

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

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

**ВИБІР СЕРЕДОВИЩА КУЛЬТИВУВАННЯ ТА
ОПТИМІЗАЦІЯ ПОСТФЕРМЕНТАЦІЙНОЇ ОБРОБКИ
БІОМАСИ ЗЕЛЕНОЇ МІКРОВОДОРОСТІ
*MONORAPHIDIUM SP.***

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:

студентка 4 курсу, групи 407

спеціальність

162 Біотехнології та біоінженерія

Андрюк Валентина Василівна

Керівник:

Кандидат біологічних наук, доцент

Чебан Лариса Миколаївна

До захисту допущено

на засіданні кафедри

протокол №_____ від _____ 2024 р.

Зав. кафедрою _____ проф. Копильчук Г. П.

Чернівці – 2024

Анотація

*Робота присвячена підбору середовища та оптимізації постферментаційної обробки біомаси зеленої мікроводорості *Monoraphidium* sp. Розроблено оптимальний режим відділення біомаси *Monoraphidium* sp. за показником ефективності флокуляції: використання базальтового туфу у концентрації 2 мг/мл, відстоювання культуральної рідини 3 доби (для агрегації клітин) та подальше центрифугування – 4000 об/хв, 20 хв.*

Ключові слова: *Monoraphidium* sp., культивування, базальтовий туф, флокулянт, біомаса.

Abstract

*The work is devoted to the optimization of the conditions of cultivation and post-fermentation treatment of the biomass of the green microalgae *Monoraphidium* sp. The optimal regime for the separation of *Monoraphidium* sp. biomass in terms of flocculation efficiency has been developed: the use of basalt tuff at a concentration of 2 mg/ml, settling of the culture fluid for 3 days (for cell agglomeration) and subsequent centrifugation - 4000 rpm, 20 min.*

Keywords: *Monoraphidium* sp., cultivation, basalt tuff, flocculant, biomass.

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

_____ В.В. Андрюк

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Характеристика представників.....	6
роду <i>Monoraphidium</i> (Komark-Legn.)	6
1.2. Методи культивування мікроводоростей та їх оптимізація	9
1.3. Підходи відділення біомаси культур мікроводоростей	16
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	23
2.1. Матеріали дослідження	23
2.2. Умови дослідження.....	23
2.3. Методи дослідження.....	25
2.4. Статистична обробка результатів.....	28
РОЗДІЛ 3.РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	29
3.1. Накопичувальне культивування <i>Monoraphidium sp</i>	29
3.2. Апробація використання базальтового туфу як флокулянта для відділення біомаси <i>Monoraphidium sp</i>	31
3.3. Біохімічна характеристика біомаси <i>Monoraphidium sp</i>	34
ВИСНОВКИ	38
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	39
ДОДАТКИ.....	44

ВСТУП

Реалізація великомасштабного виробництва біомаси мікроводоростей потребує застосування недорогих технологій щодо отримання та переробки їх біомаси [1]. *Monoraphidium* - це рід зелених водоростей з родини *Selenastraceae*. Цей рід водоростей характеризується простою структурою, особливістю швидко нарощувати біомасу та має досить високу щільність культури при лабораторних вирощуваннях. Особливість представників цього роду – це дрібні веретеноподібні клітини, іноді видовжені, доволі спірально скручені, розмір варіюється у межах 8-18 мкм завдовжки та 1,6-3,2 мкм завширшки [2]. Згідно з результатами наявних публікацій, доведено, що представники цього роду продукують різні види ліпідів, вуглеводів та інших компонентів, що входять до складу олій [3]. Звернувши увагу на достатню кількість публікації та значний інтерес науковців, *Monoraphidium* залишається недостатньо вивченим родом. А при роботі з маловивченими видами постає проблема вибору оптимального живильного середовища, режимів культивування та способів обробки біомаси.

Виробництво біомаси мікроводоростей потребує застосування недорогих технологій щодо отримання та переробки їх біомаси. Часто процес відділення біомаси мікроскопічних водоростей стає одним із найскладніших та найдорожчих етапів їх виробництва [4]. Труднощам при відділенні біомаси сприяють малі розміри клітин мікроводоростей, висока щільність клітин у культурі та електростатичні взаємодії, що пов'язані із негативним зарядом поверхні клітин водоростей [5].

Одним із результативних та економічно вигідних методів відбору біомаси є флокуляція, застосування якої дозволяє видалити понад 90 % клітин мікроводоростей з культуральної рідини [6]. Існують різні види флокулянтів, що використовуються при роботі з мікроводоростями, і для їх

оптимального вибору необхідно враховувати низку чинників: поверхневий заряд клітин, характер взаємодії клітин з флокулянтом, концентрацію та розмір клітин, іонні взаємодії, природу флокулянта та його дозування тощо [7]. Використання флокулянта дозволяє підвищити швидкість осадження клітин водоростей завдяки агрегації клітин і, таким чином, полегшити подальше розділення шляхом відстоювання, центрифугування або фільтрації. Проте існують і деякі негативні аспекти, такі як: необхідність подальшого видалення флокулянта, хімічне забруднення отриманої біомаси, утворення крихких пластівців осаду біомаси та можливий тривалий час осадження клітин [7]. Перспективними як флокулянти можуть бути мінеральні полікомпонентні базальтові туфи, що характеризуються високою хімічною та температурною стійкістю. Базальтові туфи – мінерали вулканічного походження, за хімічним складом та структурою близькі до цеолітів. Вони є достатньо потужними сорбентами, мають високу селективну здатність поглинання, характеризуються високою механічною та хімічною стійкістю [6].

Метою даної роботи був підбір середовища культивування та оптимізація постферментаційної обробки біомаси зеленої мікроводорості *Monoraphidium sp.*

Для реалізації поставленої мети були поставлені наступні завдання:

1) апробувати середовище BG-11 для накопичувального культивування *Monoraphidium sp.*

2) апробувати використання базальтового туфу як флокулянта для відділення біомаси *Monoraphidium sp.*

3) визначити параметри біомаси *Monoraphidium sp.*: кількість білків, вуглеводів, ліпідів та пігментів.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика представників роду

Monoraphidium (Komark-Legn.)

Протягом останніх тисячоліть людство визнало цінність наземних рослин як поновлюваних джерел їжі, ліків чи кормів для тварин. За всю історію людства методи сільського господарства постійно модифікувалися та вдосконалювалися задля того, щоб відповідати мінливим потребам цивілізації. Сьогодні наше населення потребує подальших інновацій для подолання серйозних екологічних проблем, пов'язаних з нинішніми промисловими і сільськогосподарськими практиками.

Мікроводорості - це група різноманітних одноклітинних фотосинтезуючих організмів, які з кожним роком стають ресурсами нового покоління з потенціалом для вирішення нагальних потреб промисловості та сільського господарства. Велике біологічне різноманіття водоростей може бути використане для виробництва безлічі цінних біопродуктів, особливо біодизеля, який з кожним роком набирає все більшої популярності. Крім того, мікроводорості мають низку переваг, таких як низькі виробничі витрати, відсутність потреби в орних землях і здатність швидко рости як у великомасштабних відкритих системах, так і в масштабованих, повністю закритих фотобіореакторах [8].

Одним із прикладів одноклітинних мікроводоростей є представники роду *Monoraphidium*. Це зелені мікроводорості родини *Selenastraceae*. Клітини 2-182 x 1-8 мкм, прямі, від прямих до сигмоподібних або спірально скручених, часто з видовженими кінцями. Клітинні стінки гладенькі. Клітини однадерні; хлоропласти одиночні, пристінкові; піреноїд відсутній або, за наявності, складний. Нестатеве розмноження автоспорами; спорангії, що утворюються в одному або двох паралельних рядах; вивільняються при

поздовжньому або поперечному розриві материнської оболонки. Джгутикові стадії та статеве розмноження невідомі. *Monoraphidium* планктонна або прикріплена у прісній воді чи ґрунті мікроводорість; описана з Європи, Азії, Північної Америки [9].

Клітини цієї водорості за морфологією та розмноженням подібні до *Ankistrodesmus*, проте не утворюють колоній [10]. Рід відокремлений від *Ankistrodesmus* на основі одноклітинної природи та послідовного розвитку автоспор [9].

Всі опубліковані до цього часу дослідження, що стосуються культивування водоростей *Monoraphidium* та споріднених родів з родини *Selenastraceae* (наприклад, *Ankistrodesmus*) були зосереджені на виробництві біодизельного палива. Нещодавно було показано, що штами з цієї родини є перспективними кандидатами в цій галузі завдяки високій ліпідній продуктивності та відповідному профілю жирних кислот [11].

Наприклад, вміст ліпідів *Monoraphidium dybowskii* C29 досягав 39%, Для *Monoraphidium contortum* вміст ліпідів становив 35%. У *Monoraphidium* sp. FXY-10 (56,8%) набагато вищий, ніж середній показник 25,5% для маслянистих зелених водоростей. Вид водоростей потребує близько 30% ліпідів на суху вагу, щоб стати можливим кандидатом для виробництва біодизеля. Таким чином, *Monoraphidium* sp. FXY-10 вважається потенційним кандидатом для виробництва біодизеля, виходячи лише з відсоткового вмісту ліпідів [12]. Окрім, *Monoraphidium* sp. FXY-10 ще декілька видів були ідентифіковані як потенційні виробники біодизельного палива, а саме *M. Contortum*, *Monoraphidium* sp. SB2, *M. Minutum*, *M. dybowskii* LB50 [11].

Згідно з даними, то *M. contortum* має високу продуктивність біомаси (896 мг/л на добу), вміст ліпідів (22,2 %) і достатній вміст жирних кислот C16:0 (24,3 %) і C18:0 (38,5 %). *M. tortile*, навпаки, характеризувався високим вмістом ліпідів (31,5 %), вміст жирних кислот C18:1 (53,9 %) але має низьку продуктивність біомаси (33 мг/л га добу) [13]. Також є дані, найбільший вміст жирних кислот C16:0 у *M. minutum* – 66,4% [14].

Серед представників роду *Monoraphidium* з найвищим вмістом олеїнової кислоти (C18:1) були *M. tortile* (53,9 %) , *M. contortum* (38,5 %) та *Monoraphidium* sp. FXY-10 [12, 13].

Також відзначено штам *Monoraphidium* sp. IBASU-A, у якому дослідили наявність провідного комплексу з пальмітинової (C16:0), олеїнової (C18:1), лінолевої (C18:2) та ліноленової (C18:3) жирних кислот. На початкових стадіях культивування у ліпідному складі біомаси переважає більше пальмітинової (C16:0) та олеїнової (C18:1) жирних кислот, що відіграє важливу роль для виробництва біодизеля високої якості. А на пізніх стадіях культивування відмічено переважання незамінних для людини та тварин довголанцюжкових поліненасичених кислот – лінолевої (C18:2) та ліноленової (C18:3) [10].

Наведено дані, що *Monoraphidium braunii* відома своїм швидким ростом і хорошою толерантністю до різних властивостей природної органічної речовини, тобто вона досліджена на здатність переносити та видаляти ендокринний руйнівник бісфенол А. *M. braunii* продемонстрував хорошу ефективність видалення при концентраціях 2, 4 і 10мг/л , видаляючи, відповідно, 39%, 48% і 35% вихідного бісфенолу А [15].

Судячи з інтересу науковців та враховуючи результати їх досліджень, представники роду *Monoraphidium* виявилися хорошими продуцентами біомаси та ліпідів з перспективним профілем жирних кислот. Але більшість з цих видів потребують ретельного відбору та оптимізації умов культивування, щоб, наприклад, відповідати стандартам для сучасних установок з виробництва біодизеля.

Пошук потенційних видів *Monoraphidium* повинен бути постійним, оскільки багато штамів, описаних у статтях, потребують доповнення або модифікації живильного середовища, перш ніж відповідати вимогам комерційних біодизельних установок. Важливо оцінити продуктивність цих штамів у різних установках фотобіореакторів на відкритому повітрі, методологію збору та екстракції ліпідів, а також економічну доцільність в

цілому, оскільки досліджень у цих сферах наразі бракує [11].

1.2. Методи культивування мікроводоростей та їх оптимізація

Водорості належать до дивергентної групи, що охоплює велику кількість відомих видів, які служать сировиною для виробництва біопалива. Водорості зазвичай можна вирощувати у великих масштабах з неорганічними сполуками, як вуглекислий газ, світлова енергія, мінеральні речовини, такі як сполуки фосфору та нітрогену.

З давніх часів водорості використовувалися як джерело їжі для людей і тварин. Крім того, вони також демонструють чудову біоактивність і секрецію метаболітів. У значній мірі проявляють властивості антибіотиків, можуть бути використані як нутрицевтики, добрива для очищення стічних. Останнє десятиліття стало свідком перетворення біомаси мікроводоростей у різноманітні форми біопалива, такі як біодизель, біоетанол, біоводень та біонафта, які потенційно можуть вирішити поточну енергетичну кризу [16].

Клітини мікроводоростей мають такі важливі ключові характеристики, як висока швидкість росту, висока продуктивність біомаси та менша потреба у воді та землі для росту, що дозволяє їм бути ідеальною сировиною для виробництва біопалива порівняно з макроводоростями. Незважаючи на інтенсивні дослідження мікроводоростей, їх комерційне застосування все ще не є економічним через перешкоди у виборі відповідної системи культивування та методів збирання для переробки біомаси [16].

Культивування мікроводоростей – складний процес, що потребує контролю для підтримки фізико-хімічних параметрів в межах оптимуму, з метою підвищення продуктивності альгокультур [17]. Спосіб культивування та його методи є двома іншими важливими параметрами, які впливають на зростання та загальну продуктивність біомаси.

Культивування мікроводоростей може здійснюватись у колбах Ерленмейера, з метою досліджень у лабораторних умовах. Для великого

масштабного виробництва біомаси та біоремедіації застосовують відкриті ставки. Для очищення стічних вод і великомасштабного комерційного виробництва різноманітних кінцевих продуктів, таких як біомаса, паливо та пігменти використовують фотобіореактори (рис. 1.) [18] .

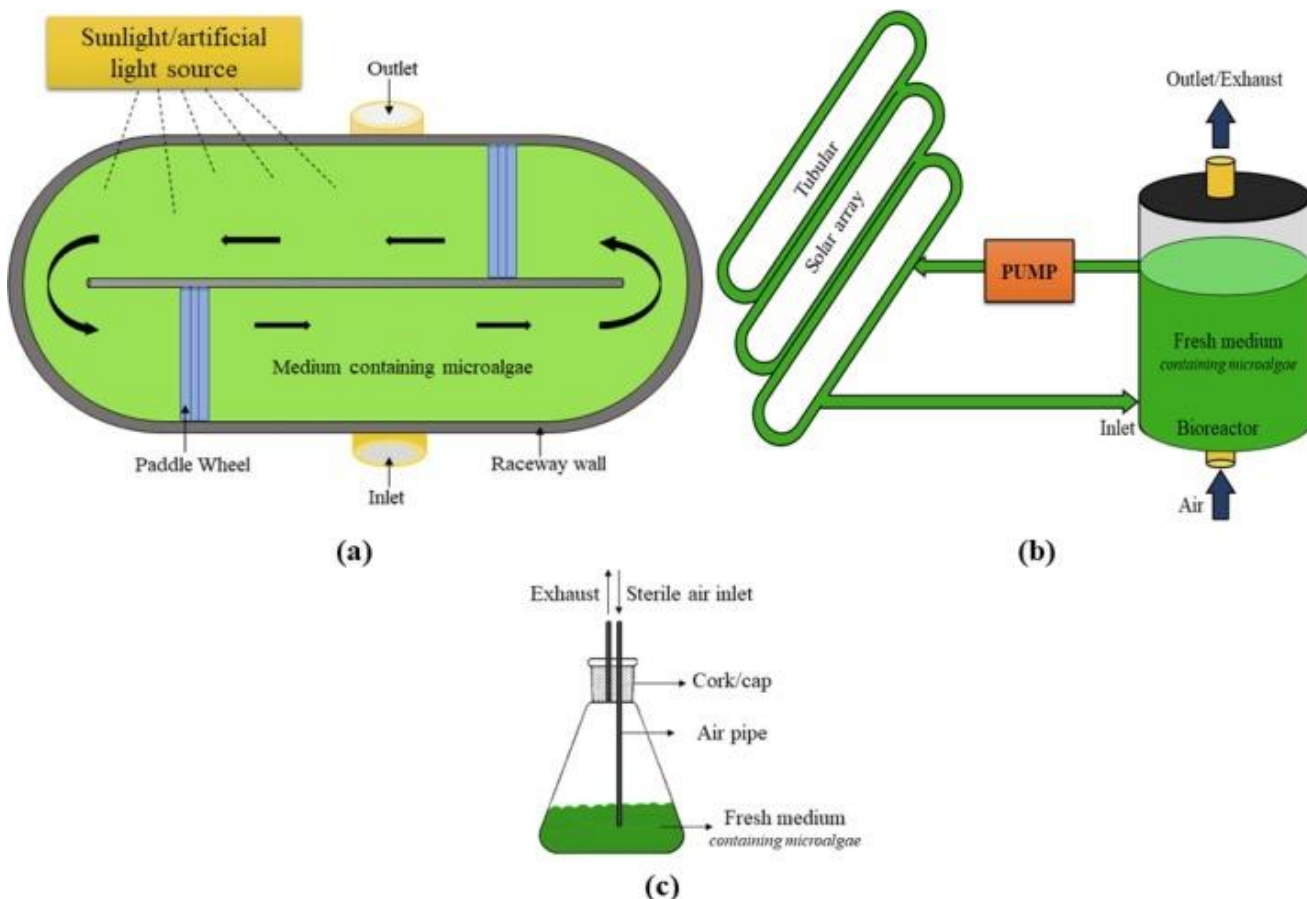


Рис. 1. Культивування мікроводоростей:

- (a) Відкритий ставок**
- (b) Трубчастий фотобіореактор**
- (c) Колба Ерленмейєра**

Колби Ерленмеєра – у народі вони називаються конічними колбами. Їх легко використовувати та обслуговувати для низьких та середніх об'ємів у лабораторії. Вони допомагають зрозуміти роль об'єму до площі поверхні (V:S) для культивування мікроводоростей. Об'єм і площа поверхні конічних колб різного об'єму суттєво впливають на ріст мікроводоростей [18].

Згідно з даними одного із досліджень, то концентрація клітин *N. pluvialis*, *C. saipanensis* і *Dunaliella* sp. залежить від об'єму посуду для культивування. Так само *Chroococcus* sp. і *Chlorella* sp., демонструють оптимальний ріст у 500-мл колбах, з V:S 1:4,16. *Chlorella* sp. також показує

високий ріст клітин у 500 мл колбах з V:S 1:1,6. Було зроблено висновок, що співвідношення V:S 1:6 та 1:4,16 майже відповідає трубчастому та плоскопанельному біореакторам відповідно [18].

Об'єм і площа поверхні впливають на кінетику росту мікробіодоростей, і було підтверджено, що мікробіодорості великих розмірів демонструють повільний ріст порівняно з мікробіодоростями меншого розміру. Кореляція між швидкістю росту та кінетикою поглинання поживних речовин у співвідношенні V:S, при цьому великі клітини, що повільно ростуть, чутливі до змін у співвідношенні V:S, а малі клітини, що розвиваються, насичені поживними речовинами.

Більші об'єми надають мікробіодоростям більше місця для пересування та запобігають самозатіненню світла культури. Якщо об'єм мінімальний, біодорості будуть щільно упаковані одна до одної, а клітини зверху не дозволять світлу проникнути в культуру, тим самим зменшуючи продуктивність біомаси [18].

Системи з відкритими вставками дешевші у будівництві, вони потребують, як мінімум, траншеї або ставка. Великі ставки мають найбільшу продуктивність порівняно з іншими системами порівнянної вартості. Крім того, вирощування у відкритих ставках може використовувати незвичайні умови, які підходять лише для певних біодоростей. Наприклад, *Spirulina sp.* процвітає у воді з високою концентрацією бікарбонату натрію, а *Dunaliella salina* росте в дуже солоній воді. Відкрита культура також може працювати, якщо існує система відбору бажаних біодоростей і заселення нових ставок з високою стартовою концентрацією бажаних біодоростей. Найбільшою перевагою цих відкритих ставок є їхня простота, що призводить до низьких виробничих і експлуатаційних витрат [20]. Відкриті ставки можна розділити на природні водойми (озера, лагуни, ставки) та штучні водойми.

Залежно від поживних речовин, необхідних видам біодоростей, для культивування біодоростей можна використовувати кілька джерел стічних вод [20].

Для деяких мікроводоростей морського типу можна використовувати морську воду або воду з високою солоністю. Хоча це дійсно найпростіший з усіх методів вирощування, він має деякі недоліки через те, що навколишнє середовище в ставку і навколо нього не повністю контролюється. Відкриті ставки дуже вразливі до забруднення іншими мікроорганізмами, наприклад, іншими видами водоростей або бактеріями. Тому культиватори зазвичай обирають закриті системи для монокультур. Відкриті системи також не дозволяють контролювати температуру та освітлення [21].

Вегетаційний період значною мірою залежить від місця розташування і, за винятком тропічних районів, обмежується теплими місяцями. Погана погода часто може сповільнити ріст водоростей. Однак основними обмеженнями у відкритих водоймах є нерівномірна інтенсивність світла, втрати при випаровуванні, дифузія CO₂ в атмосферу та потреба у великих площах землі [22].

Крім того, забруднення хижакми та іншими швидкозростаючими гетеротрофами обмежує комерційне виробництво водоростей у відкритих системах вирощування лише тими організмами, які можуть рости в екстремальних умовах. Через неефективні механізми перемішування у відкритих системах культивування швидкість масообміну є дуже низькою, що призводить до низької продуктивності біомаси [23].

Відкрита система дозволяє отримати велику площу поверхні для фіксації CO₂, і ці ставки зазвичай перемішуються гребними колесами. Але основним недоліком відкритих систем є неможливість досягти умов монокультури (тобто культури одного виду), якщо це бажано, оскільки його прямий вплив на відкрите повітря збільшує шанси перехресного забруднення. Монокультури важливі для культивування мікроводоростей, оскільки вони впливають на продуктивність біомаси та створюють ускладнення у розділенні видів мікроводоростей на етапі збирання масових культур [24].

Щоб подолати проблеми, пов'язані з відкритою системою, дослідники

спробували використовувати закриті водойми. Тут контроль над навколишнім середовищем набагато кращий, ніж у відкритих ставках.

Закриті системи коштують дорожче, ніж відкриті ставки, і значно дешевше, ніж фотобіореактори для аналогічних зон експлуатації. Як різновид системи відкритих ставків, ідея закритих ставків полягає в тому, щоб накрити його прозорим або напівпрозорим бар'єром, який перетворює його на теплицю. Ці закриті системи будуються з використанням оргскла. Це дозволяє вирощувати більше видів риб. При цьому дає можливість вирощуванним видам залишатися домінуючими. Цим також можна збільшити кількість вуглекислого газу в цих системах, таким чином знову збільшуючи швидкість росту водоростей [5].

Якщо щодо фотобіореакторів, то їх можна описати як закриту, освітлену культуральну посудину, призначену для контрольованого виробництва біомаси. Фотобіореактор відноситься до закритих систем, які закриті від навколишнього середовища і не мають прямого обміну газами і забруднюючими речовинами з навколишнім середовищем.

Фотобіореактори, незважаючи на їхню вартість, мають кілька основних переваг над відкритими системами:

- Фотобіореактори мінімізують забруднення і дозволяють вирощувати монокультури аксеничних водоростей.
- Фотобіореактори забезпечують кращий контроль над такими умовами, як рН, температура, світло, концентрація CO₂ тощо.
- Фотобіореактори призводять до менших втрат CO₂
- Фотобіореактори запобігають випаровуванню води.
- Фотобіореактори дозволяють отримувати вищі концентрації клітин.
- Фотобіореактори дозволяють виробляти складні біофармацевтичні препарати [25].

Отже, фотобіореактори, посилюють ріст мікрowodоростей шляхом штучного сприяння світловому випромінюванню для досягнення вищої

швидкості фотосинтезу, і вони зазвичай підходять для культивування мікроводоростей одного виду [24].

Окрім системи для культивування, важливою є також і технологія культивування, яку поділяють на безперервне та періодичне.

Безперервне культивування – це технологія вирощування мікроводоростей, за якої відбувається постійне додавання поживних речовин, а також видалення біомаси і продуктів обміну. Прикладом безперервного культивування є ріст мікроорганізмів у хемостаті і турбідостаті [26].

Періодична або накопичувальна культура – це культура, в яку після початку культивування не додають поживні речовини, не видаляють з неї біомасу або кінцеві продукти обміну.

Гомогенну періодичну культуру, яка добре перемішується, за рахунок чого в середовищі відсутні градієнти концентрацій, називають простою гомогенною періодичною культурою [27].

Найчастіше використовують періодичне культивування, тому що воно вважається простішим за безперервне та дозволяє отримати мікроводорості з максимально великою кількістю білку, на відміну від безперервного, за якого може відбуватися відділення біомаси з дуже низьким вмістом. Також періодичне культивування дозволяє частіше проводити очищення реактору, що є важливим за використання кінцевого продукту в харчовій промисловості.

Продуктивність культивування біомаси у фотобіореакторах залежить від тісного узгодження культурального середовища з потребами вибраного штаму водоростей. Світло, темрява, якість та обмеження світла, температура, опромінення є важливим фактором росту водоростей, розмноження, а також накопичення у біомасі водоростей цільових продуктів [28].

Для оптимізації процесу вирощування водоростей потрібно слід враховувати кожен із наведених факторів.

По-перше, це культивування мікроводоростей з використанням

відповідних, економічно ефективних середовищ, які забезпечують основні джерела поживних речовин, таких як вуглець, азот і фосфор. Використання стічних вод як середовища для росту вважається економічно ефективним, а також допомагає в процесі біоремедіації. Склад стічних вод змінюється залежно від їх походження та може не мати необхідних поживних речовин, необхідних для росту мікробіодоростей. Низька концентрація або відсутність органічного вуглецю знижує ріст мікробіодоростей і продуктивність нафти. Тому важливо перевірити концентрацію вуглецю і співвідношення азоту і фосфору у стічних водах, оскільки це значно впливає на рН середовища, ріст і накопичення ліпідів у мікробіодоростей [18].

По-друге, важливо дослідити стандартний протокол для підтримки чистої культури та регулювання умов навколишнього середовища, використовуючи при цьому недорогі середовища або стічні води для культивування. Забруднення культури зменшує кількість мікробіодоростей, тому важливо запровадити стратегічний метод моніторингу росту, щоб перевірити ріст мікробіодоростей та інших біологічних забруднень, таких як бактерії, гриби, діатомові водорості та інші види мікробіодоростей. Закриті фотобіореактори забезпечують стерильне середовище для росту, а також допомагають підтримувати параметри росту, однак вартість варіюється залежно від типу системи фотобіореакторів, що робить її рентабельним методом для великомасштабного виробництва [18].

Вирощування мікробіодоростей становить основну частку витрат, пов'язаних із виробництвом біодизеля. Щоб подолати це, перевагу надають відкритим водосховищам, оскільки вони зменшують витрати на вирощування приблизно на 50 % порівняно з фотобіореакторами. Але є кілька серйозних проблем, які необхідно вирішити під час роботи з водоростями, наприклад забруднення культури, що знижує загальну продуктивність. Один із способів подолати це - підтримувати екстремальні умови навколишнього середовища, такі як сильно солоні або лужні умови.

Основним завданням культивування мікробіодоростей є пошук і

підтримка монокультури або здорової спільної культури штамів, багатих на ліпіди, які можуть рости в стандартних умовах навколишнього середовища з менш складними або недорогими середовищами росту [18] .

Тому для оптимізації режиму росту та отримання інформації про стан культури необхідний моніторинг фізико-хімічних змінних (рН, температура, концентрація розчиненого кисню, статус поживних речовин тощо) та фотосинтетичної активності [29].

1.3. Підходи відділення біомаси культур мікроводоростей

Мікроводорості - це одноклітинні мікроорганізми, які живуть у воді та виробляють біомасу шляхом фотосинтезу. Вони з'явилися мільярди років тому в океанах, ще до того як рослини колонізували сушу. Мікроводорості зустрічаються в озерах, річках та океанах, але біомаса в природних екосистемах буває занадто низька, щоб її можна було збирати в промислових масштабах.

Вирощування мікроводоростей у промислових масштабах відбувається у спеціальних реакторах, призначених для максимізації фотосинтезу: у відкритих "ставках-доріжках або закритих фотобіореакторах.

Однак існує лише кілька комерційно успішних технологій мікроводоростей, оскільки витрати на виробництво обмежують їх застосування лише до високоцінних продуктів. Їм притаманна висока ступінь швидкості росту, висока фотосинтетична ефективність, вміст біологічно активних і багатих на енергією хімічних речовин. Досвід великомасштабного вирощування та технології подальшої обробки зосередили підвищену увагу на мікроводоростях.

Через хорошу характеристику зростає попит на біомасу мікроводоростей і продукти, отримані з мікроводоростей, необхідні для великомасштабних виробничих систем [30].

Розділення клітин є складним через низьку швидкість седиментації

мікроводоростей, їх колоїдний характер з відштовхуванням негативних поверхневих зарядів і низьку концентрацію біомаси в культуральних бульйонах, тому для концентрації клітин необхідно обробити великі обсяги.

Мікроводорості з широким спектром комерційних застосувань привернули велику увагу дослідників в останні кілька десятиліть. Однак, використання мікроводоростей не є економічно обґрунтованим через високу вартість їхнього збору. Для збирання мікроводоростей існує широкий спектр методів розділення твердої та рідкої фаз.

За останні роки знайшли досить перспективні методи відділення біомаси, які включають коагуляцію, флокуляцію, флотацію, центрифугування і фільтрацію або комбінацію різних методів. На ці методи припадає 90% загальних витрат на виробництво біомаси мікроводоростей із відкритих ставків. Вони підвищують ефективність збирання та зменшують витрати на експлуатацію та обслуговування [31].

З іншого боку, витрати на збирання мікроводоростей можуть досягати 20–30% від загальної вартості виробництва біомаси [32]. Мікроводорості зазвичай збирають за допомогою енергоємних методів, таких як флотація, центрифугування, фільтрація та електричні методи.

Як така, флокуляція широко використовується через її простоту та ефективність. Хімічні флокулянти отримали велике визнання за їх перевагу у флокуляції суспензій при низьких дозах і короткому періоді часу [24]. Тим не менш, токсичність і шкідливі ризики для здоров'я, спричинені хімічними флокулянтами, є предметом занепокоєння цього методу збору врожаю, а заміники для заміни хімічних флокулянтів є надзвичайно важливою темою дослідження.

Природні флокулянти, на відміну від хімічних флокулянтів, нетоксичні, безпечні у використанні та екологічно чисті. Різноманітність природних флокулянтів, таких як відходи рослин і фруктів, нещодавно досліджувалися в багатьох футуристичних застосуваннях, оскільки ці відходи доступні у великій кількості, вони дешеві та мають багатообіцяючі

властивості флокуляції. *Moreinga oleifera*, *Stryconus potatorum*, *Cactus species*, *Phaseolus vulgaris*, танін, насіння сурджана та гуміарабік є одними з видатних рослинних флокулянтів, які вивчалися в минулому [33]. Крім того, відходи черепашок і яєчної шкаралупи, які викидаються в навколишнє середовище, були ретельно вивчені як адсорбенти та біосорбенти для видалення барвників і важких металів, хоча доступна обмежена інформація про їхню здатність функціонувати як біофлокулянт.

Флокуляцію вважають найбільш поширеним, найефективнішим та недорогим методом відбору біомаси мікроводоростей. Вона використовується в різних галузях, таких як пивоваріння, очищення відходів і питної води та гірнича справа. У той час як у цих застосуваннях рідина часто є кінцевим продуктом, для збору мікроводоростей кінцевим продуктом є біомаса [34].

Флокуляція зазвичай використовується в поєднанні з іншими методами як етап перед збором. Видалення води під час флокуляції зменшує витрати на механічне зневоднення. Щоб максимізувати економію коштів під час механічного зневоднення, рекомендується отримати найменший можливий об'єм суспензії водоростей за найкоротший період часу. Тому флокули мікроводоростей повинні бути великими з високою швидкістю седиментації [34].

Флокуляція - це складний процес, на який впливають властивості клітинної поверхні, концентрація клітин, іонна сила, а також тип і дозування флокулянта [35]. Особливе значення для ефективності флокуляції має змішування, яке визначає кількість та інтенсивність зіткнень.

Ефективний флокулянт повинен бути недорогим, нетоксичним і ефективним при низьких концентраціях, і його бажано отримувати з джерел невикопного палива, таким чином, бути стійким і відновлюваним [22].

Незважаючи на те, що флокуляція вважається найбільш підходящим методом для збирання біомаси мікроводоростей, цей метод може мати економічні або технічні недоліки, такі як висока вартість енергії чи

токсичність флокулянту.

Збирання мікроводоростей за допомогою флокулянтів може забруднити концентрат суспензії, таким чином знизивши ринкову вартість біомаси, процеси переестерифікації та використання біомаси в харчовій промисловості та як корм для тварин. Крім того, після флокуляції суспензія все ще містить певний об'єм середовища, для видалення якого знадобиться додатковий дорогий процес. Незважаючи на ці проблеми, флокуляція була прийнята через недорогий метод збору мікроводоростей [36].

Крім того, завдяки здатності обробляти велику кількість біомаси, флокуляція з агрегацією легкого відокремлюють від середовища клітини мікроводоростей за допомогою гравітаційного відстоювання, що вважається кращим методом збору у порівнянні з іншими традиційними методами (наприклад, центрифугуванням та фільтрацією).

Також є метод самофлокуляції клітин, який відноситься до агрегації клітин і зчеплення один до одного в рідкій культурі завдяки особливим властивостям клітинної поверхні. Біомаса, отримана шляхом відстоювання флокулюючих дріжджів широко застосовується у пивоварній промисловості, а також для виробництва біоетанолу [36]. Збір дріжджових клітин шляхом флокуляції є економічним, простим і легким в експлуатації. Тому вивчення самофлокуляції клітин мікроводоростей представляє високий інтерес і доцільність використання цієї властивості для збору клітин мікроводоростей.

Найбільшими перевагами самофлокуляції клітин для збору клітин полягає в тому, що вона не потребує хімічних добавок, а отже, є економічно ефективною, не містить хімічних забруднень і є екологічно чистим.

Самофлокуляція клітин мікроводоростей, на відміну від флокуляції індукованої регулюванням рН, може відбуватися природним шляхом через взаємодію сусідніх клітин без додавання кислоти, лугу або іонів металів. Крім того, збирання мікроводоростей за допомогою самофлокуляції клітин, яка не потребує додаткових витрат на культивування мікробів або очищення біофлокулянта, зарекомендувало себе як перспективний метод для

низьковитратної технології збору врожаю [37].

Під час відбору біомаси мікроводоростей використовують також і центрифугування, яке полягає у розширенні гравітаційної седиментації, де відцентрова сила замінює силу тяжіння для відокремлення мікроводоростей від їхнього живильного середовища. Відцентрове розділення мікроводоростей залежить від характеристик осідання клітин (розмір клітин і незначна щільність клітин мікроводоростей по відношенню до їхнього живильного середовища), часу утримання клітин, часу утримання суспензії в центрифугі. Тоді і виходить, що можливість збору клітин значною мірою залежить від виду мікроводоростей та від типу центрифуг.

Було досліджено декілька центрифуг для розділення мікроводоростей. До них відносяться дискові штабельні центрифуги, перфоровані кошикові центрифуги, неперфоровані кошикові центрифуги, декантери та гідроциклони. Центрифуги, які працюють в безперервному режимі, були більш вимогливими, оскільки в режимі періодичної роботи їх доводилося зупиняти для видалення твердих частинок [18]. Центрифугування, як правило, характеризується високою ефективністю розділення (>90%) при низькій швидкості потоку і високому використанні енергії.

Порівняно з іншими методами збирання мікроводоростей флокуляція має багато переваг, наприклад, може застосовуватися до всіх видів мікроводоростей, має високий коефіцієнт відновлення і біомаса не містить хімічних речовин. Але для великомасштабного застосування споживання енергії, час обробки, технічне обслуговування та капітальні витрати бувають значно високими [18].

Іноді при зборі біомаси мікроводоростей використовують і флотацію, яка являє собою процес гравітаційного розділення, в якому повітря або газ використовуються для перенесення зважених речовин на поверхню рідини, де вони можуть бути зібрані. Іноді вони можуть бути зібрані процесом знімання.

Через низьку щільність і здатність до самоплавання деяких видів мікроводоростей цей метод може бути порівняно швидким та ефективнішим порівняно з відстоюванням. Флотаційне розділення показує ефективне збирання як прісноводних, так і морських мікроводоростей. Прикріплення зважених частинок до бульбашок повітря або газу залежить від багатьох факторів, які включають розмір зваженої частинки, ймовірність зіткнення та адгезії.

Основними перевагами є короткий час роботи, низька потреба в просторі, великі масштаби збору та висока гнучкість при низькій початковій вартості. Цей процес зазвичай вимагає флокулянтів і часто відбувається шляхом коагуляції та флокуляції. Поверхнево-активні речовини збільшують ймовірність злипання повітряних бульбашок і зважених часток [31].

Фактори, що впливають на ефективність флотації, включають тип збирача (поверхнево-активна речовина або флокулянти), рН та іонна сила середовища, тип утворення бульбашок, швидкість рециркуляції, тиск у повітряному резервуарі, час гідравлічного утримання та швидкість спливання частинок.

Доведено, що використання мікророзмірних бульбашок було ефективним для відокремлення біомаси водоростей від живильного середовища. Висока площа поверхні і низька швидкість підйому мікророзмірних бульбашок призводить до швидшого прикріплення клітин водоростей [7].

Біомасу мікроводоростей визначено як перспективну сировину для третього покоління виробництва біопалива. Незважаючи на те, що їх можна легко вирощувати в лабораторних умовах, вирощування в промислових масштабах вимагало кількох важливих міркувань, таких як дизайн, вартість, ризик забруднення та очищення.

З іншого боку, збирання мікроводоростей у промислових масштабах є надзвичайно складним завданням через розбавлену концентрацію біомаси у воді.

Отже встановлено, що флокулянти можуть бути негайним рішенням для подолання цієї проблеми, а не енергоємні методи. Флокулянти, отримані з відходів біомаси, привертають величезну увагу дослідників у наш час завдяки тому, що вони є дешеві, нетоксичні, безпечні та біологічно розкладаються. Рослинні та фруктові відходи, окрім тваринних білків, демонструють здатність до флокуляції різних типів суспензій і були виділені як потенційні флокулянти для збору клітин мікроводоростей.

Тим не менш, детальна та безперервна дослідницька діяльність має важливе значення для визначення фундаментальних властивостей флокулянтів на основі біомаси з метою встановлення їх ролі у збиранні мікроводоростей. Реалізація політики була спрямована на те, щоб зарахувати широке впровадження традиційних видів біопалива, а також систематична політична підтримка є вкрай необхідною для забезпечення сталого виробництва біопалива з мікроводоростей [16].

Необхідно вивчити ідеальні методи збирання, які враховують властивості продукту, розмір і щільність мікроводоростей, добавки, відділення від біомаси, переробку поживних середовищ і вартість усього процесу. Використання біологічно отриманих речовин для збору врожаю, таких як біофлокулянти, які придатні для вторинної переробки та екологічно сумісні, допоможе знизити витрати. Дослідження економічно ефективних методів вирощування та збору врожаю має величезні соціально-економічні переваги, оскільки висока біомаса мікроводоростей пояснюватиме високе виробництво біодизеля [18].

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали дослідження

Матеріалом у даній роботі слугувала культура мікроводорості *Monoraphidium* (Thuret) Komárková-Legnerová 1969, яку було виділено з корму для акваріумних рибок. Особливість представників цього роду – це дрібні веретеноподібні клітини, іноді видовжені, доволі спірально скручені, розмір варіюється у межах 8-18 мкм завдовжки та 1,6-3,2 мкм завширшки [4].



Рис. 2.1. Мікрофотографія *Monoraphidium* (Thuret) Komárková-Legnerová 1969 [9].

2.2. Умови дослідження

Культивування здійснювали у колбах Ерленмеєра ємкістю 250 мл протягом 21 доби. У кожную колбу було додано 100 мл середовища BG-11 [38] та 10 мл культуральної рідини *Monoraphidium* sp. До складу середовища входять всі необхідні компоненти, що сприяють ефективному розвитку водоростей. Колби щільно закрили задля запобігання забрудненню мікроводоростей зовнішніми агентами. Культивування здійснювали у кліматичній кімнаті за наступних умов: температура 24 ± 2 °C, 16-ти годинний фотоперіод, освітлення 2,5 тис. люкс холодним білим світлом.

Таблиця 2.2.

Склад середовища BG-11

№	Компонент	Кількість (мг/л)
1	NaNO_3	150
2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,5
3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,6
4	$\text{C}_6 \text{H}_8 \text{O}_7$ (лимонна кислота)	0,6
5	$2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \cdot \text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7\text{NH}_4$ (цитрат заліза)	0,6
6	$\text{Na}_2 \cdot \text{ЕДТА}$	0,1
7	Na_2CO_3	2
8	Мікроелементи	0,1
	H_3BO_3	6,1
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,9
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28,7
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (амоній молібденовокислий)	1,25

Флокуляція біомаси. У якості флокулянта було взято базальтовий туф. Базальтові туфи – це мінерали вулканічного походження, які за своїм хімічним складом і структурою близькі до цеолітів. Вони є потужними сорбентами з високою селективною здатністю до поглинання, а також відзначаються високою механічною та хімічною стійкістю. Під час використання базальтові туфи майже не змінюють свої фізико-хімічні властивості і зберігають високу іонообмінну селективність до різних хімічних сполук. У роботі використовували порошкоподібний стан базальтового туфу, який отримали із родовища «Полицьке-2», до складу якого входить: цеоліти 35–40 %, монтморилоніти 30–40 %, польові шпати 10–15 %, кремнеземи 4–5 %, гематити 3–5 %. Базальтовий туф відібраний у концентраціях: 0,5 мг/мл, 1 мг/мл, 1,5 мг/мл, 2 мг/мл. Концентрації були підібрані згідно до рекомендацій літературних джерел і на основі попередніх досліджень, які були проведені лабораторією водних біоресурсів кафедри біохімії та біотехнології ЧНУ.

Базальтовий туф змішували із культурою у співвідношенні 25:1 за об'ємом. Культуру змішану із флокулянтом залишили відстоюватись на 3 доби.

Після 3-х діб фугат зливали. У фугаті перевіряли наявність неосілих клітин під мікроскопом. Підрахунок клітин здійснювали із допомогою камери Фукса-Розенталя та тринокулярного мікроскопа Micromed XS-3300. Кількість клітин вираховували за формулою:

$$M = (a \times 10^3 \times n) / hS, \text{ де:}$$

M- кількість клітин у 1мл суспензії,

a- середня кількість клітин у квадраті сітки,

h – глибина камери у мм,

S- площа великого(чи 16 маленьких) квадратів сітки в мм²,

10³– коефіцієнт розведення см³ в мм²,

n – розведення досліджуваної суспензії [39].

За цими даними розраховували ефективність відділення біомаси: за 100 % прийнято кількість клітин у культуральній рідині по завершенню культивування – $5,36 \times 10^6$ кл/мл.

Вирахувавши відсоток відділення біомаси, наступним було здійснено центрифугування при 4000 об/хв протягом 20-ти хвилин. Умови центрифугування було підібрано на основі попередніх даних. Після центрифугування повторно розраховували відсоток ефективності відділення біомаси.

В отриманій біомасі перевіряли кількість білків, ліпідів, вуглеводів, хлорофілу а та каротиноїдів.

2.3. Методи дослідження

Визначення білків проводили згідно методики визначення Лоурі [40].

У кожну пробірку із біомасою додавали по 2 мл фосфатного буферу та центрифугували при 4000 об/хв протягом 20 хвилин. З біомаси, яка

відділилась, відібрали осад та надосадну рідину розділивши в окремі пробірки.

До 0,1 мл надосадної рідини додавали 0,9 мл H_2O і 5 мл реактиву С та залишили на 10 хвилин. Після 10-ти хвилин у кожну пробірку додавали 0,5 мл реактиву Фоліна та залишали на 30 хвилин. За 30 хвилин було відмічено світлий синій колір. Після 30-ти хвилин вимірювали кількість білка фотоелектроколориметричним методом при довжині хвилі 780 нм. Після проведеного визначення білок розраховували за формулою:

$$A = \frac{a \times V}{C \times p}, \text{де:}$$

A – кількість білка,

a – кількість білка за калібрувальним графіком,

C – кількість екстракта взята для аналізу,

V – початкова кількість екстракта,

p – маса пробірки [39].

Кількість вуглеводів у цьому ж екстракті визначали з антроновим реагентом [41]. Гранули *Monoraphidium sp* (отримані з 1,5 мл культури) ресуспендували в 0,2 мл H_2O , а потім нагрівали в 0,4 мл 40% КОН при 90°C протягом 1 год. Для охолодження додавали 1,2 мл холодного абсолютного етанолу і зберігали в холодильнику при -20 °C протягом ночі.

Потім розчин ресуспендували в 1,5 мл H_2O . Зразок реагував з антроновим реагентом та високою концентрацією сірчаної кислоти. 0,2 мл зразка змішували і перемішували з 0,4 мл попередньо охолодженого 75%-го розчину H_2SO_4 у пробірці. До цієї суміші додавали 0,8 мл реактиву антрон 2 г/л в 75% H_2SO_4 , а потім кип'ятили при 100 °C протягом 15 хв. Після охолодження поглинання зчитували за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 578 нм.

Для визначення ліпідів та пігментів проводили екстракцію осаду сумішшю хлороформом та етанолом у співвідношенні 2:1. Екстрагенти розподілили по пробірках та поставили в темне місце на 3 доби.

Після 3-х діб екстракції до 0,1 мл хлороформно-етанольного екстрагенту додавали по 2 мл концентрованої H_2SO_4 . Пробірки поставили на водяну баню при 100°C протягом 10 хвилин. Після того як пробірки охолонули додали у кожну пробу 2 мл фосфованілінового реактиву та залишили їх на 25 хвилин у темному місці.

Для визначення ліпідів використовували фотоелектроколориметричний метод при довжині хвилі 540 нм. Пігменти визначали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 450 нм - каротиноїди, хлорофіл а при довжині хвиль 650 нм та 665 нм.

Кількість ліпідів вираховували за формулою:

$$A = \frac{C \times V_1}{V_2 - m}, \text{ де:}$$

V_1 – загальний об'єм екстракта,

V_2 – об'єм екстракції взятого для аналізу,

m – маса наважки,

c – кількість ліпідів за калібрувальним графіком [39].

Також у хлороформно-етанольному екстракті здійснювали спектрофотометричне визначення пігментів: хлорофіл а – 650 та 665 нм, сумарні каротиноїди – 450 нм. Кількість пігментів розраховували за типовими формулами.

Вміст хлорофілу а визначали за формулою:

$$A = \frac{C \times V}{H} \times 1000, \text{ де:}$$

C – концентрація пігментів,

V – об'єм екстракту,

H – наважка рослинного матеріалу [39] .

Розрахунок вмісту загальних каротиноїдів проводили за формулою:

$$A = \frac{C \times V \times K}{H}, \text{ де:}$$

C – концентрація каротиноїдів,

V – об'єм екстракту,

H – наважка рослинного матеріалу [39] .

2.4. Статистична обробка результатів

Усі дослідження проводили у 4-х кратній повторюваності (n=4). Наведені результати подані як середні значення M та відхилення від середнього значення m - ($M \pm m$).

Статистичну обробку одержаних результатів проводили згідно загальноприйнятих методів з використанням програмного забезпечення Microsoft Excel. Відмінності отриманих результатів вірогідні при рівні значимості $p \leq 0,05$ за критерієм Ст'юдента.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Накопичувальне культивування *Monoraphidium sp*

Культивування мікроводоростей стає все більш цікавою темою для багатьох дослідників з метою оцінки їх потенціалу щодо накопичення білків, ліпідів та вуглеводів. Ріст культури мікроводоростей можливий лише у випадку постійного додавання всіх необхідних для росту компонентів, особливо поживних речовин у виглядів макро чи мікроелементів, достатнє освітлення.

За умов періодичного культивування живильне середовище містить обмежену початкову кількість поживних речовин, і мікроводорості ростуть доти, доки вміст якогось необхідного їм компонента не досягне критичної величини, після чого ріст сповільнюється і в подальшому призупиняється. Якщо спостерігати за ростом культури в рідкому середовищі, то виявляється, що швидкість росту змінюється в часі. Крива, яка описує залежність логарифма числа клітин, числа живих клітин або густини біомаси мікроводоростей від часу для періодичної культури називається кривою росту. Типова крива росту має так звану S-подібну форму і дозволяє виділити чотири фази росту, які проходять у певній послідовності, що виражені більшою або меншою мірою. Виділяють початкову або лаг-фазу, експоненційну, стаціонарну та фазу відмирання культури [26]. Ця область дослідження дозволить визначити найкращий час для збору культури мікроводоростей.

У результаті накопичувального культивування *Monoraphidium sp* відмічено ріст, який є характерний для типової S-подібної кривої (рис 3.1.). Зафіксовано чіткий поділ на фази. З 1-3 добу виражена лаг-фаза, з 5-11 добу чітко виражена експоненційна, з 11-13 незначна стаціонарна фаза, яка плавно переходить у фазу відмирання. У ході експоненційної фази кількість біомаси

збільшилась вдвічі завдяки швидкості поділу клітин, яка є відносно постійна для цієї фази.

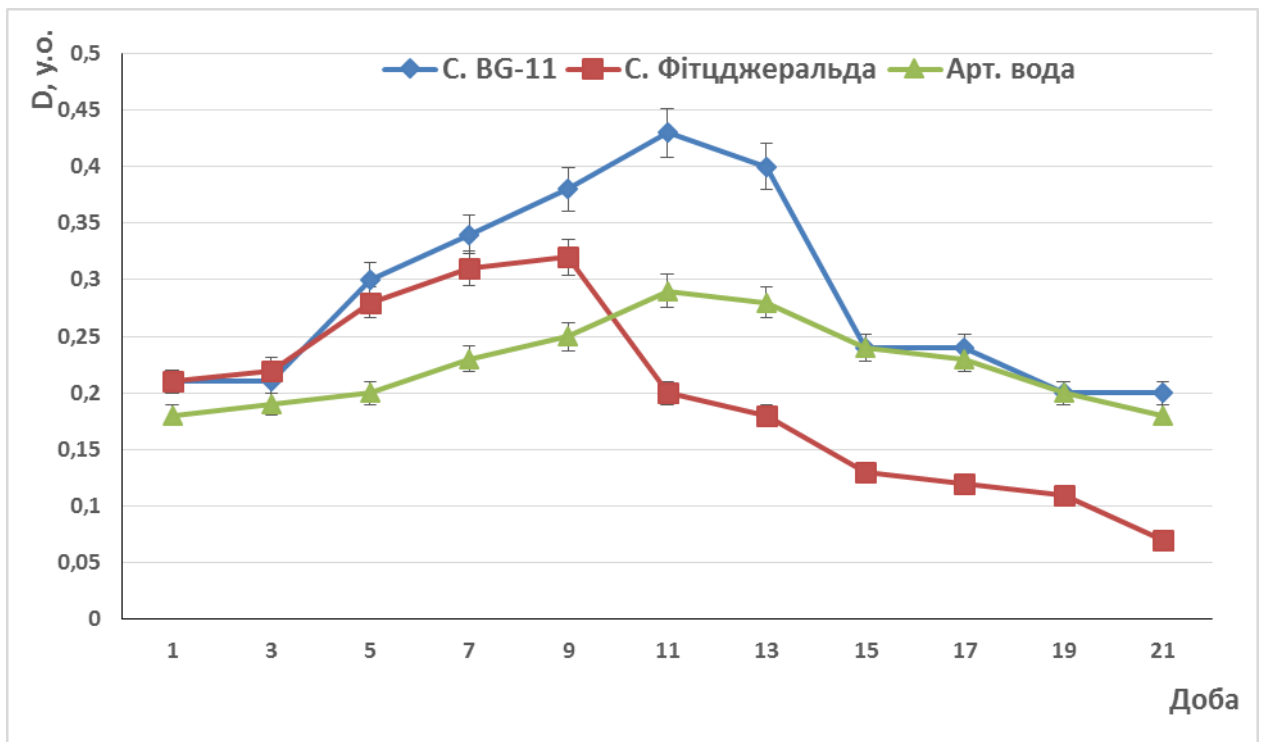


Рис 3.1. Оптична густина культури *Monoraphidium* sp. на середовищах BG-11, Фітцджеральда, артезіанській воді

Примітка: * - достовірна відмінність від середовища Фітцджеральда

Monoraphidium sp. було виділено із корму для акваріумних рибок, в умовах вирощування риб на відстояній воді. Це наштовхнуло нас на думку, що дана водорість не потребує для вирощування багатоконпонентних середовищ. Провівши вирощування *Monoraphidium* sp. на середовищі Фітцджеральда (класичне середовище для зелених водоростей), артезіанській воді та середовищі BG-11, встановлену доречність використання останнього для накопичувального культивування дослідної водорості. Зафіксовано вдвічі більший вихід біомаси *Monoraphidium* sp. у порівнянні з іншими середовищами. На рис.3.1. чітко видно, що у порівнянні з іншими середовищами, середовище BG-11 сприяє ефективному росту та розвитку культури мікроводорості *Monoraphidium* sp.

При культивуванні *Monoraphidium* sp. на середовищі BG-11, можна

отримати активну ростучу культуру з високою щільністю клітин. Концентрація клітин по завершенню культивування – $5,36 \times 10^6$ кл/мл.

Отже, щоб одержати максимальний вихід біомаси *Monoraphidium* sp. рекомендуємо виконувати культивування на середовищі BG-11 протягом 11 днів.

3.2. Апробація використання базальтового туфу як флокулянта для відділення біомаси *Monoraphidium* sp

Відділення біомаси мікроводоростей є складним та дорогим процесом у їх виробництві. Цьому сприяє низька швидкість седиментації, висока щільність культури, малі розміри клітин та їх колоїдний характер з відштовхуванням негативних поверхневих зарядів. Для уникнення цієї проблеми було досліджено різну кількість методів, але найефективнішим та недорогим методом вважають флокуляцію. На неї впливають властивості клітинної поверхні, концентрація клітин, іонна сила, а також тип і дозування флокулянта [35]. Флокуляція допомагає вилучити понад 90 % клітин водоростей із культуральної рідини [42]. При використанні флокулянтів збільшується швидкість седиментації клітин водоростей за рахунок агрегації клітин, що полегшує подальше розділення шляхом відстоювання, центрифугування або фільтрації.

При роботі з мікроводорістю *Monoraphidium* sp. виникають труднощі з відділенням її біомаси від фугату. Клітини цієї водорості дуже повільно осідають під час центрифугування і не осідають самостійно при тривалому відстоюванні. Рішенням цієї проблеми може бути використання флокулянтів з подальшим відстоюванням або центрифугуванням суміші до повного осідання біомаси. Головне завдання полягає у виборі флокулянта, який забезпечить швидке утворення великих конгломератів клітин і буде

нетоксичним для них.

З цією метою ми випробували базальтовий туф. Це мінерал вулканічного походження, що за своїм хімічним складом і структурою близький до цеолітів. Він є потужним сорбентом з високою селективною здатністю до поглинання, а також відзначається високою механічною та хімічною стійкістю [43].

Базальтовий туф у концентраціях: 0,5 мг/мл, 1 мг/мл, 1,5 мг/мл, 2 мг/мл змішували із культуральною рідиною у співвідношенні 25:1.

Перевіряли дві схеми флокуляції. За першої – після змішування туфа з культуральною рідиною здійснювали відстоювання 3 доби. Після чого біомасу відділяли та аналізували залишкову кількість клітин у фугаті. Кількість клітин після відстоювання із базальтовим туфом залишалася достатньо високою. Тільки при використанні 2 мг/мл туфу відмічено достовірну відмінність у кількості клітин (рис.3.2).

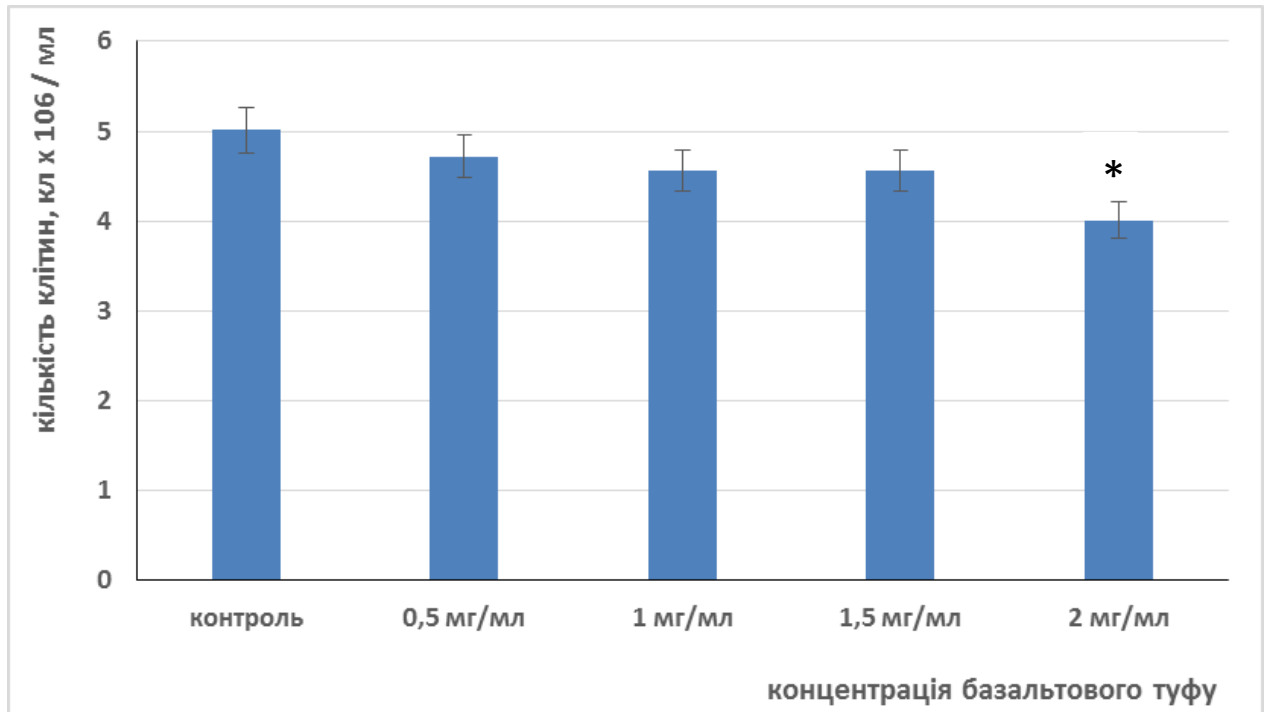


Рис.3.2. Залишкова кількість клітин *Monoraphidium sp.* після відстоювання із базальтовим туфом

Примітка: * - достовірна відмінність від контрольних значень

Тому надалі нами було вирішено долучити етап центрифугування після відстоювання культуральної рідини із базальтовим туфом (рис.3.3.). Центрифугування здійснювали при 4000 об/хв 20 хв. Відмічено слідові кількості залишкових клітин у фугаті. Навіть найменша концентрація туфу після центрифугування дозволила зменшити кількість залишкових клітин у фугаті у двічі. А збільшення концентрації туфу дозволило збільшити цей показник.

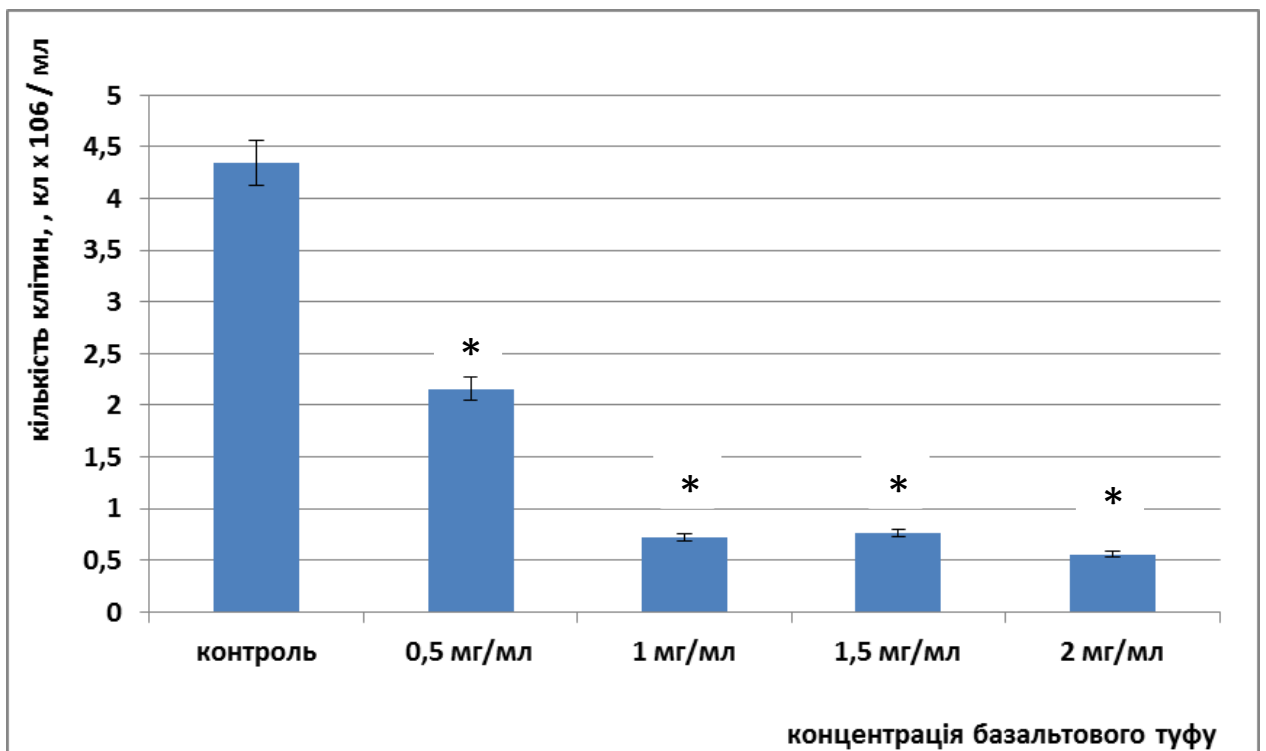


Рис.3.3. Залишкова кількість клітин *Monoraphidium* sp. після центрифугування із базальтовим туфом

Примітка: * - достовірна відмінність від контрольних значень

Надалі нами було розраховано показник ефективності відділення біомаси. Для цього було враховано вихідну кількість клітин у накопичувальній культурі та кількість після обробки флокулянтном. Дані представлено у таблиці 3.4. Прогнозовано, показники ефективності відділення біомаси після обробки флокулянтном з подальшим центрифугуванням вищі, ніж у зразках де центрифугування не залучали.

Використання 0,5 мг/мл базальтового туфу дозволило збільшити ефективність відділення біомаси до 60 %. Збільшення кількості туфу до 1 – 2 мг/мл дозволило досягти 86 – 90 % відділення біомаси.

Таблиця 3.4.

**Ефективність відділення біомаси до та після центрифугування
(n=4, M±m)**

Концентрації базальтового туфу, мг/мл	Ефективність відділення біомаси після відстоювання, %	Ефективність відділення після центрифугування, %
Контроль	5,2±0,19	39±1,9
0,5	12,1±0,34*	60±2,1*
1	14,4±0,32*	87±3,3*
1,5	15,6±0,41*	86±3,8*
2	22,1±0,33*	90±4,1*

Примітка: * - достовірна відмінність від контрольних значень

Отже, в результаті проведених досліджень ми відзначили ефективність застосування флокулянтів задля покращення процесу відділення біомаси зеленої мікроводорості *Monoraphidium sp.*

За показником ефективності флокуляції встановлено оптимальний режим відділення біомаси *Monoraphidium sp.*, який включає: використання базальтового туфу у концентрації 2 мг/мл, відстоювання культуральної рідини 3 доби (для агрегації клітин) та подальше центрифугування – 4000 об/хв, 20 хв. Ми відмітили, що при застосуванні базальтового туфу у якості флокулянта процес осідання біомаси стає швидшим та простішим.

3.3. Біохімічна характеристика біомаси *Monoraphidium sp.*

У всьому світі зростає інтерес до використання мікроводоростей як потенційного джерела біопалива. Це пояснюється вищими темпами росту та

потенціалом накопичення більшої кількості ліпідів на одиницю площі, ніж звичайні олійні культури. Мікроводорості також відомі своєю метаболічною гнучкістю, тобто при оптимізації умов культивування водоростей, можна досягти регулювання варіацій біохімічного складу біомаси.

Види *Monoraphidium* за своїм біохімічним складом є перспективними кандидатами виробництва біодизеля завдяки високому вмісту ліпідів та відповідному профілю жирних кислот [11].

Наприклад, у *Monoraphidium dybowskii* C29 вміст ліпідів досягав 39%. Для *Monoraphidium contortum* вміст ліпідів становив 35%. У *Monoraphidium* sp. FXY-10 вміст ліпідів міг досягати 56,8%, що є набагато вищим за середній показник 25,5% для маслянистих зелених водоростей [12]. *Monoraphidium contortum* досягав вмісту ліпідів 22,2 %, *Monoraphidium totile* відзначився достатньо високим вмістом ліпідів - 31,5 % [13].

Завдяки своїй здатності накопичувати ліпіди водорості щорічно виробляють у 31 раз більше олії, ніж пальмова сировина. Мікроводорості є перспективним стійким джерелом енергії, які можуть замінити викопне паливо, зберігаючи запаси харчових ресурсів для споживання людиною. Ліпіди мікроводоростей є безпечною альтернативою нафтовому дизельному паливу. Через їхню екологічність, здатність до біологічного розкладання, відсутність токсичності та низькі викиди парникових газів [44].

Порівнявши результати інших дослідників, відмічено, що досліджувана культура *Monoraphidium* sp відзначилась достатньо високим вмістом ліпідів, що відповідає 47%, білків – 26%, вуглеводів – 18%. Результати біохімічного складу наведено на рис. 3.5.

У досліджуваній біомасі також визначали вміст пігментів та каротиноїдів. У *Monoraphidium* sp. розраховали вміст хлорофілу а, що відповідає 24,63 мг/г сировини, вміст каротиноїдів – 3,81 мг (рис.3.6.).

Виходячи з того, що хлорофіл а є основним пігментом, який бере участь у процесі фотосинтезу. У культурі *Monoraphidium* sp. достатньо високий вміст хлорофілу а, що вказує на високу фотосинтетичну активність

мікроводорості, тобто це означає, що вона ефективно перетворює світлову енергію в хімічну, продукуючи органічні речовини і кисень.

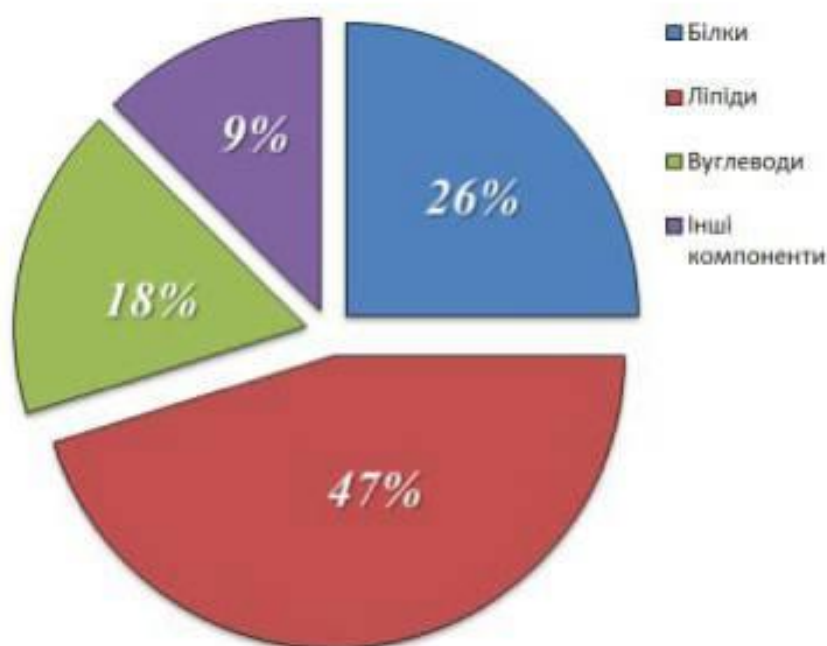


Рис.3.5. Біохімічна характеристика біомаси *Monoraphidium sp.*

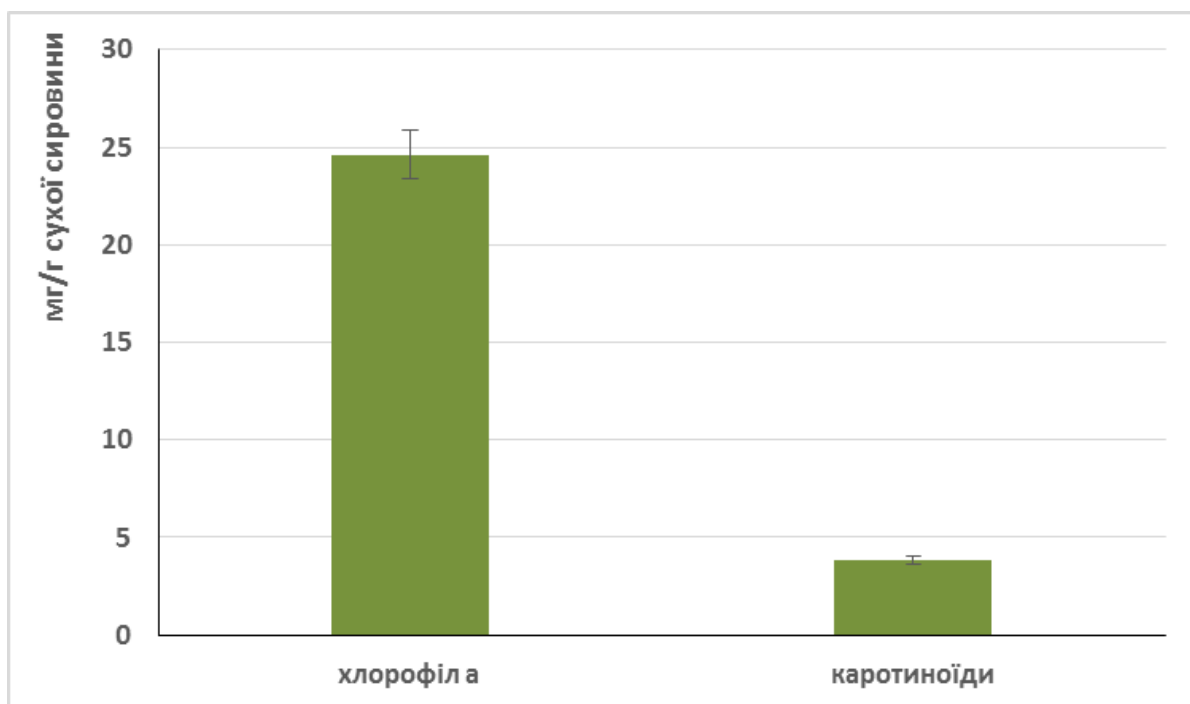


Рис.3.6. Кількість пігментів у біомасі *Monoraphidium sp.*

Наявність каротиноїдів у біомасі мікроводоростей допомагає захищати їх клітини від пошкоджень, викликаних надмірним світлом. Вони поглинають надлишкову світлову енергію і розсіюють її як тепло, запобігаючи фотодеструкції хлорофілу та інших важливих компонентів клітини. Мікроводорості забезпечують різноманітні високоцінні та промислово важливі біомолекули, такі як каротиноїди, білки, ліпіди та вуглеводи. Завдяки наявності цих біомолекул у біомасі мікроводоростей, вони є дуже корисними у харчовій, косметичній та фармацевтичній промисловості, у виробництві біодизельного палива та комбікормів.

Отже, нами отримано накопичувальну культуру *Monoraphidium sp.* на середовищі ВГ-11, розроблено процедуру флокуляції біомаси та здійснено її подальший аналіз. Біомаса *Monoraphidium sp.* внаслідок високого вмісту ліпідів є перспективним джерелом для отримання біодизелю.

ВИСНОВКИ

1. Підтверджено ефективність використання середовища BG-11 для накопичувального культивування зеленої водорості *Monoraphidium sp.* Встановлено тривалість експоненційної фази росту культури *Monoraphidium sp.* з 3 по 11 доби культивування, щільність культури на 11 добу становила— $5,36 \times 10^6$ кл/мл. Задля максимального виходу біомаси рекомендовано здійснювати накопичувальне культивування *Monoraphidium sp.* на середовищі BG-11 протягом 11 діб.

2. Розроблено оптимальний режим відділення біомаси *Monoraphidium sp.*, який включає: використання базальтового туфу у концентрації 2мг/мл як флокулянта, відстоювання культуральної рідини з флокулянтом 3 доби (для агрегації клітин) та подальше центрифугування — 4000 об/хв, 20 хв.

3. Високий вміст ліпідів (47%) у біомасі характеризує культуру *Monoraphidium sp.* як перспективний вид для виробництва біодизеля.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Bessette, A. P., Teymouri, A., Martin, M. J., Stuart, B. J., Resurreccion, E. P., & Kumar, S. (2018). Life cycle impacts and techno-economic implications of flash hydrolysis in algae processing. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(3), 3580-3588.
2. Ruggeri, M. V. R., Godoy, R. F. B., Arroyo, P. A., & Trevisan, E. (2021). Evaluation of natural flocculant efficiency in the harvest of microalgae *Monoraphidium contortum*. *SN Applied Sciences*, 3(6), 627.
3. Shrivastav, A., Mishra, S. K., Suh, W. I., Farooq, W., Moon, M., & Kim, T. Y., J. W. (2015). Characterization of newly isolated oleaginous microalga *Monoraphidium* sp. for lipid production under different conditions. *Algal Research*, 12, 289–294.
4. Tsarenko, P. M., Borysova, O. V., Kharkhota, M. A., Zelena, L. B., Konischuk, M. O., Burova, O. V., & Blume, Ya. B. (2022). *Monoraphidium* sp. IBASU-A 574 (Selenastraceae, Chlorophyta) - a promising producer of biomass for bioenergy. *Algologia*, 32(1), 88–104.
5. Kumar, B., Mathimani, T., Sudhakar, M., Rajendran, K., Nizami, A., Brindhadevi, K., & Pugazhendhi, A. (2021). A state of the art review on the cultivation of algae for energy and other valuable products: Application, challenges, and opportunities. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 138, 110649.
6. Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M. K., Forde, G. M., & Hoadley, A. (2010). Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, 2, 15.
7. Chen, L., Wang, C., Wang, W., & Wei, J. (2013). Optimal conditions of different flocculation methods for harvesting *Scenedesmus* sp. cultivated in an open-pond system. *Bioresource Technology*, 133, 9-15.
8. Fabris, M., Abbriano, R. M., Pernice, M., Sutherland, D. L., Commault, A. S., Hall, C. C., & Ralph, P. J. (2020). Emerging Technologies in Algal Biotechnology: Toward the Establishment of a Sustainable, Algae-Based

Bioeconomy. *Frontiers in Plant Science*, 11.

9. Guiry, M. D. (2020). *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Retrieved March 11, 2020, from

10. Костіков, І. Ю., & Царенко, П. М. (2009-2013). *Альгологія: Рукопис підручника для студентів 3-4 курсу спеціальності "Ботаніка"*. Київ.

11. Yee, W. (2016). Microalgae from the Selenastraceae as emerging candidates for biodiesel production: a mini review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(4).

12. Yu, X., Zhao, P., He, C., Li, J., Tang, X., Zhou, J., & Huang, Z. (2012). Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, 121, 256–262.

13. Bogen, C., Klassen, V., Wichmann, J., Russa, M. L., Doebbe, A., Grundmann, M., Uronen, P., Kruse, O., & Mussnug, J. H. (2013). Identification of *Monoraphidium contortum* as a promising species for liquid biofuel production. *Bioresource Technology*, 133, 622–626.

14. Patidar, S. K., Mitra, M., George, B., Soundarya, R., & Mishra, S. (2014). Potential of *Monoraphidium minutum* for carbon sequestration and lipid production in response to varying growth mode. *Bioresource Technology*, 172, 32–40.

15. Gattullo, C. E., Bährs, H., Steinberg, C. E. W., & Loffredo, E. (2012). Removal of bisphenol A by the freshwater green alga *Monoraphidium braunii* and the role of natural organic matter. *Science of The Total Environment*, 416, 501–506.

16. Suparmaniam, U., Lam, M. K., Uemura, Y., Lim, J. W., Lee, K. T., & Shuit, S. H. (2019). Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 115, 109361.

17. Singh, R. N., & Sharma, S. (2012). Development of suitable photobioreactor for algae production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*,

16(4), 2347–2353.

18. Pandey, S. (2024). Biodiesel production from microalgae: A comprehensive review on influential factors, transesterification processes, and challenges. *Fuel*, 367, 131547.

19. Mathimani, T., Bhumathi, D., Shan Ahamed, T., Dineshbabu, G., Deviram, G., Uma, L., & et al. (2017). Semicontinuous outdoor cultivation and efficient harvesting of marine *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 with minimum solid co-precipitation and high floc recovery for biodiesel. *Energy Conversion and Management*, 149, 13–25.

20. Mathimani, T., Uma, L., & Prabakaran, D. (2017). Optimization of direct solvent lipid extraction kinetics on marine trebouxiophycean alga by central composite design – bioenergy perspective. *Energy Conversion and Management*, 142, 334–346.

21. Doshi, A., Pascoe, S., Cogle, L., & Rainey, T. J. (2016). Economic and policy issues in the production of algae-based biofuels: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 64, 329–337.

22. Mathimani, T., Beena, N., RanjithKumar, R. (2016). Evaluation of microalga for biodiesel using lipid and fatty acid as a marker – A central composite design approach. *Journal of Energy Institute*, 89, 436–446.

23. Koley, S., Mathimani, T., Bagchi, S. K., Sonkar, S., & Mallick, N. (2019). Microalgal biodiesel production at outdoor open and polyhouse raceway pond cultivations: a case study with *Scenedesmus accuminatus* using low-cost farm fertilizer medium. *Biomass and Bioenergy*, 120, 156–165.

24. Lim, Y. A., Chong, M. N., Foo, S. C., & Ilankoon, I. (2021). Analysis of direct and indirect quantification methods of CO₂ fixation via microalgae cultivation in photobioreactors: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 137, 110579.

25. Kumar, B., Mathimani, T., Sudhakar, M., Rajendran, K., Nizami, A., Brindhadevi, K., & Pugazhendhi, A. (2021). A state of the art review on the cultivation of algae for energy and other valuable products: Application,

challenges, and opportunities. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 138, 110649.

26. Золотарьова, О. К., Шнюкова, Є. І., Сиваш, О. О., & Михайленко, Н. Ф. (2008). *Перспективи використання мікрроводоростей у біотехнології*. Київ: Альтерпрес.

27. Soto-Sierra, L., Stoykova, P., & Nikolov, Z. L. (2018). Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal Research*, 36, 175- 192.

28. Schnurr, P. J., & Allen, D. G. (2015). Factors affecting algae biofilm growth and lipid production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52, 418–429.

29. Lakatos, G., Ranglová, K., Bárcenas-Pérez, D., Grivalský, T., Manoel, J. C., Mylenko, M., Cheel, J., Nyári, J., Wirth, R., Kovács, K. L., Kopecký, J., Nedbalová, L., & Masojídek, J. (2023). Cold-adapted culturing of the microalga *Monoraphidium* sp. in thin-layer raceway pond for biomass production. *Algal Research*, 69, 102926.

30. Milledge, J. J. (2010). Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Technology*, 1, 31–41.

31. Barros, A. I., Gonçalves, A. L., Simões, M., & Pires, J. C. M. (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 1489–1500.

32. Singh, G., & Patidar, S. K. (2018). Microalgae harvesting techniques: A review. *Journal of Environmental Management*, 217, 499–508.

33. Badrus, Z. (2018). Potential of Natural Flocculant in Coagulation-Flocculation Wastewater Treatment Process. *E3S Web of Conferences*, 73, 05006.

34. Milledge, J. J., & Heaven, S. (2013). A review of the harvesting of micro-algae for biofuel production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12, 165-178.

35. Papazi, A., Makridis, P., & Divanach, P. (2010). Harvesting *Chlorella minutissima* using cell coagulants. *Journal of Applied Phycology*, 22, 349–355.

36. Wan, C., Alam, M. A., Zhao, X.-Q., et al. (2015). Current progress and future prospect of microalgal biomass harvest using various flocculation technologies. *Bioresource Technology*, 184, 51–257.
37. Vandamme, D., Foubert, I., & Muylaert, K. (2013). Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in Biotechnology*, 31(4), 233–239.
38. Al-Rikabey, M. N., & Al-Mayah, A. M. (2018). Cultivation of *Chlorella vulgaris* in BG-11 media using Taguchi method. *Journal of Advanced Research in Dynamical & Control Systems*, 10(7), 19-30.
39. Мусієнко, М. М., Паршикова, Т. В., & Славний, П. С. (2001). *Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин*. Київ: Фітосоціоцентр.
40. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1-2), 265–268.
41. Gerhardt, P. (1994). *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
42. Brányiková, I., Procházková, G., Potůčar, T., Ježová, Z., & Brányik, T. (2018). Harvesting of microalgae by flocculation. *Fermentation*, 4(4), 93.
43. Sobuś, N., Czekaj, I., Diichuk, V., & Kobasa, I. M. (2020). Characteristics of the structure of natural zeolites and their potential application in catalysis and adsorption processes. *Technical Transactions*, 117(1).
44. El-Sheekh, M. M., Galal, H. R., Mousa, A. S. H., & Farghl, A. A. (2024). Impact of macronutrients and salinity stress on biomass and biochemical constituents in *Monoraphidium braunii* to enhance biodiesel production. *Scientific Reports*, 14(1), 2725.

ДОДАТКИ

Техніка безпеки в лабораторії біотехнологічного профілю

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, заклавши 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