвітіннями.

Ключові слова: коагулянти, коагуляція, цвітіння ціанобактерій, *Microcystis pulvereae*, ціанобактерії, ціанотоксини.

Abstract

The work is devoted to investigating the effectiveness of iron-based coagulants in combating cyanobacteria, specifically *Microcystis* sp., in aquatic environments. The experiment evaluated the impact of various compounds (ferric sulfate, ferric chloride, and Fe-EDTA) on morphological changes in the cyanobacterial culture, changes in pH levels, and the toxicity of these compounds. It was found that iron-based coagulants promote the formation of flocs and a reduction in optical density, indicating effective cell sedimentation. Notably, the use of the chelated form of iron (Fe-EDTA) showed the best results, with minimal pH changes and low toxicity levels. Thus, the research confirmed the potential of iron-based coagulants in reducing cyanobacterial populations, which is crucial for improving water quality and controlling algal blooms.

Ключові слова: coagulants, coagulation, cyanobacterial bloom, *Microcystis pulvereae*, cyanobacteria, cyanotoxins.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

ЗМІСТ

Вступ	4
Розділ I. Огляд літератури	6
1.1. Токсини ціанобактерій	6
1.2. Способи боротьби із ціанобактеріями	11
1.3 Коагулянти як інструмент контролю цвітіння ціанобактерій	19
1.4. Вплив іонів Феруму на клітини бактерій	21
Розділ II. Матеріали та методи дослідження	26
2.1. Матеріали дослідження	26
2.2. Схема дослідження	28
2.3. Методи дослідження	30
2.4. Статистична обробка результатів	33
Розділ III. Результати дослідження та їх обговорення	34
Висновки	48
Список використаної літератури	50
Додатки	56
Додаток А. Техніка безпеки в лабораторії біотехнологічного профілю	57
Додаток Б. Публікації за результатами дослідження	59

ВСТУП

Ціанобактерії є одними з найдавніших фотосинтезуючих організмів, які відіграють важливу роль у функціонуванні водних екосистем. Однак, у певних умовах ціанобактерії можуть інтенсивно розмножуватися, спричиняючи явище, відоме як «цвітіння води». Це явище, що супроводжується зміною кольору води та утворенням біоплівки на її поверхні, стає серйозною екологічною проблемою. Цвітіння води спричиняє зниження вмісту кисню у водоймах, що негативно впливає на водну фауну, погіршує якість питної води та створює несприятливі умови для використання водойм у рекреаційних цілях [6, 53].

Багато видів ціанобактерій здатні продукувати токсини, відомі як ціанотоксини, які можуть бути небезпечними для людей, тварин і риб. Однак найбільшу загрозу представляють представники роду *Microcystis*. Серед найпоширеніших токсинів виділяють мікроцистини, анатоксини, циліндроспермопсини та ліпополісахариди [6, 19, 44, 53]. Ці токсини мають широкий спектр впливу: від ураження печінки та нервової системи до розвитку онкологічних захворювань. Особливо гостро проблема постає у водоймах, які використовуються як джерела питної води, адже навіть після традиційних методів очищення ціанотоксини можуть залишатися у воді, створюючи загрозу для населення.

Для боротьби із цвітінням води застосовують різноманітні методи, які умовно можна поділити на фізичні, хімічні та біологічні. Серед фізичних методів виділяють аерацію води, фільтрацію, ультрафіолетове опромінення та використання ультразвуку [50]. Біологічні підходи включають застосування природних антагоністів ціанобактерій, наприклад, інших мікроорганізмів або спеціалізованих рослин [27, 43]. Хімічні методи, у свою чергу, базуються на використанні різноманітних реагентів, серед яких коагулянти займають особливе місце [28, 41].

Коагулянти – це речовини, які здатні знижувати концентрацію суспендованих частинок, включаючи ціанобактерії, шляхом утворення флокул і їх подальшого осадження. Особливу увагу привертають коагулянти на основі сполук заліза, таких як сульфат заліза FeSO_4 , хлорид заліза FeCl_3 та хелатна форма заліза Fe-EDTA. Їхня дія базується на взаємодії з клітинами ціанобактерій та продуктами їхньої життєдіяльності, що дозволяє ефективно осаджувати клітини без значного впливу на екосистему [52].

Застосування залізовмісних коагулянтів є перспективним напрямом боротьби з цвітінням води, адже вони не лише забезпечують осадження ціанобактерій, а й сприяють зниженню концентрації ціанотоксинів у воді [26].

Тому метою даної роботи було оцінити вплив коагулянтів на основі заліза на клітини *Microcystis pulverea*, з подальшим їх використанням для регуляції чисельності ціанобактерій у водних екосистемах.

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

1. Здійснити накопичувальне культивування культури *Microcystis pulverea* для моделювання процесу «цвітіння води»;
2. Провести інкубацію *Microcystis pulverea* з різними сполуками на основі заліза: FeSO_4 , FeCl_3 , Fe-EDTA;
3. Здійснити контроль pH та оптичної густини культури *Microcystis pulverea* до та після інкубації;
4. Провести мікроскопічний аналіз зразків клітин *Microcystis pulverea* після інкубації;
5. Визначити співвідношення живих та мертвих клітин *Microcystis pulverea* за дії коагулянтів на основі феруму;
6. Розрахувати коефіцієнт токсичності досліджуваних сполук;
7. На основі проведених досліджень запропонувати стратегію використання неорганічних флокулянтів на основі феруму задля регуляції чисельності ціанобактерій у водних екосистемах.

РОЗДІЛ І. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Токсини ціанобактерій

Ціанобактерії - це фотосинтезуючі мікроорганізми, які є домінуючими первинними виробниками у водних екосистемах і роблять значний внесок у первинне виробництво в наземних екосистемах. У водних середовищах, таких як узбережжя морів та озера, вони можуть утворювати масові скупчення в умовах евтрофікації, підвищеної концентрації CO₂, зростання температури води або інтенсивного освітлення. За таких обставин ціанотоксини можуть досягати високих концентрацій у водах і становити загрозу здоров'ю та екології [46].

Незважаючи на те, що цвітіння водоростей було відоме з давніх часів, кілька досліджень показують, що в даний час воно зростає в усьому світі, головним чином через зміну клімату. Аналіз супутникових зображень за останні три десятиліття також показав, що цвітіння збільшилося у прісноводних озерах та океанах, що свідчить про те, що зміна клімату є лише одним із факторів, що сприяють масовому цвітінню ціанобактерій.

Одним із ключових чинників розвитку цвітіння є евтрофікація. Збагачення води азотом (N) і фосфором (P), переважно внаслідок сільськогосподарських і промислових викидів, сприяє цьому процесу, особливо для не-N₂-фіксуючих видів *Microcystis spp.*, які часто домінують серед ціанобактерій в озерах [20].

Ціанобактерії відомі своєю здатністю продукувати сполуки, такі як 2-метилізоборнеол і геосмін, які спричиняють неприємний запах і смак у питній воді. Проте за останні два десятиліття дослідницька увага все більше зосереджувалася на шкідливих метаболітах, які ці мікроорганізми також можуть синтезувати. Оскільки ціанотоксини асоціюються з численними випадками отруєння як у людей, так і у тварин, вони стали значною

екологічною проблемою та викликають занепокоєння щодо громадського здоров'я.

Ціанобактерії здатні синтезувати широкий спектр вторинних метаболітів з різною біологічною або біохімічною активністю, серед яких деякі є потужними токсинами, відомими як ціанотоксини. Ціанотоксини утворюють різномірну групу сполук, що відрізняються як хімічними, так і токсикологічними властивостями. З огляду на токсикологічні мішені, ціанобактеріальні токсини поділяються на гепатотоксини, нейротоксини, цитотоксини, дерматотоксини та подразливі токсини [18].

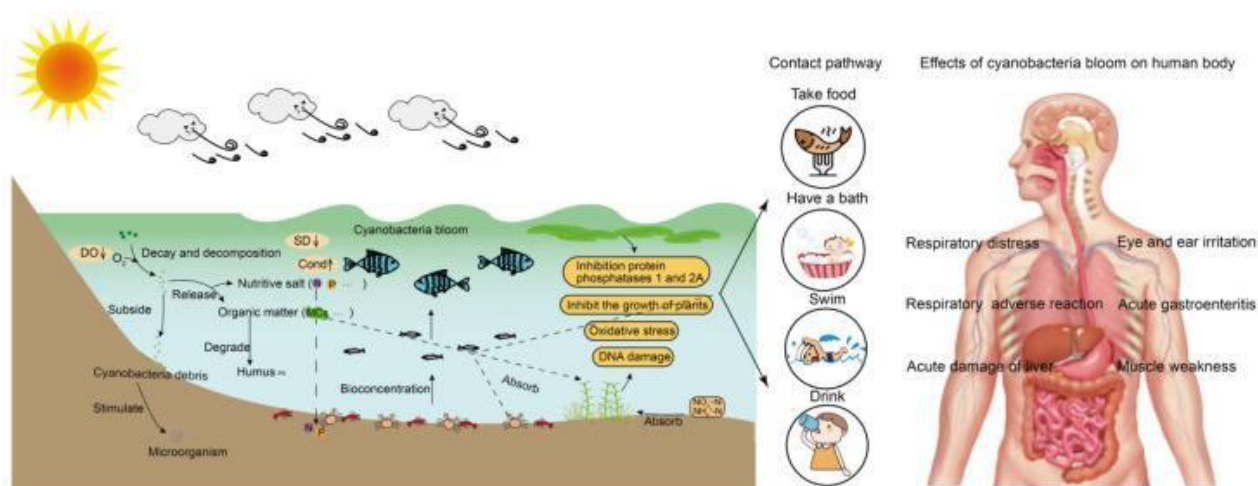


Рис.1.1. Основна небезпека цвітіння ціанобактерій для водоем, гідробіонтів і організму людини. (DO: розчинений кисень; SD: прозорість води; Cond: провідність; N: азот; P: фосфор; MCs: мікроцистини) [54].

З точки зору хімічної структури, ціанотоксини класифікують на декілька основних груп: пептиди, гетероциклічні сполуки (алкалоїди) та ліпідні сполуки. Ціанобактеріальні ліпополісахариди, що є компонентом клітинної стінки всіх ціанобактерій, також часто класифікують як ціанотоксини, оскільки вони мають певну токсичну дію [45].

Мікроцистини, мабуть, є найбільш поширеними ціанотоксинами в навколишньому середовищі, і вони присутні у великих кількостях у біомасі ціанобактерій (до 1% сухої ваги). Незважаючи на їх інтенсивні дослідження, природна фізіологічна або екологічна функція мікроцистинів недостатньо

вивчена [40]. Мікроцистини являють собою сімейство моноциклічних гептапептидів що складаються з семи амінокислот, включаючи кілька D-амінокислот і дві незвичайні амінокислоти, а саме N-метилдегідроаланін (Mdha) і гідрофобну β -амінокислоту, 3-аміно-9-метокси-2-6,8-триметил-10-фенілдека-4,6-дієнова кислота. Молекулярна маса мікроцистинів коливається в діапазоні від 909 до 1115 (рис 1.2.).

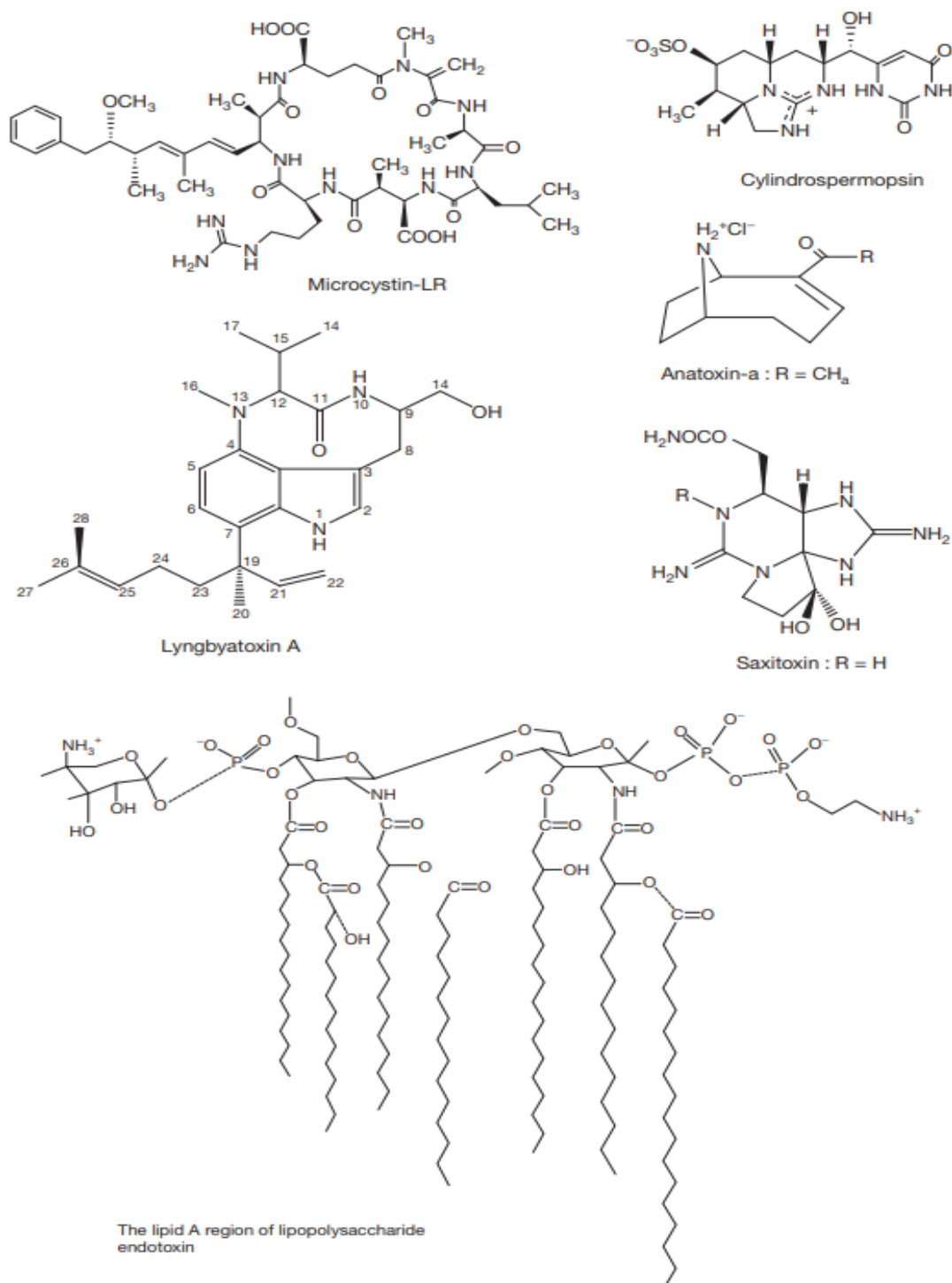


Рис.1.2. Хімічна будова ціанотоксинів [32]

Відомо, що гепатотоксичні мікроцистини (МС) синтезуються кількома родами ціанобактерій, такими як *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Anabaenopsis*, *Nostoc* і *Hapalosiphon*. Дослідження показали, що біосинтез і позаклітинна концентрація мікроцистину підвищуються під впливом інтенсивного освітлення та червоного світла, що може впливати на рівень токсичності цвітіння ціанобактерій у водних екосистемах [32].

Мікроцистини накопичуються в клітинах печінки хребетних завдяки активному транспорту за допомогою високоактивного транспортера органічних аніонів, що є частиною системи транспорту жовчних кислот. Загибель хребетних зазвичай обумовлена серйозними ураженнями печінки, що починаються з дезорганізації цитоскелета і можуть включати утворення порушених клітин, руйнування клітинних структур, перекисне окислення ліпідів, втрату цілісності мембран, пошкодження ДНК, апоптоз, некроз, внутрішньопечінкову кровотечу, що призводить до летального геморагічного шоку.

Основним механізмом токсичності є необоротне інгібування протеїнфосфатів 1 і 2А, які є ключовими регуляторними ферментами в каталізі дефосфорилювання залишків серину/треоніну в різних фосфопротеїнах (структурні білки, ферменти, регулятори). Інгібування протеїнових фосфатаз супроводжується втратою цілісності цитоскелету та подальшим цитолізом або апоптозом, головним чином гепатоцитів [32, 40].

Доведено, що мікроцистини стимулюють утворення активних форм кисню (АФК), які можуть призводити до серйозних ушкоджень клітин, таких як перекисне окислення ліпідних мембран, генотоксичність та модифікація апоптозу. Утворення АФК вважається найбільш імовірним механізмом, що спричиняє окислювальні пошкодження ДНК, генотоксичні та кластогенні ефекти мікроцистинів. Проте точний механізм окислювального стресу, індукованого мікроцистинами, залишається недостатньо дослідженим.

Циліндроспермопсин є одним із нещодавно відкритих ціанобактеріальних токсинів. Циліндроспермопсин (CYN) — це трициклічний

алкалоїд цитотоксин, вперше виділений та ідентифікований у 1992 році. Дана сполука виробляється представниками родів *Cylindrospermopsis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Raphidiopsis*. Циліндроспермопсин потужно пригнічує синтез білка і є генотоксичним, що спричиняє втрату хромосом і розрив ланцюга ДНК. Молекула токсину являє собою сульфатований цвіттеріон гуанідінія і стабільна при зміні температури, світла та рН. Він також добре розчиняється у воді та має відносно низьку молекулярну масу 415 Да [24].

Ціанобактеріальні нейротоксини, зокрема анатоксини, сакситоксини та споріднені сполуки, можуть порушувати нормальну нервово-м'язову передачу, що у високих дозах призводить до паралічу дихання і навіть смерті у людей та тварин. Анатоксин-а, який є вторинним аміном, діє як постсинаптичний антагоніст ацетилхоліну, викликаючи параліч, асфіксію та смерть. Сакситоксини або карбаматні токсини блокують напругозалежні натрієві канали, що призводить до паралічу та, у тяжких випадках, смерті. Спершу анатоксин-а був виявлений у *Anabaena*, а згодом його продукування зафіксували також у *Oscillatoria* та *Aphanizomenon* [32].

Ліпополісахариди LPS, або ендотоксини, як їх зазвичай називають, є основними компонентами клітинної стінки більшості грамнегативних бактерій і ціанобактерій. Молекули ЛПС складаються з трьох основних частин: О-антигенів, корових полісахаридів і фрагментів ліпиду А. Ділянка ліпідів А відповідає за біологічні реакції та симптоми впливу ЛПС, включаючи лихоманку, діарею, блювання та гіпотензію. Добре встановлено, що ціанобактеріальні ЛПС є значно менш ефективними, ніж типові грамнегативні бактеріальні ЛПС. LPS вважаються можливими збудниками подразнення шкіри, шлунково-кишкових розладів і респіраторної алергії [45].

Ціанобактеріальні дерматотоксини, до яких належать аплізіотоксини (АРТХ) та лінгбіатоксини (LTX), переважно синтезуються видом *L. majuscula*. На сьогодні ці токсини були виявлені лише в морській воді. У людини вони викликають дерматит, а також запалення ротової порожнини та шлунково-

кишкового тракту, що часто призводить до діареї. Крім цього, АРТХ і ЛТХ є потужними стимуляторами пухлинного росту завдяки активації протеїнкінази С [32].

1.2. Способи боротьби із ціанобактеріями

Поживні речовини відіграють ключову роль у підтримці домінування ціанобактерій, забезпечуючи необхідні ресурси для утворення нової біомаси. Азот (N) і фосфор (P) тривалий час вважаються ключовими факторами, що впливають на їх ріст і підтримку популяцій у внутрішніх водних екосистемах. Водночас, все частіше звертають увагу на роль мікроелементів, таких як залізо, у стимулюванні або обмеженні цих процесів. Контроль за надходженням поживних речовин з ідентифікованих джерел забруднення (точкових джерел) дозволяє зменшити надмірний ріст ціанобактерій, що вже було продемонстровано в деяких водоймах [22].

Кліматичні зміни, зокрема підвищення температури та інтенсифікація гідрологічних процесів, змінюють швидкість надходження поживних речовин у водні екосистеми, впливаючи на тривалість та інтенсивність цвітіння. Відтак, вплив поживних речовин і кліматичних змін варто аналізувати у взаємозв'язку.

Забруднення поживними речовинами, що походять із дифузних джерел, таких як водозбірні площі, часто становить значну частку надходжень до озер, але через своє поширене походження ускладнює контроль. Атмосферні опади також виступають джерелом поживних речовин, особливо у віддалених північних регіонах, де це може спричинити незвичні спалахи цвітіння. Окрім того, поживні речовини, які накопичуються у відкладах озер, є ще одним шляхом, що сприяє утворенню цвітіння ціанобактерій. Ці «застарілі поживні речовини» забезпечують постійну базу для нових спалахів цвітіння ціанобактерій.

Найефективнішим способом запобігання поширенню ціанобактерій є зменшення хронічного надходження поживних речовин до водних екосистем. Проте реалізація стратегій контролю поживних речовин на рівні водозбірного басейну є доволі складною. Ці заходи залежать від таких чинників, як фінансові витрати, активність і зацікавленість учасників процесу, ефективність впровадження найкращих практик управління поживними речовинами (ВМР), а також просторово-часові особливості, що впливають на реалізацію цих стратегій [13].

Фізичні методи видалення водоростей, які широко застосовуються, включають механічний збір, технологію затінення, повітряну флотацію, використання глинистих флокулянтів, ультразвукові методи, фільтрацію, ультрафіолетове опромінення та адсорбцію [51].

Механічний метод базується на застосуванні спеціальних енергетичних пристроїв для збирання та вилучення водоростей з водойми. Це дозволяє оперативно зменшити їх концентрацію, отримавши значну кількість біомаси. Однак високий вміст води у зібраних водоростях ускладнює їх подальшу переробку та утилізацію, що вимагає значних людських і матеріальних ресурсів і створює труднощі для масштабного застосування.

Метод **повітряної флотації** передбачає розділення твердої фази та рідини шляхом прикріплення клітин водоростей до мікробульбашок, що сприяє їхньому спливанню на поверхню. Цей метод є ефективним для видалення водоростей із низькою концентрацією та каламутністю. Проте, оскільки клітини водоростей і бульбашки мають однаковий негативний заряд, адгезія є обмеженою, і рівень видалення рідко перевищує 90%. Для покращення цього показника вчені розробили процес **posiDAF**, у якому бульбашки покривали катіонним полімером, що підвищило ефективність до 95%.

Флокуляція глини є природним методом видалення водоростей шляхом осадження, проте використання звичайної глини може викликати повторне цвітіння через звільнення поживних речовин. Модифікована глина

забезпечує більш стабільний ефект, хоча потребує великих дозувань і високих витрат. Наприклад, дослідження одного з дослідників показало, що використання хітозану дозволяє досягти 90% видалення клітин водоростей при оптимальних умовах (концентрація 10 мг/л, перемішування зі швидкістю 150 об/хв протягом 20 хвилин) [2].

Ультразвуковий метод передбачає застосування механічних хвиль частотою від 20 кГц, які руйнують клітини водоростей через кавітаційні ефекти, високі температури, тиск та удари. Такий підхід не лише руйнує фотосинтетичну систему клітин, але й знищує біологічну активність водоростей, включаючи мікроцистини. Ультразвуковий метод може додатково розщеплювати виділення клітин водоростей і водоростеві токсини, а також інші продукти метаболізму. Даний метод має хороший ефект видалення водоростей, простий у встановленні та обслуговуванні, вважається відносно швидким, володіє екологічним захистом навколишнього середовища та іншими перевагами, тому має широкі ринкові перспективи. Наприклад, одне з досліджень підтвердило, що ультразвук на частоті 20 кГц ефективно вбиває клітини водоростей, а частота 640 кГц сприяє швидкому розкладанню мікроцистинів шляхом окислення бензольних кілець і розщеплення пептидних зв'язків. Хоча метод має значні переваги, його недоліком є високе енергоспоживання при інтенсивному використанні, а також можливий негативний вплив на водні організми.

Методи фільтрації, зокрема піщана та мембранна фільтрація, дозволяють видаляти клітини водоростей без їх пошкодження. Піщана фільтрація зазвичай використовується після коагуляції, седиментації чи повітряної флотації. Вона ефективна для води з низьким вмістом зважених речовин і клітин водоростей, проте при високих концентраціях водоростей можливе забивання чи проникнення через шар фільтра.

Мембранна фільтрація базується на застосуванні селективних проникних мембран і може включати мікрофільтрацію (MF), ультрафільтрацію (UF), нанофільтрацію (NF) і зворотний осмос (RO).

Нанофільтрація та зворотний осмос є методами, в яких застосовують високий тиск, які дозволяють ефективно утримувати мікроорганізми, органічні речовини, і навіть іони та водорозчинні солі. Проте такі методи мають високі енергетичні витрати і можуть видаляти корисні мікроелементи, що робить воду менш придатною для пиття [51].

Мікрофільтрація та ультрафільтрація характеризуються меншими енергетичними витратами і є перспективними для широкого застосування. **Мікрофільтрація** не завжди здатна затримувати патогенні бактерії та віруси, тоді як **ультрафільтрація**, із розміром пор мембрани від 0,001 до 0,02 мкм, забезпечує ефективне видалення великих молекул і токсинів. Наприклад, за допомогою комбінації ультрафільтрації з адсорбцією порошкоподібним активованим вугіллям (РАС/UF) було досягнуто 93–98% видалення мікроцистинів [13].

Ультрафіолетове (УФ) опромінення є ефективним методом боротьби з водоростями завдяки його здатності завдавати шкоди клітинним структурам та пригнічувати їх функції. УФ-випромінювання може пошкоджувати гени, руйнувати клітинні мембрани, знижувати фотосинтетичну активність клітин водоростей, а також інгібувати вироблення та вивільнення токсинів. Крім того, УФ-опромінення підвищує седиментаційну здатність клітин водоростей, що сприяє їх видаленню з водного середовища.

Дослідження **Алама та ін.** [4] показало, що опромінення *Microcystis aeruginosa* ультрафіолетовим світлом із довжиною хвилі 254 нм при інтенсивності 37 мДж/см² значно пригнічує ріст клітин протягом 7 днів. При збільшенні інтенсивності до 75 мДж/см² спостерігалася повна загибель клітин водоростей. Ультрафіолет впливає на фотосинтетичну систему клітин, викликає серйозне пошкодження ДНК, унеможливорює транскрипцію та синтез білків, що є критично важливим для життєдіяльності водоростей. Цей метод характеризується високою ефективністю та простотою у використанні, але потребує оптимізації для мінімізації негативного впливу на екосистему та енергетичних витрат.

Адсорбційний метод видалення водоростей, як правило, базується на використанні активованого вугілля, включаючи його порошкоподібні (PAC), гранульовані (GAC) та волокнисті (ACF) форми. Завдяки великій питомій поверхні та розгалуженій пористій структурі, активоване вугілля ефективно адсорбує органічні речовини з молекулярною масою в діапазоні від 500 до 3000 мкм. Зважаючи на те, що молекулярна маса мікроцистинів становить близько 1000 мкм, вони добре піддаються адсорбції активованим вугіллям [41].

Порошок активованого вугілля використовується для посилення коагуляції під час видалення водоростей, що робить його придатним для екстреної обробки води з високим вмістом водоростевої біомаси. Цей метод не лише сприяє видаленню мікрободоростей, але й знижує концентрацію токсичних органічних речовин у воді [47].

Дослідження **Jiang та ін.** [23] представило «біореактор з мембраною з активованим вугіллям» (PAC-MBR), який показав високу ефективність у видаленні водоростей, гумінових кислот та аміачного азоту ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) у водоймах зі слабкою евтрофікацією після 4 місяців безперервної роботи. Це доводить, що адсорбційний метод може бути ефективним інструментом у боротьбі з водоростевими цвітіннями, особливо у поєднанні з іншими технологіями очищення.

Біологічні методи очищення водойм від ціанобактерій та їх токсинів полягають у використанні природних організмів або біологічних сполук для контролю розмноження шкідливих водоростей. Ці методи включають використання бактерій, вірусів, хижих організмів, вищих рослин, мікрободоростей.

Одним із найбільш вивчених біологічних агентів є **ціанофаги** — віруси, що інфікують ціанобактерії. Перше виділення та часткове очищення ціанофага було здійснено Сафферманом та Морісом у 1963 році, коли вони виділили вірус LPP-1, який міг лізувати види ціанобактерій, такі як *Lyngbya*, *Plectonema*

та *Phormidium*. Подальші дослідження показали, що ціанофаги широко поширені як у прісноводних, так і в морських екосистемах [44].

Ціанофаги працюють за принципом лізису, що означає, що після прикріплення до поверхні клітини ціанобактерії, вірусний генетичний матеріал вводиться всередину клітини. Далі цей генетичний матеріал змушує клітину-хазяїна розмножувати вірусні частинки. Як результат, клітина ціанобактерії ламається, звільняючи нові вірусні частинки, які можуть інфікувати інші клітини ціанобактерій. Ціанофаги можуть бути двох основних типів: **лізогенні фаги** - інтегруються в генетичний матеріал клітини хазяїна і можуть залишатися в стані латентності до певного часу, не спричиняючи лізису, і можуть активуватися за певних умов, наприклад, при зміні навколишнього середовища; **літичні фаги** - безпосередньо призводять до розриву клітини, що супроводжується вивільненням нових вірусів і загибеллю клітини хазяїна.

Швидкий темп реплікації ціанофагів робить їх привабливими агентами для біоконтролю. Наприклад, час генерації ціанофага LPP-DUN1 становить лише 10 годин, що дозволяє йому утворювати близько 100 нових фагових часток для кожної інфікованої клітини *Plectonema boryanum*.

Ціанофаги атакують лише певні види ціанобактерій, тому не завдають шкоди іншим організмам водної екосистеми, таким як інші мікроорганізми, риби чи водяні рослини, що робить їх безпечними для екології. Попри їхній потенціал, застосування ціанофагів у біоконтролі має низку обмежень. Однією з основних проблем є швидке виникнення резистентних мутантів-господарів. Наприклад, зміни в оболонці клітин ціанобактерій можуть призвести до блокування адсорбції фагів, що знижує ефективність контролю [52].

Бактеріальні агенти для біоконтролю ціанобактерій мають значний потенціал у боротьбі з цвітінням водоростей. Деякі бактерії можуть лізувати ціанобактерії, що призводить до раптового зниження їх біомаси. Проте не було встановлено, чи ці бактерії є первинними патогенами, що викликають загибель

водоростей, чи вони просто діють як сапрофіти, розкладаючи мертві клітини водоростей, що є результатом інших процесів.

Ціанобактеріолітичні бактерії діють трьома основними механізмами: через виробництво позаклітинних продуктів, контактний лізис і лізис захоплення. В одному з досліджень фільтрат культури *Bacillus sp.* лізував кілька видів ціанобактерій, таких як *Anabaena* і *Microcystis*. Це вказує на те, що бактерії можуть виробляти антибіотичні речовини, які знищують ціанобактерії. У подальших дослідженнях, бактерії *Bacillus sp.* виробляли летючі продукти, які інгібували розвиток нитчастих ціанобактерій, що є важливою частиною боротьби з токсичними видами водоростей.

Також вивчали інші бактерії, наприклад, *Flexibacter spp.*, які були виділені з побутових стічних вод і продемонстрували здатність лізувати *Oscillatoria williamsii*. Ці бактерії не лише впливали на цвітіння, але й інгібували фотосинтетичні процеси та активність важливих ферментів, таких як гліколатдегідрогеназа та нітрогеназа. У цьому випадку метаболіти бактерій також викликали пригнічення росту водоростей. Ідентифікація цих сполук, таких як лізоцим, допомогла підтвердити їхні властивості як біоконтролюючих агентів [44].

Загалом, бактеріальні агенти для біоконтролю ціанобактерій можуть мати значний потенціал, але для їх широкого застосування необхідні додаткові дослідження, зокрема щодо механізмів дії, ефективності в польових умовах і можливих ризиків розвитку резистентності у водоростей.

Зоопланктон може відігравати важливу роль у контролі популяцій ціанобактерій. Багато видів зоопланктону активно споживають ціанобактерії, що дозволяє знижувати концентрацію цих організмів у воді, особливо в періоди бурхливого розвитку цвітіння водоростей. Проте деякі види зоопланктону можуть бути не сприйнятливими до токсичних ефектів мікроцистинів, таких як у випадку з *Daphnia*, які виявляють певний рівень стійкості до токсинів, що дозволяє їм залишатись активними навіть в умовах високої концентрації ціанобактерій.

При локальних «цвітіннях» невеликих водойм і водосховищах часто використовують хімічні методи видалення біомаси, зокрема альгіциди. Це можуть бути різні хімічні сполуки, такі як сполуки міді, хлорид калію, перекис водню, гербіциди та інші хімічні речовини, включаючи природні сполуки. Однак використання альгіцидів в природних водоймах має серйозні екологічні ризики, тому перед їх застосуванням важливо ретельно оцінити їх екотоксикологічні властивості (зокрема через випробування *in situ*) поширених альгіцидів є хлор, перманганат калію та озон, які можуть застосовуватися на очисних спорудах для боротьби з ціанобактеріями. Однак ці речовини є небезпечними для інших водних організмів, тому їх не можна використовувати в озерах, де є ризик негативного впливу на екосистему. Важливо, що при високих концентраціях ціанобактерій, після руйнування клітин, можливе надмірне вивільнення ціанотоксинів, що може бути небезпечним для довкілля [22].

Сполуки міді є популярним методом для боротьби з цвітінням у присутності біодоступного іона Cu^{2+} , що порушує фотосинтетичні процеси, споживання фосфору та фіксацію азоту у водоростях. Проте біодоступність міді значною мірою залежить від параметрів води, таких як рН вуглець і наявність карбонатної лужності, що робить її ефективність залежною від умов екосистеми. Таким чином, незважаючи на те, що сполуки міді є ефективними і найбільш використовуваними за кордоном альгіцидами, результати обробки ними нетривалі, а самі сполуки надають несприятливий вплив на екосистему [17].

Метод селективної боротьби з токсичними ціанобактеріальними «цвітіннями» за допомогою хлориду калію був запропонований на основі чутливості штаму *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 до цього хімічного агента. Однак нещодавнє дослідження показало, що чутливість до хлориду калію значно варіює серед різних штамів *Microcystis*, що вказує на потребу в подальших дослідженнях цього методу, щоб визначити його ефективність та безпеку для різних видів ціанобактерій [22].

Іншим методом, який набуває популярності, є використання перекису водню, що є потужним окислювачем. Перекис водню має кілька переваг, зокрема високу екологічну безпеку, оскільки він розкладається на воду та кисень протягом кількох годин або днів, не залишаючи токсичних залишків. Крім того, перекис водню проявляє високу селективність щодо ціанобактерій, при цьому концентрація, яка ефективно діє на ціанобактерії, значно нижча, ніж на інші водорості, такі як зелені чи діатомові водорості. Дія перекису на ціанобактерії обумовлена утворенням гідроксильних радикалів, які порушують фотосинтетичні процеси та виділення кисню. Проте чутливість до перекису варіює залежно від виду ціанобактерії, що знову ж таки вимагає точного підбору дозування залежно від штаму [51].

1.3. Коагулянти як інструмент контролю цвітіння ціанобактерій

Коагуляція/флокуляція є найбільш використовуваною та важливою одиницею очищення води. Оскільки ціанобактеріальні клітини зазвичай несуть негативні заряди, коагулянти додають у воду, щоб нейтралізувати негативні заряди на поверхні ціанобактерій, спричиняючи їх дестабілізацію та випадання в осад. Більшість ціанобактерій та їх метаболітів можна видалити одночасно. Однак, коли щільність ціанобактерій висока, липкі виділення розподіляються поза клітинами через малий розмір ціанобактерій. Липкі виділення легко утворюють складні колоїди з коагулянтами, що ускладнює дестабілізацію ціанобактерій і призводить до незадовільного впливу коагуляції на ціанобактерії [49].

Коагуляція/флокуляція (C/F), заснована на додаванні хімічних коагулянтів і флокулянтів, таких як солі алюмінію та хлорид заліза, що сприяє агломерації частинок, відомих як флокули. Такий метод дозволяє видалити до 90% внутрішньоклітинних ціанотоксинів, що є потужним показником.

Коагулянти можуть бути на основі металів, наприклад сульфат алюмінію (квасцов), поліалюміній хлорид (РАС) і хлорид заліза (ІІІ), органічні

полімери, такі як хітозанті катіонний крохмаль, синтетичні органічні коагулянти, такі як катіонні поліакриламіді і катіонні поліаміни, або похідні витяги з насіння *Moringa oleifera*. Також дієвим методом є поєднання різних коагулянтів та баластних речовин. Баластними сполуками можуть бути місцеві ґрунти, глина, боксит, гравій або модифіковані глини та продукти з адсорбцією Р. Вибір коагулянту та баластних сполук буде ґрунтуватися на безпеці, вартості, доступності та ефективності.

Коагулянти утворюють мости між частинками, створюють пластівці, які захоплюють ціанобактерії, а потім проносяться через товщу води, захоплюючи більше клітин ціанобактерій. Ефективність коагуляції залежить від кількох факторів, таких як видові характеристики, температура, інтенсивність змішування та хімічний склад води, оскільки не всі коагулянти однаково ефективно підходять для всіх типів води. Було показано, що рН води впливає на коагуляційну ефективність більшості коагулянтів. Наприклад, хітозан був найбільш ефективним при рН нижче 8, але не показав ефективність при підвищеному рН 9–10. Галун був найбільш ефективним при рН 5–9, тоді як вапно з магнієм могло ефективно флокулювати водорості при рН 10–11 [30].

Під час гідролізу коагулянтів на основі алюмінію виділяються іони водню, що в свою чергу може спричинити зниження рН озер, тому потрібно додавати буфери. РАС спричиняє менше зниження рН, ніж галун, а також має перевагу в тому, що потрібна менша доза, а краща коагуляція досягається за нижчих температур. Взагалом підтримка правильного рівня рН при використанні тих чи інших коагулянтів є важливим моментом при очистці води, тому що при недотриманні оптимального рівня можуть спостерігатися негативні наслідки. Наприклад, застосування алюмінієвих композицій (РАС, галун) у водах з рН 6–8 загалом вважається безпечним, при рН < 5,5 відбувається утворення токсичних форм алюмінію – позитивно заряджених іонів, негативно заряджений алюмінат при рН > 8,5 - не очікується. Проте не можна виключити потенційні проблеми в цьому діапазоні рН, такі як задуха

риби полімеризованим алюмінієм, втрата ваги риби та короткочасний вплив на макрофауну [30, 38].

Незважаючи на свою ефективність у зниженні каламутності та ціанобактеріальних клітин, хімічні коагулянти та флокулянти все ще мають шкідливий вплив, наприклад, забруднення навколишнього середовища через неправильну утилізацію мулу, вплив на здоров'я людини, пов'язаний із наявністю залишків галуни в очищених водах, дороговартість утилізації осаду та впливу на здоров'я та навколишнє середовище [51].

Природні коагулянти можна класифікувати за їх походженням і розділити на три категорії:

- коагулянти рослинного походження;
- коагулянти тваринного походження;
- коагулянти на основі мікроорганізмів.

Основними сполуками, відповідальними за коагуляцію синьо-зелених водоростей, є полісахариди, глікопротеїни, функціональні білки, поліфенольні речовини та/або протеолітичні ферменти. Природні коагулянти та флокулянти є перевагами завдяки своїй здатності до біологічного розкладання, економічній ефективності, безпеці та низькій кількості утвореного осаду, ніж звичайні. Наразі було повідомлено про декілька досліджень щодо пом'якшення дії ціанобактеріального цвітіння за допомогою рослинних коагулянтів. Видалення ціанобактерій становило $\geq 70\%$ для всіх рослинних коагулянтів. В одному з досліджень було показано, що насіння *Vicia faba* та *Opuntia ficus indica cladodes* видалили до 85% *M. aeruginosa* з очищеної води за допомогою 0,5 та 1 г/л (рН 5) відповідних коагулянтів відповідно[12].

1.4. Вплив іонів Феруму на клітини бактерій

Ферум Fe є важливим мікроелементом для всього фітопланктону і відіграє важливу роль у фотосинтезі та диханні. Сполуки на основі Fe широко

розповсюджені в клітинах і беруть участь у процесах перенесення електронів та функціонуванні ферментів [27].

Залізо, як перехідний метал першого ряду, здатне існувати у двох основних окисно-відновних станах: відновленому Fe^{2+} та окисленому Fe^{3+} , які легко переходять один в одного за фізіологічних умов. Крім того, залежно від лігандного середовища, залізо може перебувати у високоспіновому або низькоспіновому стані, що додає йому універсальності. Завдяки цим властивостям залізо є надзвичайно гнучким компонентом, що інтегрується у білки, виконуючи роль біокаталізатора або переносника електронів.

Особливу потребу в залізі мають ціанобактерії, що пов'язано з їхнім походженням у насичених ферумом аноксичних океанах. Зокрема, азотофіксуючі ціанобактерії потребують Fe для роботи нітрогенази. Дослідження показують, що додавання заліза стимулює ріст, фотосинтез і фіксацію азоту в популяціях ціанобактерій [5].

Незважаючи на те, що залізо є другим за поширеністю металом та четвертим елементом у земній корі, його концентрація у водному середовищі залишається низькою через слабку розчинність. Комплекси Fe із сидерофорами та іншими органічними лігандами підвищують розчинність заліза, проте зменшують його біодоступність. У евтрофних озерах, особливо у водах з високим вмістом фосфору, біодоступне залізо обмежене через формування нерозчинних мінералів Fe-P. Роль Fe у регуляції біомаси ціанобактерій у прісноводних екосистемах поки що повністю не визначена. Нещодавні експерименти в природних умовах свідчать, що залізо може обмежувати ріст ціанобактерій у евтрофних водоймах. Попри те, що фізіологічний вплив Fe на ціанобактерії та механізми його засвоєння добре досліджені, взаємозв'язок між залізом і формуванням цвітіння ціанобактерій залишається невідомим. Вивчення цього аспекту є важливим для розуміння механізму цвітіння та розробки ефективних підходів до управління евтрофікацією [25, 33].

Мікроорганізми мають високе співвідношення площі поверхні до об'єму через свій невеликий розмір і, отже, забезпечують велику площу контакту, яка може взаємодіяти з металами в навколишньому середовищі.

Мікроорганізми можуть впливати на метали кількома шляхами(рис 1.3.):

1. **Трансформація металів:** метали можуть зазнавати змін через окисно-відновні реакції (наприклад, Fe і Mn) або алкілування (як у випадку Hg). Перетворені форми металів зазвичай мають інші характеристики рухливості та токсичності порівняно з вихідними формами.
2. **Накопичення металів:** метали можуть акумулюватися шляхом пасивної сорбції (незалежної від метаболізму) або активного внутрішньоклітинного поглинання (залежного від метаболізму). Обидва механізми можуть одночасно функціонувати в одному організмі. У деяких випадках спостерігається пасивне внутрішньоклітинне накопичення.
3. **Виділення речовин:** мікроорганізми можуть синтезувати або виділяти органічні сполуки, які впливають на рухливість металів, або продукувати сульфіди, що знижують рухливість багатьох металів.
4. **Участь у кругообігу вуглецю:** мікроорганізми впливають на кількість і склад органічних речовин, що позначається на рухливості металів, оскільки органічні сполуки можуть зв'язувати метали. При цьому мікробна деградація металоорганічних комплексів змінює специфічність металів. Однак зв'язування металів з органічними речовинами може пригнічувати деградацію останніх, що спричиняє накопичення стійких органічних речовин із включеними металами.
5. **Опосередковані впливи:** мікроорганізми можуть змінювати умови середовища (рН, Eh тощо), що, у свою чергу, впливає на рухливість металів [28].

У природному середовищі залізо переходить із відносно розчинної форми Fe^{2+} (концентрація близько 0,1 М при рН 7,0) у майже нерозчинну форму Fe^{3+} (концентрація лише 10^{-18} М при рН 7,0). Унаслідок цього залізо,

яке є важливою вторинною поживною речовиною, стало дефіцитним, обмежуючи ріст організмів у багатьох екологічних нішах. Водночас в аеробних умовах залізо може проявляти значну токсичність. Взаємодія між киснем, його відновленими формами та залізом може бути шкідливою для біологічних систем. Таким чином, за присутності кисню залізо стає як малодоступним, так і потенційно небезпечним [5].

Для забезпечення ефективного гомеостазу організмам необхідно знайти баланс між засвоєнням заліза для задоволення метаболічних потреб і регуляцією рівня вільного заліза в клітинах, щоб уникнути його токсичності. Бактерії здатні подолати «дефіцит концентрації» між нерозчинністю Fe^{3+} і потребою в ньому завдяки процесам сольобілізації оксидів тривалентного заліза. Основними стратегіями, які бактерії використовують для сольобілізації заліза, є хелатування іонів та їх відновлення до розчинних форм.

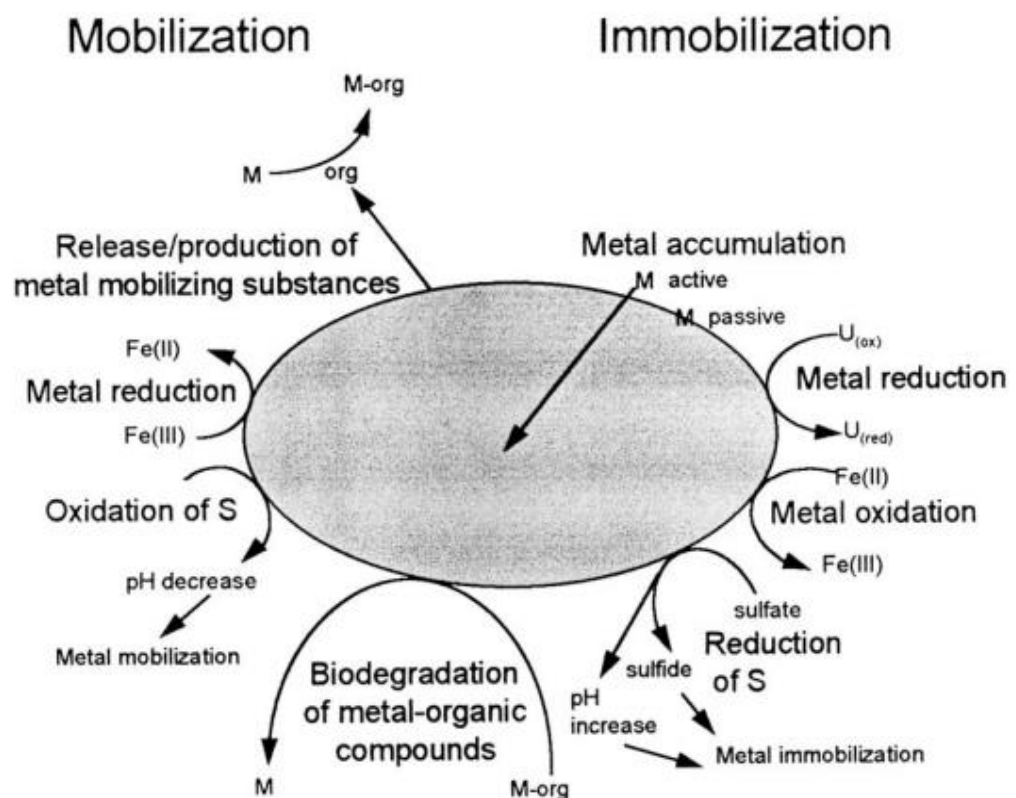


Рис. 1.3. Взаємодія металів і мікроорганізмів [28].

Бактерії розвинули спеціалізовані механізми для захоплення, транспортування та утилізації цього елемента. На початковому етапі взаємодії з ферумом відбувається адсорбція іонів металу на поверхні клітинної стінки бактерій. Завдяки негативному заряду клітинної стінки, який забезпечують карбоксильні, фосфатні та гідроксильні групи, іони Fe^{2+} і Fe^{3+} зв'язуються з поверхневими структурами клітини за принципом електростатичної взаємодії. Важливу роль також відіграють екзополісахариди, які виділяються бактеріями й сприяють локальному накопиченню заліза поблизу клітини, підвищуючи його доступність. Ще одним механізмом є синтез бактеріями низькомолекулярних сполук, відомих як сидерофори. Сидерофори мають низьку молекулярну масу (<1000 Да) і характеризуються високою специфічністю та спорідненістю до тривалентного заліза і утворюють з ним хелатні комплекси, підвищуючи розчинність заліза у водному середовищі. Після адсорбції іони феруму транспортуються всередину клітини. Для транспорту Fe^{3+} використовуються сидерофори, які зв'язуються з рецепторами на зовнішній мембрані бактерій і транспортуються всередину клітини через специфічні білки. Після потрапляння в цитоплазму ферум відновлюється або залишається в доступній формі для включення у метаболічні процеси [9].

Всередині клітини ферум інтегрується до складу ферментів і білків, зокрема залізо-сірчаних кластерів ($[\text{Fe-S}]$) та гем-груп, які відіграють важливу роль у дихальному ланцюзі, фотосинтезі, фіксації азоту та інших ключових метаболічних процесах. Наприклад, цитохроми транспортують електрони у дихальному ланцюзі, а ферредоксини виконують аналогічну функцію в процесах фотосинтезу. Проте вільне залізо в цитоплазмі може каталізувати утворення активних форм кисню (АФК) через реакцію Фентона, що призводить до оксидативного стресу і пошкодження клітинних структур. Для запобігання цим негативним ефектам бактерії зберігають залізо у зв'язаній формі, наприклад у феритині або у складі хелатних комплексів [39].

РОЗДІЛ II. Матеріали та методи дослідження

2.1. Матеріали дослідження

Серед ціанобактерій, які викликають цвітіння водоймищ, найбільш розповсюдженими є представники роду *Microcystis*.

Серед них нами було обрано для досліджень *Microcystis pulverea* (H.C.Wood) Forti (рис. 2.1. а) - найпоширеніший вид прісноводного фітопланктону, який відомий своїм токсичним впливом на аквакультуру, людей та навколишнє середовище. Він зустрічається в ґрунтах, болотах, прибережних морських екосистемах, а також на поверхні тканин рослин і тварин. Талом має коковидну, одноклітинну будову, а колонії формуються у вигляді кулястих структур. Окремі клітини також мають кулясту форму, їхній діаметр становить 2–3 мкм [27]. За Грамом фарбуються негативно.

Ця ціанобактерія має типову для прокаріот будову клітини, а отже не має ядра, вакуолей та інших мембранних органел. Також відсутні гетероцисти - спеціалізовані клітини для фіксації азоту. Ціанобактерія містить фотосинтетичні пігменти, зокрема хлорофіл *a*, каротини, фікоеритрин, фікоціанін та аллофікоціанін, які забезпечують процес фотосинтезу. Клітини оточені щільною слизовою оболонкою, яка виконує захисну функцію. *Microcystis pulverea* характеризується автотрофним і міксотрофним типами живлення, запасає глікоген і білки, а розмноження відбувається шляхом поділу клітин [56].

Цей вид належить до донно-планктонної екологічної групи та відіграє важливу роль в екосистемах. Зокрема, *Microcystis pulverea* слугує джерелом живлення для риб і бере участь у біологічному очищенні водойм, що підкреслює її значення для підтримання екологічного балансу.

Клітини ціанобактерій можуть утворювати величезні колонії на поверхні води навіть при незначних коливаннях температури, світла і поживних речовин у середовищі, що і називають «цвітінням води» (рис 2.1. б).

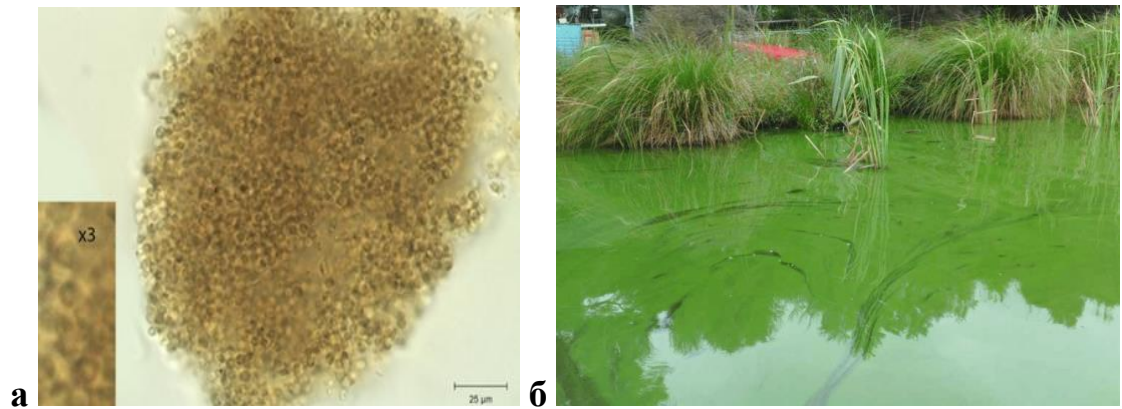


Рис. 2.1. Мікрофотографія культури *Microcystis pulvere* (а) та її цвітіння в озері Нової Зеландії (б) [6, 19]

Для вирощування накопичувальної культури ціанобактерій використовували середовище **Фітцджеральда** в модифікації Цендера і Горхема [56]. До його складу входять такі компоненти (г/л):

- NaNO_3 – 0,496 (можлива заміна на 1,054 г сечовини на 6 л середовища)
- 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 маточного розчину – 0,08 мл (включають залізо, цинк, марганець, бор, кремній, мідь, молібден, хлор, кобальт і ванадій).

Середовище готували у такому порядку:

1. Поступово додавали солі відповідно до пропису, чекаючи повного розчинення кожної попередньої.
2. Використовували лише хімічно чисті реактиви, оскільки ціанобактерії дуже чутливі до забруднень.

3. Цитрат заліза розчиняли окремо за нагрівання і додавали до стерильного середовища, після чого вносили мікроелементи, дотримуючись стерильних умов.

Після приготування здійснюється контроль рН, яке має знаходитись в межах 7,0–7,5.

Такі умови забезпечували оптимальне середовище для росту культури ціанобактерій. Накопичувальне культивування проводили протягом 21 дня за температури 20 ± 2 °C, 16-годинного фотоперіоду. По завершенню культивування кількість клітин у культурі становила $5,4 \times 10^6$ кл/мл. Підрахунок клітин здійснювали з використанням камери Фукса-Розенталя та мікроскопа XS-2610 LED MICROmed.

2.2. Схема дослідження

У якості коагулянтів для оцінки ефективності видалення *Microcystis pulverea* було обрано сполуки на основі заліза: FeSO_4 , FeCl_3 та хелатна форма Fe-EDTA.

FeSO_4 (сульфат заліза) є одним із найбільш поширених неорганічних коагулянтів, що широко використовується в обробці води. Цей коагулянт, розчиняючись у воді, утворює йони Fe^{2+} , які взаємодіють з мікроорганізмами, формуючи осад, що сприяє агрегації клітин бактерій. Важливою характеристикою FeSO_4 є його здатність до швидкого окислення в присутності кисню, що сприяє утворенню більш стійкого осаду. Проте FeSO_4 може мати обмежену ефективність при високих рН значеннях, де коагуляція може бути менш ефективною [27].

FeCl_3 (хлорид заліза) є ще одним неорганічним коагулянтом, який використовується для очищення води. FeCl_3 містить йони Fe^{3+} , які, взаємодіючи з водними компонентами, формують осад з мікроорганізмами. Це може бути особливо ефективним у більш кислих або нейтральних

середовищах, оскільки Fe^{3+} має більшу здатність до гідролізу, що призводить до утворення флокул, які ефективно знешкоджують та осаджують клітини *Microcystis pulvereae*. Хлорид заліза може мати високу ефективність при очищенні води, однак його застосування потребує ретельного контролю за рівнем рН, оскільки в основних середовищах може знижуватися ефективність коагуляції [10].

Fe-EDTA (хелатна форма заліза з етилендіамінтетраоцтовою кислотою) є коагулянтом, що містить залізо у хелатній формі. У цій формі залізо зв'язано з лігандом — етилендіамінтетраоцтовою кислотою (EDTA), що дозволяє зберігати залізо у розчинній формі і підвищує його стійкість до окиснення. Хоча Fe-EDTA не утворює осаду так швидко, як інші форми заліза, він може забезпечити довготривалу стабільність і надавати контрольоване вивільнення заліза в системі, що може бути корисним для підтримки оптимальних умов для коагуляції та видалення водоростей. Одним із переваг використання Fe-EDTA є можливість контролювати розчинність і доступність заліза в процесі очищення [53].

Для приготування робочих розчинів коагулянтів FeSO_4 , FeCl_3 та Fe-EDTA було дотримано наступних умов і технології. Для **0,5 М розчину FeSO_4** було використано 13,9 г залізного купоросу ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), яке зважили на аналітичних вагах. Речовину поступово додавали до 100 мл дистильованої води, поміщеної у конічну колбу, при постійному помішуванні скляною паличкою до повного розчинення.

Для **0,5 М розчину FeCl_3** було зважено 13,45 г кристалічного гексагідрату хлориду заліза ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Речовину, аналогічно до попереднього методу, розчинили в 100 мл дистильованої води, використовуючи конічну колбу. Помішування тривало до утворення однорідного прозорого розчину, після чого об'єм довели до 100 мл за допомогою дистильованої води.

Для **розчину Fe-EDTA** у термостійкій конічній колбі об'ємом 250 мл розчини в дистилаті 6,95 г FeSO_4 . Розчин нагрівали на плиті, поступово

доводячи до кипіння. Під час нагрівання стежили за появою перших бульбашок. В окремій посудині заздалегідь зважили 9,35 г ЕДТА . Після досягнення кипіння розчину FeSO_4 ЕДТА вводили поступово, невеликими порціями, постійно інтенсивно помішуючи. Кожну порцію додавали тільки після повного розчинення попередньої, що забезпечувало отримання прозорого та однорідного розчину. Після додавання всієї кількості ЕДТА розчин залишили на слабкому вогні до повного завершення реакції. Готовий розчин охолоджували до кімнатної температури та зберігали у герметично закритій ємності [56].

Після цього до культури ціанобактерій у пробірки додавали розчини коагулянтів з розрахунком на концентрацію Fe від 5 до 50 мг Fe/л. *Microcystis pulverea* з різними формами заліза інкубували у контрольованих умовах протягом 7 днів. Температура, освітлення та тривалість фотоперіоду під час інкубації відповідали оптимальним умовам для росту *Microcystis pulverea*. На сьомий день інкубації пробірки було вилучено для оцінки впливу коагулянтів на культуру ціанобактерій, а саме оцінювали вигляд культури (забарвлення, флокуляція), вимірювали рН, оптичну густину, проводили мікроскопію та здійснювали підрахунок живих та мертвих клітин.

2.3. Методи дослідження

Визначення оптичної густини культури. Для визначення оптичної густини (OD) культурального середовища використовувався фотоелектроколориметр КФК-2. У даному дослідженні вимірювання проводили при довжині хвилі 750 нм. Даний метод дозволяє опосередковано оцінити кількість суспендованих клітин у культуральному середовищі [56].

Визначення рН середовища. Для визначення рівня кислотності (рН) культурального середовища використовувався портативний рН-метр ADWA AD11.

Мікроскопія. Мікроскопічний аналіз зразків проводився після завершення інкубаційного періоду із застосуванням коагулянтів. Для цього використовувався мікроскоп XS-2610 LED MICROmed.

На чисте предметне скельце наносили одну краплю культурального середовища із пробірки. Вибір зразка здійснювався так, щоб у ньому були представлені клітини *Microcystis pulverea* після впливу коагулянтів. Краплю одразу накривали покривним скельцем, стежачи, щоб не утворювалися бульбашки повітря, які могли б заважати аналізу. Надлишок рідини обережно видаляли за допомогою фільтрувального паперу, щоб забезпечити чітке прилягання покривного скельця. Готовий препарат встановлювали на предметний столик мікроскопа для подальшого аналізу.

Спостереження проводили при збільшенні 200× (окуляр 20× та об'єктив 10×). У процесі аналізу оцінювали стан клітинної стінки, наявність агрегацій клітин, ступінь пошкодження або деформації клітинної структури, що могло свідчити про ефективність дії коагулянтів [56].

Визначення живих та мертвих клітин. Для визначення співвідношення живих і мертвих клітин *Microcystis pulverea* використовувався метод диференційного фарбування з використанням барвників метиленового синього та нейтрального червоного. Цей підхід дозволяє візуалізувати життєздатність клітин на основі їх здатності утримувати або виключати барвники.

Після завершення інкубації відбирали 1 мл культурального середовища зі зразка, що досліджувався. До відібраного зразка додавали 1 мл розчину, який був приготований у співвідношенні 1:5000 для кожного з барвників — метиленового синього та нейтрального червоного. Змішаний зразок витримували протягом 1 години при кімнатній температурі, забезпечуючи повну взаємодію клітин з барвниками.

Після інкубації з барвниками дослідження проводили у камері Фукса-Розенталя. Камера дозволяла точно підраховувати кількість клітин у заданому об'ємі зразка. **Живі** клітини набували червоного кольору, тим часом **мертві**

фарбувались інтенсивно синім кольором завдяки проникненню барвника через пошкоджену клітинну мембрану. Кількість клітин розраховували за формулою:

$$C = \frac{N}{n \cdot h \cdot s}, \text{ де:}$$

C – кількість клітин;

N – підрахована кількість клітин;

n – кількість квадратів, в яких проводили підрахунок;

h – глибина камери;

s – площа камери [56].

Коефіцієнт токсичності коагулянту. Метод визначення коефіцієнта токсичності базувався на аналізі кількісного співвідношення живих і мертвих клітин *Microcystis pulverea* після інкубації з коагулянтами. Для цього використовували дані, отримані під час підрахунку клітин у камері Фукса-Розенталя.

На основі даних, отриманих у камері Фукса-Розенталя, визначали загальну кількість клітин у досліджуваному зразку. За результатами фарбування підраховували кількість клітин, які поглинули метиленовий синій, тобто втратили життєздатність.

Для оцінки токсичного впливу коагулянтів використовували формулу:

$$K_{\text{токсичності}} = \frac{N_{\text{мертвих}}}{N_{\text{загальних}}} \times 100 \text{ де:}$$

- *K_{токсичності}* - коефіцієнт токсичності, виражений у відсотках;
- *N_{мертвих}* - кількість мертвих клітин у зразку;
- *N_{загальне}* - загальна кількість клітин у зразку.

Отримані результати виражали у відсотках, що дозволяло оцінити рівень токсичного впливу кожного з коагулянтів на клітини *Microcystis pulverea* [56].

Цей метод надав можливість кількісно оцінити ефективність коагулянтів не лише з точки зору осадження клітин, але й їх впливу на життєздатність ціанобактерій, що є важливим для комплексної оцінки їх дії.

2.4. Статистична обробка даних

Статистичну обробку отриманих даних виконували за загальноприйнятими методами із використанням програмного забезпечення Microsoft Excel. Усі експерименти проводилися з 4-х кратною повторюваністю. Достовірність результатів оцінювали за допомогою критерію Стьюдента. На графіках і в таблицях дані представлені як середнє значення між повторами, доповнене значенням стандартного відхилення.

РОЗДІЛ III. Результати досліджень та їх обговорення

Цвітіння води, спричинене надмірним розмноженням ціанобактерій, на сьогодні є глобальною екологічною проблемою, яка загрожує як водним екосистемам, так і здоров'ю людини. Основними причинами цього явища є евтрофікація водойм внаслідок антропогенного забруднення, зокрема надмірного внесення мінеральних добрив, стічних вод та органічних відходів. Це створює сприятливі умови для швидкого розмноження ціанобактерій, таких як *Microcystis pulvereae*, які можуть продукувати токсини, небезпечні для організмів у водоймах і для людини при використанні води.

Для боротьби з цвітінням водоростей застосовуються різноманітні методи, серед яких біологічні, фізичні та хімічні. Біологічні методи передбачають використання природних ворогів водоростей або їхніх конкурентів. Фізичні включають механічне видалення водоростей, аерацію води або покриття поверхні водойм для зменшення доступу світла. Хімічні методи, зокрема застосування коагулянтів, є одним із найперспективніших підходів, оскільки дозволяють ефективно осаджувати клітини водоростей і мінімізувати їх токсичний вплив.

У даному дослідженні було розглянуто вплив неорганічних коагулянтів на основі заліза (FeSO_4 , FeCl_3 і Fe-EDTA) на клітини *Microcystis pulvereae*. Використання коагулянтів спрямоване не лише на осадження клітин, а й на зниження їхньої життєздатності, що сприяє комплексному вирішенню проблеми [27].

Спектрофотометричний аналіз продемонстрував різний вплив обраних коагулянтів на густину культури *Microcystis pulvereae* після семиденного інкубаційного періоду.

При застосуванні сульфату заліза (FeSO_4) (рис. 3.1.) було відмічено стимуляцію ростової активності у культурі *Microcystis pulvereae*. Це свідчить про стимулюючий ефект низьких концентрацій сульфату заліза на ріст культури *Microcystis pulvereae*, що очевидно пов'язано роллю заліза у обмінних

процесах, як кофактора компонентів дихального ланцюга, фотосинтетичної системи та системи дінітрофіксації. Цей процес був більш виражений при додаванні FeCl_3 (рис. 3.2).

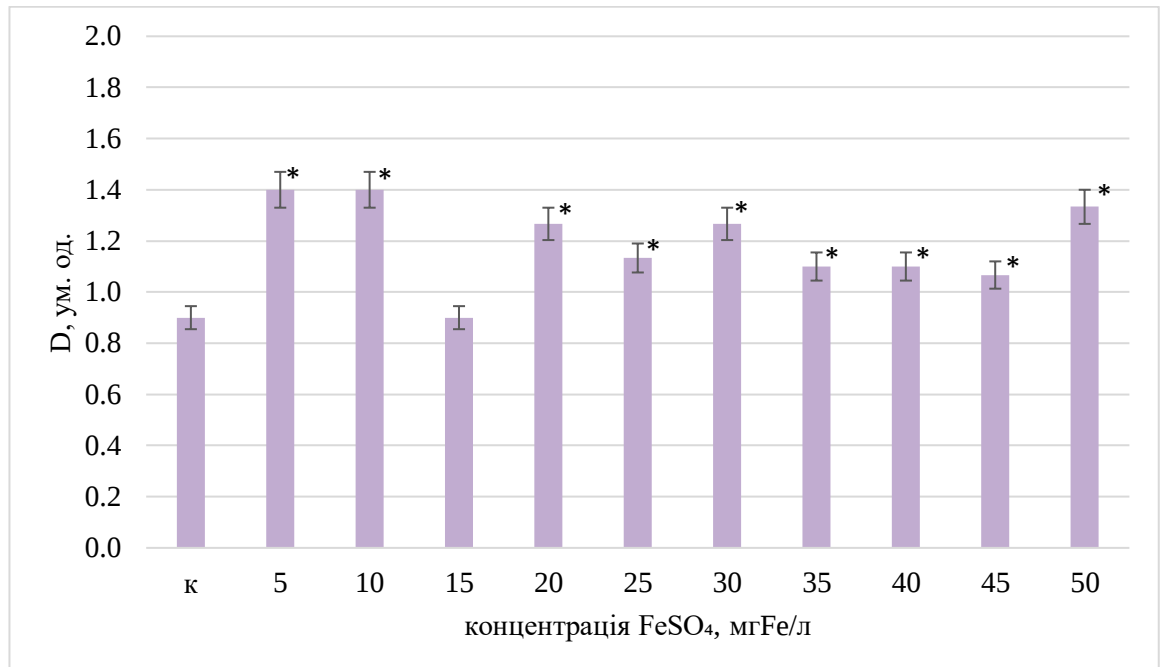


Рис. 3.1. Значення оптичної густини при застосуванні коагулянту FeSO_4

*Примітка: * - достовірна різниця відносно контрольних значень*

Найефективніші результати були отримані при використанні Fe-EDTA. У зразках з найнижчою концентрацією (5 мг Fe/л) спостерігалось збільшення густини культури, що, ймовірно, є наслідком стимуляції росту. У зразках із вищими концентраціями (10–50 мг Fe/л) густина значно зменшилася, демонструючи високий рівень осадження клітин (рис. 3.3.). Варто зазначити, що під час вимірювання на фотоелектроколориметрі спостерігалось різке зниження показників густини, що свідчить про швидке осадження флокул на дно кювети.

Таким чином, отримані дані підтверджують ефективність застосування коагулянтів для осадження клітин *Microcystis pulverea*, зокрема хелату Fe-EDTA, який показав найкращі результати серед досліджених сполук.

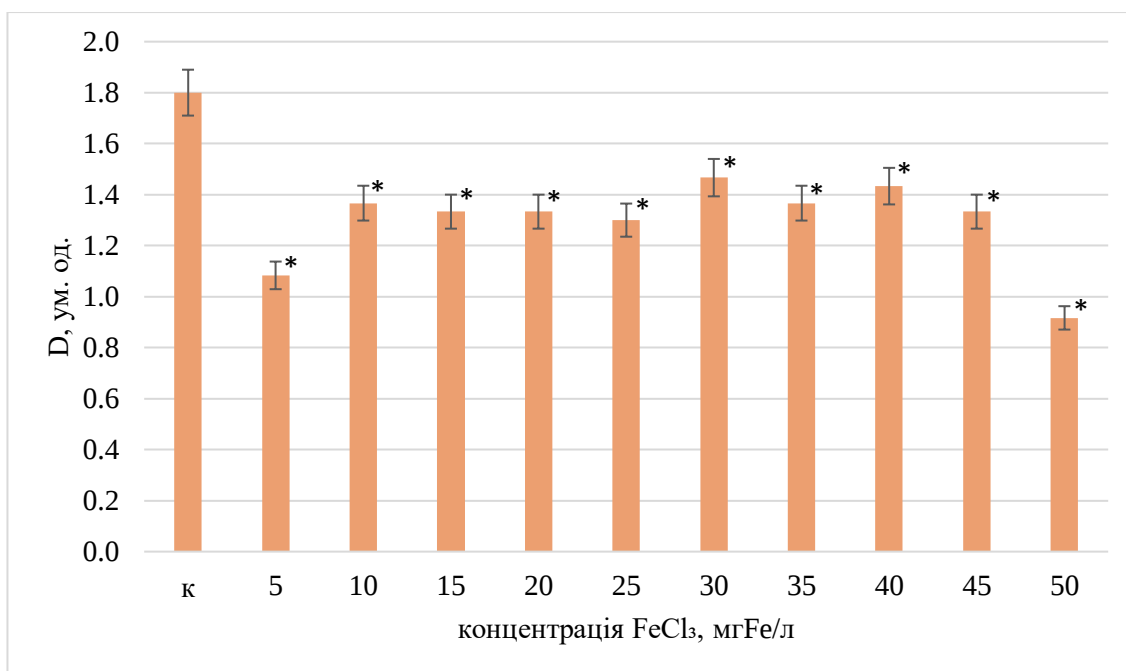


Рис. 3.2. Значення оптичної густини при застосуванні коагулянту FeCl₃

*Примітка: * - достовірна різниця відносно контрольних значень*

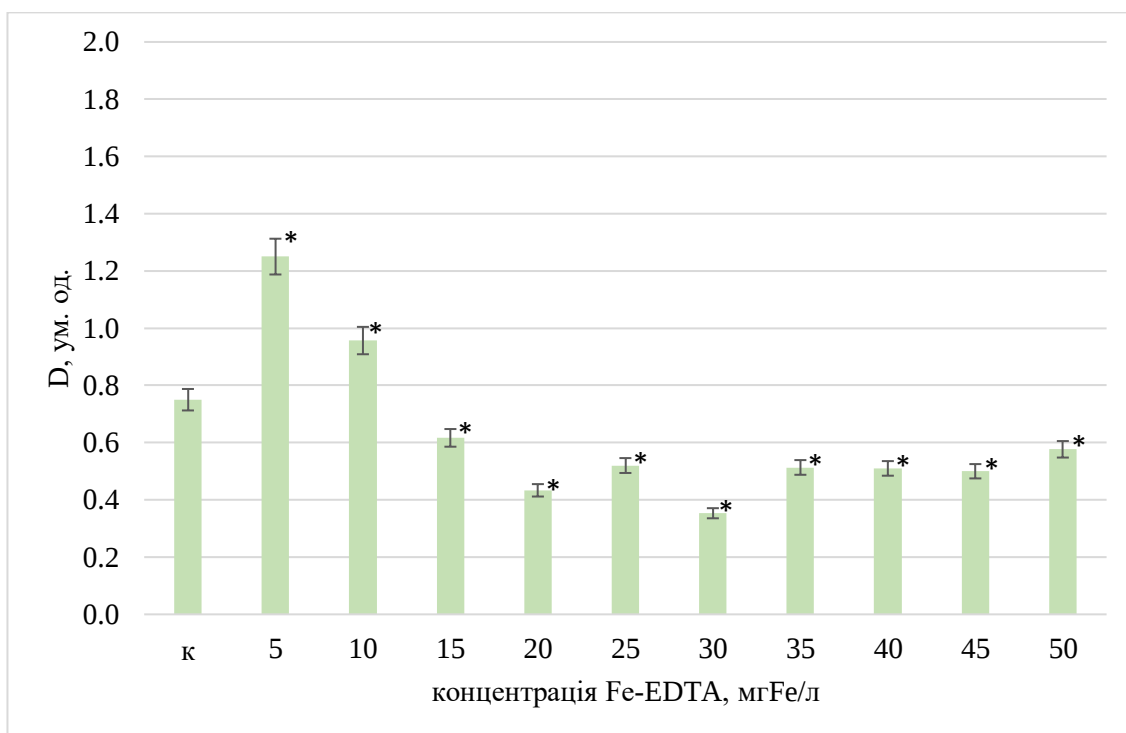


Рис. 3.3. Значення оптичної густини при застосуванні коагулянту Fe-EDTA

*Примітка: * - достовірна різниця відносно контрольних значень*

Наступним етапом було вимірювання рН зразків, результати якого наведені в таблиці 3.1. Вимірювання рівня рН у даному експерименті є

важливим, оскільки кислотно-лужний баланс значно впливає на життєздатність ціанобактерій та ефективність дії коагулянтів. Різкі зміни рН можуть спричинити стрес або загибель клітин *Microcystis pulverea*. Водночас визначення рН дозволяє оцінити потенційний вплив коагулянтів на екосистему водойм, оскільки надмірне підкислення може негативно позначитися на інших водних організмах і загальному екологічному балансі [34].

Таблиця 3.1.

Зміна рівня рН культури *Microcystis pulverea* під впливом різних концентрацій коагулянтів після 7 днів інкубації

Концентрація Fe, мг/л	FeSO ₄		FeCl ₃		Fe-EDTA	
	1 день	7 день	1 день	7 день	1 день	7 день
5	7,2	5,2 ± 0,45		1,7 ± 0,12*		6,3 ± 0,6
10		3,2 ± 0,3*		1,7 ± 0,12*		5,8 ± 0,53*
15		3,0 ± 0,27*		1,7 ± 0,12*		5,5 ± 0,5*
20		2,9 ± 0,26*		1,6 ± 0,13*		5,2 ± 0,48*
25		2,8 ± 0,24*		1,5 ± 0,12*		5,1 ± 0,45*
30		2,7 ± 0,22*		1,5 ± 0,12*		5,0 ± 0,45*
35		2,7 ± 0,22*		1,4 ± 0,1*		4,9 ± 0,43*
40		2,7 ± 0,21*		1,4 ± 0,1 *		4,7 ± 0,45*
45		2,7 ± 0,22*		1,4 ± 0,1*		4,6 ± 0,42*
50		2,6 ± 0,22*		1,4 ± 0,1*		4,6 ± 0,42*

Примітка: * - достовірна різниця відносно найменшої концентрації сполук

Результати досліджень показали суттєвий вплив обраних коагулянтів на рівень рН культури *Microcystis pulverea*. Спостерігалася тенденція до зниження рН зі збільшенням концентрації коагулянтів, що пов'язано з їх хімічними властивостями та реакцією у водному середовищі.

При використанні FeSO₄ рівень рН зменшувався більш ніж у 2,5 рази порівняно з контрольним зразком, де коагулянти не додавалися. Це свідчить про значний кислотний вплив даного реагенту на середовище. Ще більше зниження рН спостерігалася при застосуванні FeCl₃: у зразках із цим

коагулянтom рівень рН впав із 7,1 до 1,4. Подібне суттєве підкислення середовища є не лише несприятливим для життєдіяльності ціанобактерій, але й становить ризик для екосистеми, де можуть застосовуватися ці коагулянти [34].

Найбільш стабільні результати були отримані при використанні Fe-EDTA. Зниження рівня рН у зразках із цим коагулянтom було помірним — приблизно у 1,5 рази порівняно з контролем. Такий рівень зміни кислотності можна вважати прийнятним як для знищення ціанобактерій, так і для збереження екологічного балансу водойми.

Тому отримані дані свідчать, що серед досліджених коагулянтів Fe-EDTA має найменший вплив на кислотно-лужний баланс середовища, що робить його більш безпечним для використання у природних екосистемах.

Мікроскопія є чи не найважливішим методом у цьому дослідженні, оскільки дозволяє оцінити морфологічні зміни культури *Microcystis pulverea* під впливом коагулянтів, а також структуру та форму утворених флокул. Після інкубації зразків із різними коагулянтами мікроскопічний аналіз надав важливу інформацію про характер змін у клітинах та їх агрегацію.

У зразках із сульфатом заліза спостерігалася зміна кольору культури на помаранчево-жовтий, причому насиченість кольору збільшувалася зі зростанням концентрації коагулянту. Це, ймовірно, свідчить про порушення життєдіяльності ціанобактерій та накопичення вторинних метаболітів у відповідь на стресові умови [48]. Крім того, у цих зразках було помітно утворення рихлих структур, які не формували чітко виражених флокул, що може свідчити про менш ефективне агрегаційне осадження (рис. 3.4.).

У зразках із хлоридом заліза зміна кольору була менш вираженою. Зі збільшенням концентрації було помітно утворення чіткіших флокул, які добре видимі як під мікроскопом, так і при візуальній оцінці шляхом перевертання пробірки. У цих зразках флокули мали щільнішу структуру, що вказує на кращу здатність коагулянту до агрегації клітин.

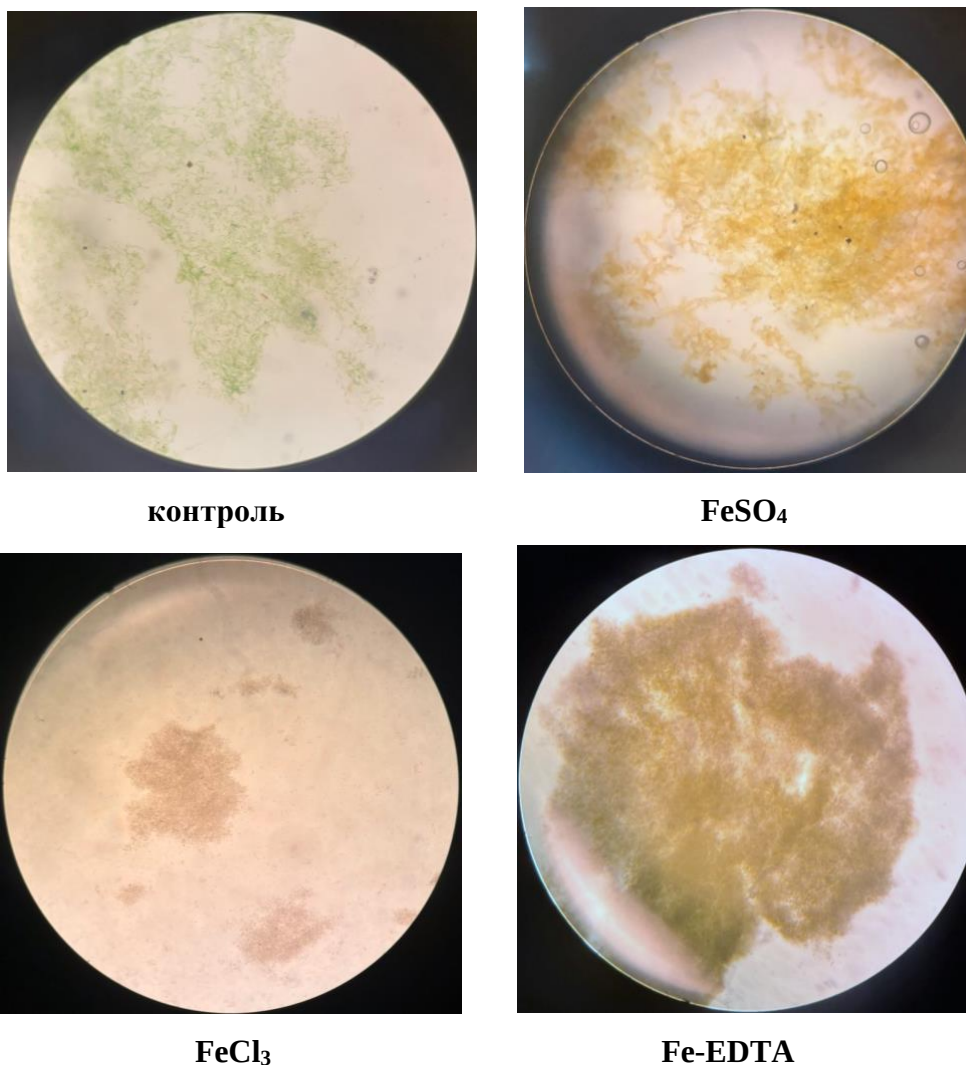


Рис.3.4. Мікроскопічне зображення зразків на 7-й день інкубування з різними коагулянтами у концентрації 50 мгFe/л

Найкращі результати спостерігалися в зразках із Fe-EDTA. Культура майже не змінила свого первинного забарвлення, що свідчить про мінімальний вплив на кольорові пігменти ціанобактерій. При рухах пробірки утворені флокули були чіткими та зберігали свою форму навіть при струшуванні. Під мікроскопом ці флокули мали добре виражену структуру (рис 3.4.) та демонстрували високу ступінь агрегації клітин, що свідчить про ефективність цього коагулянту в осадженні клітин *Microcystis pulverea*.

Отже, результати мікроскопії підтверджують перевагу хелатного комплексу Fe-EDTA у створенні стабільних флокул, порівняно із сульфатом та хлоридом заліза.

Аналіз співвідношення живих і мертвих клітин є важливим етапом дослідження, оскільки він дозволяє оцінити вплив коагулянтів на життєздатність *Microcystis pulverea*. Збереження більшості клітин у життєздатному стані після обробки є критично важливим, оскільки загибель ціанобактерій може призводити до вивільнення ціанотоксинів у середовище, що становить значну небезпеку для екосистеми.

Результати фарбування зразків метиленовим синім та нейтральним червоним показали, що застосування сульфату заліза (FeSO_4) призводило до різкого збільшення кількості мертвих клітин, особливо при високих концентраціях коагулянту (рис 3.5.). Це свідчить про руйнівну дію FeSO_4 на клітинну структуру та метаболізм ціанобактерій. Схожа картина спостерігалася у зразках, оброблених хлоридом заліза (FeCl_3), де також фіксувалося значне пошкодження клітинної мембрани, що приводило до підвищення кількості мертвих клітин (рис. 3.6.).

Найкращі результати були отримані у зразках із Fe-EDTA (рис. 3.7.). Після обробки барвниками клітини демонстрували виражену контрастність, що полегшувало визначення їхнього стану. Навіть при високих концентраціях цього коагулянту кількість мертвих клітин залишалася незначною. Це свідчить про те, що утворення флокул із використанням Fe-EDTA забезпечувало агрегацію клітин у життєздатному стані, мінімізуючи пошкодження клітинних структур.

Таким чином, результати дослідження показують, що хелатний комплекс Fe-EDTA є найбільш ефективним коагулянтом у контексті збереження життєздатності клітин *Microcystis pulverea*, зменшуючи ризики вивільнення ціанотоксинів у навколишнє середовище.

Важливим аспектом дослідження є оцінка токсичності коагулянтів, оскільки ефективний реагент для видалення ціанобактерій повинен не лише забезпечувати утворення флокул, але й не спричиняти значної шкоди мікроорганізмам та екосистемі. Надмірна токсичність може призводити до

загибелі клітин, що, своєю чергою, підвищує ризик вивільнення ціанотоксинів у середовище [27].

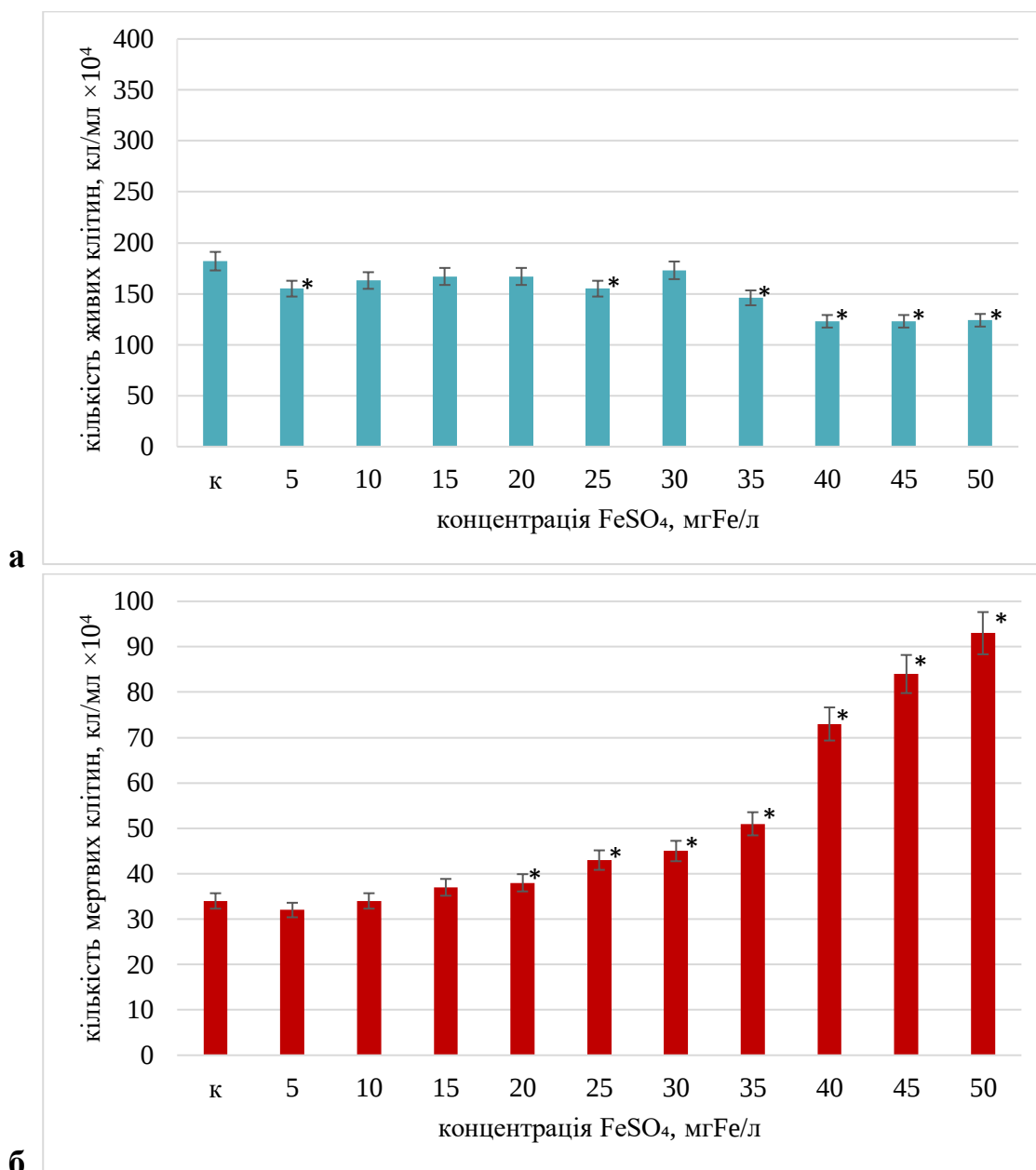


Рис. 3.5. Визначення кількості живих (а) та мертвих (б) клітин при додаванні FeSO₄

*Примітка: * - достовірна різниця відносно контрольних значень*

Результати оцінки токсичності показали, що найбільшу токсичність серед досліджуваних коагулянтів мав сульфат заліза (рис 3.8.). При концентрації 50 мг Fe/л рівень токсичності досягав 42,9%, що вказує на виражену руйнівну дію цього реагенту на клітини *Microcystis pulverea*.

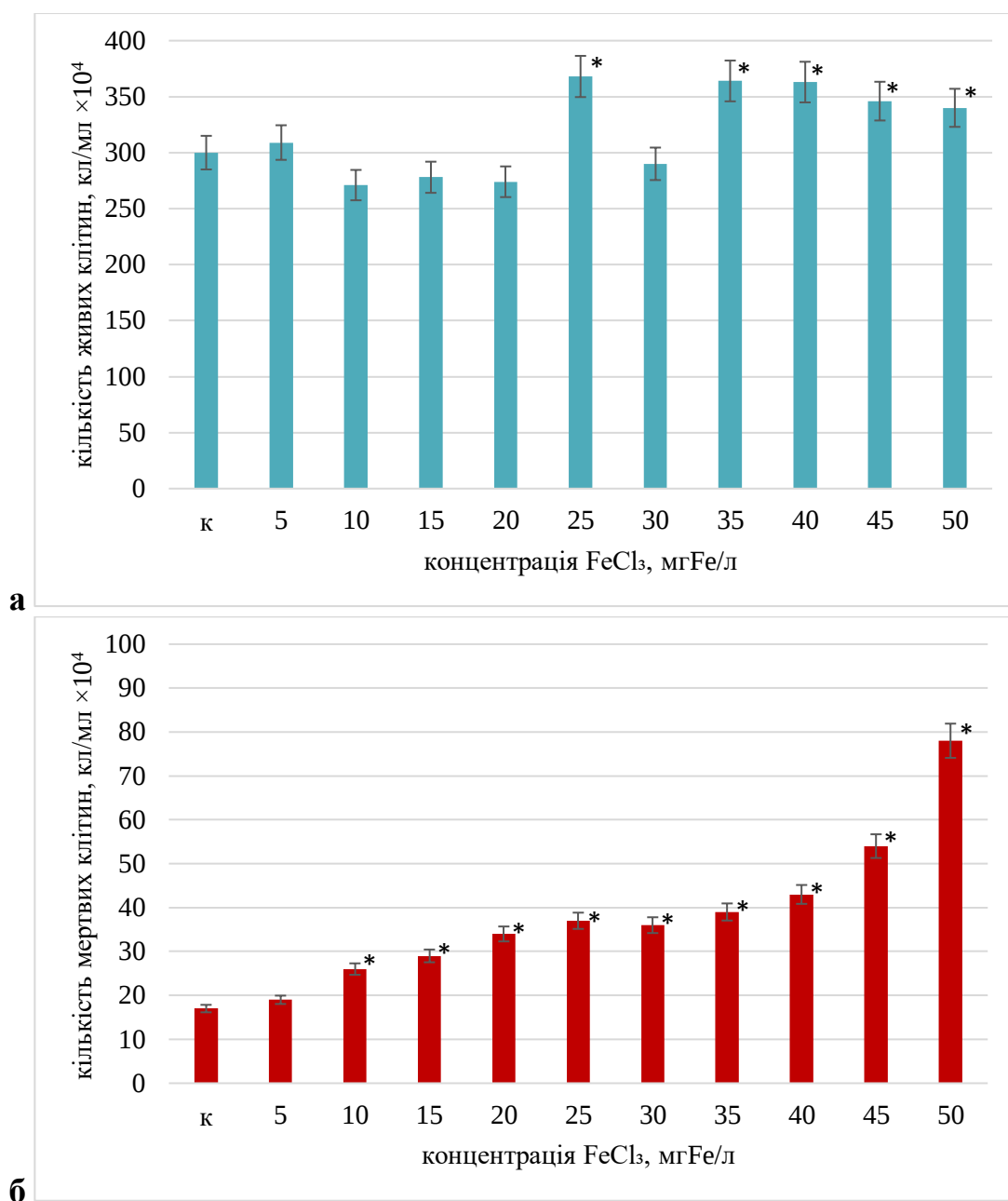


Рис. 3.6. Визначення кількості живих (а) та мертвих (б) клітин при додаванні FeCl₃

*Примітка: * - достовірна різниця відносно контрольних значень*

Ферум хлорид виявився менш токсичним. У цьому випадку спостерігалось поступове зростання токсичності зі збільшенням концентрації коагулянту. При максимальній концентрації 50 мг Fe/л токсичність становила 18,7%. Хоча цей показник є нижчим, ніж у випадку з FeSO₄, він все одно перевищує допустимі межі, що свідчить про певний негативний вплив на клітини ціанобактерій (рис. 3.9).

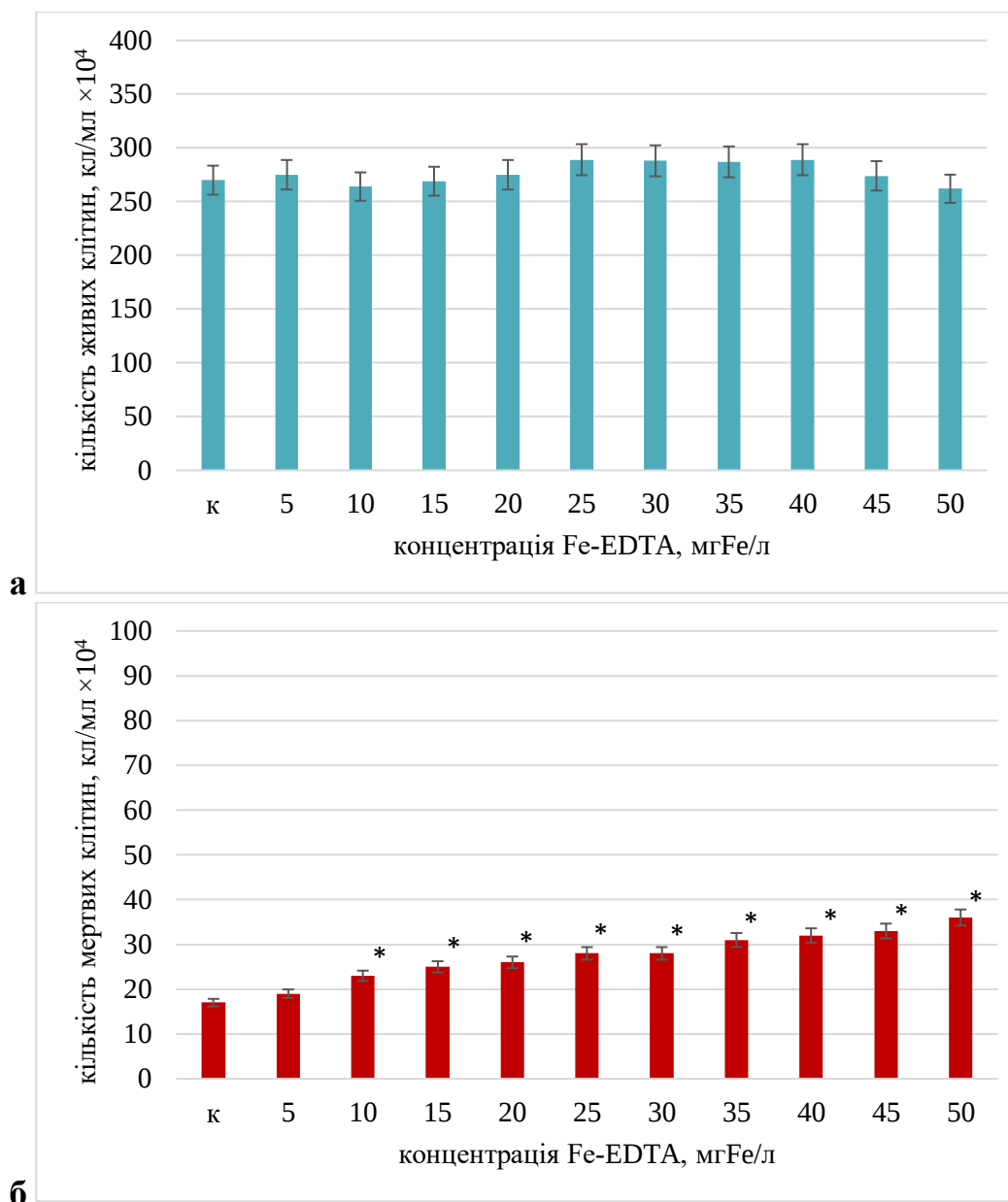


Рис. 3.7. Визначення кількості живих (а) та мертвих (б) клітин при додаванні Fe-EDTA

*Примітка: * - достовірна різниця відносно контрольних значень*

Найкращі результати були отримані при застосуванні хелатного комплексу Fe-EDTA. Його токсичність залишалася на стабільно низькому рівні, навіть при високих концентраціях. Максимальна токсичність цього коагулянту становила лише 12,1% при концентрації 50 мг Fe/л, що відповідає допустимим межах і є безпечним для мікроорганізмів (рис. 3.10). Порівняння коефіцієнтів токсичності при додаванні різних коагулянтів представлена у таблиці 3.2.

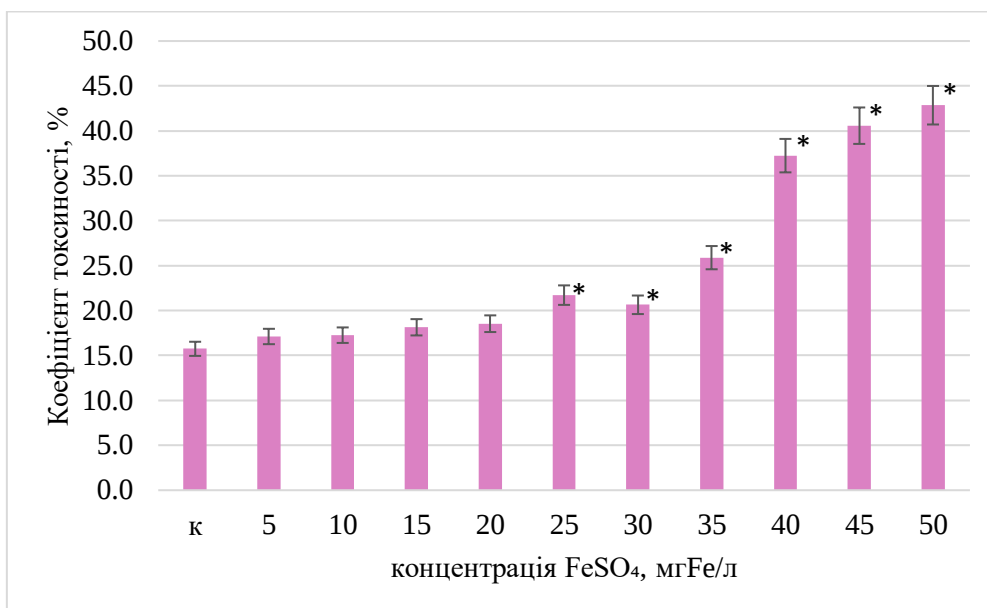


Рис. 3.8. Визначення коефіцієнту токсичності коагулянту FeSO₄

*Примітка: * - достовірна різниця відносно контрольних значень*

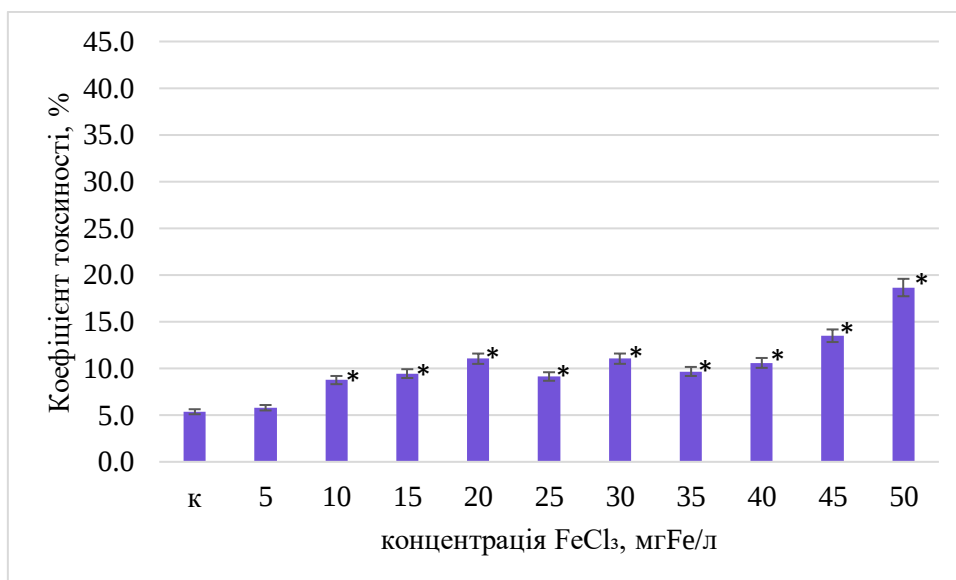


Рис. 3.9. Визначення коефіцієнту токсичності коагулянту FeCl₃

*Примітка: * - достовірна різниця відносно контрольних значень*

У результаті оцінка токсичності підтверджує, що хелатний комплекс Fe-EDTA є найбільш екологічно безпечним коагулянтом, забезпечуючи ефективне осадження ціанобактерій із мінімальним негативним впливом на їхню життєздатність та оточуюче середовище.

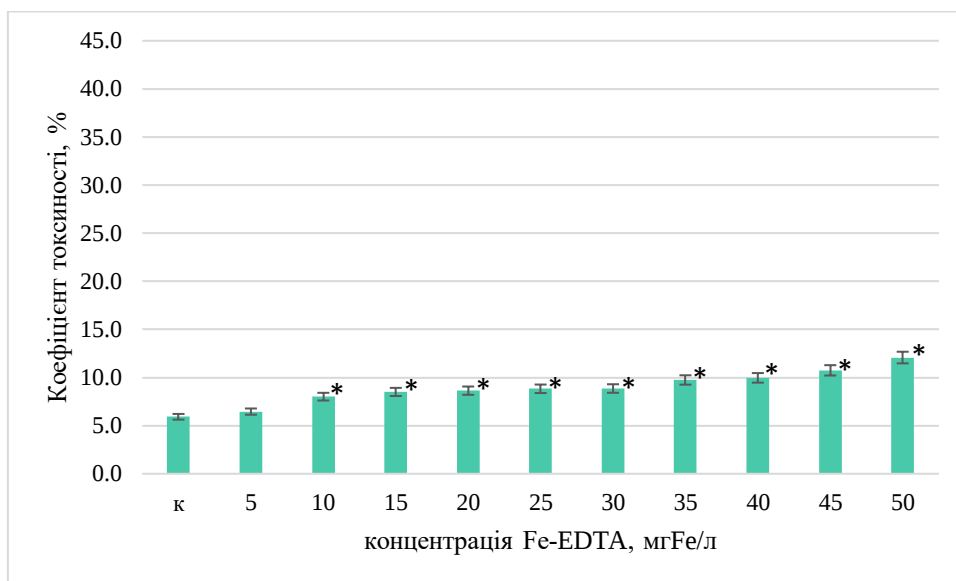


Рис. 3.10. Визначення коефіцієнту токсичності коагулянту Fe-EDTA

Примітка: * - достовірна різниця відносно контрольних значень

Проведене дослідження продемонструвало потенціал застосування коагулянтів на основі заліза для осадження клітин *Microcystis pulvereae*. Всі три досліджувані сполуки – FeSO_4 , FeCl_3 та Fe-EDTA – виявили здатність впливати на ціанобактерії, спричиняючи осадження клітин та зміни їхнього фізіологічного стану.

FeSO_4 та FeCl_3 показали задовільні результати при використанні у менших концентраціях, однак зі збільшенням дозування їхній вплив супроводжувався надмірним підкисленням середовища та зростанням кількості мертвих клітин, що може мати небажані наслідки, зокрема виділення ціанотоксинів у воду [27].

Хелатний комплекс Fe-EDTA відзначив найкращі результати серед усіх досліджуваних сполук. Його застосування забезпечувало стабільність pH середовища, ефективне утворення флокул та мінімальний вплив на життєздатність клітин.

Ефективне управління проблемою надмірного розвитку ціанобактерій, таких як *Microcystis sp.*, є важливим завданням сучасної науки та практики водоочищення. Ціанобактеріальні "цвітіння" не лише знижують якість води,

але й можуть призводити до серйозних екологічних і санітарних наслідків через утворення токсичних сполук. У зв'язку з цим розробка інноваційних методів боротьби з ціанобактеріями має важливе значення для забезпечення стабільності водних екосистем та зменшення ризиків для здоров'я.

Таблиця 3.2.

**Коефіцієнти токсичності різних коагулянтів залежно від
концентрації, %**

Концентрація Fe, мг/л	FeSO₄	FeCl₃	Fe-EDTA
5	17,1 ± 0,91	5,8 ± 0,21	6,5 ± 0,29
10	17,3 ± 0,87	8,8 ± 0,25*	8,0 ± 0,42*
15	18,1 ± 1,01	9,4 ± 0,36*	8,5 ± 0,41*
20	18,5 ± 0,67	11,0 ± 0,52*	8,6 ± 0,29*
25	21,7 ± 0,97*	9,1 ± 0,48*	8,8 ± 0,37*
30	20,6 ± 1,03*	11,0 ± 0,44*	8,9 ± 0,51*
35	25,9 ± 1,11*	9,7 ± 0,39*	9,7 ± 0,40*
40	37,2 ± 1,67*	10,6 ± 0,58*	10,0 ± 0,38*
45	40,6 ± 1,98*	13,5 ± 0,39*	10,7 ± 0,82*
50	42,9 ± 2,01*	18,7 ± 0,88*	12,1 ± 0,73*

*Примітка: * - достовірна різниця відносно найменшої концентрації сполук*

Застосування неорганічних коагулянтів є одним із найоптимальніших методів, які демонструють здатність ефективно видаляти ціанобактерії з водного середовища. Проте, важливо враховувати, що вибір коагулянту має базуватися не лише на його ефективності, а й на безпеці для екосистеми. Надмірне пошкодження клітин може спричинити вивільнення токсинів, що робить необхідним ретельне вивчення впливу коагулянтів на клітини та водне середовище загалом.

Таким чином, для успішного впровадження коагулянтів у практику водоочищення необхідний комплексний підхід, який враховує їхні хімічні властивості, специфіку дії та потенційний екологічний вплив. Раціональне

використання таких методів є вагомим кроком у забезпеченні якості води, охороні довкілля та зменшенні негативних наслідків "цвітіння" ціанобактерій.

ВИСНОВКИ

1. У результаті накопичувального культивування отримано модельну культуру *Microcystis pulverea* із щільністю клітин $5,4 \times 10^6$ кл/мл, що відповідає умовам природного процесу «цвітіння» води.

2. Додавання коагулянтів до культури *Microcystis pulverea* викликає морфологічні зміни, зокрема зміну кольору клітин та в'язкості середовища, утворення осаду, а також формування чітких флокул, що добре видно під час мікроскопічного аналізу. Найбільш виражені зміни культури спостерігалися за умов інкубації із Fe-EDTA: чіткі й добре сформовані флокули, стійкі до механічного впливу.

3. Інкубація зі сполуками Феруму призводить до зміни рН живильного середовища та впливає на щільність культури *Microcystis pulverea*. У зразках із FeSO_4 та FeCl_3 спостерігались виражені якісні зміни живильного середовища, що призводили до утворення нестійких флокул та поступової загибелі досліджуваної культури. Коефіцієнт токсичності для FeSO_4 та FeCl_3 становив 42,9% та 18,7% відповідно.

4. Інкубація *Microcystis pulverea* із хелатною формою заліза (Fe-EDTA) навіть при високих концентраціях коагулянту дозволила значно знизити кількість клітин без загибелі останніх. Частка мертвих клітин у культурі *Microcystis pulverea* за дії максимальної концентрації Fe-EDTA не перевищувала 15%.

5. Додавання коагулянтів до культури *Microcystis pulverea* викликає морфологічні зміни, зокрема зміну кольору клітин та в'язкості середовища, утворення осаду, а також формування чітких флокул, що добре видно під час мікроскопічного аналізу. Найбільш виражені зміни культури спостерігалися за

умов інкубації із Fe-EDTA: чіткі й добре сформовані флокули, стійкі до механічного впливу.

6. Задля регуляції чисельності ціанобактерій *Microcystis pulverea* шляхом коагуляції рекомендовано використовувати 40 мг/л Fe-EDTA з подальшим виділенням осадженої біомаси.

Список використаної літератури

1. Addison, E. L., Gerlach, K. T., Spellman, C. D., Santilli, G., Fairbrother, A. R., Shepard, Z., Goodwill, J. E. (2021). Physicochemical implications of cyanobacteria oxidation with Fe(VI). *Chemosphere*, 266, 128956.
2. Ahmad, A. L., Yasin, N. M., Derek, C. J. C., & Lim, J. K. (2011). Optimization of microalgae coagulation process using chitosan. *Chemical Engineering Journal*, 173(3), 879-882.
3. Ahmed, E., & Holmström, S. J. (2014). Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial biotechnology*, 7(3), 196–208.
4. Alam, M. Z. B., Otaki, M., Furumai, H., & Ohgaki, S. (2001). Direct and indirect inactivation of *Microcystis aeruginosa* by UV-radiation. *Water Research*, 35(4), 1008-1014.
5. Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quñones, F. (2003). *Bacterial iron homeostasis. FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 215–237.
6. Berdalet, E., Kudela, R., Urban, E., Enevoldsen, H., Banas, N., Yin, K. (2017). GlobalHAB: A New Program to Promote International Research, Observations, and Modeling of Harmful Algal Blooms in Aquatic Systems. *Oceanography*, 30(1), 70–81.
7. Bláha, L., Babica, P., & Maršálek, B. (2009). Toxins produced in cyanobacterial water blooms - toxicity and risks. *Interdisciplinary toxicology*, 2(2), 36–41.
8. Boopathi, T., & Ki, J. S. (2014). Impact of environmental factors on the regulation of cyanotoxin production. *Toxins*, 6(7), 1951–1978.
9. Chakraborty, S., Verma, E., & Singh, S. S. (2019). Cyanobacterial Siderophores: Ecological and Biotechnological Significance. *Cyanobacteria*, 383–397.
10. Chow, C. W. K., House, J., Velzeboer, R. M. A., Drikas, M., Burch, M. D., & Steffensen, D. A. (1998). The effect of ferric chloride flocculation on cyanobacterial cells. *Water Research*, 32(3), 808–814.

11. Dixon, M. B., Richard, Y., Ho, L., Chow, C. W., O'Neill, B. K., & Newcombe, G. (2011). A coagulation–powdered activated carbon–ultrafiltration–Multiple barrier approach for removing toxins from two Australian cyanobacterial blooms. *Journal of hazardous materials*, 186(2-3), 1553-1559.
12. El Bouaidi, W., Libralato, G., Douma, M., Ounas, A., Yaacoubi, A., Lofrano, G., Albarano, L., Guida, M., & Loudiki, M. (2022). A review of plant-based coagulants for turbidity and cyanobacteria blooms removal. *Environmental science and pollution research international*, 29(28), 42601–42615.
13. Erratt, K. J., Creed, I. F., & Trick, C. G. (2022). Harmonizing science and management options to reduce risks of cyanobacteria. *Harmful algae*, 116, 102264.
14. Fu, Q.-L., Fujii, M., Natsuike, M., & Waite, T. D. (2019). Iron uptake by bloom-forming freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in natural and effluent waters. *Environmental Pollution*, 247, 392–400.
15. Fujii, M., Dang, T. C., Rose, A. L., Omura, T., & Waite, T. D. (2011). Effect of Light on Iron Uptake by the Freshwater Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Science & Technology*, 45(4), 1391–1398.
16. González, A., Sevilla, E., Bes, M. T., Peleato, M. L., & Fillat, M. F. (2016). Pivotal Role of Iron in the Regulation of Cyanobacterial Electron Transport. *Advances in microbial physiology*, 68, 169–217.
17. Gu, P., Li, Q., Zhang, W., Zheng, Z., & Luo, X. (2019). Effects of different metal ions (Ca, Cu, Pb, Cd) on formation of cyanobacterial blooms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 109976.
18. Ho, L., Sawade, E., & Newcombe, G. (2012). Biological treatment options for cyanobacteria metabolite removal – A review. *Water Research*, 46(5), 1536–1548.
19. <https://www.algaebase.org/>

20. Huertas, M. J., & Mallén-Ponce, M. J. (2022). Dark side of cyanobacteria: searching for strategies to control blooms. *Microbial biotechnology*, 15(5), 1321–1323.
21. Ibelings, B. W., Fastner, J., Bormans, M., & Visser, P. M. (2016). Cyanobacterial blooms. Ecology, prevention, mitigation and control: Editorial to a CYANOCOST Special Issue. *Aquatic Ecology*, 50(3), 327–331.
22. Jančula, D., & Maršálek, B. (2011). Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. *Chemosphere*, 85(9), 1415–1422.
23. Jiang, Y., Liu, Y., Shi, D., Fu, W., Sun, P. F., Li, J., & Shao, S. (2020). Membrane fouling in a powdered activated carbon–membrane bioreactor (PAC-MBR) for micro-polluted water purification: fouling characteristics and the roles of PAC. *Journal of Cleaner Production*, 277, 122341.
24. Kinnear S. (2010). Cylindrospermopsin: a decade of progress on bioaccumulation research. *Marine drugs*, 8(3), 542–564.
25. Kosakowska, A., Nędzi, M., & Pempkowiak, J. (2007). Responses of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to iron and humic substances. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(5), 365–370.
26. Kranzler, C., Rudolf, M., Keren, N., & Schleiff, E. (2013). *Iron in Cyanobacteria. Genomics of Cyanobacteria*, 57–105.
27. Le, K. T. N., Goitom, E., Trigui, H., Sauvé, S., Prévost, M., & Dorner, S. (2021). The Effects of Ferric Sulfate ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) on the Removal of Cyanobacteria and Cyanotoxins: A Mesocosm Experiment. *Toxins*, 13(11), 753.
28. Ledin, M. (2000). Accumulation of metals by microorganisms — processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews*, 51(1-4), 1–31. doi:10.1016/s0012
29. Lopes P., Becker V., Patrícia Vieira da Cunha K., Frota A., Monicelli F., Araújo F. (2024). The use of coagulant and natural soil to control cyanobacterial blooms in a tropical reservoir, *Science of The Total Environment*, 939, 173378.

30. Lürling, M., Kang, L., Mucci, M., van Oosterhout, F., Noyma, N. P., Miranda, M., Marinho, M. M. (2020). Coagulation and precipitation of cyanobacterial blooms. *Ecological Engineering*, 158, 106032.
31. Merel, S., Walker, D., Chicana, R., Snyder, S., Baurès, E., & Thomas, O. (2013). State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*, 59, 303–327.
32. Mohamed, Z. A. (2018). Cyanotoxins in Egypt and Saudi Arabia. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences.
33. Molot, L. A., Li, G., Findlay, D. L., & Watson, S. B. (2010). Iron-mediated suppression of bloom-forming cyanobacteria by oxine in a eutrophic lake. *Freshwater Biology*, 55(5), 1102-1117.
34. Naceradska, J., Pivokonska, L., & Pivokonsky, M. (2019). On the importance of pH value in coagulation. *Journal of Water Supply: Research and Technology—AQUA*, 68(3), 222-230.
35. Orihel, D. M., Schindler, D. W., Ballard, N. C., Wilson, L. R., & Vinebrooke, R. D. (2016). Experimental iron amendment suppresses toxic cyanobacteria in a hypereutrophic lake. *Ecological applications : a publication of the Ecological Society of America*, 26(5), 1517–1534.
36. Paerl, H. W. (2014). Mitigating Harmful Cyanobacterial Blooms in a Human- and Climatically-Impacted World. *Life*, 4(4), 988-1012.
37. Paerl, H. W., & Paul, V. J. (2012). Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water research*, 46(5), 1349–1363.
38. Qian, F., Dixon, D. R., Newcombe, G., Ho, L., Dreyfus, J., & Scales, P. J. (2014). The effect of pH on the release of metabolites by cyanobacteria in conventional water treatment processes. *Harmful Algae*, 39, 253–258.
39. Qiu, G.-W., Koedooder, C., Qiu, B.-S., Shaked, Y., & Keren, N. (2021). Iron transport in cyanobacteria – from molecules to communities. *Trends in Microbiology*.

40. Rodgers K.J., Main B.J., Samardzic K. (2018). Cyanobacterial Neurotoxins: Their Occurrence and Mechanisms of Toxicity. *Neurotox Res*, 33(1):168-177.
41. Şengül, A.B., Ersan, G., & Tüfekçi, N. (2018). Removal of intra-and extracellular microcystin by submerged ultrafiltration (UF) membrane combined with coagulation/flocculation and powdered activated carbon (PAC) adsorption. *Journal of Hazardous Materials*, 343, 29-35.
42. Shadi S., Ugurlu K., Salem S.A., Motasem Y.D.A., Mohammed J.K.(2022). Recent advancement in the application of hybrid coagulants in coagulation-flocculation of wastewater: A review. *Journal of Cleaner Production*, 345,131133.
43. Shortle, J. S., Mihelcic, J. R., Zhang, Q., & Arabi, M. (2020). Nutrient control in water bodies: A systems approach. *Journal of environmental quality*, 49(3), 517–533.
44. Sigee, D. C., Glenn, R., Andrews, M. J., Bellinger, E. G., Butler, R. D., Epton, H. A. S., & Hendry, R. D. (1999). Biological control of cyanobacteria: principles and possibilities. *The Ecological Bases for Lake and Reservoir Management*, 161–172.
45. Stewart, I., Schluter, P. J., & Shaw, G. R. (2006). Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health - a review. *Environmental health : a global access science source*, 5, 7
46. Stroom, J. M., & Kardinaal, W. E. A. (2016). How to combat cyanobacterial blooms: strategy toward preventive lake restoration and reactive control measures. *Aquatic Ecology*, 50(3), 541–576.
47. Sun, F., Pei, H.-Y., Hu, W.-R., Li, X.-Q., Ma, C.-X., & Pei, R.-T. (2013). The cell damage of *Microcystis aeruginosa* in PACl coagulation and floc storage processes. *Separation and Purification Technology*, 115, 123–128.
48. Webb, E. A., Moffett, J. W., & Waterbury, J. B. (2001). Iron stress in open-ocean cyanobacteria (*Synechococcus*, *Trichodesmium*, and *Crocosphaera*

spp.): identification of the IdiA protein. *Applied and environmental microbiology*, 67(12), 5444–5452.

49. Wiegand, C., & Pflugmacher, S. (2005). Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(3), 201–218.

50. Yang, X., Wang, S., Pi, K., Ge, H., Zhang, S., & Gerson, A. R. (2024). Coagulation as an effective method for cyanobacterial bloom control: A review. *Water environment research: a research publication of the Water Environment Federation*, 96(3), e11002.

51. Zeng, G., Zhang, R., Liang, D., Wang, F., Han, Y., Luo, Y., Gao, P., Wang, Q., Wang, Q., Yu, C., Jin, L., & Sun, D. (2023). Comparison of the Advantages and Disadvantages of Algae Removal Technology and Its Development Status. *Water*, 15(6), 1104.

52. Zhang, S., Zhao, B., Li, J., Song, X., Tong, Y., & An, W. (2022). Host Cyanobacteria Killing by Novel Lytic Cyanophage YongM: A Protein Profiling Analysis. *Microorganisms*, 10(2), 257.

53. Zhang, T., He, J., & Luo, X. (2017). Effect of Fe and EDTA on Freshwater Cyanobacteria Bloom Formation. *Water*, 9(5), 326.

54. Zhang, W., Liu, J., Xiao, Y., Zhang, Y., Yu, Y., Zheng, Z., Liu, Y., & Li, Q. (2022). The Impact of Cyanobacteria Blooms on the Aquatic Environment and Human Health. *Toxins*, 14(10), 658.

55. Zurawell, R. W., Chen, H., Burke, J. M., & Prepas, E. E. (2005). Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews*, 8(1), 1–37.

56. Золотарьова О.К., Шнекова Є.І., Сиваш О.О., Михайленко Н.Ф. Перспективи використання мікробіодоростей у біотехнології. / Під ред. О.К. Золотарьової. – К.: Альтерпрес., 2008. – 234 с.

ДОДАТКИ

Додаток А**Правила роботи в біотехнологічній лабораторії**

При проведенні робіт у біотехнологічній лабораторії потрібно ретельно дотримуватись вимог, наведених в інструкції з техніки безпеки. Якщо студент не ознайомлений з зазначеними вимогами, він повинен повідомити про це викладача.

Студент несе персональну відповідальність за власну безпеку під час виконання експериментальних робіт у лабораторії, що підтверджено його особистим підписом у журналі з техніки безпеки.

У лабораторію забороняється входити у верхньому одязі. Усі студенти повинні працювати в чистих бавовняних халатах, які мають бути застебнуті на всі гудзики. Волосся необхідно прибрати з обличчя та сховати під шапочку. У лабораторії кожен працює на постійному місці та виконує завдання індивідуально. На робочому місці потрібно підтримувати зразковий порядок.

Під час виконання лабораторної роботи категорично забороняється користуватися мобільними телефонами та залишати їх увімкненими. У лабораторії забороняється вживати їжу та напої.

До роботи у біотехнологічній лабораторії не допускаються студенти, які мають пошкодження на відкритих ділянках шкіри, не оброблені та не заклеєні бактерицидним пластиром.

Працюючи з відкритим полум'ям (газовий пальник, спиртівка), потрібно дотримуватися таких вимог: запалювати спиртівку та газовий пальник лише за допомогою сірника, гасити запалену спиртівку потрібно, закривши доступ повітря спеціальним ковпачком, а газовий пальник – перекриттям доступу газу. Розташовувати спиртівку потрібно на відстані не менш, ніж 20 см від краю робочого стола. У разі випадкового займання ватно-марлевого корка необхідно терміново загасити його, закривши доступ повітря.

Під час роботи з живими культурами мікроорганізмів необхідно слідкувати за наявністю запобіжних ватних тампонів у піпетках та ватномарлевих корків у пробірках. У випадку потрапляння мікробного матеріалу на відкриті ділянки шкіри, стіл чи підлогу це місце треба ретельно обробити дезінфікувальним розчином та ретельно промити водою.

Роботу у мікробіологічному боксі дозволено проводити лише за проходження додаткового інструктажу з техніки безпеки, наявності відповідного захисного одягу (халат, шапочка, захисна маска та захисні окуляри).

Категорично забороняється заходити у бокс за увімкненої бактерицидної лампи.

Всі предмети, використані у роботі з живими мікроорганізмами, мають бути знезаражені фламбуванням (петлі, голки), кип'ятінням (пробірки, чашки Петрі), обробленням дезінфікувальними розчинами (шпателі, піпетки, предметні й накривні скельця). Забороняється користуватися скляним посудом, що має сколи, тріщини, гострі краї.

У лабораторії необхідно дотримуватися обережності під час роботи з хімічними речовинами. При потребі (робота з концентрованими хімічними речовинами) потрібно використовувати засоби індивідуального захисту (рукавички, респіратори, гумовий фартух, захисні окуляри). У процесі розведення концентрованої кислоти необхідно кислоту вносити у розчинник, а не навпаки. У випадку потрапляння будь-яких хімічних речовин на шкіру необхідно змити реактив великою кількістю води; нейтралізувати кислоту необхідно слабким розчином соди, а луг – слабким розчином оцтової кислоти.

Роботу з концентрованими та леткими хімічними речовинами необхідно проводити під витяжною шафою.

Необхідно суворо дотримуватися вимог електробезпеки. Забороняється користуватися несправним електрообладнання і вмикати прилади без дозволу викладача або лаборанта, а також торкатися поверхні приладу мокрими руками.

Після закінчення роботи студент повинен упорядкувати робоче місце, руки необхідно ретельно вимити, а за потреби обробити дезінфікувальним розчином. Слід мати індивідуальний рушник або серветки для витирання рук.

Публікації за результатами дослідження