

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА

БІОТЕХНОЛОГІЯ МІКРОВОДОРСТЕЙ

Методичні вказівки
до практичних робіт спеціальності 162
«Біотехнології та біоінженерія»

Харків – 2024

Рецензенти:

О. В. Звягінцева – доцент кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії НТУ «ХПІ», к. б. н.;

О. В. Наглов – доцент ЗВО кафедри фізіології людини та тварин біологічного факультету ХНУ імені В. Н. Каразіна, к. б. н.

*Затверджено до друку рішенням Науково-методичної ради
Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна
(протокол № 7 від 16 квітня 2024 року)*

Біотехнологія мікроводоростей : методичні вказівки до практичних робіт спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» / уклад. А. В. Голтвянський, М. К Ковальова. – Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2024. – 56 с.

Методичні вказівки для студентів біологічного факультету спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» містять рекомендації щодо виконання практичних робіт. Рекомендації складено відповідно до програми дисципліни «Біотехнологія мікроводоростей», яка викладається студентам 3 курсу спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» біологічного факультету ХНУ імені В. Н. Каразіна. Методичні вказівки допоможуть здобувачам вищої освіти засвоїти теоретичний курс і набути практичних навичок.

УДК 60:582.261/.279](072)Г 61

© Харківський національний університет
імені В. Н. Каразіна, 2024

© Голтвянський А. В., Ковальова М. К., уклад., 2024

© Дончик І. М., макет обкладинки, 2024

Навчальне видання

Голтвянський Анатолій Володимирович
Ковальова Марина Костянтинівна

БІОТЕХНОЛОГІЯ МІКРОВОДОРОСТЕЙ

Методичні вказівки
до практичних робіт спеціальності 162
«Біотехнології та біоінженерія»

Коректор *О. В. Анцибора*
Комп'ютерне верстання *В. В. Савінкова*
Макет обкладинки *І. М. Дончик*

Формат 60×84/16. Ум. друк. арк. 2,28. Наклад 100 пр. Зам. № 87/24.

Видавець і виготовлювач
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,
61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3367 від 13.01.2009
Видавництво ХНУ імені В. Н. Каразіна

ЗМІСТ

Практична № 1. Приготування штучних поживних середовищ для культивування клітин мікроводоростей	4
Практична робота № 2. Характеристика розвитку мікроводоростей в умовах культури. Ріст мікроводоростей у періодичній культурі	13
Практична робота № 3. Морфометричний аналіз клітин	27
Практична робота № 4. Отримання субкультур водоростей на різних фазах росту	29
Практична робота № 5. Визначення біохімічного складу біомаси водоростей	32
Практична робота № 6. Визначення вмісту загальних ліпідів з клітин мікроводоростей	45
Практична № 7. Використання мікроводоростей в біотестуванні препаратів та харчових домішок	49
Рекомендована література	54

Практична робота № 1

Приготування штучних поживних середовищ для культивування клітин мікроводоростей

Мета роботи: Знайомство з основними поживними середовищами та їх компонентами для культивування мікроводоростей. Визначити основні компоненти поживних середовищ в залежності від виду водоростей і мети дослідження.

Знання, вміння та практичні навички, які повинні одержувати студенти: приготування штучних поживних середовищ для культивування клітин мікроводоростей на прикладі середовища Артарі; набути навичок з методики приготування живильних середовищ.

Основні теоретичні відомості

Мінеральне живлення водоростей – це сукупність процесів поглинання та засвоєння необхідних для росту і функціонування клітин хімічних елементів у формі іонів неорганічних солей. Водорості отримують необхідні мінеральні речовини з води, в якій вони зростають, а також з ґрунту.

Основні елементи і сполуки, які водорості використовують у своєму живленні, включають такі:

1. Діоксид вуглецю (CO_2) використовується водоростями в процесі фотосинтезу для вироблення органічних сполук. Неорганічний вуглець надходить до живильного розчину внаслідок барботування середовища повітрям з додаванням CO_2 , а також солей вугільної кислоти.

2. Нітроген (N) надходить у вигляді аніона NO_3^- або катіона NH_4^+ . Цей елемент потрібен для синтезу білків та інших органічних сполук. Нестача нітрогену суттєво впливає на формування пігментних систем структур хлоропласта та його загальну активність. Концентрація нітрогену визначає кількість і активність рибулозодифосфаткарбоксилази.

3. Фосфор (P) надходить у вигляді аніонів PO_4^{3-} . Водорості використовують фосфор для синтезу нуклеїнових кислот та фосфоліпідів, які складають клітинні мембрани. За умов нестачі фосфору порушуються фотохімічні та темнові реакції фотосинтезу. Особливо різко дефіцит фосфору проявляється при високій інтенсивності світла, при цьому більш чутливими виявляються темнові реакції. Однак при зменшенні вмісту фосфору в два рази інтенсивність фотосинтезу знижується в меншому ступені, ніж ростові процеси і загальна продуктивність рослин. Надлишок фосфору також гальмує швидкість фотосинтезу, імовірно, унаслідок зміни проникності мембран.

4. Калій (K^+) важливий для регулювання осмотичного тиску та активації ферментів. Зменшення вмісту калію в тканинах супроводжується значним зниження інтенсивності фотосинтезу і порушеннями інших процесів у рослині. У хлоропластах вищих рослин спостерігаються зміни

структури гран, крім того, продихи слабо відкриваються на світлі і недостатньо замикаються в темряві, погіршується водний режим листка, порушуються всі процеси фотосинтезу.

5. Кальцій (Ca^{2+}) необхідний для зміцнення клітинних стінок та інших функцій.

6. Магній (Mg^{2+}) використовується для синтезу хлорофіла, бере участь у діяльності спряжених білків при синтезі АТФ, впливає на активність реакцій карбоксилування і відновлення НАДФ, унаслідок чого його нестача порушує процес фотосинтезу.

7. Залізо (Fe^{3+}) у відновленій формі необхідне для процесів біотинтезу хлорофілу і залізовмісних сполук хлоропластів (цитохромів і фередоксину). Дефіцит заліза різко порушує функціонування циклічного і нециклічного фотофосфорилування, синтез пігментів і змінює структуру хлоропластів.

8. Мідь (Cu^{2+}) входить до складу пластоціаніну, тому в рослин дефіцит міді викликає зниження інтенсивності фотосинтезу.

Основні елементи. Карбон (С), гідроген (Н) і кисень (О), що складають більше 90 % вмісту сухої біомаси, часто не відносять до мінеральних елементів і виділяють в окрему групу основних елементів.

Макроелементи. У цю групу входять елементи, вміст яких у сухій масі рослини коливається від кількох відсотків до десятих часток відсотка. Сюди відносяться нітроген, калій, кальцій, фосфор, сульфур у складі (SO_4^{2-}), магній, кремній (Si), натрій (Na), залізо.

Мікроелементи. Відносяться елементи, вміст яких у сухій масі рослини складає від тисячних до сотисятисних часток відсотка. До цієї групи входять марганець (Mn), бор (B), мідь (Cu), літій (Li), йод (I), бром (Br), нікель (Ni), молібден (Mo), кобальт (Co), хлор (Cl), селен (Se).

Мікрородорості вирощують у водних розчинах, які містять необхідні для росту компоненти. Живильне (або базове) середовище містить воду, набір мінеральних солей, фактори росту (наприклад, вітаміни). Існує кілька типів культуральних середовищ, які класифікують за різними ознаками.

Мінімальне середовище – це культуральне середовище, яке містить лише основні складові, необхідні для зростання мікрородоростей. Включає тільки неорганічні солі та воду.

Селективне середовище використовується для росту конкретних організмів, відібраних за певними властивостями. Наприклад, якщо мікрородорості виявляють резистентність до певного антибіотика, цей антибіотик може додаватися до середовища, щоб пригнічувати ріст інших клітин, які не є резистентними. Такі селективні ростові середовища також використовуються для забезпечення виживання та розмноження клітин з певними характеристиками, наприклад здатністю синтезувати певні метаболіти.

Транспортне середовище призначене для тимчасового зберігання та перевезення мікрородоростей з метою подальшого їх культивування. Це

середовище забезпечує ефективне підтримання життєздатності мікроводоростей без зміни їх концентрацій. У такому середовищі присутні лише буферні розчини та неорганічні солі. Відсутність азоту, фосфору та органічних факторів росту пригнічує розвиток мікроводоростей.

Збагачене середовище містить поживні компоненти, необхідні для росту широкого спектра мікроводоростей, включаючи ті, що потребують специфічних умов для свого розвитку.

Запропоновано різноманітні живильні середовища для культивування мікроводоростей у лабораторних умовах. Більшість з них є модифікаціями раніше використовуваних середовищ, проте деякі складені на основі аналізу води з природних місць існування конкретних видів, а також з урахуванням екологічних особливостей походження штаму. Розробляючи або модифікуючи живильне середовище, необхідно враховувати наступне:

- 1) концентрацію і склад іонів макроелементів;
- 2) джерела азоту. Зазвичай для живлення мікроводоростей використовуються нітрати, амонійний азот та сечовина, з урахуванням виду водоростей та оптимального значення рН середовища. Зріст значно залежить від доступності азоту, оскільки більшість видів мікроводоростей містять 6–9 % азоту в перерахунку на суху біомасу. Враховуючи це, можна оцінити потребу водоростей у азоті. Так, для утворення 1 г біомаси в 1 л культуральної суспензії потрібно 0,5-0,6 г $\text{KNO}_3 \text{ л}^{-1}$;
- 3) джерела вуглецю;
- 4) мікроелементи. Зазвичай мікроелементи вводять у вигляді сумішей, де концентрація кожного елементу вже передбачена заздалегідь і встановлена експериментально з урахуванням потреб активного росту водоростей. Для забезпечення стабільності такої суміші мікроелементів часто використовують комплексоутворюючі сполуки, наприклад, ЕДТА;
- 5) вітаміни, фактори росту. Так, для росту багатьох видів водоростей необхідні вітаміни, зокрема вітамін B_{12} . Цей вітамін має важливе значення для біосинтезу нуклеїнових кислот та метаболізму амінокислот. Він може бути введений у живильні середовища водоростей для забезпечення їхнього нормального росту та функціонування.

Склад мінеральних середовищ

IBASU-A – Колекція культур мікроводоростей Інституту ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України (відділ альгології / фікології, ліхенології та бріології) (Microalgae Culture Collection of M.G. Kholodny Institute of Botany NAS of Ukraine, Dept. of Phycology, Lichenology and Bryology):

Артапі (Масюк, Терещук, 1983): NaCl – 116 г/л, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ – 50 г/л, KNO_3 – 2,5 г/л, K_2HPO_4 – 0,2 г/л, $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ – 2,5 мг/л, розчин мікроелементів – 15 мл. *Dunaliella viridis* Teodorig., автотроф, мезофіл, галофіл.

Болда та Болда-3N (Андрєєва, 1998): NaNO_3 – 250 та 750 мг/л, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ – 75 мг/л, NaCl – 25 мг/л, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ – 25 мг/л, KH_2PO_4 –

175 мг/л, K_2HPO_4 – 75 мг/л, $FeSO_4 \times 7 H_2O$ – 2,5 мг/л, розчин мікроелементів – 15 мл. *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dang, факультативний міксотроф, мезофіл, галофоб.

Бурреллі (Soeder, Hegewald, 1988): KNO_3 – 200 мг/л, $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 30 мг/л, $Ca(NO_3)_2$ – 30 мг/л, K_2HPO_4 – 40 мг/л, $FeSO_4 \times 7 H_2O$ – 3,3 мг/л, розчин мікроелементів – 15 мл. *Desmodesmus armatus* (Chodat) E. Hegew – (= *Scenedesmus armatus* (Chodat) Chodat), факультативний міксотроф, мезофіл, галофоб.

Тамія модифікована (Упитис, 1983): KNO_3 – 500 мг/л, $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 100 мг/л, KH_2PO_4 – 100 мг/л, ЕДТА (трилон Б) – 16 мг/л, $FeSO_4 \times 7 H_2O$ – 10 мг/л, розчин мікроелементів – 15 мл. *Chlorella vulgaris* Beij., факультативний міксотроф, мезофіл, відомий продуцент біомаси.

Чу № 13 (Largeau, et al., 1980): KNO_3 – 200 мг/л, $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 100 мг/л, KH_2PO_4 – 100 мг/л, $CaCl_2 \times 2 H_2O$ – 80 мг/л, залізо-цитрат – 20 мг/л, лимонна кислота – 200 мг/л, розчин мікроелементів – 15 мл, вітамін B_1 – 0,4 мг/л, вітамін B_{12} – 0,5 мкг/л. *Botryococcus braunii* Kütz.

Громова № 6 (Громов, Титова, 1983): KNO_3 – 1000 /0 мг/л, $MgSO_4 \times 7 H_2O$ – 200 мг/л, $CaCl_2 \times 2 H_2O$ – 150 мг/л, $NaHCO_3$ – 200 мг/л, K_2HPO_4 – 200 мг/л, мікроелементи – 15 мл. *Anabaena sp.* автотроф, мезофіл.

Розчин мікроелементів: H_3BO_3 – 2,86 мг/л, $MnCl_2 \times 4 H_2O$ – 1,81 мг/л, $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ – 0,22 мг/л, $Co(NO_3)_2 \times 4 H_2O$ – 0,15 мг/л, NH_4VO_3 – 2,3 мг/л, $CuSO_4 \times 5 H_2O$ – 0,01 мг/л.

Приготування живильних середовищ

Так, головними факторами, що впливають на стабільність живильного середовища, є природа його компонентів, їх здатність до взаємодії, температура, рівень рН, освітленість та наявність кисню. Давайте розглянемо вплив деяких з цих факторів на неорганічні компоненти живильного середовища.

Для запобігання випадінню осаду в живильному середовищі важливо враховувати деякі особливості обробки різних солей:

1. Солі амонію: їх рекомендується автоклавувати при рН нижче 7, оскільки при високому рН може виникати аміак, що може призвести до втрати частини азоту.

2. Іони магнію, калію, амонію, натрію та фосфату: ці іони можуть випадати у вигляді осаду, особливо якщо їх солі важко розчиняються. Наприклад, погано розчиняються змішані фосфорнокислі солі, такі як солі магнію та амонію, магнію та калію, магнію та натрію.

Запобігання випадінню осаду є важливою умовою для підтримання стабільності та ефективності живильного середовища для культивування мікроводоростей. Так, враховуючи ці особливості, сіль магнію краще автоклавувати окремо від фосфатів, оскільки змішані фосфорнокислі солі магнію та амонію, що погано розчиняються, можуть випадати у вигляді осаду. Щодо сульфату кальцію та фосфорних солей, їх розчинність дійсно

досить низька, тому може виникнути осад при певних умовах. У середовищі, що не містить агентів, які утворюють комплекси, практично всі іони заліза можуть випасти у вигляді осаду, якщо не проводити значне підкислення середовища. Природні середовища, як правило, містять амінокислоти та інші сполуки, що хелатують мікроелементи.

Для підготовки живильного середовища кожен компонент зважують у необхідній кількості на технічних терезах і окремо розчиняють у воді в спеціальних ємностях, постійно перемішуючи за допомогою мішалок. Після цього приготовані розчини мінеральних солей по черзі вносять у ферментер і ретельно перемішують. При безперервному культивуванні розчини солей вводять у ферментер роздільно по індивідуальних лініях. Цей процес забезпечує рівномірне розподілення компонентів у середовищі та підтримує стабільність і однорідність живильного середовища, що важливо для успішного культивування мікроводоростей.

Для забезпечення необхідного рівня вуглецевого живлення суспензію мікроводоростей постійно барботують повітрям з додаванням вуглекислоти крізь спеціальні пристрої. При періодичній ферментації на початку процесу інокулянт мікроводоростей вноситься вже до готового живильного середовища, яке містить усі компоненти. Джерела вуглецю вводять безпосередньо перед засівом або окремі компоненти середовища вводять по мірі споживання їх культурою, підтримуючи у ферментері деяку оптимальну їх концентрацію, яка на різних етапах ферментації може змінюватись за певним законом. Цей підхід дозволяє забезпечити мікроводоростям необхідні умови для активного росту та розвитку в процесі культивування.

Приготування маточних розчинів для штучних живильних середовищ включає наступні кроки:

1. Підготовка розчинів макро- і мікросолей: розчини макро- і мікросолей готують заздалегідь у концентрованих формах для подальшого використання. Маточні розчини макросолей готуються у концентраціях, які перевищують концентрації робочих розчинів у 10–40 разів, а розчини мікросолей та вітамінів – у 100–1000 разів.

2. Зберігання маточних розчинів: після приготування маточні розчини зберігають у холодильнику, щоб забезпечити їх стабільність та тривалий термін зберігання.

3. Організація зберігання: розчини хлористого або нітратного кальцію, а також хелати заліза можуть бути готові та зберігатися окремо від інших солей, щоб уникнути можливої реакції з іншими компонентами.

Цей підхід дозволяє зручно та ефективно використовувати розчини для підготовки робочих живильних середовищ, зокрема розчинів мікроелементів, у процесі культивування мікроводоростей.

Дотримання вимог асептики є ключовим елементом приготування живильних середовищ для культивування мікроводоростей. Це зазвичай

включає повну стерилізацію всіх потоків, що подаються, а також самого біореактора. Додатково може застосовуватися регулювання рН середовища, щоб запобігти росту сторонніх мікроорганізмів.

Для стерилізації газових потоків, зокрема повітря, часто використовується процес фільтрації через спеціальні волокнисті фільтри з послідовно розташованими фільтруючими елементами. Цей процес забезпечує видалення мікроорганізмів з повітря, що входить у біореактор, зберігаючи тим самим асептичні умови у середовищі культивування. Фільтруючий матеріал періодично стерилізується, надаючи пару у відключений фільтр через задані проміжки часу, що забезпечує ефективне усунення можливих забруднень.

Рідинні потоки можуть бути стерилізовані різними методами, і кожен з них має свої переваги та застосування:

1. Термічний метод: цей метод є найпоширенішим і полягає у піддаванні рідинних потоків впливу температури, зазвичай близько 120-150 °C. Висока температура руйнує мікроорганізми та інактивує їх, забезпечуючи ефективну стерилізацію.

2. Радіаційний метод: стерилізація рідинних потоків може також відбуватися за допомогою гамма-випромінювання (g-випромінювання). Однак цей метод застосовується рідко через складнощі у створенні та експлуатації потужних джерел цього випромінювання.

3. Фільтрація: іншим ефективним методом є фільтрація, коли рідинний потік пропускається через спеціальні фільтри, які усувають мікроорганізми з розчину. Справді, цей метод є ідеальним для стерилізації рідких та газових речовин, які нестійкі до впливу високих температур, оскільки він може здійснюватися за низьких температур і потребує лише градієнта тиску з різних боків мембрани. Основною складністю цього методу є наявність термостійких мембран, які можуть витримувати багаторазову стерилізацію. Проте на сьогоднішній день ця проблема успішно вирішується шляхом використання термостійких полімерів при виробництві мембран. Застосування термостійких полімерів дозволяє створювати мембрани, які здатні зберігати свою структуру та ефективність після повторних циклів стерилізації. Це важливо для забезпечення безпеки та ефективності процесу стерилізації рідких і газових засобів.

4. Хімічний метод: частково хімічний метод також може використовуватися, наприклад, застосування хімічних речовин, які мають властивості знищувати мікроорганізми. Усунення стерилізуючого агента з живильного середовища після загибелі мікрофлори перед внесенням інокуляту є ключовою проблемою. Хімічні антисептики, які застосовуються в цьому процесі, повинні мати високу ефективність у знищенні мікроорганізмів, а також легко руйнуватись при зміні умов після стерилізації. Пропіолактон є одним з найкращих антисептиків для цих цілей. Він відомий своєю сильною бактерицидною дією, тобто здатністю

ефективно знищувати бактерії. Одночасно він легко гідролізується, тобто руйнується в присутності води, утворюючи молочну кислоту. Цей процес забезпечує безпечне та ефективне усунення залишків антисептика після завершення процесу стерилізації.

Кожен з цих методів має свої переваги та обмеження, і вибір конкретного методу залежить від конкретних умов та вимог процесу стерилізації. Стерилізація приміщення проводиться наступним чином:

1. Миття підлоги: підлогу кімнати миють за допомогою 2–3 % розчину соди або фенолу. Це допомагає усунути бруд та мікроорганізми з поверхні.

2. Кварцування УФ лампами: перед початком роботи кімнату обробляють УФ лампами для знищення мікроорганізмів та забезпечення стерильних умов.

3. Стерилізація ламінарних боксів: ламінарні бокси зазвичай обладнані УФ лампами, які можуть залишатися увімкненими на ніч для стерилізації внутрішньої поверхні. Також перед роботою поверхню всередині ламінарного бокса протирають 96 % етиловим спиртом для додаткової стерилізації.

Стерилізація посуду може проводитися двома способами: сухим жаром у сушильній шафі або за допомогою автоклаву. Перед проведенням стерилізації необхідно ретельно вимити і обполоснути посуд дистильованою водою. Режим стерилізації в автоклаві зазвичай включають 20–30 хвилин при температурі 105 °C і тиску 1,5–2 атмосфери. У сушильній шафі стерилізація може тривати 1–2 години при температурі 160–180 °C. Важливо уникати підвищення температури вище 180 °C, оскільки це може спричинити буріння посуду.

Перед автоклавуванням посуд зазвичай обгортають у пергаментний папір. Стерилізація поживних середовищ зазвичай проводиться для твердих (агаризованих) і рідких середовищ у пробірках, колбах або іншому скляному посуді. Час стерилізації залежить від об'єму середовища і може варіюватися (табл. 1).

Таблиця 1

Режим автоклавування поживних середовищ

Об'єм середовища, мл	Час стерилізації (121 °C, 1 атм.), хв..
20-50	15
75	20
250-500	25
1000	30
2000	40

Хід роботи

Матеріали, реактиви й устаткування: мінеральні солі макро- та мікроелементів, шпателі, мірний посуд, піпетки, ваги, скляний фільтр.

1. За прописом готуємо середовище **Артаї** модифікації Масюк (1973) для вирощування мікроводоростей *Dunaliella viridis*. Для приготування розчину використовують дистильовану воду та мінеральні солі, що вказані нижче. Кожну сіль зважуємо окремо, розчиняємо, переливаємо в мірну колбу і доводимо обсяг до 1 літра. Після фільтруємо через скляний фільтр і визначаємо рН приготовленого середовища.

Склад середовища (г/л):

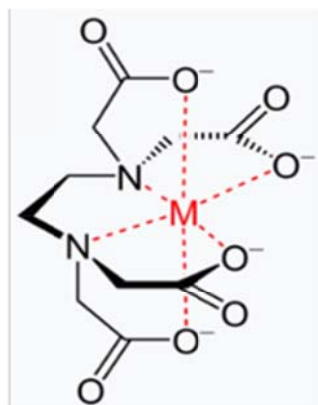
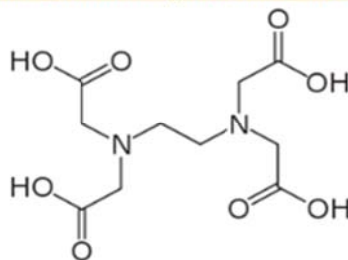
- NaCl – 116 г/л
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 50 г/л
- KNO_3 – 2,5 г/л
- K_2HPO_4 – 0,2 г/л
- рН – 6,3 -7

2. За прописом готуємо середовище Заррука (Zarrouk, 1966) для вирощування мікроводоростей *Arthrospira platensis* Gomont (= *Spirulina platensis* (Gomont) Geitler)., автотроф, нейтрофіл, алкаліфіл, термофіл, продуцент біомаси.

Для приготування розчину використовують дистильовану воду та мінеральні солі, які вказані нижче. Кожну сіль зважують окремо, розчиняють, переливають у мірну колбу і доводять обсяг до 1 літра. Після цього розчин фільтрують через скляний фільтр і визначають рН приготовленого середовища.

- NaHCO_3 – 16,8;
- K_2HPO_4 – 0,5;
- NaNO_3 – 2,5;
- K_2SO_4 – 1,0;
- NaCl – 1,0;
- $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2;
- CaCl_2 – 0,04;
- $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01;
- ЕДТА ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) – 0,08;
- рН – 8,3 - 8,4

Етилендіамінтетраоцтова кислота



Хелат метал—ЕДТА

Мікроелементи – по 1 мл кожного розчину на 1 л. Розчин мікроелементів 1 (г/л): H_3BO_3 – 2,86; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 1,81; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,22; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,08; MoO_3 – 0,015. Розчин мікроелементів 2 (мг/л): NH_4VO_3 – 23,00; $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \times 24\text{H}_2\text{O}$ – 96,00; $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 47,85; $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 17,94; $\text{Ti}_2(\text{SO}_4)_3$ – 40,00; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 44,00.

Завдання для навчально-дослідної роботи. Відповідно до виданих викладачем завдань порівняти склад різних (модифікованих) середовищ Тамія для культивування *Chlorella vulgaris*. Користуючись спеціальною літературою, запропонувати можливі пояснення впливу складу середовища на кількісний і якісний вміст біомаси у вирішенні різних біотехнологічних завдань.

Контрольні питання

1. Які існують типи живильних середовищ?
2. Що необхідно враховувати, модифікуючи живильне середовище?
3. Які фактори впливають на стабільність живильного середовища?
4. Алгоритм приготування живильного середовища.

Література: [1-4].

Практична робота № 2

Характеристика розвитку мікроводоростей в умовах культури. Ріст мікроводоростей у періодичній культурі

Мета роботи. Встановити характер росту досліджуваних культур мікроводоростей для періодичної культури фотометричним, мікроскопічним та методом зважування біомаси.

Основні теоретичні відомості

Зазвичай ріст мікроводоростей оцінюють за збільшенням їх маси або зростанням кількості клітин. Важливо зазначити, що збільшення маси не завжди відбувається разом із збільшенням кількості клітин, але також може бути пов'язане з їхніми розмірами. У процесі росту популяції мікроводоростей клітини розмножуються (діляться), тобто їх число зростає. Шляхом штучного культивування мікроводоростей зазвичай розрізняють поняття «відкритої» і «закритої» систем. З самого змісту цих термінів зрозуміло, що відкрита система – це та, в яку компоненти надходять і видаляються, тоді як закрита система – це та, в якій компоненти залишаються в системі. Якщо під час культивування постійно додаються поживні речовини і видаляється біомаса та продукти обміну речовин, система вважається відкритою, а культура – неперервною. Ріст мікроорганізмів у хемостаті і турбідостаті є прикладом неперервного культивування. Культуру мікроводоростей або мікроорганізмів називають періодичною або накопичувальною, якщо після початку її росту не додаються поживні речовини і не видаляється біомаса або кінцеві продукти обміну.

Періодична культура, що містить обмежену початкову кількість поживних компонентів, є закритою системою. Гомогенну періодичну культуру, яка добре переміщується і в середовищі відсутні градієнти концентрацій, називають простою гомогенною періодичною культурою.

Культура клітин – це сукупність генетично однорідних клітин, які здійснюють свою функцію та розмножуються у штучних умовах, зазвичай в лабораторії. Культури клітин, які були отримані шляхом управлених або випадкових мутацій, відомі як клітинні лінії.

Вивчення кінетичних особливостей розвитку клітинних популяцій є неможливим без розуміння закономірностей розвитку окремої клітини. Такі закономірності описуються клітинним циклом, який являє собою період від одного поділу клітини до наступного. У клітинному циклі еукаріотичних клітин виділяються чотири основні фази:

- 1) мітоз (М-фаза), в якій відбувається поділ материнської клітини на дві дочірні;
- 2) G1-фаза – проміжок часу від кінця М-фази до початку синтезу ДНК;

- 3) S-фаза – період синтезу ДНК;
 - 4) G2-фаза – проміжок часу від кінця S-фази до початку M-фази.
- Сукупність G1-, S- і G2-фаз називається інтерфазою.

Тривалість клітинного циклу може значно варіюватися, залежно від типу клітин. Від 0,5 до 2,0 годин (для мікробних і ембріональних клітин) до кількох десятків років (для гепатоцитів, нейронів). Різниця у тривалості клітинного циклу для різних типів клітин зумовлена відмінною тривалістю G1-фази.

При аналізі закономірностей розмноження та росту клітин використовуються терміни «швидкість» та «ріст клітин», враховуючи інтенсивність утворення клітин або біомаси. Про розмноження дізнаються внаслідок збільшення чисельності клітин, а про ріст – вимірюючи їх розміри.

За умов періодичного культивування живильне середовище містить обмежену вихідну кількість поживних речовин і мікрододорості ростуть, як правило, доки вміст якогось необхідного їм компонента не досягне критичної величини, після чого ріст сповільнюється і в подальшому призупиняється. Розвиток в такій системі відбувається згідно з законами, що характерні як для одноклітинних, так і для багатоклітинних організмів. Періодична культура веде себе подібно до багатоклітинного організму

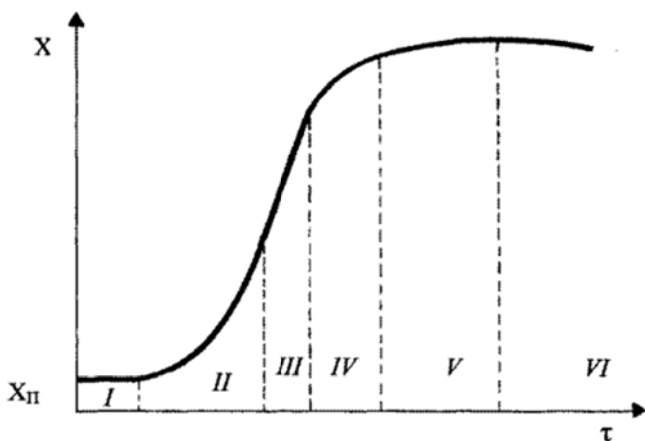


Рис. 1. Кінетична крива росту клітинної культури

з обмеженим генетичним потенціалом для росту. Спостереження за ростом такої культури вказує на те, що швидкість зростання змінюється з часом, особливо у гомогенній культурі, що перебуває в рідкому середовищі з хорошим перемішуванням. Крива, що відображає залежність логарифма числа клітин, живих клітин або густини біомаси мікрододоростей від часу для періодичної культури, називається кривою росту. Для

простої гомогенної періодичної культури характерною є так звана S-подібна форма кривої росту. Ця крива дозволяє виділити 6 фаз росту, які протікають у певній послідовності і можуть бути виражені у різному ступені (рис. 1).

1) Лаг-фаза – це період, під час якого кількість клітин помітно не збільшується (рис. 1, I). Цей період відведений на адаптацію до нових умов культивування. Тривалість лаг-фази залежить від характеристики мікрододоростей, віку клітин, кількості використаного посівного матеріалу, складу живильного середовища, фізико-хімічних параметрів. Наприклад, якщо інокулянт узятий зі старої культури, яка знаходиться в стаціонарній фазі росту, клітинам необхідно спочатку адаптуватися до нових умов. Ця адаптація

відбувається за допомогою синтезу РНК, ферментів та формування рибосом. Важливо відзначити, що при використанні великої кількості клітин у інокуляті тривалість лаг-фази скорочується і може навіть взагалі не спостерігатися;

2) фаза прискореного росту (рис. 1, II) характеризується збільшенням кількості мітозів. У цій фазі спостерігається лінійне збільшення кількості клітин залежно від часу культивування;

3) фаза експоненціального росту (рис. 1, III), протягом якої відбувається максимальний приріст біомаси та спостерігається використання субстрату з максимальною швидкістю. У цій фазі найбільш часто зустрічаються мітози порівняно з іншими фазами росту клітинної культури. Більшість клітин у цій фазі фізіологічно молоді та біологічно активні. У реальних умовах такий процес триває недовго, до відчутних змін хімічного складу середовища. Величина питомої швидкості під час експоненційної фази залежить від виду водоростей та збалансованості середовища. Розмір клітин і вміст білка в багатьох водоростей у цій фазі залишаються сталими, тому іноді говорять, що культура мікроводоростей у цьому випадку складається зі «стандартних клітин». Якщо точно встановлено, що число клітин, вміст у них білка та суха маса збільшуються з однаковою швидкістю, то за ростом культури можна спостерігати, використовуючи один із цих показників. Нерідко в експоненційній фазі росту клітини періодичної культури змінюються, оскільки середовище поступово трансформується. Концентрація субстрату зменшується, густина клітинної суспензії зростає, а також накопичуються продукти обміну речовин. Оскільки швидкість поділу клітин залишається відносно сталою в експоненційній фазі, цей період є найбільш зручним для визначення швидкості росту. Дослідження впливу різних факторів середовища, таких як рН, температура, аерація і т.п., та порівняння різних середовищ зазвичай проводяться, спостерігаючи за характером росту під час експоненційної фази;

4) фаза уповільнення росту, позначена як (рис. 1, IV), відзначається тим, що швидкість росту культури знижується до нуля. У цей період ріст клітинної культури сповільнюється через зменшення кількості мітозів. Це пояснюється тим, що кілька годин після початку логарифмічної фази росту у живильному середовищі створюються несприятливі умови для розмноження мікроорганізмів: зменшується концентрація поживних речовин, змінюється рН, деякі клітини переходять у стан спокою і вмирають внаслідок різних причин. Інтенсивність поділу клітин зменшується, і кількість живих клітин зростає все повільніше; загибель клітин стає більш поширеною. У деяких випадках лінійний ріст може спостерігатися безпосередньо після лаг-періоду, а ріст клітин з експоненційною швидкістю відсутній зовсім. Така ситуація спостерігається, коли в клітинах у силу різних причин (інгібування продуктом, затемнення водоростей і т.п.) сповільнюється швидкість біосинтетичних процесів;

5) стаціонарна фаза, позначена як (рис. 1, V), характеризується настанням рівноваги, коли кількість відмерлих клітин дорівнює кількості новоутворених внаслідок розмноження. Ця фаза настає після уповільненої фази росту. Абсолютна кількість клітин у популяції перестає зростати, хоча багато з них перебувають у стадії активного ділення. Кількість клітин в одиниці об'єму досягає максимального значення в стаціонарній фазі, а їх розміри наближаються до розмірів клітин у вихідному матеріалі. Це максимальне значення кількості клітин є важливою характеристикою кожного виду мікроводоростей і залежить від зовнішніх умов. Загальна картина залежить від фактора, який найбільше обмежує ріст. Дуже чутливі клітини швидко гинуть, тоді як інші можуть довго зберігати свою життєдіяльність. Кількість біомаси, яка продукується в стаціонарній фазі, називається врожаєм або виходом. Зрозуміло, що врожай залежить від багатьох факторів, включаючи сезон;

б) фаза відмирання культури, позначена як (рис. 1, VI), настає, коли система повністю вичерпується за субстратом або накопичення продуктів обміну є значним. У цей період переважають процеси загибелі клітин, і мітичний поділ практично не спостерігається. Через початок автолізу зменшується і сумарна біомаса культури. Відзначаються морфологічні і фізіологічні зміни, з'являються інволюційні (незвичайні) форми клітин. Фаза відмирання є протилежною експоненційній фазі. Цілком зрозуміло, що комбінація кількох лімітуючих факторів прискорює цей процес. Саме у зв'язку з цим фаза відмирання і причина загибелі клітин вивчені недостатньо.

Параметри кривої росту. Найбільший інтерес викликають у першу чергу три параметри росту: врожай (концентрація біомаси), швидкість росту (питома швидкість) та тривалість експоненціальної фази (у разі, якщо ріст періодичної культури аналізують за збільшенням біомаси, а не за кількістю клітин).

Врожай прийнято визначати як різницю між максимальною та вихідною біомасою мікроводоростей $X = X_{max} - X_0$. Цю величину виражають у грамах сухої маси (рис. 2, А). Найчастіше його відносять до одиниці об'єму, одиниці освітлюваної площі або площі культиватора, а іноді і до одиниці часу – [суха маса]/ [л] або [суха маса]/ [л доба].

Швидкість експоненціального росту (питома швидкість) – це міра швидкості росту клітин в експоненціальній фазі. Її визначають за формулою, виходячи з початкової та кінцевої біомаси X_0 та X_t у моменти часу t_0 та t (рис. 2, Б).

Тривалість експоненціальної фази. Цей параметр є важливим для висновків про стан водоростей або придатність середовища. (T_i) – визначають як проміжок часу між моментом t_r , в який культура досягла певної біомаси X_r , і моментом t_i , в який вона могла б досягти такої самої біомаси, якби відразу ж після інокуляції починався експоненційний ріст (рис. 2, В).

Оскільки параметр T_1 (час у експоненціальній фазі) придатний лише для порівняння двох культур з однаковими швидкостями експоненційного росту, рекомендується вимірювати тривалість лаг-фази не в абсолютних, а у фізіологічних одиницях (часу генерації g).

$g=t/n$ – визначає середній час генерації або час подвоєння густини клітин.

$g=\ln 2/\mu=0,693/\mu$, коли оперують кількістю клітин в одиниці об'єму.

$$\mu = \frac{\lg X_t - \lg X_0}{\lg e (t - t_0)} = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t - t_0}, \quad \text{де } \lg e = 0,43429.$$

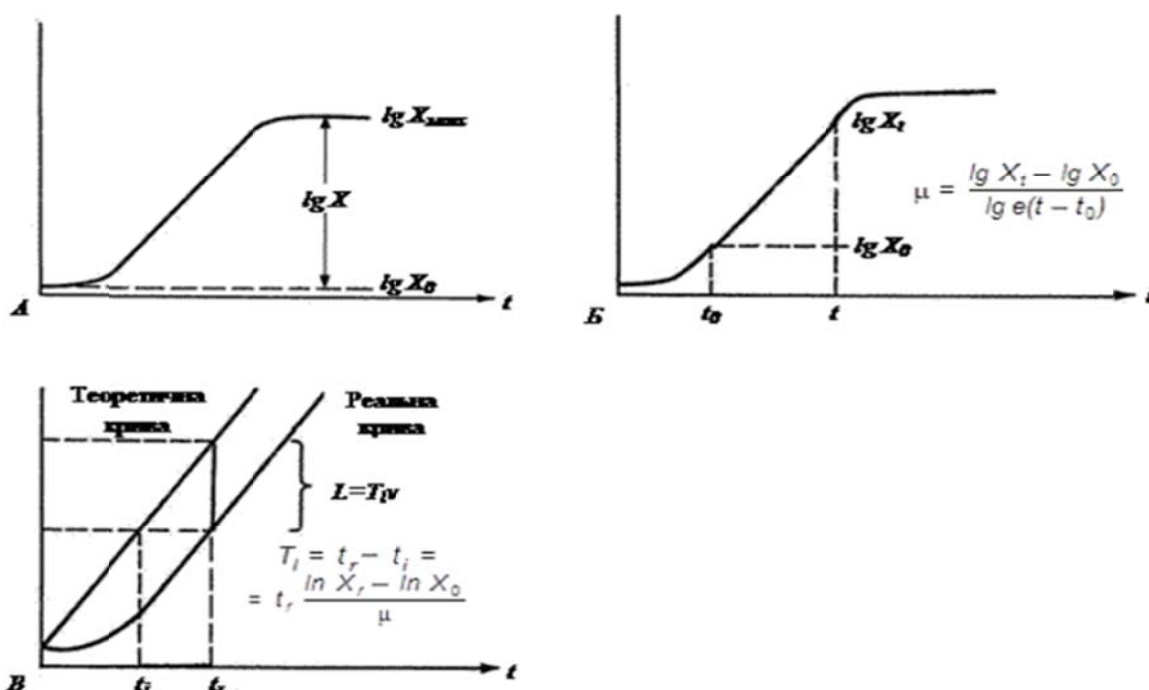


Рис. 2. Параметри росту: А – врожай (біомаса); Б – швидкість росту; В – тривалість експоненціальної фази (індекс « L » позначає експоненціальну фазу, індекс « r » – реальний ріст, а індекс « i » – ідеальний ріст)

Час подвоєння клітин або біомаси значно залежить від оптимізації параметрів культивування, таких як освітлення, перемішування, збалансованість живильного середовища, концентрація CO_2 і так далі. Так, час подвоєння біомаси для різних видів може коливатися в межах від декількох годин до кількох десятків годин, залежно від конкретних умов культивування, наприклад для *Chlorella*, за даними різних авторів, знаходиться в межах 10–30 годин.

Різниця між реальним ростом і розрахованим ідеальним виражена числом, яке кратне часу генерації і дорівнює $L=T_1X$. Таким чином, величина L показує, на скільки подвоєнь (генерацій) реальна культура відстає від ідеальної, яка з самого початку росла б експоненційно. Цю величину зазвичай використовують при порівнянні даних, що характеризують вплив різних живильних середовищ або їх компонентів, інгібіторів росту і т.д.

Хід роботи 1. Встановлення характеру росту досліджуваних культур фотометричним методом

Матеріали, реактиви й устаткування: культура *Arthrospira platensis* (рис. 1); середовище Заррука; розчини мікроелементів, шпателі, мірний

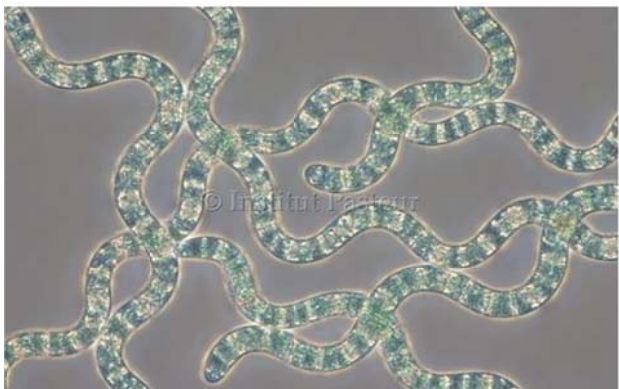


Рис. 1. *Arthrospira platensis* PCC 9223
(Фотографія: фонд колекції культур
Pasteur Culture Collection
of Cyanobacteria)

посуд, піпетки, колби для вирощування ціанобактерій, спектрофотометр UV-2600 («Shimadzu», Японія).

Умови культивування маткової культури: живильне середовище Заррука, плоскодонні конічні колби Ерленмейера об'ємом 250 мл, об'єм культури 100 мл, температура 24-26 °С, освітленість цілодобово на поверхні колби від двох ламп денного світла FD-36-E-G13 36W/2300 лм., періодичне ручне перемішування.

1. Умови проведення досліду: об'єм культури у колбах Ерленмей-

ера в експерименті становив 50 мл. Для освітлення використовувати лампи денного світла FD-36-E-G13 36W/2300 лм. Вибрати режим цілодобового освітлення. Контролювати температуру культивування ціанобактерій *Arthrospira platensis* у дні відбору проб.

2. Для отримання інокуляту взяти 10 мл 12-добової маткової культури і перенести в пластикову центрифужну пробірку. Відділення міководоростей від середовища можливо центрифугуванням або фільтруванням. Час центрифугування й число обертів залежать від розмірів клітин (в даному випадку ниткоподібна форма). Чим вони менші, тим більше потрібно обертів і тим тривалішим повинен бути час центрифугування. Найчастіше центрифугують 15–20 хв при 5–10 тис. обертів за хв. Вибираємо режим 10 хв. при 3 тис. обертів за хв. Після центрифугування надосадову рідину обережно зливаємо, осад суспендуємо в 1 мл поживного середовища Заррука. Вносимо по 50 мкл маткової суспензії на 50 мл чистого поживного середовища. Рекомендації: підрахувати кількість експериментальних варіантів (колб), визначити загальний об'єм поживного середовища, налити в одну колбу більшого об'єму, додати розчин мікроелементів, внести підсумковий об'єм інокуляту, перемішати, визначити оптичну щільність, розлити по колбах (для чого – це суттєво зменшить вихідну варіабельність експериментальних варіантів).

3. Визначення динаміки росту *Arthrospira platensis* по зміні оптичної щільності суспензії (фотометричний метод). Відбір проб для визначення щільності культури проводити на 0 (вихідна), 1, 3, 5, 7, 9, 12 добу. Перед відбором проби колбу з ціанобактеріями ретельно перемішати, набрати

дозатором зразок об'ємом 3 мл і перенести в скляну кювету, провести вимірювання і повернути культуральну рідину в колбу. Приріст біомаси вимірювати по зміні оптичної щільності суспензії на спектрофотометрі UV-2600 («Shimadzu», Японія) на довжині хвилі 750 нм. Перехід від одиниць оптичної щільності (D750) до величини абсолютно сухої маси (АСМ) розраховувати за допомогою емпіричного коефіцієнта $k = 0,624 \pm 0,049$ ($\text{г} \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{од.опт.густ.}^{-1}$), $\text{АСМ} = k \cdot \text{D750}$.

За результатами виконання завдань заповнити таблицю:

Табл. 1. Показники росту культури *Arthrospira platensis* за періодичних умов культивування

Група, варіанти дослідів	Вихідні показники інокуляту		Поточні показники культури	
Час від початку дослідів, доба	Оптична густина	Абсолютно суха маса, мг/л	Оптична густина	Абсолютно суха маса, мг/л

4. За результатами експерименту побудувати криву росту культури *Arthrospira platensis* за накопиченням біомаси в культурі, по осі y час культивування, доба; по осі x АСМ (абсолютно суха маса). Приклад кривої росту наведено на рисунку 3.

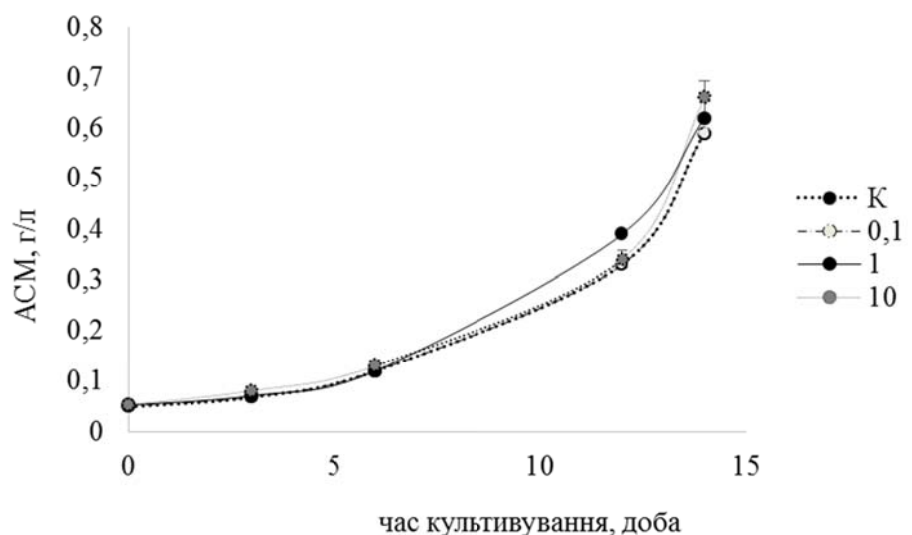


Рис. 3. Динаміка росту культури *Arthrospira platensis*

5. Висновок

Хід роботи. 2. Встановлення характеру росту досліджуваних культур. Визначення біомаси зважуванням

Матеріали, реактиви й устаткування: культура *Chlorella vulgaris* (рис. 2); середовище Тамія; розчини мікроелементів, шпателі, мірний посуд, піпетки, колби Ерленмейера, фільтри, центрифужні пробірки, чашки Петрі, центрифуга, аналітичні ваги, сушильна шафа (термостат), ексикатор

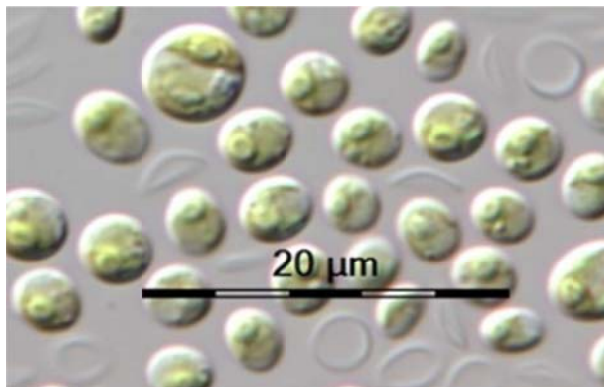


Рис. 2. *Chlorella vulgaris* 211-11b
(Фотографія: фонд колекції
культур SAG)

Умови культивування маткової культури: живильне середовище Тамія 100 мл, плоскодонні конічні колби Ерленмейера об'ємом 250 мл, температура 24-26 °С, освітленість цілодобово на поверхні колби, лампи денного світла FD-36-E-G13 36W/2300 лм., періодичне ручне перемішування.

1. Умови проведення дослідів: об'єм культури у колбах Ерленмейера в експерименті становив 50 мл.

Для освітлення використовувати лампи денного світла FD-36-E-G13 36W/2300 лм. Вибрати режим цілодобового освітлення. Контролювати температуру культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* у дні відбору проб.

2. Для отримання інокуляту взяти 10 мл 12-добової маткової культури і перенести в пластикову центрифужну пробірку. Вибраємо режим 10 хв. при 3 тис. обертів за хв. Після центрифугування надосадову рідину обережно зливаємо, осад суспендуємо в 1 мл поживного середовища Тамія. Вносимо по 50 мкл маткової суспензії на 50 мл чистого поживного середовища. Рекомендації: (див. *Arthrospira platensis*).

3. Визначення динаміки росту *Chlorella vulgaris* по виходу біомаси. Відбір проб для визначення біомаси проводити на 0 (вихідна), 1, 3, 5, 7, 9, 12 добу. Із колби в зважену центрифужну пробірку налити 10 мл (1, 3, 5 доба, далі достатньо відібрати 5 мл) ретельно перемішаної суспензійної культури. **Варіант А.** Провести спробу фільтрування культуральної рідини (культуральна рідина – складна колоїдна система, суміш живильного середовища, культури мікроорганізмів, продуктів життєдіяльності та відпрацьованих газів) через попередньо зважений паперовий фільтр. Оцінити ефективність фільтрування і можливість відділення біомаси (врахувати, що розмір клітин *Ch.vulgaris* становить від 2 до 10 мкм у діаметрі). Отримані результати занести в таблицю.

Табл. 2. Показники виходу біомаси культури *Chlorella vulgaris* за періодичних умов культивування

доба	параметри	показник
0	Маса самого фільтра x_1	
	Маса фільтра із біомасою x_2	
	Біомаса $x = x_2 - x_1$	
....12	Маса самого фільтра x_1	
	Маса фільтра із біомасою x_2	
	Біомаса $x = x_2 - x_1$	

Провести розрахунок кількості отриманої біомаси.

4. Висновок _____

Варіант Б. Зважити пробірку з культуральною рідиною. Провести центрифугування при 3000 об/хв. протягом 15 хв. Надосадову (*фугат* – рідка частина культуральної рідини, отримана після відділення біомаси) злити. Осад промити дистильованою водою і пробірки знову центрифугувати протягом 10 хв при 3000 об/хв.

Масу культури визначити за формулою:

$$M = \frac{(A-B)1000}{V},$$

де М – суха біомаса в г/л; А – маса центрифужної пробірки (фільтра) з осадом у г; В – маса центрифужної пробірки (фільтра) без осаду в г; V – обсяг культуральної рідини, узятий для центрифугування.

Отримані результати занести в таблицю.

Табл. 3. Показники виходу біомаси культури *Chlorella vulgaris* за періодичних умов культивування

доба	параметри	показник
0	Маса пробірки x_1	
	Маса пробірки з осадом x_2	
	Біомаса $x = x_2 - x_1$	
.....12	Маса пробірки x_1	
	Маса пробірки з осадом x_2	
	Біомаса $x = x_2 - x_1$	

Висновок _____

Варіант В. Набрати дозатором зразок об'ємом від 3 до 1 мл (відповідно до доби культивування) і перенести на зважену пластикову чашку Петрі (рис. 3). Ставимо зразки для висушування в сушильну шафу або термостат. Після висушування переносимо їх у ексікатор (посудина, в якій

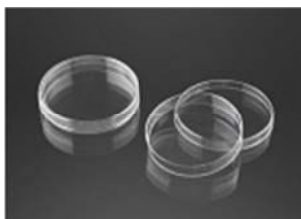


Рис. 3. Пластикові чашки Петрі (ліворуч) і ексікатор (праворуч)

підтримується певна вологість повітря, зазвичай близька до нуля, виготовлена з товстого скла або пластику (рис. 3)). Площина з'єднання з кришкою для досягнення герметичності змащується спеціальним мастилом.

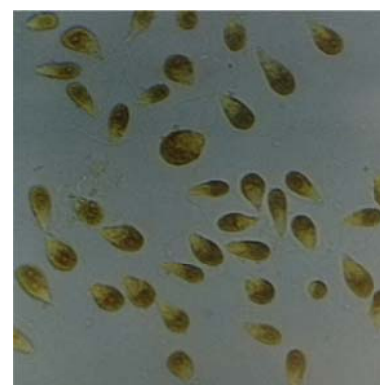
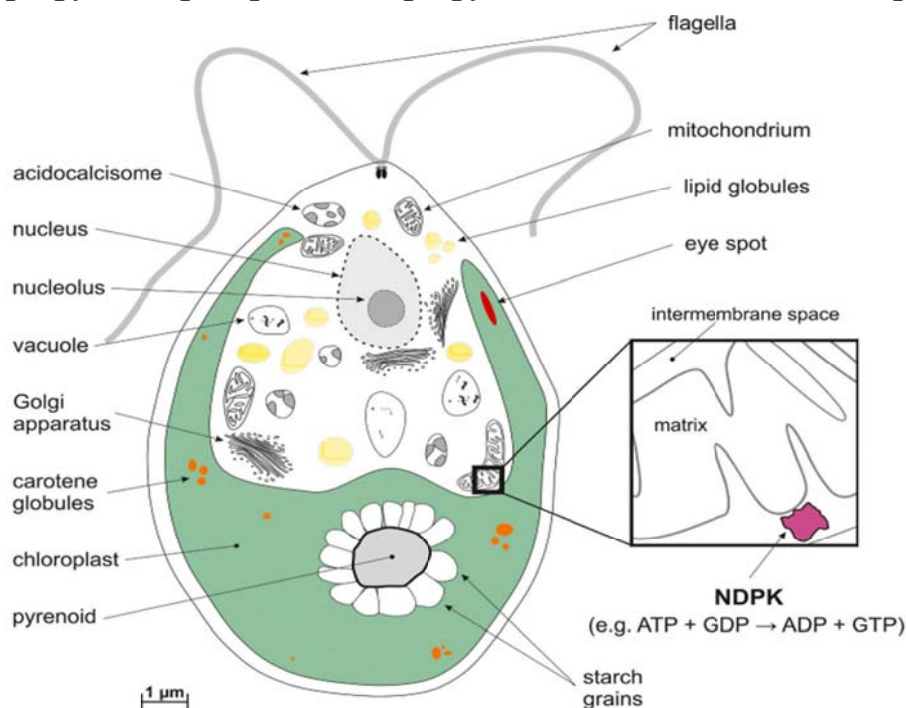
Табл. 4. Показники виходу біомаси культури *Chlorella vulgaris* за періодичних умов культивування

доба	параметри	показник
0	Маса чашки x_1	
	Маса чашки з біомасою x_2	
	Біомаса $x = x_2 - x_1$	
.....12	Маса чашки x_1	
	Маса чашки з біомасою x_2	
	Біомаса $x = x_2 - x_1$	

Висновок _____

Хід роботи. 3. Встановлення характеру росту досліджуваних культур. Визначення кількості клітин мікроскопічним методом

Матеріали, реактиви й устаткування: культура *Dunaliella viridis* Teod. var. *viridis* f. *euchlora*, штам IBASU-A N29 (рис. 4); середовище Артарі (модифікація Масюк); шпателі, мірний посуд, піпетки, колби Ерленмейера, центрифужні пробірки, центрифуга, аналітичні ваги, камера Горяєва, мікроскоп.



X600

Рис. 4. Схематична ультраструктура *Dunaliella* spp. (посилання на статтю [8]) ліворуч і фото *Dunaliella viridis* IBASU-A N29 праворуч

Умови культивування маткової культури: живильне середовище Артарі 100 мл, плоскодонні конічні колби Ерленмейера об'ємом 250 мл, температура 24-26 °С, освітленість цілодобово на поверхні колби, лампи денного світла FD-36-E-G13 36W/2300 лм., періодичне ручне перемішування.

1. Умови проведення дослідів: об'єм культури у колбах Ерленмейера в експерименті становив 20 мл. Для освітлення використовувати лампи денного світла FD-36-E-G13 36W/2300 лм. Вибрати режим цілодобового освітлення. Контролювати температуру культивування мікроводоростей *Dunaliella viridis* у дні відбору проб.

2. Для отримання інокуляту взяти 10 мл 21-добової маткової культури і перенести в пластикову центрифужну пробірку. Вибираємо режим 10 хв. при 3 тис. обертів за хв. Після центрифугування надосадову рідину обережно зливаємо, осад суспендуємо в 1 мл поживного середовища Артарі. Суспендуємо клітини в свіжому середовищі і відбираємо аліквоту 50 мкл (мінімальний об'єм) для підрахунку клітин, яку розводимо в 20 - 40 разів. Схема розведення наведена нижче (рис. 5).

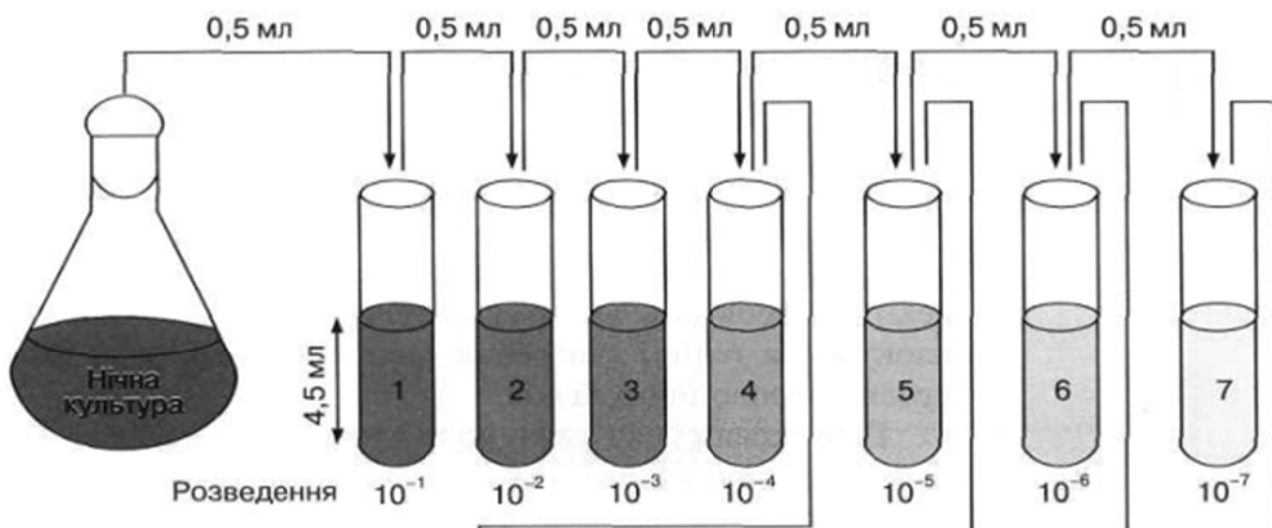


Рис. 5. Схема приготування розведеної суспензії мікроводоростей

Проводимо підрахунок клітин мікроводоростей в камері Горяєва (рис. 6) для розрахунку аліквоти, яку потрібно внести в колби для отримання вихідної концентрації 1,3 млн клітин в мл (експериментально встановлена і загальноприйнята в нашій лабораторії оптимальна вихідна щільність культури для проходження лаг фази). Розрахункова камера – товсте предметне скло з нанесеними на них поперечними жолобками, які поділяють три поперечно розташовані плоскі майданчики. Середній майданчик розташований нижче бічних на 0,1 мм в камері Горяєва і розділений поперечним жолобком на дві половини, на поверхні яких нанесені дві однакові сітки. Покривне скло притирається до бічних майданчиків до появи «райдужних» кілець (якщо накриваємо звичайним покривним склом, то

також рухом вгору і вниз притираємо покривне скло до бічних комірок). Важливо: клітини мікроводоростей *Dunaliella viridis* рухомі, тому до підрахунку їх знерухомлюють 0,05 % спиртовим розчином йоду, для цього на кінці скляної палички вносимо розчин йоду у пробірку з водоростями. Краплю досліджуваної рідини наносимо на виступаючий кінець середнього майданчика, в силу капілярності крапля підтікає під покривне скло і покриває відповідну сітку. Через 2-3 хв після вищевказаних дій, щоб клітини осіли і під час мікроскопії були видні в одній площині. Переміщуємо препарат на предметне скельце і фіксуємо за допомогою бічних гвинтів. Для зручності зору корегуємо чіткість макро- і мікрогвинтами.

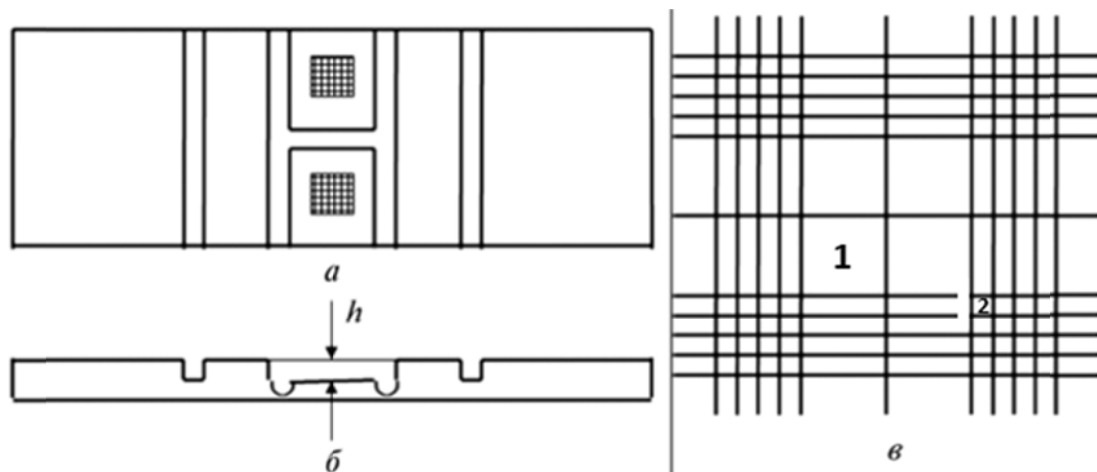


Рис. 6. Розрахункова камера Горяєва: вид зверху (а), збоку (б) і вибиті жолобки (в); великий (1) і малий (2) квадрати

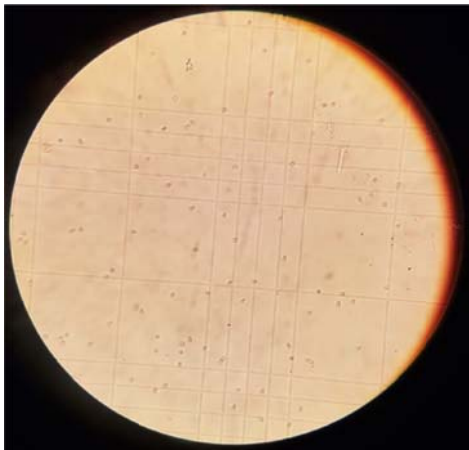


Рис. 7. Культура клітин *Dunaliella viridis* в розрахунковій камері Горяєва

3. Підрахунок числа клітин проводять з об'єктивом 10х або 20х. Число клітин підраховують у 25 великих квадратах сітки, вибираючи 3 стовпець камери (рис. 7). Враховують всі клітини, що лежать у квадраті сітки, а також перетинають верхню і праву сторони квадрата. При підрахунку число клітин у великому квадраті не повинно перевищувати 20–30, в іншому випадку вихідну суспензію клітин розводять дистильованою водою (або чистим середовищем), в залежності від завдань експерименту.

Для отримання достовірного результату загальне число підрахованих клітин мікроорганізмів повинно бути не менше 600 (2–3 краплі).

Кількість клітин в 1см³ вихідної суспензії: $C = 1000a/hSn$,

де а – середнє число клітин у квадраті сітки;

h – глибина камери, мм; 0,1 мм;

S – площа квадрата сітки, мм²; 1/25 мм;

n – розведення вихідної суспензії (якщо є);

$1000\text{мм}^3 = 1\text{см}^3 = 1\text{ мл}$, переведення в мл.

Отримуємо: $C = 1000a/0,1\text{мм} \cdot 1/25\text{ мм} \cdot 25\text{ квадратів} \cdot \text{розведення}$ або $C = a \cdot 0,01\text{млн/мл} \cdot \text{розведення}$.

4. Розрахунок посівного інокуляту. Обсяг поживного середовища колби 20 мл, в 1 мл повинно міститися 1,3 млн/мл клітин, в 20 мл – 26 млн / мл. В 1 мл маткового концентрату міститься А клітин, необхідно внести Х мкл, щоб вихідна концентрація клітин у 20 мл склала 26 млн / мл. Отримуємо: $x = 26 / A$. Отриманий в результаті розрахунку обсяг маткової культури вносимо в кожну колбу. Або див. рекомендації: (*Arthrospira platensis*).

Визначення динаміки росту *Dunaliella viridis* за кількістю клітин (концентрацією). Відбір проб для визначення біомаси проводити на 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 добу. Із колби, після ретельного перемішування суспензійної культури, відібрати дозатором аліквоту для підрахунку об'ємом 150–200 мкл, якщо необхідно (зазвичай після 5 доби) зробити розведення середовищем Артарі або дистильованою водою (в залежності від цілей завдання) і провести підрахунок клітин за методикою, яка описана вище. Отримані результати занести в таблицю.

Табл. 5. Показники росту культури *D. viridis* за періодичних умов культивування

№ колби	Час культивування, доба/ кількість клітин, млн/мл											
	1	2	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21
1												
2												
3												
4												
5												

5. Зробити висновок щодо росту культури за певних умов культивування.

Важливо: для кожного досліді кількість аналітичних (дублювання варіантів, колб, лунок тощо) і біологічних (досліджені у різні дні, місяці) повторів може бути індивідуальною. Зазвичай для експерименту з мікроводоростями рекомендовано 3–5 аналітичних повторів для варіанта (контроль, дослід) та мінімум 3 біологічні повтори. Для того щоб мінімізувати розбіжності в отриманих даних між біологічними повторами та враховуючи річну ритмічність експериментальних об'єктів, слід планувати дослідження протягом одного місяця (висаджувати культуру з невеликим інтервалом в декілька днів). Цьому передують планування експерименту і підготовка маткової культури різного терміну пересадки [9]. В короткотермінових експериментах слід брати до уваги добову ритмічність, пов'язану із чергуванням дня і ночі.

Контрольні питання

1. Вкажіть основні фази кривої росту біологічних агентів, які застосовуються в біотехнологічних процесах.
2. Чим зумовлена тривалість кожної з фаз кривої росту?
3. Вкажіть лімітуючі фактори для кожної з фаз.
4. Вкажіть відмінності кривої росту при періодичному та безперервному культивуванні продуцентів.
5. Поясніть значення термінів «культуральна рідина», «фугат», «біомаса».
6. Вкажіть можливі підходи до процесу відділення біомаси з культуральної рідини.
7. У яких випадках для відділення біомаси можна застосовувати фільтрування?
8. Що таке альгологічно чиста культура?
9. Дайте визначення вихідна щільність культури.
10. Наведіть алгоритм підрахунку клітин в камері Горяєва.

Література: [5-8].

Практична робота № 3

Морфометричний аналіз клітин

Мета роботи – визначити морфологію клітин мікроводоростей *Dunaliella viridis* в умовах періодичного (накопичувального) культивування. Отримати фотографії клітин *Dunaliella viridis* за допомогою світлового мікроскопа. Отримані фотографії проаналізувати за допомогою програм AxioVisionRel. 4.7 або ImageJ 1.52k.

Основні теоретичні відомості

Клітини мікроводоростей *Dunaliella viridis* мають різну морфологію і високу варіабельність інтенсивності росту як результат статевого та нестатевого способів розмноження і як результат їхньої адаптації (високої стійкості) до різних факторів навколишнього середовища [9–11]. Відомо, що клітини мікроводоростей *Dunaliella viridis* мають грушоподібну, сферичну та еліпсоїдну форму [3]. Для оцінки морфології клітин використовують такий показник, як відношення більшого (d_1) та меншого (d_2) діаметрів. Якщо значення $d_1/d_2 > 1$, то клітина має еліпсоїдну форму. Це характерно для гаплоїдних клітин, які мають активний метаболізм та синтезують продукти первинного метаболізму (білки, жири, вуглеводи, необхідні для росту та розмноження клітин). Якщо значення $d_1/d_2 = 1$, то клітини мають округлу форму. Це характерно для цист – тимчасова форма клітин, яка має захисну оболонку й утворюється при несприятливих умовах середовища або на певних фазах клітинного циклу. При поліпшенні умов навколишнього середовища цисти проростають і з них виходять гаплоїдні клітини.

Морфологія клітин є показником функціонального стану клітин в культурі. Тому проведення морфометричного аналізу є необхідним для характеристики клітинних культур перед використанням їх в експериментах або при використанні їх у виробництві.

Матеріали, реактиви й устаткування: культура *Dunaliella viridis*; середовище Артарі (модифікація Масюк); шпателі, мірний посуд, піпетки, колби Ерленмейера, камера Горяєва, мікроскоп, комп'ютер (ноутбук), програма AxioVisionRel. 4.7 або ImageJ1.52k.

Хід роботи

1. Культивування клітинних мікроводоростей *Dunaliella viridis* проводити протягом 21 доби на поживному середовищі Артарі (склад див. практичну роботу №1) в умовах цілодобового освітлення (від 2-х ламп денного світла FD-36-E-G13 36W/2300 лм) та при температурі 24-26°C у плоскодонних конічних колбах Ерленмейера ($V = 250$ мл). Об'єм клітинної культури становить 20 мл, а початкова концентрація клітин – $1,3 \times 10^6$ кл/мл.

2. З маточної культури мікроводоростей *Dunaliella viridis* відібрати 100 мкл клітинної суспензії.

3. Клітини мікроводоростей *D. viridis* мають 2 джгутики, тому вони постійно рухаються. Щоб знерухомити клітини, додати до зразка 0,05 % спиртовий розчин йоду.

4. Внести зразки клітин в камеру Горяєва.

5. Зробити фотографії за допомогою цифрової камери через окуляр світлового мікроскопа.

6. Отримані фотографії завантажити в програму AxioVisionRel. 4.7 або ImageJ1.52k. Провести вимірювання більшого (d_1) та меншого (d_2) діаметрів для 100 клітин. Знайти відношення цих величин (d_1/d_2) у програмі Excel. Визначити процентний вміст клітин з різними значеннями d_1/d_2 від загальної кількості проаналізованих клітин.

Побудувати графік за отриманими результатами (рис. 1).

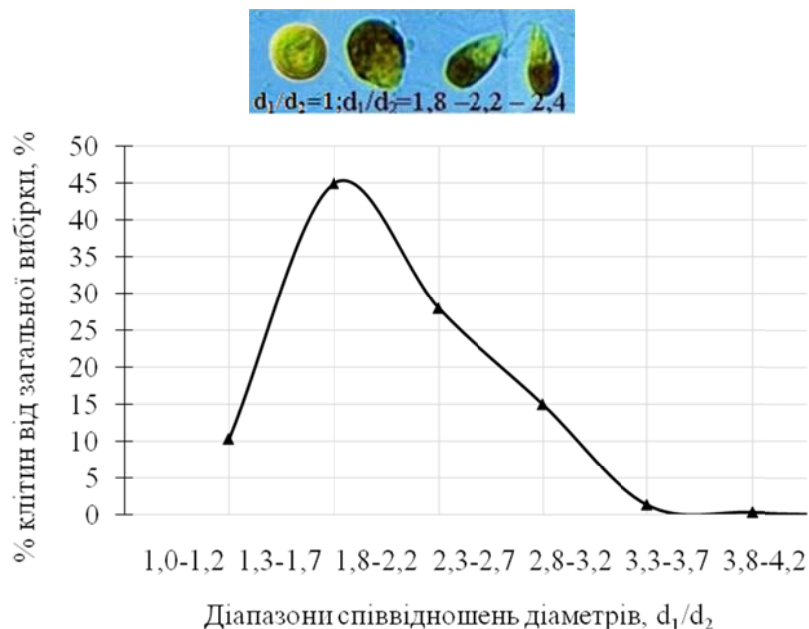


Рис. 1. Відсоткове співвідношення морфологічних класів у популяції клітин культури мікроводоростей *Dunaliella viridis* на 21 добу росту (зразок графіка [10])

Зробити висновки щодо морфологічних класів у популяції клітин мікроводоростей (субпопуляційний склад культури).

Контрольні питання

1. Які чинники впливають на морфологію клітин в культурі?
2. В чому різниця між спорами і цистами? Функції цист, спор і вегетативних клітин.
3. Сучасні методи оцінки морфології клітин: проточна та лазерна скануюча цитометрія (ознайомитися і надати характеристику методам).

Література: [9-11].

Практична робота № 4

Отримання субкультур мікроводоростей на різних фазах росту

Мета роботи – отримати субкультури мікроводоростей *Dunaliella viridis*, які пересаджують на різних фазах росту. Провести 1–5 пересадок субкультур *Dunaliella viridis* при обраних режимах. Надати характеристику субкультурам в кінці 1 пасажу та в кінці 5 пасажу за певними показниками клітинної культури.

Основні теоретичні відомості

Клітинні культури мікроводоростей широко використовуються в різних галузях біотехнології для отримання біомаси, збагаченої різними метаболітами, або для отримання певних продуктів клітинного метаболізму. Кількісний і якісний склад біомаси мікроводоростей залежить від фази росту культури [1, 2]. Фази росту клітинних культур визначають за допомогою графіка динаміки росту мікроводоростей (див. практичну роботу № 2).

Для культур мікроводоростей, для яких характерно два способи розмноження (статеве та нестатеве), інтенсивність росту залежить від переважання того чи іншого способу розмноження. Так, швидкість росту культур більше в період вегетативного розмноження, ніж у період статевого розмноження. Це пов'язано з тим, що під час статевого процесу відбувається злиття двох гамет, в результаті чого утворюється зигота, яка перетворюється на зигоспору. У певних видів водоростей зигоспори можуть знаходитися в стані спокою довгий час до декількох місяців, у інших – проростають без періоду спокою. У першому випадку в зигоспорах відбувається утворення гаплоїдних зооспор, які ростуть. Через певний час із зигоспор в залежності від розмірів виходять 4 або 32 зооспори.

У найпростішому випадку статевий процес відбувається шляхом гологамії – злиття двох рухомих статевих клітин. Статевий процес типу гологамії відбувається у мікроводоростей виду *Dunaliella*, в результаті чого утворюється диплоїдна зигота. При цьому плоїдність ядра збільшується в $2n$ разів і середній вміст ДНК на клітину збільшується. Після періоду спокою зиготи проростають з утворенням 32 клітин, при цьому відбувається мейоз.

Таким чином, швидкість росту мікроводоростей залежить від кількості в культурі вегетативних клітин, спор і цист, що в свою чергу впливає на вміст нуклеїнових кислот і інші функціональні характеристики клітин, а саме на вміст метаболітів у клітинах.

Було показано, що для культури мікроводоростей *Dunaliella viridis* лаг-фаза триває 2–5 днів після пересадки (рис. 1). У цей час не відбувається збільшення кількості клітин, вони адаптуються до нових умов навколишнього середовища. Під час фази експоненціального росту збільшується кількість клітин (накопичується біомаса мікроводоростей) за рахунок проліфера-

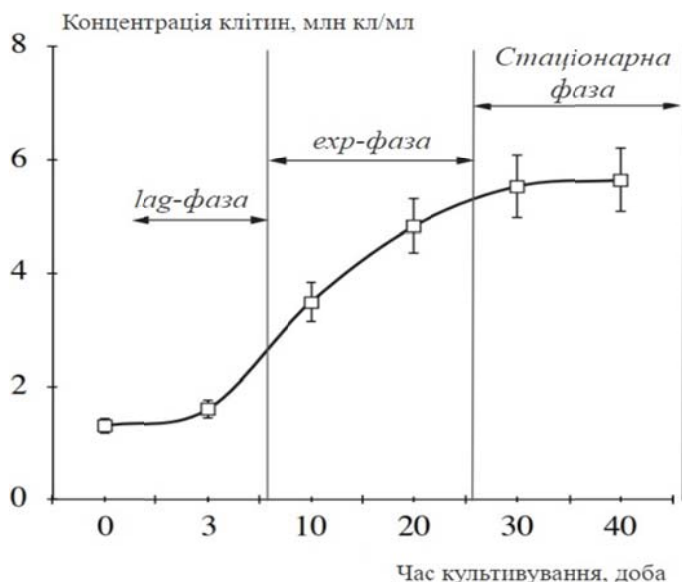


Рис. 1. Концентрація клітин культури *Dunaliella viridis* в стандартних умовах накопичувального культивування

ції вегетативних клітин. У цей час у культурі переважає нестатевий спосіб розмноження. В клітинах синтезуються продукти первинного метаболізму: амінокислоти, білки, вітаміни, органічні кислоти, вуглеводи [3]. Стационарна фаза росту триває досить довго (до 20 діб), концентрація клітин в культурі залишається постійною. В цей період відбувається активація статевого розмноження і збільшується плоідність клітин, що супроводжується накопиченням різних продуктів вторинного метаболізму: різних груп ліпідів, каротиноїдів,

вуглеводів тощо [4]. Зменшення кількості поживних речовин у складі середовища, накопичення екзометаболітів клітин призводить до зниження кількості клітин в культурі і настає фаза відмирання. Таким чином, різні фази росту характеризуються певним співвідношенням вегетативних клітин та поліплоїдних цист в культурі, що впливає на швидкість росту культури, склад клітинної популяції та на склад її біомаси.

Таким чином, щоб отримати біомасу мікроводоростей певного кількісного та якісного складу, необхідно знати характеристику культури і ідтримувати клітинну культуру на відповідній фазі росту.

Матеріали, реактиви й устаткування: культура *Dunaliella viridis*; середовище Артарі (модифікація Масюк); шпателі, мірний посуд, піпетки, колби Ерленмейера, камера Горяєва, мікроскоп.

Хід роботи

1. Культивування мікроводоростей *Dunaliella viridis* проводити на рідкому середовищі Артарі (склад див. практичну роботу № 1) протягом 10, 20, 30 та 40 діб в умовах цілодобового освітлення від 2-х ламп денного світла FD-36-E-G13 36W/2300 лм та при температурі 24-26°C у плоскодонних конічних колбах Ерленмейера (V = 250 мл). Об'єм клітинної культури становить 20 мл, а початкова концентрація клітин $-1,3 \times 10^6$ кл/мл.

2. Отримати різні субкультури мікроводоростей *Dunaliella viridis* шляхом відбору аліквот клітин з маточної культури на 10, 20, 30 та 40 добу росту, що відповідає різним фазам росту культури.

3. Схема пересадки культури мікроводоростей: відібрати аліквоти з маточної культури, центрифугувати 15 хв. 3 тис. обертів за хв. Визначити концентрацію клітин в камері Горяєва. Розрахувати, відібрати аліквоту клітинної суспензії і внести в колби на свіже середовище Артарі так, щоб

концентрація клітин становила 1,3 млн/мл. Тобто провести пересадку культури мікроводоростей (див. практичну роботу № 2).

4. Проводити культивування субкультур *Dunaliella viridis* за наступною схемою (рис. 1.2):

- пересадка культур кожні 10 діб (субкультура CuS10);
- пересадка культур кожні 20 діб (субкультура CuS20);
- пересадка культур кожні 30 діб (субкультура CuS40);
- пересадка культур кожні 40 діб (субкультура CuS40).

5. Надати характеристику субкультурам у кінці 1 пасажу. Тобто на 10, 20, 30 та 40 добу росту 1 пасажу визначити кінцеву концентрацію клітин в культурі, проаналізувати морфологію клітин (див. практичну роботу № 3), визначити кількість білка, нуклеїнових кислот і загальних ліпідів у клітинах мікроводоростей (див. практичні роботи № 5, 6).

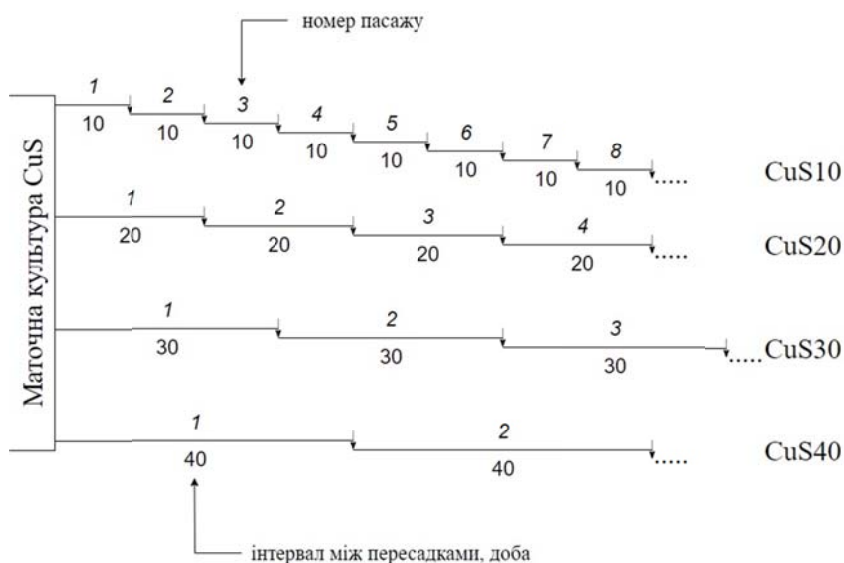


Рис. 1.2. Схема режимів культивування різних CuS субкультур

6. У кінці кожного пасажу (1, 2, 3, 4 та 5) визначати кінцеву концентрацію клітин в культурі. Записати отримані результати.

7. У кінці 5 пасажу визначити кінцеву концентрацію клітин в культурі, проаналізувати морфологію клітин, визначити кількість білка, нуклеїнових кислот і загальних ліпідів у клітинах мікроводоростей (див. практичну роботу № 5).

8. Отримані результати представити у вигляді таблиць або графіків.

Порівняти субкультуру CuS10, субкультуру CuS20, субкультуру CuS30, субкультуру CuS40 за певними показниками. Зробити висновок щодо функціонального стану клітинної культури мікроводоростей на різних фазах росту. Запропонувати режим культивування мікроводоростей для отримання біомаси певного складу.

Контрольні питання

1. Надайте характеристику функціональному стану клітинних культур мікроводоростей на різних фазах росту.

2. Способи розмноження клітин мікроводоростей та їхній вплив на показники культури мікроводоростей.

3. Порівняти накопичувальний на проточний режими культивування культур мікроводоростей. Як впливає режим культивування на отримання біомаси певного складу?

Література: [12-15].

Практична робота № 5

Визначення біохімічного складу біомаси водоростей

Мета роботи – освоїти методи визначення біохімічного складу біомаси мікроводоростей. Кількісне визначення протеїнів. Кількісне визначення вмісту хлорофілів і каротиноїдів. Визначення вмісту РНК, ДНК в клітинах водоростей. Фенол-сірчаноокислотний метод (визначення кількості загального цукру у культуральному середовищі).

Основні теоретичні відомості

Приблизно 70 % поверхні Землі покрито морями та океанами. Морське середовище має широкий спектр природних ресурсів. З урахуванням нестачі їжі для здорового життя людства, актуальним є дослідження альтернативних джерел харчування, включаючи морські біоресурси, зокрема водорості. Збільшення попиту на функціональні продукти вимагає дослідження нових натуральних інгредієнтів. Таким чином, використання водоростей для створення нових харчових продуктів стає об'єктом світового інтересу. З їстівних водоростей можна виділити три головні групи: зелені, бурі і червоні. Їх використання як джерела білка є важливим для харчової промисловості, адже вони містять багато корисних речовин. Мікро- та макроводорості багаті на білок, харчові волокна, полісахариди, ліпіди і поліненасичені жирні кислоти, пігменти, вітаміни і мінерали. Саме тому у харчовій промисловості водорості використовують не лише в якості інгредієнтів, а як високобілкові, вітамінізовані харчові добавки, біобарвники, біостимулятори та регулятори росту. Водорості також відомі своєю низькою калорійністю та багатим складом корисних речовин для здоров'я. З огляду на зростаючий попит на рослинне харчування, використання водоростей для створення нових продуктів може бути ефективним рішенням.

Для визначення кількості протеїнів існують фізичні, хімічні та біологічні методи. Найпростішим з фізичних методів є вимірювання маси чистого протеїну. Проте протеїни дуже здатні до поглинання вологи, і видалити всю воду з них складно, що робить цей метод рідко використовуваним. Серед фізичних методів для визначення кількості протеїнів найпоширенішими стали рефрактометричний (з використанням показника заломлення у розчинах протеїнів), спектрофотометричний (вимірювання поглинання ультрафіолетового світла), полярографічний (за кривими, що відображають залежність між струмом і напругою у системі з протеїном) та пікнографічний методи (визначення густини білкових розчинів).

Хімічні методи для визначення кількості білків є дуже різноманітними. Найпростішим з них є кількісне визначення загального або білкового азоту після відокремлення протеїну та інших азотовмісних речовин у результаті їх осадження.

Найпоширенішим біологічним методом для визначення кількості протеїнів є колориметричний метод. Він ґрунтується на вимірюванні інтенсивності забарвлення, що виникає після взаємодії білка зі специфічним реагентом. На практиці найчастіше застосовують колориметричні та спектрофотометричні методи для визначення кількості білка. До колориметричних методів відносяться біуретовий метод, метод Лоурі, метод Бредфорда та інші.

Матеріали дослідження та реактиви: стандартні розчини білків (100 г/л, 1 мг/мл, 10 мкг/мл), розчин білка водоростей, біуретовий реактив, реактив Фоліна ($\text{C}_{10}\text{H}_5\text{NaO}_5\text{S}$); реактив А (2 %-й розчин Na_2CO_3 в 0,1 н NaOH); реактив В (0,5 %-й розчин $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 %-му розчині $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$); реактив С (1 мл реактиву В змішати з 50 мл реактиву А), розчин Coomassie brilliant blue, 95 %-й етиловий спирт, 95 %-на H_3PO_4 , пробірки, штативи, піпетки, фотоелектроколориметр, спектрофотометр.

Кількісне визначення протеїнів

1. Спектрофотометричний метод

Основні теоретичні відомості

Спектрофотометричний метод базується на вимірюванні абсорбції розчину при довжині хвилі 280 нм. Здатність поглинати світло в ультрафіолетовій частині спектра мають лише триптофан, тирозин і фенілаланін. Оскільки білки містять різну кількість цих ароматичних амінокислот, їх поглинання в ультрафіолетовій частині спектра може відрізнятися. Абсорбція розчинів білків, які містять ці амінокислоти, при 280 нм прямо пропорційна їх концентрації в розчині.

Умовно припускають, що при середньому вмісті білка в розчині 1 мг/мл величина абсорбції при 280 нм становить 1,0 (при товщині шару рідини в 1 см). Використання цього методу дозволяє швидко визначати концентрацію білка без необхідності використання додаткових реагентів. Однак належна увага має бути приділена впливу на результат присутності нуклеїнових кислот і нуклеотидів, що може ускладнювати процес визначення концентрації протеїну за допомогою цього методу.

Хід роботи

1.1. У кварцеві кювети № 1 помістіть 3 мл стандартного розчину протеїну, № 2 – зразок розчину білка водоростей, розведеного у співвідношенні 0,01 : 1000.

1.2. Визначте величину екстинкції на спектрофотометрі при довжині хвилі 260 нм (частина спектра поглинання сполук нуклеотидної природи) і 280 нм.

1.3. Для розрахунку вмісту білка за допомогою номограми Адамса спочатку необхідно знайти експериментально отримані значення екстинкції при 260 і 280 нм. Потім, на номограмі, знайдіть ці значення у відпо-

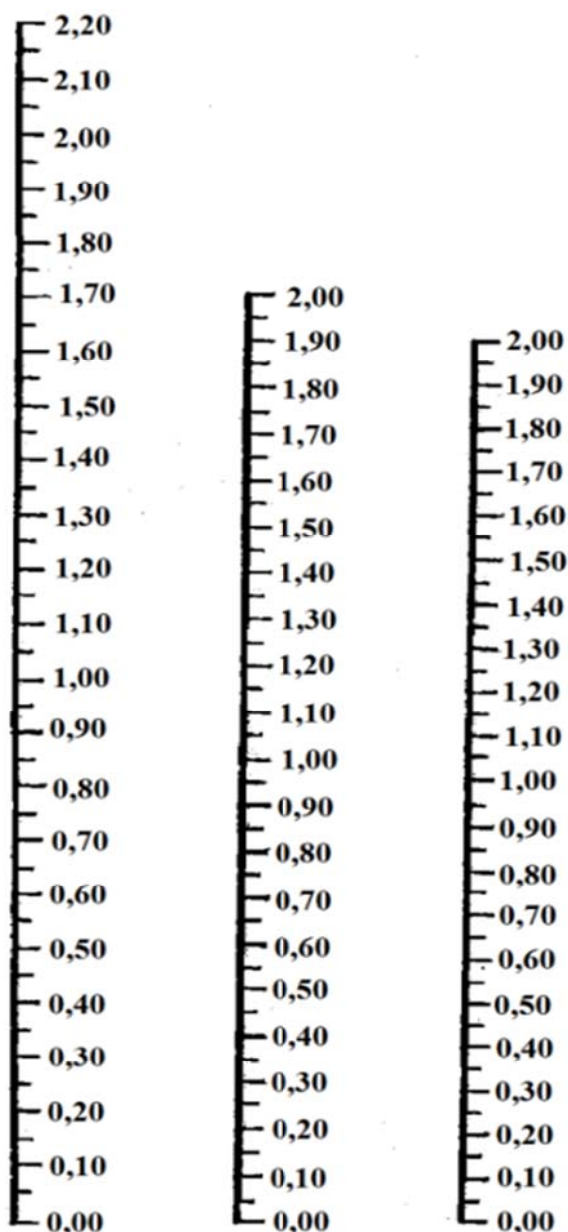


Рис. 1. Номограма для визначення концентрації протеїну

відних стовпця і з'єднайте їх прямою лінією. Точка перетину цієї прямої зі шкалою, на якій наведена концентрація білка, визначатиме вміст білка в досліджуваному розчині (рис. 1).

1.4. Концентрацію протеїну можна також розрахувати за формулою Калькара:

$$C = 1,45 \cdot A_{280} - 0,74 \cdot A_{260}$$

2. Біуретовий метод

Основні теоретичні відомості

Біуретовий метод ґрунтується на формуванні комплексних сполук синьо-фіолетового забарвлення через взаємодію іонів купруму з пептидними зв'язками білка в лужному середовищі. Забарвлений комплекс утворюється лише з пептидами, які містять більше ніж 4 амінокислотні залишки. Абсорбцію розчину, що є пропорційною концентрації пептиду, визначають при 540–560 нм. Чутливість методу – 2–10 мг/мл.

Хід роботи

2.1. У пробірки № 1 налейте 1 мл розчину білка водоростей, № 2–1 мл стандартного розчину білка, № 3–1 мл води (контроль).

2.2. У кожен з пробірок налейте по 2 мл біуретового реактиву, добре перемішайте й залишіть на 30 хв.

2.3. Після закінчення цього часу проведіть вимірювання на ФЕКу при зеленому світлофільтрі (540–560 нм) і розрахуйте вміст білка в розчинах за формулою:

$$C_{\text{досл.}} = C_{\text{ст.}} \cdot E_{\text{досл.}} / E_{\text{ст.}},$$

де $C_{\text{досл.}}$ – концентрація невідомого розчину білка,
 $C_{\text{ст.}}$ – концентрація стандартного розчину білка (100 г/л),
 $E_{\text{досл.}}$ – екстинкція дослідної проби (невідомого розчину білка),
 $E_{\text{ст.}}$ – екстинкція стандартного розчину білка.

Приклад розрахунку. Якщо екстинкція стандартної проби дорівнює 0,40, а дослідної проби – 0,24, то: $C = 100 \cdot 0,24 / 0,40 = 60$ (г/л)

3. Метод Лоурі

Основні теоретичні відомості

Метод Лоурі базується на вимірюванні інтенсивності забарвлення, яке дає білок у якісних реакціях – біуретовій та реакції Фоліна. Забарвлення розчину зумовлюється утворенням комплексних сполук синього кольору при відновленні вольфрамової та фосфорномолібденової кислот реактиву фолінатирозиновими та цистеїновими радикалами сполук білка, що утворюються при його взаємодії з лужним розчином CuSO_4 . Поєднання двох реакцій (біуретової та реакції Фоліна) значно підвищує чутливість методу. Метод Лоурі майже в 100 разів чутливіший, ніж біуретовий, і в 10–20 разів, ніж спектрофотометричний; та специфічніший. Це дає змогу визначати слідові кількості білка (20–50 мкг/мл).

Хід роботи

Для проведення визначень кількості білка за методом Лоурі приготуйте реактиви А, В та С.

Реактив А: 20,4 г Na_2CO_3 розчинити в 1 л дистильованої води.

Реактив В: 1 г $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 + 0,5$ г $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ + розчинити в 98,5 мл H_2O .

Реактив С: змішайте реактив А + реактив В у співвідношенні 49:1.

Розчин 1 моль/л (1N) NaOH : розчинити 40 г в 1 л дистильованої води.

2.1. До осаду, отриманого після екстракції каротиноїдів і хлорофілів, внести по 2 мл NaOH і розчинити білки при температурі 45-60°C.

2.2. Після цього відберіть по 50 мкл розчину, перенесіть в пробірки та додайте по 350 мкл NaOH та по 2 мл реактива С.

2.3. Через 10 хвилин в проби додайте по 200 мкл реактива Фоліна та залишіть на 30 хв у темряві.

2.4. Оптичну щільність виміряйте на двопроменевому спектрофотометрі UV-2600 («Shimadzu», Японія) проти фонові проби, яка не містила надосадової рідини з білками, при довжині хвиль 650 нм.

2.5. Кількість білка в пробах знайдіть за калібрувальною кривою.

2.6. Побудова калібрувального графіка. Для побудови калібрувального графіка приготуйте 10 мл стандартного розчину білка, який містить 4 мг сироваткового альбуміну людини у 10 мл розчину NaOH . Для серії пробірок 1, 2, 3 до 1 мл отриманого розчину додайте 1 мл NaOH і відберіть по 50, 100, 150 мкл; з 4 по 12 пробірку відберіть з вихідного розчину 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400 мкл. З кожною пробіркою проведіть реакцію, як описано вище. Виміряйте інтенсивність забарвлення кожної проби (три повтори для кожної проби) на спектрофотометрі при довжині хвилі 650 нм. Дані внесіть в таблицю 1.

Таблиця 1. Дані для побудови калібрувального графіка

№ проби	Об'єм розчину, мкл	Кількість білка, мкг	E ₆₅₀	E ₆₅₀	E ₆₅₀
1	50	10			
2	100	20			
3	150	30			
4	100	40			
5	125	50			
6	150	60			
7	175	70			
8	200	80			
9	250	100			
10	300	120			
11	350	140			
12	400	160			

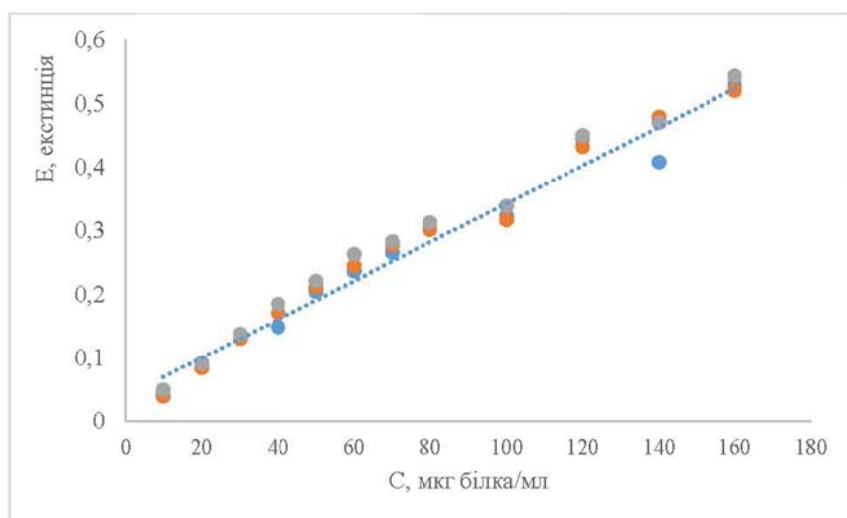


Рис. 2. Калібрувальний графік для визначення концентрації білка

2.7. Калібрувальний графік побудуйте, відкладаючи на осі абсцис концентрації використаних розчинів білка, а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкцій. Приклад калібрувального графіка наведено на рисунку 2.

4. Метод Бредфорда

Основні теоретичні відомості

Метод ґрунтується на зв'язуванні з білками одного з кислих барвників Coomassie brilliant blue, що випускається в двох модифікаціях: R-250 і G-250. При зв'язуванні з протеїнами спектр поглинання барвника змінюється, що дозволяє використовувати цей метод для дуже чуткого визначення вмісту протеїну у діапазоні від 1 до 10 мкг/мл. Оскільки протеїни можуть відрізнятися за здатністю зв'язувати барвники, калібрувальний графік будується з використанням білка, концентрацію якого передбачається визначати в майбутньому.

Хід роботи

4.1. Барвник Coomassie brilliant blue G масою 10 мг прогомогенізуйте в 5 мл 95 %-го етилового спирту. Отриманий розчин змішайте з 10 мл 95 %-ї фосфорної кислоти, доведіть водою до кінцевого об'єму 100 мл. Відфільтрований розчин барвника зберігайте при кімнатній температурі близько двох тижнів.

4.2. Візьміть дві пробірки: у першу (дослідну) внесіть 0,05 мл сироватки крові та 1,45 мл дистилату, в другу (контрольну) – 1,5 мл дистильованої води.

4.3. До вмісту обох пробірок додайте 1,5 мл барвника Coomassie brilliant blue G.

4.4. Побудова калібрувального графіка. Для побудови калібрувального приготуйте 20 мл стандартного розчину протеїну, який містить 10 мкг білка у 1 мл розчину. У серію пробірок відберіть по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мкг білка. Для отримання відповідних концентрацій у кожену пробірку внесіть необхідну кількість стандартного розчину (як зазначено в таблиці 2). Об'єм кожної пробірки доведіть дистилатом до 1,5 мл. З кожною пробіркою проведіть реакцію, як описано вище. Виміряйте інтенсивність забарвлення кожної проби через 5 хв на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 595 нм.

Таблиця 2. Дані для побудови калібрувального графіка

Кількість стандартного розчину, мл	Кількість H ₂ O, мл	Концентрація білка, мкг/мл	Екстинкція, од. абсорбції
0,15	1,35	1	
0,30	1,2	2	
0,45	1,05	3	
0,6	0,9	4	
0,75	0,75	5	
0,9	0,6	6	
1,05	0,45	7	
1,2	0,30	8	
1,35	0,15	9	
1,5		10	

Оформлення роботи. Розрахуйте концентрацію протеїну в дослідних зразках з використанням різних методів. Порівняйте отримані результати.

Контрольні запитання

1. Наведіть порівняльну характеристику основних колориметричних методів кількісного визначення білка.
2. Що лежить в основі спектрофотометричного визначення кількісного вмісту білка в біологічному матеріалі?
3. Які підходи обрахунку кількості протеїну в біоматеріалі використовуються при спектрофотометричному визначенні?
4. Які амінокислоти білків володіють максимумом поглинання при 280 нм? Як дана властивість використовується у лабораторній практиці?
5. Поясніть принцип реакції, на якій ґрунтується кількісне визначення білка біуретовим методом.
6. Який принцип визначення білка методом Лоурі?
7. Чому метод Лоурі чутливіший порівняно з біуретовим?
8. Яке значення має кількісне визначення вмісту білка?
9. Схарактеризуйте принцип методу Бредфорда.
10. Який барвник використовується для зв'язування протеїнів за методом Бредфорда?

Література: [16, 17].

Кількісне визначення вмісту хлорофілів і каротиноїдів Основні теоретичні відомості

Найважливішим показником продуктивності клітинної культури є характеристика фотосинтетичного апарату клітин [18]. У мікроводорості *Dunaliella viridis*, яка є фотоавтотрофом, наприклад, фотосинтез є основним енергетичним процесом, що відображає її функціональний стан. У *D. viridis* присутні дві форми хлорофілу – а і b. Хлорофіл а забезпечує оксигенний фотосинтез, а хлорофіл b входить до складу фотостабілізуючого комплексу фотосинтетичного апарату, тобто виконує допоміжну функцію. Співвідношення хлорофілу а / b є інформативним показником реакції фотосинтетичного апарату на стресові умови. Чим більше цей показник, тим інтенсивніше проходить фотосинтез.

Важливу допоміжну роль у процесі фотосинтезу і стабілізації мембран відіграють каротиноїди. Вони беруть участь у захисті фотосинтетичного апарату від факторів, зокрема від високої температури [19]. Відношення суми хлорофілів (а + b) до загальних каротиноїдів клітини є показником стрес-стійкості. Чим менше це співвідношення (а + b / кар), тим вище стійкість мікроводоростей до екстремальних впливів.

Матеріали дослідження та реактиви: культура водоростей *D. viridis*, 96 %-й розчин етанолу, пробірки, штативи, піпетки, спектрофотометр.

Хід роботи

1. Для екстракції каротиноїдів клітин *D. viridis* 10 мл культури центрифугувати 15 хв. 3 тис. обертів за хв. Осад клітин двічі промити дистильованою водою і суспендувати в 4 мл 96 % спирту. Зразки залишити на 12 годин в холодильнику при температурі 4 °С.

2. Оптичну щільність розчинів визначати відносно 96 % спирту на спектрофотометрі при довжинах хвиль 440,5 нм (для каротиноїдів); 649 нм (для хлорофілу "b") і 665 нм (для хлорофілу "a"), що відповідають адсорбційному максимуму каротиноїдів та хлорофілу А і В. Вміст пігментів виражати мкг/мг сухої маси.

3. Для розрахунків використовувати формули:

Для 96 % розчину етанолу:

$$C_{\text{хл. а}} = 13,70D_{665} - 5,76D_{649};$$

$$C_{\text{хл. b}} = 25,80D_{649} - 7,60D_{665}; C_{\text{хл. а}} + C_{\text{хл. b}} = 6,11D_{665} + 20,04D_{649},$$

де $C_{\text{хл. а}}$, $C_{\text{хл. b}}$, $C_{\text{хл. а}} + \text{хл. b}$ та скар. – відповідно концентрації хлорофілів, а і b, їх суми і каротиноїдів, мг/мл; D – експериментально отримані величини оптичної густини за відповідних довжин хвиль. Вміст хлорофілу в масі рослинного матеріалу x (на один грам матеріалу) розрахувати за формулою:

$$x = \frac{c_{\text{хл.}} V}{m},$$

де $C_{\text{хл.}}$ – концентрація хлорофілу а чи b, їх суми або каротиноїдів, мг/мл; V – об'єм, мл; m – маса рослинного матеріалу, г.

На рисунку 3 як приклад представлено результати дослідження вмісту хлорофілів і каротиноїдів у клітинах контрольної CuS і резистентної CuR культури водоростей *D.viridis*.

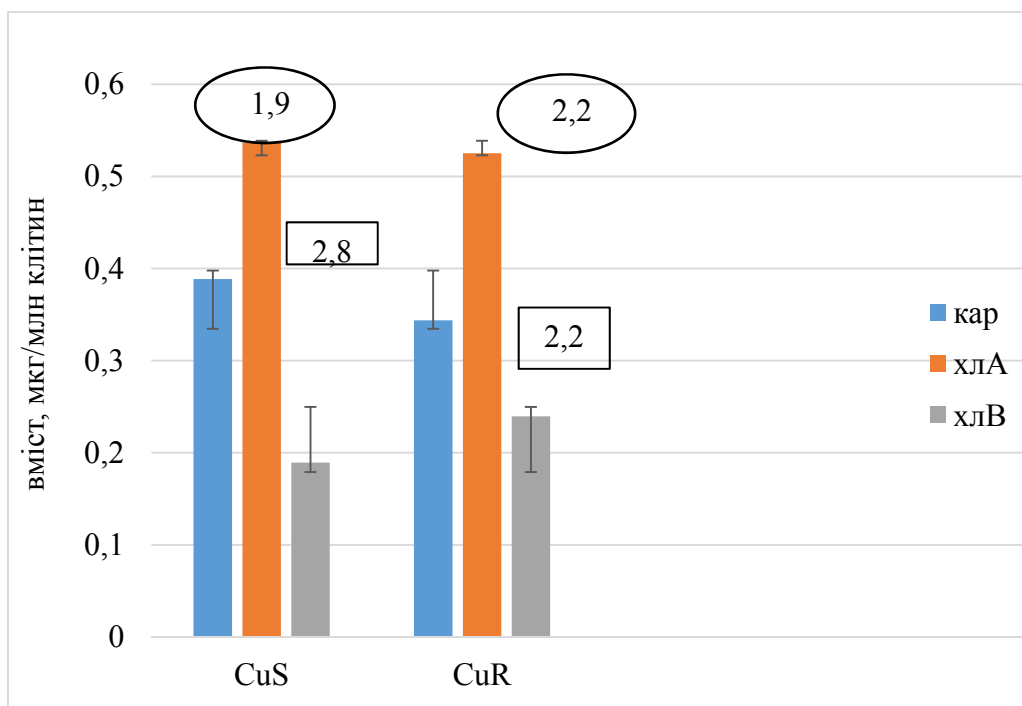


Рис. 3. Вміст хлорофілів і каротиноїдів у клітинах контрольної CuS і резистентної CuR культури водоростей *D.viridis*

Оформлення роботи. Розрахуйте концентрацію хлорофілів і каротиноїдів у дослідних зразках і тих, що зазнали дії стрес-факторів (наприклад важких металів). Порівняйте і проаналізуйте отримані результати. Користуючись спеціальною літературою, запропонувати можливі пояснення впливу стресорів на вміст хлорофілів і каротиноїдів у клітинах водоростей.

Контрольні питання

1. Які фактори впливають на кількісний вміст хлорофілів та загальних каротиноїдів?
2. Яку функцію в клітині виконує хлорофіл А?
3. Де розташовані і яку функцію в клітинах водоростей виконують каротиноїди?
4. Про що свідчить співвідношення хлорофілів а/б?

Література: [17-19].

Визначення вмісту РНК, ДНК в клітинах водоростей Основні теоретичні відомості

Відомо, що мікрowodорості мають численні медичні та промислові застосування. Молекулярні дослідження є важливими у вивченні мікрowodоростей, і для цього потрібні відповідні концентрації ДНК, вільні від домішок. Наразі існує багато протоколів для виділення ДНК з мікрowodоростей. Однак вони або трудомісткі, або дорогі, або працюють лише з кількома видами. У цьому дослідженні [20] було застосовано різні методи екстракції ДНК, щоб отримати високу концентрацію ДНК водоростей з найменшою кількістю домішок. Загалом у дослідженні було використано 30 зразків п'яти родів водоростей. Результати показали, що з п'яти методів екстракції використання SDS дало найвищу якість і кількість ДНК, за яким слідує метод CTAB. Виділені ДНК водоростей, отримані методами SDS, CTAB і DTAB, були придатні для ПЛР-ампліфікації ділянки 18S *рДНК*. Для визначення якості виділеної ДНК водоростей також використовували *MseI*-розщеплення. Геномна ДНК 24 з 30, 16 з 30 та 5 з 30 зразків водоростей, які були виділені методами SDS, CTAB та DTAB, відповідно, піддавалася розщепленню *MseI*. З іншого боку, використання методів Triton x-100 та Chelex -100 призвело до низької якості ДНК.

Набір РНК-молекул, на відміну від ДНК, є різноманітним і представлений різними типами (мРНК, рРНК, тРНК). Різноманітність РНК у клітинах про- і еукаріотів, а також їх специфічні функції, є основою для передачі та реалізації генетичної інформації під час синтезу білків за матричною ДНК (генетична експресія). Кількість моонуклеотидних залишків у молекулах РНК має значні значення – від сотень тисяч до десятків мільйонів. Це призводить до високих значень молекулярної маси, що є важливою характеристикою цих молекул. Кількість нуклеїнових кислот у клітинах різних тканин одного організму є стабільною в межах гаплоїдного набору

хромосом, але може змінюватися відповідно до зміни плоїдності, хоча це відбувається у меншій мірі, ніж зміна вмісту інших компонентів клітини. Варто відзначити, що існують певні винятки з цього правила. Відношення вмісту ДНК/РНК є інтегральним параметром, який певною мірою характеризує функціональну активність геному [20].

Для аналізу кількості ДНК в клітинах водоростей використовували метод Спіріна, в основі якого лежить екстракція нуклеїнових кислот з досліджуваного матеріалу гарячою хлорною кислотою і спектрофотометричне визначення поглинання в ультрафіолетовій області спектра [21]. Перевагою даного методу є висока чутливість. Екстракція нуклеїнових кислот з клітин досліджуваного матеріалу супроводжується їх гідролізом, тому важливо попередньо очистити проби від вільних нуклеотидів.

Матеріали дослідження та реактиви: культура водоростей *D. viridis*, HClO_4 (5 % і 60 %), хлороформ, метанол, 0,6 N KOH, пробірки, штативи, піпетки, центрифуга, водяна баня, холодильник, спектрофотометр.

Хід роботи

1. Для визначення вмісту РНК, ДНК в клітинах *Dunaliella viridis* 10мл культури центрифугувати 15 хв. 3 тис. обертів за хв. З вихідної культури мікроводоростей відібрати дозатором аликвоту об'ємом 150–200 мкл для підрахунку клітин в камері Горяєва (див. практичну роботу № 2).

2. Осад клітин двічі промити дистильованою водою, відмити від солей поживного середовища і відповідно двічі центрифугувати 10 хв. 3 тис. обертів за хв.

3. Для видалення пігментів з клітин осад відмити сумішшю хлороформ-метанолу (1:2) три рази: протягом 60 хвилин перший раз та по 40 хвилин другий та третій. Після кожної відмивки центрифугувати 10 хв. 3 тис. обертів за хв.

4. Після видалення хлороформ-метанолу до осаду клітин при температурі 0°C додати HClO_4 (5 %), центрифугувати 10 хв. 3 тис. обертів за хв. та злити надосадову рідину. Процедуру повторити три рази. Проведення даного етапу за низької температури необхідне для запобігання кислотної та ферментативної деструкції нуклеїнових кислот.

5. Для гідролізу РНК до отриманого осаду клітин внести по 1 мл дистильованої води та 1 мл 0,6 N KOH і поставити на водяну баню (37°C) на 1,5 години.

6. Після охолодження до проб додати по 200 мкл HClO_4 (60 %) для осадження білків, що розчиняються в KOH. Проби витримати при температурі 4°C протягом 12 годин.

7. Після цього центрифугувати 10 хв. 3 тис. обертів за хв. та відібрати по 200 мкл надосадової рідини з РНК, перенести в пробірки, додати по 3 мл дистильованої води, визначити оптичну щільність на

двопроменевому спектрофотометрі UV-2600 («Shimadzu», Японія) при довжині хвиль 270 нм і 290 нм та розрахувати вміст РНК за формулою:

$$x = \frac{(E_{270} - E_{290})}{0,19} \cdot 10,5/C,$$

де E_{270} і E_{290} – значення оптичної густини, виміряні при відповідних довжинах хвиль;

0,19 – коефіцієнт питомої екстинкції нуклеїнових кислот (середнє значення різниці показів оптичної густини ($D_{270} - D_{290}$), що відповідає вмісту 1 мкг фосфору нуклеїнових кислот в 1 мл випробовуваного розчину);

10,5 – коефіцієнт перерахунку кількості фосфору на нуклеїнові кислоти, мкг/мл;

C – кількість клітин млн/мл, або АСМ (абсолютно суха маса) мг, г;

метод застосовний при виконанні умови: показання оптичної густини при A_{270} і A_{290} не повинні відрізнятися більше, ніж на 15 %.

Примітка: підрахувати клітини в камері Горяєва, помножити кількість на 10 мл (загальний об'єм проби), після отримане значення підставити в формулу. Отримаємо значення мкг РНК на млн клітин.

8. Для визначення кількості ДНК в зразках до осаду клітин внести по 2 мл HClO_4 (5 %) і відмити від залишків нуклеотидів РНК, після чого центрифугувати 3000 об/хв протягом 15 хвилин і надосадову злити. Поставити на водяну баню при температурі 100°C на 20 хвилин. Потім проби охолодити в холодильнику, центрифугувати та перелити надосадову рідину у чисті пробірки. До надосадової рідини додати по 1 мл дистильованої води та визначити оптичну щільність на спектрофотометрі при довжині хвиль 270 нм та 290 нм, розрахувати вміст ДНК за формулою:

$$x = \frac{(E_{270} - E_{290})}{0,19} \cdot 10,1/C, \text{ складові формули описані вище.}$$

Оформлення роботи. Розрахуйте кількість ДНК і РНК в дослідних зразках. Відповідно до виданих викладачем завдань порівняти вміст ДНК і РНК в *CuS* і *CuR* культурах *Dunaliella viridis*.

Контрольні питання

1. Які фактори впливають на кількісний вміст ДНК?
2. Які існують типи РНК?
3. На чому заснований метод Спіріна?
4. Про що свідчить відношення ДНК/РНК?

Література: [20, 21].

Фенол-сірчаноокислотний метод (визначення кількості загального цукру у культуральному середовищі) Основні теоретичні відомості

Полісахариди мікроводоростей можна розділити на внутрішньоклітинні та структурні (які включають екзополісахариди, що вивільняються в середовище, зв'язані з клітинами полісахариди та полісахариди клітинної стінки) [22]. Полісахариди – це полімери, утворені довгими ланцюгами моносахаридів. Залежно від моносахаридів, присутніх по всьому ланцюгу, і типу зв'язку утворюється різний полісахарид з певною структурою і складом [23].

Екзополісахариди мікроводоростей синтезуються під час культивування мікроводоростей внаслідок нормальних фізіологічних процесів або стресових умов. Залежно від типу полісахариду, який потрібно вилучити, та умов культивування мікроводоростей, необхідні певні етапи екстракції та очищення; найчастіше використовують центрифугування та фільтрацію. Екзополісахариди можуть бути відновлені з культурального середовища, що призводить до валоризації процесу. Нещодавно проведені дослідження показали (рис. 4), що полісахариди мікроводоростей можна використовувати в нутрицевтиках, харчових продуктах і в якості біофлукулянтів [24, 25].

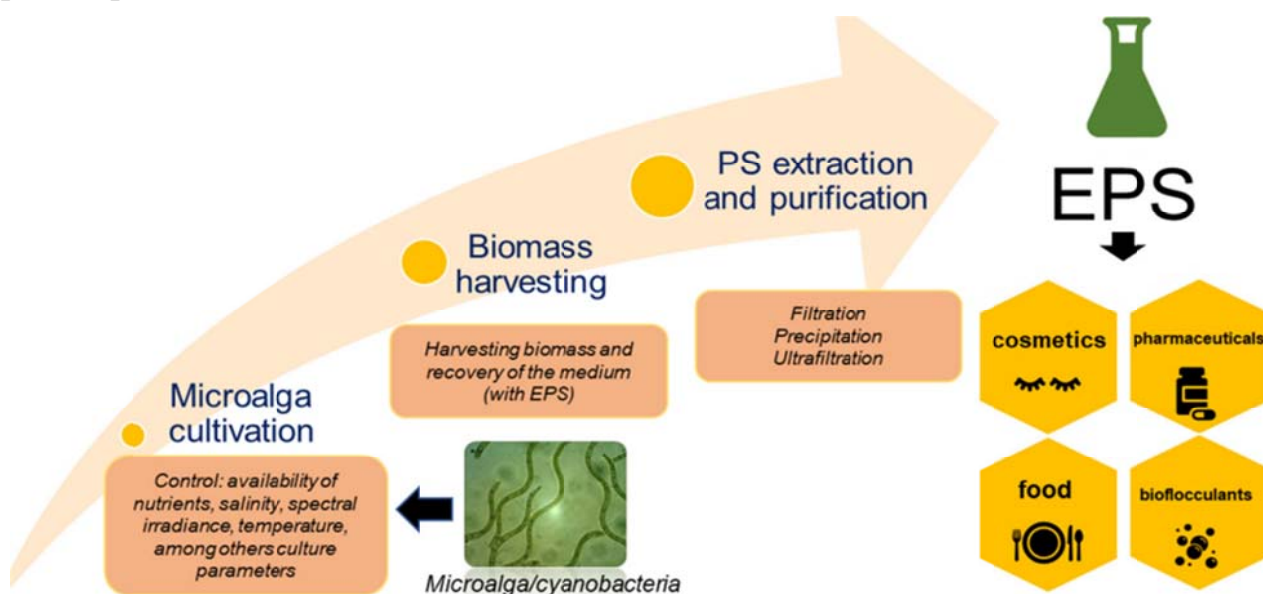


Рис. 4. Етапи отримання екзополісахаридів (ЕПС) з культур мікроводоростей і ціанобактерій та їх потенційне застосування [25]

Метод заснований на взаємодії продуктів розкладання цукрів у сильноокислому середовищі з фенолом, в результаті якого утворюються продукти конденсації, пофарбовані в жовто-оранжевий колір. Інтенсивність забарвлення в певних межах концентрацій пропорційна кількості цукрів у розчині. Під впливом кислого середовища при нагріванні сахароза та інші олігосахариди піддаються гідролізу з утворенням моносахаридів, які потім

в результаті дегідратації (відщеплення молекул води) перетворюються в фурфурол або оксиметил-фурфурол. Фурфурол і оксиметилфурфурол далі вступають у реакції конденсації з фенолом, утворюючи продукти конденсації, пофарбовані в жовто-оранжевий колір. Оптичну щільність отриманого забарвленого розчину визначають на фотоелектроколориметрі або спектрофотометрі [26].

Матеріали дослідження та реактиви: культура водоростей *D. viridis*, фенольний реактив (5 г фенолу та 100 мл дистильованої води), сірчана кислота конц., пробірки, штативи, піпетки, спектрофотометр.

Хід роботи

1. До 0,5 мл досліджуваного розчину внести по 0,5 мл фенольного реактиву. Проби швидко перемішати та додати по 2,5 мл конц. сірчаної кислоти, знову ретельно перемішати.

2. Через 30 хвилин на спектрофотометрі визначити оптичну щільність розчинів при 488 нм проти контрольної проби, яка не містить досліджуваного розчину, та розрахувати за формулою:

$$\text{мкг глюкози} = (45,9 \cdot E_{488} + 1,62) \cdot \text{коеф. розведення}$$

Оформлення роботи. Розрахувати концентрацію глюкози в дослідних зразках з різних культуральних середовищ мікробіодоростей. Зробити висновок щодо отриманих результатів.

Контрольні питання

1. На чому заснований фенольно-кислотний метод визначення кількості загального цукру?
2. Дайте характеристику реакції конденсації.
3. Сфери використання екзополісахаридів водоростей.

Література: [22-26].

Практична робота № 6

Визначення вмісту загальних ліпідів з клітин мікроводоростей

Мета роботи – визначити вміст триацилглицеридів (ТГ) з клітин мікроводоростей *Dunaliella viridis* в умовах накопичувального культивування.

Основні теоретичні відомості

Середній вміст ліпідів у клітинах водоростей варіює від 1 до 70 %, а за певних умов може досягати навіть до 90 % маси сухої речовини. Велика кількість ліпідів живих організмів входить до складу клітинних мембран. Як і в усіх живих істот, мембранними ліпідами більшості органел водоростей є переважно фосфоліпіди (фосфоглицериди). Однак ліпідна складова мембран хлоропластів здатних до фотосинтезу еукаріот, а також синьозелених водоростей (ціанобактерій) представлена чотирма класами полярних глицероліпідів, з яких фосфоліпідом є лише один – фосфатидилглицерол (ФГ). Основну ж частку складають гліколіпіди (глікозилглицериди) – 2 нейтральні галактоліпіди моногалактозилдіацилглицерол (МГДГ) і дигалактозилдіацилглицерол (ДГДГ), а також аніонний сульфоногліколіпід сульфохіновозилдіацилглицерол (СХДГ) [27].

Оскільки основна частина внутрішньоклітинних мембран водоростей припадає на тилакоїди хлоропластів, то властиві для них ліпіди переважають в екстракті з цілих клітин. У більшості випадків 4 глицероліпіди – МГДГ, ДГДГ, СХДГ і ФГ – присутні в значній кількості, також істотні частки належать фосфатидилхоліну і фосфатидилетаноламіну. Деякі водорості здатні запасати досить велику кількість ліпідів у формі триацилглицеролів (до 57 % сумарних ліпідів), які відкладаються в цитоплазмі у вигляді великих крапель. У здорових клітинах, що активно діляться, частка триглицеридів у загальній кількості ліпідів зазвичай є низькою. Однак перехід водоростей у стаціонарну фазу росту чи вплив деяких стресових чинників може стимулювати нагромадження триглицеридів. Посилений синтез триацилглицеролів та відкладання їх у запас вважається одним з елементів ранньої відповіді на ріст в умовах, коли кількість енергії, що надходить ззовні, перевищує можливості клітини утилізувати цю енергію шляхом росту й поділу клітин. Для прокаріотичних синьозелених водоростей не властиве запасання ліпідів у формі триацилглицеролів, практично всі їх жирні кислоти входять до складу полярних ліпідів, які утворюють велику систему фотосинтетичних мембран [27].

Культури, що фотосинтезують, містять жирні кислоти від C14 до C22 з переважанням C16 і C18 кислот, а гетеротрофні – переважно 14:0, 16:0 і 18:1 кислоти. До типових жирних кислот діатомових та еустигмато-

фітових водоростей відносяться міристинова, пальмітинова, пальмітоолеїнова та ейкозапентаєнова; при цьому вміст С18 кислот здебільшого є низьким. Червоні водорості багаті на ненасичені довголанцюгові жирні кислоти, головним чином С20 – ейкозапентаєнову та арахідонову. Зелені водорості здебільшого мають подібний до вищих рослин та олійних дріжджів жирнокислотний склад – з домінуванням С16 і С18 кислот, як насичених, так і ненасичених [27].

На загальну кількість жирних кислот та їх взаємні співвідношення значною мірою впливають фактори оточуючого середовища, наприклад, коливання температури чи голодування по азоту. Відсутність або дефіцит азоту в середовищі культивування, зниження температури стимулюють нагромадження ПНЖК [28].

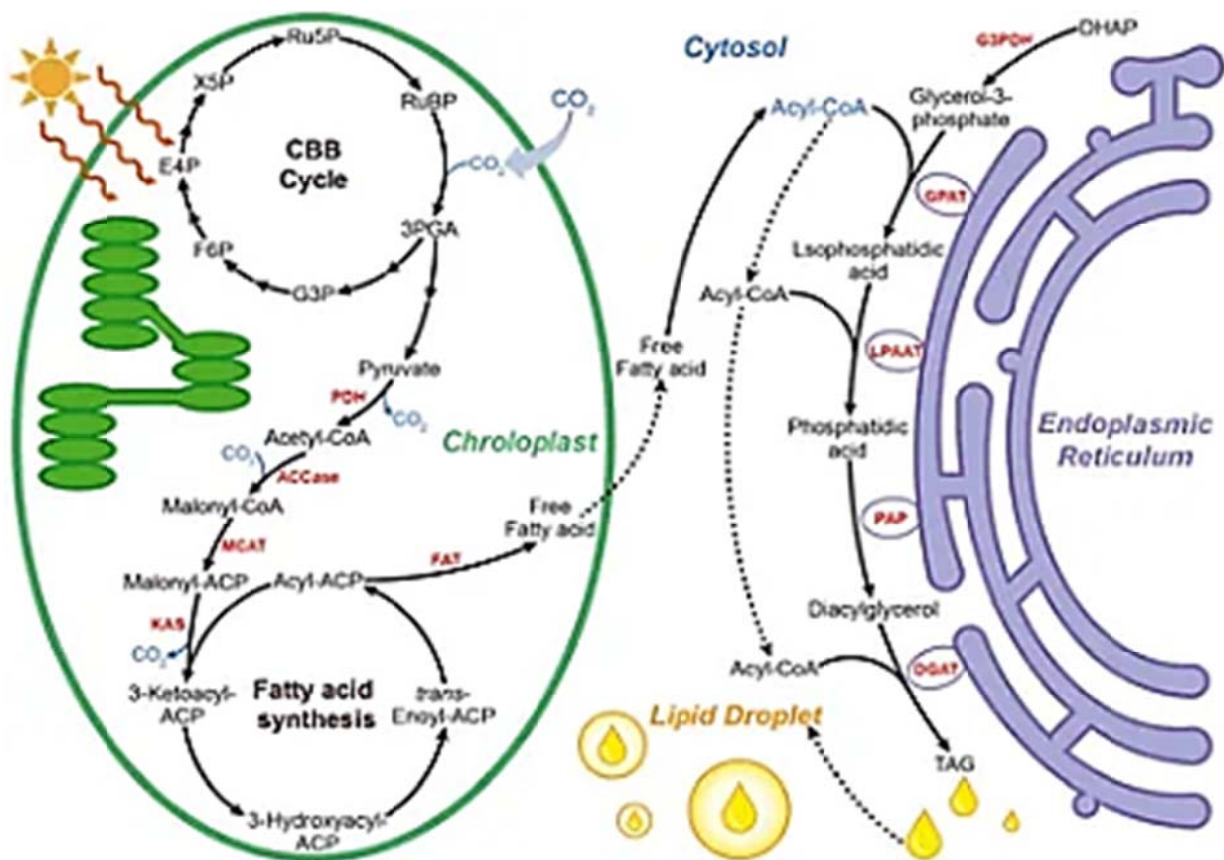


Рис. 1. Схематичний огляд метаболічних шляхів, що беруть участь у синтезі ліпідів у мікрроводоростей. 3PGA, 3-фосфогліцерат; ACCase, ацетил-KoA карбоксилаза; DGAT, діацилгліцеролацилтрансфераза; DHAP, дигідроксиацетонфосфат; E4P, еритрозо-4-фосфат; F6P, фруктозо-6-фосфат; FAT, тіоестераза жирних ацил-ACP; G3P, гліцеральдегід-3-фосфат; G3PDH, гіцерол-3-фосфатдегідрогеназа; GPAT, гліцерол-3-фосфат-ацилтрансфераза; KAS, 3-кетואцил-АКФ-синтаза; LPAAT, ацилтрансфераза лізофосфатидної кислоти; MCAT, малоніл-KoA ацилтрансацिलाза білка-переносника; ФАП, фосфатаза фосфатидної кислоти; ПДГ, піруватдегідрогеназний комплекс; Ru5P, рибулозо-5-фосфат; RuBP, рибулозо-1,5-бісфосфат; TAG, триацилгліцероли; X5P, ксилулозо-5-фосфат [29]

У діатомових водоростей вирішальним для нагромадження n-3 ПНЖК є достатня кількість силікатів у середовищі культивування. Відомо, що відносний вміст ейкозапентаєнової і докозагексаєнової кислот у мікроводоростей падає при нестачі фосфату. Хлорид амонію пригнічує ріст культури *Spirulina platensis*, проте приводить до зростання в ній вмісту γ -ліноленової кислоти. Як уже згадувалося, під час стаціонарної фази росту у багатьох мікроводоростей підвищується вміст сумарних ліпідів, особливо триацилгліцеролів. Проте цей процес супроводжується зростанням у ліпідах відносної кількості насичених і мононенасичених жирних кислот і, як наслідок, зниженням вмісту ПНЖК. Причиною цього є те, що насичені і моноєнові жирні кислоти дають більше енергії при окисненні, ніж полієнові, і, отже, забезпечують більшу ефективність запасання ліпідів. Мікроводорості є основним первинним продуцентом довголанцюгових поліненасичених n-3 жирних кислот, особливо докозагексаєнової (ДГК), у біосфері; навіть у морських макрофітів ДГК зустрічається переважно в слідових кількостях. Тому в останні десятиріччя одноклітинні водорості (рис. 1) привертають пильну увагу як вагоме джерело незвичайних та цінних ліпідів і жирних кислот [28, 29].

Відомо, що умови культивування, склад живильного середовища, температура тощо впливають на метаболізм і накопичення певних речовин в клітинах мікроводоростей, зокрема *Dunaliella viridis* [9-11]. Тому перед культивуванням мікроводоростей необхідно визначити умови культивування і кількість метаболітів, які накопичують клітини.

Матеріали дослідження та реактиви: культура водоростей *D. viridis*, хлороформ, метанол, хроматографічні силікогельові пластинки, сірчана кислота, пробірки, штативи, піпетки, вакуумна шафа, спектрофотометр.

Хід роботи

1. Клітини мікроводоростей центрифугувати при 3000 об/хв протягом 15 хвилин. Осад клітин промити чистим середовищем Артарі і вторинно центрифугувати при тих самих умовах.

2. Далі провести екстракцію ліпідів. Для цього до осаду клітин додати 2 мл суміші хлороформ : метанол (2 : 1) і залишити проби на 1 годину при кімнатній температурі. Після екстракції проби центрифугувати при 3000 об/хв 15 хвилин. Зібрати супернатант, а до осаду додати 2 мл суміші хлороформ : метанол : вода (1 : 2 : 0,8). Провести екстракцію ліпідів протягом 30 хвилин. Після екстракції проби центрифугувати при 3000 об/хв 10 хвилин і зібрати супернатант. Потім два супернатанти з'єднати, додати 1 мл хлороформу, 2 мл H_2O і центрифугувати (3000 об/хв, 10 хвилин). Після розділу фаз відібрати нижню ліпідну фракцію і залишити проби упарювати в вакуумній шафі.

Після випарювання провести розділ ліпідів на фракції за допомогою тонкошарової хроматографії (ТШХ).

3. *Тонкошарова хроматографія*. Перед проведенням ТШХ хроматографічні силікогельові пластинки активувати при температурі 120°C протягом 40 хвилин. В якості елюента використати розчин гексан : діетиловий ефір у відношенні 4 : 1, парами якого попередньо наситити камеру протягом 20 хвилин.

4. Для розділу ліпідів методом ТШХ в упарені проби додавати 50–100 мл хлороформу. Потім точково нанести зразки ліпідів на хроматографічні пластинки. Після нанесення зразків пластинки помістити в камеру з елюентом. Після закінчення процесу розділу ліпідів пластинки висушити. Для прояву різних фракцій ліпідів пластинки помістити в ексикатор, насичений парами йоду. Отримані фракції обвести голкою.

5. Визначення вмісту триацилгліцеридів спектрофотометричним методом. Після проведення ТШХ зіскоблити фракції ТГ в пластикові пробірки.

6. Для визначення вмісту ТГ в зіскоблювані фракції додати по 1 мл розчину хлороформ : метанол (1 : 2) і провести екстракцію протягом 1 години. Після закінчення екстракції зразки центрифугувати при 4000 об/хв протягом 20 хвилин. Супернатант зібрати в скляні хімічні пробірки. До осаду додати 1 мл розчину хлороформ : метанол (1 : 2) і провести повторну екстракцію протягом 30 хвилин. Проби центрифугувати при 4000 об/хв протягом 20 хвилин і отриманий супернатант з'єднати з першим. Проби поставити випаровуватися у шафу з вакуумним насосом при температурі нижче 40 °C.

7. Після упарювання до осадів додати по 1,5 мл сірчаної кислоти. Провести мінералізацію зразків при температурі 180°C протягом 20 хвилин. В остиглі проби додати по 1,5 мл дистильованої води. На спектрофотометрі Shimadzu UV-2600 визначати оптичну щільність розчину кожної проби при довжині хвилі 400 нм. Вміст ТГ розрахувати за формулою і виразити в мкг ТГ/млн кл.

8. Отримані результати записати у таблицю та зробити висновок щодо вмісту ТГ у клітинах мікроводоростей *Dunaliella viridis* в умовах накопичувального культивування.

Контрольні питання

1. Класифікація ліпідів. Будова і функції триацигліцеридів.
2. В якій фракції екстракту з цілих клітин водоростей переважають ліпіди?
3. Якими класами представлена ліпідна складова мембран хлоропластів?
4. Які фактори впливають на загальну кількість жирних кислот у біомасі водоростей?

Література: [9-11, 27-29].

Практична робота № 7

Використання мікроводоростей в біотестуванні препаратів та харчових домішок

Мета роботи – навчитися алгоритму біотестування з використанням солоноводної зеленої мікроводорості *Dunaliella viridis*.

Інтенсивний розвиток медичної науки призвів до збільшення доступності та використання фармацевтичних препаратів. У зв'язку з цим значні кількості речовин цієї групи виявляються в різних об'єктах довкілля. Зокрема, водне середовище є резервуаром лікарських засобів, що застосовуються як у медицині, так і у ветеринарії. Враховуючи поділ лікарських засобів за сферою застосування, джерела надходження цих речовин у довкілля відрізняються. Лікарські препарати для людини потрапляють у водойми переважно зі стічними водами з неметаболізованими та невикористаними ліками з лікарень, домогосподарств та фармакологічної промисловості [30].

Ці води зазвичай потрапляють на очисні споруди (ОС), де залежно від технології відбувається більша або менша деградація препаратів. У свою чергу, ветеринарні препарати найчастіше використовуються як харчові добавки як для наземних, так і для водних тварин і відіграють різну роль (наприклад, профілактичну, лікувальну, стимулятор росту) в організмах тварин-мішеней [31].

Неметаболізовані лікарські засоби та їх метаболіти виділяються з фекаліями та сечею і потрапляють у водні об'єкти шляхом вилуговування, поверхневого стоку із забрудненого гною (що використовується як добриво) та прямого забруднення в аквакультури. Як наслідок, нові забруднювачі, такі як фармацевтичні препарати, що потрапляють у навколишнє середовище, можуть спричинити негативний вплив на екосистеми. Наявні літературні дані щодо шкідливості та поширеності фармацевтичних препаратів у навколишньому середовищі свідчать про необхідність оцінки їх екологічного ризику [32]. Однак на сьогодні найбільше наукової уваги приділено нативним формам лікарських засобів, тоді як продукти трансформації (ПТ) цих речовин, під якими розуміють метаболіти, що виводяться з організму, а також продукти їх розпаду внаслідок гідролізу, фотолізу та біодеградації, залишаються малодослідженими з точки зору їх характеристики, присутності, долі та наслідків, що включають вплив на навколишнє природне середовище та здоров'я людини.

Біотестування (bioassay) – процедура встановлення токсичності середовища за допомогою тест-об'єктів, що вказують на екологічну небезпеку незалежно від того, які речовини і у яких сумішах спричиняють зміни життєво важливих функцій у тест-об'єктів.

Тест-об'єкт – організм, що використовується для оцінки токсичності хімічних речовин, природних та стічних вод, ґрунтів, донних відкладень, кормів, біологічних речовин тощо.

Тест-функції для культур одноклітинних водоростей – загибель клітин, зміна (приріст або зменшення) чисельності клітин у культурі, коефіцієнт розподілу клітин, середня швидкість росту, добовий приріст культури.

Тривалість біотестування залежить від поставленого завдання:

1. Гострі біотести виконуються за показниками виживання, тривають від кількох хвилин до 24–96 год.

2. Короткотермінові хронічні тести тривають 7 діб й закінчуються, як правило, після одержання першого покоління тест-об'єктів.

3. Хронічні тести на загальну плідність, зокрема ракоподібних, що охоплюють три покоління, тривають до народження молоді в F3.

LC0 – мінімальний поріг чутливості, за якого визначено специфічні тест-реакції або смерть тест-об'єктів.

LC50 – стандартна міра токсичності речовини, що показує, яка концентрація речовини спричиняє загибель 50 % тест-організмів за встановлений час (24, 48 або 96 год).

LC100 – найвищий смертельний поріг для всіх тварин або тест-культури водоростей, використаних у досліді [33].

Протягом багатьох років одноклітинні мікроорганізми широко застосовуються для реалізації задач в галузі охорони здоров'я та суміжних з нею напрямків, таких як фармакологія, біологія, радіологія та інших в якості індикаторних тест-систем. На даний час досить широкого практичного застосування набули тест-системи, основою яких є одноклітинні водорості. Таке превалювання обумовлене досить тривалою у часі статистикою їх використання як індикаторів. Різноманітні властивості водоростей можна використовувати в якості клітинного біосенсора як високочутливої системи біоіндикації. Реєстрацію морфологічних та функціональних змін клітин *Dunaliella viridis*, а також кількість макро- і мікроагрегатів, які утворюються, можна реєструвати за допомогою автоматизованої програми. Відсутність клітинної стінки забезпечує прямий контакт агента безпосередньо з клітинною мембраною. Зміна форми та рухливості клітин може залежати не лише від властивостей клітин, але й від природи та концентрації певних хімічних сполук в біологічних рідинах. Як наслідок, мікроводорості можуть по-різному реагувати на хімічні сполуки різного походження [34].

Також чутливим і достовірним виявився метод використання клітинної тест-системи *D. viridis* для оцінки рівня ендогенної інтоксикації при перитоніті, що дозволяє діагностувати різні ступені важкості ендотоксикозу [35]. Застосування експрес-оцінки стану компенсаторно-захисних сил організму шляхом визначення ступеня ендотоксикозу у хворих на гострий перитоніт дозволяє на ранніх етапах розвитку перитоніту діагностувати

важкість перебігу захворювання та здійснювати моніторинг компонентів сироватки в період лікування. Таким чином, використання одноклітинних водоростей, зокрема *D. viridis* в якості тест-системи для оцінювання цитотоксичності сироваток, лікарських засобів, будь-яких інших речовин з біологічно активною дією, на практиці є високочутливим методом, цінність якого полягає у можливості динамічного визначення, що характеризується низькою вартістю та простотою у використанні, а потенційними споживачами розробленої продукції можуть стати клінікодіагностичні лабораторії на базі медичних закладів різного рівня та наукові лабораторії [34].

Матеріали дослідження та реактиви: культура водоростей *D. viridis*, поживне середовище Артарі, ціанобактерії *Anabaena* sp. (рис. 1), поживне середовище Аллена (склад див. практичну роботу № 1), мікроскоп, розрахункова камера Горяєва, центрифуга, пробірки, штативи, дозатори, лабораторний посуд, планшет культуральний (рис. 1).

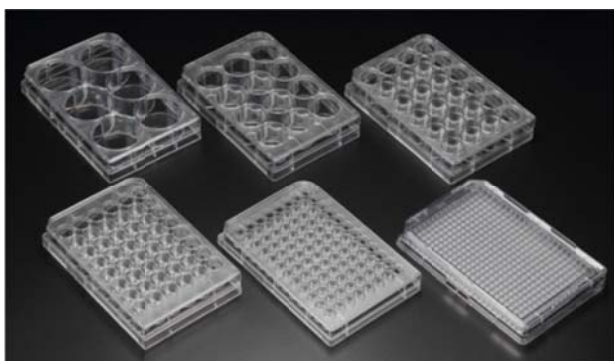


Рис. 1. Планшет культуральний ліворуч і культура *Anabaena* sp. на поживному середовищі Аллена (400 x) праворуч

Визначення чутливості тест-культури мікрроводоростей (*Dunaliella viridis*) до токсиканту (водного екстракту *Anabaena* sp.) за зміною рухливості клітин.

Хід роботи

1. Культивування *Anabaena* sp. проводити протягом 21 доби в статичних умовах за температури 24°C, в колбах Ерленмейера об'ємом 250 мл зі 100 мл поживного середовища Аллена в умовах цілодобового освітлення від 2-х ламп денного світла FD-36-E-G13 36W/2300 лм та при температурі 24–26°C. Як посівний матеріал використовувати маточну культуру *Anabaena* sp. Для цього відібрати аліквоту об'ємом 10 мл, центрифугувати 10 хвилин 3000 об/хв. Супернатант злити, осад розчинити у поживному середовищі, додати по 100 мкл суспензії ціанобактерій у кожную колбу.

2. Приготувати водний екстракт *Anabaena* sp. Біомасу *Anabaena* sp. збирати центрифугуванням (6000 об/10 хв). Осаджену біомасу піддати заморожці/розморозці в охолоджуючій суміші (100 г льоду + 33 г NaCl,

отримуючи температуру $-21,3^{\circ}\text{C}$). Процедуру повторити 3 рази, моделюючи створення стресових умов, тим самим провокуючи руйнування тріхомів та екскрецію токсинів у позаклітинне середовище. Після цього культуру висушити у термостаті протягом доби за температури 37°C . Отриманий сухий осад зважити, розтерти у порошок, додати дистильовану воду об'ємом 1 мл, перемішати до стану однорідного водного розчину. Витримати 1,5–2 год, центрифугувати, надосадову зібрати. Отриманий екстракт зберігати при $T = 4^{\circ}\text{C}$.

3. Підготовка культури *D. viridis* до тестування. Маткову культуру *D. viridis* 2-х тижневого віку центрифугувати 3 тис. об протягом 10 хвилин. Осад суспендувати в середовищі Артарі, відібрати аліквоту, розвести і порахувати кількість клітин в камері Горяєва. Вихідна щільність досліджуваної культури повинна становити 2 млн/мл, об'єм робочий 1 мл, необхідний загальний об'єм культури обчислити за кількістю комірок в планшеті (1 мл х число комірок). Далі розрахунок провести наступним чином: в 1 мл міститься а млн клітин (кількість клітин в матковій культурі), а х мл (об'єм культури, який необхідно внести) міститься в загальному об'ємі культури, отримуємо $x = (V) / a$.

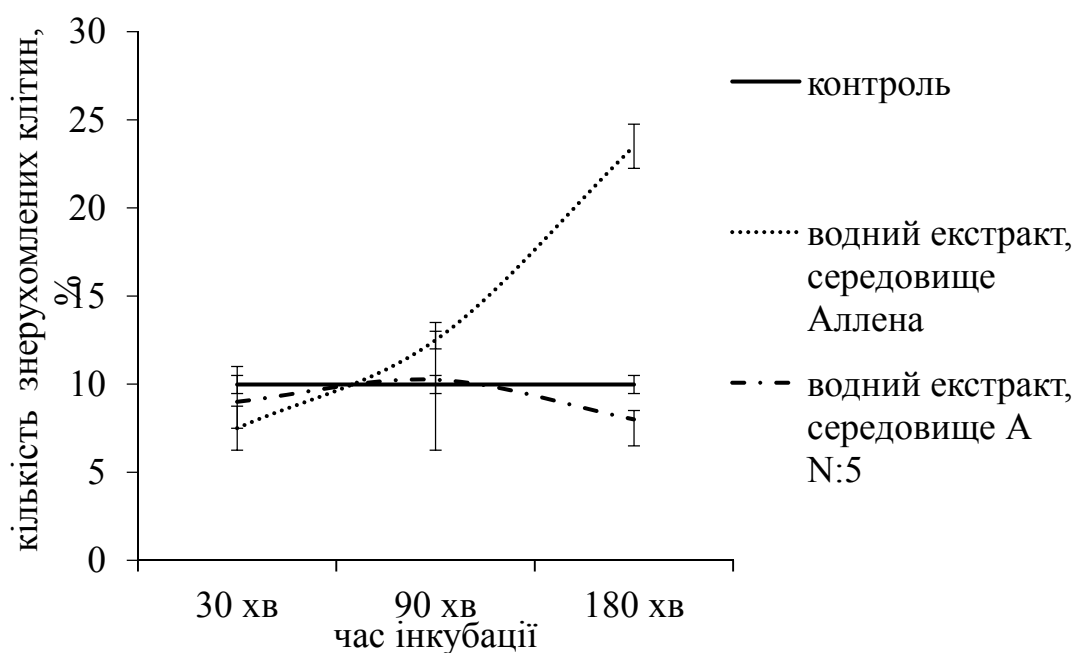
4. Скласти схему експерименту. Ставити два контролю, один без внесення досліджуваної речовини, другий з внесенням відповідного об'єму дистильованої води. Водний екстракт *Anabaena* sp. внести, наприклад, у концентраціях: 50 мкл, 75 мкл, 100 мкл та аналогічно вносити відповідний об'єм дистильованої води: 50 мкл, 75 мкл, 100 мкл – що вважати контролем. Між внесеннями розрахувати інтервал часу, необхідний для підрахунку клітин (в середньому 2 краплі з комірки, три рахункові камери, три мікроскопи (три людини), три підходи (9 комірок), 5–7 хвилин на одну камеру, приблизно 20–25 хвилин). Тобто в наступні 9 комірок внести досліджувану речовину через 20–25 хвилин і так далі. Визначити через 30, 60 і 120 хвилин кількість поодиноких нерухомих клітин (% від 2 млн), при утворенні агрегатів клітини досліджуваної культури знерухомити і рахувати всі поодинокі клітини. Розрахунок проводити наступним чином: вихідна кількість клітин 2 млн – 100 %, число поодиноких нерухомих – Х %, знаходимо відсоток нерухомих клітин. Отримані дані внести в таблицю 1.

Проаналізувати отримані дані, побудувати графіки (приклад рис. 2), зробити висновки щодо токсичного впливу водного екстракту *Anabaena* sp. на рухомість клітин *Dunaliella viridis*.

Таблиця 1. Відсоток нерухомих клітин від загальної вибірки клітин в культурі *D. viridis* після внесення різних концентрацій водного екстракту *Anabaena* sp. через 30, 90 і 180 хвилин

Середня кількість нерухомих клітин через:						
час	30 хв		90 хв		180 хв	
варіанти	к-ть	%	к-ть	%	к-ть	%

Рис. 2. Кількість знерухомлених клітин в культурі *D. viridis* після внесення 75 мкл водного екстракту *Anabaena* sp., що росла на різних середовищах порівняно з контролем



Контрольні питання

1. Поняття «біотестування», «тест-об'єкт».
2. Алгоритм проведення біотестування.
3. За якими ознаками можна фіксувати токсичну дію речовин на водорості?
4. Які види водоростей використовують для тест-об'єктів?

Література: [33-35].

Рекомендована література

1. Золотарьова О. К., Шнюкова Є. І., Сиваш О. О., Михайленко Н. Ф. Перспективи використання мікроводоростей у біотехнології. – К. : Альтерпрес, 2008. – 234 с.
2. Zhao Q., Huang H. Chapter Two - Microalgae cultivation. *Advances in Bioenergy*. 2021. Vol. 6, No 1. P. 37–115.
3. Cesar de Carvalho J., Sydney E.B., Assú Tessari L.F., Soccol C.R. Culture media for mass production of microalgae Chapter 2 - Culture media for mass production of microalgae. *Biomass, Biofuels, Biochemicals*. 2019. P. 33–50.
4. Villaró-Cos S., Franco M.C., García-Vaquero M., Morán L., Alarcón F.J., Lafarga T. Composition of microalgae produced using different types of water and nutrient sources. *Algal Research*. 2024. Vol. 78. P. 1–8.
5. Elisabeth B., Rayen F., Behnam T. Microalgae culture quality indicators: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2021. Vol. 41, No 4. P. 457–473.
6. Tan J.S, Lee S.Y., Chew K.W., Lam M.K., Lim J.W., Ho Shih-Hsin. A review on microalgae cultivation and harvesting, and their biomass extraction processing using ionic liquids. *Bioengineered*. 2020. Vol. 11, No 1. P. 116–129.
7. Krichen E., Rapaport A., Le Floc'H B E., Fouilland E. A new kinetics model to predict the growth of micro-algae subjected to fluctuating availability of light. *Algal Research - Biomass, Biofuels and Bioproducts*. 2021. Vol. 58. P. 102362 (15p.).
8. Woyda-Ploszczyca A.M., Rybak A.S. How can the commercial potential of microalgae from the *Dunaliella* genus be improved? The importance of nucleotide metabolism with a focus on nucleoside diphosphate kinase (NDPK). *Algal Research*. 2021. Vol. 60. P. 102474 (10 p).
9. Bozhkov A.I., Kovaleva M.K, Goltvyanskiy A.V., Ushakova E.O., Tsapko H. Ye., Gavrish A.O. Preliminary adaptation of *Dunaliella viridis* strains to copper sulfate affects the thermal stability of the culture. *International Journal on Algae*. 2020. Vol. 22, No 1. P. 55-68.
10. Bozhkov A.I., Goltvyanskiy A.V., Kovaleva M.K., Menzyanova N.G. On the inheritance of induced resistance to toxic concentrations of sulfur acid of copper by subsequent cell generations of *Dunaliella viridis* Teodoresco. *International Journal on Algae*. 2018. No 4. P. 339–358.
11. Barbosa M., Inácio L.G., Afonso C., Maranhão P. The microalga *Dunaliella* and its applications: a review. *Applied Phycology*. 2023. P. 99-120.
12. Aziz M.M.A., Kassim K.A., Shokravi Z., Jakarni F.M., Liu H. Y., Zaini N., et al. Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2020. Vol.19. P. 109621.

13. Sui Y., Jiang M., Moretti S. E. Vlaeminck Harvesting time and biomass composition affect the economics of microalgae production. *Journal of Cleaner Production*. 2020. Vol. 259. P. 120782.
14. Kurahashi M., Naka A., Enokida K., Morita Y. Glutathione Concentration in *Dunaliella salina*: A Growth-Phase-Dependent Study. *Microbiol. Res.* 2023. Vol. 14, No 4. P. 1483–1488.
15. Tran-Nguyen Q.A., Tran T.T.V., Trinh-Dang M. Effects of Light on the Growth and β -carotene Accumulation in the Green Algae *Dunaliella salina*. *Asian Journal of Biology*. 2023. Vol. 18, No 1. P. 1–10.
16. Лабораторний практикум із біохімії : навч.-метод. посібник. – Чернівці : Чернівець. нац. ун-т ім. Ю. Федьковича, 2019. – 144 с.
17. Біонеорганічна хімія: лабораторний практикум : навчальний посібник / О. М. Калугін, В. Г. Панченко, Ю. Є. Колупаєв та ін. – Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2015. – 108 с.
18. Khatrī K., Rathore M.S. Salt and osmotic stress-induced changes in physio-chemical responses, PSII photochemistry and chlorophyll a fluorescence in peanut. *Plant Stress*. 2022. Vol.3. P. 100063.
19. Stefanov, M.A.; Rashkov, G.D.; Apostolova, E.L. Assessment of the Photosynthetic Apparatus Functions by Chlorophyll Fluorescence and P700 Absorbance in C3 and C4 Plants under Physiological Conditions and under Salt Stress. *Int. J. Mol. Sci.* 2022. Vol. 23. P. 3768.
20. Kunalung W., Putanyawiwat P., Chaipanya C., Hongtrakul V. An Efficiency of DNA Extraction Methods for Green Microalgae. *Rajamangala University of Technology Srivijaya Research Journal*. 2021. Vol.13, No 3. P. 742–753.
21. Bozhkov A.I., Kovalova M.K., Azeev Z.A., Goltvyanskiy A.V. The effect of pre-sowing seed treatment on seedlings growth rate and their excretory activity. *Regul Mech Biosyst*. 2020. Vol. 11, No 1. P. 60–66.
22. Gaignard, C.; Gargouch, N.; Dubessay, P.; Delattre, C.; Pierre, G.; Laroche, C.; Fendri, I.; Abdelkafi, S.; Michaud, P. New horizons in culture and valorization of red microalgae. *Biotechnol. Adv.* 2019. Vol. 37. P. 193–222.
23. Prybylski, N.; Toucheteau, C.; Alaoui, H.E.; Bridiau, N.; Maugard, T.; Abdelkafi, S.; Fendri, I.; Delattre, C.; Dubessay, P.; Pierre, G.; et al. Bioactive polysaccharides from microalgae. *In Handbook of Microalgae-Based Processes and Products; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands*, 2020. P. 533–571.
24. Jesus, C.S.; Assis, D.J.; Rodriguez, M.B.; Filho, J.A.M.; Costa, J.A.V.; Ferreira, E.S.; Druzian, J.I. Pilot-scale isolation and characterization of extracellular polymeric substances (EPS) from cell-free medium of *Spirulina* sp. LEB-18 cultures under outdoor conditions. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019. Vol. 124, P. 1106–1114.
25. Costa, J.A.V.; Lucas, B.F.; Alvarenga, A.G.P.; Moreira, J.B.; de Moraes, M.G. Microalgae Polysaccharides: An Overview of Production,

Characterization, and Potential Applications. *Polysaccharides*. 2021. Vol. 2. P. 759–772.

26. Біологічна і біоорганічна хімія : базовий підручник : у 2 кн. / кол. авт.; за ред. Ю. І. Губського, І. В. Ніженковської. – Кн. 2 : Біологічна хімія / [Ю. І. Губський, І. В. Ніженковська, М. М. Корда та ін.]. 3-тє вид. (стереотипне). – К. : Медицина, 2021. – 544 с.

27. Morales M., Aflalo C., Bernard O. Microalgal lipids: A review of lipids potential and quantification for 95 phytoplankton species. *Biomass and Bioenergy*. 2021. Vol. 150. P. 1–25.

28. Daneshvar E., Zarrinmehr M.J., Kousha M., Bhatnagar A. Performance evaluation of different harvesting methods and cultivation media on the harvesting efficiency of microalga and their fatty acids profile. *Fuel*. 2020. Vol. 280, No 15. P. 118592.

29. Zhu Z., Sun J., Fa Y., Liu X., Lindblad P. Enhancing microalgal lipid accumulation for biofuel production. *Front. Microbiol.* 2022. Vol. 13. P. 1024441.

30. Grabarczyk L., Mulkiewicz E., Stolte S., Puckowski A., Pazda M., Stepnowski P., et al. Ecotoxicity screening evaluation of selected pharmaceuticals and their transformation products towards various organisms. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020. Vol. 27. P. 26103–26114.

31. Pereira A., Silva L., Lino C., Meisel L., Pena A. A critical evaluation of different parameters for estimating pharmaceutical exposure seeking an improved environmental risk assessment. *Sci Total Environ*. 2017. Vol. 603–604. P. 226–236.

32. Desbiolles F., Malleret L., Tiliacos C., Wong-Wah-Chung P., LaffontSchwob I. Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: is there a risk for the Mediterranean aquatic environment? *Sci Total Environ*. 2018. Vol. 639. P. 1334–1348.

33. Екологічна біотехнологія : навч. посібник / [О. В. Швед, О. Б. Миколів, О. П. Комаровська-Порохнявець, В. П. Новіков]. – Кн. 1. – Львів : Львівська політехніка, 2018. – 424 с.

34. Кордон Т. І. Використання одноклітинних водоростей як індикаторних тест-систем для визначення цитотоксичності. *Науковий вісник Ужгородського університету : Серія: Біологія / гол. ред. В. І. Комендар*. – Ужгород : Говерла, 2012. – Вип. 32. – С. 172–175.

35. Патент № 50174 МПК G01N 33/48. Експрес-діагностика стану компенсаторно-захисних сил організму при перитоніті / Польовий В. П., Соловей Ю. М., Божков А. І., Клімова О. М., Соловей В. М. – Заявл. 14.12.1009, опубл. 25.05.10., Бюл. № 10.