

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Школа Инженерная школа новых производственных технологий
Направление подготовки 12.04.02 «Оптотехника»
Отделение школы (НОЦ) Материаловедения

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Тема работы
Оптические методы контроля процессов культивирования микроводоросли Хлореллы

УДК 544.53:519.876

Студент

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ВМ6Б	К.А. Толеутаев		

Руководитель

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	А.Н.Яковлев	к.ф.-м.н.		

КОНСУЛЬТАНТЫ:

По разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Доцент	Е.В.Старикова	к.ф.н.		

По разделу «Социальная ответственность»

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	О.Б. Назаренко	д.т.н.		

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ:

Руководитель ООП	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
«Оптотехника»	Е.Ф. Полисадова	д.ф.-м.н		

Томск – 2018 г.

ПЛАНИРУЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ОБУЧЕНИЯ ПО ООП

Код результ ата	Результат обучения (выпускник должен быть готов)
<i>Профессиональные компетенции</i>	
P1	Применять глубокие естественнонаучные, математические, гуманитарные, общепрофессиональные знания в области оптотехники
P2	Воспринимать, обрабатывать, анализировать и систематизировать научно-техническую информацию, передовой отечественный и зарубежный опыт в области световой, оптической и лазерной техники, оптического и светотехнического материаловедения и оптических и светотехнических технологий
P3	Применять полученные знания для решения задач, возникающих при эксплуатации новой техники и технологий оптотехники
P4	Владеть методами и компьютерными системами проектирования и исследования световой, оптической и лазерной техники, оптических и светотехнических материалов и технологий
P5	Владеть методами проведения фотометрических и оптических измерений и исследований, включая применение готовых методик, технических средств и обработку полученных результатов
P6	Владеть общими правилами и методами наладки, настройки и эксплуатации оптической, световой и лазерной техники для решения различных задач
<i>Универсальные компетенции</i>	
P7	Проявлять творческий подход при решении конкретных научных, технологических и опытно-конструкторских задач в области оптотехники
P8	Владеть иностранным языком на уровне, позволяющем работать в интернациональной среде с пониманием культурных, языковых и социально – экономических различий, разрабатывать документацию, презентовать и защищать результаты инновационной деятельности
P9	Уметь эффективно работать индивидуально и в качестве члена команды по междисциплинарной тематике, демонстрировать ответственность за результаты работы и готовность следовать корпоративной культуре организации
P10	Следовать кодексу профессиональной этики, ответственности и нормам научной, педагогической и производственной деятельности
P11	Понимать необходимость и уметь самостоятельно учиться и повышать квалификацию в течение всего периода профессиональной деятельности

Министерство образования и науки Российской Федерации
федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

Инженерная школа новых производственных технологий
Отделение материаловедения
Направление подготовки (специальность) 12.04.02 «Оптотехника»

УТВЕРЖДАЮ:
Руководитель ООП «Оптотехника»
ОМ ИШНПТ

(Подпись) _____ (Дата) Е.Ф. Полисадова
(Ф.И.О.)

ЗАДАНИЕ
на выполнение выпускной квалификационной работы

В форме:

Магистерской диссертации

Студенту:

Группа	ФИО
4ВМ6Б	Толеугаеву Канату Амантаевичу

Тема работы:

Оптические методы контроля процессов культивирования микроводоросли Хлореллы	
Утверждена приказом директора (дата, номер)	

Срок сдачи студентом выполненной работы:	25.05.2018 г.
--	---------------

ТЕХНИЧЕСКОЕ ЗАДАНИЕ:

<p>Исходные данные к работе</p> <p><i>(наименование объекта исследования или проектирования; производительность или нагрузка; режим работы (непрерывный, периодический, циклический и т. д.); вид сырья или материал изделия; требования к продукту, изделию или процессу; особые требования к особенностям функционирования (эксплуатации) объекта или изделия в плане безопасности эксплуатации, влияния на окружающую среду, энергозатратам; экономический анализ и т. д.).</i></p>	<p>Отечественная и зарубежная литература по теме проекта.</p> <p>Объект исследования – оптическая плотность, люминесценция, скорость роста хлореллы.</p> <p>Предмет исследования – Хлорелла.</p> <p>Аппаратура – спектрофотометр, светодиодные облучатели, фотобиореактор, нефелометрический датчик.</p>
---	--

<p>Перечень подлежащих исследованию, проектированию и разработке вопросов</p> <p><i>(аналитический обзор по литературным источникам с целью выяснения достижений мировой науки техники в рассматриваемой области; постановка задачи исследования, проектирования, конструирования; содержание процедуры исследования, проектирования, конструирования; обсуждение результатов выполненной работы; наименование дополнительных разделов, подлежащих разработке; заключение по работе).</i></p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Литературный обзор по теме исследования. 2. Разработка методики исследований. 3. Обоснование и выбор методов и средств измерений. 4. Обоснование возможности и эффективности применения люминесцентных методов исследования эффективности облучения хлореллы
<p>Перечень графического материала</p> <p><i>(с точным указанием обязательных чертежей)</i></p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. результаты экспериментов 2. схемы экспериментальных установок 3. фотографии экспериментальных образцов
<p>Консультанты по разделам выпускной квалификационной работы</p> <p><i>(если необходимо, с указанием разделов)</i></p>	
<p>Раздел</p>	<p>Консультант</p>
<p>Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение</p>	<p>Старикова Е.В.</p>
<p>Социальная ответственность</p>	<p>Назаренко О.Б., д.т.н.</p>
<p>Раздел ВКР на иностранном языке</p>	

<p>Дата выдачи задания на выполнение выпускной квалификационной работы по линейному графику</p>	
--	--

Задание выдал руководитель:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Директор ИШНПТ	Яковлев А.Н.	к. ф.-м. н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ВМ6Б	Толеутаев К.А.		

Реферат

Выпускная квалификационная работа 135 с., 47 рис., 23 табл., 70 источников, 1 прил.

Ключевые слова: *Chlorella Vulgaris* Beijerinck, фотобиореактор, светодиоды, турбидиметрический датчик, оптические методы контроля, спектральный состав, фотопериод, интенсивность, люминесценция.

Объектом исследования является зеленый микроводоросль *Chlorella Vulgaris* Beijerinck, имеющий большой потенциал для производства биотоплива или в качестве пищевой добавки.

Целью данной работы является изучение влияния интенсивности, фотопериода, спектрального состава света на рост *Chlorella vulgaris*, а также сравнение оптических методов контроля на точность.

В процессе исследования проводились эксперименты на проверку влияния интенсивности, фотопериода и спектрального состава света на рост *Chlorella vulgaris* и был сконструирован турбидиметрический датчик.

В результате исследования выявлена степень влияния различных параметров света на рост *Chlorella vulgaris* и оценены оптические методы контроля процессов культивирования микроводоросли *Chlorella vulgaris*.

Область применения: биоэнергетика, фармацевтика, сельская хозяйства, водоочистка, пищевое применение, химическая промышленность, наука, косметика.

В настоящей работе использованы ссылки на следующие стандарты:

1. ГОСТ 12.1.005-88 Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.
2. ГОСТ 12.1.033-81 ССБТ Пожарная безопасность. Термины и определения.
3. ГОСТ 12.1.038-82 ССБТ Электробезопасность. Предельно допустимые уровни напряжений прикосновения и токов.
4. ГОСТ 17.4.3.04-85 Охраны природы. Почвы. Общие требования к контролю и охране от загрязнения.

Список основных обозначений и сокращений

I_0 – Интенсивность света на входе в вещество

N_1 – Начальная концентрация клеток

N_2 – Конечная концентрация клеток

PFD_0 – Интенсивность падающего света

PFD_{ave} – Average photon flux density

P_X – Фотосинтетическая активность

P'_X – Локальная фотосинтетическая активность в положении l

P_m – Максимальная активность фотосинтеза

R_X – Дыхательная активность

λ_{max} – Максимальная длина волна света

APAR – Average photon absorption rate

APFD – Average photon flux density

Chl a – Chlorophyll a

L: D – Light: Dark

LED – Light-emitting diode

LPAR – Local photon absorption rate

LPFD – Local photon flux density

NADP – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NPQ – Нефотохимическая тушения

OD – Optical density

PAM – Pluggable Authentication Modules

АТФ – Аденозинтрифосфат

АФК – Активные формы кислорода

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

ИИ – Источник излучения

КССА – Комплекс световых сборных антенн

ФЭУ – Фотоэлектронный умножитель

I – Интенсивность света, прошедшего слой вещества

K – Половина константы

L – Глубина фотобиореактора

N – Количество клеток в одном малом квадрате

X – Удельная активность (активность на единицу сухого веса клетки)

a, b – Эмпирические константы

b – Длина пути в мутной среде

l – Длина светового пути в определенном положении

μ – Удельный темп роста

τ – Коэффициент мутности

Оглавление

	С.
Введение	11
1 Литературный обзор	13
1.1 Морфология, состав, производство и применение <i>Chlorella vulgaris</i>	13
1.2 Влияние интенсивности света и фотопериода на биомассу <i>C. vulgaris</i>	20
1.3 Влияние различных длин волн света на рост микроводоросли <i>Chlorella Vulgaris</i>	25
1.4 Кинетическое моделирование фотосинтетической активности зеленой микроводоросли <i>Chlorella Vulgaris</i>	42
1.4.1 Модель APFD	43
1.4.2 Модель LPFD	47
1.4.3 Модель APAR	48
1.4.4 Модель LPAR	49
1.5 Турбидиметрический и нефелометрический анализ биомассу	50
2 Материалы и методы исследования	54
2.1 Фотобиореактор и экспериментальная установка	54
2.2 Турбидиметрический датчик	57
2.3 Определение количества Хлореллы методом прямого счета клеток в камере Горяева – Тома	60
2.4 Измерение удельного темпа роста	61
2.5 Измерение оптической плотности, OD_{750}	61
2.6 Методика измерения спектров люминесценции хлореллы	62
3 Результаты проведенного эксперимента	64
3.1 Влияние светового/темнового фотопериода на рост <i>Chlorella Vulgaris</i>	64
3.2 Влияние интенсивности света на рост <i>Chlorella Vulgaris</i>	70
3.3 Влияние различных длины волн света на рост <i>Chlorella Vulgaris</i>	72
3.4 Сравнение четырех методов для оценки роста <i>Chlorella vulgaris</i>	75
3.5 Выводы	80
4 Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение	82

4.1 Предпроектный анализ	82
4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования	82
4.1.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения	85
4.1.3 SWOT-анализ	87
4.2 Планирование управления научно-техническим проектом	90
4.2.1 План проекта	90
4.2.2 Бюджет научно-технического исследования	92
4.3 Оценка ресурсоэффективности проекта	96
5 Социальная ответственность	99
5.1 Производственная безопасность	100
5.1.1 Анализ вредных и опасных факторов	100
5.1.2 Отклонение параметров микроклимата в помещении	100
5.1.3 Отклонение концентрации вредных веществ в воздухе рабочей зоны	102
5.1.4 Электрический ток	105
5.2 Экологическая безопасность	106
5.3 Безопасность в чрезвычайных ситуациях	107
5.3.1 Пожарная безопасность	107
5.4 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности	110
6 Заключение	112
Список публикаций	113
Список используемых источников	114
Приложение А	121

Введение

Актуальность темы. Доля морского фитопланктона в производстве глобальной фотосинтетической биомассы составляет около 50%, что соответствует фиксации более 48 миллиардов тонн атмосферного углерода в виде CO_2 [1]. Микроводоросли являются основой всех водных пищевых цепей и, таким образом, косвенно также являются частью пищевой цепи человека. Таким образом, микроводоросли можно рассматривать как чрезвычайно важные организмы для глобальной экосистемы [2].

Благодаря своему ценному питательному составу (включая высокое содержание белка, много длинноцепочечных, ненасыщенных жирных кислот), микроводоросли также могут быть использованы непосредственно в качестве источника пищи для людей. NASA описывает микроводоросли как превосходную, компактную пищу для космонавтов. Микроводоросли также широко используются в качестве корма для животноводства: концентрированный корм для домашней птицы, жвачных животных и свиней может быть заменен микроводорослями. В аквакультуре рыбы, креветок, моллюсков и ракообразных микроводоросли незаменимы, так как водные пищевые цепи начинаются с микроводорослей. Дальнейшие применения микроводорослей из-за их высокого содержания питательных веществ - косметика, пищевые добавки и фармацевтические продукты [3].

Микроводоросли по существу требуют света (энергии), источника углерода (CO_2 для автотрофного метаболизма), среды роста (воды) и питательных веществ (азота и фосфора) для размножения. Интенсивность света и длина волны света играют очень важную роль в процессе фотосинтеза, которые, следовательно, отражаются в росте организмов. Для микроводоросли также требуются светлые и темные режимы для продуктивного фотосинтеза. Культивирование микроводорослей с использованием искусственного света может быть решением для стабильного энергоснабжения и контроля. Использование узких полос света, таких как светодиод (LED), более

экономично, чем другие источники света. Поскольку водоросли содержат пигменты хлорофилла, свет необходим для фотосинтеза. С точки зрения потребления энергии светодиод известен как экономичный источник света для удовлетворения требуемой энергии для фотосинтеза. Микроводорослям требуется оптимальные условия освещения для достижения экономически максимальных скоростей фотосинтеза [4].

Оптические методы широко используются в биологии. В первую очередь свое применение они находят в оценках концентрации тех или иных поглощающих свет объектов: фитопланктона, растворенной органики, бактерий и пр. Большое внимание оптическим методам уделяется в лабораторный практике культивирования микроводорослей, особенно, когда дело касается автоматизации управления процессов культивирования в непрерывном режиме. Используются оптические методы и для определения плотности культуры [5].

Несмотря на большое количество исследований эффекта интенсивности, фотопериода, спектрального состава света на рост и фотосинтез микроводоросли, действие узкополосного светодиодного облучения на микроводоросли остаётся недостаточно изученным. Результаты исследования в этом направлении противоречить друг к другу.

В связи с этим **целью данной работы** является анализ оптических методов контроля на основе экспериментов по изучению влияния интенсивности, фотопериода, спектрального состава облучения на рост *Chlorella vulgaris*.

Для достижения поставленной цели требуется решить следующие **основные задачи**:

1. Экспериментально исследовать влияние спектрального состава, интенсивности и фотопериода света на рост Хлореллы.
2. Сконструировать турбидиметрический датчик для контроля изменения концентрации клеток Хлореллы.
3. Сравнить и оценить оптические методы контроля роста Хлореллы.

1 Литературный обзор

1.1 Морфология, состав, производство и применение *Chlorella vulgaris*

В последнее время микроводоросли стали многообещающим альтернативным сырьем, которое представляет собой огромное биоразнообразие с множеством преимуществ, превышающих потенциал обычного сельскохозяйственного сырья. Как и любой другой фитопланктон, микроводоросли имеют питательную ценность [6]. Первыми, кто потреблял сине-зеленую микроводоросль, были ацтеки и другие мезоамериканцы, которые использовали эту биомассу в качестве важного источника пищи. В настоящее время эти микроскопические организмы по-прежнему потребляются в качестве пищевой добавки, такой как *Chlorella vulgaris* и *Spirulina platensis* [7], а их продукты также используются для различных целей, таких как красители, фармацевтические препараты, корм для животных, аквакультура и косметика.

В течение последних двух десятилетий микроводоросли начали новый курс с растущими потребностями, вызванными истощением запасов ископаемого топлива, последующим ростом цен на нефть и проблемой глобального потепления. Эти драматические пороги заставляют мир находить глобальные стратегии смягчения углекислого газа, предлагая альтернативные возобновляемые источники сырья и интенсифицируя исследования биотоплива третьего поколения. В этом контексте микроводоросли в настоящее время рассматриваются как перспективный устойчивый энергетический ресурс из-за их способности накапливать большое количество липидов, пригодных для производства биодизеля, который очень похож на нефтяное топливо [8]. Они также оказались источником таких продуктов, как белки, углеводы, пигменты, витамины и минералы [9]. Кроме того, микроводоросли захватывают солнечный свет и выполняют фотосинтез, производя приблизительно половину атмосферного кислорода на Земле и поглощая огромное количество углекислого газа в качестве основного сырья. Поэтому выращивание их рядом с

электростанциями для сжигания имеет большое значение из-за их замечательной способности поглощать углекислый газ, который они превращают в потенциальные компоненты биотоплива, продуктов питания, кормов и компонентов с высокой добавленной стоимостью [10].

Микроводоросли представляют собой огромное биоразнообразие, из которого уже описано или проанализировано около 40 000 [11]. Одним из самых замечательных является зеленый эукариотический микроводоросль *C. vulgaris*, который относится к следующей научной классификации: Domain: Eukaryota, Kingdom: Protista, Division: Chlorophyta, Class: Trebouxiophyceae, Order: Chlorellales, Family: Chlorellaceae, Genus: Chlorella, Species: Chlorella vulgaris. Следовательно, голландский исследователь Мартинус Виллем Бейеринк впервые открыл его в 1890 году как первая микроводоросль с четко определенным ядром [12]. Название Chlorella происходит от греческого слова chloros (Χλωρός), что означает зеленый, а латинский суффикс ella - его микроскопический размер. Это одноклеточная микроводоросль, которая растет в пресной воде и присутствует на Земле с докембрийского периода 2,5 миллиарда лет назад, и с тех пор ее генетическая целостность осталась постоянной. К началу 1900-х годов содержание белка хлореллы (>55% сухой массы) привлекло внимание немецких ученых как нетрадиционный источник пищи. В 1950-х годах Институт Карнеги в Вашингтоне принял участие в исследовании и сумел вырастить эту микроводоросль в больших масштабах для борьбы с выбросами CO₂. В настоящее время Япония является мировым лидером в потреблении Chlorella и использует ее для лечения [13], поскольку она показала, что она обладает иммуномодулирующими и противораковыми свойствами [14]. После кормления его крысам, мышам и кроликам в виде порошка он обнаружил защитные свойства против гематопоеза [15], связанные с возрастом, такие как сердечно-сосудистые заболевания, гипертония и катаракта; это снижает риск развития атеросклероза и стимулирует синтез коллагена для кожи [16]. Кроме того, *C. vulgaris* также способен накапливать

важные количества липидов, особенно после голодания азота, с профилем жирной кислоты, подходящим для производства биодизеля [17].

C. vulgaris представляет собой сферическую микроскопическую ячейку диаметром 2-10 мкм [18] и имеет множество структурных элементов, сходных с растениями (рис. 1.1).

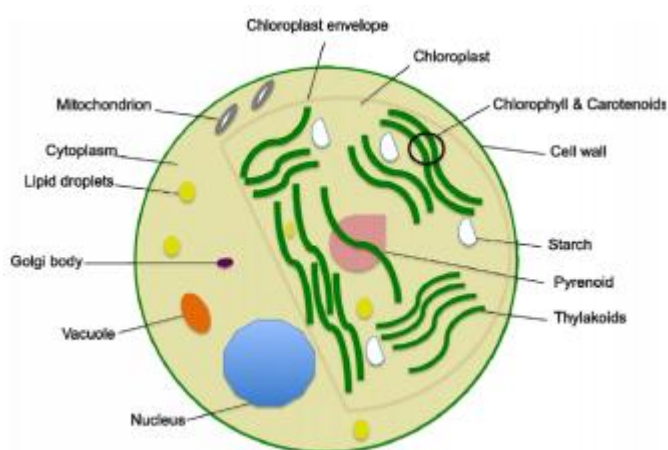


Рисунок 1.1 – Схематическая ультраструктура *C. vulgaris*, представляющая различные органеллы [6]

C. vulgaris - это не подвижная репродуктивная клетка (автоспор), которая размножается бесцеремонно и быстро. Таким образом, в течение 24 часов одна клетка *C. vulgaris*, выращенная в оптимальных условиях, размножается аутоспоролированием, что является наиболее распространенным бесполом размножением в водорослях. Таким образом, четыре дочерние клетки, имеющие собственную клеточную стенку, образуются внутри клеточной стенки материнской клетки (рис. 1.2 и 1.3) [18]. После созревания этих вновь образованных клеток разрушается материнская клеточная стенка, позволяющая высвободить дочерние клетки и оставшиеся остатки материнской клетки в качестве корма новообразованными дочерними клетками.

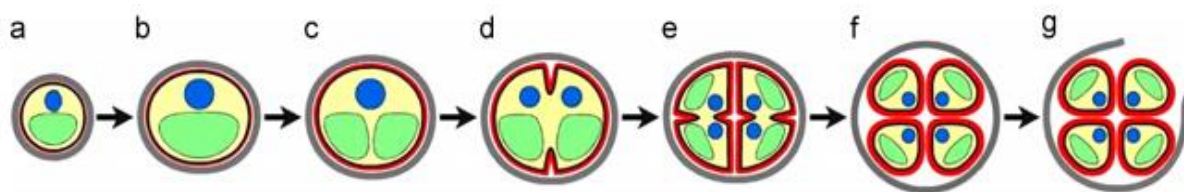


Рисунок 1.2 – Чертежи, показывающие различные фазы формирования дочерних клеточных стенок в *Chlorella vulgaris*: а) ранняя фаза роста клеток; б) поздняя фаза роста клеток; в) фаза разделения хлоропластов; д) ранняя фаза деления протопластов; е) фаза деления позднего протопласта; ф) фаза созревания дочерних клеток и г) фаза вылупления [18]

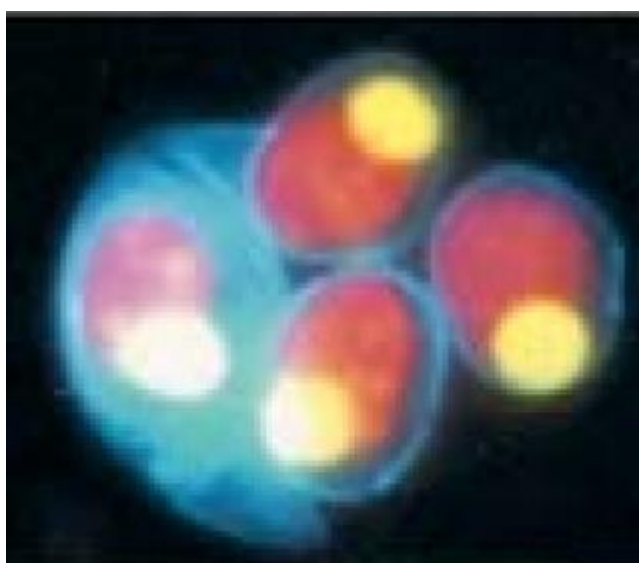


Рисунок 1.3 – Недавно сформировавшиеся клетки выходят за пределы клеточной стенки материнской клетки после вылупления [18]

Годовое производство хлореллы достигло 2000 т (сухой вес) в 2009 году, а основными производителями являются Япония, Германия и Тайвань [19]. Эта микроводоросль имеет быстрый темп роста и реагирует на каждый набор условий роста путем изменения выхода конкретного компонента. *C. vulgaris* идеально подходит для производства, потому что он чрезвычайно устойчив к суровым условиям и захватчикам. С одной стороны, содержание липидов и крахмала увеличивается, а производительность биомассы прекращается или уменьшается [20] в неблагоприятных условиях роста, таких как ограничение азота и фосфора, высокая концентрация CO_2 , чрезмерное воздействие света [21-

22], избыток железа в среде [23] или повышения температуры [24]. С другой стороны, содержание белка увеличивается в нормальных и управляемых условиях роста (добавление азота). Поэтому многие методы роста были протестированы для того, чтобы добровольно нацелить продуктивность биомассы, содержание липидов, белков, углеводов и пигментов.

Известно, что характеристики роста и состав микроводорослей в значительной степени зависят от условий культивирования [27]. Существует четыре основных типа условий культивирования микроводорослей: фотоавтотрофные, гетеротрофные, миксотрофные и фотогетеротрофные культуры [27]. Каждый вид культивирования подробно обсуждается снизу.

Фотоавтотрофное культивирование происходит, когда микроводоросли используют свет, например солнечный свет, как источник энергии, и неорганический углерод (например, углекислый газ) в качестве источника углерода для образования химической энергии посредством фотосинтеза. Это наиболее часто используемое условие культивирования для роста микроводорослей. По сравнению с другими видами культивирования проблема загрязнения менее выражена при использовании фотоавтотрофного роста. Таким образом, системы культивирования микроводорослей на открытом воздухе (такие как открытые пруды) обычно эксплуатируются в условиях фотоавтотрофного культивирования [9]. Фотоавтотрофное культивирование можно разделить на открытые пруды и закрытые фотобиореакторы.

Открытые пруды являются наиболее распространенным способом производства и являются самым дешевым методом для крупномасштабного производства биомассы. Эти системы подразделяются на природные воды (озера, лагуны и пруды) или сточные воды или искусственные пруды или контейнеры. Они обычно строятся рядом с электростанциями или тяжелой промышленностью с массивным выбросом диоксида углерода, где биомасса поглощает азот из атмосферы в виде NO_x . Чтобы обеспечить возможность легкого воздействия всех клеток на солнечный свет, особенно в конце экспоненциальной фазы роста, оптимальная глубина пруда составляет 15-50 см

[19,24]. С другой стороны, открытые системы пруда имеют некоторые ограничения, поскольку они требуют строгого экологического контроля, чтобы избежать риска загрязнения, испарения воды, загрязнений, вторжения бактерий и риска роста других видов водорослей. Кроме того, нельзя регулировать разницу температур из-за сезонных изменений, а концентрация CO_2 и избыточное воздействие солнечного света трудно контролировать. Более того, вблизи конца фазы экспоненциального роста некоторые клетки недостаточно подвержены солнечному свету, потому что другие клетки, плавающие вблизи поверхности, покрывают их, что приводит к более низким массовым выходам. Поэтому перемешивание среды является предпочтительным и в настоящее время практикуется.

Закрытый фотобиореактор был реализован в основном для преодоления некоторых ограничивающих факторов в системах открытых прудов, таким образом, выращивание биомассы в управляемой среде (рН, интенсивность света, температура, концентрация углекислого газа) для получения более высокой концентрации клеток, а также продуктов, которые более подходят для производства чистых фармацевтических препаратов, нутрицевтиков и косметики. Кроме того, эти системы более подходят для чувствительных штаммов, которые не могут конкурировать и расти в суровых условиях. Подача биомассы с CO_2 происходит путем пузырьков труб. Флуоресцентные лампы используются в случае, если трубки недостаточно или недостаточно подвержены воздействию солнечных лучей. Пробирки обычно имеют диаметр 20 см или меньше [25], а толщина их прозрачных стенок составляет несколько миллиметров, что обеспечивает соответствующее поглощение света. Таким образом, были использованы и протестированы несколько конструкций: фотобиореактор с плоской пластинкой, трубчатый фотобиореактор и фотобиореактор с колонкой. Тем не менее, основными недостатками закрытой системы являются стоимость сложной конструкции, небольшой площади освещения и стерилизации затрат [26].

Некоторые виды микроводорослей могут не только расти в фототрофных условиях, но также использовать органический углерод в темных условиях, как и бактерии. Ситуация, когда микроводоросли используют органический углерод как источник энергии и углерода, называется гетеротрофной культивацией [27]. Этот вид культивирования мог бы избежать проблем, связанных с ограниченным светом, которые препятствуют высокой плотности клеток в крупномасштабных фотобиореакторах при фотоавтотрофной культивации. Источниками углерода, используемыми для *S. vulgaris*, являются глюкоза, ацетат, глицерин и глутамат с максимальной удельной скоростью роста, получаемой с глюкозой. Тем не менее, основным недостатком этой системы является цена и доступность сахаров, которые конкурируют с сырьем для других целей, таких как производство продуктов питания и биотоплива. Гетеротрофная система на основе сахара часто страдает от проблем с загрязнением.

S. vulgaris способен сочетать как автотрофные, так и гетеротрофные методы путем проведения фотосинтеза, а также проглатывания органических материалов, таких как глюкоза, что является наиболее подходящим для *S. vulgaris* [28]. Следовательно, клетки не зависят строго от света или органического субстрата. Этот метод успешно конкурирует с автотрофными системами. Основными преимуществами миксотрофного метаболизма являются ограничение воздействия потери биомассы при темном дыхании и уменьшение количества органических субстратов, используемых для выращивания биомассы.

Фотогетеротрофная культивация - это когда микроводоросли требуется свет при использовании органических соединений в качестве источника углерода. Основное различие между миксотрофным и фотогетеротрофным культивированием состоит в том, что последний требует света в качестве источника энергии, в то время как миксотрофная культивация может использовать органические соединения для этой цели. Следовательно, фотогетеротрофное культивирование одновременно требует как сахара, так и

света [27]. Хотя производство некоторых легко регулируемых полезных метаболитов может быть усилено за счет использования фотогетеротрофной культивации, использование такого подхода для получения биодизеля очень редко, как в случае с миксотрофной культивацией.

1.2 Влияние интенсивности света и фотопериода на биомассу *C. vulgaris*

Одно из основными факторами, которые влияют на физиологию и кинетику роста хлореллы являются световые условия [29]. Количество и качество света определяют количество энергии, доступной для фотосинтезирующих организмов, для проведения их метаболических действий. Многочисленные исследования с микроводорослями различных групп свидетельствуют о том, что пигменты, ненасыщенные жирные кислоты, углеводы и содержание белка все изменяются в ответ на увеличение или уменьшение интенсивности света. Вариации в светло-темном режиме налагают изменения клеточного содержания белков, углеводов и липидов. [29] работе было исследовано влияние интенсивности света и фотопериода на биомассу *C. vulgaris*. Облучения осуществлялась с помощью холодных флуоресцентных ламп белого цвета.

Интенсивности света (37,5, 62,5 и 100 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$) и циклы света/темноты (8:16, 12:12 и 16:8 ч) в виде отдельных параметров и их взаимодействия значительно повлияли на биомассу *C. vulgaris* в конце экспоненциальной фазы роста (Рис. 1.4а-с) [29]. Более длительная продолжительность света приводила к увеличению биомассы *C. vulgaris* (Рис. 1.5). Однако интенсивность света оказывала различное влияние на биомассу; увеличение интенсивности света от 37,5 до 62,5 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ привело к увеличению биомассы, но при 100 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ биомасса уменьшилась. Максимальная биомасса $2,05 \pm 0,1 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ регистрировалась при интенсивности 62,5 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ и 16:8 ч, а минимальная биомасса

0,6-0,07 г·л⁻¹ достигала при 37,5 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ интенсивности и 8:16 [29].

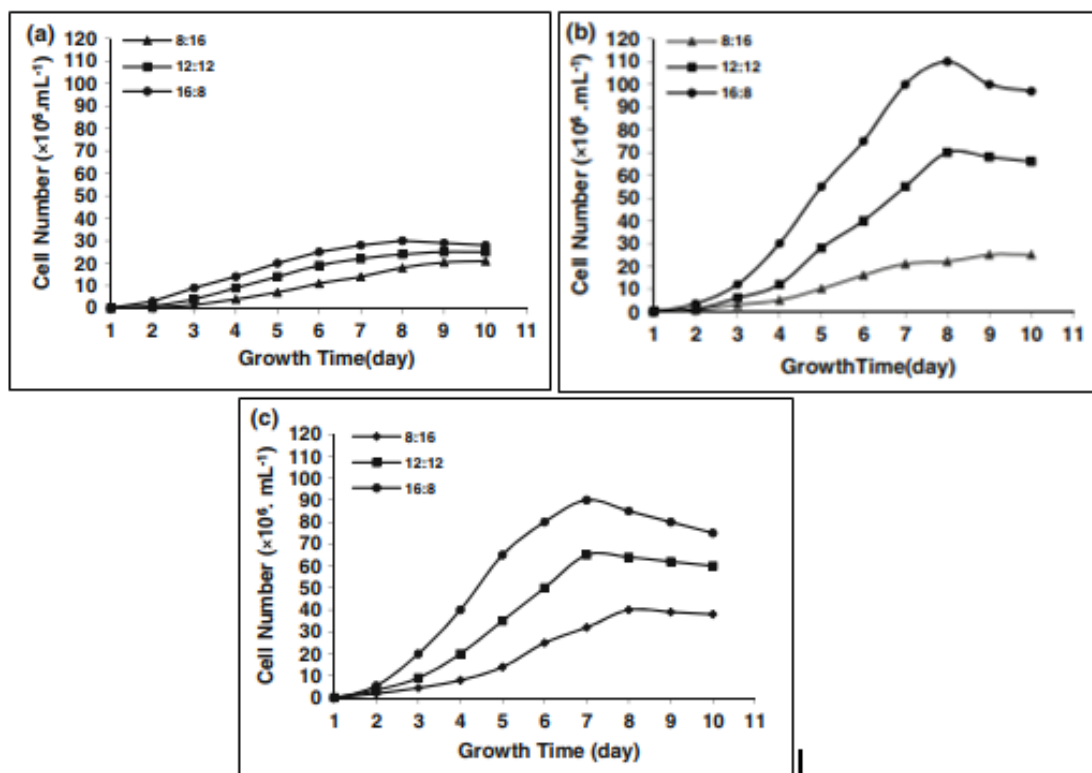


Рисунок 1.4 – Изменения концентрации клеток *C. vulgaris*, выращенных в трех разных фотопериодах (8L:16D, 12L:12D, 16L:8D) и интенсивности света (37,5 мкмоль м⁻² с⁻¹ а, 62,5 мкмоль м⁻² с⁻¹ b, 100 мкмоль м⁻² с⁻¹ c) [29]

Одно исследование показало, что рост фитопланктона зависит от общего количества света в день, а в других исследованиях установлено, что в зависимости от вида фитопланктона рост может контролироваться только фотопериодом [30-31]. Результаты в [29] работе на фотопериоде показали, что увеличение длительности света с 8:16 до 16:8 ч оказало благоприятное влияние на производство биомассы. Действительно, режим свет/темнота позволяет либо увеличить конечную концентрацию, либо снизить издержки производства. Необходимость темной фазы объяснялась тем, что фотосинтез регулируется двумя реакциями: фотохимической фазой, зависящей от света, и другой - биохимической темной фазой, которая не зависит от света.

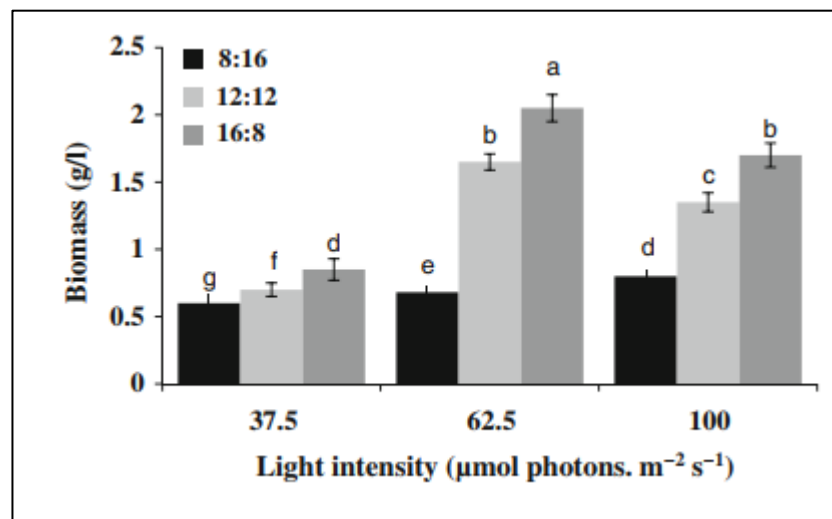


Рисунок 1.5 – Биомасса *C. vulgaris* на трех фотопериодах (8:16, 12:12 и 16:8 ч свет/темнота) и интенсивности света (37,5, 62,5 и 100 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹)

[29]

Соединения, которые производятся в фазе, зависящей от света (АТФ, НАДФН), используются в темной фазе для синтеза метаболитических молекул, необходимых для роста. Кроме того, [32] работе сообщили, что некоторые ферменты цикла пентозы фотосинтеза и фиксации CO₂ неактивны во время облучения. Согласно той же [32] работе, сродство карбоксидзиматазы к CO₂ резко уменьшается в темноте, когда рН снижается. Его активность может быть полностью заблокирована. Эта инактивация блокирует поглощение рибулоза 1,5-дифосфата, такое как полное поглощение, может препятствовать возобновлению фотосинтеза на свету. Темная фаза остается необходимой, по крайней мере, для регенерации кофакторов (NAD⁺, NADP⁺), необходимых для фазы I фотосинтеза.

С 15/9 циклом фотопериода, используя серию фотографий, сделанных в каждый час дня, [32] показал, что деление клеток происходит в темных условиях для многих одноклеточных Chlorophyceae. Деление клеток происходит в темной фазе, а также в освещенной фазе. Если равновесие клеток, которое дает митоз, возможно при темных и освещенных условиях, деление клеток происходит чаще после прерывания освещенной фазы. Поэтому

предпочтительнее использовать фотопериод с длительностью света от 12 до 15 часов, чтобы обеспечить равновесие, которое устанавливается между анаболическими и катаболическими явлениями в течение цикла фотопериода. Кроме того, для промышленного применения и учета соотношения затрат энергии и соответствующих производств биомассы продолжительность освещения в течение 12-15 часов для освещенной фазы обычно считается оптимальной для роста водорослей [32].

Производство биомассы во многих микроводорослях увеличивалось в условиях высокой освещенности, что является ожидаемым ответом на высокий свет, что обычно приводит к увеличению воспроизводства до тех пор, пока не будет наблюдаться интенсивность точки насыщения, и после этого наблюдалось фотоингибирование, что ограничивает дальнейшее производство биомассы. Этот эффект вызван реакцией фотоокисления внутри клетки, поскольку избыточный свет не может быть поглощен фотосинтетическим аппаратом [29].

Освещение состоит из двух предметов: интенсивности и длины волны света. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что свет действует как ориентир и помогает влиять на пролиферацию клеток и помогает клеточному дыханию и фотосинтезу. Во время эндотермических реакций для углеродного обмена требуется энергия, и эта энергия подается светом. Свет является основным фактором в процессе фотосинтеза для превращения диоксида углерода в органические соединения, такие как углеводы и белки, в которых выделяются вода и кислород. Если рост микроводорослей осуществляется при ограничении света, клеточные механизмы прогрессируют с образованием углерода в аминокислоты и другие важные соединения для клеток, но в насыщенном освещении увеличивается производство сахара и крахмала, а максимальная скорость роста стабилизируется. Тем не менее, некоторые результаты свидетельствуют о неконкурентной стратегии освещения, поскольку темпы роста остаются высокими, а издержки производства снижаются. Это связано с тем, что деление клеток для одноцепочечной

фотосинтетической культуры обычно происходит в темных условиях. Однако для других случаев деление клеток происходит как в темной, так и в световых фазах, но для микроорганизмов *vulgaris* происходит более деление клеток после остановки фазы освещения. Более того, некоторые ферментативные механизмы могут быть отключены во время освещения [33-35].

В работе [22], было исследовано зависимость биомассы от интенсивности света. На рис.1.6 показано изменение концентрации биомассы и содержания Chl a, когда концентрация KNO_3 и концентрация всасываемого CO_2 контролировались на уровне 1,0 мМ и 1,0% соответственно. Рост клеток увеличивался с увеличением интенсивности света.

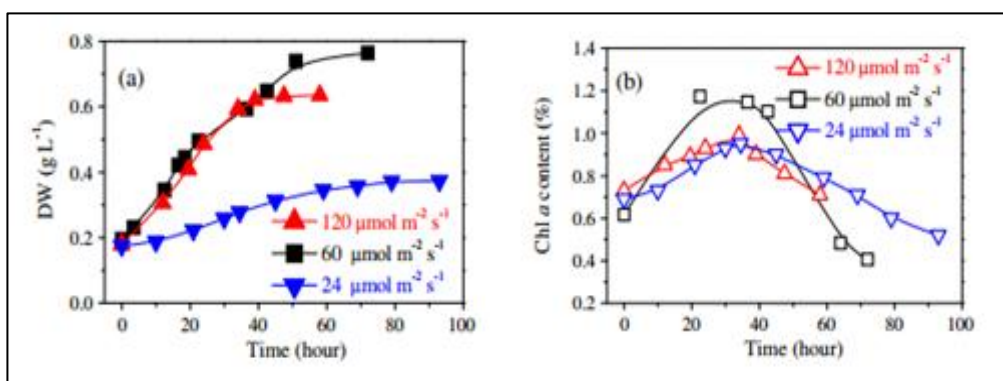


Рисунок 1.6 – Влияние облучения на концентрацию биомассы (a) и Chl a содержание *Chlorella vulgaris* (b). (Концентрация KNO_3 , 1,0 мМ; исходный газ, 1,0% CO_2 ; скорость газа, 1,2 л мин⁻¹; непрерывное освещение; температура 25 °С) [22]

Как показано на рис. 1.6 (a), только 0,37 г/л было получено при интенсивности 24 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, что может быть связано с ограничением света. С увеличением интенсивности света до 60 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ клетки непрерывно росли и на стационарной стадии собирали 0,75 г/л *C. vulgaris*. Однако при дальнейшем увеличении интенсивности света до 120 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ концентрация клеток несколько увеличилась на начальной стадии культивирования, после чего была достигнута гораздо более низкая равновесная концентрация биомассы 0,63 г/л по сравнению с таковой

при 60 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ [22]. Уменьшение концентрации биомассы при 120 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ может быть связано с фотоингибированием.

Влияние интенсивности света на содержание Chl а соответствовало содержанию биомассы. Как показано на рис. 1.6 (b), максимальное содержание Chl а увеличивается с интенсивностью света порядка 24, 120 и 60 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Свет может приводить к изменениям рН, Mg^{2+} и NADPH в строме, что будет модулировать активность ключевых ферментов в процессе синтеза жирных кислот. Влияние интенсивности света на производство липидов было найдено в соответствии с влиянием на производство биомассы. Интенсивность света в 60 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ может способствовать положительным изменениям рН, Mg^{2+} и NADPH, а затем косвенно усиливать активность ключевых ферментов, в то время, как ограничение света, так и ослабление света могут снизить активность фермента. Таким образом, для *S. vulgaris*, культивируемых под 60 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, было получено не только самое высокое содержание липидов в 20,0%, но и самая большая концентрация биомассы 0,75 г/л, тогда как клетки, культивируемые под 24 и 120 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, имели содержание липидов соответственно, 14,1% и 11,0%. Таким образом, максимальная продуктивность липидов $40 \text{ мг л}^{-1} \text{ д}^{-1}$ была получена при 60 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$, что было примерно в 2 раза больше, чем при 120 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ [22].

В природе режим света прерывистый, и интенсивность меняется ежедневно. Таким образом, изменения в количестве света приводят к различиям в биомассе и биохимическом составе, а микроводоросли проявляют различную адаптацию к различным условиям.

1.3 Влияние различных длин волн света на рост микроводоросли *Chlorella Vulgaris*

Микроводоросли фотосинтезируют, то есть они ассимилируют неорганический углерод для превращения в органическое вещество. Свет

является источником энергии, которая стимулирует эту реакцию, и в этом отношении необходимо учитывать интенсивность и спектральное качество. Как правило, микроводоросли используют свет с длиной волны от 400 до 700 нм для фотосинтеза. Длины волн, поглощаемые микроводорослями, различаются в зависимости от вида. Например, зеленые микроводоросли поглощают световую энергию для фотосинтеза с помощью хлорофиллов в качестве основной поглощающей пигмент энергии света в диапазоне 450-475 нм и 630-675 нм и каротиноидов в качестве вспомогательного пигмента, поглощающего световую энергию 400-550 нм [36]. В нескольких исследованиях сообщалось о росте микроводорослей в разных длинах волн света. Красный (600-700 нм) и синий свет (400-500 нм) стимулируют рост микроводорослей, а темпы роста и содержание липидов в микроводорослях отличаются интенсивностью света [36, 38, 4].

В работе [36] показано, что длины волны света оказывают заметное влияние на темпы роста водорослей. Красный и зеленый свет не показывали положительной тенденции в темпах роста по сравнению с белыми и синими световыми волнами (рис. 1.7). В работе [36] для облучения использовались компактные люминесцентные лампы мощностью 60 Вт ($276 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$). Они были размещены на расстоянии 20 см от фотобиореакторов, чтобы исключить температурный эффект, который может быть вызван облучением.

В рисунке 1.7 показано, что белые, синие и красные света показали самые высокие темпы роста на 3-й день, и они выглядят следующим образом: $0,369 \text{ д}^{-1}$, $0,235 \text{ д}^{-1}$ и $0,140 \text{ д}^{-1}$ соответственно (рис. 1.7). У зеленого света был самый высокий темп роста на 2-й день, который составлял $0,137 \text{ д}^{-1}$. Сообщалось, что зеленый свет наиболее эффективен в производстве клеточных углеводов (т. е. CH_2O), полученных из CO_2 . Кроме того, зеленый фотон имеет на 20% больше энергии, чем один красный фотон (т. е. 680 нм) и на 15,5% меньше энергии, чем синий фотон (т. е. 470 нм). Следовательно, более высокая экспозиция зеленого света может иметь некоторый тормозной эффект из-за более высокой подаваемой энергии. Хотя можно видеть, что синий свет имеет

больше энергии, чем зеленый фотон, сообщалось, что синий фотон поддерживает рост водорослей. Производительность объемной биомассы показана на рис. 1.7 С. Самая высокая объемная производительность биомассы составляла 0,038 г/л-д, 0,0199 г/л-д и 0,0096 г/л-д для белых, синих и красных светов, соответственно, на 3-й день, но для зеленого света это было 0,0088 г/л-д на 2-й день [36].

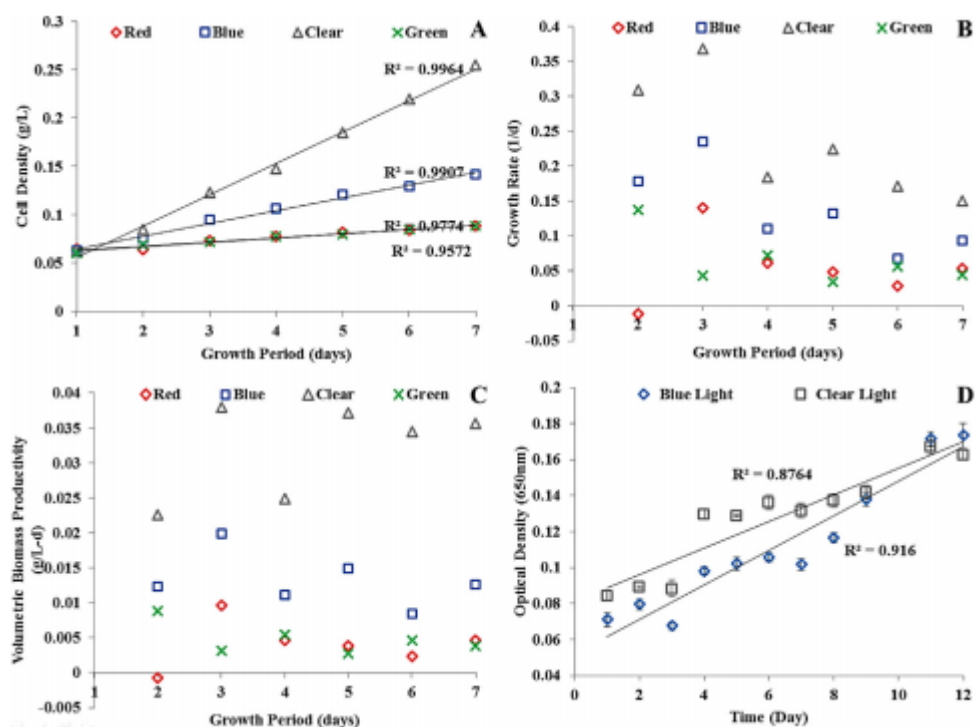


Рисунок 1.7 – Влияние длины волны света на: (А) плотность ячейки; (В) темпы роста; (С) производительность объемной биомассы; и (D) оптическая плотность в течение 12-дневного периода [36]

Оказалось, что семидневные результаты не представляют собой полный цикл роста водорослей, за исключением красного и зеленого света, которые последовательно демонстрируют более низкие темпы роста, продлевающие периоды роста, которые не идеальны для практического применения. Еще один набор экспериментов проводился с использованием синих и прозрачных светов в течение 12 дней. Результаты показаны на рисунке 1.7 D. Кривые роста были несколько схожи (линейный рост) с тенденцией, наблюдаемой в семидневных

профилях роста (рис. 1.7 А). Можно видеть, что темпы роста водорослей были сопоставимы между синими и белыми длинами волн в течение периода роста 0-10 дней. Но можно заметить, что темпы роста водорослей для синего света превысили скорость роста водорослей для белого света (через 10 дней). Это показывает, что скорость роста водорослей (*C. vulgaris*) может усиливаться под синим светом после периода акклиматизации [36].

В [36] работе красный свет не показал более высоких темпов роста. Это можно объяснить наблюдениями предыдущих исследователей, которые сообщили, что чистый красный свет может фактически вызвать повреждение клеток, которое может быть вызвано медленным и низким воздействием синего света [37, 4]. Кроме того, следует отметить, что удельная способность поглощения оптической длины волны зависит от типа водорослей, что означает его клеточный состав, среду роста и физиологические условия, как объяснялось ранее. *Yan et al.* сообщили, что чистый (белый) и красный свет показал более высокие темпы роста *C. vulgaris*, однако их исследование проводилось между 6 и 10 днями, а их среда для выращивания была синтетическими высокопрочными сточными водами [38]. Кроме того, характеристики роста зависят от интенсивности света [29].

Из рисунка 1.7 D видно, что темпы роста при синем свете ($R^2 = 0,916$), по-видимому, более близки к линейному тренду, чем белый свет ($R^2 = 0,8764$) или даже указывают на тенденцию к экспоненциальной фазе роста. Хотя экспоненциальная фаза роста желательна по практическим соображениям, синий свет требует значительного запаздывания для достижения экспоненциального роста. Таким образом, медленный темп роста при синем свете не идеален для практического применения, поскольку чем быстрее будет достигнута экспоненциальная фаза, тем выше будет производство биомассы, тем короче будут объемы пруда или фотобиореактора для производства водорослей, и чем короче будет время сбора урожая [36].

В другом исследовании *Баргбани и др.* [39] было получено более высокое производство биомассы при использовании синих и желтых светов.

Результаты из [36] исследования согласуются с их исследованием. [39] работе непрерывный свет излучался из люминесцентных ламп разных цветов с мощностью 23 Вт (рис. 1.8).

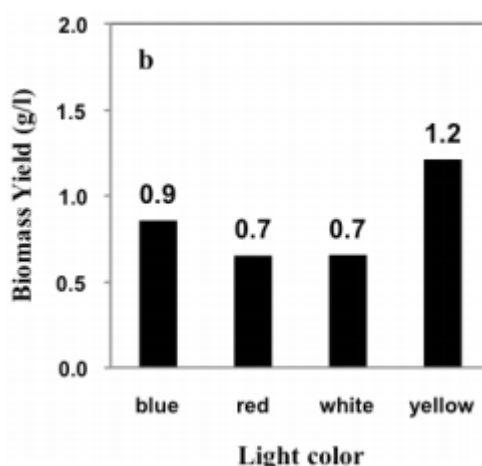


Рисунок 1.8 – Влияние разных цветов на выход экстрагированной биомассы (на сухой основе) в течение семи дней культивирования в разных условиях этого исследования согласно экспериментальному проекту Тагучи [39]

В этом исследовании были применены четыре разных цвета (белый, желтый, синий и красный) (рис. 1.8). *S. vulgaris* показал наилучшую скорость роста под желтым светом (с низкой энергией) (высокий выход фотосинтеза). Другие цвета (синий, белый и красный) привели к несколько меньшему производству биомассы.

В [34] работе использовали светло-темный фотопериод 16-8 ч и интенсивность света $100 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Были применены шесть разных цветов светоизлучающих диодов (LED), обеспечивающих узкополосный свет с разными длинами волн: синий (460 нм), зеленый (525 нм), желтый (585 нм), красный (620 нм), фиолетовый (восемь части 660 нм и одна часть 460 нм) и белые (430-730 нм). Чтобы избежать смешивания с другими источниками длины волны, обработка светодиодов была отделена пластиковым цветным черным снаружи и белым на внутренней стороне для максимального отражения. Температуру в камере устанавливали равной $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Эксперимент проводили в виде периодических культур с объемом 50 мл Z8 в 250 мл

стеклянных колбах Эрленмейера. Начальная плотность составляла 10^4 клеток на мл^{-1} , и эксперимент заканчивался через 7 дней. В эксперименте самый лучший результат показал белый и синий свет. Анализ световой микроскопии клеток в среде показал, что клетки, выращенные в синем, фиолетовом или белом свете, чаще всего объединяются в большие группы, тогда как клетки, выращенные в красном, желтом и зеленом свете, в основном присутствуют в уединенном состоянии (рис. 1.9). Эта разница между обработками была очевидна уже через 4 дня роста водорослей.

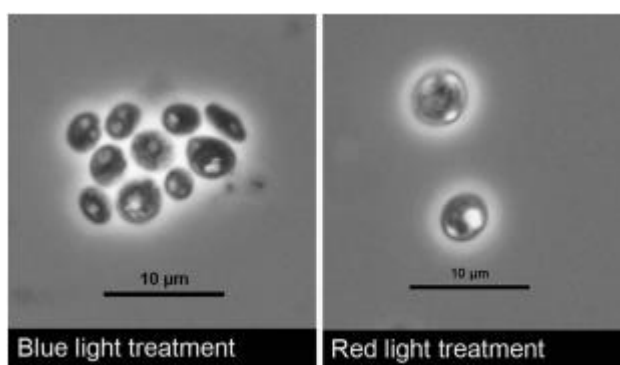


Рисунок 1.9 – Клетки *Chlorella vulgaris* после 7 дней роста водорослей при облучении синим и красным светом. Клетки, выращенные в синем (и пурпуровом или белом) свете, были более высоко агрегированы в большие группы, тогда как клетки, выращенные в красном (или желтом и зеленом) свете, в основном присутствовали в одиночном состоянии [34]

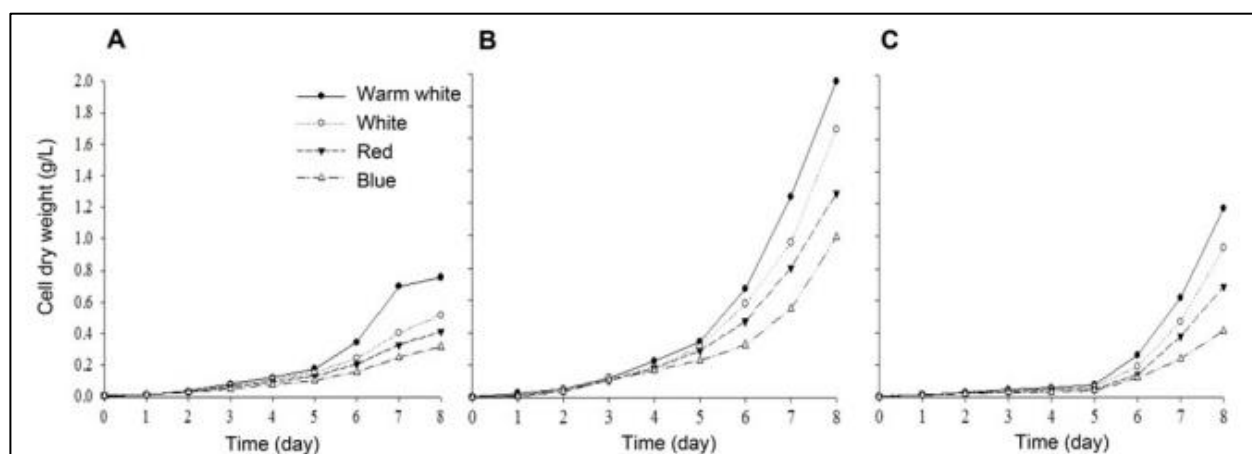


Рисунок 1.10 – Рост клеток *Chlorella vulgaris*, культивируемых при различных длинах волн и интенсивности света: (A) 50, (B) 80 и (C) 110 $\mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$ [4]

Рост микроводорослей при разных длинах волн (красный, синий, естественный белый и теплый белый) с различными интенсивностями света (50, 80 и 110 мкмоль м⁻² с⁻¹) для инкубационного периода 8 дней показан на рисунке 1.10 [4].

Теплый белый свет с 80 мкмоль м⁻² с⁻¹ интенсивность света была оптимальным светом для роста микроводорослей. Эксперименты, демонстрирующие рост микроводорослей при интенсивности света 50 и 110 мкмоль м⁻² с⁻¹ (рис. 1.10 А и 1.10 С соответственно), были ниже по сравнению с интенсивностью света 80 мкмоль м⁻² с⁻¹. Интенсивность света 50 мкмоль м⁻² с⁻¹ была низкой для поддержки роста микроводорослей, но интенсивность света 110 мкмоль м⁻² с⁻¹ была высокой, чтобы сделать фотоингибирование. Следовательно, интенсивность света 80 мкмоль м⁻² с⁻¹ была пригодна для культивации *Chlorella vulgaris* [4].

Свет необходим для микроводорослого фотосинтеза. Однако чрезмерный или недостаточный падающий свет ограничивает оптимальную производительность с точки зрения выхода биомассы или метаболита. Фотосинтез и соответствующее производство биомассы действительно зависят от фотонного потока. Когда интенсивность света недостаточна, микроводоросли потребляют углеводы во время фотодыхания; хотя они вряд ли причинят смертельный ущерб. Чрезмерная интенсивность света делает перегрузку фотосистем, отбеливает пигменты и, наконец, ломается в фотосистеме II. Адекватное освещение является важным фактором роста микроводорослей.

Цвет падающего света идеально должен соответствовать полосе поглощения пигмента, которая соответствует наименьшему возбужденному состоянию. В случае хлорофилла полосы поглощения присутствуют как в синих, так и в красных спектральных областях [40]. Поэтому рост *C. vulgaris* при теплом белом свете был выше по сравнению с красным и синим светом индивидуально. *C. vulgaris* - это штамм зеленых водорослей, которые состоят из

хлорофиллового пигмента. Теплый белый свет (сочетание всех длин волн видимого света), обеспечивающий как красную, так и синюю длины волны, более уместен для роста *S. vulgaris*. Спектр красных эмиссий идеально согласуется с фотоном, необходимым для достижения первых возбужденных состояний «а» и «б» хлорофиллов, пигментов, присутствующих в комплексах световых сборных антенн (КССА) зеленых водорослей. Синий свет (из которых фотоны содержат на 40% больше энергии, чем те, которые составляют красный свет) также могут поглощаться хлорофиллом. С этими фотонами электроны поднимаются к второму возбужденному состоянию хлорофилла. Избыточная энергия, присутствующая в синих фотонах, теряется в виде тепла. Синий свет на первый взгляд, кажется, не очень хорошо подходит для фотосинтеза и по этой причине можно считать излишним. Таким образом, хлорофилл в *S. vulgaris* мог эффективно поглощать красную, а не синюю длину волны света. Но низкие интенсивности синего света могут играть существенную роль в регуляции роста клеток и метаболизма [40]. Однако как естественный белый свет, так и теплый белый свет состоят из видимых световых длин волн (состоящих из красных и синих длин волн), они имеют разные относительные кривые потока фотонов. Светящаяся интенсивность теплого белого света ниже по сравнению с естественным белым светом на синей длине волны. Поэтому теплый белый свет показал лучшие результаты, чем естественный белый свет.

В работе [41], непрерывную облучению подавали при средней интенсивности света $100 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ под монохроматическим синим ($\lambda_{max} = 430\text{-}465 \text{ нм}$) и красным ($\lambda_{max} = 630\text{-}665 \text{ нм}$) светом. Результаты показали, что конкретная длина волны может действительно влиять на рост микроводоросли (рис.1.11 а).

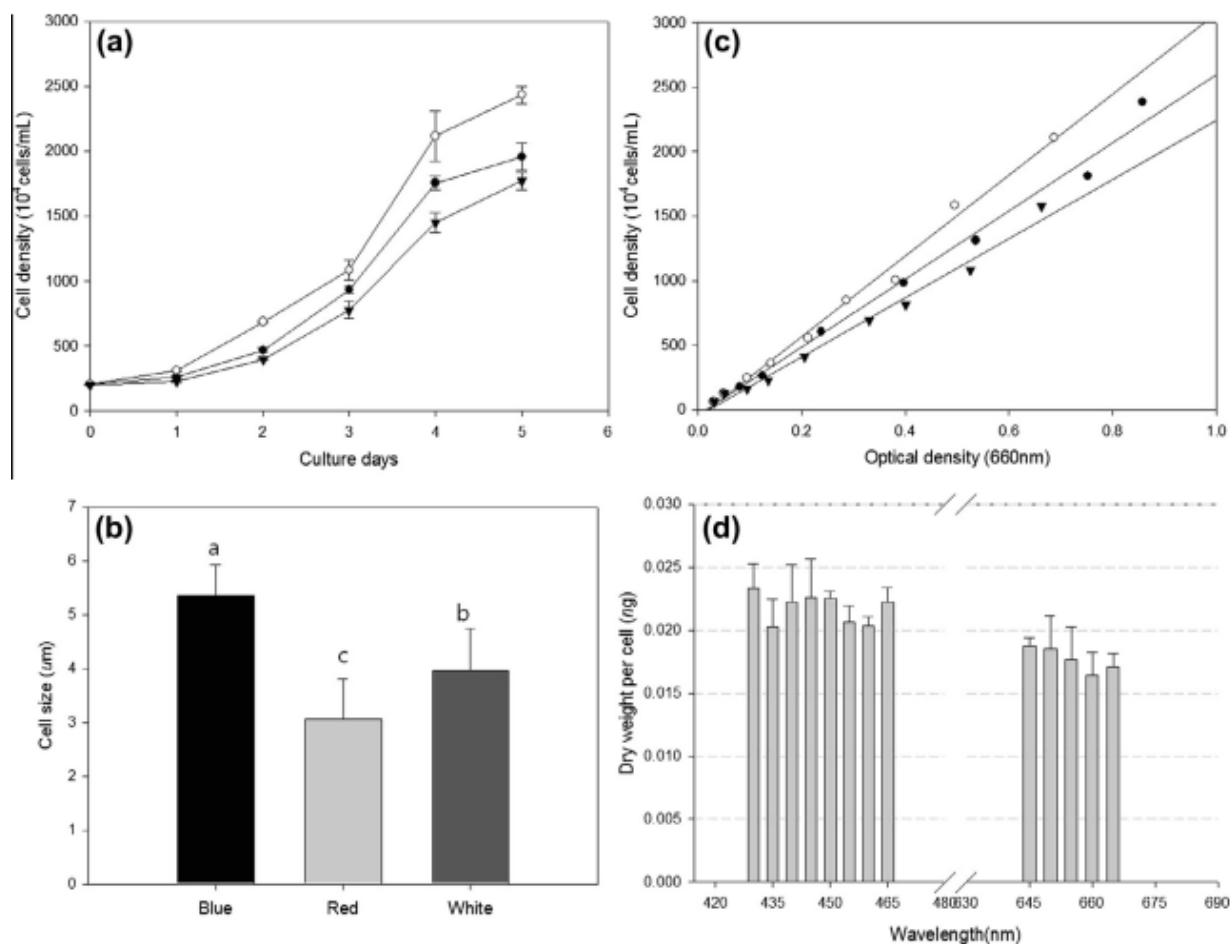


Рисунок 1.11 – Эффекты трех различных длин волн светодиода, включая красный (-○-), белый (-●-) и синий (-▼-) на *C. vulgaris*. (a) плотность клеток; (b) размер клетки; (c) корреляция между числом клеток и OD (оптическая плотность). Различные буквы над линией обозначают значительную разницу ($P < 0,05$); (d) сухой вес на клетки, культивируемые под другой длиной волны. Были отобраны восемь синих (слева) и пять красных длин волн (справа) [41]

Число клеток сильно зависело от длины волны света, так как *C. vulgaris* произвела наивысшее и низкое число клеток под красным и синим светом, соответственно. Плотность клеток *C. vulgaris*, выращенных при красном свете, была в 1,5 раза выше, чем у синего света в определенный промежуток времени после инокуляции (рис. 1.11 а). Эти результаты согласуются с другими видами микроводорослей в том, что красная длина волны оказалась оптимальной как для *Spirulina platensis*, так и для *Chlorella pyrenoidosa* [42]. [40] работе сообщили, что красный свет приводит к усилению пигментации хлорофилла,

что может объяснить результаты положительного эффекта красного света. Так как красный свет оказал такое же влияние на рост микроводоросли как у *S. rupeoidosa*, так и у *S. platensis* [42], ответы на световую длину волны могли бы быть эволюционными, сохраняющимися между различными видами микроводорослей. С другой стороны, белый свет приводил к средней степени числа клеток, тогда как синий свет последовательно уменьшал уровень числа клеток. Одна из возможных предположений заключается в том, что синий свет может подавлять деление микроводорослевых клеток, что приводит к более низкому уровню числа клеток.

Интересно, что морфология микроводорослевых клеток, например, размер клетки *S. vulgaris* был значительно изменен в ответ на разную длину волны света. Размер клеток *S. vulgaris*, культивируемых под синим светом, был последовательно больше, чем культивируемые под красным светом. Однако средний размер клеток наблюдался под белым светом (рис. 1.11 b). Измерение размера ячейки *S. vulgaris* показало, что микроводорослевые клетки, выращенные под синим светом, имеют приблизительно 60-70% увеличение диаметра по сравнению с таковыми при красном свете (рис. 1.11 b).

Чтобы дополнительно проверить эти наблюдения, были проведены два независимых анализа. Первый метод основан на корреляции между оптической плотностью и числом клеток. Графики корреляции между оптическими плотностями (OD) и числом клеток были построены для проверки любого изменения корреляции между синим и красным светом. В соответствии с наблюдением за увеличением размеров ячеек под синим светом корреляционная кривая была значительно изменена синим светом (рис. 1.11 c). Значения более высоких OD последовательно достигались при определенном числе клеток под синей длиной волны по сравнению с теми, которые были при красной длине волны (рис. 1.11 c). Разница в корреляциях между синим и красным светом четко отражает тот факт, что наблюдались значительные изменения в морфологическом признаке (различия в размере клеток) путем изменения длины волны света.

Кроме того, был также рассчитан относительный сухой вес (г / клетка) с учетом количества клеток. Чтобы полностью сравнить эффект синего или красного света, восемь (430, 435, 440, 445, 450, 455, 460 и 465 нм) и пять (645, 650, 655, 660 и 665 нм) разных длин волн светодиодов были выбраны из синего и красного света, соответственно. Ожидается, что сухой вес на клетки можно поместить в две категории: синий или красный. Опять же, очевидно, что сухой вес на ячейку *S. vulgaris* был изменен облучением различной длины волны света (рис. 1.11 d). Приблизительно 30% прироста сухого веса на ячейку *S. vulgaris* наблюдалось путем изменения длины волны от красного до синего (рис. 1.11 d). Ли и Палссон [43] продемонстрировали, что красный свет приводил к меньшим клеткам, чем к свету полного спектра из-за раннего выделения автоспоров при красном свете. Несмотря на то, что все эти предыдущие исследования не предназначались для систематического сравнения синего и красного света, они частично предоставили доказательства того, что деление клеток может быть ускорено или отложено при красном и синем свете. Вероятно, что дифференциальная скорость делений клеток или прогрессирование клеточного цикла под синим или красным светом может быть основным механизмом наблюдения за разным размером ячейки при красном или синем свете. В соответствии с этими результатами данные в этом исследовании ясно указывают на то, что морфология *S. vulgaris* размера клеток значительно трансформировалась в более крупные клетки при воздействии синего света по сравнению с тем, что были под красным светом.

Поскольку, теоретически, синий свет имеет особенность высокой энергетической длины волны, разумно предположить, что клетки *S. vulgaris* могут накапливать более высокую степень стресса под синим светом. Для дальнейшего понимания механизмов чувствительного стресса в микроводорослевых клетках при определенной длине волны света, особенно синего света, мы исследовали степень клеточного стресса путем измерения активных форм кислорода (АФК).

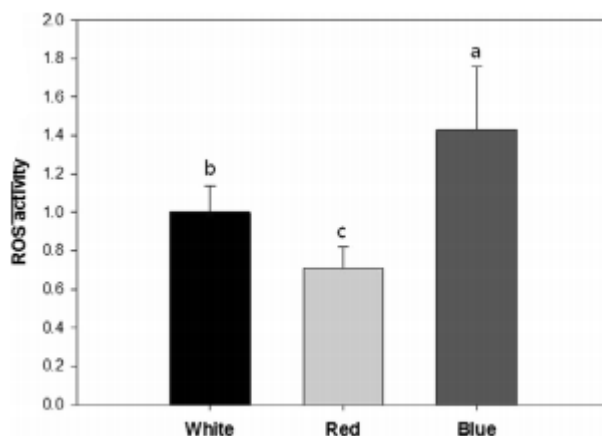


Рисунок 1.12 – Активность АФК *C. vulgaris*, выращенного под красным, синим или белым светом. Различные буквы над линией обозначают значительную разницу ($P < 0,05$) [41]

Как правило, АФК являются типичными молекулярными медиаторами различных стрессов в клетке широкого круга живых видов. Для обнаружения и количественного определения генерации АФК в клетках *C. vulgaris* при различной длине волны света использовался стандартный протокол окрашивания нитроцементного тетразолия. Активность реакционноспособного кислорода *C. vulgaris*, культивируемого под тремя разными длинами волны света (красный, синий и белый), была тщательно сравнена с тремя биологическими повторениями (рис. 1.12). Количественная оценка показала, что культивирование под синими светом ячейками значительно показало ($P < 0,05$) более высокую степень АФК, чем при белом или красном свете (рис. 1.12). Анализ на уровне АФК показал, что клетки, выращенные под синим светом, имели приблизительно 40% увеличение АФК, тогда как клетки, выращенные под красным светом, показали снижение уровня АФК на 30% (рис. 1.12). Эти данные ясно показали, что синяя длина волны привела к повышению уровня клеточной АФК, тогда как красный свет уменьшал уровень АФК в *C. Vulgaris* [41].

Ранее сообщалось, что более короткие длины волн, такие как синий и зеленый свет, обеспечивают большую энергию для фотосинтеза, тем самым вызывая фотоингибирование [44]. С другой стороны, красный свет имеет

противоположную особенность более длинной длины волны, возможно, уменьшая эффект фотоингибирования [40]. Однако не было прямых или косвенных доказательств, свидетельствующих об участии АФК в этих микроводорослевых фенотипах при разных длинах волн света. В этом исследовании мы вначале продемонстрировали, что механизм (ы) стресса, связанный с АФК, может помочь объяснить фотоингибирование микроводорослей на синем свете. Кроме того, уровень АФК был хорошо коррелирован с размерами ячейки *C. vulgaris* при экспозиции красного и синего света (рис. 1.11 d и 1.12). Следовательно, можно предположить, что увеличение генерации АФК через синее свечение может быть связано с увеличением морфологии размеров клеток в *C. vulgaris*. Результаты показывают, что синий свет вызывает окислительный стресс в клетках *C. vulgaris*, что приводит к тому, что клеточное превращение в более крупные клетки справляется с неблагоприятным состоянием высокой энергетической облучении от синего света [41].

Примечательно, что клеточная морфология размеров была значительно изменена в зависимости от длины волны света. Красный свет увеличил деление клетки, приводя к появлению небольших клеток, тогда как синий свет приводит к увеличению размера клеток. Если предположить, что разные размеры клеток могут отражать различные клеточные потенциалы, содержащие различную степень питательных веществ или белков для следующих клеточных делений. Исходя из этого, можно предположить, что генерация микроводорослевых клеток с более крупными размерами на начальном этапе культивирования может способствовать последующему делению клеток на более поздней стадии роста, что приведет к повышению продуктивности биомассы [41]. Чтобы проверить гипотезу, [41] работе приняли адекватную манипуляцию облучением длины волны LED как способ генерировать разный размер микроводорослевых клеток в разные моменты времени роста. Эксперименты проводились с помощью сдвига длины волны света в разные моменты времени. Набор экспериментов состоял из пяти различных световых

облучении: непрерывного синего или красного света; сначала синим светом, а затем смещенным в красный свет или наоборот. Световая длина волны была сдвинута либо синим, либо красным после 24, 48, 72 и 96 часов культивирования. Экспериментальные результаты, полученные с помощью сдвигов по длине волны, обозначались как форма R1B4 (1-дневный красный свет, а затем 4-дневная синяя световая подсветка) или B1R4 (1-дневный синий свет, а затем 4-дневная красная подсветка) и так далее.

Впервые было исследовано содержание хлорофилла в качестве индикатора клеточной физиологии. Изменение содержания хлорофилла в клетках *C. vulgaris* на разных длинах волн красного или синего света или при сдвиге длины волны было показано на рисунке 1.13. Примечательно, что содержание хлорофилла *C. vulgaris* сильно зависело от длины волны света. Например, синие и красные света приводили к высокому и низкому содержанию хлорофилла, соответственно. Эти данные согласуются с нашим предыдущим наблюдением по разным размерам ячеек на красном или синем свете, поскольку синий свет приводит к увеличению размера клеток, возможно, содержащим более высокие клеточные компоненты, включая хлорофилл. Интересно отметить, что культивирование микроводорослей, перенесенных с синего на красный свет, привело к немедленному снижению содержания хлорофилла (рис. 1.13). После переноса на красный свет более высокое содержание хлорофилла в синем свете стало почти на том же уровне, что и при красном свете (рис. 1.13). Снижение хлорофилла произошло в течение 24 часов после переноса с синего на красный. Эти данные снова предположили, что микроводорослевые клетки с уникальной физиологией могут быть получены путем манипуляции с различной длиной волны света [41].

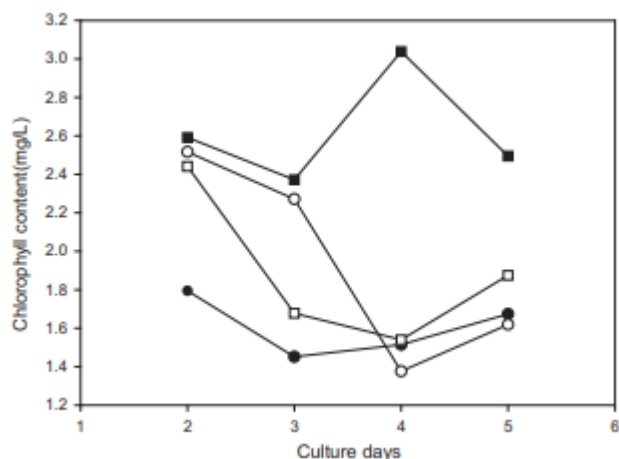


Рисунок 1.13 – Изменения содержания хлорофилла при различных условиях облучения. Содержание хлорофилла под непрерывным красным (●) или синим светом (■) по сравнению с содержанием сдвига длины волны (от синего до красного) в разные моменты времени (2 дня (□) или 3 дня после инокуляции (○)) [41]

Затем были тщательно сопоставлены показатели биомассы между непрерывным синим или красным светом и сдвигами по длине волны. Под непрерывным красным светом производительность *C. vulgaris* была аналогична производительности при белом свете, тогда как синий свет приводил к снижению производства (рис. 1.14). Результаты показали, что простое синее свечение не способствовало росту *C. vulgaris*. Однако, как и ожидалось, соответствующее переключение длины волны может привести к увеличению производства биомассы по сравнению с непрерывным моноцветным красным или синим светом (Рис. 1.14). В частности, синий свет сначала, а затем переключается на красный свет (B2R3 и B3R2), показал лучшую производительность по сравнению с другими. Наблюдалось приблизительно на 18-20% как в B2R3, так и в B3R2 [41].

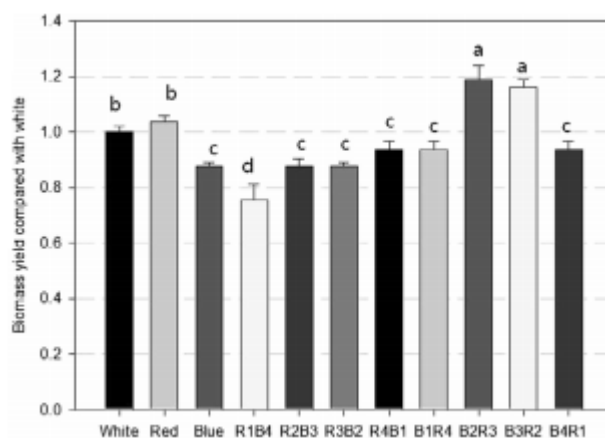


Рисунок 1.14 – Продуктивность биомассы, полученная из непрерывного одноцветного облучения или сдвига длины волны. Экспериментальные результаты, полученные с помощью сдвигов по длине волны, обозначались формой R1B4 (1-дневный красный свет, а затем 4-дневная синяя световая подсветка) или B1R4 (1-дневный синий свет, а затем 4-дневная красная подсветка) и т. д. Различные буквы над линией обозначают значительную разницу ($P < 0,05$) [41]

Напротив, сначала развертывание красного цвета, а затем переход к синему свету (R1B4, R2B3, R3B2, R4B1) показал снижение микроводорослевого роста. Возможным объяснением этих наблюдений является то, что клетки *C. vulgaris* благоприятствуют красному свету для клеточного деления, генерирующего мелкие клетки. Эти ячейки небольшого размера должны обладать меньшей способностью или потенциалом для увеличения объема ячейки даже при следующем синем облучении. Напротив, начальное облучение синего света индуцирует клетки большего размера с высокими потенциалами для последующего деления под красным светом, тем самым улучшая общее производство. Альтернативно, световая длина волны синего или красного оказывает влияние на клеточный цикл *C. vulgaris* и, таким образом, приводит к дифференциальной скорости прогрессирования клеточного цикла. Например, у *C. reinhardtii* клетки, культивируемые под синим светом, имеют больший размер клеток из-за влияния синего света на

клеточный цикл, тем самым имея высокие потенциалы для последующего клеточного деления [45]. В связи с этим, манипулируя длиной волны света от синего до красного, можно было изменить прогрессирование клеточного цикла *S. vulgaris*, что, в свою очередь, привело к увеличению производительности биомассы. Взятые вместе, иллюстрация возможного объяснения результатов была представлена на рисунке 1.15.

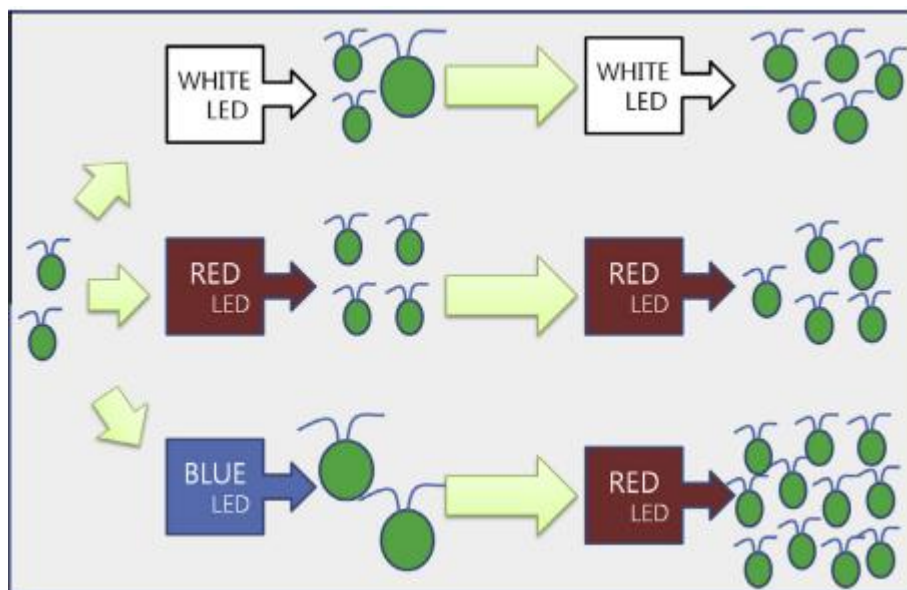


Рисунок 1.15 – Положительная модель, объясняющая различные морфологические прогрессии *S. vulgaris* при различной длине волны света. Синий свет может увеличить размеры ячеек, в то время как красный свет усиливает клеточные деления. Следовательно, мы предложили новую стратегию культивирования микроводорослей на основе изменения длины волны света (от синего до красного). Таким образом, микроводорослевые клетки с большим размером могут генерироваться на начальном этапе культивирования. Большие микроводорослевые клетки должны обладать огромным потенциалом для деления клеток. Таким образом, при облучении красным светом затем способствует последующему делению клеток на более поздней стадии роста, что приводит к повышению продуктивности биомассы, а также к производству липидов [41]

Единственное исключение для этого понятия найдено в B1R4 и B4R1. Мы предположили, что должно быть оптимальное время для переключения длины волны (от синего до красного), поскольку оно неэффективно, если оно применяется в слишком ранние или слишком поздние моменты времени. С помощью адекватного облучения синим светом микроводорослевые клетки становятся больше и готовы к следующему взрыву клеточных делений. С другой стороны, красный свет должен ускорить деление клеток как экологический сигнал. Поэтому красный свет хорошо сочетался с поздней экспоненциальной фазой. Несколько линий исследований показали, что 0-48 ч и 48-120 ч после инокуляции можно в целом классифицировать как лаг и экспоненциальную фазу соответственно. Следовательно, основная причина нашего наблюдения о существовании оптимального времени (B2R3 и B3R2) для переключения длины волны может быть объяснена периодом для отставания или экспоненциальной фазы. Кроме того, было известно, что синий свет участвует в активации фермента, тем самым регулируя транскрипцию гена, выведение энергии и в конечном счете влияя на клеточный цикл [37, 45].

1.4 Кинетическое моделирование фотосинтетической активности зеленой микроводоросли *Chlorella Vulgaris*

По мере увеличения потенциала культивирования микроводорослевой массы кинетическое моделирование микроводорослевого фотосинтеза и роста стало иметь важное значение, поскольку точная модель является предпосылкой для разработки эффективного фотобиореактора, прогнозирования производительности процесса и оптимизации рабочих условий [46, 48, 51]. Свет является наиболее важным фактором, влияющим на кинетику фотосинтеза микроводорослей [48]. В целом, большинство систем культивирования микроводорослей ограничены светом. Свет не проникает глубоко в плотные микроводорослевые суспензии, потому что он поглощается и рассеивается микроводорослевыми клетками [47]. Поэтому свет пространственно

распределен вдоль светового пути внутри фотобиореакторов. Доступность света выражается либо как плотность потока фотонов ($\mu E \text{ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$), либо скорость поглощения фотона ($\mu E \text{ кг}^{-1} \text{ с}^{-1}$), который отличается от свойств обычных растворимых субстратов. Такие отличительные черты света затрудняют математическое описание зависимости микроводорослевой фотосинтетической активности от света [46].

Многие исследователи предложили различные типы математических моделей для фотосинтеза водорослей и кинетики роста [48-54]. Основные гипотезы моделей можно разделить на четыре типа, основанные на выражении световой зависимости микроводорослевого фотосинтеза. Предполагается, что в первом типе фотосинтез водорослей зависит от средней плотности потока фотонов (APFD), который может быть получен путем объемного усреднения пространственно распределенной плотности потока фотонов внутри фотобиореактора [53, 55-57]. Второй тип модели [48, 52, 54] использует усредненную по объему скорость поглощения фотона (средняя скорость поглощения фотонов, APAR). Третий тип [49-51, 58] основан на более сложной гипотезе о том, что каждая клетка водорослей реагирует на плотность потока фотонов, достигающую своего положения (плотность локального потока фотонов, LPFD). Однако нелегко измерить фотосинтетическую активность каждой клетки; кажущаяся активность (то есть скорость образования кислорода в целом водорослевой культуре) обычно контролируется и сравнивается с результатами модели. Наконец, четвертый тип [46] основан на дополнительной гипотезе о том, что фотосинтетическая активность клетки связана с скоростью поглощения фотона клеткой (локальная скорость поглощения фотона, LPAR).

1.4.1 Модель APFD

Рабе и Бенуа [57] предположили, что средняя плотность потока фотонов может быть коррелирована со специфической скоростью роста. Это означает, что средняя плотность потока фотонов может быть репрезентативным

значением пространственно распределенной плотности внутри фотобиореактора. Такой подход наиболее широко применяется в области биотехнологии водорослей [53, 55-56].

Средняя плотность потока фотонов может быть вычислена из распределения света. Как можно видеть на рис. 1.16 А, свет ослабляется за счет поглощения и рассеяния в зависимости от длины светового пути и концентрации клеток. Средняя плотность потока фотонов представляет собой усредненное по объему значение плотности потока, зависящей от положения. Поэтому площадь, заполненная вертикальными линиями, должна быть такой же, как заполненная горизонтальными линиями на графике плотности потока фотонов в зависимости от длины пути света (рис. 1.16 А).

Модель APFD может быть сформулирована математически следующим образом:

$$P_X(X, L) = \frac{P_m PFD_{ave}(X, L)}{K + PFD_{ave}(X, L)} - R_X \quad (1)$$

где P_X - фотосинтетическая активность, P_m - максимальная активность фотосинтеза, K - половина константы, а R_X - дыхательная активность. Индекс X представляет собой удельную активность (активность на единицу сухого веса клетки). Здесь средняя плотность потока фотонов (PFD_{ave}) может быть рассчитана с использованием уравнения (3) из модифицированной модели Бейера-Ламберта [(2)]:

$$PFD(X, l) = PFD_0 \exp\left(-\frac{aXl}{b+X}\right), \quad (2)$$

$$PFD_{ave}(X, L) = \frac{1}{L} \int_0^L PFD(X, l) dl = \frac{PFD_0(b+X)}{aXl} \left\{1 - \exp\left(-\frac{aXl}{b+X}\right)\right\}. \quad (3)$$

где PFD_0 - интенсивность падающего света, a и b - эмпирические константы, X - плотность клеток, l - длина светового пути в определенном положении, L - глубина фотобиореактора. В этой работе конфигурация фотобиореактора была спроектирована так, чтобы быть параллельной лучу света (рис. 1.17). Поэтому

интеграция для получения интенсивности света с уменьшенным облучением может быть проведена по однонаправленному пути. Поскольку предполагается, что микроводорослевая культура хорошо перемешивается и, таким образом, однородна по всему объему культуры, концентрация клеток можно считать постоянной во время интеграции.

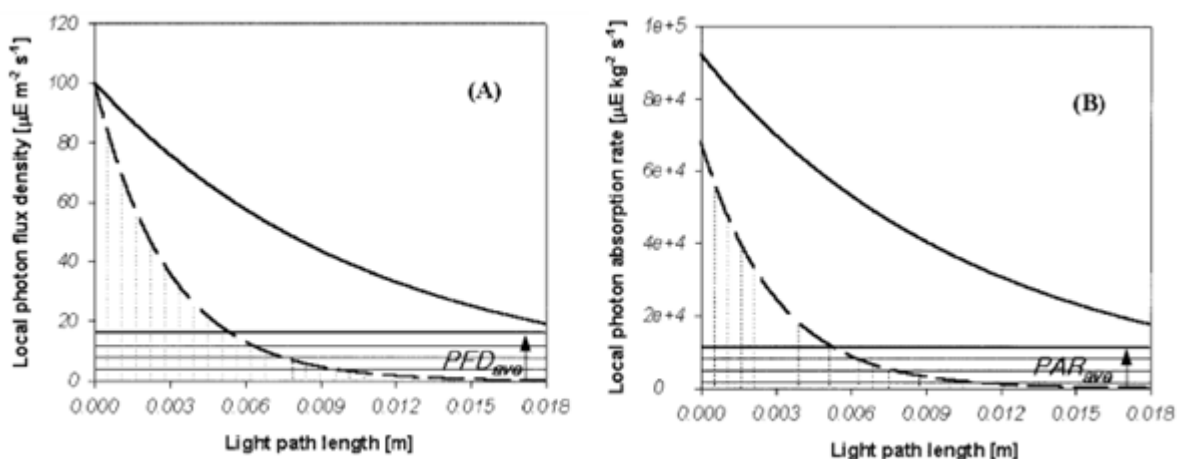
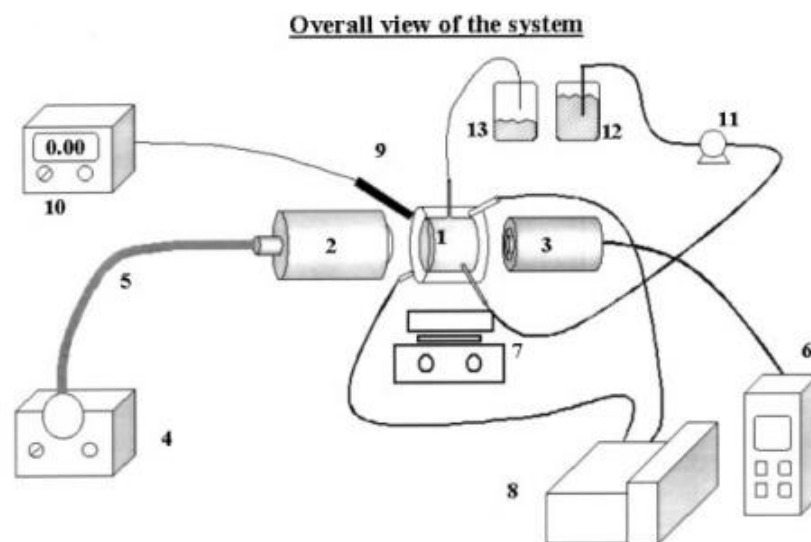
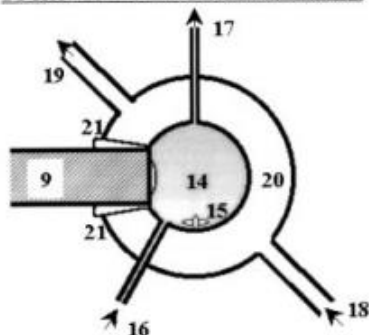


Рисунок 1.16 – Пространственные распределения плотности потока фотонов (А), рассчитанные по формуле (2) и скорости поглощения фотона (В), рассчитанной с использованием уравнения (8). Плотность клеток составляла $0,1 \text{ кг м}^{-3}$ (сплошная линия) и $0,5 \text{ кг м}^{-3}$ (пунктирная линия), а плотность потока падающего фотона фиксировалась при $100 \text{ μE м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Средняя интенсивность света и средняя скорость поглощения света рассчитываются с использованием уравнений (3) и (6) соответственно [46]



Front view of the reaction vessel



Side view of the reaction vessel

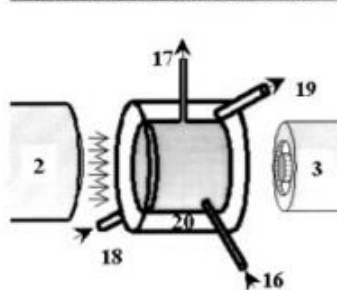


Рисунок 1.17 – Принципиальная схема системы измерения фотосинтетической активности и реакционного сосуда: 1, реакционная клетка; 2, выпуклая линза; 3, квантовый датчик; 4, кварцевый галогеновый осветитель; 5, оптическое волокно гусиного типа; 6, регистратор данных; 7, магнитная мешалка; 8, водяная баня; 9, растворенный кислородный электрод; 10, растворенный кислородный счетчик; 11, перистальтический насос; 12, резервуар для образцов; 13, резервуар для отходов; 14, микроводорослевая суспензия; 15, магнитный стержень; 16, вход образца; 17, выход образца; 18, вход охлаждающей воды; 19, выпуск охлаждающей воды; 20, охлаждающая водяная рубашка; и 21, перегородка [46]

1.4.2 Модель LPFD

В модели LPFD предполагается, что фотосинтетическая активность зависит от плотности локального потока фотонов. Поэтому фотосинтетическая активность также пространственно распределена внутри фотобиореактора. Другими словами, каждая клетка водорослей считается реагирующей на плотность локального потока фотонов, соответствующую ее положению. Некоторые исследователи использовали модель LPFD для описания световой зависимости фотосинтеза водорослей [49-51, 58].

Согласно гипотезе LPFD, локальная фотосинтетическая активность (P'_X) в положении (l) может быть выражена следующим образом:

$$P'_X(X, l) = \frac{P_m PFD(X, l)}{K + PFD(X, l)} - R_X = \frac{P_m PFD_0 \exp\left(-\frac{aXl}{b+X}\right)}{K + PFD_0 \exp\left(-\frac{aXl}{b+X}\right)} - R_X \quad (4)$$

где R_X - частота дыхания, которая, как предполагается, не зависит от плотности потока фотонов. Хотя локальную фотосинтетическую активность (P'_X) невозможно измерить, кажущуюся активность (как правило, с точки зрения скорости образования кислорода) общей культуры водорослей можно определить, измеряя изменение концентрации растворенного кислорода. Измеренная активность может рассматриваться как среднее по объему значение локальной активности. Поэтому для того, чтобы получить модельное уравнение, включающее измеримый термин активности (P_X), уравнение (4) интегрировался по всему объему фотобиореактора следующим образом:

$$P_X(X, L) = \frac{1}{L} \int_0^L P'_X(X, l) dl = \frac{P_m (b+X)}{aXl} \ln \frac{PFD_0 + K}{K + PFD_0 \exp\left(-\frac{aXl}{b+X}\right)} - R_X \quad (5)$$

1.4.3 Модель APAR

Несколько исследователей [48, 54] обнаружили линейную зависимость между средней скоростью поглощения фотона всей культурой водорослей и удельной скоростью роста, что указывает на использование средней скорости поглощения фотонов для кинетического анализа микроводорослевой активности. Однако [52] работе выявлено нелинейность в этой связи при высоких концентрациях клеток. Поэтому выражение типа Моно, предложенное Иеханой [52], было бы более адекватным подходом, способным охватить широкий диапазон концентрации клеток.

Как показано на рис. 1В, для расчета средней скорости поглощения фотона, локальная скорость поглощения фотона также должна быть интегрирована по всему объему. Однако вместо сложной процедуры интегрирования среднюю скорость поглощения фотонов (PAR_{ave}) можно легче вычислить из-за разницы между плотностями потока падающего и выходного фотонов с предположением, что световой пучок проникает прямо без радиальной дисперсии:

$$PAR_{ave}(X, L) = \frac{\{PFD_0 - PFD(X, L)\}}{XL} = \frac{PFD_0}{XL} \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{aXl}{b+X}\right) \right\} \quad (6)$$

Поэтому фотосинтетическая активность может быть выражена как функция средней скорости поглощения фотона:

$$P_X(X, L) = \frac{P_m PAR_{ave}(X, L)}{K + PAR_{ave}(X, L)} - R_X = \frac{P_m PFD_0 \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{aXl}{b+X}\right) \right\}}{KXL + PFD_0 \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{aXl}{b+X}\right) \right\}} - R_X \quad (7)$$

где единица K ($\mu E \text{ кг}^{-2} \text{ с}^{-1}$.) отличается от единицы K в уравнениях (1) и (5) ($\mu E \text{ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$).

1.4.4 Модель LPAR

Как видно из рисунка 1В, локальная скорость поглощения фотона также зависит от положения. Фотосинтетическая активность водорослевой клетки, вероятно, зависит от скорости поглощения фотона клеткой, которая обозначается как локальная скорость поглощения фотонов (LPAР), чтобы подчеркнуть свою зависимость от положения.

Локальная скорость поглощения фотона (PAR) может быть выражена с допущением недисперсного проникновения света следующим образом:

$$PAR(X, l) = \frac{1}{X} \left(-\frac{dPFD}{dl} \right) = \frac{aPFD_0}{b+X} \exp\left(-\frac{aXl}{b+X}\right) \quad (8)$$

Основываясь на гипотезе, зависимость от положения фотосинтетическую активность (P'_X) можно рассматривать как функцию локальной скорости поглощения фотона:

$$P'_X(X, l) = \frac{P_m PAR(X, l)}{K + PAR(X, l)} - R_X = \frac{P_m a PFD_0 \exp\left(-\frac{aXl}{b+X}\right)}{K(b+X) + a PFD_0 \exp\left(-\frac{aXl}{b+X}\right)} - R_X \quad (9)$$

Интегрируя уравнение (9) дает видимую фотосинтетическую активность, которая является экспериментально измеримым членом:

$$P_X(X, L) = \frac{1}{L} \int_0^L P'_X(X, l) dl = \frac{P_m (b+X)}{aXl} \ln \frac{a PFD_0 + K(b+X)}{K(b+X) + a PFD_0 \exp\left(-\frac{aXl}{b+X}\right)} - R_X \quad (10)$$

Можно отметить, что конечная модель [уравнения (1), (5), (7) и (10)] весьма различны в соответствии с гипотезами, принятыми в качестве отправной точки для вывода модели.

1.5 Турбидиметрический и нефелометрический анализ биомассы

Нефелометрия и турбидиметрия тесно связаны с аналитическими методами, основанными на рассеянии излучения раствором, содержащим диспергированные частицы. Когда излучение проходит через прозрачную среду, в которой диспергируются твердые частицы, часть излучения рассеивается во всех направлениях, что приводит к мутной форме смеси. Уменьшение падающего излучения в результате рассеяния на частицах является основой турбидиметрических методов. С другой стороны, нефелометрические методы основаны на измерении рассеянного излучения, обычно под прямым углом к падающему лучу. Выбор между нефелометрическим и турбидиметрическим измерением зависит от доли рассеянного света. Когда рассеяние велико, из-за присутствия многих частиц, турбидиметрия обычно дает более надежные результаты. Нефелометрия предпочтительна при низких концентрациях, потому что небольшая интенсивность рассеяния на черном фоне легче измерить, чем небольшое изменение интенсивности интенсивного передаваемого излучения. Важно отметить, что рассеяние, связанное как с нефелометрией, так и с турбидиметрией, не связано с потерей мощности излучения; затрагивается только направление распространения [61].

Интенсивность излучения, возникающего под любым углом, зависит от количества частиц, их размера и формы, а также от длины волны излучения.

Турбидиметрический анализ состоит из измерения уменьшения интенсивности падающего излучения, вызванного рассеянием, и аналогично поглощающему измерению, хотя причина снижения интенсивности различна.

Когда луч излучения интенсивности I_0 проходит через неабсорбирующую среду, рассеивающую свет, передаваемая интенсивность I определяется выражением:

$$I = I_0 e^{-\tau b} \quad (11)$$

где τ - мутность или коэффициент мутности, b - длина пути в мутной среде. Мутность τ часто оказывается линейно связанной с концентрацией C рассеивающих частиц. Как следствие, применяется отношение, аналогичное закону Бера. То есть,

$$S = -\log \frac{I}{I_0} = kbC \quad (12)$$

где

$$k = 2.303 \frac{\tau}{C}$$

Уравнение используется в турбидиметрическом анализе точно так же, как закон Бера используется в фотометрическом анализе. Связь между $\log \frac{I}{I_0}$ и C устанавливается со стандартными растворами, а растворитель используется в качестве ссылки для определения I_0 . Затем полученная калибровочная кривая используется для определения концентрации образцов [62].

Нефелометрия основана на измерении рассеянного излучения частицами образца под прямым углом к лучу. Детектор помещается вне пути падающего излучения от источника. В большинстве случаев детектор находится под углом 90 градусов относительно пути падающего излучения. Он измеряет интенсивность той части рассеянного излучения, которая излучается перпендикулярно от ячейки в направлении детектора. Для нефелометрических измерений уравнение описывает зависимость между интенсивностью рассеянного излучения, интенсивностью падающего излучения и концентрацией частиц, вызывающих рассеяние:

$$I = KI_0C \quad (13)$$

Величина K постоянна только для конкретного прибора и при тщательном контроле условий эксперимента. Интенсивность рассеянного излучения прямо пропорциональна как интенсивности падающего излучения, так и

концентрации анализируемого вещества. Для анализа разбавленных растворов выгодно использовать падающее излучение с высокой интенсивностью [63].

Обнаруженный рассеянный сигнал может возникать из частиц, представляющих интерес, но также из пыли, фонового рассеяния или из других молекул (например, белков и липидов) в образце. Отражение и рассеяние от оптических компонентов прибора также могут способствовать фоновому сигналу. Наилучшая производительность достигается в разбавленных растворах, где поглощение и отражение минимальны.

В этих условиях зависимость между концентрацией рассеянных частиц и интенсивностью рассеянного света почти линейна в очень широком диапазоне концентраций.

Нефелометрические и турбидиметрические методы имеют преимущества быть простыми, быстрыми и обладают высокой чувствительностью. Трудности возникают не из оптического измерения, которое просто, а от подготовки суспензии. Фактически доля излучения, рассеянного под любым углом в коллоидных системах, зависит от размера и формы частиц, ответственных за рассеяние. Поскольку большинство аналитических приложений связано с генерацией коллоидно-дисперсной фазы в растворе, те переменные, которые влияют на размер частиц во время осаждения, также влияют как на турбидиметрические, так и на нефелометрические измерения. Таким образом, такие факторы, которые могут влиять на результаты и которые должны контролироваться, включают концентрации реагентов, которые используются для приготовления суспензий, скорость и порядок смешивания, и время после того, как реагенты были смешаны, и время до измерения сделал. Значение рН, общая ионная сила и температура раствора являются другими переменными, которые имеют решающее значение и должны быть тщательно контролируемы. Для стабилизации суспензий и предотвращения осаждения частиц обычно добавляют защитный коллоид. Отсутствие и присутствие защитных коллоидов в суспензии также влияет на размер частиц. Таким образом, во время

калибровки и анализа необходимо проявлять осторожность, чтобы воспроизвести все условия, которые могут повлиять на размер частиц [61].

Длина волны, выбранная для измерений, также оказывает важное влияние на рассеяние. Экспериментально показано, что коэффициент мутности t изменяется с длиной волны в соответствии с уравнением:

$$\tau = s\lambda^{-t} \quad (14)$$

где s - постоянная для данной системы. Величина t зависит от размера частиц и имеет значение 4, когда рассеивающие частицы значительно меньше длины волны излучения; для частиц с размерами, подобными длине волны, t оказывается равным 2 [62]. Последняя ситуация обычно встречается при турбидиметрическом анализе.

Длина волны, выбранная для турбидиметрического или нефелометрического анализа, также зависит от присутствия других (мешающих) поглощающих или флуоресцирующих видов в растворе. В этом случае не следует выбирать длину волны, в которой абсорбция или флуоресценция веществами в растворе не происходит. Если рассеивающие частицы (те, которые находятся в интересах определения), также поглощают излучение, чувствительность к турбидиметрическим, но не нефелометрическим определениям может быть увеличена путем выбора длины волны, при которой происходит поглощение. В этом случае прибор измеряет сумму абсорбции и мутности, которая также должна быть пропорциональна концентрации.

2 Материалы и методы исследования

2.1 Фотобиореактор и экспериментальная установка

Эксперименты проводились в основном в фотобиореакторе (рис. 2.1), которые были оснащены светодиодами и имел рабочий объем 200 ± 5 л.

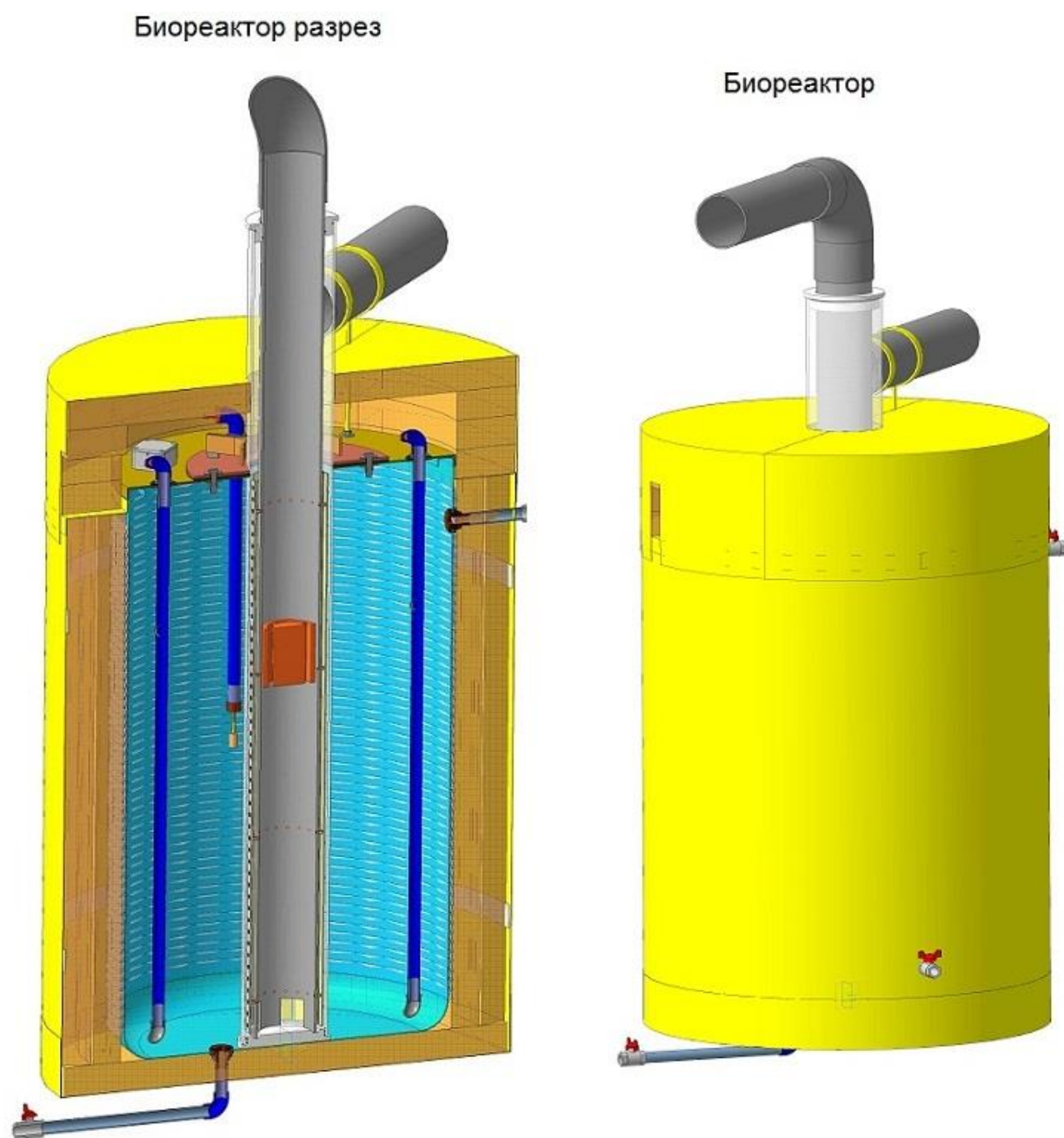


Рисунок 2.1 – Фотобиореактор

Лабораторная установка по проведению экспериментов по культивированию микроводорослей предназначена для выращивания одноклеточных водорослей хлорелла. Питательная среда Тамийя, температура поддерживается на уровне 34-36 °С, освещенность 20000 лк, осуществляется подача углекислого газа 2-10 % и перемешивание суспензии.

Установлен рН - метр, который управляет ростом микроводорослей. Отклонение значения рН от заданного вызывает подачу питательной среды.

Необходимую концентрацию углекислого газа в газовой смеси устанавливаются с помощью регулирования давления на выходе из баллона и компрессора.

Культивирование осуществляют в накопительном режиме в течение семи суток. Материал вносится в питательную среду в начале процесса и дальнейшее культивирование идет без отбора биомассы до выхода ее на стационарный уровень.

Технические характеристики:

- Мощность, кВт – 20
- Напряжение питающей сети, В - 380
- Частота питающей сети, Гц - 50

Установка представляет собой прямоугольный параллелепипед из оргстекла, наполненная водой (рис. 2.2). Емкость поделена на три отсека, в каждом из которых установлен источник излучения (ИИ), вкручиваемый в патрон. Это необходимо для того чтобы излучение из соседнего отсека было сведено к минимуму или полностью отсутствовало. Также все поверхности выполнены в белом цвете, который способствует равномерному облучению суспензии.

Так как исследования проводятся с термофильным штаммом хлореллы (*Chlorella vulgaris* Beijer), для которой температурная петля оптимальная для роста водоросли составляет 36,5-37,5 С°, используются нагревательный элемент, так называемый «греющий кабель». Термо-проводник располагается

на дне аквариума. Для поддержания постоянной температуры используется цифровой термостат, задача которого – коммутация нагревателя при отклонении от температурной петли. Контроль осуществляется при помощи датчика, который, как предполагается, будет погружен в один из мерных стаканчиков. Для создания одинаковой температуры во всех трех отсеках были высверлены отверстия в нижней части установки.

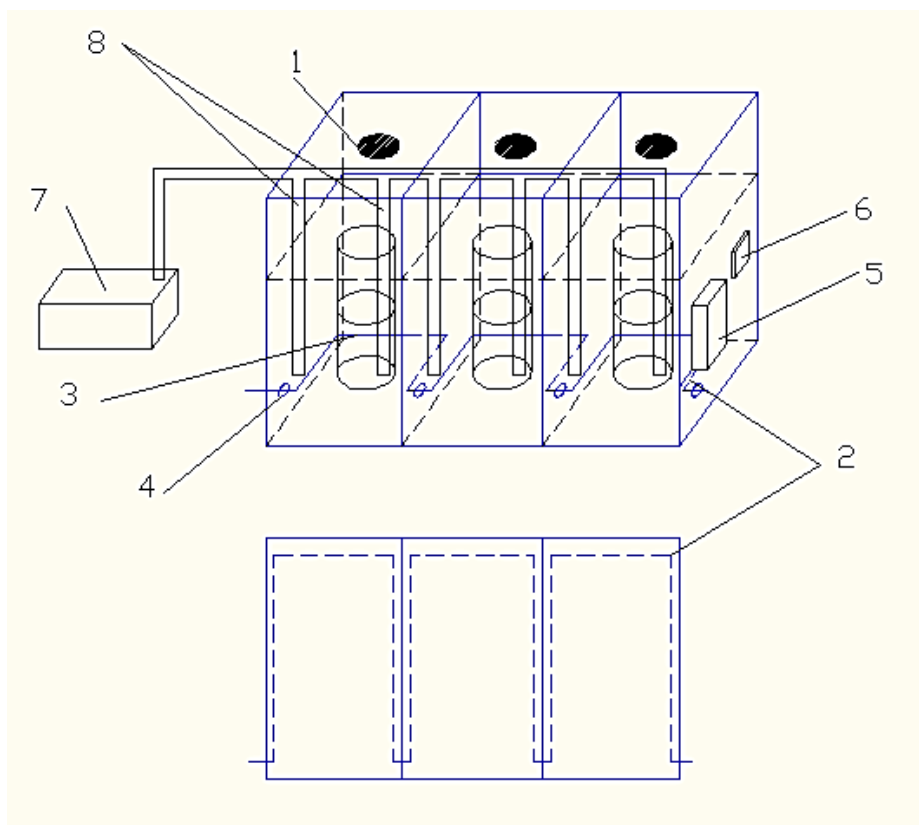


Рисунок 2.2 – Схема экспериментальной установки

- 1 – Отверстия под патроны источников излучения; 2 – Нагревательный элемент; 3 – Мерные стаканчики; 4 – Отверстия для нагревательного элемента;
 5 – Дифференциальный автоматический выключатель;
 6 – Термостат; 7 – Аэратор; 8 – Трубки аэратора.

В каждом отсеке на глубине не менее 10 см погружено по одному мерному стаканчику с суспензией, перемешивание и обогащение кислородом обеспечивается по средствам аэрации. Помимо этого, одна из трубок аэратора погружается в отсек для равномерного распределения тепла от нагревательного элемента.

Для обеспечения безопасной работы, установка защищается дифференциальным автоматическим выключателем.

Была собрана аквариумная установка для проверки эффекта различных длин волн света на рост Хлореллы (рис. 2.3). Аквариум был расположен внутри фитотрона, чтобы осуществить облучение необходимым интенсивностью и спектральным составом света. На внутренней стенке аквариума был закреплен нагреватель, для поддержки оптимальной температуры. Для аэрации использовались компрессор со скоростью подачи воздуха 1,5 л/мин. В качестве питательной среды был выбран раствор Тамия.



Рисунок 2.3 – Экспериментальная установка собранная для проверки эффекта различных длин волн света на рост Хлореллы

2.2 Турбидиметрический датчик

Турбидиметрия (название происходит от мутности) - это процесс измерения потери интенсивности проходящего света из-за эффекта рассеяния взвешенных в нем частиц. Свет пропускается через фильтр, создающий свет известной длины волны, который затем пропускается через кювету, содержащую раствор. Фотоэлемент собирает свет, который

проходит через кювету. Затем измеряется количество поглощённого света. Турбидиметрия может использоваться в биологии для определения количества клеток в растворе.

Турбидиметрический датчик был собран для контроля роста Хлореллы. Датчик состоит из светодиода и фотодиода (рис. 2.4). Светодиод специально был выбран зеленым, потому что хлорелла не поглощает зеленый луч. Характеристики фотодиода представлен в таблице 2.1.

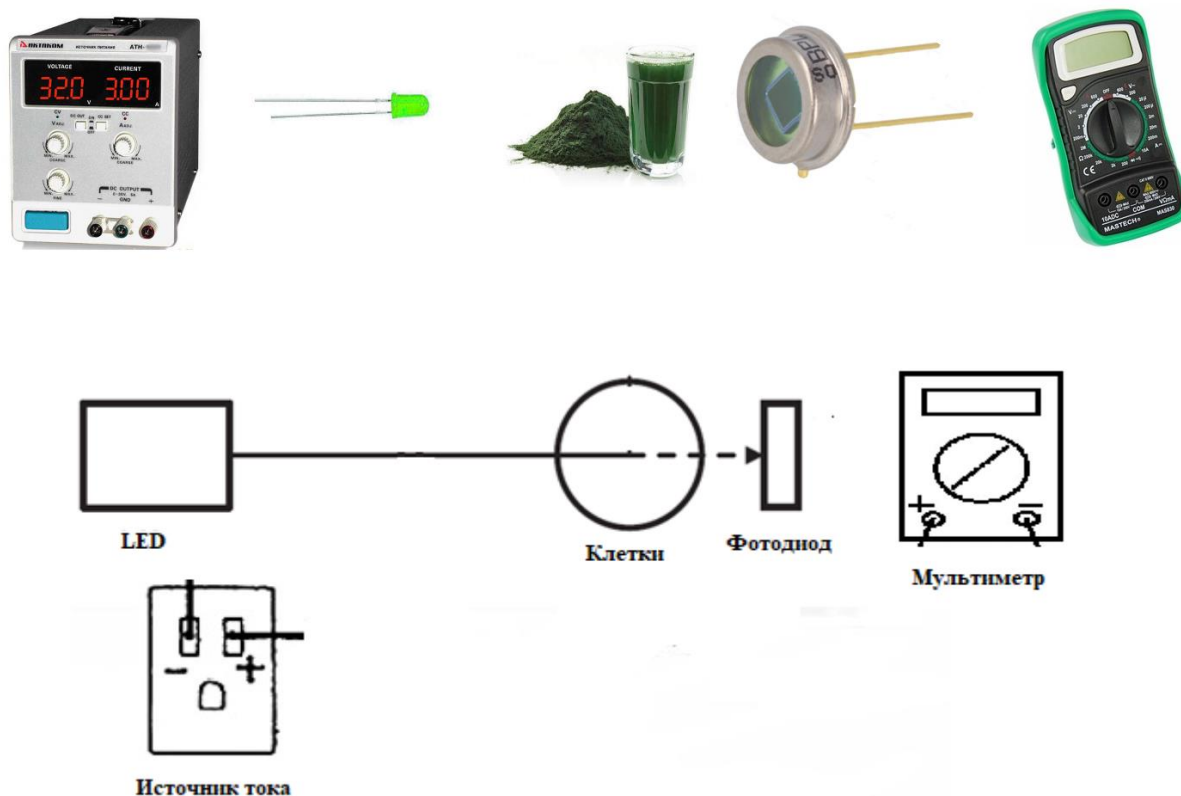


Рисунок 2.4 – Схема турбидиметрического датчика

Таблица 2.1 – Характеристики фотодиода BPW 21

Производитель	OSRAM
Тип фотоприемника	Фотодиод
Корпус	TO5
Длина волны в точке макс. чувствительности	550 нм

Продолжение таблицы 2.1

Длина волны λ_d	350-820 нм
Угол обзора	55°
Обратное напряжение макс.	10 В
Время включения	1,5 мкс
Время выключения	1,5 мкс
Светочувствительная поверхность	7,45 мм ²
Монтаж	ТНТ
Темновой ток	2 нА
Оптическая мощность	250 мВт
Линза диода	Прозрачная
Масса	0,85 г
Цена	615 рубль

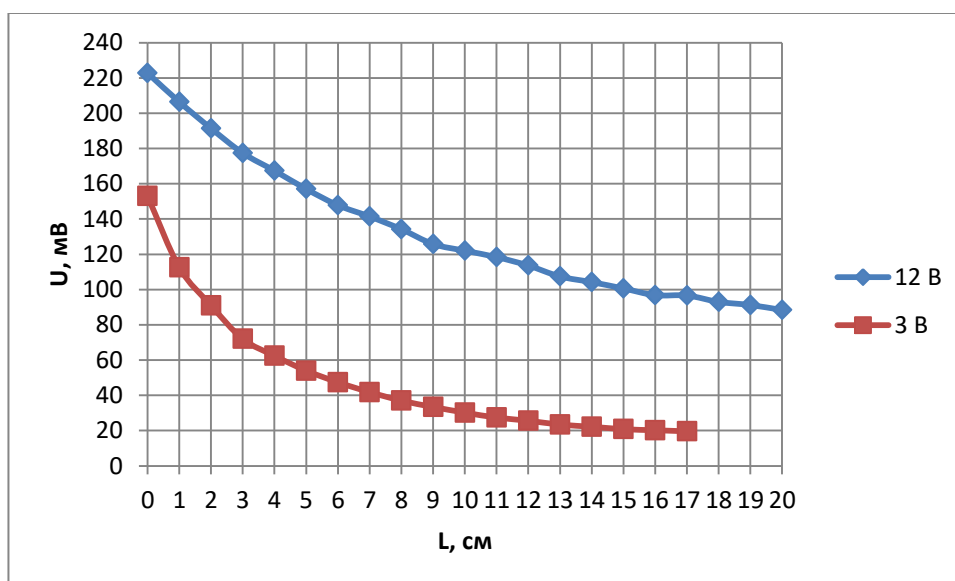


Рисунок 2.5 – Сравнения двух светодиодов, которые работают при 3 В и 12 В

Рисунке 2.5 показано зависимость напряжение светодиодов от расстоянии. Легко заметить, что светодиода работающая при 12 В плавная распределение. Поэтому, для дальнейших работ был выбран светодиод напряженностью 12 В. А расстояние между светодиодом и фотодиодом составляет 1,3 см.

2.3 Определение количества Хлореллы методом прямого счета клеток в камере Горяева – Тома

Камера Горяева – Тома представляет собой толстое предметное стекло, разделенное бороздками (рис. 2.6)

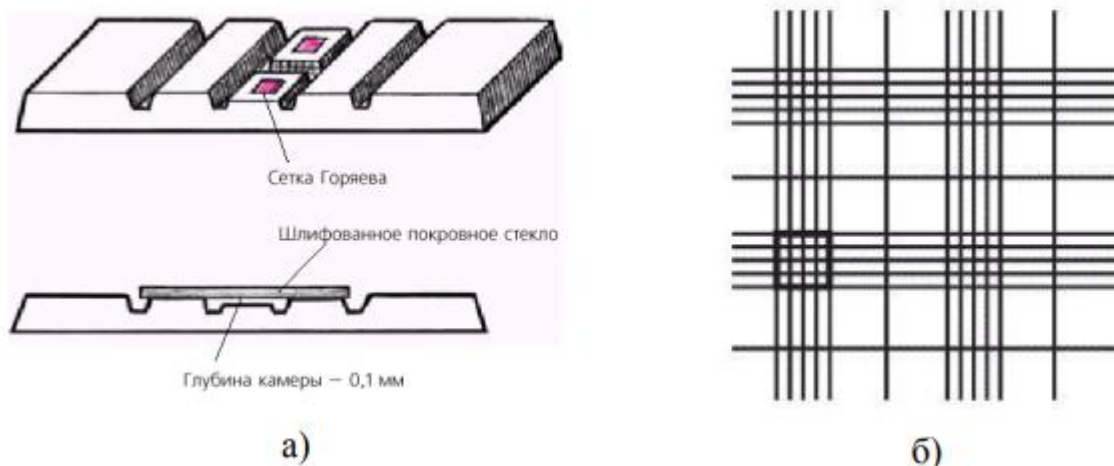


Рисунок 2.6 – Счетная камера Горяева – Тома: а) вид сверху и сбоку; б) сетка камеры под малым увеличением микроскопа

Центральная часть стекла содержит выемку глубиной 0,1 мм, на дно которой нанесена сетка и боковые пластины, к которым притирается покровное стекло.

Перед началом работы покровное стекло притирали к боковым пластинам до появления колец интерференции, свидетельствующих о том, что стекло притерто к сторонам камеры. Камера позволяет проводить подсчет всех, содержащихся в исследуемом объекте клеток. Для отделения живых клеток от мертвых использовали слабый раствор (0,2 – 0,001 %) красителя фуксина. Полученную суспензию вносили под покровное стекло, под действием капиллярных сил суспензия затягивается в область нанесенной сетки. Подсчет проводился через 2 – 3 минуты после заполнения камеры, чтобы клетки осели и при микроскопировании находились в одной плоскости.

Число клеток подсчитывалось с объективом 10 х. Подсчет проводится в 10 больших и в 20 малых квадратах сетки. Подсчет повторялся 3 – 5 раз, перед каждым подсчетом камера заполнялась заново для получения более точных результатов [59]. Количество клеток в 1 мл исследуемого объекта рассчитывалось по формуле:

$M = 2,5 \cdot 10^5 \cdot N$, где N – количество клеток в одном большом квадрате

$M = 4 \cdot 10^6 \cdot N$, где N – количество клеток в одном малом квадрате

2.4 Измерение удельного темпа роста

Удельный темп роста μ (день⁻¹) рассчитывали по следующему уравнению:

$$\mu = \frac{\ln(N_2 - N_1)}{t_2 - t_1} \quad (15)$$

где N_2 и N_1 являются конечными и начальными концентрациями клеток в моменты времени t_2 и t_1 соответственно.

2.5 Измерение оптической плотности, OD_{750}

Оптическая плотность измерялась с использованием спектрофотометра (СФ-256УВИ) при 750 нм в кварцевой кювете с 1 см световым путём. На длине волны 750 нм отсутствует специфическое поглощение (поглощение различными пигментами, такими как хлорофил, каратиноиды и другими), а поглощает только биомасса микроводоросли. В связи с этим, для оценки роста биомассы в эксперименте делались измерения оптической плотности на длине волны 750 нм.

2.6 Методика измерения спектров люминесценции хлореллы

Измерение люминесценции хлореллы производилось с помощью спектрофлюориметра Cary Eclipse [60].

Cary Eclipse - спектрофлюориметр с двумя сверхбыстрыми сканирующими монохроматорами, построенный на основе импульсной ксеноновой лампы и оптики Шварцшильда. Cary Eclipse обладает максимальной чувствительностью, скоростью и мощным пакетом программного обеспечения [60].

Cary Eclipse обеспечивает работу в режимах измерения флуоресценции, фосфоресценции, хеми- и биолюминесценции и дает возможность сбора 80 точек в секунду в режиме флуоресценции, что необходимо для изучения быстрых кинетических процессов. В этом приборе используется метод импульсно-амплитудной модуляции (РАМ). Путём модуляции амплитуды возбуждающего светового пучка (микросекундный диапазон импульсов) и синхронного измерения возбуждаемой флуоресценции или рассеянного излучения, можно работать только на частоте модулированного возбуждающего потока излучения. Так как фоны не модулированы, то это позволяет эффективно отфильтровывать полезные сигналы в электронном тракте измерительной системы [60].



Рисунок 2.7 – Флуоресцентный спектрофотометр Agilent Cary Eclipse [60]

Технические характеристики спектрофотометра Cary Eclipse приведены в таблице 2.2

Таблица 2.2 – Технические характеристики спектрофотометра [60]

Источник света	Пульсирующая Хе лампа
Ширина импульса	2 мкс
Эквивалентная мощность	75 кВт
Оптика	Шварцшильда
Монохроматоры	Черни-Турнера, 0,125 м
Дифракционные решетки	30 x 35 мм, 1200 линий/мм
Детекторы	Два ФЭУ R298
Оптический диапазон	Возбуждение: 200-900 нм, Эмиссия: 200-900 нм
Спектральная ширина щели	1.5, 2.5, 5, 10 и 20 нм
Максимальная скорость сканирования	24000 нм/мин
Скорость сбора кинетических данных	4800 точек/мин
Время усреднения сигнала	Флюоресценция: 0,0125 – 999 с; Фосфоресценция: 1 мкс – 10 с; Био/Хемилюминесценция: 40 мкс – 10 с

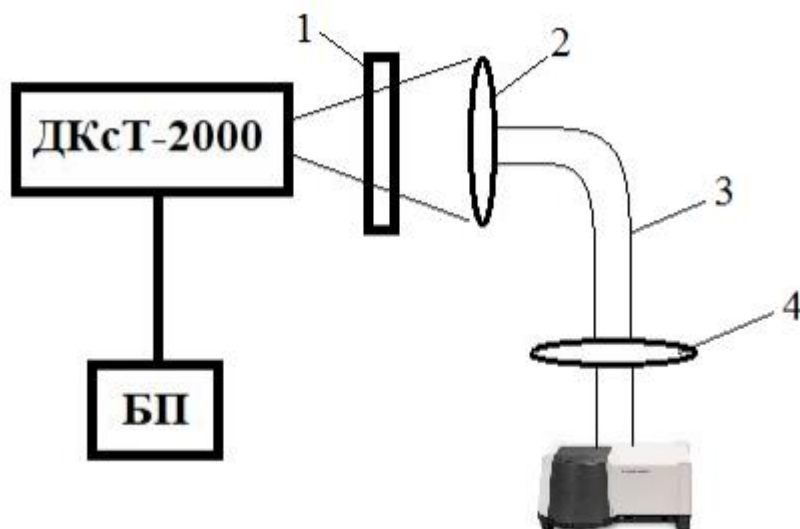


Рисунок 2.8 – Схема измерения кинетики люминесценции хлореллы с помощью флюориметра Cary Eclipse . 1- фильтр, 2,4 – линза, 2- световод

3 Результаты проведенного эксперимента

3.1 Влияние светового/темнового фотопериода на рост *Chlorella Vulgaris*

Признано, что фотосинтетический метаболизм состоит из двух фаз: световой фазы и темной фазы. На первом этапе световая энергия преобразуется в химическую энергию, которая хранится в соединениях с высокой энергией. В темной фазе химическая энергия используется в реакциях фиксации углерода. Эти пути фотосинтеза позволяют модуляции режимов света разрабатывать более дешевые и более эффективные процессы, поэтому использование соответствующих фотопериодов может снизить потребность в световой энергии с аналогичной или даже более высокой производительностью.

Эффект циклов света / темноты был выполнен для оценки влияния прерывистого облучения на производительность *Chlorella Vulgaris*. Различные световые / темные режимы 20/4, 18/6 и 16/8 ч применялись при оптимальной интенсивности света $90 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. Облучение было обеспечено с помощью холодных белых светодиодных ламп (рис. 3.1).

Рисунке 3.2 показано рост концентрации клеток при различных режимах света/темноты. Максимальная концентрация клеток было получено, когда культура была подвержена воздействию 20 ч света и 4 ч темноты на 4 день культивирования. Увеличение темного цикла до 6 и 8 часов, привело к снижению концентрации клеток 1,6 и 1,3 раза, соответственно. При комбинации облучения 20L:4D экспоненциальная фаза заканчивается на 4 день культивирования и тот же день показывает максимум концентрации. Так как, с точки зрения ресурсоэффективности, чем раньше заканчивается экспоненциальная фаза, тем эффективнее (т.е. это максимум роста, дальше не будет происходить рост). Течение первого дня роста у всех трех условиях наблюдалась снижение количество клеток и увеличение размера клеток. Этот период называется фазой адаптации. Поскольку клетки микроводорослей в фазе

адаптации уязвимы к влияющим факторам в новых обстоятельствах, избыточное потребление света и углерода в культуральной среде может оказывать ингибирующее действие на рост микроводорослей.

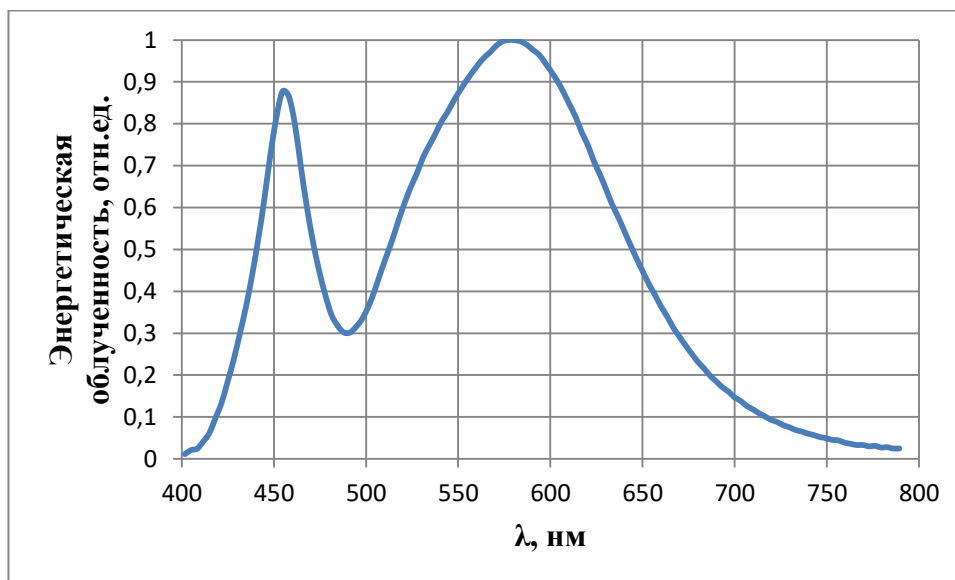


Рисунок 3.1 – Спектр холодного белого светодиода лампы

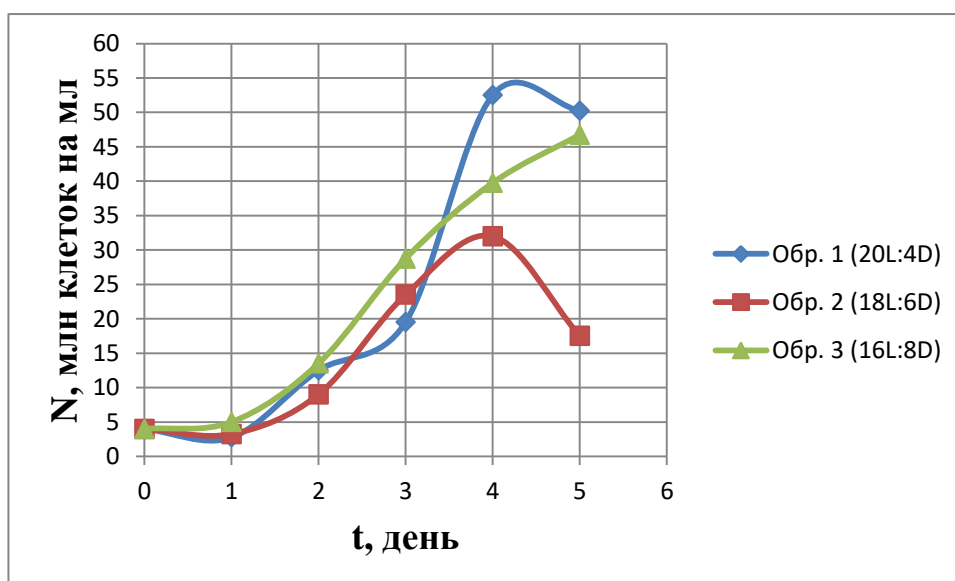


Рисунок 3.2 – Влияние фотопериода на рост *Chlorella vulgaris*

Эти результаты показывают, что водоросли не могут хранить достаточную энергию для использования в течение длительного темного периода. Последствием длительного темного периода является то, что основные соединения углерода, которые были синтезированы в свете, будут

вдыхаться для целей технического обслуживания и снижения общей скорости роста и выхода биомассы.

В световой фазе фотоавтотрофные клетки могут использовать свет для получения своих питательных веществ для хранения, но в темных условиях они должны переключаться на гетеротрофный метаболизм и использовать накопленные питательные вещества для выживания. По мере того как светлая фаза цикла становится длиннее, клетки способны продуцировать питательные вещества, приводящие к увеличению клеточной массы и фотосинтетических пигментов. Когда клетки переходят в темную фазу, катаболический метаболизм становится доминирующим, что приводит к потере, называемому ночной потерей. Таким образом, изменяющийся свет и темный цикл удлиняют время, необходимое для достижения желаемой концентрации хлорофилла.

Еще один эффект был от числа клеток. Под микроскопом было обнаружено, что количество ячеек деления увеличивается в световых циклах по сравнению с непрерывным освещением. Это может быть объяснено явлением, называемым синхронным ростом, достигаемым чередующимися светлыми и темными циклами. В синхронизированной культуре все клетки увеличиваются в размере в течение светового периода и подвергаются делению клеток во время темного периода.

Рис. 3.3 иллюстрирует скорость роста клеток *Chlorella vulgaris* при интенсивности света $90 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ для трех различных фотопериодов (24/00, 22/2 и 18/6 ч светлых/темных) в течение 3 дней. Целью этого эксперимента было оценка необходимости фотопериода. В конце эксперимента самое большое концентрация клеток было в фотопериоде 18L:6D. При культивировании без темного режима после первого дня не наблюдалось рост и это продолжалась до конца эксперимента. Это объясняется тем, что фотосинтез регулируется двумя реакциями: фотохимической фазой, зависящей от света, и другой - биохимической темной фазой, которая не зависит от света. Соединения, которые производятся в фазе, зависящей от света (АТФ, НАДФН), используются в темной фазе для синтеза метаболитических молекул,

необходимых для роста. Кроме того, [32] работе сообщили, что некоторые ферменты цикла пентозы фотосинтеза и фиксации CO_2 неактивны во время облучения. Темная фаза остается необходимой, по крайней мере, для регенерации кофакторов (NAD^+ , NADP^+), необходимых для фазы I фотосинтеза.

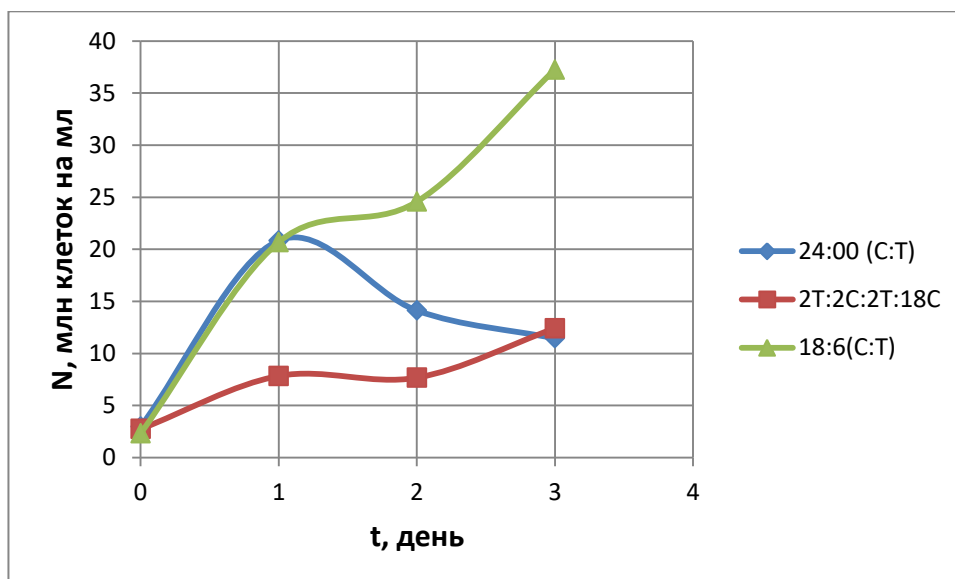


Рисунок 3.3 – Влияние непрерывного облучения и фотопериода на рост *Chlorella vulgaris*

Для полноценного понимания эффекта фотопериода, дополнительно проводился эксперимент комбинации света / темноты 2Т:2С:2Т:18С. Но, в этом случае не наблюдалось активный рост. Удельная темп роста составляло только $0,771 \text{ д}^{-1}$ на 3 день роста.

На рисунке 3.4 показано изменение роста *Chlorella Vulgaris* в условиях $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $90 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ и фотопериода комбинации 20L:4D. Анализ кривой роста показывает присутствие фазы адаптации для микроорганизма с экспоненциальным ростом, происходящим с 20 ч времени пребывания клеток. Стационарная фаза наблюдалась как с четвертого дня культуры. Максимальные концентрации клеток составляли ~ 44 млн. клеток на мл, что более чем в 9 раз увеличивало плотность клеток по сравнению с первоначально присутствующими в реакторе.

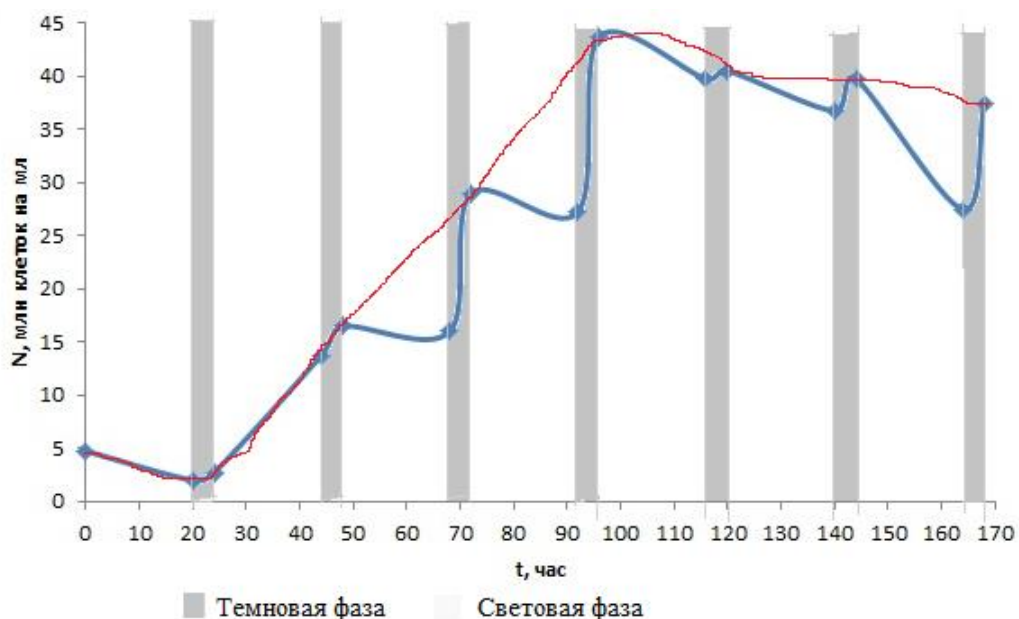


Рисунок 3.4 – Влияние фотопериода на рост *Chlorella vulgaris*

Значительные изменения в объемных скоростях роста и максимальной плотности клеток в зависимости от продолжительности светового цикла показали, что концентрация клеток снижалась пропорционально той части времени, в которой микроорганизм подвергался воздействию света. Как показано рисунке 3.4, увеличение концентрации и деление клеток происходило только темновой фазе.

Очевидно, что в течение светового периода клетки растут и увеличиваются в размерах в результате строительства клеточных структур и накопления молекул хранения, таких как крахмал и липиды, которые служат резервами энергии.

На рисунке 3.5 показано, что после достижения критического размера клетки намерены делиться. Однако, когда такая ситуация достигается в течение светового периода, процесс деления откладывается, чтобы быть выполненным в темноте, и, как следствие, материнские клетки могут продолжать расти, даже если они уже достигли критического размера. Фактически, согласно тем же авторам, микроводоросли способны отделить фазу роста клеток, которая происходит в течение светового периода, используя фотосинтеза, из

митотической и цитокINETической фаз, что, напротив, происходит в темный период, чтобы предотвратить явления повреждения ДНК, потенциально вызванные падающим потоком фотонов.

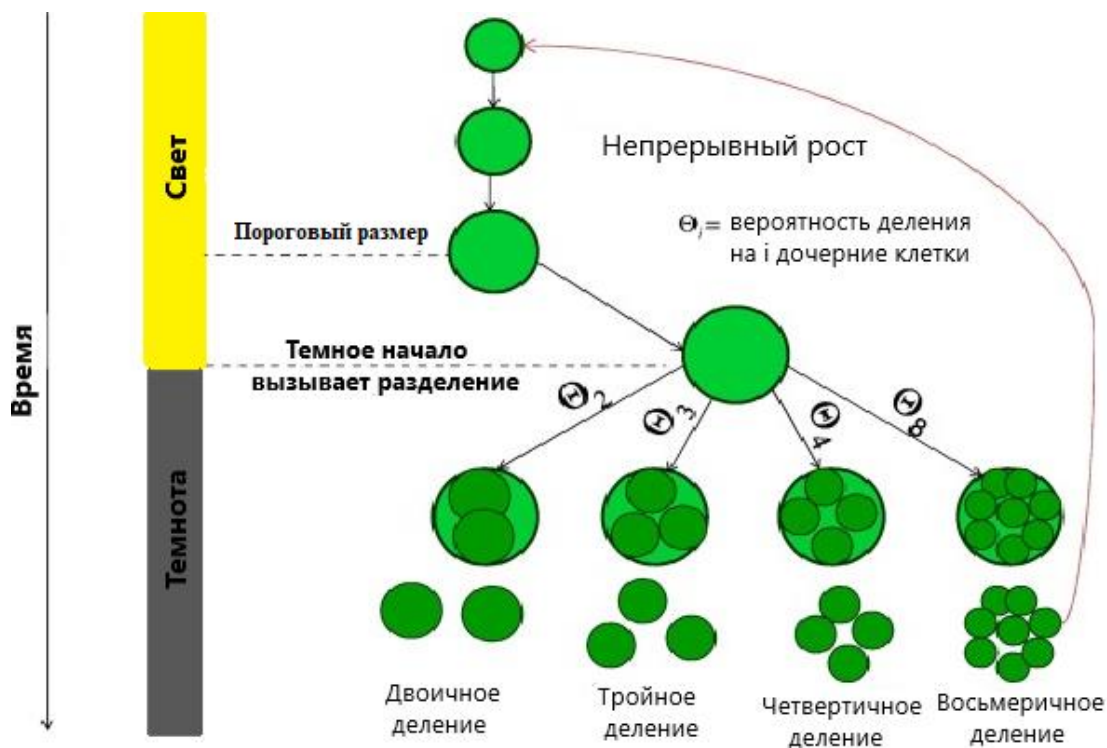


Рисунок 3.5 – Схема процессов роста и деления микроводорослевых клеток, характеризующихся множественным делением. Красная линия указывает, что новорожденные клетки перезапускают новую последовательность роста.

Впоследствии, в начале темных условий, клетки, которые достигли размера, большего или равного критическому, могут фактически начать митоз, который, в свою очередь, определит высвобождение новорожденных дочерних клеток. В большинстве эукариотических водорослей число новорожденных клеток, продуцируемых цитокИнезом, может быть больше двух. Например, когда рассматривается штамм *Chlorella Vulgaris*, число дочерних клеток может быть 2, 3, 4 или 8 согласно литературе.

3.2 Влияние интенсивности света на рост *Chlorella Vulgaris*

Водоросли являются фотосинтезирующими организмами, поэтому свет оказывает огромное влияние на общий метаболизм, влияя на их фотосинтетические характеристики и, следовательно, на их рост. Результаты, полученные из кривых роста, показали, что интенсивность света оказывают значительное влияние на рост *C. vulgaris*. На рисунке 3.6 показаны картины роста *C. vulgaris*, соответствующие различным интенсивностям света (120 и 180 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$). Максимальный рост наблюдался при интенсивности 120 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$.

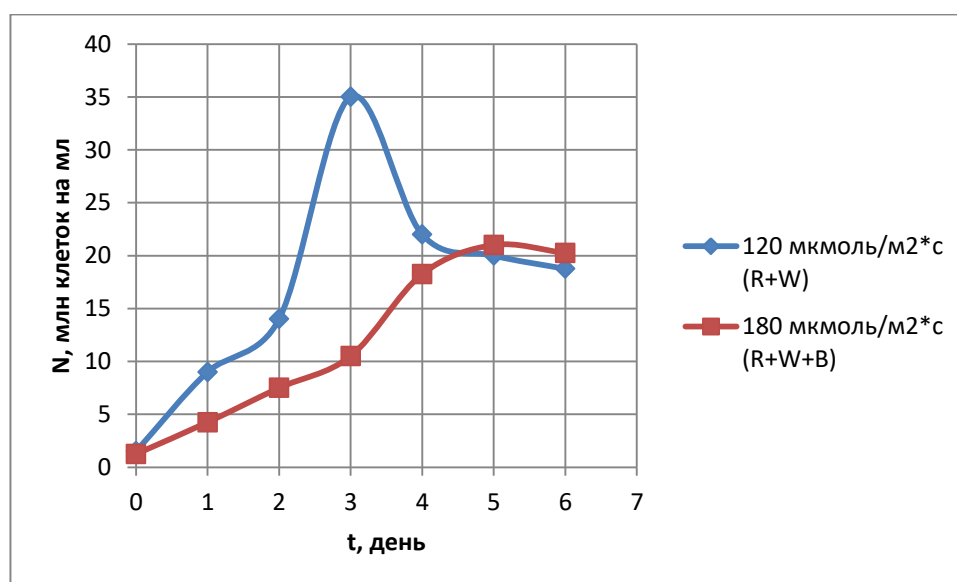


Рисунок 3.6 – Изменения концентрации клеток *C. vulgaris*, выращенных разных интенсивности света (120 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ и 180 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$)

Из рисунка 3.6 легко заметить, что при интенсивности 180 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ происходит фотоингибирование (т. е. снижение фотосинтетической активности). Отсутствие синего света положительно повлияло на рост Хлореллы. Фотоингибирование происходит во всех организмах, способных к кислородному фотосинтезу. В микроводорослях синий свет вызывает фотоингибирование более эффективно, чем другие длины волны видимого

света, а все длины волн ультрафиолетового света более эффективны, чем длины волн видимого света.

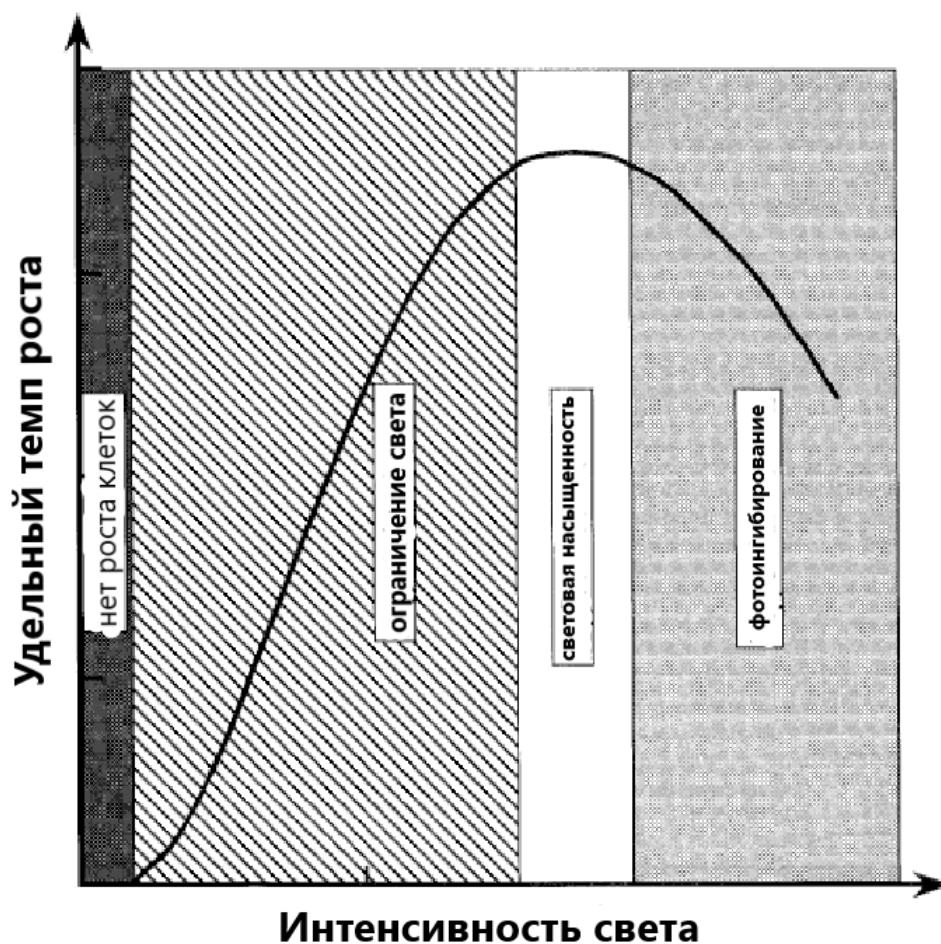


Рисунок 3.7 – Эффект фотолимитации и фотоингибирования

Когда свет предоставляется либо в ограничении, либо в избытке, он действительно отрицательно влияет на рост (рис. 3.7). В первом случае световой энергии недостаточно для генерирования всей химической и восстанавливающей силы, необходимой для питания цикла Кальвина-Бенсона, который, таким образом, работает в субоптимальных условиях. Когда избыточная световая энергия превышает избыток, она превышает фотохимическую способность процесса фотосинтеза, чрезмерное насыщение последнего и индуцирование образования триплетного состояния хлорофилла ($^3\text{Chl}^*$), который при взаимодействии с молекулярным кислородом индуцирует образование активных форм кислорода (АФК), чрезвычайно опасных для самого процесса фотосинтеза и всей клетки. Чтобы справиться с первым

выпуском, микроводоросли развили большие антенные системы, чтобы конкурировать с другими фотосинтезирующими организмами для направления всей доступной световой энергии в сторону фотосинтетической электронной цепи. В то время как для решения вопросов при воздействии избыточного света, они развивались механизм для отвода избыточной энергии в виде тепла (количественно с помощью Нефотохимического Тушения (NPQ)), предотвращая $^3\text{Chl}^*$ образование. Однако клетки тратят энергию, чтобы реагировать на неоптимальные условия роста, с которыми они сталкиваются, и их биологические реакции не всегда кинетически совместимы с промышленными системами роста. Вот почему чрезвычайно важно оценивать влияние света на оптимизацию условий промышленного культивирования для достижения оптимальных показателей роста.

3.3 Влияние различных длины волн света на рост *Chlorella Vulgaris*

Спектральное качество определяется спектром поглощения хлорофиллов и других фотосинтетически активных пигментов (таких как астаксантин и каротиноиды); обеспечение определенной длины волны света улучшит производство Хлореллы. Светоизлучающие диоды (LED) недавно были признаны эффективными источниками света и недорогими источниками энергии для выращивания микроводорослей. По этим причинам важно развивать общие знания в этой области, уделяя особое внимание воздействию светоизлучающих диодов.

Для проверки влияния конкретной длины волны на рост микроводорослей была выбрана вездесущая микроводоросль *C. vulgaris* и тщательно изучены ее характеристики роста, культивируемые под разными тремя длинами волн светодиода. Микроводоросли имеют хлорофиллы и вспомогательные пигменты с максимальными пиками поглощения в красной или синей части спектра света. По этой причине для определения эффектов важных длин волн были выбраны три разные длины волн (450, 660 и 400-700

нм), представляющие синий (450 нм), красный (660 нм) и белый (400-700 нм) в качестве контроля необходимых для фотосинтеза по микроводорослевой биологии (рис. 3.8-3.10).

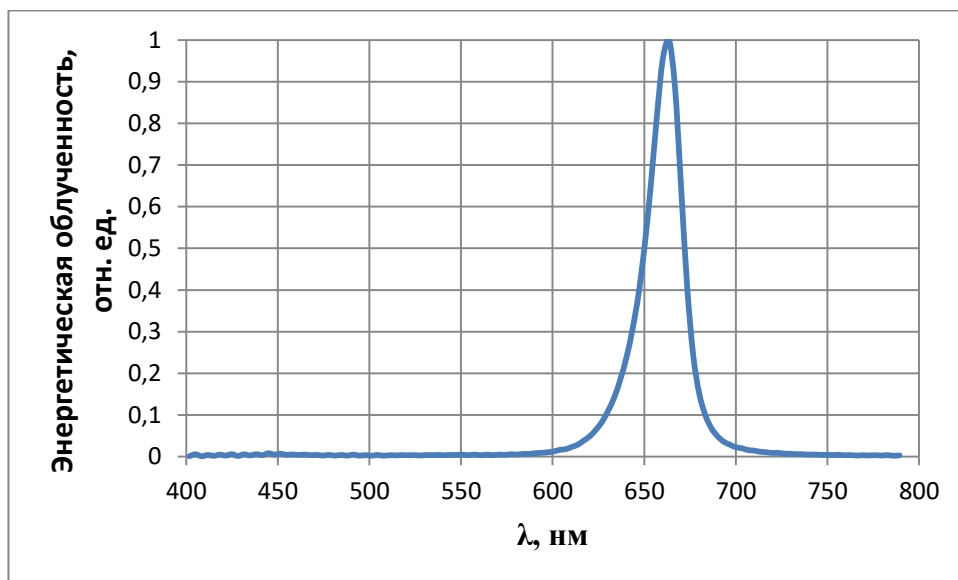


Рисунок 3.8 – Спектр облучения красного светодиода (интенсивностью 300 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$)

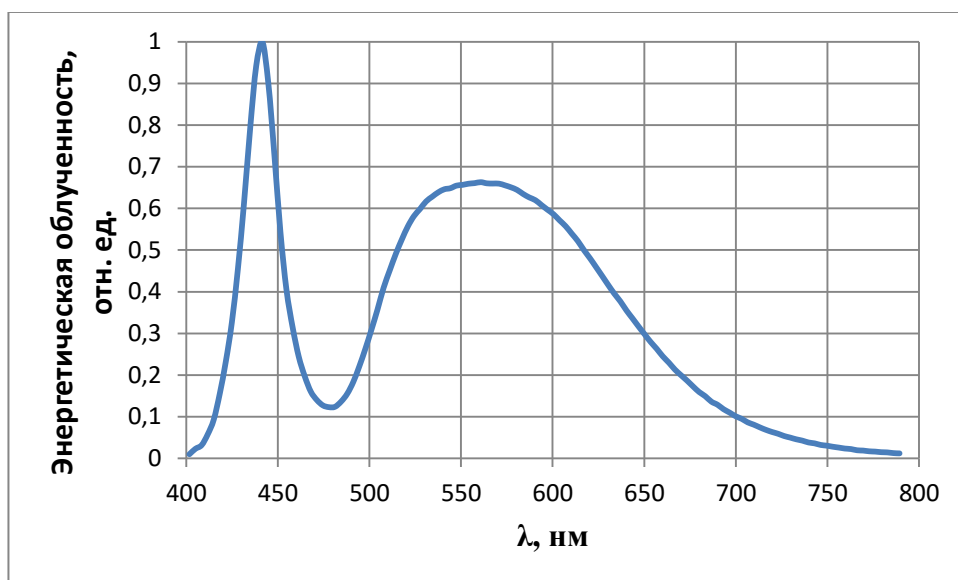


Рисунок 3.9 – Спектр облучения белого светодиода (интенсивностью 300 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$)

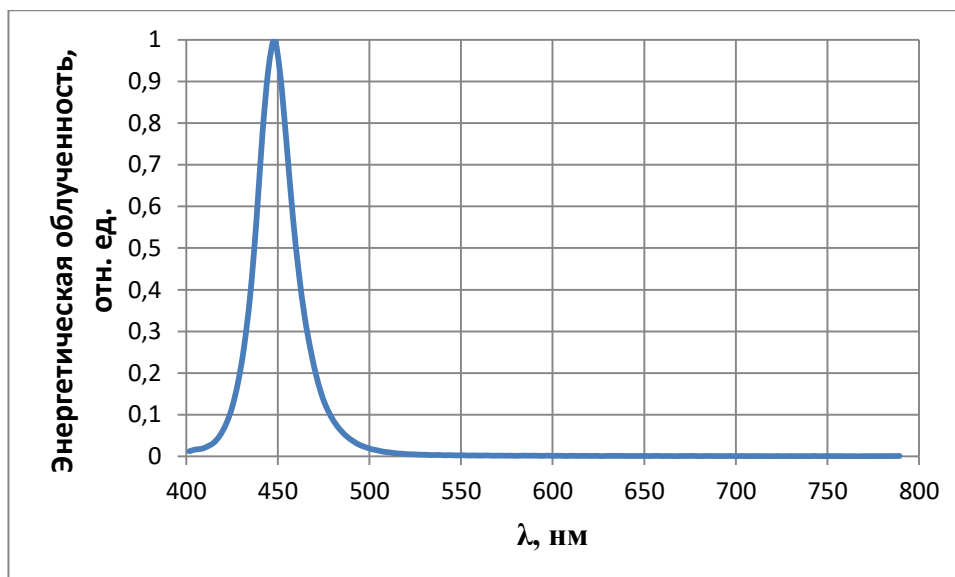


Рисунок 3.10 – Спектр облучения синего светодиода (интенсивностью 300 мкмоль фотонов $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$)

Результаты показали, что конкретная длина волны может действительно влиять на рост микроводоросли (рис. 3.11). Число клеток сильно зависело от длины волны света, так как *S. vulgaris* произвела наивысшее и низкое число клеток под красным и синим светом, соответственно.

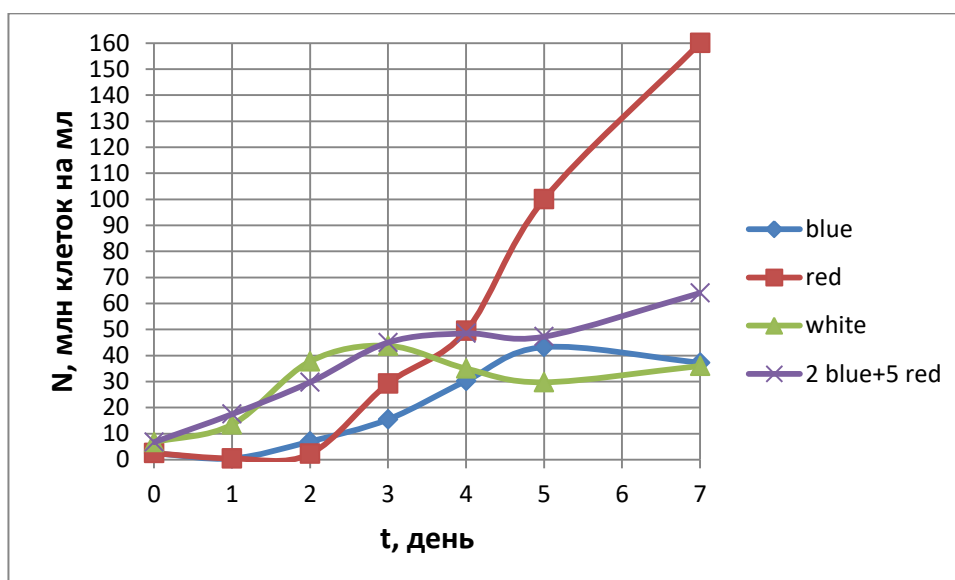


Рисунок 3.11 – Влияние различных длин волн света на рост *Chlorella Vulgaris*

Плотность клеток *S. vulgaris*, выращенных при красном свете, была в 1,5 раза выше, чем у синего света в определенный промежуток времени после инокуляции (рис. 3.11).

Эти результаты согласуются с другими видами микроводорослей в том, что красная длина волны оказалась оптимальной как для *Spirulina platensis*, так и для *Chlorella pyrenoidosa* [42]. [40] работе сообщили, что красный свет приводит к усилению пигментации хлорофилла, что может объяснить результаты положительного эффекта красного света. Так как красный свет оказал такое же влияние на рост микроводоросли как у *C. pyrenoidosa*, так и у *S. platensis* [42], ответы на световую длину волны могли бы быть эволюционными, сохраняющимися между различными видами микроводорослей. С другой стороны, белый свет приводил к средней степени числа клеток, тогда как синий свет последовательно уменьшал уровень числа клеток. Одна из возможных предположений заключается в том, что синий свет может подавлять деление микроводорослевых клеток, что приводит к более низкому уровню числа клеток.

3.4 Сравнение четырех методов для оценки роста *Chlorella vulgaris*

Сравнивали четырех методов оценки роста водорослей с использованием вездесущего *Chlorella Vulgaris* в качестве тестируемого организма. Они были основаны на подсчетах клеток с помощью визуальной микроскопии, спектроскопии (оптическая плотность), флуоресценция хлорофилла а и нефелометрия (турбидиметрия). Основными критериями были параметры точности, чувствительности, предела обнаружения, времени и количества требуемого образца.

Определение биомассы водорослей занимает центральное место в большинстве исследований фитопланктона. Были приняты многочисленные количественные методы, в том числе подсчет клеток, оптические методы с использованием живых клеток или экстрагированных пигментов и химические определения. Хотя отдельные методы часто хорошо описываются с их точностью и ограничениями, есть несколько сообщений об их систематическом взаимном сравнении.

Идеальный метод оценки биомассы является быстрым, точным, с хорошей точностью и низким пределом обнаружения, и использует небольшой объем образца. Реакция должна быть линейной над подходящим диапазоном биомассы и быть специфичной для растительного (водорослевого) материала образца. Абсолютная точность не требуется для оценки конкретных темпов роста или сравнений результатов роста (например, биоанализа), но является желательной для многих других применений.

Прямой подсчет клеток с микроскопом был принят в качестве стандартного метода сравнения других. Несмотря на то, что один из более медленных методов, способных к усталости оператора и основанный на потенциально переменной ячейке, обладает такими преимуществами, что он требует небольших объемов, дает оценки статистически известной точности и имеет низкий предел обнаружения. Дополнительным преимуществом является то, что можно наблюдать визуальное состояние клеток и возможное присутствие мусора или осадков.

Более быстрые оценки биомассы были получены с помощью оптических методов *in vivo*. Они используют небольшие объемы образцов, которые могут быть возвращены в сосуд для роста, если будут приняты адекватные асептические меры предосторожности. Однако они являются методами, наименее специфичными для водорослевого материала, и любое изменение в сопровождающем осадке (например, из-за увеличения pH во время роста) будет мешать.

Спектрофотометрические и турбидиметрические методы показали очень похожие и приемлемо низкие пределы обнаружения, а также хорошую точность. Было установлено, что использованный спектрофотометр очень стабилен.

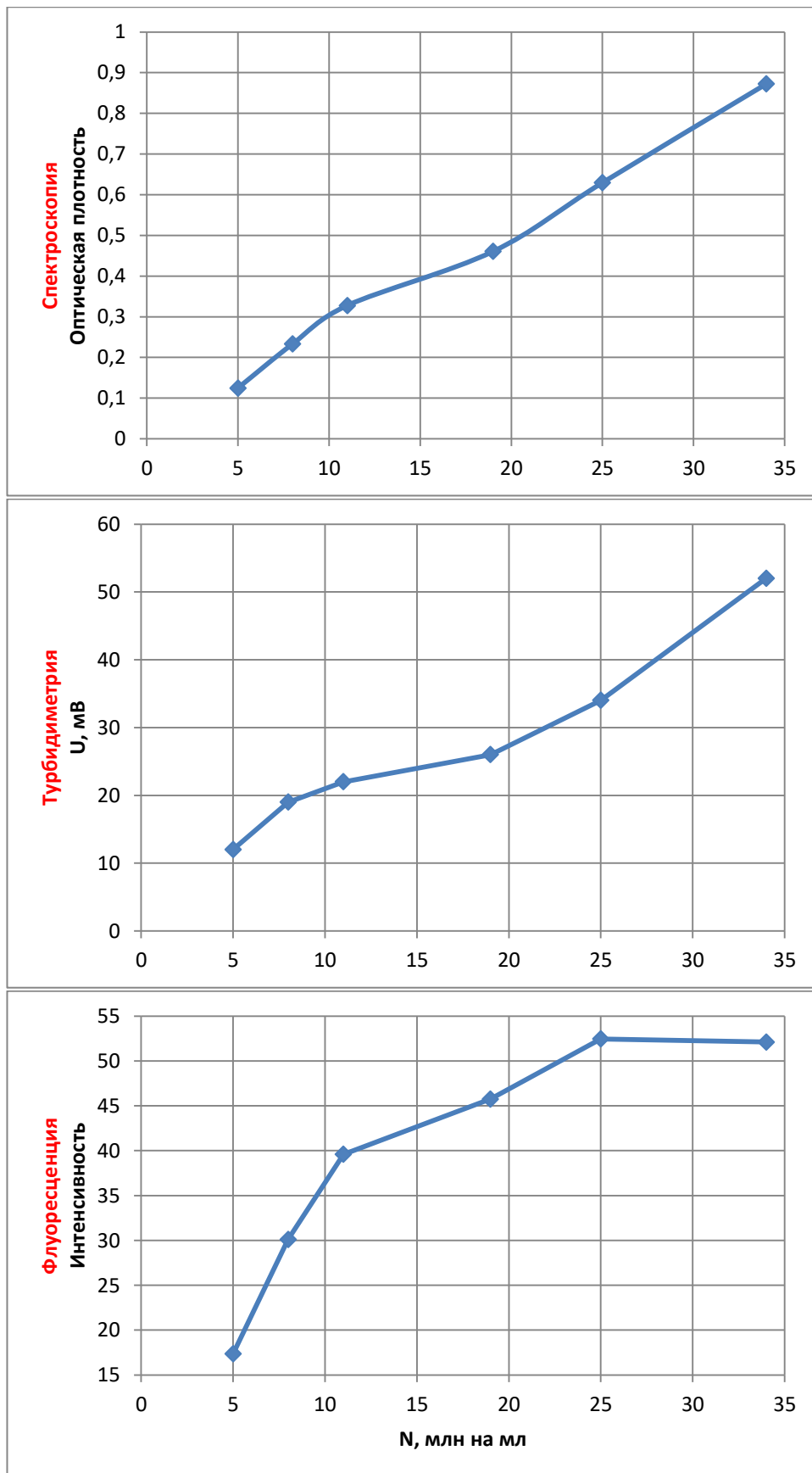


Рисунок 3.12 – Оценки роста Хлореллы тремя методами. (а) Спектрофотометрия, (б) турбидиметрия, (в) флюорометрия.

Флуоресценция показала значительно более высокую вариацию, чем два других метода *in vivo*.

Рисунке 3.12 показано, что как спектроскопия, так и турбидиметрия были линейными с 19 до 34 млн клеток на мл, которая была приблизительно максимальной плотности, полученной в культурах партии Хлореллы. А метод флуоресценции не показал линейной зависимости. Даже при больших концентрациях не смогло демонстрировать рост клеток.

Учитывая широкое использование культур водорослей в экспериментальной экологии и физиологии, удивительно, что мало (если таковые имеются) обширные и строгие сравнения методов определения биомассы в культуре. Более специализированные исследования менее редки. Однако из-за осложнений, возникающих из-за смешанных соединений организмов и присутствия других твердых частиц, эти исследования могут не иметь отношения к работе с аксиальными или одноуровневыми культурами. Даже при таких культурах трудности возникают из-за изменений в строении водорослей во время роста и при различных физических и питательных условиях. Такие проблемы здесь сведены к минимуму за счет использования культур в экспоненциальной фазе роста.

Характеристики производительности, приписываемые различным методам, являются лишь иллюстративными, поскольку они зависят от качества используемых инструментов и видов водорослей.

Химические методы были относительно медленными и, за исключением флуорометрического определения хлорофилла а, требовали умеренно больших объемов проб. Поскольку углерод обычно является основным и наиболее постоянным компонентом водорослевого вещества, он имеет очевидные преимущества в качестве показателя биомассы.

Какой бы метод не применялся для определения биомассы водорослей, необходимо принять определенную степень компромисса в отношении спецификации, манипулятивной легкости, точности и предела обнаружения. Выбранные здесь методы включают в себя много общего, но очевидные

упущения (например, сухой вес, нуклеиновые кислоты, белок, АТФ), которые заслуживают дальнейшего систематического взаимного сравнения. Мы считаем, что качественные микроскопические наблюдения должны дополнять любой выбранный метод, чтобы указать «состояние» клетки и избежать «фундаментальной ошибки» - возможного изменения вовлеченного организма, так как через загрязнение.

В свете настоящих результатов большая зависимость от визуального подсчета в прошлых экспериментальных работах по культурам *Chlorella Vulgaris*, как правило, не была неуместной. Альтернативные методы могут быть предпочтительными для получения обобщенных показателей биомассы напрямую, а не косвенно через номера клеток. Для исследований роста, связанных с низкой концентрацией этого и других микроводорослей, вполне может быть больше использования турбидиметрии и спектроскопии в тех случаях, когда ее быстрота и точность не ухудшаются при вмешательстве.

3.5 Выводы

1. Настоящее исследование показало, что *Chlorella Vulgaris* растёт в фотопериоде 20L: 4D лучше, чем других фотопериодах. Основываясь на этот результат, мы полагаем, что использование этого фотопериода в производстве, намного улучшить скорость роста *Chlorella Vulgaris*.

2. Повышение интенсивности света до $180 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ и облучения синим светом привело к фотоингибированию. В процессе фотоингибирование наблюдалась снижение активности фотосинтеза.

3. Исследование показало, что световая длина волны оказывает заметное влияние на темпы роста *Chlorella Vulgaris*. Синий и белый свет не показывали положительной тенденции в темпах роста по сравнению с красным светом.

4. Из этого исследования сделан вывод, что все оптические методы не может точно прогнозировать рост *Chlorella Vulgaris* при высоких концентрациях. Это связано тем, что закон Ламберта-Бера игнорирует рассеяние и может привести к недопустимым ошибкам.

5. Но при малых плотностях клеток методы спектроскопии и турбидиметрии показали хорошие результаты.

6. Мы считаем, что качественные микроскопические наблюдения должны дополнять любой выбранный метод, чтобы указать «состояние» клетки и избежать «фундаментальной ошибки» - возможного изменения вовлеченного организма, так как через загрязнение.

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«ФИНАНСОВЫЙ МЕНЕДЖМЕНТ, РЕСУРСОЭФФЕКТИВНОСТЬ И
РЕСУРСОСБЕРЕЖЕНИЕ»**

Студенту:

Группа	ФИО
4ВМ6Б	Толеутаев Канат Амантаевич

Инженерная школа	ИШНПТ	Отделение	Материаловедения
Уровень образования	Магистратура	Направление/специальность	Оптотехника

Исходные данные к разделу «Финансовый менеджмент, ресурсоэффективность и ресурсосбережение»:

<i>1. Стоимость ресурсов научного исследования (НИ): материально-технических, энергетических, финансовых, информационных и человеческих</i>	Работа с информацией, представленной в российских и иностранных научных публикациях аналитических материалах, статических бюллетенях и изданиях, нормативно-правовых документах; наблюдение.
<i>2. Нормы и нормативы расходования ресурсов</i>	
<i>3. Используемая система налогообложения, ставки налогов, отчислений, дисконтирования и кредитования</i>	

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

<i>1. Оценка коммерческого потенциала, перспективности и альтернатив проведения НИ с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения</i>	Определение потенциального потребителя результатов исследования, SWOT-анализ, определение возможных альтернатив проведения научных исследований
<i>2. Планирование и формирование бюджета научных исследований</i>	Планирование этапов работы, определение календарного графика и трудоемкости работы, расчет бюджета
<i>3. Определение ресурсной (ресурсосберегающей), финансовой, бюджетной, социальной и экономической эффективности исследования</i>	Оценка сравнительной эффективности проекта.

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей):

<ol style="list-style-type: none"> <i>1. Оценка конкурентоспособности технических решений</i> <i>2. Матрица SWOT</i> <i>3. Альтернативы проведения НИ</i> <i>4. График проведения и бюджет НИ</i> <i>5. Оценка ресурсной, финансовой и экономической эффективности НИ</i>
--

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику	
---	--

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
доцент	Старикова Е.В.	к. ф. н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ВМ6Б	Толеутаев Канат Амантаевич		

Выпускная квалификационная работа на тему «Оптические методы контроля культивирования микроводоросли Хлореллы» выполняется в рамках магистерской диссертации в целях нахождения оптимальных параметров культивирования и разработки эффективного фотобиореактора.

В данном разделе ВКР выполнено технико-экономическое обоснование научно-исследовательского проекта. В частности это оценка коммерческого потенциала и перспективности проведения данного исследование с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения, а также планирование и организация научно-исследовательского проекта.

4.1 Предпроектный анализ

4.1.1 Потенциальные потребители результатов исследования

Для анализа потребителей результатов исследования необходимо рассмотреть целевой рынок и провести его сегментирование.

Учитывая небольшие размеры разработанной установки, планируется применять фотобиореактор в сельском хозяйстве. Планируемый масштаб реализации разработанного проекта – на данный момент на региональном уровне. Успешно развиваясь, разработанный проект может достигнуть межрегионального уровня.

Так как в данной разработке для освещения реактора используются светодиодные светильники, затраты на электричество сократятся по сравнению с используемыми в современных фотобиореакторах галогенных и люминесцентных ламп. Так же срок службы светодиодов намного больше, чем у других ламп.

Учитывая, что система фотобиореактора полностью автоматизирована, сократятся затраты на обслуживающий персонал - для обслуживания одной или нескольких установок будет достаточно контроля одного человека.

На основе вышесказанного, в сравнении с используемыми на данный момент фотобиореакторами, данная установка по культивированию хлореллы может получить масштабное развитие не только в больших сельскохозяйственных производствах, но и на малых фермах, т.к. увеличивается продуктивность сельскохозяйственных животных при использовании суспензии хлореллы. Более того, хлорелла, являясь пробиотиком, позволяет отказаться от кормовых антибиотиков.

Для начала планируется распространить установку в Томской области, целевой аудиторией могут стать предприятия производящие мясо и молочные продукты, а также яйца, эти компании представлены в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Целевая аудитория Томской области





Фирма производитель	Электронный адрес	Производимая продукция	Используемый корм
ООО «Межениновска я птицефабрика»	http://xn---7sbbaecuadfxddvhsbtyzn1a4c8b8p.xn--p1ai/	Один из крупнейших производителей мяса цыплят-бройлеров в Западной Сибири	Экологически чистые корма без использования гормональных препаратов и антибиотиков.
Свиноводческий комплекс ЗАО "Сибирская Аграрная Группа"	http://www.sibagrogroup.ru/production/factories/?ID=801	Обеспечивает производство 30 тыс. тонн свинины в год	Силос, комбикорма, добавки.

Продолжение таблицы 4.1

Птицефабрика «Томская» ЗАО "Сибирская Аграрная Группа"	http://www.sibagrogroup.ru/production/factories/?ID=1887	Производство промышленного яйца, производство мяса бройлеров	Комбикорма, добавки.
ООО «Деревенское молочко», г. Северск	http://derevenskoe-molochko.ru/	Молочные продукты	Силос, сено, добавки.

Таблица 4.2 – Карта сегментирования рынка

		Выпускаемая продукция		
		Фотобиореактор	Кормовые добавки	Маточная культура
Размер компании	Крупные			
	Средние			
	Мелкие			

 Птицефабрика «Томская» ЗАО "Сибирская Аграрная Группа"
 ООО «Деревенское молочко», г. Северск
 ООО «Межениновская птицефабрика»
 Свиноводческий комплекс ЗАО "Сибирская Аграрная Группа"

Как видно из таблицы 4.2, наиболее перспективным сегментом в отраслях производства фотобиореактора, кормовых добавок и маточной культуры для формирования спроса является сегмент крупных и средних предприятий. Птицефабрикам можно продать фотобиореакторы и они будут сами эксплуатировать. А хлореллу в виде кормовых добавок планируется продавать фермам занимающиеся животноводством. Маточную культуру спрос мало. В основном их заказывают исследовательские центры для экспериментов.

4.1.2 Анализ конкурентных технических решений с позиции ресурсоэффективности и ресурсосбережения

В России культиватор для выращивания хлореллы производят несколько компаний. Так, научно-производственная компания "ДЕЛО" является основателем внедрения инновационной биотехнологии хлореллы в животноводство. Для выращивания хлореллы компания "ДЕЛО" предлагает:

- установки серии КМК (культиватор маточной культуры) - КМК-150, производительностью 50 л суспензии в сутки;
- установки серии ФБР - ФБР-150 и ФБР-250, производительностью соответственно 150 и 250 л суспензии в сутки.

Компания ОАО «АгроСервер» предлагает для культивирования хлореллы биореактор КХ-60. Данный биореактор представляет собой модульную установку с производительностью суспензии хлореллы 60 л в сутки и плотностью клеток 50 – 60 млн/мл.

Таблица 4.3 – Оценочная карта для сравнения конкурентных технических решений (разработок)

Критерии оценки	Вес критерия	Баллы			Конкурентоспособность		
		Б _ф	Б _{к1}	Б _{к2}	К _ф	К _{к1}	К _{к2}
1	2	3	4	5	6	7	8
Технические критерии оценки ресурсоэффективности							
1. Повышение производительности установки	0,15	5	3	3	0,75	0,45	0,45
2. Энергоэкономичность	0,15	5	1	1	0,75	0,15	0,15
3. Безопасность	0,1	5	2	2	0,5	0,2	0,2
4. Простота эксплуатации	0,1	5	5	5	0,5	0,5	0,5
Экономические критерии оценки эффективности							
1. Конкурентоспособность продукта	0,15	5	3	3	0,75	0,45	0,45
2. Цена	0,15	4	4	5	0,6	0,6	0,75
3. Предполагаемый срок эксплуатации	0,1	5	3	3	0,5	0,3	0,3
4. Послепродажное обслуживание	0,1	5	2	2	0,5	0,2	0,2
Итого	1	39	23	24	4,85	2,85	3

Примечание.

K_1 – установка научно – производственной компании "Дело" КМК – 150; K_2 – установка компании ОАО "АгроСервер" КХ – 60; Ф – разработанный фотобиореактор.

Проанализировав доступную информацию о приведенных выше биореакторах, были выявлены недостатки установок:

1. Малая степень автоматизации, что делает необходимым наличие оператора для отслеживания параметров среды на протяжении всего цикла выращивания (около 18 часов), а это может привести к ошибке в технологическом процессе, так называемому «человеческому фактору».

2. Еще одним недостатком существующих конструкций является применение не энергоэффективных источников облучения: ламп накаливания и люминесцентных ламп.

3. Также форма источников облучения делает не возможным равномерное облучение хлореллы по всему объему культиватора.

4. К недостаткам можно отнести форму резервуаров для культивирования. Форма прямоугольного параллелепипеда создает большие потери излучения в углах резервуаров.

5. Отсутствие возможности регулировать спектральный состав излучателей для быстрого роста хлореллы.

Усовершенствованный фотобиореактор должен максимально автоматизировать процесс выращивания микроводорослей и устранить большую часть недостатков применяемых на сегодня культиваторов. Скорость получения и качество готового продукта должны выйти на новый уровень, в то же время, сократятся затраты на электроэнергию и работу обслуживающего персонала.

4.1.3 SWOT-анализ

На основе работы, проведенной в предыдущих разделах магистерской диссертации, был составлен SWOT-анализ научно-исследовательского проекта. Результаты первого этапа SWOT-анализа представлены в таблице 4.4.

Таблица 4.4 – Матрица первого этапа SWOT-анализа

	<p>Сильные стороны научно-исследовательского проекта:</p> <p>С1. Заявленная экономичность и энергоэффективность технологии;</p> <p>С2. Полная автоматизация;</p> <p>С3. Экологичность;</p> <p>С4. Специально подобранный спектр облучения для быстрого роста хлореллы.</p>	<p>Слабые стороны научно-исследовательского проекта:</p> <p>Сл1. Высокая цена в отличие от некоторых конкурентов;</p> <p>Сл2. Сложность в разработке установки.</p> <p>Сл3. Отсутствие рекомендации и литературы для подбора параметров оптимального культивирования.</p> <p>Сл4. Отсутствие у потенциальных потребителей квалифицированных кадров по работе с научной разработкой</p>
<p>Возможности:</p> <p>В1. Привлечение специалистов разного профиля для разработки установки;</p> <p>В2. Отказ от антибиотиков сельских хозяйств, использующих данную установку, следовательно, экономия бюджета.</p> <p>В3. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ</p> <p>В4. Повышение стоимости конкурентных разработок</p>		

Продолжение таблицы 4.4

<p>Угрозы:</p> <p>У1. Отсутствие финансирования проекта;</p> <p>У2. Отсутствие тенденции развития данной установки;</p> <p>У3. Нехватка специалистов для разработки данного фотобиореактора.</p> <p>У4. Большой срок поставок материалов, используемых в проводимом исследовании.</p>		
--	--	--

Таким образом, по анализу интерактивных таблиц можно составить итоговую матрицу SWOT-анализа (таблица 4.5).

Таблица 4.5 – Итоговая матрица SWOT-анализа

	<p>Сильные стороны научно-исследовательского проекта:</p> <p>С1. Заявленная экономичность и энергоэффективность технологии;</p> <p>С2. Полная автоматизация;</p> <p>С3. Экологичность;</p> <p>С4. Специально подобранный спектр облучения для быстрого роста хлореллы.</p>	<p>Слабые стороны научно-исследовательского проекта:</p> <p>Сл1. Высокая цена в отличие от некоторых конкурентов;</p> <p>Сл2. Сложность в разработке установки.</p> <p>Сл3. Отсутствие рекомендации и литературы для подбора параметров оптимального культивирования.</p> <p>Сл4. Отсутствие у потенциальных потребителей квалифицированных кадров по работе с научной разработкой</p>
--	---	---

Продолжение таблицы 4.5

<p>Возможности:</p> <p>В1. Привлечение специалистов разного профиля для разработки установки;</p> <p>В2. Отказ от антибиотиков сельских хозяйств, использующих данную установку, следовательно, экономия бюджета.</p> <p>В3. Использование инновационной инфраструктуры ТПУ</p> <p>В4. Повышение стоимости конкурентных разработок</p>	<p>При привлечении специалистов разного профиля к работе над установкой можно проработать разносторонние аспекты фотобиореактора: инженеры-светотехники занимаются подбором наиболее эффективного для роста хлореллы спектра; инженеры – электрики занимаются разработкой автоматизации системы. За счет использования автоматизации системы и светодиодных источников света сократятся затраты на электроэнергию.</p> <p>Использование хлореллы в корм животным позволяет отказаться от применения антибиотиков чаще одного раза в год.</p>	<p>За счет того, что в данной установке больше новшеств и датчиков контроля показателей, установка может стоить дороже некоторых установок конкурентов. Но за счет энергосбережения фотобиореактор в скором времени окупает себя. При возникшей нехватки специалистов для разработки проекта, привлекались студенты с других институтов и кафедр.</p>
<p>Угрозы:</p> <p>У1. Отсутствие финансирования проекта;</p> <p>У2. Отсутствие тенденции развития данной установки;</p> <p>У3. Нехватка специалистов для разработки данного фотобиореактора.</p> <p>У4. Большой срок поставок материалов, используемых в проводимом исследовании.</p>	<p>При отсутствии финансирования данного проекта есть возможность покупать детали за свой счет или принимать стороннюю помощь в получении деталей для установки. Сравнивая установку с конкурентными, учитывая все ее новшества, развития установка получит довольно быстрое.</p>	<p>При разработке фотобиореактора все еще возникает нужда в сторонних специалистах разных профилей и направлений, из – за этого возникает сложность в разработке установки и сроках окончания готового фотобиореактора.</p>

4.2 Планирование управления научно-техническим проектом

4.2.1 План проекта

Таблица 4.6 – Календарный план проекта

№	Название	Длительность, дни	Дата начала работ	Дата окончания работ	Состав участников
1	Утверждение темы	3	11.02	13.02	Руководитель
2	Подбор и изучение материалов по теме	11	14.02	24.02	Дипломник
3	Составление плана	4	25.02	28.02	Руководитель
4	Календарное планирование работ	3	1.03	3.03	Руководитель
5	Изучение литературы по теме	15	4.03	18.03	Дипломник
6	Изучение зарубежной литературы	11	19.03	29.03	Дипломник
7	Разработка методики эксперимента	3	30.03	1.04	Руководитель, Дипломник
8	Проведение эксперимента	24	2.04	25.04	Руководитель, дипломник
9	Статистическая обработка результатов эксперимента	15	26.04	10.05	Дипломник
10	Анализ и оценка полученных результатов	15	11.05	25.05	Руководитель, Дипломник
11	Разработка методики контроля культивирования микрородоросли и эффективного фотобиореактора	11	26.05	05.06	Руководитель, Дипломник
12	Вывод по цели	11	06.06	16.06	Руководитель, дипломник
Итого:		126			

Таблица 4.7 – Календарный план-график проведения НИОКР по теме

№	Вид работ	Исполнители	Т _к , кал. дн.	Продолжительность выполнения работ													
				февр.		март			апрель			май			июнь		
				2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	
1	Утверждение темы	Руководитель	3	///													
2	Подбор и изучение материалов по теме	Дипломник	11		■												
3	Составление плана	Руководитель	4		///												
4	Календарное планирование работ	Руководитель	3			///											
5	Изучение литературы по теме	Дипломник	15			■	■										
6	Изучение зарубежной литературы	Дипломник	11				■	■									
7	Разработка методики эксперимента	Руководитель, Дипломник	3					///	■								
8	Проведение эксперимента	Руководитель, дипломник	24						///	■	■						
9	Статистическая обработка результатов эксперимента	Дипломник	15									■	■				
10	Анализ и оценка полученных результатов	Руководитель, Дипломник	15									///	■	■			
11	Разработка методики контроля культивирования микроводоросли и эффективного фотобиореактора	Руководитель, Дипломник	11											///	■		
12	Вывод по цели	Руководитель, дипломник	11												///	■	

/// – руководитель, ■ – дипломник

4.2.2 Бюджет научно-технического исследования

Таблица 4.8 – Группировка затрат по статьям

№	Статьи					
	Сырье, материалы, покупные изделия и покупные полуфабрикаты	Специальное оборудование для научных (экспериментальных) работ	Основная заработная плата	Дополнительная заработная плата	Отчисления на социальные нужды	Накладные расходы
1.	Резервуар	Спектрофотометр СФ-56	Руководитель	Руководитель	Руководитель	Печать и ксерокопирование материалов исследования
2.	Облучатель	Нефелометрический датчик	Дипломник	Дипломник	Дипломник	Оплата услуг связи
3.	Аэратор	Микроскоп				Оплата электроэнергии
4.	Питательная среда					
5.	Маточная культура микроводоросли					
6.	Датчик рН					
7.	Нагреватель					
Итого руб.:	45500	280400	295244,72	34829,36	68501,18	97522,22
Плановая себестоимость	∑821997,48					

Расчет стоимости материальных затрат производилось по действующим прейскурантам и договорным ценам. В стоимость материальных затрат включили транспортно-заготовительные расходы (3 – 5 % от цены). Результаты по данной статье представлены в таблице 4.9.

В статью специальное оборудование для экспериментальных работ включили все затраты связанные с приобретением специального оборудования. Определение стоимости спецоборудования производили по действующим прейскурантам, а также учли доставку и монтаж в размере 15 % от его цены. Результаты по данной статье представлены в таблице 4.10.

Таблица 4.9 – Сырье, материалы, комплектующие изделия и покупные полуфабрикаты

Наименование	Единица измерения	Кол-во	Цена за единицу, руб.	Сумма, руб.
Резервуар	штука	1	17500	17500
Облучатель	штука	1	15000	15000
Аэратор	штука	1	3500	3500
Питательная среда	л	150	30	4500
Маточная культура микроводоросли	л	1	1000	1000
Датчик pH	штука	1	2000	2000
Нагреватель	штука	2	1000	2000
Итого по статье				45500

Таблица 4.10 – Расчет затрат по статье «Спецоборудование для научных работ»

№	Наименование оборудования	Кол-во единиц оборудования	Цена единицы оборудования, тыс. руб.	Общая стоимость оборудования, тыс. руб.
1.	Спектрофотометр СФ-56	1	220	253
2.	Нефелометрический датчик	1	2	2,3
3.	Микроскоп	1	21,8	25,1
Итого по статье				280,4

Основная заработная плата

Таблица 4.11 – Расчет основной заработной платы

№ п/п	Исполнитель	Трудоемкость, чел.-дн.	Зарплата, приходящаяся на один чел.-дн., тыс. руб.	Всего заработная плата по тарифу (окладам), тыс. руб.
1.	Руководитель	74	3486,04	257966,96
2.	Дипломник	116	321,36	32277,76
Итого по статье С _{осн}				295244,72

Таблица 4.12 – Баланс рабочего времени

Показатели рабочего времени	Руководитель	Дипломник
Календарное число дней	126	126
Количество нерабочих дней - выходные дни - праздничные дни	24	42
Потери рабочего времени - отпуск - невыходы по болезни	0	0
Действительный годовой фонд рабочего времени	102	84

Для руководителя:

$$З_{\text{м}} = 26300 \cdot 1,3 = 34190 \text{ руб.}$$

$$З_{\text{дн}} = 34190 \cdot 10,4 / 102 = 3486,04 \text{ руб.}$$

$$З_{\text{осн}} = 3486,04 \cdot 74 = 257966,96 \text{ руб.}$$

Для дипломника:

$$З_{\text{м}} = 1854 \cdot 1,3 = 2410,2 \text{ руб.}$$

$$З_{\text{дн}} = 2410,2 \cdot 11,2 / 84 = 321,36 \text{ руб.}$$

$$З_{\text{осн}} = 321,36 \cdot 116 = 32277,76 \text{ руб.}$$

Таблица 4.13 – Расчет основной заработной платы

Исполнители	З _б , руб.	К _р	З _м , руб.	З _{дн} , руб.	Т _р , раб. дн.	З _{осн} , руб.
Руководитель	26300	1,3	34190	3486,04	74	257966,96
Дипломник	1854	1,3	2410,2	321,36	116	32277,76

Дополнительная заработная плата научно-производственного персонала

Расчет дополнительной заработной платы ведется по следующей формуле:

$$З_{\text{доп}} = k_{\text{доп}} \cdot З_{\text{осн}}$$

где $k_{\text{доп}}$ – коэффициент дополнительной заработной платы (на стадии проектирования принимается равным 0,12 – 0,15).

Таблица 4.14 – Заработная плата исполнителей НТИ

Заработная плата	Руководитель	Дипломник
Основная зарплата	257966,96	32277,76
Дополнительная зарплата	30956,03	3873,33
Зарплата исполнителя	288922,99	36151,09
Итого по статье $C_{\text{зп}}$	325074,08	

Отчисления на социальные нужды

Статья включает в себя отчисления во внебюджетные фонды.

$$C_{\text{внеб}} = k_{\text{внеб}} \cdot (З_{\text{осн}} + З_{\text{доп}})$$

где $k_{\text{внеб}}$ – коэффициент отчислений на уплату во внебюджетные фонды (пенсионный фонд, фонд обязательного медицинского страхования и пр.).

Таблица 4.15 – Отчисления на социальные нужды

Исполнитель	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб.	Отчисления, руб.
Руководитель	257966,96	30956,03	78298,13
Дипломник	32277,76	3873,33	9796,94
Коэффициент отчислений во внебюджетные фонды	27,1%		
Итого по статье $C_{\text{внеб}}$			68501,18

Накладные расходы

Расчет накладных расходов ведется по следующей формуле:

$$C_{\text{накл}} = k_{\text{накл}} \cdot (З_{\text{осн}} + З_{\text{доп}})$$

где $k_{\text{накл}}$ – коэффициент накладных расходов.

Величину коэффициента накладных расходов можно взять в размере 70%.

Таблица 4.16 – Накладные расходы

Исполнитель	Основная заработная плата, руб.	Дополнительная заработная плата, руб.	Накладные расходы, руб.
Руководитель	257966,96	30956,03	86676,89
Дипломник	35992,32	3873,33	10845,32
Коэффициент накладных расходов	70 %		
Итого по статье $C_{\text{накл}}$			97522,22

4.3 Оценка ресурсоэффективности проекта

Ресурсоэффективность разработка эффективного фотобиореактора определяется при помощи интегрального критерия ресурсоэффективности, который имеет следующий вид:

$$I_{pi} = \sum a_i \cdot b_i$$

где: I_{pi} - интегральный показатель ресурсоэффективности;

a_i - весовой коэффициент проекта;

b_i - бальная оценка проекта, устанавливается экспертным путем по выбранной шкале оценивания.

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности представлен в таблице 4.17

Таблица 4.17 – Сравнительная оценка характеристик проекта

Критерии	Весовой коэффициент	Бальная оценка разработки
1. Качество светодиодов и отражателей	0,25	4
2. Удобство в эксплуатации (соответствует требованиям потребителей)	0,25	5
3. Производительность	0,20	4
4. Экономичность	0,20	5
5. Экологичность	0,10	5
Итого:	1,00	

Интегральный показатель ресурсоэффективности для разрабатываемого проекта:

$$I_{pi} = 0,25 \cdot 4 + 0,25 \cdot 5 + 0,20 \cdot 4 + 0,20 \cdot 5 + 0,10 \cdot 5 = 4,55$$

Проведенная оценка ресурсоэффективности проекта дает достаточно неплохой результат (4,55 из 5), что свидетельствует об эффективности реализации технического проекта.

Расчет интегрального показателя ресурсоэффективности проекта имеет важное значение при выполнении раздела «Ресурсоэффективность и финансовый менеджмент». Его высокое значение говорит об эффективности использования технического проекта. Высокие баллы безопасности и надежности, удобства в эксплуатации и предполагаемый срок эксплуатации позволяют судить о корректно выполненной разработке системы.

**ЗАДАНИЕ ДЛЯ РАЗДЕЛА
«СОЦИАЛЬНАЯ ОТВЕТСТВЕННОСТЬ»**

Студенту:

Группа	ФИО
4ВМ6Б	Толеутаев Канат Амантаевич

Школа	ИШНПТ	Отделение	Материаловедения
Уровень образования	Магистр	Направление/специальность	12.04.02. Опотехника

Исходные данные к разделу «Социальная ответственность»:

1. Характеристика объекта исследования (вещество, материал, прибор, алгоритм, методика, рабочая зона) и области его применения	Объектом исследования является микроводоросль <i>Chlorella Vulgaris</i> . Область применения – сельское хозяйство.
--	--

Перечень вопросов, подлежащих исследованию, проектированию и разработке:

1. Производственная безопасность	<p>Анализ выявленных вредных факторов:</p> <ul style="list-style-type: none"> – отклонение параметров микроклимата в помещении; – отклонение концентрации вредных веществ в воздухе рабочей зоны. <p>Анализ выявленных опасных факторов:</p> <ul style="list-style-type: none"> – электробезопасность.
2. Экологическая безопасность:	<p>Анализ воздействия объекта на:</p> <ul style="list-style-type: none"> – атмосферу (выбросы); – литосферу (отходы).
3. Безопасность в чрезвычайных ситуациях:	<p>Возможные чрезвычайные ситуации:</p> <ul style="list-style-type: none"> – пожар;
4. Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности:	<ul style="list-style-type: none"> – специальные (характерные при эксплуатации объекта исследования, проектируемой рабочей зоны) правовые нормы трудового законодательства; – организационные мероприятия при компоновке рабочей зоны.

Дата выдачи задания для раздела по линейному графику

Задание выдал консультант:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
Профессор	Назаренко Ольга Брониславовна	д. т. н.		

Задание принял к исполнению студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ВМ6Б	Толеутаев Канат Амантаевич		

5 Социальная ответственность

В последнее время микроводоросли стали многообещающим альтернативным сырьем, которое представляет собой огромное биоразнообразие с множеством преимуществ, превышающих потенциал обычного сельскохозяйственного сырья. Как и любой другой фитопланктон, микроводоросли имеют питательную ценность [6].

В течение последних двух десятилетий микроводоросли начали новый курс с растущими потребностями, вызванными истощением запасов ископаемого топлива, последующим ростом цен на нефть и проблемой глобального потепления. Эти драматические пороги заставляют мир находить глобальные стратегии смягчения углекислого газа, предлагая альтернативные возобновляемые источники сырья и интенсифицируя исследования биотоплива третьего поколения. В этом контексте микроводоросли в настоящее время рассматриваются как перспективный устойчивый энергетический ресурс из-за их способности накапливать большое количество липидов, пригодных для производства биодизеля, который очень похож на нефтяное топливо [8]. Они также оказались источником таких продуктов, как белки, углеводы, пигменты, витамины и минералы [9]. Кроме того, микроводоросли захватывают солнечный свет и выполняют фотосинтез, производя приблизительно половину атмосферного кислорода на Земле и поглощая огромное количество углекислого газа в качестве основного сырья. Поэтому выращивание их рядом с электростанциями для сжигания имеет большое значение из-за их замечательной способности поглощать углекислый газ, который они превращают в потенциальные компоненты биотоплива, продуктов питания, кормов и компонентов с высокой добавленной стоимостью [10].

5.1 Производственная безопасность

5.1.1 Анализ вредных и опасных факторов

Производственная безопасность представляет собой систему организационных мероприятий и технических средств, уменьшающих вероятность воздействия на персонал опасных производственных факторов, вредных воздействий технологических процессов, энергии, средств, предметов, условий и режимов труда до приемлемого уровня. В связи, с чем необходимо выявить вредные и опасные производственные факторы, которые могут возникать в процессе культивирования микроводоросли *Chlorella Vulgaris*. Результаты проведенного анализа представлены в таблице 5.1 с учетом, что эксперименты проводились в учебной лаборатории.

Таблица 5.1. Опасные и вредные факторы при культивировании микроводоросли *Chlorella Vulgaris*

Источник фактора, наименование видов работ	Факторы		Нормативные документы	
	Вредные	Опасные	Вредные факторы	Опасные факторы
1) Подготовка установк у (фотобиореактор) и образцов к эксперименту; 2) Процесс культивирования; 3) Измерение с помощью оптических методов (спектрофотометр, датчик мутности, микроскоп) получаемые данные	Отклонение показателей микроклимата в помещении	Электрический ток	СанПиН 2.2.4.548-96 [64]	ГОСТ 12.1.038-82 ССБТ [65]
	Отклонение концентрации вредных веществ в воздухе рабочей зоны			

5.1.2 Отклонение параметров микроклимата в помещении

Микроклимат производственных помещений – это климат внутренней среды этих помещений, который определяется действующими на организм человека сочетаниями температуры, влажности и скорости движения воздуха.

Согласно [64], показателями, характеризующими микроклимат, являются: температура воздуха, относительная влажность воздуха, скорость движения воздуха, интенсивность теплового излучения.

Влияние микроклимата на самочувствие человека значимо и существенно, а переносимость температуры во многом зависит от скорости движения и влажности окружающего воздуха - чем выше показатель относительной влажности, тем быстрее наступает перегрев организма. Недостаточная влажность, в свою очередь, может негативно отражаться на организме, становясь причиной пересыхания и растрескивания кожи и слизистой, а также последующего заражения болезнетворными микроорганизмами. Длительное воздействие высокой температуры при повышенной влажности может привести к гипертермии, или накоплению теплоты и перегреву организма, а пониженные показатели температуры, особенно при повышенной влажности воздуха, могут быть причиной гипотермии, или переохлаждения.

Необходимые условия микроклимата различаются для теплого и холодного времени года. Они делятся на оптимальные, обеспечивающие полный тепловой комфорт, и допустимые, которые могут приводить к некоторому дискомфорту, но находятся в пределах адаптивных возможностей человека. Все категории работ разграничиваются на основе интенсивности энергозатрат организма в Вт.

Экспериментальная часть ВКР проводилась в лабораторных условиях, по энергозатратам ее следует отнести к категории Ia – работа легкая физическая, производимая сидя или связанная с ходьбой, но не требующая систематического физического напряжения или поднятия и переноса тяжестей. Оптимальные и допустимые параметры микроклимата для категорий Ia на рабочем месте приведены в таблицах 5.2 и 5.3 [64].

Таблица 5.2. Оптимальные величины показателей микроклимата на рабочих местах производственных помещений для категорий Ia [64]

Период года	Температура воздуха, °С	Температура поверхностей, °С	Относительная влажность воздуха, %	Скорость движения воздуха не более, м/с
холодный	22 .. 24	21 .. 25	60 .. 40	0,1
теплый	23 .. 25	22 .. 26	60 .. 40	0,1

Таблица 5.3. Допустимые величины показателей микроклимата на рабочих местах производственных помещений для категорий Ia [64]

Период года	Температура воздуха, °С		Относительная влажность, %	Скорость движения воздуха, м/с	
	Диапазон ниже оптимальных величин	Диапазон выше оптимальных величин		Диапазон ниже оптимальных величин	Диапазон выше оптимальных величин
холодный	20 .. 21,9	24,1 .. 25	15 .. 75	0,1	0,1
теплый	21 .. 22,9	25,1 .. 28	15 .. 75	0,1	0,2

Отопление лаборатории и корпуса в целом водяное с применением радиаторов, что обеспечивает постоянное и равномерное нагревание воздуха в холодное время года. В рабочем помещении имеется как естественная вентиляция, так и принудительная. Для обеспечения оптимальных и допустимых показателей микроклимата в холодный период года следует применять средства защиты рабочих мест от остекленных поверхностей оконных проемов, чтобы не было охлаждения. В теплый период года необходимо предусмотреть защиту от попадания прямых солнечных лучей.

5.1.3 Отклонение концентрации вредных веществ в воздухе рабочей зоны

Стерилизация, или обеспложивание (от лат. «sterilis» - бесплодный) означает полное уничтожение зародышей микроорганизмов в питательных средах, посуде и т.д. Стерилизация очень важна в фикологических (альгологических) исследованиях, особенно при поддержании живых организмов в качестве изолированных штаммов в культуре [66].

Существует множество методов стерилизации, которые условно можно разделить на четыре категории: стерилизацию путем нагревания, стерилизацию при помощи электромагнитного излучения, стерилизацию при помощи фильтрации и химическую стерилизацию (см. табл. 5.4). Стерилизация с помощью нагревания является обычным способом стерилизации и, как правило, требует высоких температур ($\geq 100^{\circ}\text{C}$) при условии, что стерилизуемые материалы устойчивы к высоким температурам (например, стекло, металлические инструменты, алюминиевая фольга). Жидкости стерилизуются методом фильтрации, когда они содержат нестойкие компоненты, разрушающиеся при высокой температуре.

Таблица 5.4. Использование и ограничение использования различных методов стерилизации [66]

Категория	Метод	Сущность метода	Использование	Ограничение
Химические вещества	Отбеливатель (гипохлорит натрия)	1-5 мл на 1 л, несколько часов	Большой объем воды для аквакультуры	Цисты могут выживать; требуется последующая нейтрализация (например, тиосульфат натрия, 250г/л маточного раствора, 1мл на 4мл отбеливателя)
	Этанол	50-70% раствор	Очень распространенный метод общей дезинфекции	Некоторые устойчивые микроорганизмы

Продолжение таблицы 5.4

	Оксид этилена	Герметичная комната или сосуд с высоким давлением	Пластиковые или каучуковые продукты, не стойкие к нагреванию продукты	Взрывчатые вещества, химические остатки проблематичны или токсичны
	Хлорид ртути (HgCl ₂)	0,1%; добавить небольшое количество NaCl и разбавить дистиллированной водой	Антисептик и средство дезинфекции	Яд; не для материалов, контактирующих с живыми клетками
	Фенол (карболовая кислота)	3% раствор	Антисептик и средство дезинфекции	Яд; не для материалов, контактирующих с живыми клетками
	Раствор крезола	3-5% раствор	Антисептик и средство дезинфекции	Яд; не для материалов, контактирующих с живыми клетками
	Формальдегид (формалин)	2-5% раствор	Антисептик и средство дезинфекции	Яд; не для материалов, контактирующих с живыми клетками

Электромагнитные волны (например, ультрафиолетовое излучение, γ -излучение, x -излучение и микроволновое излучение) используются как альтернативные способы стерилизации для материалов, которые не выдерживают высокой температуры (например, изделия из пластика или жидкости с неустойчивыми компонентами). В настоящее время одноразовая пластиковая посуда стерилизуется при помощи γ -излучения. Наконец, для стерилизации могут быть использованы различные химикаты, однако следы химических веществ могут сохраняться после обработки, и могут быть вредными для водорослей и исследователей. И поэтому, мы стараемся не

использовать химических веществ для стерилизации. При использовании соблюдались меры безопасности.

5.1.4 Электрический ток

Электробезопасность представляет собой систему организационных и технических мероприятий и средств, обеспечивающих защиту людей от вредного и опасного воздействия электрического тока [67]. В зависимости от индивидуальных показателей человека (масса, рост, строение тела, пол, род занятий), его физического состояния (болезнь, наличие состояния алкогольного опьянения), параметров протекающего тока (сила тока и его частота), состояния окружающей среды зависит поражающее воздействие на организм.

Одним из наиболее опасных параметров являются переменный ток с частотой от 10 до 120 Гц. Наиболее безопасным напряжением для человека является до 12 В, условно безопасным до 36 В [65]. Опасной величиной считается ток, более 1 мА, а смертельным более 100 мА. Опасность поражения человека электрическим током существует во всех случаях, когда используются электрические установки и оборудование.

По условиям электробезопасности установки, используемые при выполнении дипломной работы, относятся к категории установок, работающих с напряжением до 220 В. Устройства относятся к 1 классу, так как имеют рабочую изоляцию и места для заземления. В системе, в соответствии с ГОСТ 12.1 009-76, применяется рабочая изоляция.

Безопасность эксплуатации при нормальном режиме работы установок обеспечивается следующими защитными мерами:

1. Применение изоляции;
2. Недоступность токоведущих частей;
3. Применение малых напряжений;
4. Изоляция электрических частей от земли.

Ток, который может вызвать травму, появляется в фотобиореакторе только при повреждении (пробое) первичной обмотки, когда вторичный виток оказываются под напряжением питающей сети (220, 380 В).

Согласно ПУЭ (7-е изд.) [64] данная лаборатория относится к категории помещения – без повышенной опасности. Так как в ней учтены все необходимые правила по электробезопасности, это сухое помещение без повышенного напыления, температура воздуха нормальная, пол покрыт изоляционным материалом. Влажность воздуха не превышает 75%, отсутствует токопроводящая пыль, температура не превышает 35°C. Все сотрудники проходят первичный инструктаж по электробезопасности.

Основными техническими средствами защиты человека от поражения электрическим током, используемыми отдельно или в сочетании друг с другом, являются: защитное заземление, защитное зануление, защитное отключение, электрическое разделение сети, малое напряжение, электрозащитные средства, уравнивание потенциалов, двойная изоляция, предупредительная сигнализация, блокировка, знаки безопасности.

Искусственное заземление – это преднамеренное электрическое соединение какой-либо точки электрической сети, электроустановки или оборудования с заземляющим устройством.

5.2 Экологическая безопасность

Экологическая безопасность – это допустимый уровень негативного воздействия со стороны природных и антропогенных факторов экологической опасности на окружающую среду и человека.

Соответственно, негативное влияние на атмосферу будет заключаться только в скоплении пыли на рабочем месте, а воздействие на литосферу будет характеризоваться утилизацией твердых бытовых отходов (бумага, отходы от образцов и т.п.).

Решения по обеспечению экологической безопасности:

1. для литосферы – вывоз твердых бытовых отходов, с последующей переработкой [68].

2. для атмосферы – проведение ежедневной влажной уборки на рабочем месте и проветривание помещения.

Фотобиореактор работает непосредственно от электрической сети. Более того, микроводоросль хлорелла имеет свойство потреблять большое количество углекислого газа и перерабатывать его в кислород, следовательно, установка не вызывает загрязнения природы.

Учитывая замену традиционных источников света в установке на светодиодные, сокращается потребление электроэнергии за счет того, что светодиоды имеют максимальную светоотдачу, обладают более высоким (до 80 %) коэффициентом полезного использования электроэнергии по сравнению с другими источниками. Кроме того, конструктивные особенности светодиодных систем позволяют размещать источники света внутри суспензии микроводорослей, что позволяет лучше утилизировать энергию излучения. В силу своей твердотельной конструкции светодиоды более экологически безопасны и в отличие от люминесцентных ламп не содержат ртути, что так же положительно сказывается на окружающей среде.

5.3 Безопасность в чрезвычайных ситуациях

5.3.1 Пожарная безопасность

Пожарная безопасность предусматривает обеспечение безопасности людей и сохранения материальных ценностей предприятия на всех стадиях его жизненного цикла. Основными системами пожарной безопасности являются системы предотвращения пожара и противопожарной защиты, включая организационно-технические мероприятия.

Ответственность за обеспечение мер пожарной безопасности при проведении пожароопасных работ возлагается на руководителя подразделения, на территории которого проводятся работы.

Требования инструкции являются обязательными для исполнения всеми сотрудниками.

Лица, виновные в нарушении Правил пожарной безопасности, несут дисциплинарную, административную или уголовную ответственность в соответствии с действующим законодательством.

Основные причины возникновения пожара:

Воспламенение термопласта в результате повышения температуры нагревателей из-за:

- отказа терморегуляторов и датчиков температуры;
- неправильной установки датчиков температуры и силовых разъемов для электропитания нагревателей.

Воспламенение используемых материалов в результате взрыва от повышенной температуры летучих продуктов термоокислительной деструкции или взрывов термопласта, содержание которых в воздухе рабочей зоны превысило предельно-допустимые нормы.

Воспламенение изоляции электрических проводов, автотрансформаторов, трансформаторов, в результате длительного воздействия повышенной нагрузки, короткого замыкания или других причин.

Меры предупреждения возникновения пожара:

Перед началом технологического процесса необходимо проверить;

- исправность нагревателей в фотобиореакторе;
- правильность установки датчиков температуры;
- правильность подключения силовых разъемов питающих проводов;
- исправность автоматизированной системы регулирования температуры.

Во время технологического процесса каждые 30 минут производить осмотр рабочего оборудования, контроль температуры в фотобиореакторе.

В случае перегрева фотобиореактора необходимо:

- отключить питание нагревателей;
- отключить систему регулирования температуры;
- устранить причину перегрева;
- устранить возникшие неисправности;
- охладить фотобиореактор до заданной температуры, затем продолжить технологический процесс.

При невозможности устранить возникшие неисправности необходимо обесточить соответствующее электрооборудование и сообщить о происходящем руководителю лаборатории.

Для локализации или ликвидации загорания на начальной стадии используются первичные средства пожаротушения. Первичные средства пожаротушения обычно применяют до прибытия пожарной команды. Углекислотные (ОУ-2) и порошковые огнетушители предназначены для тушения электроустановок, находящихся под напряжением до 1000 В. Кроме того, порошковые применяют для тушения документов. Для тушения токоведущих частей и электроустановок применяется переносной порошковый огнетушитель, например, ОП-5.

В общественных зданиях и сооружениях на каждом этаже должно размещаться не менее двух переносных огнетушителей. Огнетушители следует располагать на видных местах вблизи от выходов из помещений на высоте не более 1,35 м.

Здание должно соответствовать требованиям пожарной безопасности, а именно, наличие охранно-пожарной сигнализации, плана эвакуации, порошковых огнетушителей с поверенным клеймом, табличек с указанием направления к эвакуационному выходу.

В нашей лаборатории имеются следующие средства огнетушения:

- ручные огнетушители
- бочки с водой
- ящики с песком
- ручной пожарный инструмент и инвентарь (ведра, ломы, топоры, лопаты, багры и т.п.).

5.4 Правовые и организационные вопросы обеспечения безопасности

В лабораторию, чтобы делать эксперименты допускаются только те люди, которые ознакомлены инструкциями по работе лабораторных установках.

1. Достаточное рабочее пространство, позволяющее осуществить все необходимые движения и перемещения.

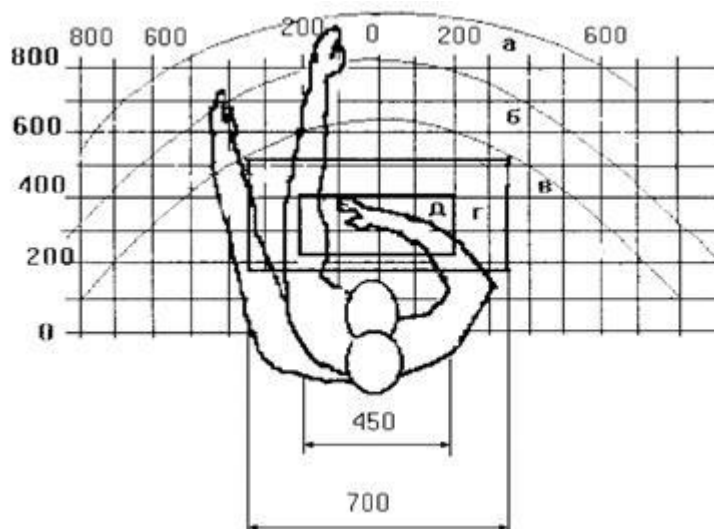


Рисунок 5.1 — Зоны досягаемости рук в горизонтальной плоскости. а - зона максимальной досягаемости; б - зона досягаемости пальцев при вытянутой руке; в - зона легкой досягаемости ладони; г - оптимальное пространство для грубой ручной работы; д - оптимальное пространство для тонкой ручной работы.

2. Достаточные зрительные, физические и слуховые связи между инженером и машиной.

3. Оптимальное размещение оборудования, входящего в состав рабочего места.

4. Рабочее кресло должно легко перемещаться и поворачиваться, иметь регулируемое по высоте сиденье, наклон спинки и сиденья, а также оптимальную твёрдость рабочих поверхностей.

Расположение фотобиореактора должна обеспечивать безопасные условия труда и удобства при эксплуатации, техническом обслуживании и ремонте. В нашем случае фотобиореактор компактной и все эти требования соблюдении.

6 Заключение

1. Настоящее исследование показало, что *Chlorella Vulgaris* растёт в фотопериоде 20L: 4D лучше, чем других фотопериодах. Основываясь на этот результат, мы полагаем, что использование этого фотопериода в производстве, намного улучшить скорость роста *Chlorella Vulgaris*.

2. Повышение интенсивности света до $180 \text{ мкмоль м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ и облучения синим светом привело к фотоингибированию. В процессе фотоингибирование наблюдалась снижение активности фотосинтеза.

3. Исследование показало, что световая длина волны оказывает заметное влияние на темпы роста *Chlorella Vulgaris*. Синий и белый свет не показывали положительной тенденции в темпах роста по сравнению с красным светом.

4. Из этого исследования сделан вывод, что все оптические методы не может точно прогнозировать рост *Chlorella Vulgaris* при высоких концентрациях. Это связано тем, что закон Ламберта-Бера игнорирует рассеяние и может привести к недопустимым ошибкам.

5. Но при малых плотностях клеток методы спектроскопии и турбидиметрии показали хорошие результаты.

6. Мы считаем, что качественные микроскопические наблюдения должны дополнять любой выбранный метод, чтобы указать «состояние» клетки и избежать «фундаментальной ошибки» - возможного изменения вовлеченного организма, так как через загрязнение.

Список публикаций

1. Baktybayev A., Turanov S., Romanenko S., Toleutaev K. Effective modernization of the optical irradiating system in greenhouse // Key Engineering Materials. – 2018. – №769. – С. 388-393.
2. Бактыбаев А. А., Туранов С. Б., Толеутаев К. А. Эффективная модернизация оптической облучающей системы в тепличном хозяйстве // Высокие технологии в современной науке и технике (ВТСНТ-2017) : сборник научных трудов VI Международной научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов, г. Томск, 27–29 ноября 2017 г. / Национальный исследовательский Томский политехнический университет (ТПУ) ; под ред. А. Н. Яковлева. — Томск: Изд-во ТПУ, 2017. — С. 130-131.
3. Бактыбаев А. А., Толеутаев К. А. К вопросу единого подхода конвертации световых величин в единицы фитохарактеристик //

Список используемых источников

1. Field C. B., Behrenfeld M. J., Randerson J. T., Falkowski P. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components // *Science*. – 1998. – №28. – С. 237-240.
2. Bialon J., Rath T. Growth rates and photon efficiency of *Chlorella vulgaris* in relation to photon absorption rates under different LED types // *Algal Research*. – 2018. – №31. – С. 204–215.
3. Becker E. W. Microalgae for human and animal nutrition, Second Edition, Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. – 2013. – С. 461–503.
4. Khalili A., Najafpour G. D., Amini G., Samkhaniyani F. Influence of Nutrients and LED Light Intensities on Biomass Production of Microalgae *Chlorella vulgaris* // *Biotech. and Biopro. Eng.* – 2015. – №20. – С. 284-290.
5. Геворгиз Р. Г., Алисиевич А. В., Шматок М. Г. Оценка биомассы *Spirulina Platensis* (Nordst.) Geitl. по оптической плотности культуры // *Экология моря*. – 2005. – №70. – С. 96-106.
6. Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P. Y., Garcia C. V. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review // *Ren. and Sust. Energy Rev.* – 2014. – №35. – С. 265–278.
7. Fradique M., Batista A. P., Nunes M. C., Gouveia L., Bandarra N. M., Raymundo A. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: preparation and evaluation // *J. Sci. Food Agric.* – 2010. – №90. – С. 1656–1664.
8. González Fernández C., Sialve B., Bernet N., Steyer J. P. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part I: focus on cultivation and biofuel production // *Biofuel. Bioprod. Biorefin.* – 2012. – №6. – С. 105–113.
9. Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review // *Renew. Sustain. Energy Rev.* – 2010. – №14. – С. 217–232.

10. Spolaore P., Joannis Cassan C., Duran E., Isambert A. Commercial applications of microalgae // *J. Biosci. Bioeng.* – 2006. – №101. – C. 87–96.
11. Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances // *Plant. J.* – 2008. – №54. – C. 621–639.
12. Beijerinck M. Kulturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen // *Algen. Botanische. Ztg.* – 1890. – №48. – C. 729.
13. Kitada K., Machmudah S., Sasaki M., Goto M., Nakashima Y., Kumamoto S., et al. Supercritical CO₂ extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris* // *J. Chem. Technol. Biotechnol.* – 2009. – №84. – C. 657-661.
14. Morris H. J., Carrillo O. V., Almarales Á., Bermúdez R. C., Alonso M. E., Borges L, et al. Protein hydrolysates from the alga *Chlorella vulgaris* 87/1 with potentialities in immunonutrition // *Biotechnol. Appl.* – 2009. – №26. – C. 162-165.
15. de Souza Queiroz J., Barbosa C. M., da Rocha M. C., Bincoletto C, Paredes Gamaro E. J., de Souza Queiroz M. L., et al. *Chlorella vulgaris* treatment ameliorates the suppressive effects of single and repeated stressors on hematopoiesis // *Brain Behav. Immun.* – 2012. – №29. – C. 39-50.
16. Sano T., Tanaka Y. Effect of dried, powdered *Chlorella vulgaris* on experimental atherosclerosis and alimentary hypercholesterolemia in cholesterol-fed rabbits // *Artery.* – 1987. – №14. – C. 76-84.
17. Zheng H., Yin J., Gao Z., Huang H., Ji X., Dou C. Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2011. – №164. – C. 1215-1224.
18. Yamamoto M., Fujishita M., Hirata A., Kawano S. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) // *J. Plant. Res.* – 2004. – №117. – C. 257-264.

19. Brennan L., Owende P. Biofuels from microalgae a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products // *Renew. Sustain. Energy Rev.* – 2010. – №14. – C. 557-577.
20. Příbyl P., Cepák V., Zachleder V. Production of lipids and formation and mobilization of lipid bodies in *Chlorella vulgaris* // *J. Appl. Phycol.* – 2013. – №25. – C. 545-553.
21. Converti A., Casazza A. A., Ortiz E. Y., Perego P., Del Borghi M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production // *Chem. Eng. Process: Process Intensif.* – 2009. – №48. – C. 1146-1151.
22. Lv J. M., Cheng L. H., Xu X.H., Zhang L., Chen H. L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions // *Bioresour. Technol.* – 2010. – №101. – C. 6797-6804.
23. Liu Z. Y., Wang G. C., Zhou B. C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* // *Bioresour. Technol.* – 2008. – №99. – C. 4717-4722.
24. Richmond A., Boussiba S., Vonshak A., Kopel R. A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors // *J. Appl. Phycol.* – 1993. – №5. – C. 327-332.
25. Chisti Y. Biodiesel from microalgae // *Biotech. Adv.* – 2007. – №25. – C. 294-306.
26. Lee Y. K. Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential // *J. Appl. Phycol.* – 2001. – №13. – C. 307-315.
27. Chojnacka K., Marquez Rocha F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae // *Biotechnology.* – 2004. – №3. – C. 21-34.
28. Liang Y., Sarkany N., Cui Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions // *Biotechnol. Lett.* – 2009. – №31. – C. 1043-1049.
29. Khoeyi Z. A., Seyfabadi J., Ramezanpour Z. Effect of light intensity and photo period on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris* // *Aquacult. Int.* – 2012. – №20. – C. 41-49.

30. Tzovenis I., Pauw N. D., Sorgeloos P. Effect of different light regimes on the docosahexaenoic acid (DHA) content of *Isochrysis aff. Galbana* (clone T ISO) // *Aquac. Int.* – 1997. – №5. – C. 489-507.
31. Sanchez Saavedra M. P., Voltolina D. Effect of photon fluence rates of white and blue-green light on growth efficiency and pigment content of three diatom species in batch cultures // *Cienc. Mar.* – 2002. – №28. – C. 273-279.
32. Bouterfas R., Belkoura M., Dauta A. The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake // *Limnologia*. – 2006. – №25. – C. 647-656.
33. Daliry S., Hallajisani A., Mohammadi Roshandeh J., Nouri H., Golzary A. Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth // *Global J. Environ. Sci. Manage.* – 2007. – №3. – C. 217-230.
34. Hultberg M., Asp H., Marttila S., Bergstrand K. J., Gustafsson S. Biofilm Formation by *Chlorella vulgaris* is Affected by Light Quality // *Curr. Microbiol.* – 2014. – №69. – C. 699-702.
35. Al Qasmi M., Raunt N., Talebi S., Al Rajhi S., Al Barwani T. A review of effect of light on microalgae growth // *Proceedings of the World Congress on Engineering*. – 2012. – №1. – C. 4-6.
36. Blair M. F., Kokabian B., Gude V. G. Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production // *J. of Envir. Chem. Engin.* – 2014. – №2. – C. 665-674.
37. Ruyters G. Effects of blue light on enzymes, in: H. Senger (Ed.), *Blue Light Effects in Biological Systems*, Springer-Verlag, Berlin, – 1984. – C. 283-301.
38. Yan C., Zhang L., Luo X., Zheng Z., Effects of various LED light wavelengths and intensities on the performance of purifying synthetic domestic sewage by microalgae at different influent C/N ratios // *Ecol. Eng.* – 2013. – №51. – C. 24-32.
39. Barghbani R., Rezaei K., Javanshir A. Investigating the effects of several parameters on the growth of *Chlorella vulgaris* using Taguchi's experimental approach // *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.* – 2012. – №1. – C. 128-133.

40. Matthijs H. C., Balke H., Van Hes U. M., Kroon B., Mur L. R., Binot R. A. Application of light emitting diodes in bioreactors: Flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*). *Biotechnol. Bioeng.* – 1996. – №50. – C. 98-107.
41. Kim D. G., Lee C., Park S. M., Choi Y. E. Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris* // *Biores. Tech.* – 2014. – №159. – C. 240-248.
42. Wang C. Y., Fu C. C., Liu Y. C. Effects of using light emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochem. Eng. J.* – 2007. – №37. – C. 21-25.
43. Lee C. G., Palsson B. Ø. High density algal photobioreactors using light emitting diodes // *Biotechnol. Bioeng.* – 1994. – №44. – C. 1161-1167.
44. Das P., Lei W., Aziz S. S., Obbard J. P. Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light // *Biores. Tech.* – 2001. – №102. – C. 3883-3887.
45. Oldenhof H., Zachleder V., van den Ende H. Blue and red light regulation of the cell cycle in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta) // *Eur. J. Phycol.* – 2006. – №41. – C. 313-320.
46. Yun Y. S., Park J. M. Kinetic Modeling of the Light Dependent Photosynthetic Activity of the Green Microalga *Chlorella vulgaris* // *Biotech. and Bioeng.* – 2003. – №83. – C. 303-311.
47. Yun Y. S., Park J. M. Attenuation of monochromatic and polychromatic lights in *Chlorella vulgaris* suspensions // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – №55. – C. 765-770.
48. Aiba S. Growth kinetics of photosynthetic microorganisms // *Adv. Biochem. Eng.* – 1982. – №23. – C. 85-156.
49. Cornet J. F., Dussap C. G., Dubertret G. A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina plantensis* in photobioreactors. I. Coupling between light transfer and growth kinetics // *Biotechnol. Bioeng.* – 1992. – №40. – C. 817-825.

50. Cornet J. F., Dussap C. G., Cluzel P., Dubertret G. A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina plantensis* in photobioreactors. II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations // *Biotechnol. Bioeng.* – 1992. – №40. – C. 826-834.
51. Ever E. G. A model for light limited continuous cultures: growth, shading, and maintenance // *Biotechnol. Bioeng.* – 1991. – №38. – C. 254-259.
52. Iehana M. Kinetic analysis of the growth of *Spirulina* sp. on continuous culture // *J. Ferment. Technol.* – 1983. – №61. – C. 457-466.
53. Prokop A., Erickson L. E. Photobioreactors. In: Prokop A, Erickson L E, editors. *Bioreactor system design*. New York: Marcel Dekker, Inc. – 1995. – C. 441-477.
54. Van Liere L., Mur L. R. Growth kinetics of *Oscillatoria agardhii* Gomont in continuous culture, limited in its growth by the light energy supply // *J. Gen. Microbiol.* – 1979. – №115. – C. 153-160.
55. Molina Grima E., Garcia Camacho F., Sanchez Perez J. A., Acien Fernandez F. G., Fernandez Sevilla J. M. Evaluation of photosynthetic efficiency in microalgal cultures using averaged irradiance // *Enzyme. Microb. Technol.* – 1997. – №21. – C. 375-381.
56. Molina Grima E., Garcia Camacho F., Sanchez Perez J. A., Fernandez Sevilla J. M., Acien Fernandez F. G., Contreras Gomez A. A mathematical model of microalgal growth in light limited chemostat culture // *J. Chem. Tech. Biotechnol.* – 1994. – №61. – C. 167-173.
57. Rabe A. E., Benoit R. J. Mean light intensity: a useful concept in correlating growth rates of dense cultures of microalgae // *Biotechnol. Bioeng.* – 1962. – №4. – C. 377-390.
58. Tamiya H., Hase E., Shibata K., Mituya A., Iwamura T., Nihei T., Sasa T. Kinetics of growth of *Chlorella*, with special reference to its dependence on quality of available light and on temperature. In: Burlew J S, editor. *Algal culture from laboratory to pilot plant*. Washington, D C: Carnegie Institution of Washington Publication. – 1953. – C. 204-232.

59. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для студ.высш.учеб.заведений / Под ред. А.И.Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
60. Флуоресцентный спектрофотометр CARY ECLIPSE фирмы «Аджилент» [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://cn.agilent.com/cs/library/brochures/5990-7788RU.pdf> (дата просмотра) 23.05.2018.
61. Morais I. P. A., Toth I. V., Rangel A. O. S. S. Turbidimetric and Nephelometric Flow Analysis: Concepts and Applications // Spectroscopy Letters. – 2006. – №39(6). – С. 547-579.
62. Skoog D. A. Miscellaneous optical methods. In Principles of Instrumental Analysis, 3rd ed.; Saunders College Publishing: Philadelphia, 1985; pp. 379–381.
63. Braun R. D. Radiative scattering. In Introduction to Instrumental Analysis; McGraw Hill: New York, 1987; p. 428.
64. СанПиН 2.2.4.548-96. Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений.
65. ГОСТ 12.1.038-82 ССБТ. Электробезопасность. Предельно допустимые уровни напряжений прикосновения и токов.
66. Современные методы выделения и культивирования водорослей / Под ред. Гайсина Л. А., Фазлутдинова А. И., Кабиров Р. Р. Уфа: Изд. БГПУ, 2008. – 152с.
67. Правила устройства электроустановок. 7-е изд. – СПб.: ДЕАН, 2013. – 704с.
68. ГОСТ 17.4.3.04-85. Охраны природы. Почвы. Общие требования к контролю и охране от загрязнения.
69. ГОСТ 12.1.033-81 ССБТ. Пожарная безопасность. Термины и определения
70. ГОСТ 12.1.005-88. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.

Приложение А

Раздел (1) Обзор литературы

Студент:

Группа	ФИО	Подпись	Дата
4ВМ6Б	Толеутаев Канат Амантаевич		

Консультант отделение материаловедения ИШНПТ:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата

Консультант – лингвист отделение материаловедения ИШНПТ:

Должность	ФИО	Ученая степень, звание	Подпись	Дата
доцент	Парнюгин А. С.	к. п. н.		

1 Literature review

1.1 Morphology, composition, production and applications of *Chlorella vulgaris*

Recently, microalgae have become a promising alternative raw material, which is a huge biodiversity with many advantages, exceeding the potential of conventional agricultural raw materials. Like any other phytoplankton, microalgae have nutritional value [6]. The first to consume the blue-green microalga was the Aztecs and other Mesoamericans, who used this biomass as an important source of food. Currently, these microscopic organisms continue to be consumed as a nutritional supplement, such as *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* [7], and their products are also used for a variety of purposes, such as dyes, pharmaceuticals, pet food, aquaculture and cosmetics.

Over the past two decades, microalgae have started a new course with growing demands caused by the depletion of fossil fuel reserves, the subsequent rise in oil prices and the problem of global warming. These dramatic thresholds are forcing the world to find global strategies for carbon dioxide mitigation by proposing alternative renewable feedstocks and intensifying researches on third-generation biofuels. In this context, microalgae are currently regarded as a promising sustainable energy resource because of their ability to accumulate a large amount of lipids suitable for biodiesel production, which is very similar to petroleum fuel [8]. They also proved to be a source of products such as proteins, carbohydrates, pigments, vitamins and minerals [9]. In addition, microalgae capture sunlight and perform photosynthesis, producing about half of atmospheric oxygen on Earth and absorbing huge amounts of carbon dioxide as the main raw material. Therefore, growing them next to combustion plants is important because of their remarkable ability to absorb carbon dioxide, which they convert into potential components of biofuels, foods, feeds and components with high added value [10].

Microalgae represent a huge biodiversity, of which about 40,000 have already been described or analyzed [11]. One of the most remarkable is the green eukaryotic microalga *C. vulgaris*, which belongs to the following scientific classification: Domain: Eukaryota, Kingdom: Protista, Division: Chlorophyta, Class: Trebouxiophyceae, Order: Chlorellales, Family: Chlorellaceae, Genus: Chlorella, Species: *Chlorella vulgaris*. Consequently, the Dutch explorer Martinus Willem Beijerinck first discovered it in 1890 as the first microalga with a well-defined nucleus [12]. The name Chlorella comes from the Greek word chloros (Χλωρός), which means green, and the Latin suffix ella is its microscopic size. It is a unicellular microalga that grows in fresh water and has been present on earth since the pre-Cambrian period 2.5 billion years ago and since then its genetic integrity has remained constant. By the early 1900s, the chlorella protein content (>55% dry weight) had attracted the attention of German scientists as an unconventional source of food. In the 1950s, the Carnegie Institution in Washington took part in the study and managed to grow this microalga on a large scale to combat CO₂ emissions. At present, Japan is the world leader in Chlorella consumption and uses it for treatment [13], because it showed that it has immunomodulating and anti-cancer properties [14]. After feeding it to rats, mice and rabbits in the form of powder, it showed protection properties against hematopoiesis [15] age-related diseases like cardiovascular diseases, hypertension and cataract; it lowers the risk of atherosclerosis and stimulates collagen synthesis for skin [16]. Furthermore, *C. vulgaris* is also capable of accumulating important amounts of lipids, especially after nitrogen starvation with a fatty acid profile suitable for biodiesel production [17].

C. vulgaris is a spherical microscopic cell with a diameter of 2-10 μm [18] and has a number of structural elements similar to plants (Fig. 1).

C. vulgaris is a non-motile reproductive cell (autospore) that reproduces asexually and rapidly. Thus, within 24 h, one cell of *C. vulgaris* grown in optimal conditions multiplies by autospore formation, which is the most common asexual reproduction in algae. In this manner, four daughter cells having their own cell wall are formed inside the cell wall of the mother cell (Figs. 2 and 3) [18]. After

maturation of these newly formed cells, the mother cell wall ruptures, allowing the liberation of the daughter cells and the remaining debris of the mother cell will be consumed as feed by the newly formed daughter cells.

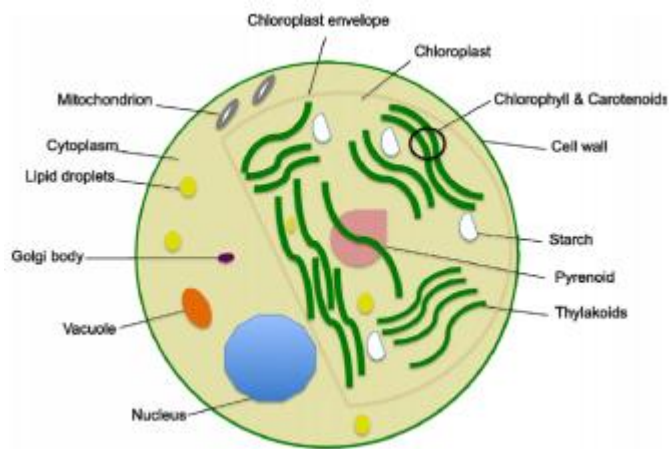


Figure 1 - Schematic ultrastructure of *C. vulgaris*, representing various organelles [6]

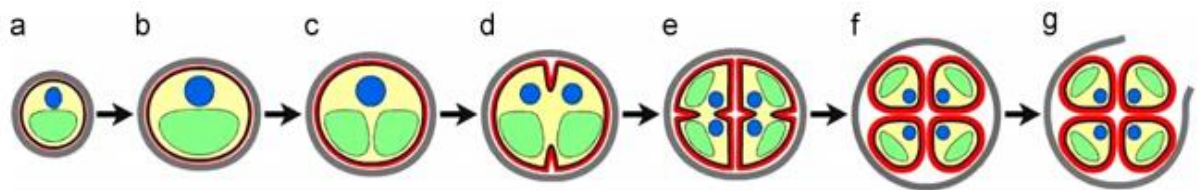


Figure 2 - Drawings showing the different phases of formation of daughter cell walls in *Chlorella vulgaris*: a) early phase of cell growth; b) late phase of cell growth; c) Phase separation of chloroplasts; d) early phase of protoplast fission; e) phase of late protoplast fission; f) the maturation phase of the daughter cells; and g) the hatching phase [18]

Annual production of chlorella reached 2000 tons (dry weight) in 2009, and the main producers are Japan, Germany and Taiwan [19]. This microalga has a rapid growth rate and reacts to each set of growth conditions by changing the yield of a particular component. *C. vulgaris* is ideal for production, because it is extremely resistant to harsh conditions and invaders. On the one hand, the content of lipids and starch increases, and the productivity of biomass ceases or decreases [20] under adverse growth conditions, such as nitrogen and phosphorus restriction, high CO₂

concentration, excessive light exposure [21-22], excess iron in medium [23] or increase in temperature [24]. On the other hand, the protein content increases under normal and controlled growth conditions (addition of nitrogen). Therefore, many methods of growth have been tested in order to voluntarily target the productivity of biomass, the content of lipids, proteins, carbohydrates and pigments.

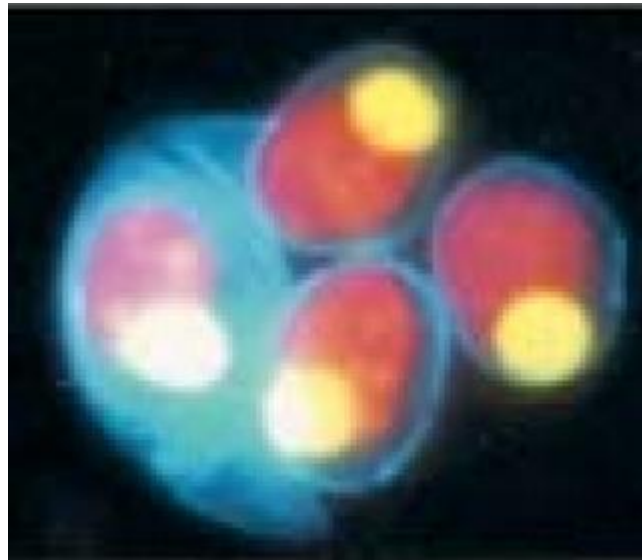


Figure 3 - The newly formed cells extend beyond the cell wall of the maternal cell after hatching [18].

It is known that the growth characteristics and composition of microalgae largely depend on cultivation conditions [27]. There are four main types of conditions for the cultivation of microalgae: photoautotrophic, heterotrophic, mixotrophic and photogenotrophic cultures [27]. Each type of cultivation is discussed in detail below.

Photoautotrophic cultivation occurs when microalgae use light, for example sunlight, as an energy source, and inorganic carbon (for example, carbon dioxide) as a carbon source to generate chemical energy through photosynthesis. This is the most commonly used condition for cultivation for microalgae growth. In comparison with other types of cultivation, the problem of pollution is less pronounced when using photoautotrophic growth. Thus, systems for the cultivation of microalgae in the open air (such as open ponds) are usually operated under photoautotrophic cultivation

conditions [9]. Photoautotrophic cultivation can be divided into open ponds and closed photobioreactors.

Open ponds are the most common way of production and are the cheapest method for large-scale biomass production. These systems are divided into natural waters (lakes, lagoons and ponds) or sewage or artificial ponds or containers. They are usually built next to power plants or heavy industry with a massive release of carbon dioxide, where biomass absorbs nitrogen from the atmosphere in the form of NO^x . To ensure that all cells can easily be exposed to sunlight, especially at the end of the exponential growth phase, the optimal pond depth is 15-50 cm [19,24]. On the other hand, open pond systems have some limitations because they require a strict environmental control to avoid the risk of pollution, water evaporation, contaminants, bacterial invasion and the risk of growth of other species of algae. In addition, temperature differences due to seasonal change cannot be controlled and CO_2 concentration and excess sunlight exposure are difficult to control. Moreover, near the end of the exponential growth phase, some cells are not exposed to sunlight, because other cells floating near the surface cover them, which leads to lower mass yields. Therefore, mixing of the medium is preferred and is currently practiced.

Closed photobioreactor was implemented mainly to overcome some of the limiting factors in open pond systems, thus growing biomass in a controlled environment (pH, light intensity, temperature, carbon dioxide concentration) for obtaining a higher concentration of cells and products that are more suitable for the production of pure pharmaceuticals, nutraceuticals and cosmetics. In addition, these systems are more suitable for sensitive strains that cannot compete and grow in harsh conditions. Feeding the biomass with CO_2 comes by bubbling the tubes. Fluorescent lamps are used if the tubes are insufficient or insufficiently exposed to sunlight. Tubes usually have a diameter of 20 cm or less [25], and the thickness of their transparent walls is several millimeters, which provides appropriate absorption of light. Thus, several designs were used and tested: a photobioreactor with a flat plate, a tubular photobioreactor and column photo-bioreactor. Nevertheless, the main

shortcomings of the closed system are the cost of a complex design, a small area of illumination and sterilising costs [26].

Some types of microalgae can not only grow under phototrophic conditions, but also use organic carbon under dark conditions, like bacteria. The situation when microalgae use organic carbon as a source of energy and carbon is called heterotrophic cultivation [27]. This type of cultivation could avoid problems associated with limited light that interfere with high cell density in large-scale photobioreactors in photoautotrophic cultivation. The sources of carbon used for *C. vulgaris* are glucose, acetate, glycerol and glutamate with the maximum specific growth rate obtained with glucose. However, the main disadvantage of this system is the price and availability of sugars, which compete with raw materials for other purposes, such as food and biofuel production. A heterotrophic sugar-based system often suffers from pollution problems.

C. vulgaris is able to combine both autotrophic and heterotrophic methods by carrying out photosynthesis, as well as ingesting organic materials such as glucose, which is most suitable for *C. vulgaris* [28]. Consequently, the cells do not depend strictly on light or an organic substrate. This method successfully competes with autotrophic systems. The main advantages of mixotrophic metabolism are the limitation of the effect of biomass loss on dark breath and the reduction of the amount of organic substrates used for growing biomass.

Photogerotrophic cultivation is when microalgae require light when using organic compounds as a carbon source. The main difference between mixotrophic and photoheterotrophic cultivation is that the latter requires light as an energy source, while mixotrophic cultivation can use organic compounds for this purpose. Consequently, photogeotrophic cultivation simultaneously requires both sugar and light [27]. Although the production of some easily regulated beneficial metabolites can be enhanced by the use of photoheterotrophic cultivation, the use of this approach for obtaining biodiesel is very rare, as in the case of myxotrophic cultivation.

1.2. Effect of light intensity and photoperiod on *C. vulgaris* biomass

One of the main factors that affect the physiology and kinetics of chlorella growth is light conditions [29]. The amount and quality of light determine the amount of energy available for photosynthetic organisms to conduct their metabolic activities. Numerous studies with microalgae of various groups indicate that pigments, unsaturated fatty acids, carbohydrates and protein content all change in response to an increase or decrease in the intensity of light. Variations in the light-dark regime impose changes in the cellular content of proteins, carbohydrates and lipids. At work [29], the effect of light intensity and photoperiod on the biomass of *C. vulgaris* was investigated. Irradiation was carried out with the help of cold fluorescent lamps of white color.

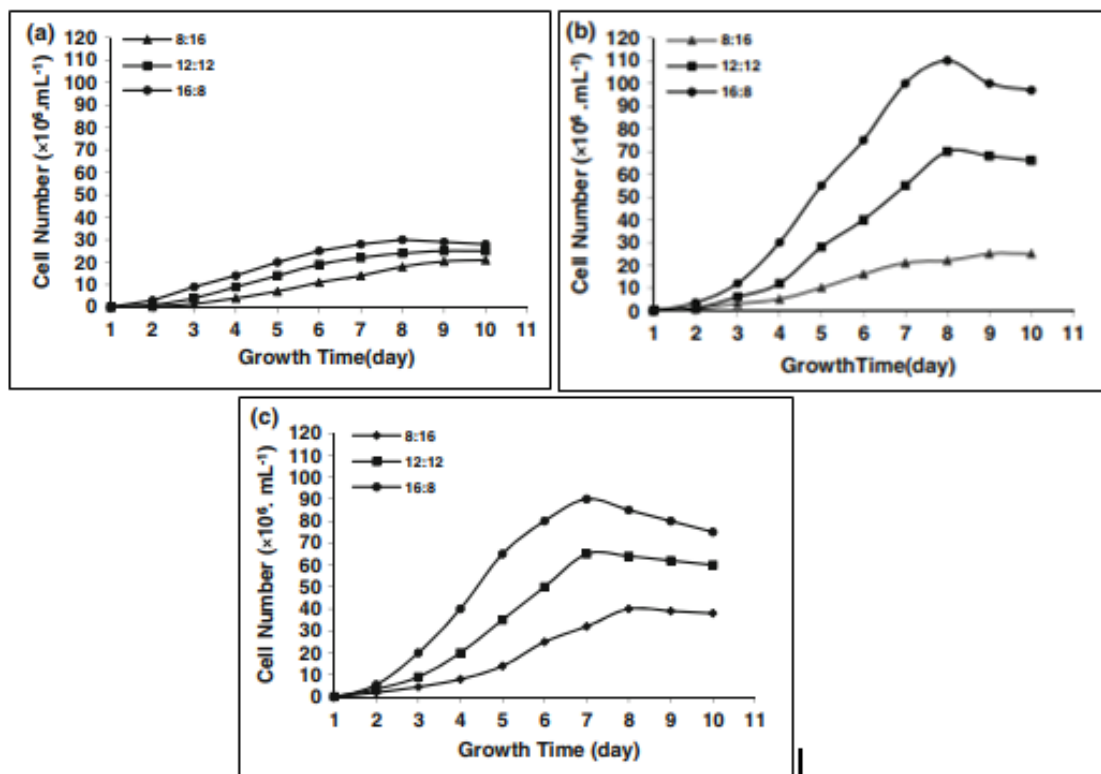


Figure 4 - Changes in the concentration of *C. vulgaris* cells grown in three different photoperiods (8L: 16D, 12L: 12D, 16L: 8D) and light intensity ($37.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a, $62.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ b, $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ c) [29]

The intensities of light (37.5, 62.5 and 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and light / dark cycles (8:16, 12:12 and 16: 8 h) as separate parameters and their interaction significantly influenced the biomass of *C. vulgaris* at the end of the exponential phase of growth (Figure 4a-c) [29]. A longer duration of light resulted in an increase in the biomass of *C. vulgaris* (Figure 5). However, the intensity of light exerted a different influence on biomass; an increase in the light intensity from 37.5 to 62.5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ led to an increase in biomass, but at 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ the biomass decreased. The maximum biomass of $2.05 \pm 0.1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ was recorded at an intensity of 62.5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and 16: 8 h, and the minimum biomass of $0.6-0.07 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ reached at 37.5 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ intensity and 8:16 [29].

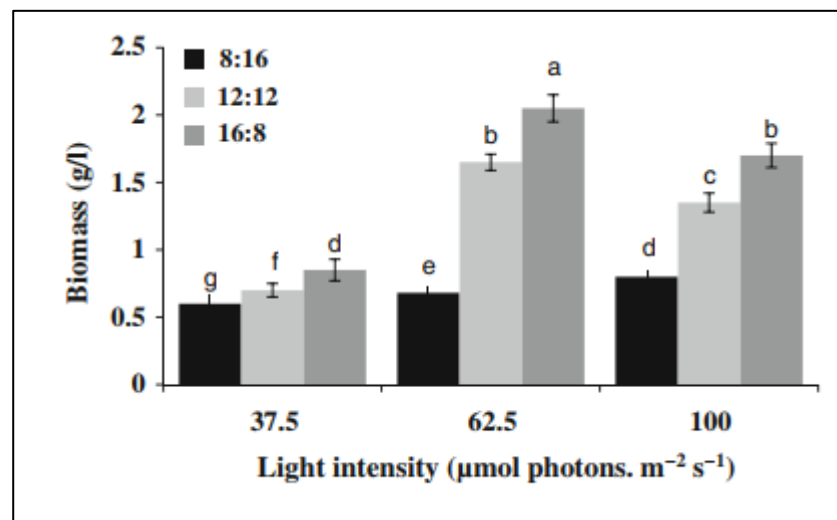


Figure 5 - Biomass of *C. vulgaris* in three photoperiods (8:16, 12:12 and 16: 8 h light / dark) and light intensity (37.5, 62.5 and 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) [29]

One study showed that phytoplankton growth depends on the total amount of light per day, and in other studies it has been established that, depending on the type of phytoplankton, growth can be controlled only by the photoperiod [30-31]. The results in [29] on the photoperiod showed that an increase in the duration of light from 8:16 to 16: 8 h had a favorable effect on biomass production. Indeed, the light / dark regime allows for either an increase in final concentration or a lowering of production costs. The need for a dark phase was explained by the fact that

photosynthesis is regulated by two reactions: a photochemical phase that depends on light and another, a biochemical dark phase that does not depend on light. Compounds that are produced in a phase that depends on light (ATP, NADPH) are used in the dark phase to synthesize the metabolic molecules necessary for growth. In addition, [32] reported that some enzymes in the cycle of pentoses of photosynthesis and fixation of CO₂ are inactive during irradiation. According to the same work [32], the affinity of carboxydimatase to CO₂ sharply decreases in the dark, when the pH decreases. Its activity can be completely blocked. This inactivation blocks the absorption of ribulose 1,5-diphosphate, such as complete absorption, may inhibit the resumption of photosynthesis in the light. The dark phase remains necessary, at least for the regeneration of the cofactors (NAD⁺, NADP⁺) required for phase I photosynthesis.

With the 15/9 photoperiod cycle, using a series of photographs taken at each hour of the day, [32] showed that cell division occurs in dark conditions for many unicellular Chlorophyceae. Cell division occurs in the dark phase, as well as in the illuminated phase. If the cell balance that gives mitosis is possible under dark and lighted conditions, cell division occurs more often after the interruption of the illuminated phase. Therefore, it is preferable to use a photoperiod with a light duration of 12 to 15 hours to provide the equilibrium that is established between anabolic and catabolic events during the photoperiod cycle. In addition, for industrial use and accounting for the ratio of energy costs and the corresponding biomass production, the duration of illumination for 12-15 hours for the illuminated phase is usually considered optimal for algae growth [32].

Biomass production in many microalgae has increased under high light conditions, which is an expected response to high light, which usually leads to an increase in reproduction until the saturation point intensity is observed, and then photoinhibition was observed, which limits further biomass production. This effect is caused by the reaction of photo-oxidation within the cell, since excess light can not be absorbed by the photosynthetic apparatus [29].

Illumination consists of two subjects: intensity and wavelength of light. The available data indicate that light acts as a guide and helps to influence cell proliferation and helps cellular respiration and photosynthesis. During endothermic reactions for carbon metabolism, energy is needed and this energy is supplied by light. Light is the main factor in the process of photosynthesis for the conversion of carbon dioxide into organic compounds, such as carbohydrates and proteins, in which water and oxygen are released. If the growth of microalgae occurs with light restriction, the cellular mechanisms progress to form carbon into amino acids and other important compounds for cells, but the production of sugar and starch increases in saturated light, and the maximum growth rate stabilizes. Nevertheless, some results indicate a non-competitive lighting strategy, as growth rates remain high and production costs are reduced. This is due to the fact that cell division for single-stranded photosynthetic culture usually occurs in dark conditions. However, for other cases, cell division occurs in both dark and light phases, but for vulgaris microalgae, more cell division occurs after the illumination phase is stopped. Moreover, some enzymatic mechanisms may be disabled during lighting [33-35].

At work [22], the dependence of biomass on the intensity of light was investigated. Figure 6 shows the change in biomass concentration and *Chl a* content when the KNO_3 concentration and the intake of CO_2 concentration were monitored at 1.0 mM and 1.0%, respectively. The growth of cells increased with increasing light intensity. As shown in Fig. 6 (a), only 0.37 g / l was obtained at an intensity of 24 $\mu\text{moles of photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, which may be due to light confinement. With increasing light intensity up to 60 $\mu\text{moles of photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, the cells continuously grew and 0.75 g / l *C. vulgaris* was collected at a stationary stage. However, with a further increase in the light intensity to 120 $\mu\text{mol of photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, the cell concentration slightly increased at the initial stage of cultivation, after which a much lower equilibrium biomass concentration of 0.63 g / l was achieved, compared with that at 60 $\mu\text{moles of photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ [22]. Reducing the concentration of biomass at 120 $\mu\text{mol of photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ can be associated with photoinhibition.

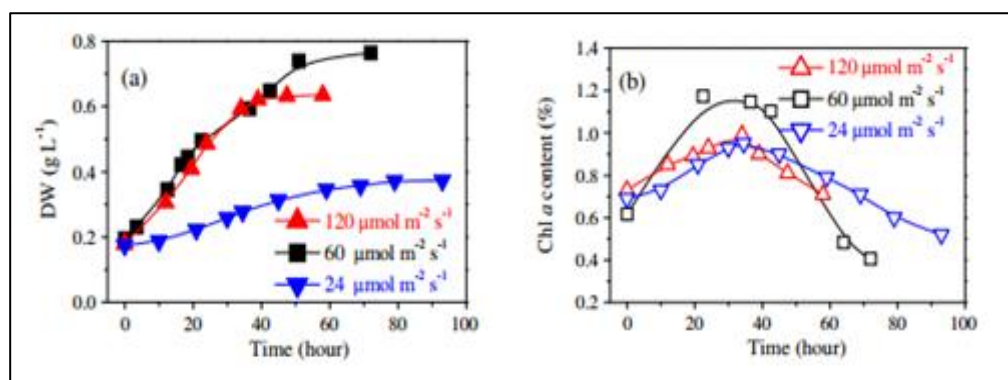


Figure 6 - Effect of irradiation on the concentration of biomass (a) and Chl a content of *Chlorella vulgaris* (b). (Concentration of KNO₃, 1.0 mM, feed gas, 1.0% CO₂, gas velocity, 1.2 L min⁻¹, continuous lighting, temperature 25 °C) [22]

The influence of light intensity on the content of Chl a corresponded to the content of biomass. As shown in Fig. 6 (b), the maximum content of Chl a increases with light intensity of the order of 24, 120 and 60 μmoles of photons m⁻² s⁻¹. Light can lead to changes in pH, Mg²⁺ and NADPH in the stroma, which will modulate the activity of key enzymes in the synthesis of fatty acids. The effect of light intensity on the production of lipids was found in accordance with the effect on biomass production. The intensity of light in 60 μmol of photons m⁻² s⁻¹ can promote positive changes in pH, Mg²⁺ and NADPH, and then indirectly enhance the activity of key enzymes, while light limiting and light attenuation can reduce the activity of the enzyme. Therefore, not only the highest lipid content of 20.0% but also the largest biomass concentration of 0.75 g L⁻¹ were obtained for *C. vulgaris* cultivated under 60 μmol of photons m⁻² s⁻¹, whereas cells cultivated under 24 and 120 μmol of photons m⁻² s⁻¹ had the lipid content of 14.1% and 11.0%, respectively. Thus, the maximum lipid productivity of 40 mg L⁻¹ d⁻¹ was obtained at 60 μmol of photons m⁻² s⁻¹, which was about 2 times as that under 120 μmoles of photons m⁻² s⁻¹ [22].

In nature, the mode of light is intermittent, and the intensity varies daily. Thus, changes in the amount of light lead to differences in biomass and biochemical composition, and microalgae show different adaptations to different conditions.

1.3 Influence of different wavelengths of light on the growth of *Chlorella Vulgaris*

Microalgae photosynthesize, i. e., they assimilate inorganic carbon for conversion into organic matter. Light is the source of energy that stimulates this reaction, and in this regard, it is necessary to take into account intensity and spectral quality. As a rule, microalgae use light with a wavelength of 400 to 700 nm for photosynthesis. The wavelengths absorbed by microalgae differ depending on the species. For example, green microalgae absorb light energy for photosynthesis with chlorophylls as the main pigment absorbing light energy in the range of 450-475 nm and 630-675 nm and carotenoids as an auxiliary pigment absorbing light energy of 400-550 nm [36]. Several studies reported the growth of microalgae in different wavelengths of light. Red (600-700 nm) and blue light (400-500 nm) stimulate the growth of microalgae, and the growth rate and lipid content in microalgae differ in the intensity of light [36, 38, 4].

It was shown in [36] that the wavelengths of light exert a noticeable influence on the growth rates of algae. Red and green light did not show a positive trend in growth rates compared to white and blue light waves (Figure 7). In [36], compact fluorescent lamps with a power of 60 W ($276 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were used for irradiation. They were placed at a distance of 20 cm from the photobioreactors to exclude the temperature effect, which can be caused by irradiation.

Figure 7 shows that white, blue and red light showed the highest growth rates on day 3, and they look like this: 0.369 d^{-1} , 0.235 d^{-1} and 0.140 d^{-1} , respectively (Figure 7B). The green light had the highest growth rate on day 2 which is 0.137 d^{-1} . It was reported that green light is most effective in the production of cellular carbohydrates (i.e., CH_2O), derived from CO_2 . In addition, a green photon has 20% more energy than one red photon (i.e., 680 nm) and 15.5% less energy than a blue photon (i.e., 470 nm). Consequently, a higher exposure to green light may have some inhibitory effect due to higher energy supplied. Although it can be seen that blue light has more energy than a green photon, it was reported that blue photon supports the

growth of algae. The productivity of bulk biomass is shown in Fig. 7C. The highest volumetric productivity of biomass was 0,038 g / l*d, 0,0199 g / l*d and 0,0096 g / l*d for white, blue and red lights, respectively, on the third day, but for green light this was 0.0088 g / l*d on the 2nd day [36].

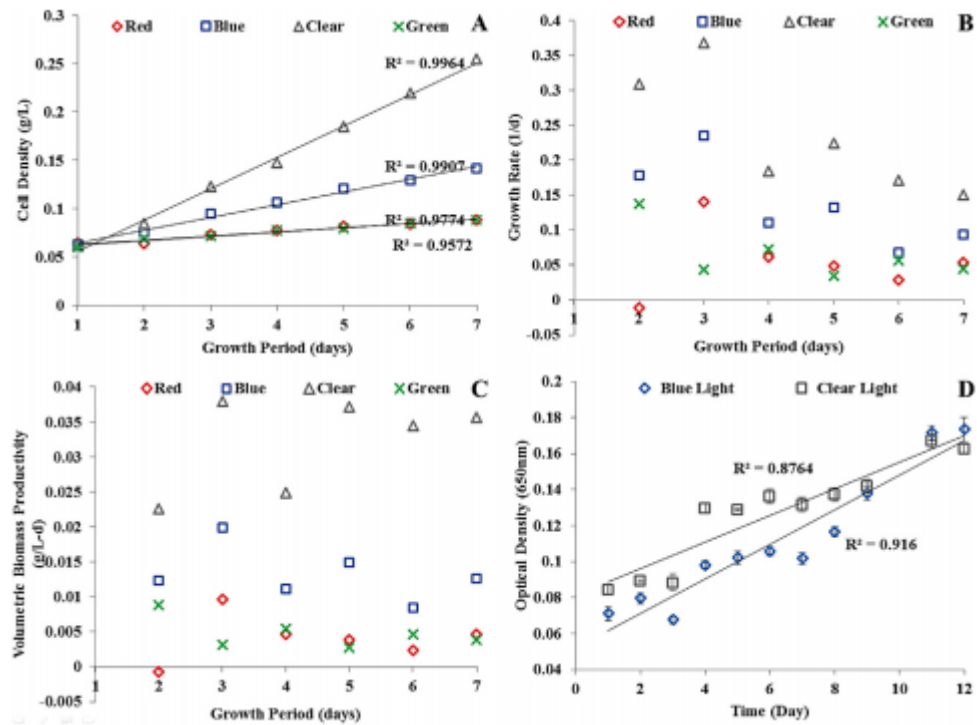


Figure 7 - Effect of wavelength of light on: (A) cell density; (B) growth rates; (C) the productivity of bulk biomass; and (D) optical density for a 12-day period [36]

It turned out that the seven-day results do not represent a complete cycle of algae growth, except for red and green light, which consistently show lower growth rates, prolonging growth periods that are not ideal for practical use. Another set of experiments was conducted using blue and transparent lights for 12 days. The results are shown in Figure 7D. The growth curves were somewhat similar (linear growth) with a trend observed in the seven-day growth profiles (Fig. 7A). It can be seen that algal growth rates were comparable between blue and white wavelengths during the growth period of 0-10 days. But it can be noticed that the growth rates of algae for blue light exceeded the growth rate of algae for white light (after 10 days). This shows that the growth rate of algae (*C. vulgaris*) can be enhanced by the blue light after the acclimatization period [36].

In [36], red light did not show higher growth rates. This can be explained by the observations made by previous researchers who reported that pure red light could actually cause cell damage which can be recovered by slow and low exposure to blue [37, 4]. In addition, it should be noted that the specific absorption capacity of the optical wavelength depends on the type of alga meaning its cellular composition, growth medium and physiological conditions, as explained earlier. Yan et al. reported that pure (white) and red light showed higher growth rates of *C. vulgaris*, but their study was conducted between 6 and 10 days, and their growing medium was synthetic high-strength wastewater [38]. In addition, the growth characteristics depend on the intensity of light [29].

Figure 7D shows that the growth rate with blue light ($R^2 = 0.916$) appears to be closer to a linear trend than white light ($R^2 = 0.8764$) or even indicate a trend toward an exponential growth phase. Although the exponential growth phase is desirable for practical reasons, blue light requires a significant time lag to achieve exponential growth. Thus, the slow growth rate with blue light is not ideal for practical use, because the faster the exponential phase is reached, the higher the biomass production, the shorter will be the pond or photobioreactor volume for algae production, and the shorter the harvest time [36].