

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

Факультет харчових технологій та біотехнологій

Кафедра біотехнологій та радіології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня бакалавра

на тему: «Дослідження впливу фізико-хімічних факторів
культивування на синтез астаксантину у *Haematococcus*
pluvialis»

Виконала: студентка 4 курсу,
групи 1, спеціальності
G21 Біотехнології та біоінженерія
Прокопович А. І.

Керівник: Малишева Х. В.

Рецензент: Руденко О. П.

Робота заслухана на засіданні кафедри біотехнології та радіології і
рекомендована до захисту, протокол № __від____ 2026 р.

Завідувач кафедри біотехнології та радіології
В. І.

Буцяк

ЛЬВІВ – 2026

ЗМІСТ

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>АНОТАЦІЯ</u> | 4 |
| <u>ВСТУП</u> | 7 |
| <u>РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ТА ОБҐРУНТУВАННЯ НАПРЯМУ ДОСЛІДЖЕННЯ</u> | 9 |
| <u>1.1. Біологічна характеристика <i>H. pluvialis</i> як об'єкта біотехнології</u> | 9 |
| <u>1.2. Життєвий цикл і морфологічні стадії <i>H. pluvialis</i></u> | 11 |
| <u>1.3. Особливості ізоляції та лабораторного культивування <i>H. pluvialis</i></u> | 14 |
| <u>1.4. Бактеріальна контамінація культур мікроводоростей і підходи до їх очищення</u> 17 | 17 |
| <u>1.5. Астаксантин як цільовий біотехнологічний продукт <i>H. pluvialis</i></u> | 19 |
| <u>РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ</u> | 22 |
| <u>2.1. Загальна схема дослідження</u> | 22 |
| <u>2.2. Об'єкт дослідження та ізоляція <i>H. pluvialis</i> із природного середовища</u> | 23 |
| <u>2.3. Культивування <i>H. pluvialis</i> на різних поживних середовищах</u> | 24 |
| <u>2.4. Мікроскопічне дослідження морфології та життєвого циклу <i>H. pluvialis</i></u> | 26 |
| <u>2.5. Очищення культури <i>H. pluvialis</i> від бактеріальної контамінації</u> | 27 |
| <u>2.6. Описово-аналітична обробка результатів</u> | 28 |
| <u>РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ АНАЛІЗ</u> | 30 |
| <u>3.1. Ізоляція <i>H. pluvialis</i> із природного середовища</u> | 30 |
| <u>3.2. Оцінка росту <i>H. pluvialis</i> на середовищах ВВМ та Тамія</u> | 31 |
| <u>3.3. Морфологічні особливості клітин <i>H. pluvialis</i> та спостереження за життєвим циклом</u> | 33 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>3.4. Оцінка підходів до зменшення бактеріальної контамінації культури <i>H. pluvialis</i></u> | 36 |
| <u>3.5. Узагальнення результатів і значення отриманої культури для подальших досліджень астаксантиногенезу</u> | 38 |
| <u>ВИСНОВКИ</u> | 40 |
| <u>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</u> | 42 |

АНОТАЦІЯ

Актуальність теми. Мікроводорість *Haematococcus pluvialis* є перспективним біотехнологічним об'єктом завдяки здатності накопичувати астаксантин — цінний каротиноїдний пігмент із вираженими антиоксидантними властивостями. Його використання у харчовій, фармацевтичній, косметичній промисловості та аквакультури зумовлює актуальність досліджень, спрямованих на оптимізацію культивування цієї мікроводорості. Ефективне використання *H. pluvialis* потребує відпрацювання умов стабільного лабораторного культивування, накопичення життєздатної біомаси, контролю морфологічного стану клітин і зменшення бактеріальної контамінації. Важливим етапом є оцінка росту культури на різних поживних середовищах, зокрема ВВМ і Тамія, що впливає на її життєздатність, морфологічні зміни та подальшу здатність до індукції каротиногенезу. Тому дослідження культуральних і морфологічних особливостей *H. pluvialis*, ізольованої з природного середовища, має важливе наукове й практичне значення для подальших досліджень накопичення астаксантину.

Метою роботи є дослідження культуральних і морфологічних особливостей *H. pluvialis* за умов культивування на середовищах ВВМ і Тамія та оцінка підходів до зменшення бактеріальної контамінації культури.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

- здійснити аналіз наукової літератури щодо біологічних особливостей мікроводорості *H. pluvialis*, специфіки її життєвого циклу, умов культивування та біотехнологічного потенціалу як природного продуцента астаксантину;
- провести ізоляцію *H. pluvialis* із природного середовища та здійснити первинну адаптацію отриманої культури до лабораторних умов культивування;

- дослідити особливості росту *H. pluvialis* на поживних середовищах ВВМ та Тамія в умовах лабораторного культивування;
- провести порівняльну оцінку культурального стану *H. pluvialis* на досліджуваних поживних середовищах за візуальними, культуральними та мікроскопічними показниками;
- охарактеризувати морфологічний стан клітин *H. pluvialis* та простежити прояви окремих стадій її життєвого циклу в умовах лабораторного культивування;
- здійснити апробацію підходів до зменшення бактеріальної контамінації культури *H. pluvialis* із використанням антибіотичних препаратів;
- оцінити ефективність застосованих методичних підходів до очищення культури від бактеріальної контамінації та визначити основні труднощі підтримання культури в лабораторних умовах;
- обґрунтувати доцільність подальшого використання отриманої культури *H. pluvialis* для дослідження процесів індукції каротиногенезу та накопичення астаксантину.

Об'єкт дослідження: культура мікроводорості *H. pluvialis*, ізольована з природного середовища та адаптована до лабораторних умов культивування.

Предмет дослідження: культуральні та морфологічні особливості *H. pluvialis* за умов лабораторного культивування, характер її росту на поживних середовищах ВВМ і Тамія, а також методичні підходи до зменшення бактеріальної контамінації культури.

Методи дослідження. Методологічну основу роботи становив комплекс теоретичних, альгологічних, мікробіологічних, культуральних, морфологічних та описово-аналітичних методів дослідження. Проведено аналіз наукових джерел, ізоляцію мікроводорості *H. pluvialis* із природного середовища, її адаптацію та

культивування на поживних середовищах. Морфологічний стан клітин і окремі стадії життєвого циклу оцінювали методом світлової мікроскопії. Для зменшення бактеріальної контамінації застосовували обробку антибіотиками. Результати узагальнювали з використанням порівняльно-описового та аналітичного підходів.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати можуть бути використані для вдосконалення підходів до ізоляції, очищення та лабораторного культивування *H. pluvialis*. Дані щодо росту культури, морфологічного стану клітин і бактеріальної контамінації є основою для подальших досліджень індукції каротиногенезу та накопичення астаксантину, а також можуть застосовуватися в освітньому процесі під час вивчення біотехнології мікроводоростей.

Ключові слова: *Haematococcus pluvialis*, мікроводорості, астаксантин, каротиногенез, природна ізоляція, лабораторне культивування, поживне середовище ВВМ, середовище Тамія, бактеріальна контамінація, антибіотики, чиста культура, життєвий цикл, морфологічний стан клітин, світлова мікроскопія, альгобіотехнологія.

ВСТУП

На сучасному етапі розвитку біотехнології мікроводорості розглядають як цінні біологічні об'єкти для отримання біомаси, пігментів, антиоксидантів, поліненасичених жирних кислот, білків та інших біологічно активних сполук [21, 23, 25, 28]. Особливу увагу серед них привертає *H. pluvialis* — одноклітинна зелена мікроводорість, здатна за дії стресових чинників накопичувати астаксантин [1, 8, 22, 34, 36]. Цей каротиноїд характеризується вираженими антиоксидантними властивостями та має значний практичний інтерес для харчової, фармацевтичної, косметичної, кормової промисловості й аквакультури [6, 9, 13, 28, 32].

Біотехнологічна цінність *H. pluvialis* значною мірою пов'язана з особливостями її життєвого циклу. За сприятливих умов клітини перебувають переважно у зеленій вегетативній стадії, активно ростуть і накопичують біомасу. За впливу стресових чинників, зокрема дефіциту поживних речовин, підвищеної інтенсивності освітлення, температурних змін або осмотичного навантаження, клітини переходять у нерухомі форми, формують потовщену клітинну оболонку та здатні накопичувати каротиноїди [16, 18, 19, 22, 34, 36]. Саме ці морфологічні й фізіологічні зміни є основою двостадійних підходів до культивування *H. pluvialis*, які передбачають спочатку нарощування зеленої біомаси, а надалі — індукцію каротиногенезу [8, 16, 22, 34, 36].

Попри значний інтерес до *H. pluvialis* як природного продуцента астаксантину, ефективне використання цієї мікроводорості у лабораторних і біотехнологічних дослідженнях потребує попереднього відпрацювання базових етапів роботи з культурою. До них належать ізоляція мікроводорості з природного

середовища, адаптація отриманого матеріалу до лабораторних умов, підбір поживного середовища, контроль морфологічного стану клітин і зменшення рівня бактеріальної контамінації [7, 18, 19, 27, 33]. Наявність супутньої мікрофлори може ускладнювати підтримання культури, впливати на її ріст, фізіологічний стан і достовірність інтерпретації результатів [7, 10, 14, 33].

Окремим методичним завданням під час роботи з природними ізолятами *H. pluvialis* є очищення культури від бактеріальних контамінантів. Для цього можуть застосовуватися багаторазові пересіви, мікроскопічний контроль, зміна умов культивування та обробка антибіотичними препаратами [7, 10, 14, 33]. Водночас використання антибіотиків потребує обережного підходу, оскільки вони можуть впливати не лише на супутню бактеріальну мікрофлору, а й на загальний стан альгологічної культури [10, 14, 31]. Тому оцінка ефективності підходів до зменшення бактеріальної контамінації є важливим етапом формування стабільної лабораторної культури *H. Pluvialis* [7, 33].

Важливе значення має також оцінка росту *H. pluvialis* на різних поживних середовищах. Склад середовища визначає доступність макро- і мікроелементів, інтенсивність розвитку клітин, збереження зеленої вегетативної стадії та загальний фізіологічний стан культури [18, 19, 27, 30, 36]. Порівняльна візуальна, культуральна та мікроскопічна оцінка розвитку мікроводорості на середовищах ВВМ і Тамія дає змогу визначити їхню придатність для підтримання культури в лабораторних умовах і подальшого використання у біотехнологічних дослідженнях [18, 19, 27, 36].

Таким чином, дана кваліфікаційна робота присвячена дослідженню культуральних і морфологічних особливостей *H. pluvialis*, ізольованої з природного середовища, оцінці її росту на поживних середовищах ВВМ і Тамія, аналізу

окремих стадій життєвого циклу та апробації підходів до зменшення бактеріальної контамінації культури. Отримані результати можуть бути використані як підготовчий етап для подальших досліджень астаксантиногенезу та вдосконалення лабораторних методів культивування мікроводоростей у навчальних і наукових цілях.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ТА ОБҐРУНТУВАННЯ НАПРЯМУ ДОСЛІДЖЕННЯ

1.1. Біологічна характеристика *H. pluvialis* як об'єкта біотехнології

Haematococcus pluvialis — прісноводна одноклітинна зелена мікроводорість, що належить до класу *Chlorophyceae*, порядку *Volvocales* та родини *Haematococcaceae*. У науковій літературі цей вид також трапляється під синонімічними назвами *Haematococcus lacustris* та *Sphaerella lacustris*. Сучасні молекулярно-філогенетичні дослідження, зокрема аналіз рибосомальної ДНК та інших генетичних маркерів, підтвердили належність роду *Haematococcus* до групи зелених водоростей, спорідненої з такими родами, як *Chlamydomonas* і *Chlorella* [2] (рис. 1.1).

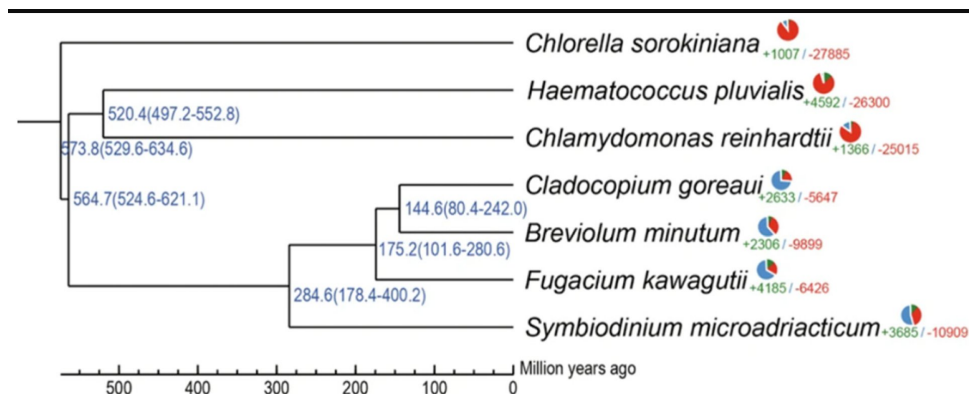


Рис. 1.1 Філогенетичне дерево семи репрезентативних видів мікроводоростей із відображенням еволюційної дивергенції та змін у сімействах генів [29]

Систематичне положення *Haematococcus* продовжує уточнюватися завдяки розвитку молекулярної філогенетики та секвенування геномів. Це дає змогу глибше охарактеризувати еволюційні зв'язки всередині групи зелених водоростей і між окремими представниками роду [2]. Вперше *Haematococcus* був описаний Й. фон Флотовим у 1844 році, а згодом Трейсі Елліот Хейзен детально описала його біологічні особливості та життєвий цикл.

Природними місцями існування *H. pluvialis* є переважно дрібні тимчасові водойми, зокрема кам'яні заглиблення, дощові калюжі, невеликі водойми з талою водою, штучні резервуари, декоративні чаші, пташині купальні, ставки та басейни [22]. Такі екотопи характеризуються нестабільними умовами середовища — періодичними змінами температури, освітленості, вологості та концентрації поживних речовин. Саме ці умови зумовили формування в *H. pluvialis* ефективних механізмів адаптації до стресових чинників [19, 22, 34, 36].

Біотехнологічна цінність *H. pluvialis* насамперед пов'язана зі здатністю синтезувати й накопичувати астаксантин — 3,3'-дигідрокси- β,β -каротен-4,4'-діон, кетокаротиноїд із вираженими антиоксидантними властивостями [1, 8, 22, 32, 34]. У стадії апланоспор вміст астаксантину в клітинах може досягати 3–5 % сухої маси біомаси, що робить цю мікрководорість одним із найбагатших природних джерел цієї сполуки [1, 22, 34].

Крім астаксантину, біомаса *H. pluvialis* містить інші цінні сполуки: лютеїн, зеаксантин, β -каротин, поліненасичені жирні кислоти, білки та полісахариди. Це створює передумови для комплексного використання біомаси з одержанням кількох біологічно цінних продуктів [1, 21, 28]. Одним із найпоширеніших напрямів практичного застосування мікрководорості *H. pluvialis* є використання її біомаси у складі кормів для аквакультури. Висушена та подрібнена біомаса *H. pluvialis*,

відома як *dried algal meal*, застосовується як кормова добавка для покращення пігментації м'яса лососевих риб, форелі та панцира ракоподібних, що має важливе значення для товарної якості продукції [9, 13, 32].

H. pluvialis також розглядають як джерело білка для функціональних харчових продуктів, біологічно активних добавок і кормів для тварин. Загальний вміст білка в клітинах залежить від умов культивування та стадії розвитку, однак у середньому становить 30–45 % сухої маси [25, 27, 28]. За дії стресових чинників метаболізм клітин переорієнтовується на накопичення каротиноїдів, тоді як вміст білка може знижуватися. Тому під час культивування важливо враховувати цільове призначення біомаси та, відповідно, оптимізувати умови росту [23, 27, 28].

Окремий інтерес становить використання *H. pluvialis* як потенційної сировини для отримання біопалива. За стресових умов ця мікроводорість здатна накопичувати значну кількість ліпідів, вміст яких може досягати 20–40 % сухої маси [21, 24]. Ліпідна фракція може бути використана для виробництва біодизеля, а залишкова біомаса після вилучення астаксантину та ліпідів — для отримання біогазу шляхом анаеробного зброджування [11, 21, 24]. Водночас промислове використання *H. pluvialis* для виробництва біопалива наразі обмежується високою вартістю культивування, збору та переробки біомаси. Тому найбільш доцільним вважається інтегрований підхід, за якого основним цільовим продуктом є астаксантин, а залишкова біомаса використовується для отримання супутніх біопродуктів [11, 21, 24, 29].

Отже, *H. pluvialis* є цінним біотехнологічним об'єктом завдяки здатності накопичувати астаксантин, білки, ліпіди та інші біологічно активні речовини [1, 21, 22, 28]. Її використання є перспективним для аквакультури, харчової, фармацевтичної, косметичної, кормової та біоенергетичної галузей [6, 9, 13, 28, 32].

1.2. Життєвий цикл і морфологічні стадії *H. pluvialis*

Життєвий цикл *H. pluvialis* є складним і включає кілька морфологічних стадій, зміна яких залежить від умов середовища. Саме особливості клітинної морфології та фізіологічної відповіді на стресові чинники визначають здатність цієї мікроводорості до накопичення астаксантину [5, 22, 35].

За сприятливих умов культивування переважають зелені рухливі вегетативні клітини сферичної або овальної форми. Вони мають два джгутики, що забезпечують активний рух у водному середовищі, а також чашоподібний хлоропласт, ядро, скоротливі вакуолі та світлочутливе вічко, яке бере участь у фототаксисі [5, 22, 35]. На цьому етапі основним пігментом є хлорофіл, а вміст каротиноїдів залишається відносно низьким (рис. 1.2).

Узагальнена схема життєвого циклу *Haematococcus pluvialis*
та переходу до накопичення астаксантину



Рис. 1.2 Схематичне зображення основних морфологічних стадій життєвого циклу *H. pluvialis* та переходу клітин від зеленої вегетативної стадії до червоних товстостінних цист, що супроводжується накопиченням астаксантину

За оптимальних умов клітини активно ростуть і розмножуються шляхом мітотичного поділу з утворенням зооспор. Зооспори мають джгутики та здатні до активного руху, що забезпечує їх переміщення у напрямку сприятливіших умов розвитку [35]. Ця стадія характеризується високою фотосинтетичною активністю та інтенсивним накопиченням біомаси [18, 35].

За дії несприятливих чинників, зокрема дефіциту поживних речовин, високої інтенсивності освітлення, підвищення температури або збільшення солоності, клітини переходять у стресову фазу [16, 19, 22, 34, 36]. У цей період рухливі зелені клітини втрачають джгутики, округлюються та переходять у нерухому пальмелоподібну стадію. Одночасно відбувається потовщення клітинної оболонки й накопичення резервних речовин, зокрема ліпідів і каротиноїдів [18, 22, 26, 35].

Найхарактернішою стадією життєвого циклу *N. pluvialis* є формування апланоспор, або гематоцист. Вони мають інтенсивне червоне забарвлення, зумовлене накопиченням астаксантину. У цій стадії клітини вкриваються товстою багат шаровою оболонкою, що забезпечує захист від несприятливих чинників довкілля. Астаксантин накопичується переважно в цитоплазматичних ліпідних краплях, локалізованих навколо хлоропласта [22, 26, 34].

Утворення товстостінних цист і накопичення астаксантину є важливими адаптаційними механізмами *N. pluvialis*. Вони забезпечують захист клітинних структур від ультрафіолетового випромінювання, активних форм кисню, температурного та осмотичного стресу [16, 22, 34]. Морфологічні зміни клітин супроводжуються перебудовою метаболізму: у зеленій фазі переважають процеси росту, синтезу білків і хлорофілу, тоді як у стресовій фазі активується синтез ліпідів і каротиноїдів [16, 22, 34, 36].

Клітинна оболонка *H. pluvialis* також зазнає істотних змін упродовж життєвого циклу. У вегетативних клітин вона є відносно тонкою та еластичною, що забезпечує рухливість і газообмін [5, 22, 35]. У стадії гематоцист оболонка потовщується та стає стійкішою до механічних і хімічних впливів, що ускладнює екстракцію астаксантину та потребує застосування спеціальних методів руйнування клітинної стінки [12, 20, 26].

Здатність *H. pluvialis* переходити від стадії активного росту до стадії накопичення астаксантину лежить в основі двостадійного культивування. На першому етапі створюють оптимальні умови для нарощування біомаси, а на другому — застосовують стресові чинники для індукції каротиногенезу [19, 22, 34, 36]. Такий підхід дає змогу окремо оптимізувати процеси росту клітин і синтезу цільового метаболіту.

Отже, життєвий цикл *H. pluvialis* тісно пов'язаний із процесами адаптації до стресових умов і накопиченням астаксантину [5, 22, 34, 35]. Розуміння морфологічних стадій цієї мікроводорості є важливим для розроблення ефективних схем її лабораторного та промислового культивування.

1.3. Особливості ізоляції та лабораторного культивування *H. pluvialis*

Ізоляція та підтримання культури *H. pluvialis* є важливими етапами роботи з природними ізолятами цієї мікроводорості. У природних умовах *H. pluvialis* часто трапляється у тимчасових водоймах, дощових калюжах, на поверхні каміння та в інших прісноводних екотопах, що характеризуються нестабільними умовами середовища [22]. Такі зразки зазвичай містять не лише клітини мікроводоростей, а

й супутню бактеріальну, грибну та протозойну мікрофлору, тому процес ізоляції потребує ретельного мікробіологічного контролю [7, 33].

Ізоляція *H. pluvialis* зазвичай починається з відбору природного матеріалу — води, мулу або субстрату з водойм. Надалі зразки переносять на поживні агарові середовища у стерильних умовах, а після появи ізольованих колоній переводять у рідке середовище для подальшого культивування [7, 33]. Особливе значення має мінімізація бактеріальної та грибної контамінації, оскільки *H. pluvialis* росте відносно повільно й може пригнічуватися супутньою мікрофлорою [17, 33].

Після ізоляції культура потребує адаптації до лабораторних умов. Цей етап передбачає поступове переведення клітин із природного середовища у контрольовані умови культивування, зокрема стабільний температурний режим, визначений фотоперіод, відповідний склад поживного середовища та регулярний мікроскопічний контроль [8, 18, 19, 22, 36]. Адаптація є необхідною для забезпечення стабільного росту культури та подальшого використання її в експериментальних дослідженнях.

Вибір поживного середовища є одним із ключових чинників успішного культивування *H. pluvialis*. Склад середовища визначає доступність макро- і мікроелементів, швидкість росту, інтенсивність накопичення біомаси, фізіологічний стан клітин і їхню здатність реагувати на стресові чинники [18, 19, 27, 30, 36].

Bold's Basal Medium, або BBM, є класичним середовищем для культивування прісноводних зелених мікроводоростей. Воно містить неорганічні солі, джерела азоту й фосфору, а також комплекс мікроелементів, необхідних для підтримання фототрофного росту. У дослідженнях *H. pluvialis* BBM часто використовують як

базове середовище для підтримання культури та порівняння з іншими середовищами [18, 27, 36].

Середовище Тамія історично застосовується для культивування прісноводних мікроводоростей, зокрема *Chlorella* та інших представників *Chlorophyta*. Його використання у порівняльних експериментах із *H. pluvialis* дає змогу оцінити реакцію клітин на інше співвідношення макро- і мікроелементів та визначити придатність середовища для підтримання культури в лабораторних умовах [18, 19, 36].

У дослідженнях *H. pluvialis* також застосовують BG-11 та Optimal Haematococcus Medium, або ОНМ. Середовище BG-11 містить відносно високі концентрації нітратів і фосфатів, що може сприяти активному росту клітин у зеленій стадії [27]. Середовище ОНМ є спеціально адаптованим для культивування *Haematococcus* та споріднених видів, і використовується у дослідженнях росту культури та синтезу астаксантину [30] (табл. 1.1).

Таблиця 1.1

Порівняльна характеристика поживних середовищ, що використовуються для культивування *H. pluvialis*

| Поживне середовище | Основна характеристика | Значення для культивування |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ВВМ | Базове мінеральне середовище для культивування прісноводних зелених мікроводоростей; містить джерела азоту, фосфору та комплекс мікроелементів. | Використовується для підтримання зеленої вегетативної стадії, накопичення біомаси та порівняльної оцінки росту культури [27]. |
| Тамія | Мінеральне середовище, історично застосовуване для | Дає змогу оцінити реакцію <i>H. pluvialis</i> на альтернативне |

| | | |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | культивування <i>Chlorella</i> та інших представників <i>Chlorophyta</i> . | співвідношення макро- і мікроелементів та визначити її придатність для лабораторного підтримання культури [18, 19, 36]. |
| BG-11 | Середовище з відносно високим вмістом нітратів, фосфатів, солей магнію та кальцію, а також мікроелементів. | Може забезпечувати активний ріст клітин у зеленій стадії та високу продуктивність біомаси за достатнього азотного живлення [27]. |
| ОНМ | Спеціалізоване середовище, адаптоване для культивування <i>Haematococcus</i> та споріднених видів. | Використовується у дослідженнях росту культури та синтезу астаксантину, зокрема для оптимізації умов культивування [30]. |

Серед основних фізико-хімічних чинників, що впливають на ріст *H. pluvialis*, важливе значення мають освітлення та температура. У зеленій фазі культивування зазвичай застосовують помірну інтенсивність освітлення та фотоперіод, що сприяє активному поділу клітин і накопиченню біомаси [8, 18, 22, 36]. Підвищення інтенсивності світла, дефіцит азоту або інші стресові чинники можуть стимулювати перехід клітин у червону стадію та накопичення астаксантину [15, 16, 22, 34, 36]. Оптимальна температура для лабораторного культивування *H. pluvialis* зазвичай становить 20–25 °С; відхилення від цього діапазону може пригнічувати ріст або передчасно індукувати каротиногенез [8, 22, 36].

Отже, успішне культивування *H. pluvialis* потребує поєднання кількох умов: якісної ізоляції природного матеріалу, поступової адаптації культури, підбору поживного середовища, контролю температури й освітлення та постійного мікроскопічного моніторингу стану клітин.

1.4. Бактеріальна контамінація культур мікроводоростей і підходи до їх очищення

Культивування *H. pluvialis* у лабораторних і промислових умовах часто ускладнюється мікробною контамінацією. Бактерії можуть потрапляти в культуру з природних зразків, води, повітря, лабораторного обладнання або під час перенесення культури [7, 33]. Оскільки *H. pluvialis* характеризується відносно повільним ростом, супутня мікрофлора може швидко конкурувати з мікроводорістю за поживні речовини, що призводить до пригнічення росту, зниження накопичення біомаси та потенційного зменшення продуктивності астаксантину [33].

У сучасних дослідженнях значну увагу приділяють не лише бактеріальній, а й комплексній мікробній контамінації, яка може включати бактерії, гриби та паразитичні організми. Зокрема, описано випадки ураження культур *H. pluvialis* хітридієвими грибами, що спричиняли значні втрати астаксантину. Водночас фунгіцидні обробки за певних концентрацій можуть негативно впливати на саму культуру [17]. Це підкреслює необхідність обережного й науково обґрунтованого підходу до очищення культур мікроводоростей.

Бактеріальна контамінація не завжди є візуально помітною, однак вона може істотно впливати на стан культури. Бактерії споживають поживні речовини, змінюють рН середовища, виділяють метаболіти та можуть спричиняти лізис клітин мікроводорості. Крім того, розвиток супутньої мікрофлори ускладнює інтерпретацію результатів експериментів, особливо під час оцінки ростових характеристик, фізіологічного стану клітин і накопичення біологічно активних сполук [7, 31, 33].

Одним із підходів до зменшення бактеріальної контамінації культур мікроводоростей є застосування антибіотиків у поживному середовищі. Антибіотична обробка може пригнічувати бактеріальну мікрофлору й сприяти отриманню культур із нижчим рівнем контамінації [10, 14, 33]. Наприклад, під час культивування *IsochrYSIS* комбінації стрептоміцину, канаміцину та гентаміцину давали змогу зменшувати бактеріальне забруднення й отримувати аксенічні культури [10].

Для очищення культур можуть застосовуватися бактерицидні антибіотики, які порушують формування клітинної стінки бактерій, а також бактериостатичні препарати, що пригнічують ріст і поділ бактеріальних клітин [7, 10, 14]. Водночас застосування антибіотиків має обмеження: окремі бактерії можуть бути резистентними до певних препаратів, деякі антибіотики можуть впливати на метаболізм мікроводорості, а тривале або неконтрольоване використання препаратів може сприяти формуванню резистентних бактеріальних популяцій [10, 14, 31, 33].

Тому очищення культур мікроводоростей потребує комплексного підходу, який поєднує антибіотичну обробку, регулярне пересівання, мікроскопічний контроль і дотримання стерильних умов. Важливими профілактичними заходами є стерильна підготовка поживних середовищ, автоклавування або фільтрація розчинів, робота в ламінарному боксі, ультрафіолетова обробка робочих поверхонь, використання стерильного інструментарію та своєчасний контроль стану культури.

Отже, бактеріальна контамінація є одним із ключових методичних ускладнень під час роботи з природними ізолятами *H. pluvialis*. Її мінімізація є необхідною умовою для стабільного культивування мікроводорості та подальшого дослідження її біотехнологічного потенціалу.

1.5. Астаксантин як цільовий біотехнологічний продукт *H. pluvialis*

Астаксантин є природним кисневмісним каротиноїдом із групи ксантофілів, який характеризується високою біологічною активністю та вираженим антиоксидантним потенціалом [6, 22, 32]. За хімічною природою він належить до тетратерпеноїдів і має молекулярну формулу $C_{40}H_{52}O_4$. Його молекулярна структура включає два окисеновані іононові кільця та кон'югований полієновий ланцюг, що забезпечує здатність молекули нейтралізувати активні форми кисню та вільні радикали [6, 32] (рис. 1.3).

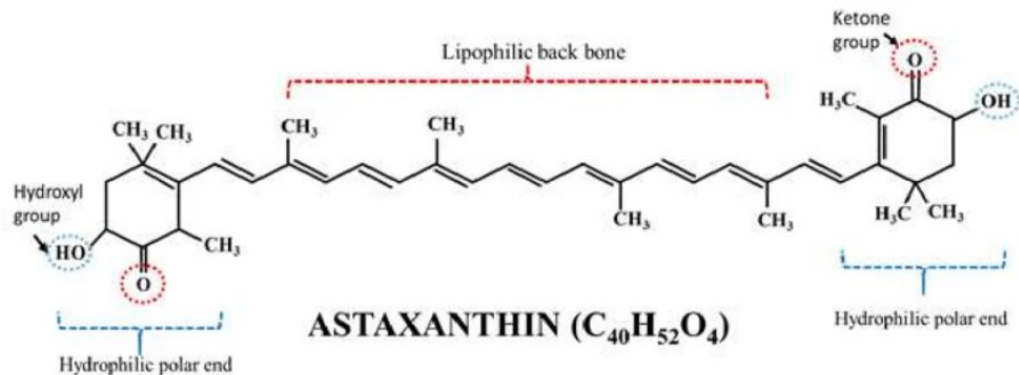


Рис. 1.3 Структура астаксантину [32]

Астаксантин має червоно-оранжеве забарвлення, добре розчиняється в органічних розчинниках і є жиророзчинною сполукою, що визначає його накопичення у клітинних мембранах та ліпідних структурах [6, 20, 26]. Завдяки особливостям молекулярної будови він може локалізуватися у фосфоліпідному бішарі мембран, стабілізувати їхню структуру та запобігати перекисному окисненню ліпідів [6, 32].

У клітинах мікроводоростей астаксантин виконує насамперед захисну функцію. За умов надлишкового освітлення, дефіциту поживних речовин,

підвищеної солоності або інших стресових чинників він знижує рівень окисного пошкодження, захищає фотосинтетичний апарат і сприяє виживанню клітин [16, 22, 34, 36]. У *H. pluvialis* астаксантин накопичується переважно у стадії цист, що супроводжується характерним почервонінням клітин [22, 26, 34].

Астаксантин має широкий спектр потенційних практичних застосувань. У фармацевтичній і медичній галузях його розглядають як природний антиоксидант із протизапальними, імуномодулюючими, кардіопротекторними та нейропротекторними властивостями [6, 32]. Він здатний зменшувати перекисне окиснення ліпідів, стабілізувати клітинні мембрани та нейтралізувати активні форми кисню [6, 32]. Також описано його позитивний вплив на функціонування серцево-судинної системи, органів зору та нервової тканини [6].

У косметології та дерматології астаксантин використовують завдяки його здатності захищати клітини шкіри від фотостаріння та оксидативного пошкодження [6, 28]. У харчовій промисловості його застосовують як натуральний барвник і функціональний інгредієнт продуктів оздоровчого призначення [1, 28]. Особливо важливе значення астаксантин має в аквакультури, де його додають до кормів для покращення пігментації лососевих риб, форелі, креветок та інших гідробіонтів [9, 13, 32].

Природний астаксантин із *H. pluvialis* вважається ціннішим порівняно із синтетичними аналогами завдяки наявності природних стереоізомерів і вищій біологічній активності [1, 6, 22, 32]. Це зумовлює зростання попиту на біотехнологічне виробництво астаксантину з мікроводоростей [1, 8, 11, 22].

Отже, астаксантин є основним цільовим продуктом *H. pluvialis* і визначає її високу біотехнологічну цінність. Подальші дослідження, спрямовані на оптимізацію умов культивування, очищення культури та індукцію каротиногенезу,

є важливими для підвищення ефективності отримання цього природного каротиноїду.

Аналіз наукової літератури свідчить, що *H. pluvialis* є перспективним об'єктом сучасної альгобіотехнології завдяки здатності накопичувати астаксантин та інші біологічно активні сполуки. Біотехнологічний потенціал цієї мікроводорості значною мірою визначається особливостями її життєвого циклу, зокрема переходом від зеленої вегетативної стадії до червоних товстостінних цист за дії стресових чинників.

Для ефективного використання *H. pluvialis* у лабораторних і прикладних дослідженнях важливе значення мають ізоляція культури з природного середовища, її адаптація до контрольованих умов, підбір поживного середовища та зменшення бактеріальної контамінації. Саме ці етапи є необхідною передумовою для подальших досліджень індукції каротиногенезу та накопичення астаксантину.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Загальна схема дослідження

Дослідження проводили за поетапною схемою, що включала ізоляцію природного матеріалу, попередню морфологічну ідентифікацію *H. pluvialis*, адаптацію культури до лабораторних умов, культивування на поживних середовищах ВВМ і Тамія, мікроскопічний моніторинг морфологічного стану клітин та апробацію підходів до зменшення бактеріальної контамінації.

Загальна схема дослідження



Рис. 2.1. Загальна схема організації дослідження культури *H. pluvialis*

Оцінку результатів здійснювали за візуальними, культуральними та мікроскопічними ознаками з використанням описово-аналітичного підходу.

2.2. Об'єкт дослідження та ізоляція *H. pluvialis* із природного середовища

Об'єктом дослідження була культура зеленої мікроводорості *H. pluvialis*, ізольована з природного середовища. Вибір цього виду зумовлений його біотехнологічною цінністю, особливостями життєвого циклу та здатністю накопичувати каротиноїди, зокрема астаксантин, за дії несприятливих чинників середовища.

Первинний матеріал для дослідження відбирали з природного водного середовища, у якому візуально спостерігали ознаки розвитку мікроскопічних водоростей. Відбір проб здійснювали у стерильні ємності з дотриманням умов, спрямованих на мінімізацію додаткової контамінації зразка. Після транспортування до лабораторії проби переглядали методом світлової мікроскопії з метою виявлення клітин, морфологічно подібних до *H. pluvialis*.

Мікроскопічні дослідження проводили за допомогою мікроскопа Carl Zeiss AxioLab A1 FL (Німеччина), оснащеного системою для світлової та флуоресцентної мікроскопії. Реєстрацію зображень здійснювали з використанням кольорової цифрової камери AxioCam 208 color, інтегрованої з мікроскопом.

Роботу з культурою проводили у ламінарній шафі біологічної безпеки II класу Streamline SC2-4S1 (Esco, Сінгапур) із дотриманням правил асептики. Це давало змогу зменшити ризик внесення сторонньої мікрофлори під час перенесення

культури, приготування середовищ і виконання маніпуляцій із дослідним матеріалом.

Попередню ідентифікацію мікроводорості здійснювали на основі морфологічних ознак: наявності округлих або овальних клітин, зеленого забарвлення вегетативних форм, рухливих клітин із джгутиками, а також нерухомих клітин із потовщеною оболонкою. Особливу увагу приділяли зміні морфологічного стану клітин у процесі культивування, оскільки для *H. pluvialis* характерний перехід від рухливих зелених вегетативних форм до нерухомих пальмелоподібних і цистоподібних стадій.

Для отримання лабораторної культури частину природного матеріалу переносили у рідкі поживні середовища. Подальше підтримання культури здійснювали шляхом періодичного пересівання у свіже середовище. На початкових етапах культура не була аксенічною, оскільки природний матеріал містив супутню бактеріальну мікрофлору. У зв'язку з цим одним із завдань роботи було відпрацювання підходів до зменшення бактеріальної контамінації та отримання культури *H. pluvialis* із нижчим рівнем супутньої мікрофлори.

2.3. Культивування *H. pluvialis* на різних поживних середовищах

Культивування *H. pluvialis* проводили у лабораторних умовах із контролем основних параметрів середовища. Для оцінки придатності поживних середовищ до підтримання росту культури використовували два варіанти: BBM та середовище Тамія. Обидва середовища містять мінеральні компоненти, необхідні для підтримання життєдіяльності фотосинтетичних мікроорганізмів.

Поживні середовища готували на основі дистильованої води з додаванням відповідних мінеральних компонентів. До їхнього складу входили джерела азоту, фосфору, калію, магнію, кальцію та мікроелементи, необхідні для росту зелених мікроводоростей. Після приготування середовище стерилізували для зменшення ризику мікробної контамінації.

Культивування проводили у стерильному лабораторному посуді за умов освітлення, придатних для фототрофного росту мікроводоростей. Оптимальний температурний режим для підтримання зеленої вегетативної стадії *N. pluvialis* становить переважно 20–25 °С, оскільки такі умови сприяють активному росту клітин і накопиченню біомаси без передчасної індукції стресових форм. Культури періодично перемішували для запобігання осіданню клітин, покращення доступу світла та рівномірного розподілу біомаси у середовищі.

Таблиця 2.1

Компонентний склад поживних середовищ BBM і Тамія, використаних у дослідженні, мг/л

| Компонент | BBM | Тамія |
|---------------------------------------|------------|--------------|
| Макроелементи | | |
| K ₂ HPO ₄ | 75 | – |
| KH ₂ PO ₄ | 175 | 1000 |
| NaNO ₃ | 250 | – |
| KNO ₃ | – | 500 |
| MgSO ₄ × 7H ₂ O | 75 | 100 |
| CaCl ₂ × 2H ₂ O | 25 | – |
| NaCl | 25 | – |
| Мікроелементи | | |

| | | |
|-------------------------------------------------------|------|------|
| $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 160 | 160 |
| $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 100 | 100 |
| H_3BO_3 | 0,28 | 0,28 |
| $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,22 | 0,22 |
| $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,04 | 0,04 |
| $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | 2,86 | 2,86 |
| $\text{MnCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,90 | 0,90 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,06 | 0,06 |

Оцінку росту культури на двох поживних середовищах здійснювали за візуальними, культуральними та мікроскопічними ознаками без побудови повних кривих росту. Враховували інтенсивність забарвлення культуральної суспензії, ступінь помутніння середовища, наявність осаду, загальний стан культури та морфологічні ознаки клітин під мікроскопом. Порівняння середовищ проводили за їх здатністю підтримувати життєздатність культури, збереження зелених вегетативних форм і загальну активність розвитку *H. pluvialis*.

Під час культивування особливу увагу приділяли зміні морфологічного стану клітин. У сприятливих умовах у культурі переважали зелені клітини, тоді як за погіршення умов або старіння культури спостерігали округлення клітин, втрату рухливості та появу нерухомих форм. Такі зміни розглядали як прояви природної морфологічної мінливості *H. pluvialis* у лабораторних умовах.

2.4. Мікроскопічне дослідження морфології та життєвого циклу *H. pluvialis*

Морфологічний стан клітин *H. pluvialis* досліджували методом світлової мікроскопії. Для цього краплю культуральної суспензії наносили на предметне скло, накривали покривним скельцем і переглядали під мікроскопом при різних збільшеннях. Мікроскопічні спостереження проводили в динаміці культивування для виявлення змін клітинної морфології та оцінки окремих стадій життєвого циклу.

Під час мікроскопічного аналізу враховували форму клітин, їх розміри, забарвлення, наявність або відсутність рухливості, стан клітинної оболонки, наявність хлоропласта, а також появу нерухомих пальмелоподібних або цистоподібних форм. Окрему увагу приділяли виявленню зелених вегетативних клітин, що свідчать про активний фізіологічний стан культури, та округлих нерухомих клітин, характерних для переходу до менш активного або стресового стану.

Спостереження за життєвим циклом проводили описовим методом. Фіксували наявність різних морфологічних форм *H. pluvialis* у культурі та їх зміну в процесі культивування. Отримані мікроскопічні дані використовували для попереднього підтвердження належності досліджуваної культури до *H. pluvialis* та оцінки її придатності до подальшого лабораторного підтримання.

Оскільки в межах роботи не проводили кількісне визначення астаксантину, зміни забарвлення клітин розглядали лише як морфологічну та візуальну ознаку зміни фізіологічного стану культури. Наявність оранжевого або червонуватого відтінку окремих клітин не використовували як кількісний показник накопичення

астаксантину, а трактували як потенційну ознаку переходу клітин до стресових форм, що потребує подальшого підтвердження спеціальними аналітичними методами.

2.5. Очищення культури *H. pluvialis* від бактеріальної контамінації

Оскільки культура *H. pluvialis* була ізольована з природного середовища, вона містила супутню бактеріальну мікрофлору. Наявність бактеріальної контамінації оцінювали за результатами мікроскопічного перегляду культуральної суспензії та загальним станом культури під час вирощування. Ознаками контамінації вважали наявність дрібних рухливих або нерухомих бактеріальних клітин у середовищі, помутніння культуральної рідини, утворення слизистих включень або зміну характеру росту культури.

Для зменшення бактеріальної контамінації культури *H. pluvialis* проводили антибіотичну обробку з використанням гентаміцину та стрептоміцину. Гентаміцин застосовували у робочій концентрації 50 мг/л, стрептоміцин — 100 мг/л культурального середовища. Антибіотики вносили безпосередньо у культуральне середовище з подальшим інкубуванням культури в лабораторних умовах. Метою обробки було пригнічення росту супутньої бактеріальної мікрофлори за умови збереження життєздатності клітин мікроводорості.

Після внесення антибіотиків проводили регулярне спостереження за станом культури. Оцінювали прозорість середовища, наявність або зменшення бактеріальної контамінації, морфологічний стан клітин мікроводорості, інтенсивність їх забарвлення та загальну життєздатність культури. Ефективність

застосування антибіотиків оцінювали порівняно — за ступенем зменшення бактеріальної мікрофлори та збереженням клітин *H. pluvialis* у культурі.

Під час інтерпретації результатів враховували, що застосування антибіотиків може мати неоднозначний вплив на альгологічну культуру. З одного боку, антибіотики здатні зменшувати кількість бактеріальних контамінантів, з іншого — можуть впливати на загальний стан культури, змінювати мікробні взаємодії у середовищі або пригнічувати розвиток мікроводорості. Тому отримані результати розглядали як попередній етап відпрацювання методики очищення культури, що потребує подальшої оптимізації.

2.6. Описово-аналітична обробка результатів

Отримані результати аналізували з використанням описового та порівняльного підходів. Оцінку росту *H. pluvialis* на двох поживних середовищах проводили за візуальними, культуральними та мікроскопічними ознаками. Порівнювали загальний стан культури, інтенсивність розвитку, наявність морфологічних змін клітин, а також здатність культури зберігати життєздатність у лабораторних умовах.

Результати мікроскопічного дослідження використовували для характеристики основних морфологічних форм *H. pluvialis* та опису окремих стадій її життєвого циклу. Дані щодо очищення культури від бактеріальної контамінації аналізували за ефективністю двох застосованих антибіотичних препаратів та їхнім впливом на стан мікроводорості.

Кількісне визначення астаксантину, побудову повних кривих росту та спектрофотометричний аналіз пігментів у межах цієї роботи не проводили.

Відповідно, отримані результати розглядаються як підготовчий етап для подальших досліджень, спрямованих на індукцію каротиногенезу та аналітичне визначення астаксантину у культурі *H. pluvialis*.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ АНАЛІЗ

3.1. Ізоляція *H. pluvialis* із природного середовища

На першому етапі дослідження було проведено відбір природного матеріалу з метою виявлення та подальшого культивування мікроводорості *H. pluvialis* у лабораторних умовах. Первинний зразок являв собою змішаний природний матеріал, що містив мікроскопічні водорості, бактеріальну мікрофлору та інші супутні мікроорганізми, що є типовими для природних водних екотопів.

Після транспортування зразка до лабораторії було проведено його мікроскопічний аналіз. У препаратах виявлено клітини, морфологічно подібні до *H. pluvialis*: округлі або овальні зелені клітини, окремі рухливі форми, а також нерухомі клітини з більш щільною оболонкою. Наявність різних морфологічних форм свідчила про неоднорідний фізіологічний стан культури та можливий перехід клітин між окремими стадіями життєвого циклу.

Попередню ідентифікацію культури здійснювали за морфологічними ознаками, характерними для *H. pluvialis*, зокрема за формою клітин, забарвленням, наявністю рухливих форм і появою нерухомих округлих клітин. Слід зазначити, що така ідентифікація має попередній характер, оскільки у межах роботи не проводили молекулярно-генетичне підтвердження видової належності культури.

На початкових етапах культивування отримана культура не була аксенічною, оскільки у зразку спостерігалася бактеріальна контамінація. Наявність супутньої бактеріальної мікрофлори ускладнювала підтримання культури та зумовлювала

необхідність подальшої апробації підходів до її очищення. Водночас виявлення життєздатних клітин *H. pluvialis* у природному матеріалі дало змогу перейти до наступних етапів дослідження — культивування на поживних середовищах, мікроскопічного моніторингу та оцінки підходів до зменшення бактеріальної контамінації.

Таким чином, у результаті первинної ізоляції з природного середовища було отримано змішану лабораторну культуру, що містила клітини *H. pluvialis* та супутню бактеріальну мікрофлору. Отриманий матеріал використано для подальшого культивування на середовищах ВВМ і Тамія, морфологічного аналізу та апробації методів очищення культури.

3.2. Оцінка росту *H. pluvialis* на середовищах ВВМ та Тамія

Для оцінки придатності різних поживних середовищ до підтримання культури *H. pluvialis* було проведено культивування на двох середовищах — ВВМ та середовищі Тамія. Культивування здійснювали за температури 20–25 °С, що є оптимальною для підтримання зеленої вегетативної стадії *H. pluvialis* та сприяє росту клітин без передчасної індукції стресових форм.

Оцінку росту проводили за візуальними, культуральними та мікроскопічними ознаками. У межах роботи не здійснювали побудову повних кривих росту, визначення сухої біомаси, регулярний підрахунок клітин або спектрофотометричне вимірювання оптичної густини. Тому отримані результати слід розглядати як якісну порівняльну оцінку здатності середовищ підтримувати життєздатність культури.

Під час культивування враховували інтенсивність забарвлення культуральної суспензії, прозорість або помутніння середовища, наявність осаду, загальний стан

культури та морфологічні особливості клітин під мікроскопом. На обох середовищах спостерігали збереження життєздатних клітин *H. pluvialis*, однак характер розвитку культури мав певні відмінності.

На середовищі BBM культура зберігала характерне зелене забарвлення, що свідчило про наявність фотосинтетично активних клітин. Водночас у процесі культивування спостерігали появу окремих нерухомих округлих форм. Це могло бути пов'язано з адаптацією клітин до лабораторних умов, зміною складу середовища або поступовим старінням культури.

На середовищі Тамія також спостерігали підтримання життєздатності культури *H. pluvialis*. За візуальними ознаками культура характеризувалася зеленим забарвленням і поступовим розвитком клітинної суспензії. Під час мікроскопічного аналізу виявляли зелені клітини округлої або овальної форми, а також окремі нерухомі форми. Це свідчило про здатність культури адаптуватися до цього середовища та зберігати життєздатність у лабораторних умовах (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Порівняльна характеристика стану культури *H. pluvialis* на середовищах BBM та Тамія

| Критерій оцінки | BBM | Тамія |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Візуальний стан культури | Зелене забарвлення суспензії, поступова адаптація культури | Зелене забарвлення суспензії, підтримання життєздатності клітин |
| Морфологічний стан клітин | Зелені округлі та овальні клітини, поява окремих нерухомих форм | Зелені клітини округлої або овальної форми, окремі нерухомі форми |
| Ознаки переходу до стресових форм | Округлення частини клітин, поява пальмелоподібних форм | Поодинокі морфологічні зміни залежно від стану культури |

| | | |
|----------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Бактеріальна контамінація | Наявна, потребує контролю | Наявна, потребує контролю |
| Загальна придатність середовища | Придатне для підтримання культури | Придатне для підтримання культури |

Порівняльна оцінка двох середовищ показала, що обидва варіанти можуть бути використані для лабораторного підтримання культури *H. pluvialis*. Водночас відмінності у візуальному стані суспензії, морфології клітин і ступені прояву супутньої мікрофлори свідчать про необхідність подальшої оптимізації умов культивування. Отримані дані не дають підстав для кількісного порівняння інтенсивності росту, однак підтверджують можливість підтримання культури на обох досліджуваних середовищах.

Таким чином, культивування на середовищах ВВМ і Тамія дозволило оцінити загальну здатність ізольованої культури *H. pluvialis* адаптуватися до лабораторних умов. Обидва середовища можуть бути використані для подальшої роботи з культурою, однак для отримання стабільної та чистішої культури необхідним є подальше вдосконалення умов культивування й очищення від бактеріальної мікрофлори.

3.3. Морфологічні особливості клітин *H. pluvialis* та спостереження за життєвим циклом

Мікроскопічне дослідження культури *H. pluvialis* дозволило виявити кілька морфологічних типів клітин, характерних для різних стадій життєвого циклу цієї мікроводорості. У препаратах спостерігали зелені клітини округлої або овальної

форми, що відповідали вегетативному стану культури. Вони мали виражене зелене забарвлення, що свідчило про наявність хлорофілу та функціонування фотосинтетичного апарату.

Окремі клітини характеризувалися рухливістю, що є типовою ознакою вегетативних форм *H. pluvialis*. Наявність рухливих клітин розглядали як один із показників життєздатності культури та активного фізіологічного стану клітин. Водночас у культурі виявляли нерухомі округлі форми, які можуть відповідати пальмелоподібним клітинам або перехідним стадіям життєвого циклу (рис. 3.1).

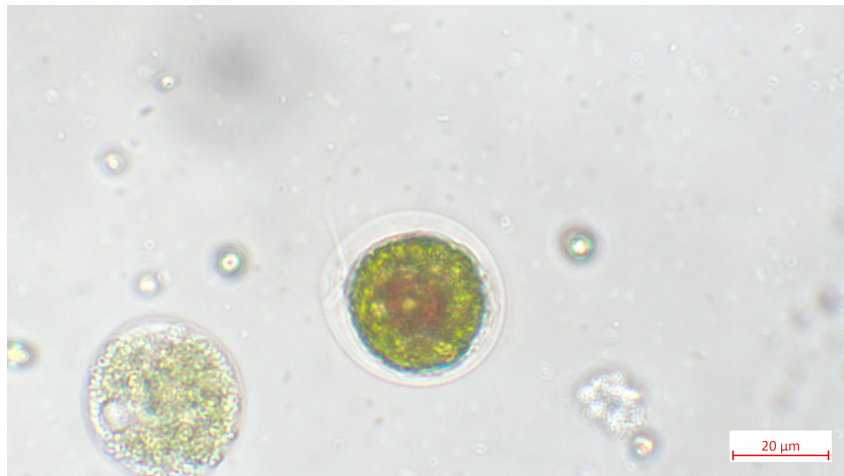


Рис. 3.1. Морфологія клітин *H. pluvialis* у лабораторній культурі: зелені округлі клітини з вираженою клітинною оболонкою та внутрішньоклітинною пігментацією. Світлова мікроскопія, масштабна лінійка — 20 мкм.

У процесі культивування спостерігали поступове збільшення частки округлих нерухомих клітин. Такі зміни можуть бути пов'язані з адаптацією культури до лабораторних умов, зміною складу поживного середовища, старінням культури або дією супутніх стресових чинників. У частини клітин відзначали ущільнення клітинної оболонки, що може свідчити про перехід до більш стійких форм існування (рис. 3.2).

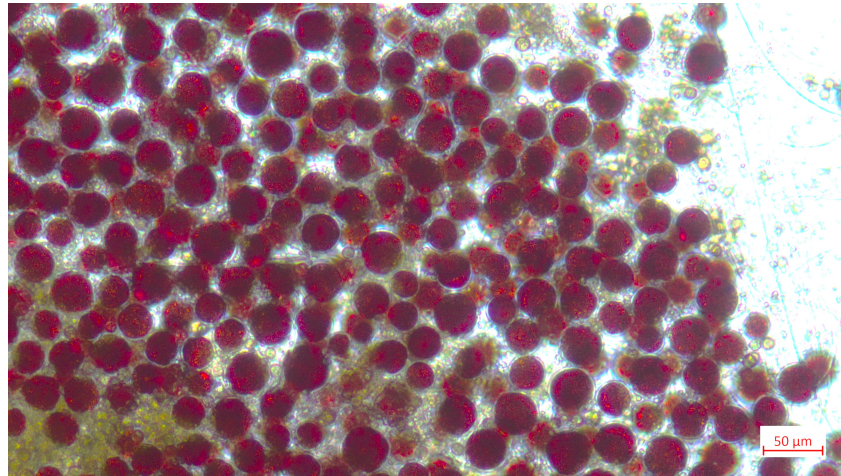


Рис. 3.2 Морфологічно неоднорідна культура *H. pluvialis* із переважанням округлих пігментованих нерухомих клітин та наявністю супутніх включень у культуральній суспензії. Світлова мікроскопія, масштабна лінійка — 50 мкм.

Зміна морфологічного стану клітин є важливою особливістю *H. pluvialis*, оскільки життєвий цикл цього виду включає чергування рухливих зелених вегетативних клітин, нерухомих пальмелоподібних форм і цистоподібних клітин. Така морфологічна пластичність забезпечує виживання мікрободорості за нестабільних умов середовища та має значення для подальших біотехнологічних досліджень.

У межах цієї роботи зміни забарвлення клітин і поява окремих нерухомих форм розглядалися як морфологічні ознаки зміни фізіологічного стану культури. Оскільки кількісне визначення астаксантину не проводилося, ці ознаки не використовували як прямий доказ накопичення астаксантину. Їх трактували як потенційні прояви переходу клітин до стресових форм, що потребує подальшого підтвердження спеціальними аналітичними методами (рис. 3.3).

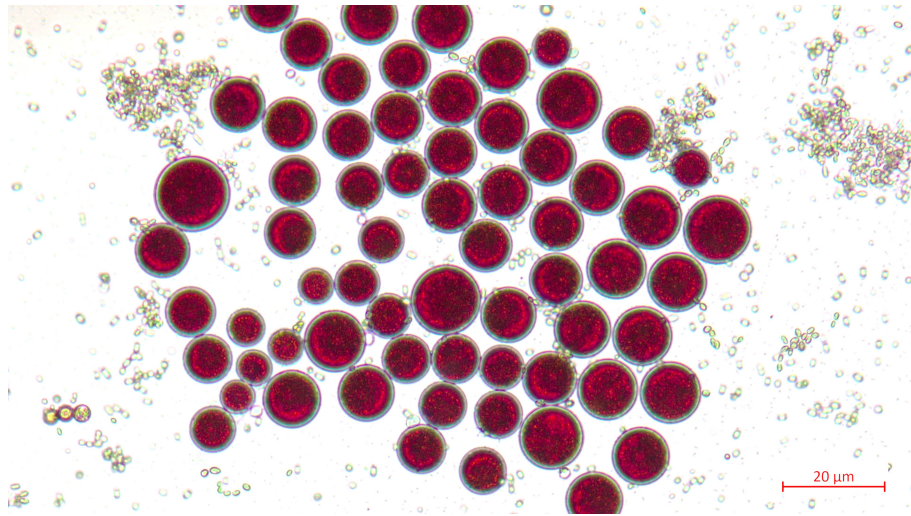


Рис. 3.3. Округлі нерухомі форми *H. pluvialis* із вираженою внутрішньоклітинною пігментацією, характерною для переходу культури до стресового фізіологічного стану. Світлова мікроскопія, масштабна лінійка — 20 мкм.

3.4. Оцінка підходів до зменшення бактеріальної контамінації культури *H. pluvialis*

Оскільки культура *H. pluvialis* була отримана з природного середовища, у ній спостерігалася супутня бактеріальна мікрофлора. Бактеріальна контамінація проявлялася наявністю дрібних бактеріальних клітин у полі зору мікроскопа, помутнінням культурального середовища та присутністю сторонніх мікроорганізмів у культуральній суспензії. Наявність бактерій ускладнювала підтримання культури та могла впливати на її розвиток.

З метою зменшення бактеріальної контамінації було проведено антибіотичну обробку культури з використанням гентаміцину та стрептоміцину. Гентаміцин застосовували у робочій концентрації 50 мг/л, стрептоміцин — 100 мг/л

культурального середовища. Антибіотики вносили безпосередньо у культуральне середовище з подальшим інкубуванням культури в лабораторних умовах. Метою обробки було пригнічення росту супутньої бактеріальної мікрофлори за умови збереження життєздатності клітин мікроводорості.

Після внесення антибіотиків оцінювали стан культури, наявність бактеріальної мікрофлори, морфологію клітин *H. pluvialis* та загальну життєздатність мікроводорості. Ефективність обробки визначали описово, шляхом порівняння стану культури без антибіотиків і після застосування відповідного препарату.

Застосування гентаміцину у концентрації 50 мг/л сприяло частковому зменшенню кількості бактеріальних клітин у культурі. Водночас повного очищення культури досягти не вдалося, що може бути пов'язано з наявністю стійких бактеріальних форм, прикріпленням бактерій до поверхні клітин мікроводорості або недостатньою тривалістю обробки. Клітини *H. pluvialis* після обробки переважно зберігали життєздатність, однак у культурі спостерігали окремі морфологічні зміни, що свідчить про необхідність подальшої оптимізації умов антибіотичної обробки.

Після застосування стрептоміцину у концентрації 100 мг/л також спостерігали зменшення бактеріального навантаження, проте ефективність очищення була неповною. У культурі залишалися поодинокі бактеріальні клітини, що підтверджує складність отримання аксенічної культури *H. pluvialis* із природного матеріалу. При цьому важливим було збереження життєздатності самої мікроводорості, оскільки надмірний або тривалий антибіотичний вплив може негативно позначатися на стані альгологічної культури (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

**Порівняльна оцінка ефективності антибіотичної обробки культури
*H. pluvialis***

| Варіант обробки | Вплив на бактеріальну контамінацію | Стан клітин | Загальна оцінка |
|-------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Без антибіотика | Бактеріальна контамінація зберігалася | Клітини життєздатні, культура змішана | Не забезпечує очищення культури |
| Гентаміцин, 50 мг/л | Часткове зменшення бактеріальної мікрофлори | Клітини мікроводорості переважно зберігали життєздатність | Перспективний варіант, потребує оптимізації тривалості обробки |
| Стрептоміцин, 100 мг/л | Часткове зменшення бактеріальної мікрофлори | Можливі зміни стану культури залежно від чутливості клітин | Потребує додаткового підбору концентрації та режиму обробки |

Таким чином, застосування гентаміцину та стрептоміцину дозволило частково зменшити бактеріальну контамінацію, однак не забезпечило повного отримання аксенічної культури. Це свідчить про необхідність поєднання антибіотичної обробки з іншими методами очищення, зокрема багаторазовим пересіванням, серійним розведенням культури, мікроскопічним контролем та, за можливості, виділенням окремих клітин або колоній.

3.5. Узагальнення результатів і значення отриманої культури для подальших досліджень астаксантиногенезу

Проведені дослідження дозволили отримати первинну лабораторну культуру *H. pluvialis*, ізольовану з природного середовища, та оцінити її здатність до підтримання росту на поживних середовищах ВВМ і Тамія. Незважаючи на наявність бактеріальної контамінації, культура зберігала життєздатність, що підтверджувалося наявністю зелених клітин і характерних морфологічних форм.

Мікроскопічні спостереження підтвердили морфологічну неоднорідність культури та наявність клітин, що відповідають різним стадіям життєвого циклу *H. pluvialis*. Це має важливе значення для подальших досліджень, оскільки здатність клітин переходити між різними морфологічними станами є передумовою для індукції каротиногенезу.

Порівняння двох поживних середовищ показало, що обидва середовища можуть використовуватися для лабораторного підтримання культури. Водночас отримані результати мають попередній якісний характер і потребують подальшого уточнення із застосуванням кількісних методів оцінки росту, зокрема підрахунку клітин, визначення оптичної густини або сухої біомаси.

Спроби очищення культури від бактеріальної контамінації з використанням гентаміцину та стрептоміцину показали часткову ефективність такого підходу. Повного очищення культури досягти не вдалося, однак встановлено, що антибіотична обробка може бути використана як один із етапів отримання культури з нижчим рівнем бактеріального забруднення. Надалі доцільним є поєднання антибіотичної обробки з методами серійного розведення, багаторазового

пересівання, культивування на агаризованих середовищах та постійного мікроскопічного контролю.

Отримані результати слід розглядати як підготовчий етап до подальших досліджень астаксантиногенезу. Для переходу до дослідження накопичення астаксантину необхідно отримати стабільну та максимально чисту культуру, оптимізувати умови її росту, а також застосувати аналітичні методи кількісного визначення пігментів.

ВИСНОВКИ

1. Проаналізовано наукові джерела щодо біологічних особливостей *H. pluvialis*, її життєвого циклу та біотехнологічного значення як природного продуцента астаксантину. Встановлено, що здатність цього виду переходити від зеленої вегетативної стадії до нерухомих товстостінних форм є основою подальших досліджень індукції каротиногенезу.

2. У результаті проведених досліджень із природного середовища було отримано первинну лабораторну культуру *H. pluvialis*. Попередню ідентифікацію культури здійснено за морфологічними ознаками, зокрема наявністю округлих або овальних зелених клітин, рухливих форм, а також нерухомих клітин із потовщеною оболонкою.

3. Показано, що отримана культура *H. pluvialis* здатна зберігати життєздатність за умов лабораторного культивування на поживних середовищах ВВМ і Тамія. Обидва середовища забезпечували підтримання зелених клітин і окремих нерухомих форм, однак отримані результати мають якісний характер і потребують подальшого уточнення із застосуванням кількісних методів оцінки росту.

4. Мікроскопічне дослідження підтвердило морфологічну неоднорідність культури *H. pluvialis*. У культурі спостерігали зелені вегетативні клітини, округлі нерухомі форми та клітини з вираженою внутрішньоклітинною пігментацією, що свідчить про зміну фізіологічного стану культури в процесі культивування. Оскільки кількісне визначення астаксантину не проводилося, зміни забарвлення

клітин розглядали як морфологічну ознаку, що потребує подальшого аналітичного підтвердження.

5. Встановлено, що культура, ізольована з природного середовища, містила супутню бактеріальну мікрофлору. Для зменшення бактеріальної контамінації було апробовано антибіотичну обробку з використанням гентаміцину у концентрації 50 мг/л і стрептоміцину у концентрації 100 мг/л. Застосування антибіотиків сприяло частковому зменшенню бактеріального забруднення, однак не забезпечило отримання повністю аксенічної культури.

6. Отримані результати свідчать, що антибіотична обробка може бути використана як один із етапів очищення культури *H. pluvialis*, проте потребує подальшої оптимізації щодо концентрації препаратів, тривалості обробки та поєднання з іншими підходами — серійним розведенням, багаторазовим пересіванням, культивуванням на агаризованих середовищах і мікроскопічним контролем.

7. Проведене дослідження є підготовчим етапом для подальшого вивчення астаксантиногенезу у *H. pluvialis*. Для переходу до досліджень накопичення астаксантину необхідно отримати стабільну культуру з мінімальним рівнем бактеріальної контамінації, оптимізувати умови культивування та застосувати аналітичні методи кількісного визначення пігментів.

8. Матеріали роботи можуть бути використані для вдосконалення лабораторних підходів до ізоляції, підтримання та очищення культур мікроводоростей, а також в освітньому процесі під час вивчення біотехнології мікроводоростей, альгології та мікробіології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Bassani J. C., da Cunha S., de Assis Leite D. C., Endres C. M., Pelisser C., Meneghetti K. L., Bombo G., Morais A. M. M. B., Morais R. M. S. C., Backes G. T., Steffens J. Exploring the Potential of *Haematococcus pluvialis* as a Source of Bioactives for Food Applications: A Review. *Microorganisms*. 2025. Vol. 13, no. 11. URL: <https://www.mdpi.com/2076-2607/13/11/2606>
2. Bian C., Liu C., Zhang G., Tao M., Huang D., Wang C., Lou S., Li H., Shi Q., Hu Z. A chromosome-level genome assembly for the astaxanthin-producing microalga *Haematococcus pluvialis*. *Scientific Data*. 2023. Vol. 10, no. 1. P. 511. URL: <https://www.nature.com/articles/s41597-023-02427-1>
3. Christian D., Zhang J., Sawdon A. J., Peng C. Enhanced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light illumination. *Bioresource Technology*. 2018. Vol. 256. P. 548–551. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.074>
4. de Moraes L. B. S., Mota G. C. P., da Silva B. A. B. et al. Integrated system for bioremediation of Nile tilapia rearing effluent and astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture International*. 2024. Vol. 32, no. 4. P. 4345–4358. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10499-021-00655-z>
5. Deng Y., Li C., Xiao Z., Chen J., Wu Z., Peng X., Lu Z., Yan W., Qu J. Monitoring the life cycle stages of *Haematococcus pluvialis* by using FLIM. 2024. P. 1310470–1310470-7. DOI: <https://doi.org/10.1117/12.3023913>
6. Donoso A., González-Durán J., Muñoz A. A., González P. A., Agurto-Muñoz C. Therapeutic uses of natural astaxanthin: An evidence-based review focused on human clinical trials. *Pharmacological Research*. 2021. Vol. 166. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661821000633>

7. Fernandez-Valenzuela S., Chávez-Ruvalcaba F., Beltran-Rocha J. C., Morales San Claudio P., Reyna-Martínez R. Isolation and Culturing Axenic Microalgae: Mini-Review. *The Open Microbiology Journal*. 2021. Vol. 15. P. 111–119. URL: <https://www.sciencedirect.com/org/science/article/pii/S1874285821000133>
8. Ha N. C., Tam L. T., Hien H. T. M., Thu N. T. H., Hong D. D., Thom L. T. Optimization of Culture Conditions for High Cell Productivity and Astaxanthin Accumulation in Vietnam's Green Microalgae *Haematococcus pluvialis* HB and a Neuroprotective Activity of Its Astaxanthin. *Bioengineering*. 2024. Vol. 11, no. 12. P. 1176. URL: <https://www.mdpi.com/2306-5354/11/12/1176>
9. Hart B., Colombo S. M. Effects of a novel weakened whole-cell form of *Haematococcus pluvialis* on flesh pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) when compared to synthetic astaxanthin. *Aquaculture Research*. 2022. Vol. 53, no. 6. P. 2408–2419. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/are.15758>
10. Huang J., Liang S., Liu H., Li Y., Wang X., Guo Y., Liang J. Establishment of Axenic Cultures for Two Marine Microalgae and the Effects of Antibiotics on Their Growth. *Water*. 2025. Vol. 17, no. 2. P. 275. DOI: <https://doi.org/10.3390/w17020275>
11. Khoo K. S., Lee S. Y., Ooi C. W., Fu X., Miao X., Ling T. C., Show P. L. Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*. 2019. Vol. 288. Article 121606. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121606>
12. Kim B., Lee S. Y., Narasimhan A. L., Kim S., Oh Y. Cell disruption and astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis*: recent advances. *Bioresource Technology*. 2021. Article 126124. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126124>
13. Lee M.-C., Huang C.-Y., Huang J., Chang C.-Y., Lee P.-T., Nan F.-H. The effect of dietary supplementation with *Haematococcus pluvialis* for enhanced pigmentation in *Amphiprion ocellaris*. *Aquaculture Research*. 2023. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2023/5542730>

14. Liu J., Sun Y., Zhang L., Li X., He Z., Zhou C., Han J. Screening of antibiotics to obtain axenic cell cultures of a marine microalga *Chrysolida roscoffensis*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2023. Vol. 11. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1218031>
15. Lutz G. A., Concas A., Damergi E., Chen L., Zhang W., Liu T. Production of Carotenoids and Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Cultivated Under Mixotrophy Using Brewery Wastewater: Effect of Light Intensity and Cultivation Time. *Applied Sciences*. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/app14219704>
16. Mansouri Z., Essahli Z., Lijassi I., Rhazi L., Wahby I. Management of growth and astaxanthin accumulation in the green microalgae *Haematococcus pluvialis*: effect of photosynthesis-related nutrients and light stress. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2025. Vol. 119. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-025-02219-0>
17. Mansouri Z., Lijassi I., Amorim A., El Aissami A., Rhazi L., Wahby I. *Haematococcus pluvialis* culture contaminated with chytrids: growth management and astaxanthin production. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2025. Vol. 118, no. 8. Article 114. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40665072/>
18. Marinho Y. F., Malafaia C. B., de Araújo K. S., da Silva T. D., Santos A. P. D., de Moraes L. B. D., Gálvez A. Evaluation of the influence of different culture media on growth, life cycle, biochemical composition, and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*. *Aquaculture International*. 2021. Vol. 29. P. 757–778. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00655-z>
19. Nahidian B., Ghanati F., Shahbazi M., Soltani N. Effect of nutrients on the growth and physiological features of newly isolated *Haematococcus pluvialis* TMU1. *Bioresource Technology*. 2018. Vol. 255. P. 229–237. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.130>
20. Nemani N., Dehnavi S. M., Pazuki G. Extraction and separation of astaxanthin with the help of pre-treatment of *Haematococcus pluvialis* microalgae

- biomass using aqueous two-phase systems based on deep eutectic solvents. *Scientific Reports*. 2024. Vol. 14. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55630-4>
21. Nishshanka G. K. S. H., Liyanaarachchi V. C., Nimarshana P. H. V., Ariyadasa T. U., Chang J.-S. *Haematococcus pluvialis*: A potential feedstock for multiple-product biorefining. *Journal of Cleaner Production*. 2022. Vol. 344. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652622007351>
22. Oslan S. N. H., Shoparwe N. F., Yusoff A. H., Rahim A. A., Chang C. S., Tan J. S., Oslan S. N., Arumugam K., Ariff A. B., Sulaiman A. Z., Mohamed M. S. A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin. *Biomolecules*. 2021. Vol. 11, no. 2. P. 256. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom11020256>
23. Pan-Utai W., Pantoa T., Prasert W., Sangkhiaw J., Rojviriyaya C., Phoovasawat C., Kantrong H. Microalgae-Enriched High-Moisture Meat Analogues: Improved Physicochemical, Functional, and Digestibility Properties. *Foods*. 2025. Vol. 14, no. 16. URL: <https://www.mdpi.com/2304-8158/14/16/2838>
24. Pandey S., Narayanan I., Selvaraj R., Varadavenkatesan T., Vinayagam R. Biodiesel production from microalgae: A comprehensive review on influential factors, transesterification processes, and challenges. *Fuel*. 2024. Vol. 367. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236124006951>
25. Prates J. A. M. Unlocking the functional and nutritional potential of microalgae proteins in food systems: A narrative review. *Foods*. 2025. Vol. 14, no. 9. URL: <https://www.mdpi.com/2304-8158/14/9/1524>
26. Praveenkumar R., Lee J., Vijayan D., Lee S. Y., Lee K., Sim S., Hong M., Kim Y.-E., Oh Y. Morphological Change and Cell Disruption of *Haematococcus pluvialis* Cyst during High-Pressure Homogenization for Astaxanthin Recovery. *Applied Sciences*. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/app10020513>

27. Silva D. L. B., Moraes L. B. S., Oliveira C. Y. B., Campos C. V. F. S., Bezerra R. S., Gálvez A. O. Influence of culture medium on growth and protein production by *Haematococcus pluvialis*. *Acta Scientiarum. Technology*. 2022. Vol. 44. URL:

<https://periodicos.uem.br/actascitechnol/index.php/ActaSciTechnol/article/view/59590>

28. Sun S.-T., Jiang Y.-J., Simal-Gandara J., Guo X. Beyond astaxanthin: The bioactive ingredients of *Haematococcus pluvialis* and their applications in food. *Trends in Food Science & Technology*. 2026. Vol. 163. URL:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224425005801>

29. Tian J., Lin J., Zhuang G., Sun P., Geng P., Chen L., Chen X. Microalgae-derived biodiesel: Review on microalgae species, genetic modification, cultivation strategies, and mutagenesis. *Algal Research*. 2026. Vol. 84. URL:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926425006010>

30. Vo T., Cao P., Truong Ngoc H., Nguyen P. T. H. Microalgae *Haemococcus pluvialis*, Cultured in OHM Medium under Stressful Conditions: Phenolic Content and Antioxidant Capacity. *Journal of Biochemistry International*. 2024. Vol. 11, no. 1. P. 1–6. URL: <https://ikpress.org/index.php/JOBI/article/view/8584>

31. Xue X., Su X., Zhou L., Ji J., Qin Z., Liu J., Li K., Wang H., Wang Z. Antibiotic-Induced Recruitment of Specific Algae-Associated Microbiome Enhances the Adaptability of *Chlorella vulgaris* to Antibiotic Stress and Incidence of Antibiotic Resistance. *Environmental Science & Technology*. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.3c02801>

32. Yallappa M. S., Deshpande A. D. Astaxanthin — King of antioxidants as immune modulator and anti-inflammatory for enhancing productive performance and health of animals. *Indian Journal of Dairy Science*. 2021. URL: https://www.researchgate.net/publication/350631606_Astaxanthin_-

King of antioxidants as immune modulator and anti-inflammatory for enhancing productive performance and health of animals

33. Yu B. S., Lee S. Y., Sim S. J. Effective contamination control strategies facilitating axenic cultivation of *Haematococcus pluvialis*: Risks and challenges. *Bioresource Technology*. 2022. Vol. 344, no. Pt B. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34748979/>

34. Yu W.-J., Zhang L., Zhao J., Liu J. Enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* by exogenous oxaloacetate combined with nitrogen deficiency. *Bioresource Technology*. 2021. Article 126484. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126484>

35. Zhang C., Liu J., Zhang L. Cell cycles and proliferation patterns in *Haematococcus pluvialis*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 2017. Vol. 35. P. 1205–1211. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00343-017-6103-8>

36. Zhao Y., Yue C., Geng S., Ning D., T., Yu X. Role of media composition in biomass and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* under two-stage cultivation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2019. Vol. 42. P. 593–602. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00449-018-02064-8>