

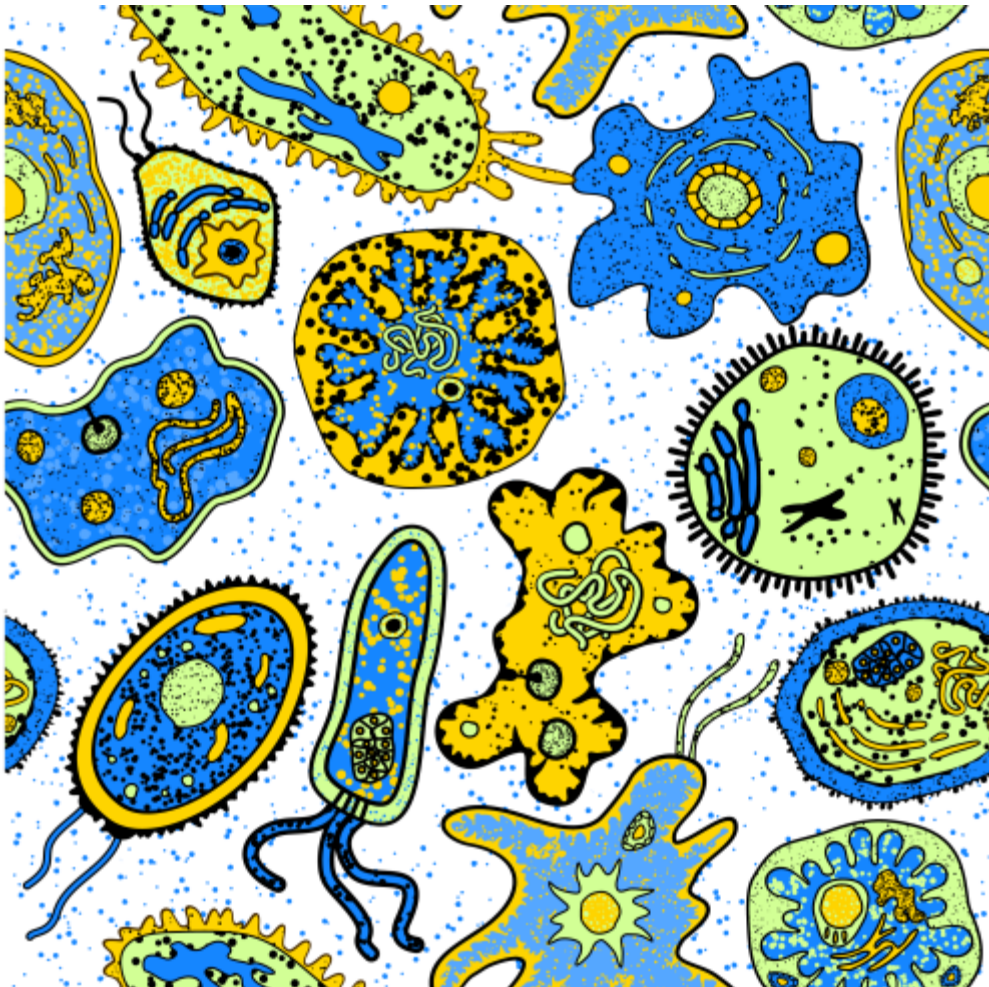
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького*

Кафедра біотехнології та радіології

БІОТЕХНОЛОГІЯ ПРОТИСТІВ

**Методичні вказівки до лабораторних робіт для здобувачів
першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
ОП «Біотехнології та біоінженерія»**



Львів – 2024

Біотехнологія протистів: методичні вказівки до лабораторних робіт для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія ОП «Біотехнології та біоінженерія» / [уклад. Малишева Х. В.] Львів: Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2024. 76 с.

Рецензент – Ольга Яремко, доцент кафедри мікробіології та вірусології, Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, к.с.-г.н.

Рекомендовано навчально-методичною радою факультету харчових технологій та біотехнології, протокол № 4 від 30.09.2024 р.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ У БІОТЕХНОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ	6
Загальні правила роботи у лабораторії	6
НАДАННЯ ПЕРШОЇ ДОМЕДИЧНОЇ ДОПОМОГИ	7
РОБОТА З ОПТИЧНИМИ ПРИЛАДАМИ	8
Світловий мікроскоп.....	9
Основні характеристики.....	10
Порядок роботи	11
Загальні правила.....	12
ВИМОГИ ДО ОФОРМЛЕННЯ ТА ЗАХИСТУ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ ..	12
ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ	13
ЧАСТИНА 1. МІКРОСКОПІЯ ПРОТИСТІВ	13
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №1. Мікроскопічні методи дослідження протистів: виготовлення препаратів та вивчення морфологічних особливостей представників родів Amoeba, Paramecium, Euglena, Chlorella і Tetraselmis	13
ЧАСТИНА 2. КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОТИСТІВ	23
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №2. Методи культивування найпростіших	24
Теоретичні відомості	24
Практична частина.....	30
Контрольні питання	31
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №3. Культивування прісноводних мікроводоростей на різних середовищах	32
Теоретичні відомості	32
Практична частина.....	37
Контрольні питання	40
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №4. Вплив факторів середовища (освітлення, склад поживного середовища) на приріст біомаси мікроводоростей	40
Теоретичні відомості	40
Практична частина.....	44
Контрольні питання	45
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №5. Виділення ліпідів з мікроводоростей	45
Теоретичні відомості	46
Практична частина.....	51
Контрольні питання	54
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №6. Аналіз ліпідної фракції	54
Теоретичні відомості	54
Практична частина.....	59
Контрольні питання	59
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №7. Оптимізація умов культивування морських мікроводоростей	60
Теоретичні основи.....	60
Практична частина.....	63
Контрольні питання	64
ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №8. Оцінка якості біомаси морських мікроводоростей для виробництва кормів	64

Теоретичні основи.....	64
Практична частина.....	69
Контрольні питання	72
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	73
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА.....	75
ІНФОРМАЦІЙНІ РЕСУРСИ.....	76

ВСТУП

Навчальна дисципліна «Біотехнологія протистів» є важливою складовою підготовки майбутніх біотехнологів і біоінженерів, надаючи їм необхідні теоретичні знання та практичні навички для роботи з протистами – групою організмів, що включає одноклітинні еукаріоти, такі як водорості, найпростіші та інші мікроорганізми. Протисти мають великий біотехнологічний потенціал завдяки їхньому різноманіттю, швидкому росту та здатності до синтезу різних біологічно активних речовин, таких як ліпіди, білки, пігменти, ферменти та інші метаболіти, що знаходять застосування в харчовій, фармацевтичній, косметичній промисловості, а також у біоенергетиці.

Метою навчальної дисципліни «Біотехнологія протистів» є надання здобувачам вищої освіти фундаментальних знань та формування практичних навичок щодо використання протистів у біотехнологічних процесах. Зокрема, здобувачі повинні ознайомитися з роллю протистів у виробництві біомаси, біологічно активних речовин та їхнім застосуванням для вирішення екологічних проблем, таких як очищення забруднених середовищ або зменшення вуглецевого сліду. Особливу увагу приділяється вивченню сучасних методів культивування протистів у лабораторних та промислових умовах, включаючи оптимізацію параметрів середовища для досягнення максимального приросту біомаси та ефективного синтезу цінних біомолекул.

Завдання дисципліни полягають у формуванні в здобувачів глибокого розуміння біологічних особливостей протистів, їхньої класифікації, метаболізму та життєвого циклу. Здобувачі мають засвоїти сучасні методи дослідження, які включають молекулярні, мікроскопічні та біохімічні техніки, що дозволяють аналізувати генетичні та фізіологічні особливості цих організмів. Також здобувачі навчатися проводити культивування протистів, зокрема водоростей, у різних типах живильних середовищ, оптимізуючи параметри середовища, такі як температура, рН, освітленість та концентрація вуглекислого газу, для підвищення продуктивності.

У результаті вивчення дисципліни здобувачі вищої освіти повинні набути навичок роботи з біореакторами, вміти використовувати сучасні методи виділення біомаси та аналізу її компонентів, таких як ліпіди, білки та каротиноїди, а також вивчати економічний потенціал використання протистів у промислових масштабах. Здобувачі отримають можливість проводити наукові дослідження у сфері біотехнології протистів, розробляти нові технології для харчової, фармацевтичної та біоенергетичної галузей, а також запропонувати інноваційні рішення для подолання екологічних проблем за допомогою біотехнологічних процесів.

Ці методичні рекомендації покликані допомогти здобувачам у проведенні лабораторних робіт, що дозволять закріпити теоретичні знання на практиці. Лабораторні завдання охоплюють культивування мікроводоростей та інших протистів, дослідження їхнього росту, складу та продуктивності за різних умов середовища, а також аналіз біологічно активних речовин, що виробляються цими організмами.

ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ У БІОТЕХНОЛОГІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Загальні правила роботи у лабораторії

Сучасна біотехнологічна лабораторія – це високотехнологічний комплекс, обладнаний сучасними приладами та устаткуванням, що дозволяють проводити різноманітні дослідження. Проте, найбільш поширеною причиною помилок у проведенні аналізів та експериментів залишається людський фактор. Крім того, навіть найпростіші дослідження можуть відрізнятися залежно від умов конкретної лабораторії, тому один і той же аналіз або експеримент, проведений у різних лабораторіях, може дати радикально різні результати.

Особливістю роботи в біотехнологічній лабораторії, яка займається дослідженням протистів (найпростіші та мікроводорості), є постійний контакт працівників із культурами цих організмів. Хоча протисти зазвичай не становлять такої загрози, як патогенні мікроорганізми, все ж така робота вимагає дотримання правил безпеки та стерильності, щоб запобігти контамінації культур і зберегти чистоту експериментів. Тому всі працівники лабораторії зобов'язані дотримуватись наступних правил роботи:

ЗАБОРОНЕНО

- ✓ Перебувати у верхньому одязі (необхідний спеціальний одяг – халат).
- ✓ Відкривати вікна (можна тільки з дозволу викладача).
- ✓ Приносити та вживати напої і продукти.
- ✓ Палити.
- ✓ Приносити сторонні речі.
- ✓ Виходити за межі лабораторії в халатах або одягати верхній одяг на халат.
- ✓ Користуватися відкритим вогнем.
- ✓ Вмикати та вимикати тумблери на електрощиті (можна тільки з дозволу викладача).

Необхідно дотримуватись заходів безпеки, керуючись наступними правилами:

- ✓ Двері лабораторії повинні бути постійно зачиненими.
- ✓ Забороняється самостійно ремонтувати несправне обладнання та оптичні прилади (про це необхідно повідомити викладача).
- ✓ При виготовленні тимчасових препаратів слід обережно поводитися з ріжучими інструментами та склом. У разі порізів повідомити викладача для надання медичної допомоги.
- ✓ Забороняється викидати зламані предметні та покривні скельця у смітник, уламки необхідно складати у спеціальний контейнер.
- ✓ Брати живі або зафіксовані організми чи торкатися до них (можна тільки з дозволу викладача).
- ✓ Перш, ніж розпочати роботу, необхідно переконатися в цілковитій справності електронагрівних приладів, пальників, а також у наявності засобів пожежогасіння.

- ✓ Працювати з отруйними і легкозаймистими хімічними речовинами дозволяється тільки у витяжній шафі.
- ✓ Набирання реактиву і переливання його з однієї посудини в іншу допускається лише піпеткою з гумовою грушею.
- ✓ Працювання з небезпечними реактивами необхідно в медичних рукавичках.
- ✓ Для роботи із зафіксованими об'єктами використовувати пінцет, оскільки фіксувальні рідини є отруйними. Під час роботи з препаратами слід бути обережними, щоб бризки при стисненні тканин не потрапили на обличчя та руки. У разі потрапляння рідин на шкіру негайно змити їх великою кількістю води.
- ✓ По закінченні роботи непотрібний біологічний матеріал та культури мікроорганізмів повинні бути знищені. Інструменти, які використовувалися в роботі, та поверхню робочого столу необхідно дезінфікувати.
- ✓ Після закінчення роботи обов'язково прибрати своє робоче місце, почистити інструменти і прилади, зокрема, протерти лінзу об'єктива мікроскопа, відключити всі електроприлади. Протерти робочий стіл дезінфікуючим розчином. Вимити руки з милом.
- ✓ Лише упевнившись в абсолютній чистоті робочого місця і цілковитій пожежній безпеці приладів, можна покинути лабораторію.

НАДАННЯ ПЕРШОЇ ДОМЕДИЧНОЇ ДОПОМОГИ

- ✓ При виникненні пожежі у лабораторії необхідно негайно виключити газ та нагрівальні прилади, прибрати легкозаймисті рідини, вогонь засипати піском або накрити вовняною ковдрою, шматком азбесту, рушником або залити тетрахлорометаном. Великий вогонь гасять за допомогою вогнегасника. Не можна задувати палаючу рідину або заливати її водою. Якщо на людині палає одяг, її треба швидко закутати в ковдру, халат або покласти на підлогу і перекочуючи збивати полум'я. Якщо загорілися дерев'яні предмети, полум'я гасять водою або вогнегасником.
- ✓ Під час роботи у хімічній лабораторії найбільш можливими є порізи склом, опіки термічні та хімічні, а також інгаляційне ураження парами токсичних речовин.
- ✓ У всіх лабораторіях у доступному постійному місці має бути аптечка з набором необхідних матеріалів і медикаментів. Всі працівники у лабораторії повинні бути обізнані з правилами надання першої медичної допомоги. В аптечці лабораторії необхідно мати стерильні бинти та вату, 5%-ий спиртовий розчин йоду, 2%-ий розчин гідрокарбонату натрію, мазь від опіків, лейкопластир, 2%-ий розчин калій манганату (VII) KMnO_4 , 2%-ий розчин оцтової кислоти, 2%-ий розчин борної кислоти, етанол, піпетки для очей, скляні палички та ножиці.
- ✓ При теплових опіках роблять примочку з розчином 2%-го калій манганату (VII) KMnO_4 або етанолу $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, а потім наносять мазь від опіків.
- ✓ При хімічних опіках шкіри необхідно насамперед видалити речовину, що викликала опік, відповідним розчинником, а потім уражену ділянку обробити етиловим спиртом і змазати маззю від опіків.

✓ При опіках кислотами ушкоджене місце обмивають водою з крану, а потім 3%-им розчином натрій гідрокарбонату (питної соди); при опіках їдкими лугами – водою, а потім 2%-им розчином оцтової або борної кислоти і знову водою.

✓ При опіках очей кислотою необхідно промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у розчині питної соди (3%-му), і знову змити водою; при опіках очей лугом – промити їх великою кількістю води, потім обробити тампоном, змоченим у 2%-му розчині борної кислоти, і знову промити водою. Після цього необхідно звернутись до лікаря.

✓ При опіках бромом ушкоджене місце необхідно швидко промити спиртом та змастити маззю від опіків.

✓ У випадку опіку фенолом ушкоджене місце розтирають гліцеролом до відновлення природного кольору шкіри, потім промивають водою і накладають пов'язку з марлі, що змочена у розчині гліцеролу.

✓ При порізах склом у першу чергу необхідно пінцетом, попередньо промитим спиртом, видалити з рани видимі шматочки скла, рану промити дистильованою водою або протерти тампоном, змоченим в етиловому спирті, а далі змастити 5%-им розчином йоду та забинтувати. Невеликі порізи можна заклеїти антисептичним пластиром.

✓ При ураженні електрострумом насамперед необхідно відключити електроенергію, а потім, якщо необхідно, зробити штучне дихання та викликати швидку допомогу.

✓ При вдиханні галогенів, галогеноводнів та оксидів Нітрогену потрібно вдихнути спирт або понюхати 5%-ий розчин амоніаку, а потім вийти на свіже повітря.

✓ При інгаляційних ураженнях потрібно негайно вийти на свіже повітря.

У всіх випадках опіків, поранень та отруєнь після надання першої допомоги необхідно звернутися до лікаря!

РОБОТА З ОПТИЧНИМИ ПРИЛАДАМИ

Мікроскоп є оптико-механічним приладом, що дозволяє отримувати значно збільшене зображення об'єкта, розміри якого виходять за межі роздільної здатності неозброєного ока. У мікроскопі можна виділити такі системи: оптичну, механічну та освітлювальний пристрій.

Механічна система складається з підставки, тримача тубуса, тубуса, предметного столика, револьвера, макро- та мікрометричних гвинтів, які служать для наведення різкості (рис. 1).

Освітлювальний пристрій включає трансформатор (є не у всіх мікроскопах), лампу, конденсор, діафрагму та матові скла, призначені для спрямування світла на препарат, установки оптимального освітлення об'єкта та регулювання сили освітлення. Освітлювач може бути вбудованим або розташовуватися окремо, при цьому є дзеркало, яке направляє світло на препарат.

До оптичної системи мікроскопа належать об'єктиви та окуляр. Об'єктив забезпечує значно збільшене дійсне обернене зображення досліджуваного об'єкта. Він складається із системи лінз, поміщених у металеву оправу. Найважливіша з них – зовнішня (фронтальна) лінза, від фокусної відстані якої залежить збільшення об'єктива. Зазвичай на револьвері розміщено кілька об'єктивів із різним збільшенням. Від збільшення об'єктива залежать також дві його характеристики: робоча відстань, тобто відстань від фронтальної лінзи до площини препарату, і площа поля зору. Чим більше збільшення об'єктива, тим менша його робоча відстань і вужче поле зору.

Окуляр використовується для розгляду зображення об'єкта, що дається об'єктивом, тобто виконує роль лупи. Він складається з 2-3 лінз і забезпечує додаткове збільшення об'єкта, значення якого вказане на його оправі. Загальне збільшення мікроскопа є добутком збільшення об'єктива і окуляра.

Чіткість отриманого зображення визначається роздільною здатністю мікроскопа, яка залежить від довжини хвилі використовуваного світла і числової апертури оптичної системи мікроскопа (її значення вказане на оправі об'єктива). Чим більше значення числової апертури, тим вища роздільна здатність. Підвищити роздільну здатність мікроскопа можна, збільшивши показник заломлення середовища, що межує з лінзою. Для цього між фронтальною лінзою об'єктива і досліджуваним об'єктом розміщують краплю рідини з високим показником заломлення, наприклад краплю води ($n=1,3$), гліцерину ($n=1,4$) або кедрової олії ($n=1,5$). Для кожної з цих рідин існують спеціальні об'єктиви, які називаються імерсійними.

Світловий мікроскоп

Світлові мікроскопи використовуються для спостереження біологічних об'єктів, таких як клітини, тканини та мікроорганізми, за рахунок збільшення зображення за допомогою системи лінз. Вони дозволяють досліджувати структуру та морфологію живих і фіксованих зразків. Основними елементами мікроскопа є окуляр, об'єктиви, конденсор, освітлювач та предметний столик. Завдяки можливості зміни збільшення, світлові мікроскопи є незамінними для вивчення як загальної будови клітин, так і деталей їх внутрішньої організації. Їх широко застосовують у біології, медицині та навчальних лабораторіях для візуалізації об'єктів, невидимих неозброєним оком.

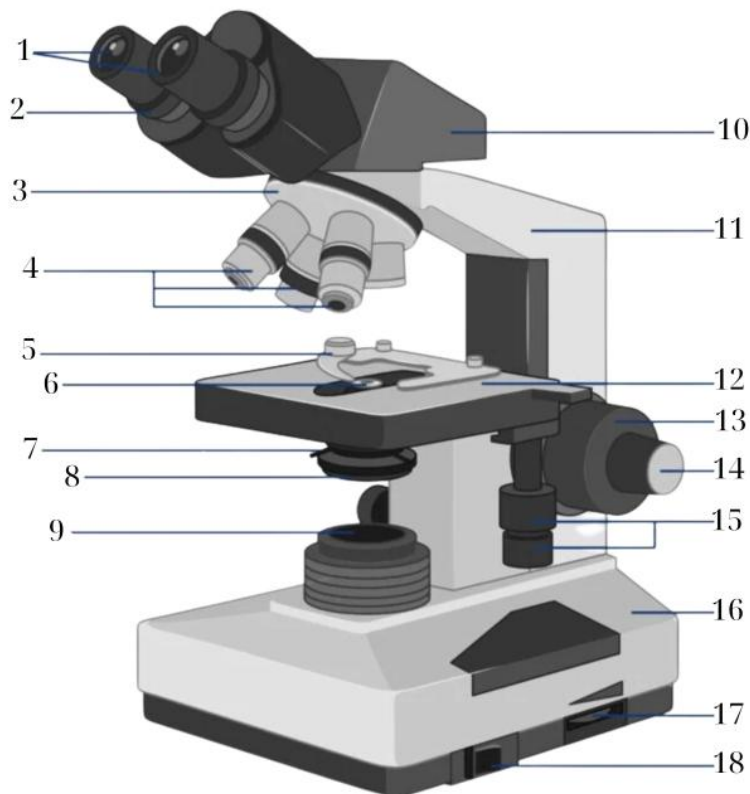


Рис. 1. Будова світлового мікроскопа

1 – окуляр; 2 – регулятор налаштування діоптрій; 3 – револьвер для об'єктивів; 4 – об'єктиви; 5 – пружинний важіль тримача об'єктів; 6 – апертура; 7 – діафрагма; 8 – конденсор; 9 – освітлювач; 10 – тубус; 11 – тубусотримач; 12 – предметний столик; 13 – макрогвинт для грубого налаштування; 14 – мікрогвинт для точного налаштування; 15 – ручка для переміщення предметного столика в напрямку X/Y; 16 – основа; 17 – регулятор яскравості освітлення; 18 – вимикач освітлювача.

Основні характеристики

Світловий мікроскоп складається з таких основних елементів:

- **окуляр (1)** – частина, через яку спостерігають зображення об'єкта, що збільшується;
- **регулятор налаштування діоптрій (2)** – дозволяє підлаштувати окуляри під індивідуальні особливості зору користувача;
- **револьвер для об'єктивів (3)** – механізм, на якому закріплені об'єктиви (4) різної кратності, що дозволяє швидко змінювати збільшення;
- **об'єктиви (4)** – лінзові системи, що формують зображення об'єкта з різними збільшеннями;
- **пружинний важіль тримача об'єктів (5)** – забезпечує надійну фіксацію препарату на предметному столику;
- **апертура (6)** – отвір у конденсорі для контролю кількості світла, що проходить через об'єкт;
- **діафрагма (7)** – регулює інтенсивність світлового потоку;
- **конденсор (8)** – система лінз, яка концентрує світловий потік на об'єкті дослідження;
- **освітлювач (9)** – джерело світла, яке підсвічує об'єкт знизу;

- **тубус (10)** – вертикальна частина мікроскопа, що з'єднує окуляр з об'єктивами;
- **тубусотримач (11)** – забезпечує стабільне розташування тубуса на мікроскопі;
- **предметний столик (12)** – платформа для розміщення препаратів, що переміщується за допомогою координатних ручок **(15)**;
- **макрогвинт (13)** – служить для грубого налаштування фокусу зображення;
- **мікрогвинт (14)** – використовується для точного налаштування фокусу;
- **ручка для переміщення предметного столика в напрямках X/Y (15)** – забезпечує рух предметного столика по горизонталі та вертикалі;
- **основа (16)** – нижня частина мікроскопа, що забезпечує його стійкість;
- **регулятор яскравості освітлення (17)** – дозволяє налаштувати яскравість світла;
- **вимикач освітлювача (18)** – вмикає та вимикає освітлювач мікроскопа.

Порядок роботи

1. Зняти чохол з мікроскопа і встановити його в зручне для роботи положення. Праворуч мають бути розташовані необхідні предмети (предметні та покривні скельця, реактиви, препарувальні голки, тощо).
2. Встановити об'єktiv малого збільшення.
3. Покласти препарат на предметний столик мікроскопа, закріпивши його важелем тримача об'єкта. Відрегулювати положення препарату відносно об'єктива.
4. Рухом макрогвинта, дивлячись збоку на препарат, опустити об'єktiv. Дивлячись в окуляр і обертаючи макрогвинт на себе, поступово піднімати оптичну частину мікроскопа, доки досліджуваний об'єкт не потрапить у фокус. Нечітке зображення сфокусувати мікрогвинтом.
5. Обертанням ручки регулятора освітлення встановити оптимальне освітлення поля зору.
Для роботи з великим збільшенням (10x, 40x, 100x):
6. Розмістити об'єкт або цікаву частину об'єкта в центрі поля зору, оскільки при великому збільшенні площа поля зору значно скорочується.
7. Поворотом револьвера до клацання обережно змінити об'єktiv.
8. Нечітке зображення сфокусувати спочатку макрогвинтом, а потім мікрогвинтом.
9. Чіткість зображення відрегулювати за допомогою діафрагми, розташованої під предметним столиком.
10. Після закінчення роботи знову перевести мікроскоп на мале збільшення, і тільки після цього зняти препарат з предметного столика.
11. При тривалій роботі необхідно періодично вимикати освітлювач, щоб уникнути його перегріву.
12. Після закінчення роботи вимкнути освітлювач, вставити блок живлення в приймальний пристрій і надіти чохол.

Загальні правила

- ✓ При забрудненні зовнішніх лінз окулярів та об'єктивів під час роботи слід протерти їх м'якою чистою тканиною.
- ✓ Категорично забороняється відкручувати рухомі деталі, розбирати окуляри та об'єктиви, а також грубо обертати мікрометричний гвинт.
- ✓ При виявленні будь-яких несправностей слід звернутися до викладача.

ВИМОГИ ДО ОФОРМЛЕННЯ ТА ЗАХИСТУ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

Всі лабораторні роботи практикуму оформлюються в окремому робочому зошиті. Зошит здається на перевірку викладачу після кожного заняття.

При підготовці до лабораторної роботи з відповідної теми необхідно вивчити теоретичну частину, що стосується даної роботи.

Перед початком лабораторної роботи при співбесіді з викладачем студент зобов'язаний:

- ✓ представити для обговорення план роботи, який детально з виділенням окремих етапів складений у відповідності з методикою роботи і зафіксовано в робочому журналі;
- ✓ обґрунтувати всі розрахунки і відповідні перерахунки з урахуванням кількостей речовин і об'ємів розчинів, необхідних для напрацювання продукту, щоб можна було використовувати його в подальших методиках;
- ✓ пояснити хімізм процесів і написати реакції, що лежать в основі цих процесів.

У звіті з лабораторної роботи фіксуються всі записи, що стосуються проміжних і кінцевих результатів аналізу (наприклад, дані про вихід продукту до сушіння, після сушіння тощо).

При захисті лабораторної роботи студент викладає не тільки суть даного методу аналізу і констатує кінцевий результат експерименту, але також дає вичерпні відповіді на поставлені питання.

ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ

ЧАСТИНА 1. МІКРОСКОПІЯ ПРОТИСТІВ

Мікроскопія є однією з ключових методик в біологічних дослідженнях, що дозволяє вивчати структуру та організацію мікроорганізмів, зокрема протистів. Протисти – це велика група еукаріотичних організмів, що демонструють значну різноманітність у формах, життєвих циклах і середовищах існування. Вони можуть мати одно- або багатоклітинну організацію та вивчаються в різних галузях науки, включаючи екологію, біотехнологію і медицину.

Мікроскопічне дослідження протистів відіграє важливу роль у розумінні їхньої морфології, структурних особливостей, способів живлення, руху та розмноження.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №1. Мікроскопічні методи дослідження протистів: виготовлення препаратів та вивчення морфологічних особливостей представників родів *Amoeba*, *Paramecium*, *Euglena*, *Chlorella* і *Tetraselmis*

Мета: ознайомитися з методами та техніками мікроскопії для вивчення протистів, вивчити основні характеристики та структурні особливості представників родів *Amoeba*, *Paramecium*, *Euglena*, *Chlorella*, *Tetraselmis*, а також засвоїти навички виготовлення тимчасових (живих) мікропрепаратів протистів для подальшого їхнього дослідження під мікроскопом.

Теоретичні відомості

1. Методи та техніки мікроскопії для вивчення протистів.
2. Основні характеристики та структурні особливості представників родів *Amoeba*, *Paramecium*, *Euglena*, *Chlorella*, *Tetraselmis*.
3. Виготовлення тимчасових (живих) і постійних мікропрепаратів протистів.

Методи та техніки мікроскопії для вивчення протистів

Сучасні методи мікроскопії надають дослідникам можливість спостерігати найдрібніші структурні особливості клітин, оцінювати їхні фізіологічні процеси та взаємодію з навколишнім середовищем. Для вивчення протистів використовуються різні типи мікроскопії, кожен з яких має свої переваги та обмеження.

Світлова мікроскопія. Світлова мікроскопія є одним з основних методів, який широко використовується для вивчення протистів. Вона дозволяє розрізняти основні органели клітини, такі як ядро, цитоплазма, вакуолі та інші структури. Для більш точного спостереження часто застосовуються різні техніки фарбування, які покращують контрастність зображення і дають змогу вивчати певні компоненти клітини.

✓ *Світлонаправлена мікроскопія* (англ. bright-field microscopy) є найпростішим різновидом світлової мікроскопії, яка дозволяє спостерігати живі або фіксовані клітини.

✓ *Фазово-контрастна мікроскопія* (англ. phase-contrast microscopy) використовується для спостереження за живими клітинами без застосування фарбників. Вона забезпечує кращу видимість внутрішніх структур завдяки відмінності фазових зсувів світла, що проходить через клітину.

✓ *Диференційно-інтерференційна мікроскопія* (англ. DIC-microscopy) покращує тривимірне зображення об'єкта, що дозволяє дослідникам розрізняти тонкі деталі.

Флуоресцентна мікроскопія. Флуоресцентна мікроскопія використовує спеціальні барвники (флуорохроми), що випромінюють світло певної довжини хвилі після збудження. Цей метод дозволяє вивчати певні компоненти клітини, такі як ДНК, мембрани або цитоскелет, за допомогою маркерів, що флуоресціюють під дією ультрафіолетового світла. Даний метод особливо корисний для дослідження динамічних процесів у живих клітинах.

Електронна мікроскопія. Електронна мікроскопія (англ. electron microscopy, EM) дозволяє досягати набагато вищого ступеня роздільної здатності порівняно зі світловою мікроскопією, що робить її незамінною для вивчення ультраструктури клітин протистів. Є два основні типи електронної мікроскопії:

✓ *Трансмісійна електронна мікроскопія* (англ. transmission electron microscopy, TEM) дає можливість спостерігати внутрішню будову клітини на дуже тонких зрізах.

✓ *Скануюча електронна мікроскопія* (англ. scanning electron microscopy, SEM) використовується для дослідження поверхневих структур клітини.

Основні характеристики та структурні особливості деяких протистів

Представники роду *Amoeba* належать до типу Sarcomastigophora, класу Lobosea, порядку Amoebida, родини Amoebidae. Це одноклітинні гетеротрофні організми, які мають здатність до амебоїдного руху за допомогою псевдоподій. Вони характеризуються відсутністю постійної клітинної стінки, що дозволяє їхній формі постійно змінюватися. Основні структурні елементи включають ядро, яке містить генетичний матеріал, ектоплазму і ендоплазму, що забезпечують функціонування клітини, а також скоротливі та травні вакуолі, які регулюють водний баланс і здійснюють травлення. Амеби здійснюють захоплення їжі шляхом фагоцитозу, поглинаючи бактерії та інші дрібні організми. Вони живуть у прісноводних середовищах і є важливими компонентами екосистеми. До роду *Amoeba* належать різноманітні види, наприклад такі як *Amoeba proteus*, що відрізняються розмірами, морфологією та середовищем існування (рис. 2).

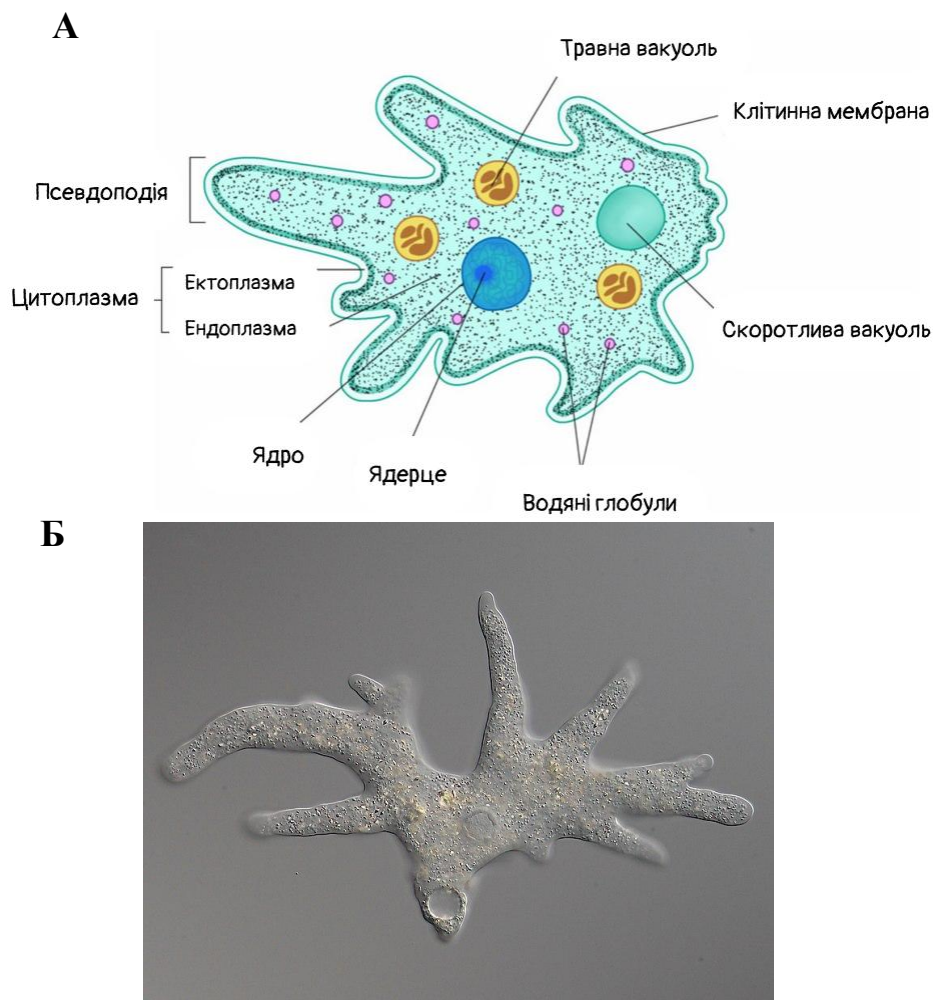


Рис. 2. Внутрішня будова (А) і зовнішній вигляд (Б) *Amoeba* sp. (джерело: <https://en.wikipedia.org>)

Представників роду Амеба використовують у біотехнології для вивчення процесів клітинної міграції, механізмів фагоцитозу та як моделі для дослідження клітинної реакції на різні хімічні сполуки.

Для вивчення амеб використовують світлову мікроскопію для спостереження загальної морфології та руху, а також фазово-контрастну мікроскопію для детального дослідження псевдоподій і внутрішніх органел. Флуоресцентна мікроскопія дозволяє виявити специфічні органели та білки, тоді як DIC-мікроскопія і електронна мікроскопія забезпечують високу роздільну здатність і деталізацію ультраструктури клітини.

Представники роду **Paramecium** належать до типу Ciliophora, класу Oligohymenophorea, порядку Peniculida, родини Parameciidae. Це одноклітинні організми, що мають характерну овальну або тупелькоподібну форму та вкриті великою кількістю війок, які забезпечують їхній рух та захоплення їжі. Війки створюють рухи, що спрямовують часточки їжі у перистом – ротову заглибину, яка веде до клітинного рота та травної вакуолі. Парамеції мають два ядра: велике макронуклеус, яке контролює метаболічні процеси, та мале мікронуклеус, що бере участь у статевому процесі – кон'югації. Основними структурними особливостями є також скоротлива вакуоля, яка регулює водний баланс, і трихоцисти, що виконують захисну функцію (рис. 3).

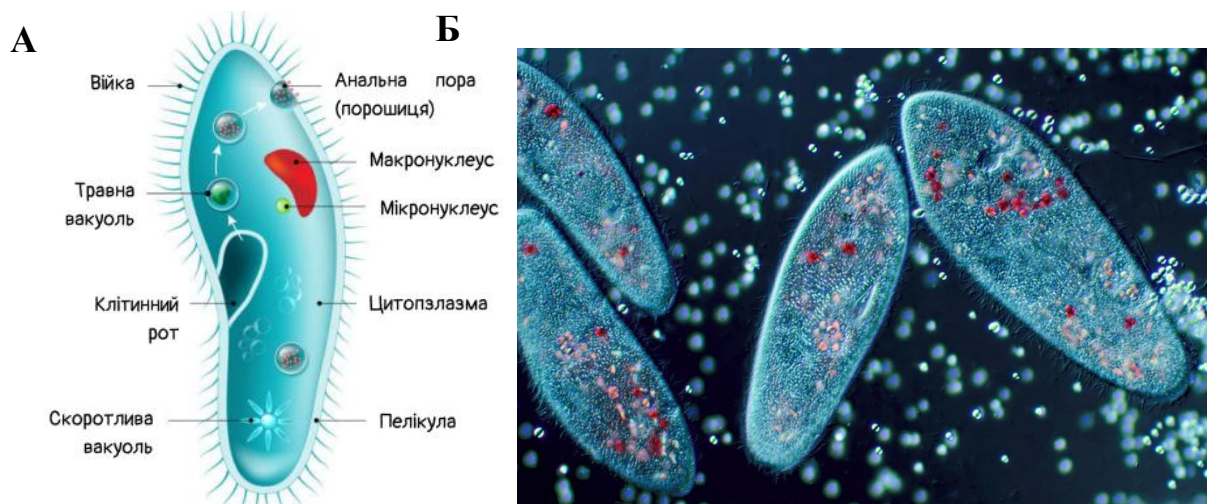


Рис. 3. Внутрішня будова (А) і зовнішній вигляд (Б) *Paramecium* sp.
(джерело: <https://mikro-foto.de/>)

Парамеції є гетеротрофами, живляться бактеріями та дрібними органічними часточками.

У біотехнології парамеції використовують для дослідження рухових реакцій, харчової поведінки та в якості тест-об'єктів для оцінки токсичності водних середовищ.

Світлова мікроскопія дозволяє спостерігати загальну морфологію та рухливість предстаників роду *Paramecium*, а фазово-контрастна мікроскопія підходить для вивчення внутрішньої структури, таких як травні вакуолі та скоротливі вакуолі. Флуоресцентна мікроскопія використовується для виявлення специфічних органел, тоді як DIC-мікроскопія та електронна мікроскопія забезпечують деталізоване зображення поверхні клітини та її ультраструктури.

Представники роду ***Euglena*** належать до типу Euglenozoa, класу Euglenophyceae, порядку Euglenales, родини Euglenaceae. Це одноклітинні організми, які поєднують риси як рослин, так і тварин, оскільки здатні до фотосинтезу завдяки наявності хлоропластів, але також можуть житися гетеротрофно. Евглени мають веретеноподібну форму тіла та один або два джгутики, які забезпечують їхній активний рух у воді. Їхня поверхня вкрита пелікулою – щільною білковою оболонкою, що надає клітині гнучкість і міцність. В клітині є світлочутливе вічко (стигма), яке допомагає орієнтуватися у напрямку світла, та скоротлива вакуоля, яка регулює водний баланс (рис. 4).

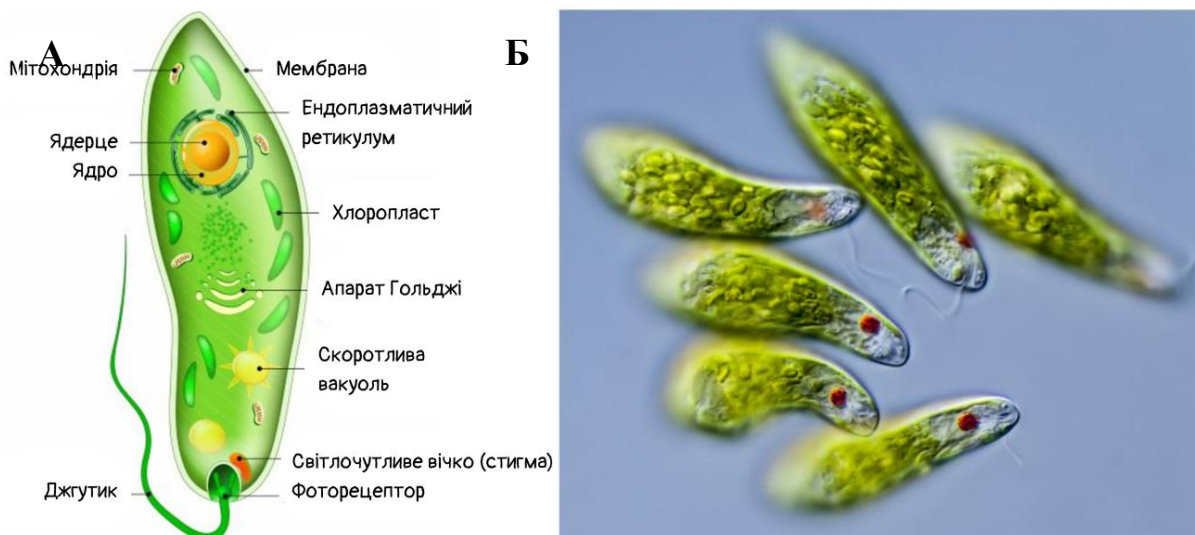


Рис. 4. Внутрішня будова (А) і зовнішній вигляд (Б) *Euglena* sp. (джерело: <https://mikro-foto.de/>)

Евглени можуть змінювати спосіб живлення залежно від умов середовища, що робить їх цікавими для досліджень адаптації.

У біотехнології представників роду *Euglena* використовують для вивчення фотосинтезу, екологічного моніторингу та як джерело біологічно активних речовин.

Флуоресцентна мікроскопія дозволяє детально вивчати хлоропласти, а DIC-мікроскопія допомагає побачити тонкі деталі пелікули та джгутика.

Представники роду ***Chlorella*** належать до типу Chlorophyta, класу Trebouxiophyceae, порядку Chlorellales, родини Chlorellaceae. Це одноклітинні зелені водорості кулястої форми, що мешкають у прісних водоймах та вологих ґрунтах. Вони мають хлоропласти з хлорофілами *a* та *b*, завдяки чому здатні ефективно здійснювати фотосинтез і накопичувати вуглеводи у формі крохмалю. Клітинна стінка хлорели є жорсткою та складається з целюлози, що забезпечує їм міцність і захист (рис. 5).

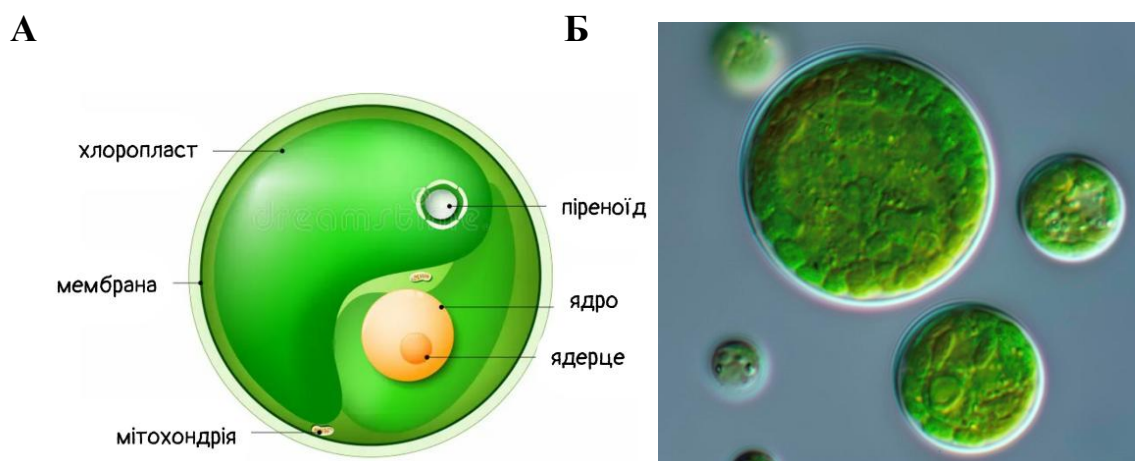


Рис. 5. Внутрішня будова (А) і зовнішній вигляд (Б) *Chlorella* sp. (джерело: <https://mikro-foto.de/>)

Основною особливістю є високий вміст білка, вітамінів і мікроелементів, що робить ці водорості цінними для харчової промисловості. Розмножуються

вони шляхом безстатевого поділу, утворюючи кілька дочірніх клітин усередині материнської.

У біотехнології представників роду *Chlorella* використовують для виробництва харчових добавок, біопалива, а також у системах очищення стічних вод і як модельний організм для досліджень фотосинтезу.

Для вивчення хлорели використовується світлова та флуоресцентна мікроскопія, яка дозволяє спостерігати за фотосинтезом і структурою хлоропластів.

Представники роду ***Tetraselmis*** належать до типу Chlorophyta, класу Chlorodendrophyceae, порядку Chlorodendrales, родини Chlorodendraceae. Це одноклітинні зелені водорості, що мають овальну або грушоподібну форму і мешкають переважно в морських середовищах. Клітини тетраселмісу вкриті пелікулою з целюлозних пластинок, що надає їм певну міцність і гнучкість. Водорості мають чотири джгутики, що забезпечують активний рух у воді, а також світлочутливе вічко (стигму), яке дозволяє орієнтуватися у напрямку світла. У клітині міститься один великий хлоропласт, у якому здійснюється фотосинтез із накопиченням продуктів у вигляді крохмалю та ліпідів. Тетраселміс здатний переходити до міксотрофного способу живлення, комбінуючи фотосинтез з поглинанням органічних речовин (рис. 6).

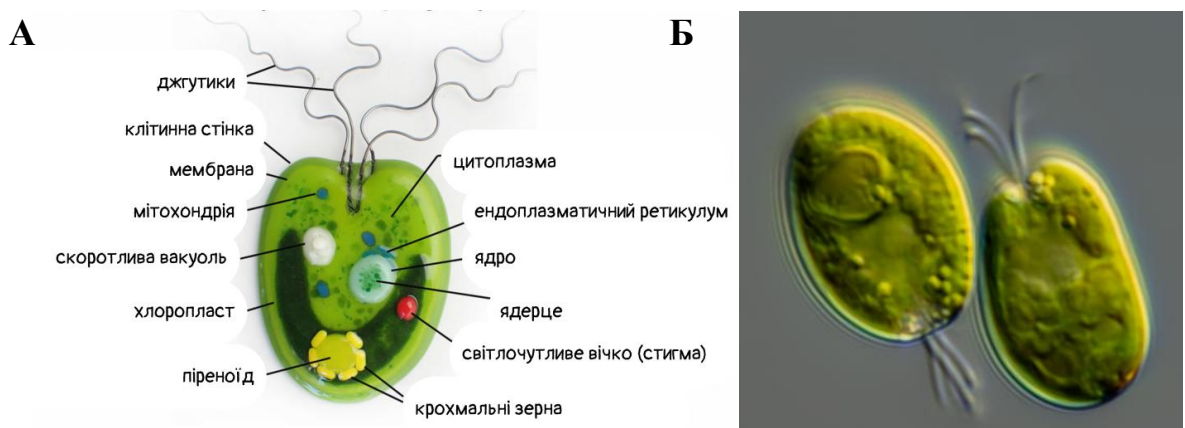


Рис. 6. Внутрішня будова (А) і зовнішній вигляд (Б) *Tetraselmis* sp.
(джерело: <https://mikro-foto.de/>)

У біотехнології представників роду *Tetraselmis* використовують для виробництва біопалива, як корм для аквакультури та для очищення водних екосистем завдяки їхній здатності до біосорбції токсичних сполук.

Флуоресцентна мікроскопія допомагає дослідити хлоропласти та джгутики, тоді як електронна мікроскопія може бути корисною для детального вивчення клітинної стінки.

Виготовлення тимчасових (живих) і постійних мікропрепаратів протистів

Живі препарати. Основним методом вивчення протистів є дослідження їх *in vivo*. Для мікроскопічного дослідження об'єкти поміщають, по можливості, в ту ж середовище, в якій вони живуть. Найчастіше це прісна вода.

Спостереження можна проводити, просто взявши з поверхні культури піпеткою краплю на предметне скло, накривши її покривним склом без ніжок. Амеб витягують з культури або піпеткою, або кладуть чисте покривне скло плазом на поверхню культури; при цьому амеби зазвичай накопичуються на склі. Через 15–30 хвилин скло виймають і поміщають "лицем вниз" (тобто змоченою у культурі стороною) на маленьку краплю тієї ж рідини на предметному склі.

Розглядаючи інфузорій на живому матеріалі, окрім звичайних світлооптичних систем, використовують фазово-контрастне обладнання, що значно покращує видимість війкових утворень.

Серйозною перешкодою при вивченні багатьох об'єктів *in vivo* є їх рухливість. Для подолання цього використовують різні методи. Найбільш поширеним є обережне притискання об'єкта між покривним і предметним склом, що досягається шляхом відсмоктування рідини фільтрувальним папером.

До задовільних результатів також призводить (особливо для інфузорій) наступний прийом: на предметному склі у краплі рідини з досліджуванним об'єктом препарувальними голками розщеплюється на окремі волоконця шматочок гігроскопічної вати, і препарат накривається покривним склом. Завдяки тигмотаксису дрібні тварини нібито "прилипають" до волокон вати, залишаючись деякий час нерухомими або малорухливими.

Найкращим засобом для уповільнення руху інфузорій та інших протистів є корагеновий мох. Кілька шматочків моху перед використанням промиваються у 0,5% розчині соди, загортаються в шматок м'якої промитої марлі і опускаються на дно посудини з культурою інфузорій. На 100 мл 4–6 г моху. Рух інфузорій вже на третій день значно сповільнюється. Для швидшого згущення рідини з інфузоріями беруть кілька крапель на предметне скло, і рідина швидко починає підсихати та згущуватися.

Крім того, для швидкого або прискореного уповільнення руху інфузорій беруть 1–2 гілочки корагенового моху, промивають у 0,5–1% розчині соди і опускають у невелику ємність з 5–8 см³ культури інфузорій. Через кілька годин утворюється майже повністю згущена маса, в якій найпростіші рухаються надзвичайно повільно. При цьому чудово видно рух кожної війки.

Знерухомлення великих інфузорій (*Spirostomum*, *Paramecium*, *Stentor*) досягається заливкою в 0,5–1,5% розчин желатину. Цей метод забезпечує надійне закріплення тіла інфузорії без жодних візуальних пошкоджень.

До деяких найпростіших (*Stentor*, сувоїки тощо) застосовується анестезія високою температурою. Предметне скло з краплею найпростіших обережно нагрівається до температури 30–35°C. При цьому рух припиняється, але руйнування ще не відбувається. Найменший перегрів викликає загибель організму і розпад клітини.

При вивченні особливостей морфології протистів на живих об'єктах в деяких випадках використовується забарвлення вітальними барвниками, насамперед нейтральним червоним (1:1000). Цей барвник добре контрастує об'єкти і чітко виявляє травні вакуолі.

Форма, довжина і характер формування псевдоподій амєб вивчаються за допомогою забарвлення живих клітин 0,01% розчином альціанової сині, який виявляє шар глікокаліксу, добре розвиненого у амєб. Для фіксації протистів особливо часто використовується рідина Шаудіна при виготовленні тотальних препаратів, зрізів і мазків. Готується вона наступним чином: сулема (насичений розчин) – 2 частини, спирт (96% або абсолютний) – 1 частина. Зазвичай застосовують у підігрітому (50-60°C) стані. Термін фіксації – 5-10 хвилин. Після фіксації за Шаудіном особливо добре фарбуються ядра.

Дуже хороші результати дає метод Бресслау. На предметне скло наноситься дуже маленька крапля води з найпростішими, і поруч з нею така ж крапля 100 % розчину Opalblau (краще з додаванням на 1 см³ цього розчину 6 крапель Phloxinhodamin). Обидві краплі на предметному склі змішуються і розмазуються по склу, мазок швидко підсушується в струмені теплого повітря, а потім препарат закріплюється в канадському бальзамі.

Постійні препарати. Вивчення ядер у амєб проводять на постійних препаратах, виготовлених наступним чином. На поверхню водної культури, де є плівка з амєбами, обережно поміщають одне або кілька покривних скелець; вони не тонуть завдяки своєму невеликому вазі та існуванню плівки поверхневого натягу. Через кілька годин (12-24 години) скельця знімають і тією ж стороною опускають на поверхню злегка підігрітої фіксуючої рідини Шаудіна. Цей розчин фіксує, швидко вбиває, ущільнює і консервує амєб, порівняно мало змінюючи їх форму і внутрішню структуру. Для фіксації амєб достатньо 2-3 хвилин, після чого скло з фіксованими і при цьому щільно прикріпленими до нього формами переносять у йодований спирт (на 100 частин 70% спирту – 1-2 грами звичайної йодної настойки) для промивання сулеми. При знебарвленні йодного розчину його додають до тих пір, поки колір не перестане змінюватися (10-15 хв), оскільки якщо в протоплазмі залишиться сулема, вона в подальшому, вже в готовому препараті, кристалізується і зіпсує препарат.

Потім покривне скло послідовно промивають у 70% спирті і дистильованій воді, переносять у водний розчин гематоксиліну за Делафільдом і залишають у ньому на 24 години; після цього промивають у водопровідній воді, швидко переводячи через спирти зростаючої концентрації, аж до абсолютного, і ксилол (або гвоздикову олію) і закріплюють у канадському бальзамі.

Для уповільнення руху інфузорій та інших протистів їх можна перенести у краплю розчину вишневого клею або чистого гуміарабіку. Розчин не повинен бути дуже густим. У в'язкому середовищі рух тварин сповільнюється.

Вивчення будови джгутикових проводять як на живому матеріалі, так і на фіксованому. Наприклад, евглен можна консервувати 96% спиртом; потім перенести в суміш рівних об'ємів 96% спирту і гліцерину та закріпити в суміш гліцерин-желатину.

Для закріплення евглен у гліцерин-желатині на предметне скло піпеткою наносять крапельку спирто-гліцеринової суміші, вирізають невеликий шматочок гліцерин-желатину і кладуть його на чисте покривне скло, яке обережно підігрівають знизу, тримаючи пінцетом над спиртівкою. Слідкувати,

щоб при нагріванні не з'являлися бульбашки повітря в желатині; коли вона під дією тепла розплавиться, скло швидко перевертають краплею желатину донизу і обережно кладуть на крапельку суміші з евгленами; желатин розтікається під покривним склом і швидко застигає. Щоб запобігти висиханню, краї покривного скла обводять залізним лаком.

Для виявлення джгутика евглен до краплі культури на предметному склі додають краплю 10-відсоткового розчину барвника – опалового синього. Тоді ж роблять на тому ж склі тонкий мазок: інше (чисте) предметне відшліфоване скло підводять до краплі суміші (культури і барвника) і, утримуючи скло під нахилом, переміщують його вздовж першого скла; суміш розподіляється на предметному склі тонким шаром. Після підсихання на мазок наносять краплю канадського бальзаму або гліцерин-желатину, накривають покривним склом. Безбарвні джгутики видно на блакитному фоні барвника.

Для виявлення хроматофорів евглени знебарвлюють. Для цього їх тримають 1–2 дні в темряві; параміл при цьому використовується, а хроматофори виступають чіткіше. Фіксують 2-відсотковим формаліном, зневоднюють гліцерином: до краплі води з фіксованими евгленами додають краплю гліцерину і обережно її відсмоктують; поверх кладуть шматочок суміші гліцерин-желатину, підігрівають і накривають покривним склом.

Структура багатьох інфузорій добре зберігається при фіксації їх у парах OsO_4 . Для цього надходять наступним чином: невелику краплю з інфузоріями на предметному склі перевертають рідиною донизу над відкритою посудиною з 2% розчином осмієвої кислоти. Пари цієї кислоти швидко вбивають інфузорій, добре зберігаючи їх форму та війки. Препарат накривають покривним склом; дослідження ведуть без фарбування в краплі води. Можна також використовувати короточасну фіксацію в осмієвих сумішах (5-15 хв) з подальшим розглядом об'єкта без фарбування в краплі води. При цьому добре видно кінетици.

Додана до такого препарату слабка оцтова кислота чітко виявляє ядерний апарат, а додавання йоду – війки і джгутики, при цьому фарбується крохмаль (у синій колір) і глікоген (у червоно-бурий колір). Додавання 2-4 % розчину соди виразно виявляє війковий апарат, різні інші ектоплазматичні відростки, а також будову рота і глотки.

Для вивчення ядерного апарату інфузорій використовуються тотальні препарати, фіксовані сулемовими або пікриновими сумішами та приклеєні до скла целоїдином. Рідину з живими об'єктами наносять тонкою піпеткою на чисто вимите знежирене скло, розподіляють рівномірно по його поверхні. Надлишок води відсмоктують.

На скло наливають кілька крапель фіксатора (зручна рідина Буена). Через 10-20 хвилин фіксатор зливають або відсмоктують. Скло промивають 96% спиртом. Об'єкти, злегка приклеєні фіксатором, залишаються при цьому на склі. Після цього на кут скла з об'єктами наносять краплю (з піпетки) рідкого розчину целоїдину на суміші рівних частин абсолютного спирту і сірчаного ефіру (0,25-0,5%). Похитуванням скла досягають рівномірного розтікання целоїдину. Скло з об'єктами, покритими целоїдиною плівкою, переносять на 10-15 хвилин (можна й більше) в 70% спирт для ущільнення плівки. Після

ущільнення целоїдину скло промивають у воді, і препарат фарбується. Така методика дозволяє надійно приклеїти протистів до скла і чудово зберігає найтонші цитологічні деталі.

Практична частина

Матеріали: дистильована вода, культури *Amoeba sp.*, *Paramecium sp.*, *Euglena sp.*, *Chlorella sp.*, *Tetraselmis sp.*

Обладнання: мікроскоп, предметні та покривні скельця, піпетка або пастерівська піпетка, лабораторний шпатель або мікроскопічна голка, пінцет, фільтрувальний папір, серветки або ватні диски.

Порядок виконання роботи

1. Підготовка робочого місця:
 - Ретельно продезінфікуйте робочий стіл та руки.
 - Перевірте чистоту предметних і покривних скельць.
2. Виготовлення тимчасового мікропрепарату *Amoeba sp.*:
 - Візьміть чисте предметне скло.
 - За допомогою піпетки нанесіть на предметне скло 1-2 краплі культури амеби.
 - Обережно накрийте краплю з культурою покривним скельцем, уникаючи утворення бульбашок повітря.
 - Видаліть надлишок рідини фільтрувальним папером.
 - Поставте препарат під мікроскоп і спостерігайте за рухом, формою та структурними елементами амеби (псевдоподії, ядро, вакуолі).
3. Виготовлення тимчасового мікропрепарату *Paramecium sp.*:
 - Підготуйте предметне скло.
 - Нанесіть 1-2 краплі культури парамеції.
 - Накрийте покривним скельцем, уникаючи утворення бульбашок повітря.
 - Видаліть надлишок рідини фільтрувальним папером.
 - Спостерігайте під мікроскопом за морфологічними ознаками парамецій, такими як форма тіла, війки, скоротлива вакуоля, макронуклеус і мікронуклеус.
4. Виготовлення тимчасового мікропрепарату *Euglena sp.*:
 - Підготуйте предметне скло.
 - Додайте 1-2 краплі культури евглени.
 - Накрийте покривним скельцем.
 - Видаліть надлишок рідини фільтрувальним папером.
 - Поставте препарат під мікроскоп і спостерігати за рухом джгутика, формою тіла та характерною зеленою забарвленістю евглени, обумовленою хлоропластами.
5. Виготовлення тимчасового мікропрепарату *Chlorella sp.*:
 - На чисте предметне скло нанесіть 1-2 краплі культури хлорели.
 - Обережно покрийте покривним скельцем.
 - Видаліть надлишок рідини.

- Спостерігайте під мікроскопом за окремими клітинами хлорели, визначити форму, розміри, наявність хлоропластів.

6. Виготовлення тимчасового мікропрепарату *Tetraselmis* sp.:

- На предметне скло нанесіть 1-2 краплі культури тетраселмісу.
- Накрийте покривним скельцем.
- Видаліть надлишок рідини.
- Спостерігайте під мікроскопом за формою клітин, наявністю джгутиків та їхньою активністю.

Завдання

1. Вивчіть морфологічні особливості кожного виду протистів, звертаючи увагу на характерні ознаки, такі як форма тіла, структура клітини, рухові органели, наявність вакуоль, забарвлення та інші деталі.

2. Зробіть замальовки побачених структурних елементів для кожного виду та опишіть їхні основні характеристики.

Контрольні запитання

1. Які основні методи та техніки мікроскопії використовуються для вивчення протистів та у чому їх особливості?

2. Які морфологічні особливості характерні для представників родів *Amoeba*, *Paramecium*, *Euglena*, *Chlorella* і *Tetraselmis*?

3. Які методи використовуються для фіксації та виготовлення тимчасових мікроскопічних препаратів?

4. Які переваги та недоліки мають тимчасові (живі) препарати порівняно з постійними препаратами протистів?

5. Як впливає процес фіксації та зневоднення на збереження структурних особливостей протистів при виготовленні мікроскопічних препаратів?

ЧАСТИНА 2. КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОТИСТІВ

Культивування протистів є важливим напрямом біотехнологічних досліджень, оскільки ці мікроорганізми мають значний потенціал для використання в різних галузях науки та промисловості.

Серед протистів особливе місце займають мікроводорості, такі як хлорела і тетраселміс, які демонструють високу швидкість росту та здатність адаптуватися до різноманітних умов середовища. Ці мікроводорості є перспективними об'єктами для культивування у великих масштабах завдяки їхній здатності накопичувати значну кількість ліпідів, білків і вуглеводів. Їх унікальні властивості дозволяють використовувати ці водорості як сировину для виробництва біопалива, зокрема біодизеля, що робить їх важливими компонентами сучасних технологій відновлюваної енергетики. Хлорела і тетраселміс здатні поглинати вуглекислий газ з навколишнього середовища, сприяючи зменшенню рівня парникових газів в атмосфері, що робить їх використання ще більш привабливим з екологічної точки зору. Водночас ці мікроводорості можна культивувати на відходах виробництва, знижуючи тим самим витрати на їх вирощування. Культивування хлорели часто

застосовується у відкритих і закритих фотобіореакторах, де оптимізуються умови освітлення, температури та живильних середовищ. Тетраселміс, завдяки своїй здатності до швидкого росту у солонуватій воді, є ефективним кандидатом для інтеграції в системи морської аквакультури.

Основним завданням лабораторного практикуму з культивування мікроводоростей є ознайомлення з основними методами підтримання чистих культур, умовами їхнього росту та методами контролю якості біомаси. Оволодіння цими навичками є важливим для подальшого застосування мікроводоростей у дослідженнях біоенергетики та біотехнологічних процесів.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №2. Методи культивування найпростіших

Мета: ознайомитися з методами виділення культури *Paramecium* sp. з природних джерел і культивування її в лабораторних умовах, а також вивчити оптимальні умови для підтримання росту і розмноження цих протистів.

Теоретичні відомості

1. Методи отримання культур найпростіших з природи.
2. Методи і техніки культивування найпростіших у лабораторних умовах.
3. Склад і різновиди живильних середовищ для культивування найпростіших.

Методи отримання культур найпростіших з природи

Лабораторне вивчення та визначення протистів переважно ведеться на живому матеріалі, оскільки будь-яка фіксація деформує або руйнує клітину найпростішого. Тому в лабораторії необхідно постійно наявність живих культур. Це досягається змістом культур протистів, одержаних у природі.

Місця збору протистів. Для отримання культури протистів, яка містилася б у лабораторії, необхідно знати місця їх проживання. Зазвичай це вологі та водяні стоячі біотопи (стави, стариці, канали та ін), у текучих водоймах протистів значно менше.

Біологічний метод оцінки ступеня забруднення природних вод був розроблений у 1902 р. німецькими дослідниками Кольквітцем (ботанік) та Марссоном (зоолог).

1. Сильно забруднені води з різким переважанням відновлювальних процесів – **полісапробна зона** (гр. «poly» - багато, «sapro» - гнилий).
2. Води, в яких відновлювальні процеси припинилися та почалися окислювальні, з поступовим переважанням останніх – **мезосапробна зона** (гр. «mesos» - середній).
3. Води, в яких спостерігається повне окислення органічної речовини, що надходила – **олігосапробна зона** (гр. «oligos» - незначний).

Пізніше мезосапробну зону розділили на дві:

- **α-мезосапробну**, більш забруднену, близьку до полісапробної,
- **β-мезосапробну**, що наближається до олігосапробної.

Потім було введено ще **катаробну зону** (гр. «katharos» - чистий), під якої малася на увазі абсолютно чиста вода, яка не містить органічних речовин.

Таким чином, була створена система із **5 зон** або ступенів сапробності, що характеризує процес самоочищення від крайнього ступеня забруднення до поступово зростаючої чистоти води. У кожній із зон сапробності розвивається властивий їй комплекс тварин та рослин, здатних існувати в даних умовах, які й були названі авторами цієї системи сапробними організмами чи сапробіонтами.

Водойми залежно від їх величини, освітленості, прогріваності та ступеня забруднення по-різному заселені протистами.

У стоячих водоймах із чистою прозорою водою звичайним видом є *Stentor coeruleus* – інфузорії, які сидять групами на різних дрібних донних предметах; таким же чином накопичуються у великих кількостях на водних предметах сувійки (*Vorticella sp.*), утворюючи навіть на око видимий наліт; на корінцях ряски нерідко можна зустріти *V. lemnae*.

У стоячих водоймах: ставках, озерах, не дуже забруднених (олігосапробні), численні джгутикові *Eudorina elegans*, у планктоні таких водойм можна зустріти *Volvox aureus* і *V. glabator*.

У стоячих водоймах, багатих на органічні речовини – мезо- та полісапробних (стави, озерця, канави та ін), численні евгени. Різні їх види живуть або на поверхні дна або поблизу нього, сирої землі біля самого берега, у поверхневому шарі мулу, утворюючи яскраво-зелені плівки (плями). Численні у водоймах (калюжі, канавки) більш менш багатих органічними речовинами види *Chlamydomonas*, які, розвиваючись у великих кількостях, викликають «цвітіння» водойм. Види роду *Vodo* віддають перевагу сильно забрудненим водоймам.

У стоячих забруднених водоймах (з гниючим листям та іншими рослинними залишками) або в дрібних затінених повільно проточних, зарослих водною рослинністю водоймах, мешкають різні амеби. Найбільш сприятлива для розмноження амеб температура 18...20°C.

У таких водоймах виявляються *A. proteus*, раковинні амеби (*Arcellidae*, *Diffugiidae*), види роду *Centropyxis*, *Actinosphaerium* (*A. eichhorni*). Нерідко вони, причому, у великих кількостях, зустрічаються у торф'яних болотах.

Деякі види інфузорій, зокрема *Stylonychia mytilus*, живуть у будь-якій невеликій стоячій водоймі. Види родів *Loxodes*, *Bursaria* восени (вересень–жовтень) зустрічається у багатьох водоймах.

Для полісапробних водойм характерні такі інфузорії, як *Caenomorpha*, *Colpidium*, *Epalxella*, *Lacrymaria*, *Metopus*, *Vorticella*; для α -мезосапробної – *Carchesium*, *Chilodonella*, *Paramecium*, *Urocentrum*; для β -мезосапробної – *Euplotes*, *Halteria*, *Spirostomum*, *Stentor*; для олігосапробної – *Dileptus*, *Strobilidium*, *Thuricola*.

Кращі місця для взяття проб у водоймах – це пологі береги з рослинними залишками, що гниють. Тут відбувається рясний ріст бактерій, які є основною їжею для багатьох протистів. У воді проби краще брати з глибини трохи більше кількох сантиметрів від поверхні дна, де умови життя протистів оптимальніші. Збір протистів можливий протягом усього періоду, коли водойми не замерзли (травень–жовтень).

Техніка збору. Методи та прийоми збору визначаються особливостями проживання протистів у вологих та водних біотопах.

Так, мешканців товщі води збирають планктонною сіткою. Осад поміщають у банку і заливають великою кількістю води, взятої з тієї ж водойми.

При зборі донних найпростіших разом з водою зачерпують з дна мул, а також старе листя, водорості, водні рослини.

Це можна робити як планктонною сіткою, так і планктонним сачком, проводячи ними поблизу поверхні дна. Зачерпнути мул можна за допомогою склянки або чотирикутної акваріумної банки. При опусканні їх у воду отвором вниз та швидкому повертанні отвором догори біля дна водойми повітря, що виходить з них, піднімає мул, який зачерпується посудиною.

Для отримання протистів з вологих субстратів (болотного ґрунту, моху) використовують вичавки з них. Верхні частини (стебла моху) віджимають рукою, прополіскують у віджатій рідині і знову віджимають.

У залишку цієї рідини, що відстоялася, виявляються різні види Testacea.

Для отримання більш різноманітної фауни протистів береться значна кількість проб з різних водойм. Посудини для проб – це чисті скляні банки, сполощені кілька разів водою з водоймища, звідки беруться протисти.

При перевезенні протистів необхідно захищати їх від перегрівання.

Раковини форамініфер збираються разом із морським піском. Пісок промивають для видалення мулу; грубі домішки видаляються просіюванням через металеве решето із отворами до 2 мм у діаметрі. Раковинки форамініфер вибирають препаративними голками під лупою.

Методи і техніки культивування найпростіших у лабораторних умовах

Культивування протистів у лабораторії – це догляд за ними, що вимагає певних знань та навичок.

Спочатку принесені в лабораторію польові проби розливають по судинах меншої ємності (банки, склянки), додають в них листя, що гниє, або водні рослини, або детрит і мул (краще урізноманітнити середовище кожної посудини для отримання більшої різноманітності видів протистів), і закривають скляними кришками (це зменшує випаровування води та забруднення культури пилом). Для утримання протистів використовується тільки прозорий (не зелений) скляний посуд. Використання металевого посуду виключається, оскільки метал виявляє шкідливий вплив на протистів. Ці культури містять велику кількість різних видів і належать до **змішаних** чи **сирих культур**. Враховуючи особливості трофіки протистів, посудини з культурами слід поміщати у різні умови (Т°С, освітленість).

Для отримання фотосинтезуючих (зелених) форм частину проб необхідно ставити в помірно світле місце, і евгени розмножаться через 1-2 тижні. Для розвитку гетеротрофних видів частину проб слід помістити у затемнене місце.

Необхідно пам'ятати, що створена лабораторна культура – це екологічна система, в якій протисти піддаються дії різних факторів. Небезпечне перегрівання, яке може легко статися в невеликому обсязі рідини та спричинити загибель мікроорганізмів – основного харчового субстрату найпростіших та самих найпростіших, тому слід захищати посудини з

культурою від яскравих сонячних променів, особливо у спекотну пору. Оптимальною вважається для культивування протистів (для звичайних повсякденних, наприклад, навчальних цілей) кімнатна температура (+18-22°C). В умовах температури +10°C і нижче протисти чудово існують, але слабо розмножуються.

При температурі +25°C прискорюються обмін і розмноження, культура швидко збагачується кількісно, але так само швидко і зникає.

У посудинах з культурами протистів не повинно бути їх хижаків, здебільшого нижчих ракоподібних (дафній, циклопів та ін.).

Різні абіотичні, біотичні чинники, біологічні особливості видів протистів визначають розподіл їх у даній штучній екосистемі у часі та просторі. Деякі види (амеби *A. proteus*, *Pelomyxa palustris* та ін) виявляються відразу в придонному шарі відстоюної води та мулу, і можуть у таких «вихідних» умовах жити кілька тижнів. Інші (*Stylonychia mytilus*) виявляються через тиждень. З часом протисти починають погано розмножуватися, інцистуються або зовсім зникають. Це показник несприятливих умов утримання, зокрема нестачі кормів. Для стимулювання розвитку бактерій у посудину 2-3 рази на місяць додають 5-10 крапель сирого молока. Замість молока можна використовувати відвари: вівсяний, рисовий, пшеничний, пшоняний. Для приготування відвару 50 г однієї з круп кип'ятять в 1 л води протягом 15–30 хвилин. До культур відвар додають не більше двох разів на місяць по 5-10 см³.

Годувати амеб для збереження їх культури за кімнатної температури можна крохмалем (одна петля подрібненого крохмалю на пробірку з амебами кожні 10-12 діб). У цьому випадку життєздатні амеби (*Entamoeba invadens*) зберігаються в одній пробірці 5-7 місяців.

Слід враховувати харчові потреби хижих протистів. Наприклад, *Bursaria* охоче харчується джгутиковими та іншими дрібнішими протистами. Тому її культивування вимагає наявності в банках евглен або інших джгутикових.

У культуральних банках різні види протистів розподіляються в різних місцях, відповідно до місць проживання в природних умовах. Тому, щоб протисти не розсіювалися по товщі води, банки з культурами слід тримати у спокої, не струшувати. Зокрема, зелені джгутиконосці фототропні та тримаються біля сторони посудини, повернетою до світла; у придонних шарах води – інфузорії; наліт, що покриває стінки акваріумів, що довго стоять, з рослинами, нерідко складається з раковинок *Arcella* та *Centropyxis*; сонячники також мешкають на стінках посудини і т.д.

Знаючи особливості проживання, можна видобувати (для вивчення) необхідні види протистів із цих змішаних культур. Протистів витягують з акваріума піпетками, краще забезпеченими грушами, і переносять на предметне скло, де розглядають у краплі рідини.

Штучні культури протистів. Штучні культури, на відміну змішаних, «природних», – це чисті культури певних видів протистів, які отримують (індивідуальне культивування) з вільноживучої особини. Окрема клітина поміщається в мікроакваріум (скла з краплею середовища, поміщені у вологу камеру), а потім через добу або інший час одна з дочірніх клітин знову поміщається в мікроакваріум зі свіжим середовищем і кормом. Надалі для

ведення індивідуальної культури беруться годинникове скло, поміщене у вологу камеру. Для стерильного ведення індивідуальної культури використовуються пластини з лунками, вкритими склом. Такі пристрої легко стерилізуються і можуть бути застосовані без вологої камери, оскільки скляна пластинка запобігає випаровуванню.

Крім того, деякі дослідники використовують скляні кільця, поміщені в розплавлений живильний агар до автоклавування, які після охолодження утворюють мікроакваріуми з живильним дном, куди висівають бактерії. Після того, як бактерії виростають, мікроакваріуми додають мінеральне середовище і поміщають інфузорій. Використовують також і скло з лунками, на дно яких поміщають агар, а потім висівають бактерії. Метод індивідуальної культури відіграв велику роль у вивченні протистів. Користуючись цим методом, протистологи з'ясували, які умови середовища, корми, рН середовища, температури в поєднанні можуть давати високий темп поділу інфузорій.

В даний час цей метод культивування протистів широко і ефективно застосовується протозоологами та цитологами для вирішення низки наукових завдань. Масове періодичне культивування вільноживучих протистів дозволяє отримувати велику кількість матеріалу.

Отримання штучних культур – це другий спосіб, який дає постійний лабораторний матеріал. Він передбачає використання певних середовищ, нерідко специфічних, для культивування окремих видів чи певних їх груп.

Склад і різновиди живильних середовищ для культивування найпростіших

За походженням і складом живильні середовища можна розділити на **натуральні (природні), синтетичні та напівсинтетичні**.

Натуральні середовища бувають рослинного та тваринного походження.

Синтетичні середовища готують із певних хімічно чистих сполук зазначених концентрацій.

Напівсинтетичні середовища мають складний склад. Компонентами цих середовищ (вуглеводи, фосфати, нітрати та інші) є натуральні продукти: м'ясний відвар, дріжджовий екстракт, пивне сусло.

За призначенням середовища бувають: **стандартні** або **середовища загального призначення** (у таких середовищах вирощують чи накопичують біомасу протистів); **спеціальні середовища** чи **середовища спеціального призначення**. Ці середовища призначені для виявлення тих чи інших біохімічних особливостей мікроорганізмів або для отримання їх культур, які мають особливі властивості.

Культури інфузорій найбільше широко використовуються в наукових дослідженнях, у навчальному процесі, останнім часом привертають увагу як об'єкт біотехнології. Для їх отримання найчастіше використовуються: сінний відвар, молочний розчин, настій салату, сінний настій, агар та ін.

Сінний відвар. Культуральним середовищем може бути сінний відвар: 15 грам сухого подрібненого сіна кип'ятять у колбі з чистою водою протягом 15-30 хвилин, потім фільтрують. Середовище розливають у чашки Коха або у скляні банки. Посуди з відваром залишають відкритими на кілька днів, поки в

ньому не розвинуться сінні бактерії (*Bacillus subtilis*), які є прекрасною їжею для інфузорій. Через 1–2 дні у відвар вносять парамецій, які у таких культурах швидко розмножуються та зберігаються кілька тижнів. Щоб підтримувати культуру, її необхідно іноді пересівати, тобто півсклянки культури додають у банку зі свіжим сінним настоем або іншою живильною рідиною.

Молочний розчин. У чисті хімічні пробірки (краще нові, не вживані) наливають по 15-20 м³ води (водопровідної, колодязної, дощової). У кожену пробірку додають по 2-3 краплі сирого молока і збовтують. У кожену пробірку впускають приблизно 10-20 парамецій і нещільно затикають шматочком вати. Через 5–7 днів інфузорії сильно розмножуються і можуть жити у цій пробірці місяцями. Двічі на місяць у пробірки додають по краплі молока.

Крім парамецій, на молочному розчині з таким же успіхом розводяться стилоніхії та спіростомум. У молочному розчині інфузорії харчуються молочнокислими бактеріями, що розмножуються.

Настій салату. У скляні посудини з кип'яченою водою опускають попередньо прокип'ячений мішечок з тюлі з листям салату. Посудини закривають скляною пластинкою. У такому настої розвивається, особливо сприятлива для харчування парамецій, бактеріальна флора. Ще краще, якщо основною рідиною для культури береться 0,025% водний розчин лібіховського екстракту.

Сінний настій. Беруть лугове сіно, ріжуть його і кладуть у скляний посуд з дощовою водою. Дні через три до отриманого сінного настою доливають півсклянки води з ставка або водоймища, багатого органічними речовинами, що розкладаються.

З часом у культурі з'являються різні інфузорії; і зрештою, з'являються і парамеції. Культура виявляється найбагатшого тижня через два після додавання ставкової води. На поверхні культури утворюються точкові плівки з бактерій, що накопичилися, серед яких рухається багато інфузорій.

Агар-агар. Легко можна культивувати інфузорій на звичайному агарі, який використовується для культури амеб. Декілька інфузорій піпеткою переносять на агар-агар, де вони швидко розмножуються при зберіганні культури в теплі (+15-20°C). Виходить культура придатна для вивчення вегетативних форм та поділу.

Приготування середовища: агар-агару – 0,6-1,0 г, водопровідної води – 90 см³, звичайного лужного поживного бульйону – 10 г. Після кип'ятіння розливають у чашки Петрі та стерилізують.

Екстракт свинячого мозку. Дозволяє отримати багату та майже чисту культуру *Paramecium* (у більшості *P. aurelia*). 120 грам свинячого мозку розрізають на шматочки та роздавлюють у воді; суміш залишають стояти півдня і потім продавлюють її через чисту серветку. Отриманий «мозковий сік» розбавляють водою до одного літра і розливають у банки, куди додають по 1 см³ сінного настою. Інфузорії з'являються дні за три. Поверхневу плівку з культури видаляють щодня.

Для отримання можливо більш чистих культур, 0,025% водний розчин екстракту лібіховського засівають *Bacillus proteus*, які витісняють інші бактерії.

Потім у рідину пускають багаторазово відмитих у стерильній воді парамецій, які розмножуються за рахунок харчування бактеріями.

Для вивчення кон'югації користуються водними культурами інфузорій, для чого в годинникове скло поміщають інфузорій з різних культур.

Активні хижаки *Dileptus*, *Didinium* добре розвиваються на сінних або гнойових культурах за наявності достатньої кількості їжі. Їжею можуть слугувати живі інфузорії туфельки, яких розводять у окремії культурі. Невелику їх кількість необхідно додавати до середовища, у якому живуть хижі інфузорії.

Дилептуси дуже добре живуть у чашках Петрі на зернах рису. Виходить багаточлена культура: на рисі розводять бактерій, які слугують їжею інфузоріям (парамеціям). Останніми, у свою чергу, харчуються хижаки. За відсутності їжі дилептуси та дидініуми легко інцистуються. Так само легко вони виходять з цист при пересіві на свіже середовище.

Можна використовувати мінеральне середовище Лозина-Лозинського. Так, інфузорія *Spirostomum ambiguum* культивується на мінеральному середовищі наступного складу (мг/л): KCl – 4, NaCl – 30, CaCl₂•2H₂O – 5, MgCl₂ 6H₂O – 5, NaHCO₃ – 7,5. Як корм використовують бактерій *Aerobacter aerogenes* або *Bacillus subtilis*, а також дріжджі *Saccharomyces ellipsoides* (у співвідношенні 1:1 за об'ємом сирової маси). Годування проводять один раз на тиждень. Після чотирьох годин культури очищають і оновлюють.

Практична частина

Матеріали проточна або джерельна вода і сіно для приготування середовища.

Обладнання: пробірки або пляшки для збору проб води з природних водойм, мікроскоп, піпетки та піпеточні наконечники, предметні скельця і покривні скельця, чашки Петрі, термостат, культуральні флакони, колби, фільтрувальний папір, лійка.

Порядок виконання роботи

1. Збір проб води з природних джерел.

- Виберіть природне джерело прісної води (озеро, ставок, калюжа), яке має помірно багатий органічними речовинами вміст. Найкраще збирати воду з поверхневого шару, де є багато мікроорганізмів і детриту.

- За допомогою стерильної пробірки або пляшки зберіть 100-200 мл води з водойми. Зразки можна збирати з різних частин водойми для підвищення ймовірності виявлення інфузорій.

- Привезіть зразки до лабораторії для подальшого дослідження.

2. Підготовка поживного середовища для культивування.

- Приготуйте середовище для культивування інфузорій, яке повинно включати джерела органічних речовин і бактерій, необхідних для живлення інфузорій (див. «сінний відвар» у теоретичній частині).

3. Залиште середовище на кілька днів для росту бактерій.

- Автоклавувати середовище не потрібно, оскільки природні бактерії необхідні для розвитку інфузорій.

4. Виділення інфузорій з природних водойм.

- За допомогою піпетки відберіть кілька крапель води зі зразка, зібраного з природного водоймища.
- Нанесіть краплю води на предметне скельце, накрийте покривним скельцем і досліджуйте під мікроскопом.
- Шукайте інфузорій, які мають видовжену овальну форму і активно рухаються за допомогою війок. Якщо інфузорій не виявлено, спробуйте дослідити інші зразки або частини проби.

5. Культивування інфузорій в лабораторних умовах:

- Якщо інфузорій було виявлено в зразках, перенесіть декілька особин за допомогою піпетки у свіжоприготоване поживне середовище (чашки Петрі або культуральні флакони).
- Залиште культуру при кімнатній температурі або в термостаті при температурі 20-25°C. Уникайте прямих сонячних променів, які можуть перегріти середовище і знищити інфузорій.
- Щоденно спостерігайте за розвитком культури, використовуючи мікроскоп. Через кілька днів кількість інфузорій має значно зрости.
- Якщо потрібно довгостроково підтримувати культуру, раз на тиждень переносьте частину культури у свіже поживне середовище.

6. Оцінка стану культури.

- Щодня оцінюйте здоров'я культури інфузорій за такими критеріями:
 - ✓ рухливість інфузорій: активний рух свідчить про здорову культуру.
 - ✓ щільність культури: збільшення кількості клітин з часом.
 - ✓ чистота середовища: відсутність контамінацій бактеріями або грибами, які можуть погіршити ріст інфузорій.
- Якщо спостерігаються ознаки контамінації (помутніння середовища або різке зменшення кількості інфузорій), необхідно ізолювати здорові особини та перенести їх у свіже середовище.

Завдання

1. Оцініть успішність культивування *Paramecium sp.* на основі кількості інфузорій через кілька днів культивування.

Контрольні питання

1. Які основні методи використовуються для отримання культур найпростіших з природних середовищ?
2. Які техніки культивування найпростіших застосовуються в лабораторних умовах для забезпечення їхнього росту та розвитку?
3. Які умови є оптимальними для культивування найпростіших?
4. Як поживне середовище впливає на ріст і розвиток найпростіших?
5. Які заходи можна застосувати для уникнення контамінації під час культивування найпростіших?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №3. Культивування прісноводних мікроводоростей на різних середовищах

Мета: дослідити вплив якісного та кількісного складу стандартних живильних середовищ на процес культивування та приріст біомаси мікроводоростей *Chlorella vulgaris*.

Теоретичні відомості

1. Типи живильних середовищ для культивування прісноводних мікроводоростей.
2. Значення основних мікро- та макроелементів для розвитку мікроводоростей.
3. Оцінка росту мікроводоростей.
4. Показники здоров'я культури: колір, щільність біомаси, відсутність контамінацій.

Мікроводорості є важливими об'єктами біотехнологічних досліджень завдяки своїй здатності швидко накопичувати біомасу, ефективно використовувати поживні речовини та синтезувати широкий спектр біологічно активних сполук, таких як ліпіди, білки, пігменти та інші метаболіти. Завдяки цим властивостям мікроводорості знаходять застосування у різних галузях промисловості, включаючи аквакультуру, фармацевтику, косметологію, виробництво кормів для тварин, а також виробництво біопалива. Одним із перспективних видів мікроводоростей для отримання біопалива є представники роду *Chlorella*, які характеризуються високим вмістом ліпідів, що становлять до 30-50% від сухої маси клітин за певних умов культивування.

Отримання біопалива з мікроводоростей, зокрема з *Chlorella sp.*, є актуальним напрямом досліджень через можливість використання цих мікроорганізмів як відновлюваного джерела енергії. Вирощування мікроводоростей не потребує великих площ орної землі, що зменшує навантаження на сільськогосподарські ресурси, а також дає змогу застосовувати солонувату або навіть забруднену воду. Крім того, мікроводорості активно поглинають вуглекислий газ під час фотосинтезу, що робить їх культивування екологічно безпечним та сприяє зниженню рівня CO₂ в атмосфері.

Для успішного культивування *Chlorella* необхідно створити оптимальні умови середовища, які включають певний вміст поживних речовин, концентрацію джерел вуглецю та азоту, рівень освітленості, температуру, а також інші параметри. У лабораторних умовах варіювання цих факторів дозволяє досягти максимального накопичення ліпідів у клітинах, що є необхідним для подальшої їх екстракції та конверсії у біопаливо.

Наступні лабораторні роботи (№3-6) присвячені культивування мікроводоростей *C. vulgaris*, збільшенню їхньої біомаси, оптимізації умов середовища для максимального накопичення ліпідів, виділенню ліпідної фракції та аналізу отриманого продукту. Такий комплексний підхід дозволяє не тільки дослідити умови, що впливають на ліпідний метаболізм

мікроводоростей, але й оцінити перспективи використання цих мікроводоростей як ефективної біосировини для виробництва біодизелю та інших видів біопалива.

Типи живильних середовищ для культивування прісноводних мікроводоростей

Культивування прісноводних мікроводоростей в лабораторних умовах потребує застосування спеціальних живильних середовищ, які забезпечують організми необхідними елементами для росту та метаболічної активності. Середовище має містити всі необхідні макро- та мікроелементи, вуглець та джерела азоту для забезпечення ефективного фотосинтезу та приросту біомаси.

Живильні середовища штучного складу. У лабораторіях найчастіше використовуються штучно створені живильні середовища, які дозволяють регулювати вміст поживних речовин для різних типів мікроводоростей. Деякі з найпоширеніших середовищ включають середовище BG-11, F/2 тощо.

Середовище BG-11 є стандартним середовищем для культивування ціанобактерій та зелених водоростей. Воно містить макроелементи, такі як нітрати, фосфати, сульфати, кальцій, магній та натрій, а також мікроелементи, включаючи залізо, цинк, мідь і молібден.

F/2 середовище є широко використовуваним для морських і прісноводних мікроводоростей і включає збалансоване співвідношення макроелементів та мікроелементів для підтримки оптимального росту.

Природні живильні середовища. Культивування мікроводоростей можна також проводити у середовищах, підготовлених на основі природних водних джерел, таких як прісноводні озера, річки або підземні води. Проте такі середовища можуть мати непостійний склад та забруднення, що впливає на їхню ефективність і потребує додаткової підготовки.

Комерційні середовища. Для промислового культивування часто застосовуються готові комерційні середовища, зокрема ті, що містять специфічні джерела вуглецю, азоту та інших поживних елементів, які стимулюють максимальний приріст біомаси для комерційних цілей.

Значення основних мікро- та макроелементів для розвитку мікроводоростей

Водоростям, як і вищим рослинам, необхідно три основні компоненти для росту та розвитку: сонячне світло, оксид карбону (IV) і вода. Як і рослини вони використовують фотосинтез для перетворення сонячної енергії на енергію хімічних зв'язків і запасання поживних речовин.

Частка Карбону в сухій біомасі водоростей складає понад 50%. Тобто, для утворення 1 кг біомаси водоростей необхідно понад 1,8 кг оксиду (IV) карбону. Як альтернативне балонному і дешеве джерело цього газу для культивування водоростей можливо використовувати газові викиди, що утворюються при перебігу промислових процесів, згоряння викопних палив, а також ферментаційних процесів. Чистий CO₂ у лабораторній роботі за відсутності балонного одержують при проведенні спиртового бродіння або за використання біогазу з лабораторних метантенків. В останньому випадку відбувається збагачення біогазу метаном. Ферментаційний процес є одним з найбільш

придатних для культивування водоростей, при цьому діоксид карбону можна використовувати без додаткового очищення, що зменшує витрати на виробництво кінцевих продуктів.

До поживних елементів, вміст яких є обов'язковим у середовищі для культивування і необхідним для росту мікроводоростей, зокрема роду *Chlorella*, належать N, P, Mg, S, K, Fe, Ca, Mn, Zn і Cu. Натомість немає даних щодо ролі і необхідності таких елементів як B, Mo, Na, Co, Sr.

Нітроген. Ріст усіх організмів залежить від доступності мінеральних поживних речовин, з яких одним з найважливіших є Нітроген, що необхідний у значних кількостях, як основний компонент білкових молекул, хлорофілу, азотистих основ, що входять до складу нуклеїнових кислот та молекул, що забезпечують запасання та зберігання енергії. У перерахунку на суху масу клітин кількість Нітрогену становить 7-10%.

Більшість фотосинтетичних водоростей можуть рости, використовуючи неорганічні джерела Нітрогену, такі як іони нітрату або амонію. При чому амонійний нітроген споживається першочергово, тоді як нітрат часто не утилізується поки у середовищі присутні амонійні солі. Додавання амонію до живильного середовища водоростевих культур призводить до різкого і повного інгібування асиміляції нітратів. Це пояснюється тим, що NH_4^{4+} є кінцевим продуктом відновлення нітрату і інгібує процес за типом зворотного зв'язку. NH_4^{4+} переводиться у органічні форми, а його асиміляція пов'язана з втратами внутрішньоклітинних запасів вуглеводнів. Першою сполукою, що синтезується при асиміляції амонійного нітрогену є глютамінова кислота, попередником якої є α -глутарова кислота, а каталіз здійснюється глютамін дегідрогеназою. Однак багато водоростей чутливі до NH_4^{4+} і їх ріст уповільнюється за концентрації, що перевищують 1 ммоль/л.

Асиміляція Нітрогену тісно пов'язана з концентрацією іонів водню у середовищі, так як при поглинанні нітрогену змінюється значення рН. Коли у якості основного джерела Нітрогену використовується амоній, рН середовища може швидко знижуватись і досягати значення 3,0. Зміна значень рН може бути причиною уповільнення росту, що спостерігається для деяких водоростей при зростанні концентрації амонію у середовищі, а надалі і зростанні внутрішньоклітинного рівня рН внаслідок поглинання слабодисоціюючих молекул гідроксиду амонію. Споживання нітрат-іонів веде до зростання рН.

Фосфор. Фосфати відіграють дві ключові ролі в метаболізмі мікроводоростей. Поперше, вони слугують структурними елементами ряду біологічних компонентів, наприклад, сахарофосфатний остов нуклеїнових кислот. Інша роль пов'язана з накопиченням та переносом енергії. Більшість видів водоростей мають сталість клітинного вмісту Фосфору, що становить 1% сухої маси. Потреби мікроорганізмів у фосфорі змінюються в залежності від виду. При визначенні оптимальних концентрацій фосфатів для діатомових та зелених водоростей у лабораторних умовах було встановлено, що концентрація нижче 50 мкг/л фосфору є лімітуючою, при вмісті фосфору понад 20 мг/л спостерігається ефект інгібування росту, а оптимальною є концентрація у межах 0,1-2 мг/л.

Включення ортофосфату до клітин мікрободоростей є енергозалежним процесом, який забезпечується енергією завдяки одному з двох шляхів – фотосинтезу або диханню. Ортофосфат переважно включається до метаболізму клітин через реалізацію одного з трьох шляхів: 1) фотофосфорилування; 2) субстратного фосфорилування; або 3) окиснювального фосфорилування. На поглинання фосфатів впливають і інші фактори, такі як рН і концентрація іонів Na^+ , K^+ , Mg^{2+} або деяких важких металів у середовищі.

За умов високого вмісту у середовищі, неорганічний фосфат акумулюється у водоростях у гранулах у вигляді поліфосфатних кислот, що метаболізуються за умов фосфорного голодування. При фосфорному голодуванні лімітуючою стадією клітинного циклу є G2 (премітотична) фаза, у якій закінчується «приготування» клітини до мітотичного поділу.

Сульфур. Подібно до Фосфору, Сульфур також є життєво необхідним елементом для клітин живих організмів, адже входить до складу деяких важливих амінокислот (метіоніну, цистеїну), вітамінів та сульфоліпідів. Потреби у Сульфурі забезпечуються, в основному, за допомогою введення у поживне середовище неорганічного сульфату. Деякі водорості (*Chlorella*, *Euglena*) можуть споживати органічний сульфур, що входить до складу сірковмісних амінокислот. Надходження сульфату до клітини відбувається шляхом активного транспорту.

Натрій і Калій. Кількість Натрію є суттєвим фактором лише для ціанобактерій. Також вважається, що Натрій необхідний азотфіксуючим водоростям для перетворення молекулярного азоту на іон амонію.

Вміст у середовищі Калію важливий для всіх водоростей. В умовах калійного дефіциту ріст і фотосинтез уповільнюються, водночас прискорюються дихальні процеси. Повернення до нормального стану таких клітин досягається додаванням сполук Калію або Рубідію. Цей елемент виступає кофактором для декількох ферментів і включається до білкового синтезу і осморегуляції. Згідно даних досліджень з мікрободоростями *Chlorella sorokiniana* оптимальна концентрація йонів калію у середовищі для росту біомаси знаходиться у межах 0,5 ммоль/л-0,1 моль/л.

Кальцій. Кількість Кальцію, що необхідна для росту водоростей, є наразі предметом обговорення. Його фізіологічна роль повністю не з'ясована. Кальцій може відігравати роль у підтримці цитоплазматичних мембран. Він приймає участь в утворенні скелету деяких водоростей і може відкладатися всередині або на поверхні клітинних стінок у вигляді кальцитів або арагонітів. Для зелених водоростей його додають у невеликих кількостях.

Магній. Магній, займаючи центральне положення у молекулі хлорофілу, має велике значення для всіх фотосинтетичних організмів, у тому числі й водоростей. Інші функції Магнію полягають у агрегації рибосом у функціональні одиниці і формуванні структури молекули каталази. Дефіцит Магнію, наприклад, у зелених водоростей призводить до порушення поділу клітин, що є причиною їх ненормально великих розмірів.

Ферум. Ферум є одним з основних елементів у метаболізмі, що забезпечує функцію цитохромів, відіграє важливу роль у асиміляції Нітрогену,

як функціональний елемент ферредоксину і впливає на синтез фікоціаніну та хлорофілу.

Дискусійним питанням є те, у якому вигляді цей елемент має бути присутнім у середовищі, адже наразі немає згоди у питанні кращої доступності для водоростей елементарної, колоїдної або розчинної форми заліза. На сьогодні Ферум найчастіше вводиться у середовище у вигляді хелатних комплексів, для яких комплексоутворюючим елементом є етилендіамінтетраацетат (FeEDTA). Відоме також використання цитратних комплексів заліза, де лимонна кислота наряду з комплексоутворюючими властивостями проявляє буферну дію та є відновлюючим агентом.

Оцінка росту мікроводоростей

Для ефективного культивування мікроводоростей необхідно постійно моніторити їх ріст, що дозволяє виявити ефективність середовища та параметрів культивування. Існує кілька методів оцінки росту мікроводоростей:

- **Оптична густина (OD).** Оцінка росту мікроводоростей за допомогою вимірювання оптичної густини є одним з найшвидших методів. Для цього використовують спектрофотометр, який вимірює поглинання світла зразком на певній довжині хвилі (зазвичай 680-750 нм). Чим вища оптична густина, тим більше клітин у зразку.

- **Визначення сухої маси.** Цей метод передбачає збирання клітин мікроводоростей шляхом центрифугування або фільтрації, після чого зразок висушується і зважується. Визначення сухої маси дозволяє точно оцінити кількість біомаси, що виробляється у процесі культивування.

- **Клітинний підрахунок.** Підрахунок кількості клітин може бути проведений вручну за допомогою лічильника клітин або автоматично за допомогою електронних лічильників. Цей метод надає точну інформацію про кількість живих клітин у зразку.

- **Флуоресцентні методи.** Флуоресцентні барвники можуть використовуватися для вимірювання специфічних компонентів клітин, таких як хлорофіл, ліпіди або білки. Ці методи надають більш детальну інформацію про фізіологічний стан клітин та метаболічну активність.

Показники здоров'я культури: колір, щільність біомаси, відсутність контамінацій

Для забезпечення ефективного культивування важливо контролювати здоров'я культури мікроводоростей, оскільки це впливає на її продуктивність та якість біомаси.

- **Колір культури.** Зміна кольору культури є одним з перших показників змін у здоров'ї мікроводоростей. Зелений колір вказує на здорову культуру з активним фотосинтезом, тоді як жовтуватий або блідий колір може свідчити про недостатність поживних речовин або стресові умови. Наприклад, при дефіциті азоту хлорофіл деградує, що призводить до пожовтіння клітин.

- **Щільність біомаси.** Щільність біомаси оцінюється шляхом вимірювання концентрації клітин або сухої маси культури. Здорова культура має високу щільність біомаси, що свідчить про активний ріст. Зниження

щільності може бути наслідком несприятливих умов культивування або інфікування культури.

- **Відсутність контамінацій.** Наявність контамінацій (бактерій, грибків або інших водоростей) може значно знизити продуктивність культури. Контамінації зазвичай виявляються за допомогою мікроскопічного аналізу або візуально за зміною структури культури чи її кольору. Своєчасне виявлення та усунення контамінацій є важливим для підтримання здорової культури мікроводоростей.

Отже, культивування мікроводоростей на різних живильних середовищах є складним процесом, що вимагає ретельного контролю поживних речовин, джерел вуглецю та азоту, а також оцінки фізіологічного стану культури. Правильний вибір середовища та його оптимізація можуть значно підвищити продуктивність біомаси, що є важливим для різних біотехнологічних застосувань, таких як виробництво біопалива, харчових добавок або фармацевтичних продуктів.

Практична частина

Матеріали та реактиви: колби на 1 л, стаканчики, скляні палички, піпетки, пробірки на 50 мл, вата, марля.

Обладнання: термостат, аналітичні ваги, мікроскоп, камера Горяєва.

Камера Горяєва – це прилад призначений для підрахунку кількості клітин у заданому об'ємі рідини. Зовні вона являє собою прозорий паралелепіпед (предметне скло), з борознами і нанесеною мікроскопічною сіткою. Розміри малих поділок клітин сітки складають 0,05 мм, а великих – 0,2 мм. При цьому сітка нанесена на ділянку скла, що розташована на 0,1 мм нижче, ніж дві сусідні ділянки. Ці ділянки слугують для притирання покривного скла. У результаті об'єм рідини над квадратом, утвореним малими діленнями сітки Горяєва, складає 0,004 мікролітра.

При роботі з камерою її робочі поверхні повинні бути чистими і сухими. Під час підрахунку клітин суспензії неприпустимо наявність пухирців повітря на сітці камери, оскільки це заважає точності підрахунку.

Підрахунок клітин у суспензії в камері Горяєва в малому квадраті проводився за рівнянням (1):

$$X = \frac{(a * 4000 * y)}{b}, \text{ кл/мкл}$$

де x – шукана кількість клітин у суспензії в 1 мм³; a – сума клітин у суспензії, підрахованих у певному об'ємі камери; b – кількість підрахованих малих квадратів; y – розведення суспензії.

Склад поживних середовищ для культивування

Таблиця 1. Склад живильного середовища Тамія для культивування мікроводоростей

№	Речовина	Концентрація, г/л
1	KNO ₃	5,0

2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,5
3	KH ₂ PO ₄	1,25
4	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,003
5	ЕДТА	0,003
6	Розчин мікроелементів: H ₃ BO ₃ MnCl ₂ ·7H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O MoO ₃ NH ₄ VO ₃	1 мл 2,36 1,81 0,222 0,018 0,023
7	Агар-агар (для густої) не використовуємо	20
8	Вода дистильована	

Таблиця 2. Склад живильного середовища Громова №6 для культивування мікрободоростей

№	Речовина	Концентрація, г/л
1	KNO ₃	1,0
2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
3	KH ₂ PO ₄	0,2
4	NaHCO ₃	0,2
5	CaCl ₂	0,15
6	Розчин мікроелементів: NaBO ₂ ·4H ₂ O MnSO ₄ ·4H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O CuSO ₄ ·5H ₂ O FeSO ₄ ·7H ₂ O Na ₂ ЕДТА (Трилон Б)	1 мл 2,63 1,81 0,222 1,0 0,02 0,079 9,3 10,0
7	Вода дистильована	

Таблиця 3. Склад живильного середовища модифікованого №2 для культивування мікрободоростей

№	Речовина	Концентрація, г/л
1	KNO ₃	1,0
2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2
3	KH ₂ PO ₄	0,2
4	NaHCO ₃	0,2
5	CaCl ₂	0,1
6	Розчин мікроелементів: NaBO ₂ ·4H ₂ O MnSO ₄ ·4H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O CuSO ₄ ·5H ₂ O FeSO ₄ ·7H ₂ O Na ₂ ЕДТА (Трилон Б)	1 мл 2,63 1,81 0,222 1,0 0,02 0,079 9,3 10,0
7	Вода дистильована	

Таблиця 4. Склад живильного середовища модифікованого №3 для культивування мікроводоростей

№	Речовина	Концентрація, г/л
1	KNO ₃	1,0
2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,5
3	NaH ₂ PO ₄	0,5
4	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
5	ЕДТА	0,01
6	Розчин мікроелементів: H ₃ BO ₃ MnCl ₂ ·4H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O NH ₄ VO ₃ CuSO ₄ ·5H ₂ O	1 мл 2,4 2,0 0,3 1,0 0,05 0,1
7	Вода дистильована	

Порядок виконання роботи

1. Приготувати живильні середовища заданого якісного та кількісного складу (див. табл. 1-4) для культивування культури мікроводоростей *C. vulgaris*. Живильне середовище приготувати у кількості 1 л кожного. З цією метою солі по чергові розчинити у окремих стаканах з невеликою кількістю дистильованої води (не більше 10 мл) та послідовно додавати отримані розчини у колбу місткістю 1 л.

2. Розчин мікроелементів об'ємом 50 мл приготувати в окремій колбі за вищезгаданою схемою і додати 1 мл приготованого розчину у колби, з основними компонентами середовища для культивування. Після внесення всіх необхідних компонентів, довести об'єм живильного розчину до 1 л шляхом додавання дистильованої води.

3. З кожного досліджуваного середовища за допомогою мірної піпетки відібрати по 30 мл розчину (у трьох повторностях) і внести до пробірок на 50 мл. Таким чином, отримують по 3 пробірки кожного з чотирьох середовищ (всього 12 пробірок). До кожного середовища додати 10 мл культури мікроводоростей *C. vulgaris*.

4. За допомогою камери Горяєва на мікроскопі за стандартною методикою розрахувати кількість клітин у 10 комірках. Кількість клітин у малому квадраті камери Горяєва обчислюється за рівнянням (без розведення) (2):

$$X = \frac{a * 4000}{c}, \text{ кл/мкл}$$

де X – шукана кількість клітин у суспензії в 1 мкл; a – сума клітин суспензії, підрахована у певному об'ємі камери; c – кількість підрахованих малих квадратів. Вивести середнє значення та записати до таблиці (операцію повторювати щодоби протягом 10 діб).

5. Пробірки закрити ватними пробками і поставити до термостату при температурі 30°C та постійній освітлюваності. Вимірювання приросту біомаси за допомогою камери Горяєва проводити щодоби.

6. Починаючи з 6 доби з одної з 3 пробірок для кожного середовища, відбирати по 5 мл культуральної рідини і ввести по 5 мл свіжого живильного середовища. Розрахувати приріст біомаси протягом 6 діб.

7. Розрахунок питомої швидкості росту культури визначається за рівнянням (3):

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t}, \text{ доби}^{-1}$$

де μ – питома швидкість росту культури, N_0 – кількість клітин на початку культивування, N_t – кількість клітин на даний час, t – час. Середній час генерації клітин визначається за рівнянням (4):

$$g = \frac{\ln 2}{\mu}, \text{ доби}$$

Завдання

1. Спостереження записати до таблиці.
2. Розрахувати швидкість приросту культури та час її подвоєння.
3. Зробити висновки, щодо якісного та кількісного складу культурального середовища та приросту біомаси.
4. Визначити оптимальне середовище для культивування *C. vulgaris*.

Контрольні питання

1. Яка роль феруму та купруму для розвитку та розмноженню мікроводоростей?
2. Проведіть порівняльну характеристику складу жирних кислот у водоростей та олійних рослин.
3. Які елементи живлення необхідні для культивування мікроводоростей і чому?
4. Яка роль магнію та калію для розвитку та розмноженню мікроводоростей впливає температура на приріст біомаси?
5. Як впливає зміна форми джерел живлення на приріст біомаси?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №4. Вплив факторів середовища (освітлення, склад поживного середовища) на приріст біомаси мікроводоростей

Мета: дослідити вплив якісного та кількісного складу поживного середовища та режиму освітлення на процес культивування та приріст біомаси мікроводоростей *C. vulgaris*.

Теоретичні відомості

1. Вплив режиму освітленості, температури, солоності і рН на приріст біомаси мікроводоростей.

2. Вплив мінеральних речовин на приріст біомаси мікроводоростей.

Вплив режиму освітленості, температури, солоності і рН на приріст біомаси мікроводоростей

Світло. Зміна інтенсивності освітлення при культивуванні водоростей призводить до змін біохімічного складу клітин, що пов'язано зі змінами ультраструктур, біофізичних та фізіологічних властивостей спрямованих на урегулювання процесів фотосинтезу та росту клітин. Звичайною реакцією на зменшення інтенсивності або кількості освітлення є збільшення кількості хлорофілу а та інших світлочутливих пігментів. З іншого боку, при зростанні інтенсивності освітлення хлорофіл а та інші пігменти, що прямо задіяні у фотосинтезі зменшують активність, у той час як вторинні пігменти (зеаксантин, β -каротин, астаксантин), що слугують як фотопротекторні агенти, активуються.

Клітинний вміст у ліпідах ненасичених вищих жирних кислот (НВЖК), включно з ейкозопентаєною кислотою (ЕПК), обернено залежить від інтенсивності світла при вирощуванні. Позитивним модулятором загального накопичення ліпідів є знижена інтенсивність світла. Недостатність світла при вирощуванні біомаси клітин мікроводорості виду *Nannochloropsis* сприяє збільшенню кількості полярних ліпідів, що формують клітинну мембрану та мембрани хлоропластів - фосфо- та гліколіпіди, які характеризуються більшими ніж за звичайних умов пропорціями вмісту ЕПК, тоді як насичені ВЖК типу 16:0 і C16:1 ω -7 переважають при зростанні інтенсивності світла. Оскільки НВЖК значною мірою присутні у мембранах тилакоїдів, підвищена їх продуктивність при низькій кількості світла супроводжує зростання площі тилакоїдних мембран у клітині. При надто високій інтенсивності освітлення часом спостерігається збільшення НВЖК, що вірогідно пов'язано із процесом зростання ступеню ненасиченості кислот за відповідних умов, медіатором якого є кисень. Якщо вплив інтенсивності освітлення на процес росту клітин розглядати з урахуванням вмісту основних поживних речовин, виявляється, що висока інтенсивність освітлення при достатньому вмісті нітрогену у поживному середовищі, є позитивним фактором впливу на ріст культури і вміст ліпідів у ній, у той час як при недостатці нітрогену надмірне освітлення призводить до пошкодження (руйнування) клітин водоростей.

Температура. Оптимальною для вирощування *C. vulgaris*, є температура 30°C. Максимальний приріст біомаси, що відповідає 0,5 діб⁻¹, відбувається за температури 32,5°C і при рН у межах 6,31-6,84.

Вплив температури на біохімічні процеси робить її одним з найважливіших зовнішніх факторів, що впливають на біохімічний склад клітин водоростей. Однак, за використання газових викидів і CO₂ як джерело Карбону, потрібно враховувати вплив температурного фактора як на споживання поживних речовин, так і на розчинність газів. В роботах вивчено вплив температурного фактора на кількісний і якісний склад ліпідів. Зменшення температури середовища нижче оптимального рівня призводить до збільшення ступеню ненасиченості ліпідів мембранних систем. Так, вміст ЕПК у *Chlorella* за температури 28°C є нижчим ніж за температури 15-20°C за підтримання сталості інших умов. Підвищення стабільності і текучості клітинних мембран,

особливо тилакоїдних, забезпечує захист фотосинтетичного механізму від фотоінгібування і зниженої температури. Температура, знаходячись на фізіологічно толерантному рівні, здійснює більший вплив на відносний склад ВЖК (ступінь насиченості ланцюгів) у різних класах ліпідів ніж на загальний вміст ліпідів у клітинах. Відомо, що зниження температури нижче оптимального рівня, призводить до зростання активності ферментного синтезу, як адаптивного механізму для підтримки сталого рівня дихання та фотосинтезу. Вплив температури на накопичення ліпідів є також видоспецифічним; так вміст ліпідів у деяких зелених водоростей, наприклад, *Chlorella sorokiniana*, при низькій температурі не підвищується, у той час як для *Chlorella ellipsoidea* спостерігається значний приріст вмісту неполярних ліпідів у біомасі.

Температура також впливає на кількість Карбону і Нітрогену, що необхідно клітинам, і на загальний розмір клітини. Оптимальна температура вирощування може бути причиною невеликого розміру клітин, а зменшення або збільшення температури відносно оптимального рівня призводить до збільшення об'єму клітин. Тобто, за температурних умов відмінних від оптимальних, потребується більше поживних речовин для підтримки того ж рівня приросту клітин.

Солоність. Багато мікрободоростей здатні до накопичення невеликих молекул, як осморегуляторних речовин у відповідь на збільшення солоності навколишнього середовища або осмотичного тиску. З числа таких речовин у водоростей найвагомішими є поліспирти, до яких відносяться гліцерол, манітол, галактітол, сорбітол та ін.

Зростання солоності може спричинити незначне зростання загального вмісту ліпідів, що спостерігається для культур *Monodus subterraneus* і *Dunaliella spp.* Відносний вміст ЕПК щодо загальних кислот за таких умов зменшується.

Найбільш оптимальними умовами для накопичення ліпідів є умови концентрації солей у середовищі на рівні близько 12% (за температури 14,5°C). При цьому за зазначених умов більший рівень накопичення мають насичені низьковуглецеві кислоти, а при відхиленні цього значення зростає відносний рівень ненасичених довголанцюгових кислот.

pH. Оптимальне значення pH для росту *Chlorella* знаходиться у межах 6,31 – 6,84. Екстремальне зростання pH значно уповільнює клітинний цикл *Chlorella*, лімітуючою стадією при цьому є вивільнення автоспор після поділу клітинних ядер.

Зміщення pH у сильнолужну зону сприяє зміні відносного вмісту різних класів ліпідів. Так, загальна кількість ліпідів у клітинах при pH > 11 зменшується, однак, змінюються класи клітинних ліпідів і жирних кислот (ЖК). При значному зменшенні кількості структурних мембранних ліпідів за даних стресових умов у кілька разів підвищується вміст запасних триацилгліцеролів (ТАГ). Паралельно відбувається зростання відносної кількості C16:0 та C18:1 ЖК у складі всіх трьох класів ліпідів та зменшення кількості ненасичених кислот.

Вплив мінеральних речовин на приріст біомаси мікрободоростей

Недостача Нітрогену. Основний лімітуючий фактор росту клітин – Нітроген, як один з основних елементів протеїнів, нуклеїнових кислот, фосфоліпідів, обов'язково повинен надходити до клітин з мінеральними речовинами. Недостача Нітрогену значно уповільнює ріст біомаси культури, водночас з цим спостерігається збільшення вмісту ліпідів і жирних кислот у біомасі. У випадку зниження кількості Нітрогену у клітині нижче порогового значення, фотосинтез все ж продовжується, хоч і на зниженому рівні. За таких умов відбувається перенаправлення потоків Карбону, фіксованого у фотосинтезі, від напрямку синтезу протеїнів до переважаючих напрямків синтезу ліпідів або вуглеводів. Це зумовлено тим, що ферменти синтезу ліпідів менше піддаються катаболізму у порівнянні з ферментами білкового синтезу. Згідно іншій гіпотезі приріст кількості ліпідів за стресових умов вмісту нітрогену у культуральному середовищі розраховується згідно залежності: синтез – споживання, адже за стресових умов призупиняється використання клітинами ліпідів у енергетичних цілях.

На відміну від полярних ліпідів, що утворюються у клітинах з достатнім вмістом Нітрогену, при азотній недостатці домінантними стають триацилгліцерольні нейтральні форми.

Недостача Фосфору. Деякі ознаки нестачі Фосфору у поживному середовищі подібні до тих, що спостерігаються при недостатці Нітрогену. Відбувається зниження вмісту хлорофілу а, у той час, як кількість вуглеводів зростає у еу- та прокаріотичних клітинах. Відомо, що нестача фосфору призводить до накопичення β -каротину в клітинах *Dunaliella* і астаксантину у *Haematococcus*, однак не так помітно, як у випадку дефіциту Нітрогену.

Під час фосфорного голодування клітин водоростей спостерігається накопичення ними значних кількостей ліпідів, у той час як вміст білків, хлорофілу та нуклеїнових кислот зменшується.

Сульфур. За надлишку сполук сульфуру (сульфіду, сульфіту та сульфату натрію) пригнічується швидкість фотосинтезу. Пояснити це можливо тим, що збільшення швидкості циклічного фосфорилування призводить до створення великого пулу фосфорильованих інтермедіатів циклу Кальвіна і сприяє більш інтенсивній роботі білків хлоропластів. Як відомо, циклічне фосфорилування є більш резистентним до дії несприятливих умов середовища, а сполуки сульфуру мають стресову дію. Таку дію можна пояснити імовірним одночасним впливом іонів натрію та сульфуру в різній ступені окиснення на водоокиснюючий комплекс фотосистеми II. При цьому не спостерігається прямої пропорціональності між концентрацією хлорофілу та інтенсивністю фотосинтезу.

Недостача Калію. В умовах недостатці Калію у середовищі, швидкість росту і фотосинтезу спадає, однак прискорюються дихальні процеси. Підвищення концентрації калію у живильному середовищі негативно впливає на приріст біомаси водоростей.

Недостача Феруму. Дефіцит Феруму індукує різні біохімічні зміни. З одного боку, с-фікоціанін і хлорофіл а за даних умов піддаються деградації. З іншого боку, відбувається накопичення специфічного білку *isiA* (англ. iron-stressinduced), що, зв'язуючись з ФС I, утворює комплекс у формі кільця з 18

білкових молекул *isiA* навколо тримера ФС I. Такий комплекс було знайдено у ціанобактерій, у середовищі культивування яких була недостача Феруму. Вважається, що збільшення інтенсивності ФС I досягається завдяки збільшенню гнучкості світлопоглинаючої системи в умовах зменшення ролі фікобілісом.

Манган. Даний мікроелемент необхідний для функціонування деяких ферментів фотосинтезу, а також ключового ферменту синтезу ліпідів ацетил-СоА-карбоксилази. За оптимального рівня вмісту він сприяє синтезу ліпідів.

Практична частина

Матеріали та реактиви: колби на 1 л, стаканчики, скляні палички, піпетки, пробірки на 50 мл, вата, марля, сульфат натрію, сульфат натрію, нітрат натрію, концентрована сульфатна кислота.

Обладнання: термостат, аналітичні ваги, мікроскоп, камера Горяєва, іонометр.

Дослід 1

Порядок виконання роботи

1. У пробірку на 50 мл додати 30 мл середовища, що одержані в попередній лабораторній роботі, та 10 мл суспензії культури мікроводоростей *C. vulgaris*. Дослідження проводити у трьох повторностях.

2. До пробірок згідно таблиці 5 додати речовини у кількості, що наведена.

Таблиця 5. Вихідні дані для проведення експерименту

Середовище	pH	№ пробірки	Додана речовина	Концентрація, г/л
Середовище Тамія		1	Контроль	0
		2	Na ₂ SO ₃	2 г/л
		3	Na ₂ SO ₃	1 г/л
Середовище Громова		1	Контроль	0
		2	H ₂ SO ₄	2 г/л
		3	H ₂ SO ₄	1 г/л
Середовище модифіковане №2		1	Контроль	0
		2	NaNO ₃	2,5 г/л
		3	NaNO ₃	1,25 г/л
Середовище модифіковане №3		1	Контроль	0
		2	Na ₂ SO ₄	2 г/л
		3	Na ₂ SO ₄	1 г/л

3. За допомогою іонометру виміряти pH та записати до таблиці. Значення pH вимірювати щодоби.

4. За допомогою камери Горяєва на мікроскопі за стандартною методикою розрахувати кількість клітин у 10 комірках. Кількість клітин у малому квадраті камери Горяєва обчислюється за формулою (2) (без розведення). Вивести середнє значення та записати до таблиці (операцію повторювати щодоби протягом 8 діб).

5. Пробірки закрити ватними пробками і поставити до термостату при температурі 30°C та постійній освітлюваності.

Дослід 2

Порядок виконання роботи

1. У пробірку на 50 мл додати 30 мл середовища, що одержані в лабораторній роботі №1, та 10 мл суспензії культури мікроводоростей *C. vulgaris*.

2. До пробірок згідно таблиці 5 додати речовини у кількості, що наведена.

3. За допомогою іонометру виміряти рН та записати до таблиці. Значення рН вимірювати щодоби.

4. За допомогою камери Горяєва на мікроскопі за стандартною методикою розрахувати кількість клітин у 10 комірках. Значення вносити до таблиці.

5. Пробірки закрити ватними пробками і поставити до термостату при температурі 30°C та освітлюваності 12x12 – 5 діб, 8x8 – 5 діб, 4x4 – 5 діб.

6. Починаючи з 5 доби з пробірок для кожного середовища, відбирати по 5 мл культуральної рідини і вводити по 5 мл свіжого поживного середовища.

7. Розрахувати приріст біомаси при різній освітлюваності за формулами, що наведені в лабораторній роботі №3.

Завдання

1. Значення рН, концентрації клітин для усіх дослідів занести до таблиці.

2. Розрахувати приріст клітин та час подвоєння клітин для кожного середовища та кожного параметра освітлюваності.

3. Зробити висновки щодо впливу сполук сульфуру та нітрогену і режиму освітлюваності на приріст біомаси водоростей. Визначити оптимальні умови вирощування.

Контрольні питання

1. Вплив режиму освітлюваності на приріст біомаси водоростей.

2. Поясніть, на які процеси у мікроводоростях впливає освітлюваність.

3. Як освітлюваність впливає на біосинтез ліпідів та їх якісний склад?

4. Вплив сполук нітрогену на біосинтез жирних кислот та їх якісний склад.

5. Вплив сполук сульфуру на біосинтез та якісний склад жирних кислот у мікроводоростей.

6. Вплив температури на якісний склад жирних кислот мікроводоростей.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №5. Виділення ліпідів з мікроводоростей

Мета: провести екстракцію ліпідів з біомаси зелених мікроводоростей та визначити їх вміст в перерахунку на одиницю сухої біомаси.

Теоретичні відомості

1. Порівняльна характеристика складу жирних кислот у водоростей та олійних рослин.
2. Біосинтез жирних кислот та фосфоліпідів у мікрowodоростях.
3. Методи екстракції ліпідів з мікрowodоростей.

Порівняльна характеристика складу жирних кислот у водоростей та олійних рослин

Жирні кислоти є важливими компонентами ліпідів, які виконують структурні та енергетичні функції в клітинах рослин і мікрowodоростей. Склад жирних кислот у водоростей та олійних рослин має свої особливості, обумовлені їхнім середовищем існування та функціональними вимогами.

Мікрowodорості містять ліпіди і ЖК, як мембранні компоненти, запасні речовини, метаболіти і джерела енергії. До складу цитоплазматичної мембрани входять переважно лише фосфоліпіди, у той час, як гліколіпіди формують мембрану внутрішньоклітинних органел. Єдиним фосфоліпідом, що входить до складу цих органел є фосфатидна кислота. Енергетичну і запасну функції виконують нейтральні ТАГ, що знаходяться у цитоплазмі у вигляді вкраплень. Відомо, що деякі види водоростей здатні накопичувати велику кількість ліпідів (понад 30%) у залежності від середовища культивування. Наприклад, *Chlorella sp.*, *Botryococcus braunii* та *Dunaliella salina*, що відносяться до відділу зелених водоростей, класу вольвоксових, за нормальних умов культивування мають наступний компонентний склад: 30–50% білки, 20–40% вуглеводи, 8–15% ліпіди. Однак, за несприятливих умов ці види можуть акумулювати до 80% АГ, 80% вуглеводів і до 40% гліцеролу у перерахунку на суху вагу. Тобто, фактори зовнішнього середовища, такі як світло, температура, вміст поживних речовин і солоність впливають не лише на фотосинтез і продуктивність біомаси клітин, а й на шляхи і активність клітинного метаболізму, призводячи до змін якісного і кількісного складу клітин.

Мікрowodорості, як правило, мають широкий спектр жирних кислот, серед яких переважають ненасичені жирні кислоти, такі як ЕПК (20:5) і докозагексаєнова кислота (ДГК, 22:6), характерні для морських водоростей. Вони містять значну кількість поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) з довгими ланцюгами, що надає їм особливі біологічні властивості. Високий вміст таких ПНЖК забезпечує гнучкість мембран і адаптацію до низьких температур. Прісноводні водорості також містять α -ліноленову (18:3) та лінолеву (18:2) кислоти, які є важливими попередниками для синтезу більш складних ПНЖК.

Олійні рослини, такі як соняшник, ріпак, соя, льон та оливка, мають свій специфічний профіль жирних кислот, який обумовлює їхні харчові та промислові властивості. У більшості олійних культур домінують мононенасичені жирні кислоти, наприклад, олеїнова кислота (18:1), або поліненасичені жирні кислоти, такі як лінолева кислота (18:2) і α -ліноленова кислота (18:3). Наприклад, соняшникова олія багата на лінолеву кислоту, а оливкова — на олеїнову, що робить їх придатними для різних харчових потреб.

У той час як насичені жирні кислоти, такі як пальмітинова (16:0) і стеаринова (18:0), присутні в олійних рослинах у менших кількостях.

Мікрородорості можуть накопичувати значно більше ліпідів (до 50-60% від сухої маси) порівняно з олійними рослинами (зазвичай 15-30%). У багатьох видів мікрородоростей високий вміст тригліцеридів — основної сировини для виробництва біодизеля. Наприклад, *Nannochloropsis*, *Chlorella* та *Botryococcus braunii* здатні накопичувати великі обсяги ліпідів у вигляді нейтральних жирів за умов стресу (наприклад, при нестачі азоту).

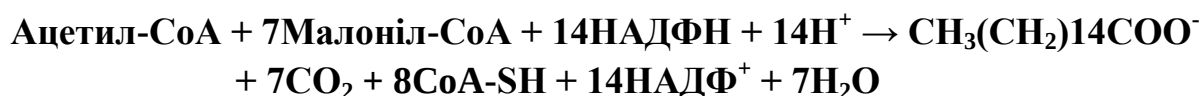
З точки зору виходу біомаси, мікрородорості також мають перевагу, оскільки вони можуть продукувати біомасу зі швидкістю, вищою за олійні рослини, на порядок. Крім того, водорості можна вирощувати у відкритих ставках або спеціальних біореакторах, що дозволяє ефективніше використовувати обмежені ресурси, такі як земля та вода.

Біосинтез жирних кислот та фосфоліпідів у мікрородоростях

Особливості біосинтезу ліпідів у водоростей, на відміну від вищих рослин, полягають у тому, що клітини перших є недиференційованими, а отже кожна клітина біомаси має однаковий потенціал синтезу і накопичення необхідних речовин під впливом зовнішніх умов і поживного середовища. Ліпіди вищих рослин накопичуються головним чином у репродуктивних органах (насінні або фруктах). Окрім того, для клітин водоростей властивим є накопичення у значних кількостях довголанцюгових поліненасичених ЖК, таких як ейкозапентаєнова (C20:5 ω 3), докозагексаєнова (C22:6 ω 3) і арахідонова (C20:4 ω 6). Рослини ж здатні синтезувати ЖК з довжиною ланцюга більше за C18 у досить обмеженій кількості, а деякі поліненасичені кислоти (C16:4 δ -7, C18:3 δ -5, C18:4 δ -5) взагалі для них не властиві.

Синтез жирних кислот у водоростей головним чином відбувається у хлоропластах. Загальна схема біосинтезу показана на рис. 7. ЖК використовуються як попередники в утворенні структурних елементів хлоропластів, клітинних мембран так само і нейтральних запасних ліпідів, переважно триацилгліцеридів, що можуть накопичуватись за несприятливих умов росту відповідних мікроорганізмів.

На початку шляху синтезу ацетил-СоА включається як субстрат ферменту ацетил-СоА карбоксилази (реакція 1). Новоутворений малоніл-СоА активується шляхом заміни коферменту А на ацилпереносний білок (АПБ). Далі малоніл-АПБ приймає участь у ряді реакцій конденсації з кожним оборотом циклу, при цьому довжина ланцюга збільшується на два атоми карбону. В цілому, сумарна реакція синтезу ЖК є загальною як для вищих рослин, так і для водоростей і у випадку пальмітинової кислоти C16 виглядає наступним чином (5):



Джерелом ацетил-СоА для даного процесу є мітохондріальний пул, що формується переважно у ході процесів окиснення різних органічних речовин. Відомо, що мітохондріальна мембрана не проникна для молекул ацетил-СоА. Перенесення ацетил-СоА через мембрану відбувається за допомогою

спеціального механізму, за яким внутрішній мітохондріальний ацетил-СоА спочатку реагує з оксалоацетатом, утворюючи цитрат (6):

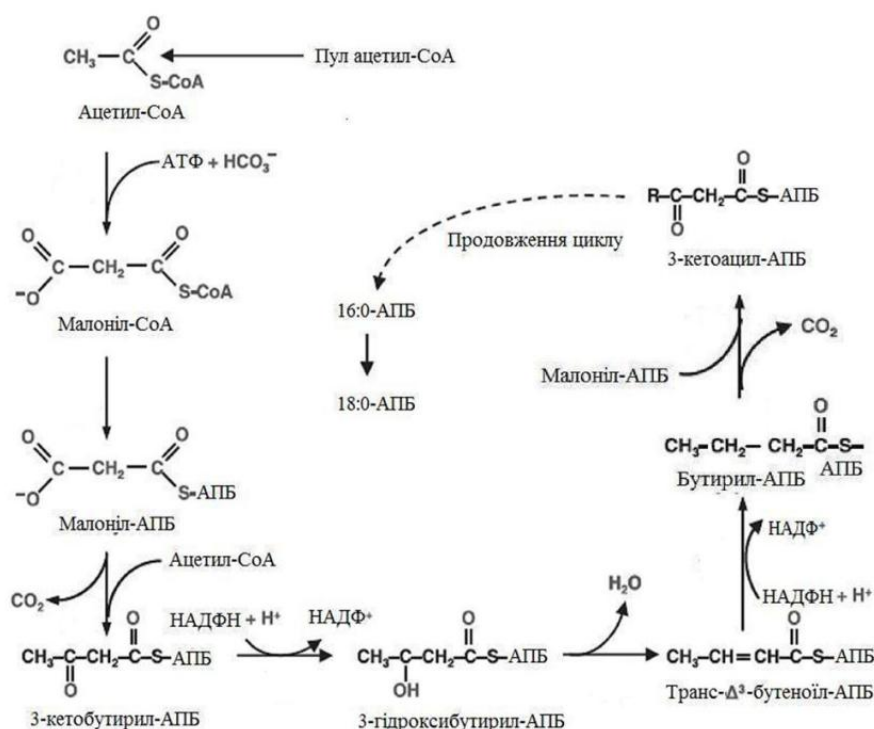


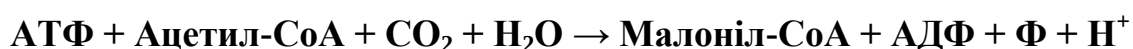
Рис. 7. Шлях синтезу жирних кислот у хлоропластах

Цитрат, що утворився, переноситься через внутрішню мембрану мітохондрій з матриксу в цитозоль за допомогою спеціальної трикарбоксилат-транспортуючої системи. Далі цитрат реагує з СоА і АТФ в цитозолі, утворюючи цитозольний ацетил-СоА. Ця реакція каталізується АТФ-цитратліазою (7):



Утворений у ході реакції оксалоацетат, не може надійти назад всередину мітохондрії. Він відновлюється під дією цитозольної малатдегідрогенази до малату, який за допомогою дикарбоксилат-транспортної системи повертається в мітохондріальний матрикс, де знову окислюється до оксалоацетату, завершуючи цикл.

Утворений у цитозолі ацетил-СоА піддається карбоксилюванню, внаслідок чого утворюється малоніл-СоА – безпосередній попередник 14 з 16 вуглецевих атомів в молекулі пальмітинової кислоти. Цю необоротну реакцію каталізує ацетил-СоА-карбоксилаза (8):



Ацетил-СоА-карбоксилаза – регуляторний фермент. Реакція, що каталізується цим ферментом, є лімітуючим етапом, що визначає швидкість всього процесу біосинтезу жирних кислот. Для перебігу стадії транскарбоксилювання необхідна присутність Mn^{2+} зв'язаного з білком

Головним позитивним модулятором ацетил-СоА-карбоксилази є цитрат, що ініціює перехід ферменту у високоактивний ниткоподібний полімер. Як тільки вміст цитрату в мітохондріях збільшується, що спостерігається при високій швидкості утворення мітохондріального ацетил-СоА і АТФ, цитрат виходить з мітохондрій і виступає одночасно в ролі попередника цитозольного ацетил-СоА і алостеричного активатора ацетил-СоАкарбоксилази.

Утворена кислота у виді ацил-АПБ або сполучається з гліцерол-3-фосфатом і далі включається в ланцюжок утворення пластидних ліпідів, або гідролізується і утворює ліпіди цитоплазматичної мембрани.

Біосинтез тригліцеридів та фосфогліцеридів представлений на рис. 8:

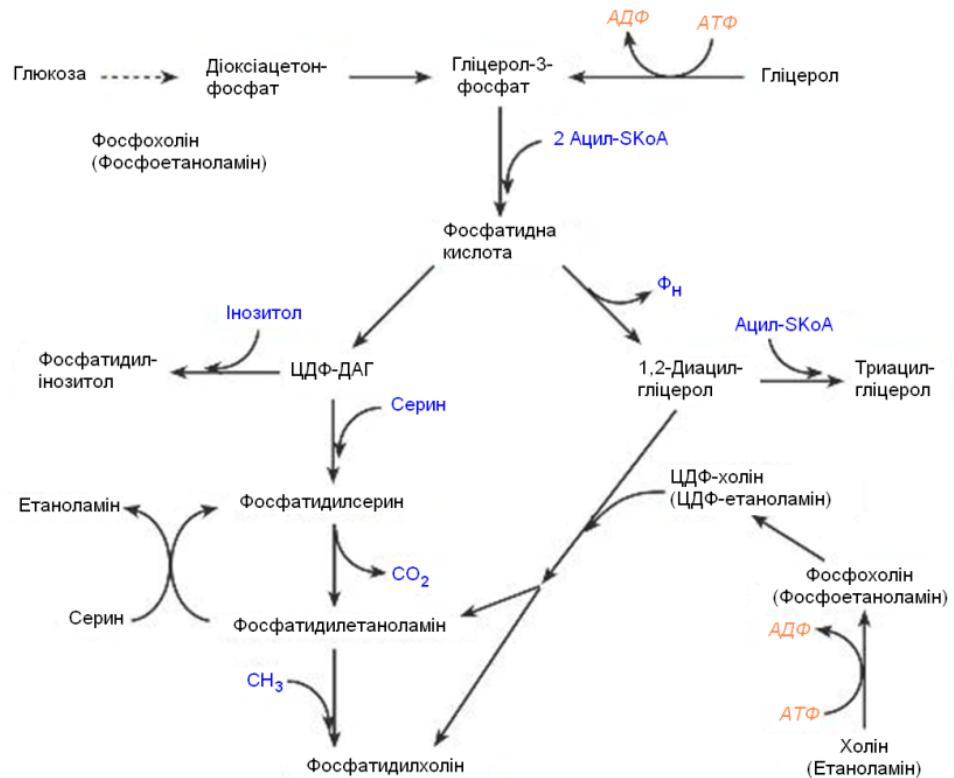


Рис. 8. Загальна схема реакцій синтезу триацилгліцеролів і фосфоліпідів (ЦДФ-ДАГ – цитидиндифосфат-диацилгліцерол, ЦДФ-холін – цитидиндифосфат-холін, ЦДФ-етаноламін – цитидиндифосфат-етаноламін)

Початкові реакції синтезу триацилгліцеролів і фосфоліпідів подібні і відбуваються за наявності гліцеролу і жирних кислот. У реакціях біосинтезу можна виділити наступні стадії:

1. Утворення гліцерол-3-фосфату через діоксиацетонфосфат з глюкози або при фосфорилуванні вільного гліцеролу.

2. Біосинтез фосфатидної кислоти - за наявності гліцерол-3-фосфату і жирних кислот. При зв'язуванні гліцерол-3-фосфату з жирними кислотами синтезується фосфатидна кислота. Далі фосфатидна кислота може перетворюватися двома шляхами - в цитидиндифосфат-диацилгліцерол або дефосфорильованого до 1,2-диацилгліцерол (далі -1,2-ДАГ).

3. Синтез триацилгліцеролів іде з 1,2-ДАГ після дефосфорилювання фосфатидної кислоти. Утворений 1,2-ДАГ ацилюється до триацилгліцеролу (далі – ТАГ).

4. Синтез фосфоліпідів. Зараз розглядаються два шляхи синтезу фосфоліпідів.

По одному шляху 1,2-ДАГ не перетворюється на ТАГ, а зв'язується з етаноламіном з утворенням фосфатидилетаноламіну, або з холіном – утворюється фосфатидилхолін.

Іншим шляхом, ЦДФ-ДАГ зв'язується або з інозитолом, або з серином з утворенням відповідно фосфатидилінозиту або фосфатидилсерину.

При декарбоксилюванні фосфатидилсерину, утворюється фосфатидилетаноламін, який може перетворитися, у свою чергу, в фосфатидилхолін.

Синтезований будь-яким способом фосфатидилетаноламін також здатний взаємодіяти з серином і утворювати фосфатидилсерин.

Таким чином, кожен з основних фосфоліпідів – фосфатидилсерин, фосфатидилетаноламін, фосфатидилхолін – здатний надходити з різних джерел, що сприяє підтримці необхідного балансу.

Прісноводні водорості найчастіше містять ті ж самі жирні кислоти, що й вищі рослини, проте в інших співвідношеннях. Більшість жирних кислот у цих водоростей зазвичай є нерозгалуженими з парним числом атомів вуглецю – від 14 до 18. Для прісноводних водоростей характерні вищий вміст С16 жирних кислот і нижчий – С18 кислот (особливо α -ліноленової), ніж у листі вищих рослин. Морські ж види переважно відзначаються набагато ширшим спектром жирних кислот, ніж прісноводні водорості. Вони містять велику кількість відмінних від α -ліноленової кислоти полієнових жирних кислот.

Методи екстракції ліпідів з мікроводоростей

Для екстракції ліпідів з біологічного матеріалу використовують систему, що включає неполярний і полярний розчинники. З клітин водоростей ліпіди екстрагують з вологих клітин за методикою Блая і Дайера (Bligh & Dyer).

Залежно від полярності розчинника ліпіди (а саме полярні фосфоліпіди) поведуть себе неоднаково на межі розділу фаз органічна речовина – вода. Таким чином змінюється і ступінь екстракції. В табл. 6 наведено розчинники, які використовуються для екстракції.

Оскільки молекули фосфоліпідів мають амфіфільну природу, то їх полярні «голови» у неполярних або слабополярних розчинниках (гексан, діетиловий ефір) знаходяться у воді. Окрім того, у гексані навіть вуглеводневі «хвости» фосфоліпідів знаходяться не в органічній фазі, а у прилеглому шарі. У діетилового ефіру полярність вища (2,9), ніж у гексану, тому неполярні «хвости» фосфоліпідів знаходяться в органічній фазі, а полярна частина знаходиться або на межі розподілу двох фаз (що не гідратується), або у водній фазі (що гідратується). Розчинність бутанолу у воді найвища зі всіх досліджуваних розчинників, тому всі фосфоліпіди, незалежно від того, гідратуються вони або ні, переходять в органічну фазу.

Таблиця 6. Розчинники для екстракції ліпідів

Розчинник	Полярність	Густина, г/см ³	Розчинність у воді, мас. %	Вміст ліпідів в екстракті, мг/100 мл
Гексан	0	0,6590	0,01	52,4
Діетиловий ефір	2,9	0,7135	7,5	84,88
Бутанол	3,9	0,8096	7,9	73,84
Хлороформ	4,3	1,4890	0,82	74,52
Хлороформ етанол	4,84	-	-	169,12

У хлороформі всі види фосфоліпідів добре розчинні, тому велика частина їх міститься в органічній фазі, проте у водному шарі залишаються фосфоліпіди, що здатні до гідратації.

Методика, запропонована Блайом і Дайером може легко використовуватися для біоматеріалу, який містить відносно малу кількість ліпідів і великі пропорції води. Суміш хлороформу і метанолу дозволяє розчинити широкий спектр ліпідів. Ця система придатна для екстракції як полярних, так і неполярних ліпідів. Оптимальні умови для екстракції є тоді, коли суміш розводять водою, оскільки утворюється двофазна система. Нижній шар хлороформу містить ліпіди, верхній метанол-водний шар акумулює неліпідні компоненти. Зменшення кількості ліпідів у верхній фазі можна досягти використанням насиченого водного розчину солі, наприклад NaCl, замість дистильованої води.

Дана методика не передбачає гомогенізації клітин мікробдоростей, оскільки вони легко розпадаються при контакті з розчинниками для екстракції. Метод екстракції ліпідів неполярними розчинниками може застосовуватись як автономно, так і у поєднанні з виділенням олій на пресі. Після віджиму залишки біомаси промиваються циклогексаном. Ліпіди розчиняються в органічному розчиннику, а біомаса відфільтровується. Далі розчин розділяється шляхом дистиляції. Дана методика (холодний віджим і розчинення в гексані) дозволяє отримати вихід олій до 95% від загального вмісту.

Практична частина

Матеріали та реактиви: хлороформ, метанол, дистильована вода, кристалічний хлорид натрію, пробірки для центрифугування, скляна лійка, скляні бюкси, фільтрувальний папір, гумові пробки, піпетки або шприци, колба на 100 мл, стакани на 100 мл.

Обладнання: центрифуга, аналітичні ваги, годинник.

Порядок виконання роботи

1. Необхідну кількість бюксів помити, висушити, пронумерувати та довести до сталої ваги (замість бюксів можна використовувати центрифужні пробірки). Зважування проводити на аналітичних терезах. Відповідні значення занести до таблиць 7 та 8.

2. Приготувати суміш розчинників, що складається з 10 мл хлороформу та 20 мл метанолу.

3. Приготувати водний розчин NaCl: Зважити 5 г сухого NaCl та внести наважку до мірної колби на 100 мл. Долити невелику порцію води та перемішати до повного розчинення наважки солі. Розчин довести до мітки дистильованою водою.

4. Суспензію мікроводоростей, що одержана в попередніх лабораторних роботах за оптимальних умов росту, піддають центрифугуванню при частоті обертання 2500 об/хв. Процес проводять періодами по 10-15 хв до переважного осадження клітин біомаси, що контролюється візуально. Після повного осадження клітин обережно зливають рідину над осадом. За необхідності в цю саму пробірку додати наступну порцію суспензії клітин і повторювати центрифугування до отримання необхідної кількості біомаси.

5. Отриману біомасу з пробірки ретельно переносять до відповідного попередньо зваженого бюксу. Для повного перенесення можна використати невелику кількість води. 52асово вологою біомасою сушать у сушильній шафі за температури 105-115°C до сталої ваги. Зважування проводити на аналітичних терезах. Відповідні значення занести до таблиці 7 та розрахувати сухий залишок біомаси за рівнянням (9):

$$m_c = m_{b+c} - m_b$$

Пояснення позначень наведені в таблиці 7.

Таблиця 7. Дані для розрахунку сухої маси сировини для екстрагування

№ бюксу	Середовище, на якому зростала культура мікроводоростей	Маса сухого порожнього бюксу, (m_b), г	Маса бюксу з висушеною біомасою водоростей (m_{b+c}), г	Сухий залишок сировини для екстрагування, (m_c), г

6. Після останнього зважування біомаси клітин до бюксу додають 5 мл суміші розчинників. Бюкс закривають, енергійно струшують протягом 5 хв та дають відстоятися протягом не менш, ніж 12 годин. За цей час суха біомаса, що залишилась на стінках бюксу протягом сушіння, під дією суміші розчинників осяде.

7. Після відстоювання вміст бюксу перелити до пробірки для центрифугування. Кілька разів обполоскати бюкс порціями суміші розчинників по 2 мл за раз. Змив зливати до пробірки, де міститься перша порція екстракту. Вміст пробірки енергійно струсити. Екстракт центрифугувати періодами по 10-15 хв за частоти обертання 2000 об/хв до повного осадження біомаси, яке контролюється візуально.

8. Після центрифугування рідку фракцію перелити до нового чистого бюксу. До залишку біомаси додати ще 2 мл суміші розчинників та знову центрифугувати. Супернатант перелити в пробірку до першої порції надосадової рідини. Залишкову біомасу зберегти для подальшого використання.

9. До бюксу з освітленим екстрактом додати 3 мл водного розчину NaCl, закрити його, енергійно струсити та дати відстоятися до зникнення помутніння у нижній, темно-зеленій фракції. Відбулося вилучення водорозчинних компонентів з хлороформно-метанольного екстракту та їх перехід до водного розчину NaCl.

10. Після цього обережно шприцом вилучити з бюксу водну фракцію

11. Бюкси з очищеним екстрактом ліпідів поставити до сушильної шафи. Висушування проводити за температурного режиму 105-115°C до сталої ваги. Зважування проводити на аналітичних терезах. Результати занести до таблиці 8. Масу сухого залишку ліпідів розраховуємо зарівнянням (10):

$$m_{\text{л}} = m_{\text{б+л}} - m_{\text{б}}$$

Пояснення до позначень наведені в таблиці 8.

Таблиця 8. Дані для розрахунку сухої маси ліпідів

№ бюксу	Примітка	Маса сухого порожнього бюксу, ($m_{\text{б}}$), г	Маса бюксу з сухим залишком ліпідів, ($m_{\text{б+л}}$), г	Маса сухого залишку ліпідів, ($m_{\text{л}}$), г

12. Розрахункові дані щодо сухого залишку клітинного матеріалу та отриманої маси ліпідів внести до таблиці 9 та розрахувати відсотковий вміст ліпідів у сухому матеріалі зарівнянням (11):

$$\omega = \left(\frac{m_{\text{с}}}{m_{\text{л}}} \right) * 100\%$$

Таблиця 9. Дані для розрахунку та результат розрахунку відносного вмісту ліпідів у сировині

Середовище на якому культивувалась біомаса водоростей	Сухий залишок сировини для екстрагування, ($m_{\text{с}}$), г	Маса сухого залишку ліпідів, ($m_{\text{л}}$), г	Вміст ліпідів у сухому залишку, ω , %

Завдання

1. Розрахувати вміст ліпідів у сухій біомасі мікроводоростей та зробити висновки щодо зміни кількісного складу ліпідів в залежності від умов культивування (вмісту поживних речовин та режиму освітлюваності).

2. Визначити оптимальні умови культивування для одержання максимальної кількості ліпідної фракції.

Контрольні питання

1. Як впливають різні сполуки сульфуру на кількісний вміст ліпідів у мікроводоростях?
2. Який вплив мають сполуки нітрогену на кількісний вміст ліпідів у культурах мікроводоростей?
3. Як елементи живлення впливають на кількісний вміст ліпідів у мікроводоростях?
4. Який вплив має режим освітлення на кількісний вміст ліпідів у мікроводоростях?
5. Які методи вилучення ліпідів з мікроводоростей використовуються в лабораторних умовах?
6. Які методи застосовуються для відділення мікроводоростей від культуральної рідини?
7. Як відбувається біосинтез жирних кислот та фосфоліпідів у мікроводоростях?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №6. Аналіз ліпідної фракції

Мета: проаналізувати склад ліпідної фракції за допомогою одновимірної та двовимірної тонкошарової хроматографії.

Теоретичні відомості

1. Порівняльна характеристика складу жирних кислот у мікроводоростей та олійних рослин.
2. Жирнокислотний склад мікроводоростей різних таксономічних груп.
3. Методи дослідження ліпідного складу.

Порівняльна характеристика складу жирних кислот у мікроводоростей та олійних рослин

Природа залишків жирних кислот, що входять до складу гліцероліпідів мікроводоростей, є надзвичайно важливою як для виконання ліпідами їх функцій, так і для комерційного застосування водоростей. З точки зору жирнокислотного складу, водорості є об'єктами з унікальним біотехнологічним потенціалом. Якщо до складу ліпідів вищих рослин входить переважно невелика кількість жирних кислот (до 7-8), то мікроводорості часто мають набагато різноманітніший набір насичених і ненасичених вищих карбонових кислот з довжиною ланцюга від 12 до 28 атомів Карбону. В табл. 10 наведено склад жирних кислот рослинних олій та мікроводоростей.

Таблиця 10. Жирнокислотний склад (% сумарної кількості жирних кислот) соєвої і пальмової олій, а також водоростей

Жирні кислоти	Соєва олія	Пальмова олія	Водорості
Каприлова (8:0)		9,7	
Капринова (10:0)		7,5	
Лауринова (12:0)		42,1	
Міристинова (14:0)		22,4	9,1
Пальмітинова (16:0)	14,69	18,2	36,6

Пальмітоолеїнова (16:1)			11,9
Маргарінова (17:0)			0,89
Стеаринова (18:0)			2,7
Олеїнова (18:1)	5,4		6,7
Лінолева (18:2)	26,8		7,4
Ліноленова (18:3)	44,4		22,3
Арахідова (20:0)	8,0		
Арахідонова (20:4)	0,35	0,14	0,65
Ейкозапентаєнова (20:5)			0,08
Бегенова (22:0)	0,33		
Насичені	20,77		49,29
Ненасичені	52,4	100,04	30,43

З насичених жирних кислот у складі водоростей переважає пальмітинова кислота, з ненасичених – пальмітоолеїнова (16:1) і ліноленова (18:3). Загальна ненасиченість жирних кислот ліпідів мікрowodоростей значно вища, ніж у пальмової олії, але поступається соєвій олії.

Європейський стандарт EN 14214 чітко обмежує вміст ліноленової кислоти, який має бути не більшим 12%. Крім того, в цьому стандарті зазначається, що кількість поліненасичених естерів з числом подвійних зв'язків ≥ 4 має бути не більше одного відсотка. Це пов'язано із нестійкістю таких сполук і легкістю їх окиснення.

Деякі мікрowodорості здатні запасати досить велику кількість ліпідів у формі триацилгліцеролів (до 57% сумарних ліпідів), які відкладаються в цитоплазмі у вигляді великих крапель. У здорових клітинах, що активно діляться, частка тригліцеридів у загальній кількості ліпідів зазвичай є низькою. Однак перехід водоростей у стаціонарну фазу росту чи вплив деяких стресових чинників може стимулювати накопичення тригліцеридів. Посилений синтез триацилгліцеролів 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 клітини. При цьому кількість тригліцеридів може сягати до 80% від загального вмісту ліпідів. Для прокаріотичних синьоzielених водоростей не властиве запасання ліпідів у формі триацилгліцеролів; практично всі їх жирні кислоти входять до складу полярних ліпідів, які утворюють велику систему фотосинтетичних мембран.

Головною насиченою кислотою ліпідів мікрowodоростей у певних випадках може бути міристинова, проте в більшості випадків такою є пальмітинова кислота. Ліпідам водоростей здебільшого притаманний високий вміст ненасичених жирних кислот, які можуть мати від 1 до 6 (інколи до 8) подвійних зв'язків. При порівнянні з вищими рослинами увагу привертає наявність у водоростей тетраєнових C16 і C18 кислот. Довголанцюгові жирні кислоти (C20 і більше) зустрічаються в основному в галотолерантних видах і переважно є високоненасиченими.

Окремі види чи порядки мікрowodоростей накопичують такі незвичні сполуки, як бетаїнові ліпіди, хлоросульфоліпіди чи деякі інші сульфоліпіди, вуглеводні, частково деацильовані або, навпаки, додатково ацильовані похідні гліко- і фосфоліпідів. Певні мікроорганізми можуть містити глікозильовані похідні вищих полігідроксиспиртів чи полігідроксикарбонових кислот, вільні

(неестерифіковані) жирні кислоти, вищі спирти, диацилгліцероли, сфінголіпіди, стероли й естери стеролів, естери воску, арсенвмісні ліпіди тощо. Під визначення ліпідів підпадають також хінони, токофероли та зелені пігменти водоростей – хлорофіли.

Більшість жирних кислот використовується водоростями для побудови мембран і синтезу ефірів. Наприклад, мембрани хлоропластів збагачені глікозилгліцеридами, тоді як плазматична та ендоплазматична мембрани збагачені фосфоліпідами. Жирні кислоти з непарним числом атомів вуглецю (наприклад, 15:0, 17:0, 17:2n-5) і розгалужені жирні кислоти (ізостеаринова та інші) можуть зустрічатися в окремих видах водоростей як міnorні компоненти.

Насичені та ненасичені жирні кислоти значно відрізняються за конфігурацією. У насичених кислотах вуглеводневий ланцюг може приймати безліч конформацій завдяки повній свободі обертання навколо кожного окремого зв'язку. Однак найбільш вірогідною є енергетично вигідніша витягнута форма. У ненасичених кислотах неможливе обертання навколо подвійних зв'язків, що обумовлює жорсткий перегин вуглеводневого ланцюга. Такі структурні властивості ланцюгів жирних кислот мають велике біологічне значення, оскільки відомо, що ненасичені жирні кислоти забезпечують високу плинність і вибірку проникність мембранного бішару.

Жирнокислотний склад мікроводоростей різних таксономічних груп

Якісний і кількісний склад жирних кислот еукаріотичних мікроводоростей є надзвичайно різноманітним. У евгленових водоростей якісний склад залежить навіть від типу живлення. Культури, що фотосинтезують, містять жирні кислоти від C14 до C22 з переважанням C16 і C18 кислот. Червоні водорості багаті на ненасичені довголанцюгові жирні кислоти, головним чином C20 – ейкозапентаєнову та арахідонову. До типових жирних кислот діатомових та еустигматофітових водоростей відносяться міристинова, пальмітинова, пальмітоолеїнова та ейкозапентаєнова; при цьому вміст C18 кислот здебільшого є низьким. Зелені водорості здебільшого мають подібний до вищих рослин та оліїстих дріжджів жирнокислотний склад – з домінуванням C16 і C18 кислот, як насичених, так і ненасичених. Кілька видів містить багато ейкозапентаєнової кислоти.

Прісноводні водорості найчастіше містять ті ж самі жирні кислоти, що й вищі рослини, проте в інших співвідношеннях. Більшість жирних кислот у цих водоростей зазвичай є нерозгалуженими, з парним числом атомів вуглецю – від 14 до 18. Для прісноводних водоростей характерні вищий вміст C16 жирних кислот і нижчий C18 кислот (особливо α -ліноленої), ніж у вищих рослинах. Морські ж види переважно відзначаються набагато ширшим спектром жирних кислот, ніж прісноводні водорості; помітною їх ознакою є велика кількість відмінних від α -ліноленої кислоти полієнових жирних кислот.

Жирнокислотний склад ліпідів мікроводоростей може дуже змінюватись при варіюванні умов культивування. Так, зниження температури культивування, так само як і підвищення рівня освітленості, призводить до зростання частки ненасичених жирних кислот у хімічному складі водоростей. Ненасичені жирні кислоти мають меншу теплоту згорання, оскільки у них

менша спорідненість до кисню (при зберіганні вони легше окиснюються). Натомість використання лише насичених жирних кислот підвищує температуру замерзання біодизелю, що ускладнює його використання за низьких температур. Жирнокислотний склад ліпідів також залежить від їх таксономічного положення. Так, кількісно головною жирною кислотою прокаріотичних синьозелених водоростей (ціанобактерій) є пальмітинова (16:0). Довжина ацильних ланцюгів у гліцероліпідах синьозелених водоростей не перевищує 18 атомів вуглецю. На основі жирнокислотного складу синьозелені водорості поділяють на 4 групи. Штами першої групи містять лише насичені та моноєнові жирні кислоти, а трьох інших – ще й полієнові: другої – ́ліноленову (18:3n-3) і лінолеву (18:2n-6), третьої – γ-ліноленову (18:3n-6) і лінолеву, четвертої – стеаридонову (18:4n-3), обидва види ліноленової та лінолеву. *C. vulgaris* містить полієнові жирні кислоти, які відносяться до другої групи.

Накопичення ліпідів у водоростей відбувається зазвичай у період стресу та при дефіциті поживних речовин. Вміст ліпідів і жирних кислот варіює у відповідності до умов культивування. У деяких випадках вміст ліпідів може збільшуватись внаслідок азотного голодування та інших стресів. При цьому метаболізм змінюється в бік підвищення акумуляції нейтральних ліпідів у вигляді ТАГ, які не виконують жодних структурних функцій, а є формою запасання вуглецю та енергії. Згідно біохімічних досліджень вважається, що ацетил-СоА-карбоксилаза – біотинвмісний фермент, що каталізує ранні стадії синтезу жирних кислот і може приймати участь у контролі процесу накопичення ліпідів. Тому одним із способів підвищення олійності водоростей є збільшення активності цього ферменту методами генетичної інженерії. Водорості містять від 2 до 40% ліпідів / жирних кислот від їх маси. Найбільша їх кількість знайдена у *Prymnesium parvum*, *C. vulgaris* та *Scenedesmus dimorphus*, що дає можливість застосовувати їх для промислового виробництва біодизельного пального або біологічно активних речовин (БАР) (табл. 11).

Таблиця 11. Хімічний склад водоростей, % від сухої маси

Вид	Білки	Вуглеводи	Ліпіди	Нуклеїнові к-ти
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14	3-6
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	47	-	1.9	-
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40	-
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirogyra</i> sp.	6-20	33-64	11-21	-
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8	-
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6	-
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20	-
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-38	1-2
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3	-
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14	-
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5

<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4.5
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11	5
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7	-

Вміст жирних кислот у межах одного і того ж виду може істотно відрізнятися у різних класів ліпідів. Запасні ліпіди, такі як триацилгліцероли, часто містять набагато менше ПНЖК, ніж полярні гліцероліпіди. З полярних ліпідів МГДГ звичайно має найвищий ступінь ненасиченості жирнокислотних залишків, а СХДГ – найменший. Вміст полярних ліпідів і триацилгліцеролів, порівняно з іншими ліпідними фракціями, практично у всіх мікроводоростей набагато вищий.

Методи дослідження ліпідного складу

Якісний та кількісний аналіз ліпідів визначають за допомогою хроматографічних методів, зокрема методами рідинної та тонкошарової (ТШХ) хроматографії, які наразі вважаються найефективнішими і універсальними способами розділення інтактних сумішей ліпідів та їх ліпофільних фрагментів. Більш того, якщо в якості адсорбенту використовується силікагель, оброблений нітратом срібла, то методом ТШХ можна розділяти ліпіди одного класу по числу подвійних зв'язків. Розділення ліпідів методом ТШХ проводять зазвичай на силікагелі, проте можна використовувати оксид алюмінію, іонообмінну целюлозу, сефедекс, целюлозу та ін.

Хроматографічне дослідження проводять для полярних ліпідів, до яких відносяться фосфоліпіди. Фосфоліпіди – група похідних 1,2-діацилгліцерол3-фосфату, що має назву фосфатидної кислоти. Похідні можуть утворюватись за рахунок приєднання до фосфатної групи аміноспиртів або полігідрокси сполук. Прикладами таких ліпідів є:

- фосфатидилхолін (ФХ, тривіальна назва лецитин);
- фосфатидилетаноламін (ФЕА, тривіальна назва цефалін);
- фосфатидилсерин (ФС);
- фосфатидилінозитол (ФІ);
- фосфатидилгліцерол (ФГ);
- дифосфатидилгліцерол (ДФГ, тривіальна назва кардіоліпін).

Одновимірною тонкошаровою хроматографією дає хороше розділення ліпідів, однак, для отримання більш достовірних даних розділення екстракту необхідно проводити у різних системах. Використовують системи на основі суміші хлороформ/метанол. Хлороформ вимиває гліколіпіди у верхню частину пластини. Для розкладу суміші гліколіпідів на компоненти, до носія додають ацетон.

Для проявлення пластин використовуються різні речовини – йод (проявлення ліпідів за рахунок зв'язування з ненасиченими ділянками ЖК), фосфомолібденову кислоту (якісний реагент на фосфорну кислоту, також може з'єднуватись з іншими ліпідами, що мають велику кількість ненасичених зв'язків), а-нафтол (для специфічного визначення гліколіпідів), молібдат амонію (специфічне визначення фосфоліпідів) та ін.

Практична частина

Матеріали і реактиви: метанол, хлороформ, хроматографічні пластини, 5% розчин фосфомолібденової кислоти, ацетон, піпетки, колби, дистильована вода, 25% розчин гідроксиду амонію, оцтова кислота.

Обладнання: сушильна шафа, устаткування для проведення хроматографії.

Порядок виконання роботи

1. У 100 мл колбі приготувати розчин хлороформ : метанол у співвідношенні 1:2 за об'ємом.

2. Екстракти, що одержані в лабораторній роботі 5, розчинити у суміші $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:2 об.) так, щоб отримати розчини однакової концентрації.

3. Активувати пластинки для хроматографії у сушильній шафі протягом 30 хв за температури 115°C .

4. Для проведення одновимірної хроматографії приготувати нейтральну систему складу хлороформ : метанол : вода (65:25:4 об.) у 100 мл колбі.

5. На пластинку нанести по три треки кожного зразка масою екстракту 50, 100 та 150 мкг у кожному.

6. Хроматографічну пластинку занурити у розчин хлороформ: метанол: вода і витримати 1 годину.

7. У 100 мл колбі приготувати лужний розчин складу $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/25\%\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (90:70:5,5:15 об.), який використовується для двовимірної хроматографії.

8. У 100 мл колбі приготувати кислий розчин складу $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$ (40:15:14:13:7,5 об.), який використовується для двовимірної хроматографії.

9. Спочатку провести розгонку за використання лужного розчину, для чого на хроматографічну пластинку нанести по три треки кожного зразка масою 50, 100 та 150 мкг у кожному. Занурену пластинку у лужний розчин витримати 1 год. і висушити в сушильній шафі при 60°C .

10. Провести хроматографію у кислому розчині в другому напрямі. Для чого пластинку занурити у кислий розчин і витримати 1 год, висушити у сушильній шафі при 60°C .

11. Для проявлення хроматографічних пластин у обох випадках нанести на пластинку аерозоль 5% розчин фосфомолібденової кислоти (ФМК).

12. Пластинку прогріти при 120°C у сушильній шафі до проявлення.

Завдання

1. За використання літературних джерел провести ідентифікацію одержаних ліпідів. Отримані результати записати до протоколу.

Контрольні питання

1. Які ліпідні фракції містяться у мікроводоростях?
2. Які жирні кислоти містяться у різних видах мікроводоростей?
3. Чим відрізняються жирні кислоти?
4. Який принцип дії тонкошарової хроматографії?

5. Які Ви знаєте розчинники для ліпідів?
6. Які хроматографічні методи застосовуються для визначення ліпідів та жирних кислот?
7. Які методи ідентифікації хроматограм Ви знаєте?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №7. Оптимізація умов культивування морських мікроводоростей

Мета: дослідити вплив різних параметрів культивування (рН, тривалість освітлення та температура) на ріст та приріст біомаси мікроводоростей *Tetraselmis sp.*

Теоретичні основи

1. Основні фактори, що впливають на ріст і продуктивність морських мікроводоростей.
2. Особливості культивування мікроводоростей *Tetraselmis sp.*
3. Вплив аерації, фотоперіоду та рівня солоності на ріст і якісний склад біомаси мікроводоростей *Tetraselmis sp.*
4. Технології культивування морських мікроводоростей: закриті біореактори та відкриті системи (басейни).

Мікроводорості є перспективним джерелом кормових добавок завдяки високому вмісту білків, вітамінів, пігментів та біологічно активних речовин, які сприяють покращенню росту, здоров'я та продуктивності сільськогосподарських тварин та аквакультурних організмів. Зокрема, морські мікроводорості роду *Tetraselmis* привертають увагу як важливий компонент кормових сумішей завдяки високому вмісту білків, ліпідів, вітамінів групи В, а також хлорофілів і каротиноїдів, що можуть позитивно впливати на фізіологічний стан організмів.

Наступні лабораторні роботи (№7 і 8) присвячені особливостям культивування мікроводоростей *Tetraselmis sp.* з метою отримання кормових добавок на їх основі. Мікроводорості роду *Tetraselmis* вирізняються високою швидкістю росту та здатністю до накопичення значної кількості біомаси за короткий період, що робить їх економічно вигідними для комерційного культивування. Вони здатні адаптуватися до різних умов навколишнього середовища, що дозволяє оптимізувати їхнє культивування для досягнення максимальних показників біомаси та її якісного складу. Особливості хімічного складу мікроводоростей *Tetraselmis* залежать від умов культивування, таких як температура, освітленість, наявність поживних речовин та солоність середовища.

Основні фактори, що впливають на ріст і продуктивність морських мікроводоростей

Температура. Температура відіграє ключову роль у рості мікроводоростей, впливаючи на активність ферментів, фотосинтез та метаболічні процеси. Більшість морських мікроводоростей, включаючи *Tetraselmis sp.*, мають оптимальний температурний діапазон для росту від 20°C

до 28°C. Відхилення від цього діапазону може призвести до зменшення швидкості росту або загибелі клітин. При нижчих температурах ферментативна активність знижується, що призводить до зменшення поглинання поживних речовин і фотосинтезу. Водночас при вищих температурах може збільшуватися денатурація білків та фотодихання, що інгібує ріст.

Освітлення. Світло є основним джерелом енергії для фотосинтезу в мікроводоростях. Інтенсивність, тривалість (фотоперіод) та якість світла (довжина хвилі) можуть значно впливати на їх ріст. Морські мікроводорості, включаючи *Tetraselmis sp.*, зазвичай потребують світлової інтенсивності 50-150 μmol фотонів $\text{m}^2\text{хс}^{-1}$ для оптимального росту. Інтенсивність світла нижче необхідного порогу призводить до зниження фотосинтетичної активності, тоді як надмірне світло може викликати фотоінгібування, що шкодить фотосистемі. Безперервне освітлення (24 години) може сприяти швидшому росту, однак періодичні цикли темряви (наприклад, 16:8 годин світла/темряви) також необхідні для імітації природних умов і підтримки оптимального метаболізму клітин.

Концентрація CO_2 . CO_2 є важливим джерелом вуглецю для фотосинтезу мікроводоростей, і його доступність безпосередньо впливає на ріст та продуктивність біомаси. Морські мікроводорості, такі як *Tetraselmis sp.*, добре ростуть у середовищах, де концентрація CO_2 підтримується на рівні 5-10%. Додавання CO_2 до середовища вирощування може підвищити ефективність фотосинтезу, що призводить до збільшення накопичення біомаси та ліпідів. Однак надмірні концентрації CO_2 можуть призвести до закислення середовища, що негативно впливає на життєздатність клітин і продуктивність.

Склад поживних речовин (макро- та мікроелементи). Поживні речовини необхідні для синтезу клітинних компонентів, таких як білки, нуклеїнові кислоти та ліпіди. Основними макроелементами для росту мікроводоростей є азот (N) і фосфор (P). Для оптимального росту співвідношення N у середовищі повинно становити від 5:1 до 16:1. Азот зазвичай постачається у вигляді амонію (NH_4^+) або нітрату (NO_3^-), тоді як фосфор – у вигляді фосфату (PO_4^{3-}). Мікроелементи, такі як залізо (Fe), марганець (Mn), мідь (Cu) і цинк (Zn), також важливі для різних ферментативних процесів, хоча вони потрібні в менших кількостях. Недостатність або дисбаланс у постачанні поживних речовин може призвести до б'ясово і обмежити ріст або змінити біохімічний склад мікроводоростей.

Особливості культивування мікроводоростей *Tetraselmis sp.*

Tetraselmis sp. – це джгутикові зелені морські мікроводорості, що широко використовуються в аквакультурі та біотехнології. Їх культивування вимагає ретельного контролю параметрів навколишнього середовища для досягнення максимальної врожайності біомаси.

Вимоги до середовища. Оптимальні умови для росту *Tetraselmis sp.* Включають температуру 24-27°C, інтенсивність освітлення 50-100 μmol фотонів $\text{m}^2 \text{с}^{-1}$ та рівень солоності між 20 та 35 проміле. *Tetraselmis sp.* Може рости як у фототрофних (світло як джерело енергії), так і у міксотрофних (світло та органічний вуглець) умовах, що надає гнучкість у стратегіях

культивування. Живильне середовище зазвичай збагачується макроелементами (N, P) та мікроелементами (Fe, Mn, Cu), щоб забезпечити постійний ріст.

Роль оптимізації для максимального приросту біомаси. Оптимізація умов навколишнього середовища є ключем до максимізації росту та продуктивності біомаси *Tetraselmis sp.*. Регулювання pH, температури, рівня поживних речовин і подачі CO₂ може покращити ефективність фотосинтезу та поглинання поживних речовин. Наприклад, підтримання pH у діапазоні 7.5-8.5 забезпечує оптимальну активність ферментів та розчинність поживних речовин. Збагачення CO₂ може підвищити фіксацію вуглецю та накопичення ліпідів, тоді як додавання азоту збільшує вміст білків. Регулярний моніторинг та регулювання цих параметрів можуть значно покращити швидкість росту та врожайність біомаси.

Вплив аерації, фотоперіоду та рівня солоності на ріст і якісний склад біомаси *Tetraselmis sp*

Аерація. Аерація необхідна для забезпечення достатньої кількості CO₂ та запобігання накопиченню кисню, що може інгібувати фотосинтез у культурах мікроводоростей. Вона також допомагає підтримувати однорідність середовища, забезпечуючи рівномірний розподіл поживних речовин та світла. Недостатня аерація може призвести до виснаження кисню та градієнтів поживних речовин, що обмежує ріст.

Фотоперіод. Тривалість освітлення (фотоперіод) впливає на фотосинтетичну активність та метаболічні ритми мікроводоростей. Для *Tetraselmis sp.* Оптимальним є фотоперіод 12-16 годин світла з подальшими 8-12 годинами темряви. Такий цикл світла/темряви дозволяє ефективно проводити фотосинтез під час світлової фази та необхідне метаболічне відновлення під час фази темряви.

Солоність. Солоність впливає на осмотичний тиск та іонний баланс у клітинах мікроводоростей, що впливає на їх ріст та біохімічний склад. *Tetraselmis sp.* Може витримувати широкий діапазон солоності (20-35 проміле), але оптимальною для росту є солоність близько 30 проміле. Відхилення від цього діапазону можуть призвести до осмотичного шоку, що знижує швидкість росту та змінює вміст ліпідів і білків.

Технології культивування морських мікроводоростей: закриті біореактори та відкриті системи

Закриті біореактори. Закриті біореактори, такі як фотобіореактори (ПБР), забезпечують контрольоване середовище для культивування мікроводоростей. Вони мають переваги, як-от знижений ризик контамінації, кращий контроль параметрів середовища (температура, освітлення, CO₂) та вища врожайність біомаси. У закритих системах мікроводорості зазвичай вирощуються у вертикальних або горизонтальних трубках, де максимізується освітлення, а постійне змішування забезпечує рівномірні умови росту. ПБР ідеальні для виробництва продуктів високої цінності, таких як біоактивні сполуки, де чистота і якість є вирішальними.

Відкриті системи (басейни). Відкриті системи, такі як каналні басейни, є простішими і економічнішими, ніж закриті біореактори. Ці системи

покладаються на природне світло і аерацію, що робить їх придатними для вирощування великих обсягів біомаси. Однак вони більш вразливі до контамінації та коливань навколишнього середовища, що може вплинути на швидкість росту та врожайність. Відкриті системи зазвичай використовуються для виробництва біомаси у великих кількостях, як-от для біопалива та кормів для тварин, де необхідні великі обсяги біомаси за низькою ціною.

Отже, оптимізація умов навколишнього середовища, таких як температура, освітлення, рівень CO₂ та склад поживних речовин, є критично важливою для успішного культивування морських мікроводоростей, зокрема *Tetraselmis sp.* Додатково, розуміння впливу аерації, фотоперіоду та солоності дозволяє ще більше вдосконалити стратегії культивування для підвищення як росту, так і біохімічного складу біомаси. Через ретельне управління цими факторами культивування мікроводоростей можна оптимізувати для різних біотехнологічних застосувань.

Практична частина

Матеріали та реактиви: культура мікроводоростей *Tetraselmis sp.*, живильні середовища з різним складом (модифіковане середовище F/2 з сульфатом амонію як джерелом азоту), регулятори pH (розчини NaOH і HCl).

Обладнання: люмінесцентні лампи, біореактори (скляні акваріуми) об'ємом 4 л, термостати, pH-метр, центрифуга, аналітичні ваги.

Порядок виконання роботи

1. Підготовка середовища для культивування.

- Підготуйте модифіковане живильне середовище F/2, у якому натрій-нітрат замінено на сульфат амонію (0,212 г/л (NH₄)₂SO₄). Додайте NaH₂PO₄·H₂O (0,024 г/л) та мікроелементи (CuSO₄·5H₂O, ZnSO₄·7H₂O, CoCl₂·6H₂O, MnCl₂·4H₂O, Na₂MoO₄·2H₂O) з концентрацією 1 мл/л кожного з елементів.

- Простерилізуйте живильні середовища за допомогою автоклава перед культивуванням мікроводоростей.

2. Підготовка культур мікроводоростей.

- Отримайте чисту культуру *Tetraselmis sp.* Відновіть культуру у біореакторах об'ємом 4 л, використовуючи попередньо підготовлене живильне середовище.

- Початкова концентрація біомаси повинна бути 80±30 мг/л для всіх експериментальних варіантів.

3. Оптимізація умов культивування.

• Оптимізація pH:

- ✓ проведіть культивування мікроводоростей при pH 7 і 8, використовуючи NaOH та HCl для регулювання кислотності;

- ✓ pH контролюйте щодня і за необхідності коригуйте.

• Оптимізація температурного режиму:

- ✓ проведіть експерименти при трьох температурних режимах: 19°C, 25°C і 28°C;

- ✓ використовуйте термостати для підтримання стабільної температури в біореакторах.

- **Оптимізація фотоперіоду:**
 - ✓ вивчіть вплив різних тривалостей освітлення, застосовуючи три фотоперіоди: 20 годин світла/4 години темряви, 18 годин світла/6 годин темряви, 12 годин світла/12 годин темряви;
 - ✓ використовуйте таймери для автоматичного контролю освітлення.
- 4. Спостереження за ростом біомаси.
 - Кожні 48 годин відбирайте проби по 50 мл з біореакторів для аналізу приросту біомаси.
- 5. Оцінка приросту біомаси.
 - Відібрані проби центрифугуйте при 4200 об/хв протягом 20 хвилин для осадження біомаси.
 - Злийте надосадову рідину, промийте осад дистильованою водою для видалення солей.
 - Перенесіть вологу біомасу у заздалегідь зважену колбу та висушіть у сушильній шафі при 80°C до постійної ваги.
 - Визначте масу сухої біомаси за допомогою ваг та розрахуйте концентрацію сухої маси у пробі (мг/л).

Завдання

1. Порівняйте приріст біомаси для різних значень рН, температур та фотоперіодів.
2. Визначте найкращі умови для максимального приросту біомаси мікроводоростей *Tetraselmis sp.*

Контрольні питання

1. Як рН впливає на ріст мікроводоростей?
2. Як змінюється приріст біомаси при різних температурах культивування?
3. Який вплив має тривалість освітлення на процес фотосинтезу у мікроводоростей?

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ №8. Оцінка якості біомаси морських мікроводоростей для виробництва кормів

Мета: оцінити якість отриманої біомаси *Tetraselmis sp.* за вмістом білків, ліпідів, вуглеводів та пігментів, а також визначити можливість використання такої біомаси як кормової добавки.

Теоретичні основи

1. Особливості хімічного складу біомаси мікроводоростей *Tetraselmis sp.* для виробництва кормів.
2. Методи оцінки якості біомаси мікроводоростей.
3. Перспективи використання *Tetraselmis sp.* у виробництві кормів.

Особливості хімічного складу біомаси мікроводоростей *Tetraselmis sp.* для виробництва кормів

Вміст білків та амінокислот. Білки мікроводоростей є основним компонентом, який визначає їх поживну цінність. Біомаса мікроводоростей роду *Tetraselmis* може містити до 50% білків від загальної сухої маси, що робить її конкурентною з традиційними джерелами білків, такими як соєвий шрот чи рибне борошно. Важливим аспектом є також наявність у складі білків усіх незамінних амінокислот, таких як лізин, треонін, валін, метіонін, фенілаланін, які необхідні для нормального функціонування організму.

Вміст ліпідів та жирних кислот. Ліпіди є важливим компонентом, що забезпечує енергетичні потреби організму та формування клітинних мембран. Біомаса *Tetraselmis sp.* може містити значну кількість ліпідів (до 30% від сухої маси), які збагачені на поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), такі як ейкозапентаєнова (ЕПК) та докозагексаєнова кислоти (ДГК). Ці жирні кислоти мають велике значення для підтримання здоров'я та підвищення імунної відповіді організму. Для кормового використання важливо забезпечити достатню кількість ПНЖК, які є необхідними для нормального функціонування нервової та імунної систем.

Вміст вуглеводів. Вуглеводи в біомасі мікроводоростей переважно представлені у формі полісахаридів, що можуть виконувати як запасну, так і структурну функцію. Вони забезпечують енергетичні потреби організму та можуть використовуватися як субстрат для росту корисної мікрофлори кишечника.

Вміст пігментів. Пігменти, такі як хлорофіл та каротиноїди, є біологічно активними речовинами, які беруть участь у фотосинтезі та можуть проявляти антиоксидантні властивості. Біомаса *Tetraselmis sp.* містить значну кількість хлорофілів (хлорофіл а та б), а також каротиноїди (лютеїн, β-каротин), які є цінними для покращення якості кормів. Вони можуть слугувати натуральними барвниками та антиоксидантами, що захищають клітини від оксидативного стресу.

Мінеральний склад та наявність токсичних елементів. Мікроводорості можуть накопичувати різні мінеральні речовини, такі як натрій, калій, магній, залізо, цинк, які є важливими для метаболізму тварин. Зольний склад біомаси визначається після спалювання сухої маси зразка та аналізу залишку. Важливим аспектом є оцінка наявності токсичних елементів, таких як кадмій, свинець, ртуть, що може мати негативний вплив на здоров'я тварин.

Порівняння з іншими джерелами кормових добавок. Біомаса *Tetraselmis sp.* має переваги порівняно з іншими джерелами кормових добавок завдяки високій концентрації поживних речовин та біологічно активних компонентів. Порівняно з традиційними кормовими джерелами, такими як соєвий шрот чи рибне борошно, *Tetraselmis sp.* містить більшу кількість поліненасичених жирних кислот та пігментів, що робить її цінним доповненням до раціонів сільськогосподарських тварин.

Методи оцінки якості біомаси мікроводоростей

Оцінка якості біомаси мікроводоростей є важливим етапом для визначення її придатності для використання у виробництві кормів. Для цього застосовуються різноманітні методи, які дозволяють визначити вміст білків,

ліпідів, вуглеводів, пігментів, зольних речовин та інших біомолекул. Крім того, застосовуються методи для виявлення токсичних елементів, які можуть негативно впливати на здоров'я тварин. Нижче розглянуто основні методи оцінки якості біомаси, які використовуються для мікроводоростей.

Визначення вмісту білків та амінокислот. Визначення вмісту білків у біомасі мікроводоростей здійснюється методом К'ельдаля, який базується на визначенні кількості загального азоту у зразку, оскільки білки є основними носіями азоту в клітині. Суть методу полягає в розкладанні білкових речовин до аміаку шляхом кип'ятіння з концентрованою сірчаною кислотою, а потім вимірюванні кількості аміаку, що утворився. Вміст білків розраховується шляхом множення кількості азоту на коефіцієнт 6,25.

Для визначення амінокислотного складу білків використовується метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), який дозволяє розділити амінокислоти після попереднього гідролізу білків та визначити їх концентрацію. Застосування ВЕРХ дозволяє точно оцінити наявність усіх незамінних амінокислот та визначити біологічну цінність білка.

Визначення вмісту ліпідів та жирних кислот. Вміст ліпідів визначається гравіметричним методом після їх екстракції органічними розчинниками, такими як хлороформ і метанол (метод Фольча). Після екстракції ліпідів із біомаси отриману суміш поділяють на водний і органічний шари. Органічний шар, що містить ліпіди, відокремлюють і висушують для визначення загальної маси ліпідів. Цей метод є точним і дозволяє визначити вміст загальних ліпідів у зразку.

Для детальнішого аналізу складу ліпідів використовують метод газової хроматографії (ГХ). Ліпіди перетворюють на метилові ефіри жирних кислот, які аналізують у газовому хроматографі. Визначення жирних кислот дозволяє виявити наявність та концентрацію насичених, мононенасичених і поліненасичених жирних кислот, що є важливими показниками для оцінки харчової цінності та впливу на здоров'я організмів.

Визначення вмісту вуглеводів. Вуглеводи в біомасі мікроводоростей визначають спектрофотометричним методом за допомогою фенол-сірчаної кислоти. Після додавання фенолу та сірчаної кислоти до розчину біомаси утворюються кольорові комплекси, які поглинають світло на довжині хвилі 490 нм. Інтенсивність кольору пропорційна кількості вуглеводів у зразку, що дозволяє точно оцінити їх вміст. Цей метод є зручним і широко використовується для визначення загального вмісту вуглеводів у зразках.

Визначення вмісту пігментів. Пігменти, такі як хлорофіли та каротиноїди, є важливими компонентами мікроводоростей, які відіграють роль у фотосинтезі та можуть бути корисними у виробництві кормів як антиоксиданти. Пігменти екстрагують з біомаси за допомогою органічних розчинників, таких як ацетон або метанол, а потім визначають їх концентрацію спектрофотометричним методом.

Концентрацію хлорофілів вимірюють на довжинах хвиль 663 нм (хлорофіл *a*) та 647 нм (хлорофіл *b*), що дозволяє визначити загальний вміст хлорофілів у зразку. Каротиноїди вимірюють на довжині хвилі 450 нм. Пігментний склад біомаси може варіювати залежно від умов культивування,

таких як освітленість і температура, що дозволяє регулювати якість біомаси в процесі її виробництва.

Визначення зольних речовин. Зольні речовини – це залишок, що утворюється після спалювання органічної частини біомаси при високій температурі (500-600°C). Вміст золи вказує на наявність мінеральних компонентів, таких як кальцій, магній, фосфор та інші, які є важливими для живлення тварин. Визначення зольних речовин здійснюється шляхом спалювання сухої маси зразка у муфельній печі з подальшим зважуванням залишку.

Визначення наявності токсичних елементів. Мікрободорості можуть накопичувати токсичні елементи, такі як важкі метали (свинець, кадмій, ртуть), які можуть негативно впливати на здоров'я тварин та людини. Для визначення вмісту токсичних елементів використовують метод атомно-абсорбційної спектрофотометрії (ААС). Цей метод дозволяє визначити кількість окремих елементів у зразку з високою точністю і забезпечити безпечність біомаси для використання у виробництві кормів.

Оцінка мікробіологічної чистоти біомаси. Мікробіологічна чистота біомаси є важливим показником її якості, особливо у випадку використання мікрободоростей у виробництві кормів. Для оцінки мікробіологічної чистоти визначають загальну кількість мікроорганізмів, а також проводять тестування на наявність патогенних бактерій, таких як *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, та інших. Мікробіологічний аналіз проводиться шляхом висівання зразків на спеціальні поживні середовища з подальшою ідентифікацією зростаючих колоній.

Фракціонування та аналіз ліпідного складу. Для більш детального аналізу ліпідного складу біомаси застосовується фракціонування ліпідів, що дозволяє поділити їх на нейтральні ліпіди, гліколіпіди та фосфоліпіди. Фракціонування проводиться шляхом колоночної хроматографії з використанням різних розчинників. Нейтральні ліпіди екстрагують дихлорметаном, гліколіпіди – ацетоном, а фосфоліпіди – метанолом. Після фракціонування ліпіди аналізують за допомогою газової хроматографії, що дозволяє визначити якісний та кількісний склад кожної фракції.

Аналіз поживної цінності біомаси. Загальний аналіз поживної цінності біомаси передбачає визначення кількісного складу білків, ліпідів, вуглеводів, а також вітамінів та мікроелементів. Отримані дані дозволяють оцінити придатність біомаси мікрободоростей для використання у виробництві кормів та скласти оптимальні кормові раціони для різних груп тварин.

Таким чином, комплексний підхід до оцінки якості біомаси мікрободоростей забезпечує повне розуміння її складу та придатності для виробництва кормів, а також дає можливість коригувати процеси культивування для отримання біомаси з оптимальним хімічним складом.

Перспективи використання *Tetraselmis sp.* у виробництві кормів

Мікрободорості роду *Tetraselmis* мають значний потенціал для використання у виробництві кормів завдяки їх високому вмісту поживних речовин, зокрема білків, незамінних амінокислот, жирних кислот, вітамінів і

мікроелементів. Вони є одними з найперспективніших об'єктів для культивування у промислових масштабах і можуть застосовуватися як кормові добавки для широкого спектру тварин, включаючи риб, ракоподібних, молюсків, свійську птицю та навіть ссавців.

Переваги використання *Tetraselmis sp.* як кормової добавки. Однією з основних переваг *Tetraselmis sp.* є висока харчова цінність їх біомаси. Вони містять до 50% білка від загальної сухої маси, що робить їх порівняними з такими традиційними джерелами білків, як соя та рибне борошно. При цьому, *Tetraselmis sp.* збагачені незамінними амінокислотами, такими як лізин, треонін, валін, ізолейцин, які необхідні для нормального росту та розвитку організму. Вміст амінокислот у біомасі мікроводоростей значною мірою залежить від умов культивування, що дає можливість регулювати склад білка для досягнення оптимальної поживної цінності корму. *Tetraselmis sp.* також є цінним джерелом поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), особливо ейкозапентаєнової (ЕПК) та докозагексаєнової кислоти (ДГК), які є важливими для підтримання здоров'я організму тварин, зокрема, для нормальної роботи нервової та імунної систем. Ці жирні кислоти часто є дефіцитними у традиційних кормових сумішах, тому додавання біомаси *Tetraselmis sp.* до раціонів риб чи свійської птиці дозволяє забезпечити їхню повноцінність та збалансованість.

Використання *Tetraselmis sp.* як кормової добавки також сприяє покращенню імунітету, зниженню захворюваності, поліпшенню конверсії корму та підвищенню виживаності молоді. Завдяки високому вмісту каротиноїдів (лютеїну, β -каротину та інших) біомаса мікроводоростей діє як природний антиоксидант, який захищає організм тварин від оксидативного стресу та позитивно впливає на їхній загальний фізіологічний стан.

Застосування *Tetraselmis sp.* в аквакультурі. В аквакультурі *Tetraselmis* використовують як цінну кормову добавку для личинок риб та інших морських організмів. Вони забезпечують повний набір поживних речовин, необхідних для швидкого росту та розвитку молоді. Мікроводорості можуть бути використані як корм для артемії та копеподів, які, в свою чергу, є основним харчовим ресурсом для багатьох видів морських риб.

Крім того, *Tetraselmis sp.* використовуються як корм для двостулкових молюсків, таких як устриці та мідії, оскільки вони стимулюють їх ріст та підвищують життєздатність личинок на ранніх стадіях розвитку. Завдяки високому вмісту біологічно активних речовин, *Tetraselmis* забезпечують покращення кольору, смаку та текстури м'яса молюсків, що є важливим чинником для комерційного вирощування.

Використання *Tetraselmis sp.* у виробництві комбікормів для свійської птиці та великої рогатої худоби. Мікроводорості можуть бути використані як добавка до комбікормів для свійської птиці та великої рогатої худоби, забезпечуючи їх поживними речовинами та біологічно активними компонентами. Біомаса *Tetraselmis sp.* підвищує продуктивність курей-несучок, покращуючи якість яєць (вміст білка, жовтка, забарвлення шкаралупи) та знижуючи загальний рівень холестерину. Використання мікроводоростей у кормах для ВРХ сприяє поліпшенню росту тварин, підвищенню якості молока та м'ясних продуктів, завдяки високому вмісту ПНЖК та каротиноїдів.

Перспективи використання *Tetraselmis sp.* у вирощуванні ракоподібних. Додавання мікроводоростей *Tetraselmis sp.* до раціонів креветок та інших ракоподібних дозволяє забезпечити швидке зростання, зниження захворюваності та покращення загальної якості продукції. Мікроводорості сприяють синтезу хітину, який є основним компонентом зовнішнього скелету ракоподібних, що забезпечує швидку линьку та прискорений ріст.

Завдяки високому вмісту каротиноїдів та антиоксидантів *Tetraselmis sp.* також покращують забарвлення панцира креветок, що є важливим показником товарної якості. Мікроводорості підвищують рівень виживаності молоді, підвищують стійкість до стресових умов та поліпшують імунну відповідь ракоподібних.

Економічні та екологічні переваги використання *Tetraselmis sp.* Використання *Tetraselmis sp.* як кормової добавки має низку економічних та екологічних переваг. Завдяки високій швидкості росту та здатності накопичувати біомасу в короткий термін, мікроводорості є економічно вигідними для виробництва кормів. Крім того, культивування мікроводоростей не потребує великих площ земельних ресурсів і може здійснюватися у спеціальних біореакторах або відкритих ставках.

Мікроводорості також можуть використовуватися для рекультивації стічних вод, оскільки здатні ефективно поглинати азот та фосфор з водного середовища. Це дозволяє одночасно забезпечити очищення вод та отримати високоякісну біомасу для виробництва кормів. Використання мікроводоростей зменшує залежність від традиційних кормових добавок, таких як соя та рибне борошно, знижуючи вплив на навколишнє середовище.

Незважаючи на значний потенціал *Tetraselmis sp.* як кормової добавки, існує низка викликів, які потребують подальших досліджень. Серед них — стандартизація методів культивування для досягнення стабільного хімічного складу біомаси, дослідження впливу різних умов вирощування на накопичення біологічно активних речовин, а також розробка оптимальних методів збирання та обробки біомаси для збереження її поживних властивостей.

Перспективними напрямками досліджень є генетична модифікація штамів *Tetraselmis sp.* з метою підвищення вмісту цінних компонентів, а також розробка нових технологій культивування, які дозволять знизити витрати на виробництво та підвищити ефективність використання ресурсів.

Практична частина

Матеріали: висушена біомаса мікроводоростей *Tetraselmis sp.* (з лабораорної роботи №7), ацетон, хлороформ, метанол, сірчана кислота, розчин фенолу, хлорид калію, сульфат натрію, дистильована вода.

Обладнання: центрифуга, спектрофотометр, аналітичні ваги, пробірки, колби, механічний шейкер, фільтрувальний папір, водяна баня, сушильна шафа.

Порядок виконання роботи

1. Визначення вмісту ліпідів методом Фольча.

- Зважте 100 мг висушеної біомаси мікроводоростей.

- Помістіть зважену біомасу в пробірку та додати 10 мл суміші хлороформу та метанолу у співвідношенні 2:1 (v/v).
- Інтенсивно перемішуйте пробірку з біомасою протягом 20 хвилин на механічному шейкері або магнітній мішалці для повного розчинення ліпідів.
- Після екстракції, перенесіть суміш у розділову лійку. Додайте 5 мл 0,88% розчину KCl для розділення фаз.
- Залиште розділову лійку на 10-15 хвилин, щоб утворилися два окремих шари: верхній водний та нижній органічний.
- Обережно зберіть органічний (нижній) шар, який містить екстраговані ліпіди, в чисту скляну колбу.
- Промийте органічний екстракт розчином 0,88% KCl для видалення залишків солей. Цей процес повторіть 2-3 рази.
- Після завершення промивання, додайте невелику кількість (приблизно 1-2 г) Na₂SO₄ (натрій сульфат безводний) для видалення залишків води. Залиште суміш на 5-10 хвилин, час від часу струшуючи.
- Профільтруйте суміш через фільтрувальний папір, збираючи екстракт у попередньо зважену колбу (або в суху колбу, якщо масу визначатимуть пізніше).
- Видаліть розчинник шляхом випаровування на водяній бані або з використанням ротаційного випарювача при температурі 40-50°C до утворення сухого залишку ліпідів.
- Висушіть колбу з ліпідами в сушильній шафі при температурі 70-80°C протягом 30-40 хвилин.
- Після висушування зважте колбу з ліпідами. Розрахуйте масу ліпідів шляхом вирахування маси порожньої колби з маси колби з ліпідами.
- Розрахуйте вміст ліпідів за формулою:

$$\text{Вміст ліпідів (\%)} = \frac{\text{Маса ліпідів (мг)}}{\text{Маса сухої біомаси (мг)}} \times 100$$

2. Визначення вмісту білків методом К'єльдаля.

- Візьміть 0,5 г сухої біомаси мікродоростей та помістіть у колбу для аналізу.
- Додайте 10 мл концентрованої сірчаної кислоти (H₂SO₄) до зразка у колбі.
- Внесіть каталітичну суміш, яка містить сульфат калію (K₂SO₄) та мідний сульфат (CuSO₄), для прискорення розкладання органічних сполук.
- Перенесіть колбу на нагрівальний пристрій та проведіть розкладання зразка при температурі 370–400°C до отримання прозорого розчину (зразок повинен стати безбарвним).
- Після завершення розкладання охолодіть колбу до кімнатної температури.
- Додайте 50 мл дистильованої води та обережно перелийте суміш у приймальну колбу для наступної дистиляції.

- До колби зі зразком додайте 25 мл 40% розчину гідроксиду натрію (NaOH), не перемішуючи шари, та негайно закрийте колбу пробкою з трубкою, під'єднаною до дистиляційного апарату.

- Здійсніть дистиляцію, збираючи виділений амоніак у колбу з 25 мл борної кислоти (4%).

- Після завершення дистиляції отриманий розчин титруйте 0,1 М розчином хлоридної кислоти (HCl) до зміни кольору індикатора (переважно метилового червоного або бромкрезолового зеленого).

- Розрахуйте вміст загального білка за формулою:

$$\text{Вміст білка(\%)} = N(\%) \times 6,25$$

де N – вміст азоту в зразку.

3. Визначення вмісту вуглеводів методом Дюбуа.

- Зважте 1 мг висушеної біомаси мікроводоростей та помістіть її у пробірку з 5 мл дистильованої води.

- Інтенсивно перемішуйте пробірку на шейкері протягом 5-10 хвилин для повного розчинення біомаси.

- Візьміть 1 мл отриманого розчину як зразок і помістіть в нову пробірку.

- Додайте до зразка 1 мл 5% розчину фенолу.

- Обережно додайте 5 мл концентрованої сірчаної кислоти (95–97% чистоти) до пробірки з розчином, повільно виливаючи кислоту по стінці пробірки, щоб уникнути швидкого нагрівання та утворення бульбашок.

- Перемішайте розчин у пробірці та залиште його при кімнатній температурі на 20 хвилин для повної реакції.

- Після інкубації виміряйте оптичну густину (поглинання) розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 490 нм.

- За калібрувальною кривою, побудованою на основі стандартних розчинів глюкози, визначіть концентрацію вуглеводів у зразку.

- Розрахуйте загальний вміст вуглеводів у сухій масі біомаси, виразивши його у відсотках.

4. Визначення загального вмісту хлорофілів.

- Візьміть 5 мл культури мікроводоростей та перенесіть у центрифужну пробірку.

- Центрифугуйте зразок при 3000 об/хв протягом 10 хвилин для осадження біомаси.

- Видаліть супернатант та промийте осад 5 мл холодної дистильованої води для видалення залишків солей та домішок.

- Повторіть процес промивання ще раз, додавши 5 мл дистильованої води, та знову центрифугувати протягом 10 хвилин при 3000 об/хв.

- Видаліть супернатант та додайте 1 мл дистильованої води до осаду для ресуспендування біомаси.

- Перенесіть ресуспендовану біомасу в скляну пробірку.

- Додайте 4 мл чистого ацетону до пробірки з біомасою. Закрийте пробірку алюмінієвою фольгою, щоб запобігти впливу світла на пігменти.

- Помістіть пробірку в холодильник (4°C) та залиште на 24 години, періодично струшуючи пробірку для забезпечення повного екстрагування пігментів.
- Після екстракції перевірте, чи залишилась біомаса знебарвленою. Якщо ні, повторіть екстракцію з додатковою порцією ацетону.
- Після завершення екстракції центрифугуйте пробірку при 3000 об/хв протягом 10 хвилин, щоб відокремити знебарвлену біомасу від пігментного розчину.
- Перенесіть супернатант, що містить екстраговані пігменти, в чисту пробірку.
- Виміряйте концентрацію хлорофілів *a* і *b* за допомогою спектрофотометра, використовуючи довжини хвиль 663 нм та 647 нм відповідно.
- Обчисліть загальний вміст хлорофілів за рівняннями Ліхтенталера та Бушмана:

$$\text{Концентрація хлорофілу } a = 12,25 \times A_{663} - 2,79 \times A_{647}$$

$$\text{Концентрація хлорофілу } b = 21,50 \times A_{647} - 5,10 \times A_{663},$$

де A_{663} та A_{647} — це показники оптичної густини (абсорбції) при відповідних довжинах хвиль.

- Загальний вміст хлорофілів (мг/л) виразити як суму концентрацій хлорофілу *a* і *b*.

Завдання

1. На основі проведених досліджень визначіть якість біомаси *Tetraselmis sp.* (вміст білків, ліпідів, вуглеводів, пігменти)
2. Оцініть перспективність використання біомаси *Tetraselmis sp.* як кормової добавки у тваринництві чи аквакультурах.

Контрольні питання

1. Які основні компоненти визначають поживну цінність біомаси мікроводоростей?
2. Яким чином визначається вміст білків у біомасі мікроводоростей?
3. Які методи використовують для оцінки вмісту ліпідів у мікроводоростях?
4. Які поліненасичені жирні кислоти присутні у біомасі мікроводоростей роду *Tetraselmis*?
5. Якими методами оцінюють мінеральний склад біомаси мікроводоростей?
6. Який метод використовують для аналізу жирнокислотного складу ліпідів?
7. Як здійснюється визначення вуглеводів у біомасі мікроводоростей?
8. У чому суть методу визначення вмісту пігментів у мікроводоростях?
9. Які переваги має використання *Tetraselmis* як кормової добавки?

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

Водорості в біоенергетиці та інших галузях промисловості: Лабораторний практикум [Електронний ресурс] : навч. посіб. для студ. спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія», освітньої програми «Біотехнології» / КПІ ім. Ігоря Сікорського ; уклад.: Н. Б. Голуб, І. І. Левтун. – Київ : КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2020. – 59 с.

Голуб Н. Б., Бунча В. Ю. Вплив іонів лужних металів на приріст біомаси та накопичення ліпідів (метаболізм) у *Chlorella vulgaris* // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2012. – № 3. – С. 12-17.

Голуб Н. Б., Ситнік О. І., Будика К. Е. Вплив сполук сульфуру на процеси фотосинтезу та дихання у *Chlorella vulgaris* // Вісник Національного університету «Львівська політехніка», серія «Хімія». – 2012. – № 726. – С. 153-158.

Золотарьова О. К., Шнюкова Є. І., Сиваш О. О., Михайленко Н. Ф. Перспективи використання мікроводоростей у біотехнології. – Київ : Альтерпрес, 2008. – 234 с.

Левтун І. І. Біотехнологія культивування мікроводоростей *Chlorella vulgaris* з підвищеним вмістом ліпідів : автореф. дис. канд. техн. наук : 03.00.20 – біотехнологія / Левтун Ігор Ігорович. – Київ, 2017. – 26 с.

Юлевич О. І. Біотехнологія : навч. посіб. / за ред. М. І. Гиль. – Миколаїв : МДАУ, 2012. 476 с.

Aishvarya V., Jena J., Pradhan N., Panda P. K., Sukla L. B. Microalgae: Cultivation and Application. In: Sukla, L., Pradhan, N., Panda, S., Mishra, B. (eds). Environmental Microbial Biotechnology. Soil Biology, vol. 45. – Cham: Springer, 2015.

Becker E. W. Microalgae: Biotechnology and Microbiology / E. W. Becker. – Cambridge: Cambridge University Press, 1994. – 295 p.

Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. – 1959. – Vol. 37. – pp. 911-917.

Chisti Y. Biodiesel from microalgae // Biotechnology Advances. – 2007. – Vol. 25. – pp. 294–306.

Chisti Y. Microalgae biotechnology: a brief introduction. In: Handbook of Microalgae-Based Processes and Products. – 2019. – pp. 3-23.

Fajardo C., Donato M. D., Carrasco R., Martínez-Rodríguez G., Mancera J. M., Fernández-Acero F. J. Advances and challenges in genetic engineering of microalgae // Reviews in Aquaculture. – 2020. – Vol. 12, No. 1. – pp. 365-381.

Garcia M., Sevilla J., Fernandez F., Grima E., Camacho F. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile // Journal of Applied Phycology. – 2000. – Vol. 12. – pp. 239–248.

Golub N. B., Levтun I. I. A Closer Look at Biodiesel Production, under edition of Luisa Rios // Nova Publishing, 2019. – 317 p.

Golub N. B., Levтun I. I. Influence of light energy wavelengths on cultivation of *Chlorella vulgaris* // Вісник Національного університету «Львівська політехніка», серія «Хімія, технологія речовин та їх застосування». – 2016. – Вип. 841. – С. 138-144.

Grama S. B., Liu Z., Li J. Emerging Trends in Genetic Engineering of Microalgae for Commercial Applications // Marine Drugs. – 2022. – Vol. 20, Article 285.

Gupta V. K., Tuohy M. G. Biofuel and Biorefinery Technologies / V. K. Gupta, M. G. Tuohy. – Springer, 2019. – 107 p.

Guckert J. B., Cooksey K. E. Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high pH-induced cell cycle inhibition // J. Phycol. – 1990. – Vol. 26. – pp. 72-79.

Hammond E. W. Chromatography for the analysis of lipids / E. W. Hammond. – Boca Raton, USA: CRC Press, 2000. – 604 p. ISBN 0-8493-4255-4.

Hooper J. Introduction to Algology: With a Catalogue of American Algæ / J. Hooper. – Forgotten Books, 2018. – 34 p.

Hu Q. Chapter 5: Environmental effects on cell composition, pp. 83-93 / A. Richmond (ed.) // Handbook of Microalgal Culture. – Oxford: Blackwell Science Ltd, 2004. – pp. 83–93.

Jinsoo Kim, JooYoup Lee, Keener T. C. Growth Kinetic Study of *Chlorella Vulgaris* // AIChE Annual Meeting. – 2009. – 6 p.

Kumar G., Shekh A., Jakhu S., Sharma Y., Kapoor R., Sharma T. R. Bioengineering of Microalgae: Recent Advances, Perspectives, and Regulatory Challenges for Industrial Application // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – Vol. 8, Article 914.

Lewis T., Nichols P. D., McMeekin T. A. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs // Journal of Microbiological Methods. – 2000. – Vol. 43. – pp. 107–116.

Parpais J., Marie D., Partensky F., Morin P., Vaulot D. Effect of phosphorus starvation on the cell cycle of the photosynthetic prokaryote *Prochlorococcus* spp. // Marine Ecology Progress Series. – 1996. – Vol. 132. – pp. 265 – 274.

Patrinou V., Daskalaki A., Kampantais D., Kanakis D. C., Economou C. N., Bokas D., Kotzamanis Y., Aggelis G., Vayenas D. V., Tekerlekopoulou A. G. Optimization of Cultivation Conditions for *Tetraselmis striata* and Biomass Quality Evaluation for Fish Feed Production // Water. – 2022. – Vol. 14, Article 3162.

Pandey A., Lee D.-J. Biofuels from Algae / A. Pandey, D.-J. Lee. – Elsevier, Academic Press, 2014. – 348 p.

Reddy M. H. Application of algal culture technology for carbon dioxide and flue gas emission control: A thesis for partial fulfilment of the requirements for the degree Master of Science / M. H. Reddy ; Arizona State University. – Phoenix, 2002. – 96 p.

Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., Roessler P. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program-biodiesel from algae, Closeout Report // National Renewable Energy Laboratory. – Golden, Colorado. – 1998. – 328 p.

Sreenikethanam A., Raj S., Banu J. R., Gugulothu P., Bajhaiya A. K. Genetic Engineering of Microalgae for Secondary Metabolite Production: Recent Developments, Challenges, and Future Prospects // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – Vol. 10, Article 836056.

Vallesi A., Pucciarelli S., Buonanno F., Fontana A., Mangiagalli M. Bioactive molecules from protists: Perspectives in biotechnology // *European Journal of Protistology*. – 2020. – Vol. 75, Article 125720.

Yousuf A. Microalgae Cultivation for Biofuels Production / A. Yousuf. – Elsevier, Academic Press, 2019. – 382 p.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Cadoret, J.-P., Bougaran, G., Bérard, J.-B., Carrier, G., Charrier, A., Coulombier, N., Garnier, M., Kaas, R., Le Déan, L., Lukomska, E., Nicolau, E., Rouxel, C., Saint-Jean, B., & Schreiber, N. Microalgae and Biotechnology. In: Monaco, A., Prouzet, P. (eds.). *Development of Marine Resources*. – 2014.

Day, J.G., Achilles-Day, U., Brown, S., & Warren, A. Cultivation of Algae and Protozoa. In: Hurst, C.J., Crawford, R.L., Garland, J.L., Lipson, D.A., Mills, A.L., & Stetzenbach, L.D. (eds.). *Manual of Environmental Microbiology*. – 2007.

Fajardo, C., Donato, M.D., Carrasco, R., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J.M., & Fernández-Acero, F.J. Advances and challenges in genetic engineering of microalgae // *Reviews in Aquaculture*. – 2020. – Vol. 12, No. 1. – pp. 365-381.

Fleurence, J. Biology and Ecology of Microalgae. In: Fleurence, J. (ed.). *Microalgae*. – 2021.

Foissner, W., & Hawksworth, D. (eds.). *Protist Diversity and Geographical Distribution. Topics in Biodiversity and Conservation*. – Vol. 8. – Springer Netherlands, 2009. – p. 111.

Grama, S.B., Liu, Z., & Li, J. Emerging Trends in Genetic Engineering of Microalgae for Commercial Applications // *Marine Drugs*. – 2022. – Vol. 20, No. 5, Article 285.

Hoeltz, M., Benitez, L.B., Machado, Ê.L., & Schneider, S. Microalgae and Clean Technologies: A Review // *CLEAN – Soil, Air, Water*. – 2019. – Vol. 47, No. 11, Article 1800380.

Hoyer, J., Cotta, F., Diete, A., & Großmann, J. Bioenergy from Microalgae – Vision or Reality? // *ChemBioEng Reviews*. – 2018. – Vol. 5, No. 4. – pp. 207-216.

Jayaprada, T., & Wewalwela, J.J. The Application of DNA Transfer Techniques That Have Been Used in Algae. In: Adetunji, C.O., Oloke, J.K., Dwivedi, N., Ummalyma, S.B., Dwivedi, S., Hefft, D.I., & Adetunji, J.B. (eds.). *Next-Generation Algae*. – 2023.

Li, H., Chen, S., Liao, K., Lu, Q., & Zhou, W. Microalgae biotechnology as a promising pathway to ecofriendly aquaculture: A state-of-the-art review // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. – 2021. – Vol. 96, No. 4. – pp. 837-852.

Posten, C. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae // *Engineering in Life Sciences*. – 2009. – Vol. 9, No. 3. – pp. 165-177.

Rotter, A., Barbier, M., Bertoni, F., Bones, A., Cancela, L., Carlsson, J., Carvalho, M., Ceglowska, M., Chirivella-Martorell, J., Dalay, M., Cueto, M., Dailianis, T., Deniz, I., Diaz-Marrero, A., Drakulovic, D., Dubnika, A., Edwards, C., Einarsson, H., Erdogan, A., ... Vasquez, M. The essentials of marine biotechnology // *Frontiers in Marine Science*. – 2021. – Vol. 8, Article 629629.

Simpson, A.G.B., Slamovits, C.H., & Archibald, J.M. Protist Diversity and Eukaryote Phylogeny. In: Archibald, J.M., Simpson, A.G.B., Slamovits, C.H. (eds.).

Handbook of the Protists. 2nd ed. – Vol. 1. – Springer International Publishing, 2017. – pp. 1–22.

Tiedtke, A. Biotechnology with Protozoa. In: Rehm, H.-J., & Reed, G. (eds.). *Biotechnology*. – 2001.

Wan, C., Chen, B., Zhao, X., & Bai, F. Current Advances in Biotechnology of Marine Microalgae. In: Kim, S.-K. (ed.). *Encyclopedia of Marine Biotechnology*. – 2020.

Yang, L., Li, H., Liu, T., Zhong, Y., Ji, C., Lu, Q., Fan, L., Li, J., Leng, L., Li, K., & Zhou, W. Microalgae biotechnology as an attempt for bioregenerative life support systems: Problems and prospects // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. – 2019. – Vol. 94, No. 10. – pp. 3039-3048.

ІНФОРМАЦІЙНІ РЕСУРСИ

Львівська національна наукова бібліотека України імені В. Стефаника.
URL: <https://www.lsl.lviv.ua/index.php/uk/golovna2/>

Львівська обласна універсальна наукова бібліотека.
URL: <http://www.lounb.org.ua/>

Національна бібліотека України ім. В. І. Вернадського.
URL: <http://www.nbuv.gov.ua/>

The National Center for Biotechnology Information.
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

WorldCat. The world's largest library catalog. URL: <https://www.worldcat.org/>

Wiley. Online Library. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/>

AlgaEnergy. URL: <https://www.algaenergy.com/>

Aliga Microalgae. URL: <https://www.aliga.dk/>

ATCC. Algae. URL: <https://www.atcc.org/microbe-products/protistology/algae#t=productTab&numberOfResults=24>

ATCC. Microorganisms for Sustainable Biofuel Production. URL: <https://www.atcc.org/microbe-products/applications/environmental/biofuel-production#t=productTab&numberOfResults=24>

Moodle. Біотехнологія протистів. URL: <http://moodle.lvet.edu.ua/moodle/course/view.php?id=2984>