

**КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИНСТИТУТ ЭКОЛОГИИ, БИОТЕХНОЛОГИИ И  
ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ**

*Кафедра биотехнологии*

**Учебно-методическое пособие**

**Биотехнология микроводорослей: методы культивирования, оценки  
выхода биомассы и содержания в ней липидов, белков, углеводов**

**Казань - 2025**

**УДК 582.26/27, 577.1**

**ББК 30.37**

*Принято на заседании кафедры биотехнологии*

*Протокол № 9 от 13 мая 2025 г.*

**Рецензенты:**

Кандидат биологических наук,  
доцент, старший научный сотрудник **П.А. Куринцева**  
Кандидат биологических наук,  
доцент, старший научный сотрудник **Н.В. Данилова**

**Авторы:** к.б.н. старший научный сотрудник **Г.Ш. Галиева**, к.х.н. ведущий  
инженер **С.В. Белякова**, научный сотрудник **А.С. Гордеев**

**ISBN**

Учебное пособие предназначено для студентов обучающихся по направлениям 19.04.01 Биотехнология (Системная биотехнология и архитектура живых систем) и 19.03.01 «Биотехнология» (Биотехнология и биоинженерия) для изучения дисциплины «Большой биотехнологический практикум» и сопровождения практических занятий. В пособии представлен теоретический материал о видах микроводорослей, способах выделения чистых культур и культивирования, оценки белков, углеводов, липидов, получаемых из микроводорослей, а также представлено описание практических работ по данной дисциплине.

**УДК 582.26/27, 577.1**

**ББК 30.37**

**ISBN**

© Галиева Г.Ш., 2025  
© Белякова С.В., 2025  
© Гордеев А.С., 2025  
© Издательство Казанского  
Университета, 2025

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
<b>Методические рекомендации .....</b>	<b>4</b>
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	5
1. Общая характеристика микроводорослей .....	5
1.1. Систематика и морфология микроводорослей .....	5
1.2 Физиология микроводорослей.....	6
1.3 Основные биологически активные вещества, выделяемые из микроводорослей .....	8
1.4 Экологические особенности культивирования микроводорослей.....	13
1.5 Применение микроводорослей в биотехнологиях.....	17
ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В ЛАБОРАТОРИИ .....	21
<b>ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ .....</b>	<b>24</b>
1.2 Типы питательных сред для культивирования микроводорослей .....	26
1.2.1 Методика приготовления жидкой среды Тамия:.....	28
1.2.2 Приготовление агаризованной среды Тамия:.....	29
2. Оценка параметров роста и продуктивности культуры микроводорослей .....	31
2.1 Методы оценки биомассы .....	31
2.1.1 Определение сухого веса микроводорослей (Dry Weight, DW) .....	31
2.1.2 Определение оптической плотности (Optical Density, OD) .....	33
2.1.3 Подсчет клеток с помощью камеры Горяева.....	34
2.3. Методы анализа биологически активных веществ культур микроводоросли .....	37
3.1 Определение содержания липидов в микроводорослях .....	37
3.2 Определение белков в биомассе микроводорослей методом Бредфорда .....	39
3.3 Определение углеводов в биомассе микроводорослей антронным методом .....	45
Глоссарий терминов .....	50
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	51

## **ВВЕДЕНИЕ**

Микроводоросли – это группа автотрофных микроорганизмов, обитающих в морских, пресноводных и почвенных экосистемах и продуцирующих органические вещества в процессе фотосинтеза. Благодаря высокой метаболической гибкости, адаптации к различным условиям культивирования, а также возможности быстрого роста, число исследований по их использованию в качестве источника биологически ценных продуктов стремительно растёт. В настоящее время ведутся поиски комплексных технологий культивирования микроводорослей, направленных на выделение различных биологически активных веществ из биомассы для повышения рентабельности производства водорослей (1).

### **Методические рекомендации**

- Пособие предназначено для студентов биологических, биотехнологических и экологических специальностей.
- Каждый раздел включает теоретический материал и практические задания.
- Лабораторные работы могут быть адаптированы под доступное оборудование.

## ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1. Общая характеристика микроводорослей

#### 1.1. Систематика и морфология микроводорослей

Микроводоросли — полифилетическая группа, включающая множество различных организмов, которые относятся как к прокариотам, так и к эукариотам. Микроводоросли являются фотоавтотрофами, которые осуществляют оксигенный фотосинтез. Их вегетативное тело лишено проводящих систем и представлено талломом, при этом у них отсутствуют какие-либо многоклеточные органы размножения. Средой обитания микроводорослей чаще всего является водная среда (пресная и морская), а также суши («Почва», стволы деревьев и пр.) (2).

Согласно классификации Д.К. Зернова водоросли относят к двум царствам *Prokaryota* и *Eucaryota*, при этом выделяют следующие отделы (рис. 1):

Прокариотические водоросли:

Отдел 1. Синезеленые водоросли — *Cyanophyta*;

Отдел 2. Прокариотические (первичные) зеленые водоросли — *Prochlorophyta*.

Эукариотические водоросли:

Отдел 1. Эвглеиевые водоросли — *Euglenophyta*;

Отдел 2. Динофитовые водоросли — *Dinoflagellata (Dinophyta)*;

Отдел 3. Криитофитовые водоросли — *Cryptophyta*;

Отдел 4. Рафидофитовые водоросли — *Raphidophyta*;

Отдел 5. Золотистые водоросли — *Chrysophyta*;

Отдел 6. Диатомовые водоросли — *Bacillariophyta*;

Отдел 7. Желтозеленые водоросли — *Xanthophyta*;

Отдел 8. Красные водоросли — *Rhodophyta*;

Отдел 9. Бурые водоросли — *Ochrophyta (Phaeophyta)*;

Отдел 10. Зеленые водоросли — *Chlorophyta*;

Отдел 11. Харовые водоросли — *Charophyta* (3).

## 1.2 Клеточная организация микроводорослей: структура и функции

Клетки микроводорослей по строению похожи на клетки растений, однако у них есть особенности, обусловленные специфичностью среды обитания и обмена веществ. Различают клетки, содержащие типичные ядра, окруженные ядерными оболочками (мембранами), и клетки, не имеющие типичных ядер, окруженных ядерными оболочками. В первом случае говорят об эукариотическом строении клетки, а во втором — о прокариотическом. Прокариотическое строение клетки имеют сине-зеленые микроводоросли (*Cyanophyta*) и первичные зеленые микроводоросли (*Prochlorophyta*), эукариотическое строение имеют представители всех других отделов микроводорослей. Выделяют также и мезокариотические организмы, клетки которых имеют черты, характерные как для эукариотических, так и прокариотических клеток. Однако все мезокариотические организмы (к ним относят водоросли из отдела *Dinophyta*) имеют ядра, окруженные ядерными оболочками, поэтому их рассматривают как эукариоты.

По форме клеток микроводоросли бывают шаровидные, цилиндрические, грушевидные, яйцевидные, веретеновидные, спиралевидные, дисковидные, бочонковидные и сложные, по функциям — половые, вегетативные и пр. (2).

Клеточные покровы микроводорослей представляют собой сложные многослойные структуры, обеспечивающие механическую защиту, поддержание формы и транспорт веществ. Их строение варьирует в зависимости от таксономической группы и включает несколько ключевых компонентов. Плазмалемма или плазматическая мембрана микроводорослей, как и у других эукариот, состоит из липопротeinового бислоя толщиной 7–10 нм. Она выполняет барьерную функцию, регулируя поступление и выведение веществ. У подвижных форм, таких как *Euglena gracilis*, плазмалемма участвует в формировании пелликулы — уплотнённого поверхностного слоя.

Перипласт — это плотная, часто слоистая структура, расположенная над плазмалеммой. Он состоит преимущественно из белков, хотя у некоторых групп водорослей может включать и полисахариды. У многих представителей, включая *Cryptomonas* и *Euglenophyta*, перипласт образует сложную белковую структуру, расположенную над плазмалеммой. У *Euglenida* он состоит из взаимосвязанных полос — белковых полосок (pellicle strips), придающих клетке гибкость и прочность. У *Cryptophyceae* перипласт включает внутренний слой из целлюлозоподобных фибрилл.

Для водорослей с жесткими покровами важную роль играет клеточная стенка. Состав клеточной стенки варьируется в зависимости от таксономической группы. Например, у зеленых водорослей она состоит из целлюлозы и гликопротеинов, у диатомовых — из кремнезёма ( $\text{SiO}_2$ ), а у красных водорослей — из агара и каррагинана. В отличие от перипласта, который обычно имеет белковую природу и гибкую структуру (как у *Euglena viridis*), клеточная стенка характеризуется жесткостью и углеводным составом (как у *Chlorella vulgaris* или *Spirogyra communis*). Покоящиеся клетки имеют более толстые оболочки по сравнению с репродуктивными и молодыми вегетативными клетками. При неблагоприятных условиях, таких как дефицит питательных веществ (например, при недостатке азота у *Scenedesmus quadricauda*) или воздействии стрессовых факторов, наблюдается значительное утолщение клеточных стенок (4).

Сравнительный анализ клеточных покровов микроводорослей демонстрирует эволюционные адаптации к различным экологическим нишам и имеет важное значение для их систематики и биотехнологического использования (5).

Водоросли имеют клеточную оболочку, выполняющую защитную и опорную функции. Толщина оболочки зависит от видовой принадлежности, его возраста, функционального состояния и условий окружающей среды. Если в среде обитания есть дефицит какого-либо компонента, то клеточные

оболочки значительно утолщаются. У многих водорослей, особенно у одноклеточных, на поверхности оболочки появляются различного рода дополнительные структуры - щетинки, шипики, чешуйки. Роль этих структур заключается в выполнении защитной функции или поддержании клетки в состоянии парения

Эукариотические микроводоросли имеют такие структуры как ядро, митохондрии, аппарат Гольджи, эндоплазматическая сеть и др. (6). Общим для всех водорослей является наличие хлорофилла и обусловленное этим автотрофное питание – способность синтезировать на свету органические вещества из неорганических. У многих водорослей зеленая окраска хлорофилла замаскирована другими пигментами. В клетке содержатся фотосинтезирующие хлорофиллы, также могут содержаться другие пигменты, формирующиеся в хроматофорах, эндоплазматический ретикулум, митохондрии, пиреноиды (тельца белковой природы, принимающие участие в процессе образования крахмала) (3,6).

### **1.3 Основные биологически активные вещества, выделяемые из микроводорослей**

#### **Липиды**

Липиды представляют собой обширную группу органических соединений, объединенных общим свойством гидрофобности - нерастворимостью в воде и хорошей растворимостью в неполярных органических растворителях. По своей химической природе это преимущественно низкомолекулярные вещества, хотя встречаются и более сложные структуры. Основу классификации липидов составляет их способность к омылению - реакции гидролиза под действием щелочей. К омыляемым липидам относятся триацилглицериды, фосфолипиды и воска, тогда как неомыляемую группу составляют стероиды, терпены и некоторые витамины.

В живых организмах липиды выполняют множество жизненно важных функций. Прежде всего, они служат основным строительным материалом клеточных мембран, формируя их липидный бислой. Отличительной особенностью липидов является их высокая энергоемкость, обусловленная большим количеством углерод-водородных связей в молекулах. Эта характеристика делает их идеальным резервным источником энергии. Кроме того, липиды демонстрируют уникальную способность к самоорганизации в водных средах, формируя сложные надмолекулярные структуры.

Липиды подразделяются на несколько основных классов по их химической структуре и биологическим свойствам. Микроводоросли являются ценным источником разнообразных липидов, содержание которых может достигать до 70% от сухой массы в зависимости от вида и условий культивирования. Их липидный состав имеет уникальные особенности и практическую значимость.

Выделяют следующие основные классы липидов в составе микроводорослей:

- **Нейтральные липиды** (до 90% от общего содержания):
  - Триацилглицериды (ТАГ) - основные запасающие липиды (15-65%)
  - Свободные жирные кислоты
  - Стерины и стеролы
- **Полярные липиды** (структурные):
  - Фосфолипиды (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин)
  - Гликолипиды (моногалактозилдиацилглицериды, сульфохинозилдиацилглицериды)
- **Специализированные липиды:**
  - Пигмент-связанные липиды (хлорофиллы, каротиноиды)
  - Эфиры восков
  - Гидрокарбоны (алканы, алкены)

Микроводоросли представляют перспективную платформу для получения ценных липидов с широким спектром применения в различных отраслях промышленности.

## Белки

Белки представляют собой высокомолекулярные биополимеры, состоящие из аминокислотных остатков, с молекулярной массой от 6000 до 2 000 000 Да. Эти уникальные по своему разнообразию соединения выполняют важнейшие и многообразные функции в клетке. К основным биологическим функциям белков относятся: катализическая (осуществляемая ферментами), регуляторная (контроль скорости химических реакций в клетке и уровня метаболизма организма), транспортная (перенос веществ в организме и через биологические мембранны), структурная (формирование хромосом, цитоскелета, соединительной и мышечной ткани), а также рецепторная (распознавание внеклеточных сигналов и инициация клеточного ответа). Помимо этого, белки выполняют защитную, резервную, токсическую, сократительную и множество других специализированных функций.

Белки состоят из двадцати стандартных  $\alpha$ -аминокислот, которые универсальны для всех живых организмов. Помимо этих основных структурных единиц, в природе существует свыше 150 других аминокислот. Эти дополнительные соединения встречаются в клетках либо в свободной форме, либо в составе различных биомолекул, но никогда не включаются в состав белков. Большинство из них представляют собой: модифицированные производные стандартных  $\alpha$ -аминокислот; аминокислоты с аминогруппой в других положениях ( $\beta$ -,  $\gamma$ - и  $\delta$ -формы). Данная классификация отражает фундаментальное биохимическое различие между протеиногенными (входящими в состав белков) и непротеиногенными аминокислотами.

Незаменимые аминокислоты – это группа протеиногенных  $\alpha$ -аминокислот, которые не синтезируются в организме человека и животных и

должны поступать с пищей. Их отсутствие в рационе приводит к нарушениям белкового обмена и серьезным патологиям.

К числу незаменимых аминокислот для взрослых относятся:

Валин - участвует в мышечном метаболизме

Изолейцин - регулирует уровень сахара в крови

Лейцин - стимулирует синтез белка в мышцах

Лизин - важен для синтеза коллагена и усвоения кальция

Метионин - источник серы для организма

Тreonин - поддерживает работу печени и иммунитета

Триптофан - прекурсор серотонина и мелатонина

Фенилаланин - участвует в синтезе нейромедиаторов

Гистидин (условно незаменим для взрослых, полностью незаменим для детей) - важен для роста и регенерации тканей.

Микроводоросли – ценный источник полноценного белка, содержащего все девять незаменимых аминокислот (НАК), необходимых человеку. По составу они близки к эталонному белку (по стандартам ФАО/ВОЗ), а некоторые виды даже превосходят традиционные источники (сою, яйца, молоко). Поэтому поиск и выделение новых штаммов микроводорослей и анализ содержания белка и белкового профиля актуальная задача.

## **Углеводы**

Углеводы представляют собой обширный класс органических соединений, включающий три основные группы: моносахариды, олигосахариды и полисахариды. Эти вещества играют фундаментальную роль в биохимических процессах живых организмов.

Моносахариды - простейшие представители углеводов, имеющие в своей структуре карбонильную группу (альдегидную или кетонную) и несколько гидроксильных групп. Их общая формула выражается как  $(CH_2O)_n$ ,

где  $n$  обычно колеблется от 3 до 7. Помимо основных функциональных групп, моносахариды могут содержать дополнительные химические группы, включая: тиольные (-SH); карбоксильные (-COOH); аминогруппы (-NH<sub>2</sub>); фосфатные остатки. Полисахариды образуются в результате процессов поликонденсации моносахаридов и представляют собой типичные биополимеры. Их молекулы состоят из многочисленных моносахаридных звеньев, соединенных гликозидными связями. В зависимости от структуры различают:

- линейные полисахариды;
- разветвленные полисахариды;
- гомополисахариды (из одинаковых мономеров);
- гетерополисахариды (из разных мономеров);

Олигосахариды занимают промежуточное положение между моно- и полисахаридами. В их состав входит от 2 до 10 моносахаридных остатков. Наиболее распространенными представителями этой группы являются дисахариды, состоящие из двух моносахаридных единиц. Все три класса углеводов выполняют важные биологические функции: энергетическую (основной источник энергии); структурную (компоненты клеточных стенок); запасающую (резервные питательные вещества); информационную (клеточное распознавание). Особенностью углеводов является их способность образовывать различные пространственные формы (циклы, линейные структуры) и вступать в многочисленные химические реакции, что определяет их ключевую роль в метаболизме живых систем.

Микроводоросли синтезируют широкий спектр углеводных соединений, которые играют ключевую роль в их метаболизме и структурной организации. Эти соединения представлены тремя основными группами.

Моносахариды микроводорослей включают:

- пентозы (ксилозу и рибозу), участвующие в построении нуклеиновых кислот;

- гексозы (глюкозу, галактозу, маннозу и фруктозу) - основные метаболиты энергетического обмена;
- аминосахара (глюкозамин и галактозамин), входящие в состав клеточных стенок;
- уроновые кислоты (глюкуроновую и галактуроновую), придающие отрицательный заряд полисахаридам.

Олигосахариды представлены:

- дисахаридами (сахарозой и трегалозой), выполняющими транспортную и защитную функции;
- трисахаридами (раффинозой);
- сложными олигомерами (гликолипидами и гликопротеинами), участвующими в межклеточных взаимодействиях.

Полисахариды микроводорослей подразделяются на:

- запасные (крахмал, ламинарин, парамилон) - энергетические депо;
- структурные (целлюлоза, гемицеллюлозы, альгинаты) - обеспечивают механическую прочность клеток;
- слизистые (сульфатированные полисахариды) - выполняют защитные и регуляторные функции.

Уникальной особенностью углеводов микроводорослей является наличие редких компонентов, таких как L-сахара и сульфатные группы, а также их способность образовывать комплексы с другими биополимерами. Эти структурные особенности определяют специфические физико-химические свойства и биологическую активность углеводных соединений микроводорослей (7).

#### **1.4 Экологические особенности культивирования микроводорослей**

Несмотря на способность микроводорослей расти при различных условиях, как в пресных, морских водоемах, соленых озерах, почвах и пр., для эффективного культивирования и наращивания биомассы микроводорослей требуется соблюдение оптимальных условий. Основными факторами для

культивирования микроводорослей являются: интенсивность освещения; температура; макро- и микро- элементы, концентрация  $\text{CO}_2$ , рН.

**Температура** рассматривается как один из критических факторов для роста микроорганизмов и биохимического состава клеток. При повышенных и пониженных относительно оптимальной температурах наблюдается снижение физиологической активности: изменения вязкости цитоплазмы, текучести и проницаемости мембран, ферментативной активности, снижение содержания общего количества липидов в клетках микроводорослей, но при этом повышение содержание нейтральных липидов, ингибирования процессов репликации, транскрипции и трансляции. Большинство видов микроводорослей лучше всего растут при оптимальной температуре от 15 до 30°C. Значительное повышение температуры за пределы диапазонов температурной толерантности отрицательно влияет на рост и метаболизма микроорганизмов: эффективность поглощения и использования питательных веществ, активность ферментов и скорость фиксации  $\text{CO}_2$  (4).

**Световой режим**, включающий продолжительность и интенсивность освещения, является критически важным фактором, определяющим продуктивность микроводорослей. Фотосинтетический аппарат этих организмов способен к моментальному поглощению и конверсии световых квантов в химическую энергию (АТФ и НАДФ-Н). Исследования показывают, что удлинение фотопериода положительно влияет на рост культур, однако максимальная продуктивность по биомассе (например, у *Chlorella vulgaris* и *Nannochloropsis gaditana*) и эффективность фиксации углекислого газа достигаются только при оптимальной интенсивности освещения. Для большинства промышленных штаммов этот показатель находится в диапазоне 100-300  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . (8).

**Углекислый газ** ( $\text{CO}_2$ ) служит основным субстратом для фотосинтеза микроводорослей, оказывая комплексное воздействие на их физиологию и продуктивность. Оптимальные концентрации  $\text{CO}_2$  (2-5% от газовой фазы) значительно усиливают фотосинтетическую активность, что подтверждается

исследованиями с *Chlorella vulgaris*, демонстрирующими 30-50% увеличение скорости роста. Такие условия способствуют активации ключевого фермента RuBisCO и повышению эффективности световых реакций. При повышенных концентрациях CO<sub>2</sub> (3-7%) наблюдается существенное изменение биохимического состава клеток. У *Nannochloropsis*, например, отмечается увеличение содержания липидов до 60% от сухого веса, одновременно с накоплением каротиноидов и полисахаридов. Эти изменения имеют важное значение для биотехнологического применения микроводорослей. Однако превышение уровня 10% CO<sub>2</sub> приводит к негативным последствиям - ацидозу цитоплазмы, ингибированию карбоксилазной активности RuBisCO и снижению активности карбоангидразы. При дефиците CO<sub>2</sub> (<0.03%) активируются системы активного транспорта бикарбоната и ССМ-механизмы (концентрирующие механизмы углерода) (9).

В биотехнологической практике подача CO<sub>2</sub> при культивировании микроводорослей позволяет существенно повысить продуктивность (на 70-120%) и снизить себестоимость биомассы. Оптимальные параметры аэрации включают скорость подачи 0,2-1,5 vvm, размер пузырьков менее 100 мкм и поддержание pH в диапазоне 7,5-8,5. Особое значение имеет использование промышленных выбросов CO<sub>2</sub>, что одновременно решает задачи утилизации парниковых газов и производства ценной биомассы (10).

Экологические последствия повышения атмосферной концентрации CO<sub>2</sub> проявляются в стимуляции роста фитопланктональных сообществ, изменении их видового состава и трансформации глобального цикла углерода. В прикладном аспекте ведутся работы по созданию CO<sub>2</sub>-толерантных штаммов микроводорослей с повышенной углеродфиксацией способностью для промышленного культивирования.

**Кислотность среды** играет ключевую роль в культивировании микроводорослей и цианобактерий, поскольку непосредственно влияет на доступность CO<sub>2</sub> и питательных веществ, что в свою очередь определяет метаболическую активность микроорганизмов. При низких значениях pH

(менее 5) в среде преобладает угольная кислота ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), которая слабо диссоциирует, ограничивая доступность  $\text{CO}_2$  для фотосинтеза. В щелочных условиях (рН выше 11) низкая концентрация ионов водорода способствует преобладанию карбонатных форм ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), что также снижает доступность молекулярного  $\text{CO}_2$  и угнетает рост клеток. Оптимальный уровень рН для культивирования варьируется в зависимости от вида микроорганизмов (11).

Содержание питательных элементов среды является критичным для успешного культивирования микроводорослей. Основными элементами питания для микроводорослей выступают макроэлементы, потребляемые в относительно больших количествах. Азот, являясь структурным компонентом аминокислот, нуклеиновых кислот и хлорофилла, занимает особое место в метаболизме. Его дефицит приводит не только к замедлению роста, но и вызывает значительные изменения биохимического состава клеток, в частности накопление липидов. Фосфор, участвующий в энергетическом обмене и построении клеточных мембран, также относится к критически важным элементам. Калий выполняет регуляторные функции, поддерживая осмотическое давление и активируя ферментные системы.

Не менее важную роль при культивировании микроводорослей играют **микроэлементы** - железо, входящее в состав фотосистем и цитохромов, непосредственно влияет на эффективность фотосинтеза; марганец выступает важным кофактором фотосистемы II, а цинк участвует в процессах синтеза фитогормонов и репликации генетического материала. Особые требования к питанию проявляют отдельные группы микроводорослей. Например, диатомовые водоросли нуждаются в кремнии для построения своих кремниевых панцирей, а некоторые виды требуют добавления витаминов, таких как B12 или биотин, для нормального роста и развития. Оптимальное соотношение основных элементов питания варьирует в зависимости от видовой принадлежности микроводорослей и условий культивирования. Для морских видов характерно соотношение азота к фосфору около 16:1, тогда как для пресноводных этот показатель составляет примерно 8:1. Нарушение

баланса питательных элементов приводит не только к снижению продуктивности, но и вызывает значительные изменения в биохимическом составе клеток, активирует стрессовые механизмы и может нарушать нормальный ход клеточного цикла. В практике культивирования микроводорослей применяют специализированные питательные среды, состав которых оптимизирован для конкретных таксономических групп (4).

### **1.5 Применение микроводорослей в биотехнологиях**

Сами водоросли являются источником белка, витаминов, пигментов и высококачественных липидов, включая жирные кислоты, такие как, например, омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты (12). Биомасса микроводорослей и продукты, полученные из их биомассы, нашли широкое применение в различных областях народного хозяйства. Так, биомассу микроводорослей используют в качестве корма для скота, домашних животных и аквакультуры. Благодаря наличию в составе микроводорослей незаменимых аминокислот, витаминов (A, C, D, E, B12, B9, B6, K) и минералов (I, Fe, Ca, Mg, Na, P, S) их биомассу используют в качестве биологических добавок для человека. Наиболее часто используемые при производстве продуктов питания для человека являются водоросли Spirulina, так как она содержит большое количество белка и фолиевой кислоты, что полезно для репродуктивной системы женщин, а также замедляет старение кожи (13,14).

В сельском хозяйстве микроводоросли вызывают всё больший интерес в качестве биоудобрений благодаря высокому содержанию микро- и макроэлементов, фитогормонов и биологически активных соединений. Эти компоненты оказывают положительное влияние на почвенную экосистему, усиливая взаимодействие между сельскохозяйственными культурами и почвенными микроорганизмами. Одним из ключевых преимуществ микроводорослей является их способность эффективно усваивать фосфор и азот даже в условиях дефицита питательных веществ, что делает их ценным ресурсом для восстановления плодородия почвы. Кроме того, они обогащают

грунт органическими веществами, выделяя полезные соединения и улучшая его структуру, увеличивают влагоудерживающую способность. Микроводоросли также производят важные метаболиты, такие как фитогормоны и полисахариды, которые могут дополнительно стимулировать рост растений и повышать урожайность. Ещё одно их ценное свойство – способность подавлять развитие патогенов грибного и бактериального происхождения и нематоды. Это происходит благодаря синтезу биологически активных веществ, таких как бензойная и мажускулоновая кислоты, а также гидролитических ферментов, что позволяет рассматривать микроводоросли в качестве природных биопестицидов (15).

Биоэнергетика во всем мире является активно развивающимся сектором экономики, который основан на источниках энергии органического происхождения, используемых для производства тепла, электричества и топлива (16,17). Биомасса микроводорослей является широко применяемым источником сырья при получении биотоплива и биопластика. Выделяют три поколения возобновляемых источников растительного сырья для получения биотоплива: растения, отходы и микроводоросли.

Первое поколение включает традиционные сельскохозяйственные культуры с высоким содержанием липидов, крахмала и сахаров. Липиды перерабатываются в компоненты биодизельного топлива, а крахмалы и сахара служат сырьем для производства биоэтанола. Однако использование этих культур имеет ряд недостатков: они требуют пахотных земель, которые могли бы использоваться для выращивания пищевых продуктов, а также значительных затрат на обработку почвы, удобрения и пестициды. Второе поколение представлено непищевыми остатками растений, травой и древесиной. Производство биотоплива из такого сырья менее затратно, поскольку оно содержит целлюлозу и лигнин, что позволяет его прямое сжигание или переработку в горючие газы через пиролиз. Однако у этого сырья есть свои минусы: низкая урожайность с единицы площади и необходимость использования больших территорий. Третье поколение – это биомасса

микроводорослей. Ее ключевые преимущества включают высокую продуктивность с единицы площади, возможность круглогодичного выращивания, быстрый рост и компактность производства.

В последние годы особый интерес исследователей и производителей привлекает биоэнергетический потенциал микроводорослей. Финансирование разработок в этой области постоянно растет, поскольку производство CO<sub>2</sub>-нейтрального топлива является одной из ключевых глобальных задач. Это позволит снизить выбросы парниковых газов и смягчить последствия изменения климата. В перспективе, по мере истощения ископаемых ресурсов, биотопливо из возобновляемого сырья может стать важной альтернативой. Однако для обеспечения экологической и экономической устойчивости необходимо использовать такие источники сырья, которые способны поглощать атмосферный углекислый газ (18).

Фармацевтическое применение микроводорослей охватывает широкий спектр направлений. Цианобактерии рода *Nostoc* служат источником антибиотических веществ. *Chlorella vulgaris* содержит соединения с выраженной противовирусной активностью. *Spirulina* является сырьем для получения противоопухолевых препаратов. *Euglena gracilis* используется при создании иммуномодулирующих средств. Особого внимания заслуживают кардиопротекторные свойства омега-3 кислот, получаемых из микроводорослей, которые стали альтернативой традиционному рыбьему жиру. Пробиотические комплексы на основе *Spirulina Chlorella* находят все более широкое применение в фармацевтике. Белковые компоненты *Chlorella* служат основой для создания вегетарианских продуктов с высоким содержанием полноценного белка. Диетические добавки на основе омега-3 кислот из микроводорослей представляют собой растительную альтернативу традиционным источникам этих соединений. Функциональные напитки с экстрактами водорослей сочетают тонизирующие и общеукрепляющие свойства. Современные технологии экстракции и очистки позволяют получать

из этих организмов высокоочищенные биологически активные соединения для различных отраслей промышленности (1).

Несмотря на широкое обилие видов, наиболее используемыми в различных отраслях являются такие виды микроводорослей как: *Chlamydomonas*, *Botryococcus*, *Scenedesmus*, *Neochloris*, *Haematococcus* и *Nannochloropsis*. При этом неоспоримыми лидерами являются микроводоросли рода *Chlorella* и цианобактерии *Arthrospira (Spirulina)* благодаря стрессоустойчивости при разных температурах, устойчивости к высоким концентрациям CO<sub>2</sub>. (19–21).

# **ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В ЛАБОРАТОРИИ**

## **Общие требования**

Студенты допускаются к работе в лаборатории только после прохождения инструктажа по технике безопасности с обязательной регистрацией в журнале. Работать разрешается только в халате. Запрещено находиться в лаборатории в верхней одежде или оставлять её в помещении.

Следует соблюдать максимальную осторожность: неаккуратность, невнимательность или недостаточное знание оборудования и реактивов могут привести к несчастному случаю.

## **Основные опасные факторы**

В биохимической лаборатории работающие могут столкнуться с:

- огнеопасными и легковоспламеняющимися веществами;
- летучими ядовитыми и взрывчатыми соединениями;
- щелочными металлами;
- концентрированными кислотами и щелочами;
- биологическим материалом;
- лабораторной посудой (особенно работающей под вакуумом или давлением);
- электроприборами.

## **Правила работы с химическими веществами:**

Запрещено пробовать вещества на вкус. Нюхать реактивы можно, осторожно направляя пары движением руки, а не вдыхая их напрямую. Использовать только реактивы с четкими этикетками. Работать с токсичными и агрессивными веществами только в спецодежде и с защитой для глаз, кожи и органов дыхания. Запрещено использовать лабораторную посуду не по назначению. Нельзя оставлять без присмотра работающие приборы (спиртовки, нагреватели, вакуумные установки).

## **Работа с кислотами и щелочами:**

Концентрированные кислоты и щелочи хранят в толстостенной стеклянной посуде (не более 2 л) в вытяжном шкафу. Разбавлять кислоты можно только, добавляя кислоту в воду (не наоборот!) при постоянном перемешивании. Растворять щелочи следует, медленно добавляя их небольшими кусочками в воду, используя щипцы или пинцет.

### **Действия при разливах:**

Кислоты – засыпать песком, затем нейтрализовать содой или известью, промыть водой.

Щелочи и аммиак – засыпать песком или опилками.

### **Первая помощь при ожогах:**

Кислотой – промыть водой, затем приложить 2% раствор соды.

Щелочью – промыть водой, затем обработать 1-2% раствором уксусной или борной кислоты.

### **Работа с биологическим материалом**

Использовать медицинские перчатки и автоматические дозаторы.

Избегать попадания биоматериала на кожу и поверхности.

При загрязнении обработать спиртом или 3% раствором хлорамина.

После работы продезинфицировать посуду и инструменты, протереть стол и руки спиртом.

### **Правила работы с огнём и электрооборудованием**

#### **Спиртовка:**

Перед зажиганием снять колпачок для удаления паров спирта. Не зажигать, если спирта меньше половины или фитиль не достаёт до дна. Не переносить горящую спиртовку и не зажигать одну от другой. Гасить только колпачком (не дуть!).

#### **Электроприборы:**

Должны быть исправны и заземлены.

Распределительный щит включается только под контролем преподавателя.

#### **Центрифуги:**

Загружать только парное количество уравновешенных пробирок.

Перед включением проверять, что роторная камера закрыта.

**Действия при авариях:**

Порезы стеклом: удалить осколки, промыть рану 2% раствором перманганата калия или 3% перекисью водорода, обработать йодом, забинтовать.

Отравление парами: немедленно вывести пострадавшего на свежий воздух, оказать первую помощь и отправить в медпункт.

Строгое соблюдение этих правил минимизирует риски и обеспечит безопасность работы в лаборатории (22).

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### 1. Методы отбора микроводорослей из объектов окружающей среды

Средой обитания микроводорослей являются пресные и морские водоемы, почвы, другие среды. На первом этапе осуществляется отбор проб микроводорослей с мест обитания.

#### Отбор проб

Водные пробы: собираются с разных глубин с использованием батометров или бутылок (рис. 1).

а)



б)



Рисунок 1. Виды батометров: а) Нискина, б) Паталаса.

Для выделения почвенных микроводорослей пробы почвы отбираются с поверхности или на определенной глубине, затем суспенсируются в воде. Для выделения из других сред: биопленок, льда, и пр, пробы также ресуспенсируются в воде.

#### Предварительная обработка образцов

На следующем этапе осуществляется фильтрация образцов для удаления крупных частиц. В качестве фильтров могут использоваться сите, сетки или мембранные фильтры. Форма частиц также влияет на процесс. Мембранные фильтры изготавливают из переплетенных нитей ацетата

целлюлозы, которые имеют извилистые поры. Размеры пор могут быть 0.01, 0.1, 0.2, 0.45 мкм. Поликарбонатные фильтры представляют собой тонкие листы с круглыми порами одинакового диаметра. Лучше подходят для фикологии, так как работают как идеальное сито.

После фильтрации проводят концентрирование клеток центрифугированием и обработку образцов антибиотиками и фунгицидами для подавления роста бактерий и грибов.

## **2. Методы выделения микроводорослей**

Для выделения микроводорослей используют различные подходы:

- а) Метод серийных разведений, при котором пробы разводятся стерильной средой (серийные разведения) и высеваются либо на жидкую среду, либо на агаризованную в чашки Петри. После инкубации отбираются колонии водорослей.
- б) Метод прямого отбора клеток - микропипетирование при использовании данного подхода для выделения микроводорослей под микроскопом с помощью микропипетки отбираются отдельные клетки. (23).

### **2.1 Выделение микроводорослей методом серийных разведений**

#### ***Оборудование и материалы:***

Стерильные пробирки с жидкой питательной средой (например, среда Тамия для сине-зеленых водорослей);

Стерильные чашки Петри

Стерильные пипетки (1 мл и 10 мл) или дозатор

Стерильные наконечники для пипеток

Спиртовка или горелка для асептических условий

Парафильм или стерильная пленка для герметизации

Инкубатор/климатическая камера с освещением (температура 20–25°C, свет ~50–100  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )

#### ***Ход работы:***

1. Подготовка серийных разведений

Взять исходную пробу (воду, почвенную вытяжку или смешанную культуру водорослей). Тщательно взболтать пробу для равномерного распределения клеток. При необходимости профильтровать через стерильный фильтр (3–5 мкм). Приготовить разведения ( $10^{-1}$ – $10^{-4}$ ):

- Внести в 4 стерильные пробирки по 9 мл стерильной среды
- Добавить 1 мл исходной пробы в первую пробирку (получили  $10^{-1}$ )
- Перенести 1 мл из первой пробирки во вторую ( $10^{-2}$ )
- Повторить процедуру до последней пробирки ( $10^{-4}$ )

## 2. Посев на чашки Петри

В чашки Петри со стерильной агаризованной средой внести по 0.1–0.5 мл из каждой пробирки с разведениями в отдельные чашки. Подписать чашки (указать разведение и дату). Посеять контрольный образец стерильной среды для проверки на контаминацию. Инкубировать чашки при 20–25°C с фотопериодом 12:12 (7–14 дней). Проверять рост колоний под микроскопом с определенной периодичностью. Выбрать изолированные колонии. Перенести стерильной петлей или пипеткой колонии в свежую жидкую среду. Проверить чистоту культуры микроскопированием. Хранить чистые культуры в жидкой среде или на агаровых скошенных пробирках.

## 3. Типы питательных сред для культивирования микроводорослей

В биотехнологии микроводорослей применяют различные питательные среды, состав которых зависит от вида водорослей, их метаболических особенностей и целей культивирования. Универсальными средами для пресноводных микроводорослей являются среды Тамия, BG11, BVM. Кроме того, для специализированных задач (азотфиксация, экстремофилы) используют специализированные среды или модифицированные составы универсальных сред. К часто используемым специализированным средам относят среду Аллена и Зарукко, которые применяют для культивирования азотфиксирующих цианобактерий и

алкалифильных микроводорослей соответственно. В таблице 1 приведены составы наиболее часто используемых питательных сред.

Таблица 1. Прописи основных питательных сред используемых при культивировании микроводорослей

Компонент	Состав питательных сред, г/л			
	Тамия	ВВМ	BG11	Аллена
KNO <sub>3</sub>	5	-	-	0.04
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	2.5	0.075	0.075	0.075
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.25	0.175	-	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	0.075	-	-
Na <sub>2</sub> -ЭДТА	0.037	5	0.001	0.001
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.009	0.5	-	-
NaNO <sub>3</sub>	-	0.25	1.5	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *3H <sub>2</sub> O	-	-	0.04	-
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	-	0.025	0.036	0.036
NaCl	-	0.025	-	-
Лимонная кислота	-	-	0.006	0.006
Аммоний железо- лимоннокислый (Fe- цитрат)	-	-	0.006	0.006
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	-	0.02	0.02
Микроэлементы	+ 1 мл			
Микроэлементы				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 г/л	1.13 г/л	2.86 г/л	2.86 г/л
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	1.81 г/л	0.014 г/л	1.81 г/л	1.81 г/л
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.22 г/л	0.088 г/л	0.22 г/л	0.22 г/л
MoO <sub>3</sub>	17.64 мг/л	7 мг/л	-	-
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	22.96 мг/л	-	-	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	-		0.39 г/л	0.39 г/л

CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	-	0.016 г/л	0.079 г/л	0.079 г/л
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	0.005 г/л	0.049 г/л	0.049 г/л

### 3.1 Методика приготовления жидкой среды Тамия

Приготовление раствора макроэлементов – растворить соответствующие навески KNO<sub>3</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O в небольшом объеме воды, также растворить FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, EDTA, оба раствора внести примерно в 800 мл дистиллированной воды.

Приготовление раствора микроэлементов - в отдельных стаканах растворить H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MoO<sub>3</sub> и NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>, после смешать растворы веществ мерной колбе на 1000 мл воды, после довести до 1 л. Готовый раствор в объеме 1 мл вноситься в раствор макроэлементов. После основной раствор с макро- и микро- элементами доводится до 1 л дистиллированной водой. На следующем этапе осуществляется коррекция pH. Оптимальный pH для большинства водорослей – 6,8–7,2. Регулирование pH осуществляют с помощью 1M NaOH или HCl. Далее проводят стерилизацию питательной среды автоклавированием при 121°C, в течение 15–20 мин. Если для приготовления среды используется глюкоза, ее стерилизуют отдельно либо фильтрацией с использованием шприцевых фильтров 0,22 мкм или автоклавированием в более низкой температуре, например 110°C.

После автоклавирования (опционально) добавляют стерильные растворы: B<sub>1</sub> (тиамин) – 0,1–1 мг/л; B<sub>12</sub> (цианокобаламин) – 0,5–2 мкг/л; Биотин – 0,5–1 мкг/л.

### **3.2 Приготовление агаризованной среды Тамия:**

Кроме жидких питательных сред, для культивирования микроводорослей используют агаризованные питательные среды. В практике культивирования водорослей применяют агаризованные чашки Петри или агаризованные косяки. Чаще всего агаризованные среды используют для выделения и поддержания чистых культур микроорганизмов; сохранения музейных коллекций штаммов; культивирования прикрепленных форм водорослей. В лабораторной практике используют два основных варианта агаризованных сред: чашки Петри с агар-агаром и агаризованные косяки в пробирках.

В среду Тамия вносят агар в концентрации 1-2%С, нагревают на плите или водяной бане до полного растворения агара. После проводят стерилизацию в автоклаве при 120°C в течение 20 минут. Стерилизованный агар охлаждают до температуры 50-60°C; для поддержания оптимальной температуры используют водяную баню. Розлив среды: производят в стерильные чашки Петри в ламинарном боксе или над пламенем горелки; важно соблюдать температурный режим (50-60°C) для предотвращения образования конденсата. После застывания агара чашки переворачивают, хранят в герметичных контейнерах или пластиковых пакетах, оптимальная температура хранения - +4°C (холодильная камера). На рисунке 2 представлены микроводоросли, выращенные на разных типах питательных сред: на агаризованной среде в пробирках (скошенная поверхность) и на плотной агаровой среде в чашке Петри. Различия в морфологии колоний обусловлены условиями культивирования.

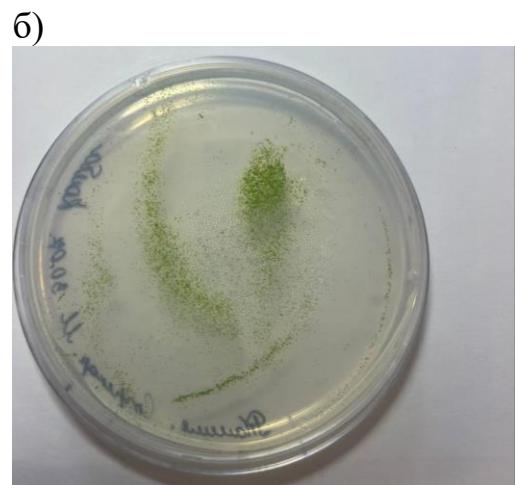


Рисунок 2. Культивирование микроводорослей: а) на агаризованной среде в пробирках (скошенный агар), б) на плотной питательной среде в чашке Петри

## 4. Оценка параметров роста и продуктивности культуры микроводорослей

Количественными показателями для оценки роста культуры микроводорослей являются определение концентрации клеток, сухая биомасса культуры микроводоросли, оценка оптической плотности, определение содержания хлорофилла.

**Концентрация клеток** (клеток/мл) – подсчет в камере Горяева, гемоцитометре или автоматическом счетчике клеток;

**Сухая биомасса** (г/л) – фильтрация и сушка до постоянного веса;

**Оптическая плотность (OD)** – спектрофотометрия (обычно при 680–750 нм для хлорофилла);

**Содержание хлорофилла** – экстракция ацетоном/метанолом и спектрофотометрический анализ;

В начале выращивания микроводоросли необходимо определить ключевые факторы, влияющие на рост и продуктивность культур микроводоросли и поддерживать выбранные параметры течение всего эксперимента:

- Свет: интенсивность (ФАР 100–1000 мкмоль/м<sup>2</sup>/с), фотопериод (свет:темнота).
- Температура: оптимум 20–30°C (в зависимости от штамма).
- Питательные вещества: азот (NO<sub>3</sub><sup>–</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), фосфор (PO<sub>4</sub><sup>3–</sup>), микроэлементы (Fe, Mg и др.).
- pH: обычно 7–9.
- Аэрация/перемешивание: предотвращает седиментацию и улучшает газообмен.

### 4.1 Методы оценки биомассы

#### 4.1.1 Определение сухого веса микроводорослей (Dry Weight, DW)

Метод основан на гравиметрическом определении массы клеточного осадка после удаления влаги. Сухой вес (Dry Weight, DW) является

абсолютным показателем биомассы и выражается в граммах или миллиграммах на литр культуры.

***Средства измерения реактивы и материалы:***

- Аналитические весы (точность 0,0001 г)
- Мембранные фильтры (размер пор 0,45-1,2 мкм)
- Фильтрационная установка (вакуумный насос)
- Сушильный шкаф ( $105\pm2^{\circ}\text{C}$ )
- Эксикатор с осушителем
- Пинцет
- Микропипетки
- Дистиллированная вода
- Маркированные алюминиевые чашки или фильтровальные бумаги

***Методика определения:***

Отбирают определенную аликовоту культуры, фильтруют через предварительно взвешенный мембранный фильтр (0,45–1,2 мкм). После окончания фильтрации, промывают дистиллированной водой для удаления солей. Далее фильтр с микроводоролями при  $105^{\circ}\text{C}$  до постоянного веса (обычно 12–24 ч). Взвешивают и вычисляют биомассу (г/л или мг/л).

Методика выполнения анализа включает несколько последовательных этапов. Первоначально проводится подготовка фильтров - их высушивают при рабочей температуре до постоянного веса, после чего хранят в эксикаторе. Для фильтрации отбирают аликовоту хорошо перемешанной культуры, объем которой зависит от плотности клеточной суспензии. В случае концентрированных культур допускается предварительное разведение пробы.

Процесс фильтрации осуществляют под вакуумом, используя предварительно взвешенные мембранные фильтры ( $W_1$ ). После завершения фильтрации осадок тщательно промывают дистиллированной водой для удаления остатков питательной среды и минеральных солей. Фильтры с биомассой переносят в сушильный шкаф и выдерживают при температуре  $105^{\circ}\text{C}$  до достижения постоянного веса ( $W_2$ ). Продолжительность сушки

обычно составляет 24-48 часов. После завершения сушки образцы охлаждают в эксикаторе в течение 30 минут и проводят окончательное взвешивание.

Формула расчета сухого вещества:

$$DW = (W_2 - W_1) / V, \text{ где:}$$

$DW$  – сухое вещество, (г/мл);

$W_1$  - вес чистого фильтра, г;

$W_2$  - вес фильтра с осадком, г;

$V$  - объем профильтрованной культуры, мл

Для работы с малыми объемами культуры могут быть использованы модификации методики, включающие микроцентрифугирование и последующую лиофильную сушку полученного осадка. Особое внимание при проведении анализа следует уделять предотвращению потерь биомассы на всех этапах работы и строгому соблюдению температурного режима сушки.

#### **4.1.2 Метод определения оптической плотности (Optical Density, OD)**

##### **культуры микроводорослей**

Метод основан на измерении степени поглощения светового потока клеточной суспензией. Оптическая плотность (OD - Optical Density) прямо пропорциональна концентрации клеток в суспензии и используется для оценки плотности культуры микроорганизмов.

***Средства измерения реактивы и материалы:***

- Спектрофотометр (фотоколориметр);
- Кюветы (пластиковые, стеклянные или кварцевые) 10x10 мм;
- Физиологический раствор или культуральная среда;
- Микропипетки;
- Вортекс;
- Чистые пробирки.

##### ***Методика определения:***

Включить спектрофотометр и прогреть в течение 15-20 минут. Установить длину волны, наибольшие пики поглощения хлорофилла наблюдаются при длинах волн от 680-750 нм. Провести калибровку прибора

на "ноль" с использованием стерильной культуральной среды или дистиллированной воды.

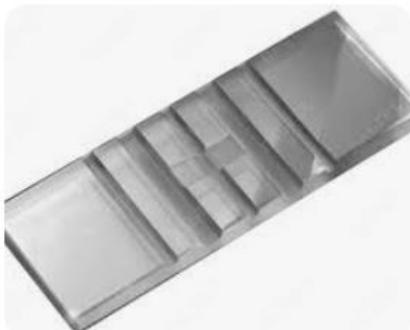
Тщательно перемешать исследуемую суспензию на вортексе. Заполнить кювету, при этом уровень жидкости должен быть выше светового пучка. Для кювет 10x10 мм оптимальный объем: 3-4 мл. Протереть внешние поверхности кюветы мягкой безворсовой салфеткой. Поместить кювету в кюветное отделение. Провести измерение оптической плотности. При значениях оптической плотности больше 1, необходимо развести образец.

#### **4.1.3 Подсчет клеток с помощью камеры Горяева**

Метод подсчета клеток основан на визуальном подсчете клеток микроорганизмов в стандартизированном объеме жидкости с помощью специальной камеры с нанесённой микроскопической сеткой (24). Количество клеток в определённом количестве малых квадратов сетки позволяет рассчитать концентрацию клеток во всей суспензии. Чаще всего для этих целей используют счетную камеру Горяева. Счётная камера Горяева – это специализированное предметное стекло с конструктивными особенностями, предназначенными для точного подсчета клеточных суспензий. На камеру Горяева нанесена микроскопическая сетка, позволяющая точно определить концентрацию клеток в суспензии. Основу устройства составляет толстая пластина из оптического стекла с прямоугольным углублением в центральной части глубиной ровно 0,1 мм (рис. 3а). На дне камеры нанесены две идентичные измерительные сетки, разделённые между собой глубокой поперечной канавкой. По боковым сторонам расположены стеклянные площадки, к которым плотно притираются специальные шлифованные покровные стёкла. Каждая измерительная сетка имеет размеры 3×3 мм и сложную систему разметки. Основная сетка разделена на 225 крупных квадратов за счёт пересечения 15 вертикальных и 15 горизонтальных линий. Особенностью конструкции является дополнительное деление: каждый третий ряд как по вертикали, так и по горизонтали разделён ещё на четыре части. В местах пересечения этих линий образуются малые квадраты, составляющие 1/16 часть большого квадрата. При этом на сетке наблюдается чёткое

чередование различных типов квадратов: полностью разделённых на 16 малых, разделённых только по вертикали или горизонтали, и цельных квадратов без дополнительных линий.

а)



б)

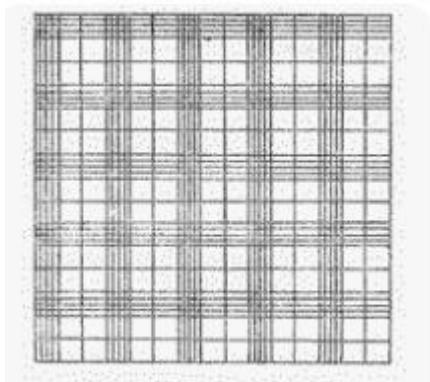


Рисунок 3. а) камера Горяева; б) сетка камеры Горяева

***Средства измерения реактивы и материалы:***

- Счётная камера Горяева
- Покровное стекло
- Микроскоп с увеличением 100-400х
- Микропипетка, или пипетка Пастера, или дозатор
- Предметные и покровные стёкла
- Физиологический раствор или культуральная среда

***Методика определения:***

Перед началом работы необходимо тщательно очистить рабочую поверхность счетной камеры и покровное стекло от возможных загрязнений. Покровное стекло следует плотно притереть к камере, добиваясь полного прилегания и образования герметичной полости между ними. Если исследуемая суспензия имеет слишком высокую концентрацию клеток, необходимо предварительно развести ее стерильным физиологическим раствором до оптимальной концентрации. Перед взятием пробы суспензию следует тщательно перемешать для обеспечения равномерного распределения клеток в объеме жидкости. Для заполнения камеры с помощью микропипетки

наносят 10-20 мкл подготовленной суспензии на край покровного стекла. Жидкость должна самостоятельно заполнить рабочее пространство камеры под действием капиллярных сил. Важно избегать избыточного давления, которое может привести к переполнению камеры или образованию пузырьков воздуха. Заполненную камеру аккуратно помещают на предметный столик микроскопа. Подсчет клеток проводят при увеличении 100-400х, выбирая для анализа 5-10 малых квадратов сетки Горяева, расположенных в разных зонах камеры для получения репрезентативных данных (рис. 4). Чаще всего в начале подсчета выбирают верхний левый квадрат, после окончания подсчета значения записывают, окуляры передвигают на право на одну секцию и вниз, находя малый квадрат. Находящийся по диагонали от первого и так далее, до окончания подсчета. Таким образом, получится рассчитать количество клеток в 5 малых квадратах, для которых находят среднее значение. При подсчете клеток, расположенных на границах квадратов, учитывают только те, которые касаются двух определенных сторон (например, верхней и левой), чтобы избежать двойного учета одних и тех же клеток. Это правило обеспечивает единообразие подсчета и повышает точность измерений.

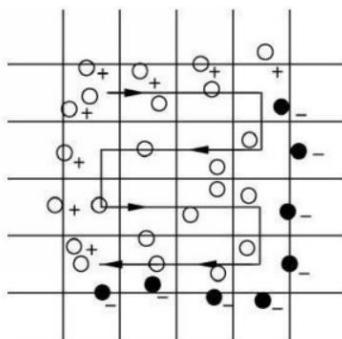


Рисунок 4. Порядок подсчета клеток в камере Горяева

Формула для расчёта концентрации клеток:

$$C = (a \times K \times 10^4) / b, \quad \text{где}$$

- С - концентрация клеток (кл/мл);
- а - среднее количество клеток в малом квадрате;
- К - коэффициент разведения;
- $10^4$  - коэффициент пересчёта на 1 мл ( $0,00025 \text{ мм}^3 \rightarrow 1 \text{ мл}$ );
- b - количество подсчитанных квадратов.

## **5. Методы анализа биологически активных веществ культур микроводоросли**

### **5.1 Определение содержания липидов в микроводорослях**

Методика основана на разделении липидов (нейтральных и полярных) и нелипидных компонентов с использованием органических растворителей. Хлороформ применяется для экстракции нейтральных липидов, включая триглицериды, хлорофиллы и стеролы. Метанол выполняет двойную функцию: дегидратирует ткани и разрушает клеточные мембранны, способствуя высвобождению липидов. Водный слой служит для отделения липидной фракции от полярных соединений, таких как белки и углеводы (25).

Ключевое преимущество данной методики заключается в сохранении нативных форм липидов и пигментов, что позволяет проводить их дальнейший анализ без значительных структурных изменений.

#### ***Средства измерения/реактивы и материалы:***

- Смесь хлороформ:метанол (2:1 по объёму);
- 0.9% раствор NaCl (или дистиллированная вода);
- Центрифуга (до 3000 rpm);
- Стеклянные пробирки/пластиковые фальконы;
- Весы аналитические;
- Дозатор 0,1-1 мл;
- Наконечники к дозатору;
- Азотный испаритель (для упаривания).

#### ***Методика определения:***

##### **Гомогенизация образца:**

Взвешивают 10–100 мг сухих микроводорослей (или 0.1–1 г влажных) в пробирке с известной массой ( $m_1$ ). Добавляют 20 объёмов смеси хлороформ:метанол (2:1) (например, 2 мл растворителя на 100 мг биомассы). Гомогенизацию проводят одним из способов (либо совмещают два из трех):

- Проводят три цикла замораживания до  $-80^{\circ}\text{C}$  / оттаивание до  $37^{\circ}\text{C}$ ;

- Используют ультразвуковую обработку (от 15 до 30 мин, с охлаждением на льду).
- Механическое растирание пестиком в ступке с добавлением кварцевого песка.

### Фазовое разделение:

Добавляют 0.2 объёма 0.9% раствора NaCl (например, 0.4 мл к 2 мл экстракта). Интенсивно встряхивают в течение 1 минуты, затем инкубируют 10 минут при 4°C. Центрифугируют при 1000–3000 грм в течение 5–10 минут для разделения фаз.

### Разделение фаз:

После центрифугирования образуются три слоя: верхняя фаза: метанол, вода, белки и углеводы. Промежуточная прослойка: денатурированные белки и клеточный дебрис. Нижняя фаза: хлороформ с растворёнными липидами и пигментами (рис. 5). Верхнюю фазу аккуратно удаляют пипеткой. Через промежуточный слой осторожно забирают нижнюю хлороформную фазу стеклянной пипеткой или дозатором и переносят в пробирку с известной массой (m2).

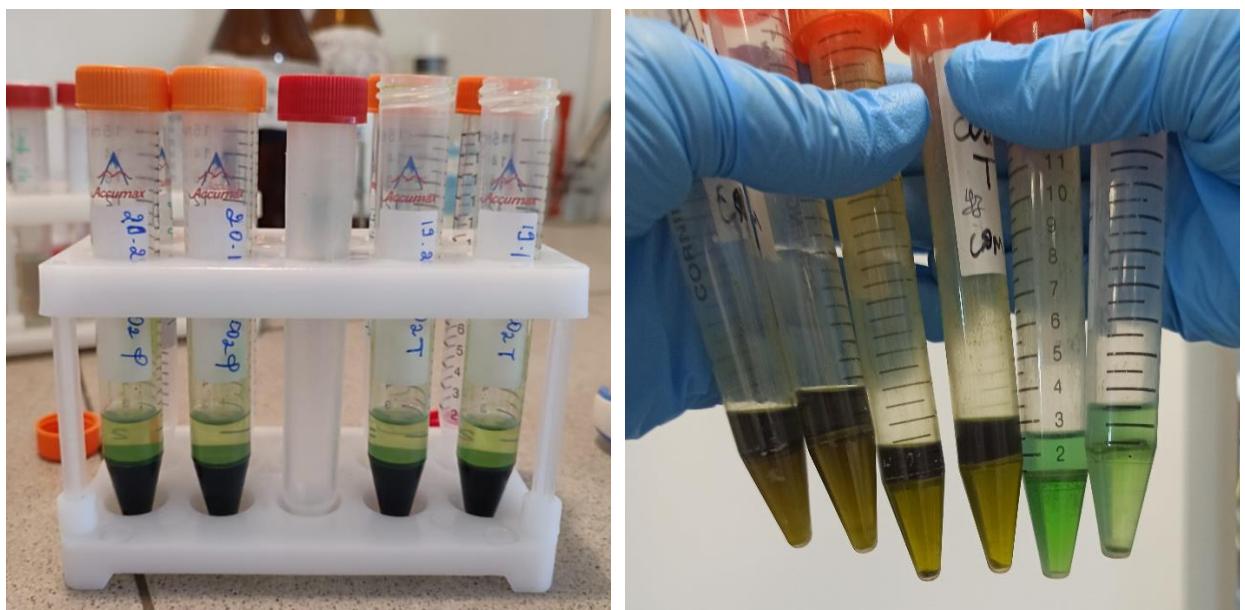


Рисунок 5. Фазовое разделение при экстракции липидов

## **Очистка и концентрирование липидов**

Хлороформную фазу промывают 1% раствором NaCl (в соотношении 1:1), после чего повторно центрифугируют. Растворитель удаляют упариванием под струёй азота или на роторном испарителе (температура не должна превышать 40°C). Сухой остаток взвешивают для гравиметрического определения выхода липидов по формуле:

$$\text{С лип (\%)} = \frac{m_2 - m_1}{m} \times 100, \text{ где}$$

$m_1$  – масса пустого фалькона (г);

$m_2$  – масса фалькона с липидами (г);

$m$  – масса образца микроводорослей (г);

Метод обеспечивает высокую степень очистки липидов и подходит для последующего изучения их состава и количественного определения.

## **5.2 Определение белков в биомассе микроводорослей методом Брэдфорда**

Метод Брэдфорда представляет собой колориметрический анализ, основанный на способности белка связываться с красителем Кумасси Бриллиантовый G-250, что приводит к изменению его спектральных характеристик. В кислой среде краситель существует в двух формах: протонированной (красная форма с максимумом поглощения при 470 нм) и депротонированной (синяя форма с максимумом поглощения при 595 нм). При взаимодействии с белками происходит сдвиг равновесия в сторону синей формы. Механизм взаимодействия основан на связывании красителя преимущественно с основными (аргинин, лизин, гистидин) и ароматическими аминокислотными остатками белковых молекул. Это приводит к изменению электронного состояния красителя и соответствующему изменению его спектра поглощения. Метод характеризуется высокой чувствительностью в диапазоне 1-1500 мкг/мл, причем наибольшая чувствительность наблюдается для катионных белков, таких как бычий сывороточный альбумин. По сравнению с другими методами определения белка (Лоури, Бенседжида), метод Брэдфорда имеет ряд преимуществ: не требует нагревания проб,

позволяет получить результаты уже через 2-5 минут после начала реакции, менее чувствителен к присутствию большинства буферных компонентов.

### ***Средства измерения реактивы и материалы:***

#### **Материалы:**

- Спектрофотометр с кюветным отделением (рабочий диапазон 450-650 нм);
- Аналитические весы (точность 0,0001 г);
- Вортекс для перемешивания проб;
- Микроцентрифуга (до 14000 об/мин);
- Пипетки переменного объема (10-1000 мкл) с соответствующими наконечниками;
- Пластиковые или кварцевые кюветы (оптический путь 1 см);
- Термостат (при необходимости инкубации при постоянной температуре);
- Фальконы;
- Парафильм или другие средства для герметизации пробирок;
- Фильтровальная бумага (для очистки кювет);
- Микропробирки для приготовления калибровочных растворов;
- Ледяная баня (при работе с термолабильными образцами).

#### **Реактивы:**

- Краситель Кумасси Бриллиантовый G-250 ( $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$ );
- Этанол 95%;
- Ортофосфорная кислота (85%);
- Бычий сывороточный альбумин (БСА) или другой белковый стандарт;
- Дистиллированная или деионизированная вода.

#### ***Приготовление реактивов:***

1) Реактив Bradford (готовить под вытяжкой): 100 мг красителя Кумасси ярко-голубого (Coomassie Blue Brilliant G-250) растворить в 50 мл 96 % этанола. Затем к этому раствору, постоянно перемешивая его стеклянной палочкой, добавить 100 мл 85 % фосфорной кислоты. При добавлении фосфорной кислоты окраска раствора из синего цвета должна перейти в коричневый. В стакан объемом 1 л налить 500–700 мл дистиллированной воды

и медленно, помешивая воду стеклянной палочкой, добавлять в неё раствор, содержащий краситель Кумасси голубой, этанол и фосфорную кислоту. Довести раствор до 1 литра и оставить на ночь при комнатной температуре. После этого полученный раствор необходимо профильтровать. Реактив Bradford\* хранить в холодильнике в колбе из темного стекла с притёртой пробкой. При длительном хранении (более 1 месяца) реактив необходимо повторно калибровать. Реактив после фильтрации должен иметь коричневую и оливковую окраску, при добавлении в образец, содержащий белок, должен окраситься в оттенок синего или если концентрация белка низкая, то цвет будет близок к коричневому/оливковому.

2) Калий-фосфатный буфер (pH 7.4) (КФБ): Смешать 25 мл раствора А+ 15 мл раствора В, разбавить дистиллированной водой до 100 мл (т.е. прилить еще 60 мл дистиллированной воды).

Раствор А: 0,2 н КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 2,72 г растворить в 100 мл дистиллированной воды

Раствор В: 0,2 н NaOH – 0,8 г растворить в 100 мл дистиллированной воды

### ***Приготовление растворов для построения калибровочной кривой***

Приготовление стандартных растворов белка начинают с основного раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) концентрацией 1 мг/мл. Для этого 10 мг сухого БСА растворяют в 10 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивая до полного растворения. Полученный раствор используют для приготовления серии стандартных разведений в микропробирках (Таблица 2).

**Таблица 2. Состав растворов для построения калибровочной кривой.**

Стандарт, №	Конечная концентрация, мкг/мл	Объём Бредфорда, мл	Объём раствора БСА (1мг/мл), мкл
0	0,00	1	0
1	1,00	1	1
2	4,98	1	5
3	9,90	1	10
4	14,78	1	15
5	19,61	1	20

6	24,39	1	25
7	29,13	1	30
8	38,46	1	40
9	47,62	1	50

Затем пробирки переворачивают пару раз, оставляют на 5-10 минут для появления окраски (не более 30 минут) и определяют оптическую плотность при длине волны 595 нм. Строят калибровочную кривую.

### **Подготовка кювет для анализа**

Для спектрофотометрических измерений необходимо использовать кюветы из оптического стекла или специального пластика (кварцевые кюветы не подходят). Кюветы должны быть абсолютно чистыми. При работе запрещается касаться светопропускающих окон голыми руками - только в перчатках. Процедура очистки включает последовательную промывку: сначала техническим 96% спиртом, затем чистым спиртом, дистиллированной водой и в завершение - изопропанолом или 2-бутанолом. Окончательная обработка предполагает протирание окон ватным тампоном, смоченным в одном из указанных спиртов, с последующей промывкой дистиллированной водой. Сушку проводят в положении, исключающем контакт оптических поверхностей с другими предметами. При необходимости ускоренной сушки в термостате при 56°C следует обеспечить надежную фиксацию кюветы.

### ***Ход анализа при работе с опытным образцом***

Масса навески зависит от состояния биомассы:

- Свежая биомасса микроводорослей – 100–200 мг;
- Сухая биомасса микроводорослей – 10–50 мг.

Биомассу ресуспенсируют в КФБ (при необходимости с добавками). Объем буфера зависит от состояния биомассы: для свежих образцов 50 мл, для сухих 2-4 мл.

Лизирование клеток осуществляют одним из методов:

- ультразвуком (3 импульса по 30 сек, 70% амплитуда, на льду);
- механически (растиранием с использованием песка, стеклянных шариков + жидкого азота);

- замораживанием-оттаиванием (3 цикла:  $-80^{\circ}\text{C} \rightarrow 37^{\circ}\text{C}$ ).

При работе со свежими образцами клетки микроводорослей собирают путем центрифугирования в течение 5 мин при 3700 об/мин. Взвешивают на весах 200 мг исследуемой ткани. Растирают ее до образования однородной массы (гомогената) с 50 мл КФБ в фарфоровой ступке на холду (взять пластиковую коробку, положить туда лед и охлаждающие элементы, разместить ступку). Процедуру проводят в течение 1 ч при постоянном помешивании при  $4^{\circ}\text{C}$ . Затем гомогенат центрифугируют 10 мин при 3700-8000 rpm.

При работе с сухими образцами после добавления КФБ осуществляют трехкратный цикл замораживания-оттаивания, далее осуществляется обработка ультразвуком с добавлением льда и/или хладоагентов в ультразвуковую ванну.

При необходимости выполняют промывку клеток (опционально):

- осаждают центрифугированием ( $3700 \text{ g}$ , 5 мин);
- промывают КФБ буфером для удаления остатков культуральной среды;
- центрифугируют ( $12000 \text{ g}$ , 20 мин,  $4^{\circ}\text{C}$ );
- собирают супернатант с растворимым белком.

### **Определение белка в образце**

Для точного определения содержания белка методом Брэдфорда критически важно соблюдать оптимальное соотношение между анализируемым образцом и реагентом. Это обеспечивает линейность колориметрической реакции и достоверность результатов.

Рекомендуемые параметры анализа: Типичное соотношение образца к реагенту варьирует в пределах 1:5 - 1:20. Конкретные условия подбирают в зависимости от типа используемого оборудования (микропланшетный ридер, кюветный спектрофотометр) и ожидаемой концентрации белка.

### **Возможны различные варианты постановки реакции:**

При работе с микропланшетом обычно используют 10 мкл образца и 990 мкл реагента (соотношение 1:99). Для кюветного спектрофотометра чаще

применяют 50-100 мкл образца с добавлением 1-2 мл реагента (примерное соотношение 1:20).

Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны  $\lambda=595$  нм. Так же готовят холостую пробу, где вместо образца используют аналогичное количество буфера. Измерения проводят в нескольких (не менее трёх) повторностях. Содержание белка в пробе (мг/мл) определяют по калибровочному графику. Расчет концентрации в пробе в мг/г осуществляется по формуле:

$$C = \frac{(A - Ax) * V_{\text{ЭКС}} * k * D * 1000}{m * V_{\text{Аликов}}}$$

где:

$A$  – оптическая плотность образца, ОЕ;

$Ax$  – оптическая плотность в холостой пробе, ОЕ;

$k$  – калибровочный коэффициент;

$V_{\text{ЭКС}}$  – объем экстракта, мл;

$m$  – масса навески, г;

$V_{\text{Аликов}}$  – объем аликовоты, мл;

$D$  – коэффициент разведения;

1000 – коэффициент пересчета в мг;

$C$  – концентрация белка мг/г.

### **Ключевые факторы при выборе условий:**

- Линейность калибровочной зависимости (оптимальный диапазон оптической плотности 0-1,5 ОЕ. при 595 нм)
- Чувствительность метода (при низких концентрациях белка допустимо увеличение объема пробы)
- Учет матричных эффектов (компоненты буфера могут влиять на результаты, поэтому не рекомендуется использовать слишком большие объемы образца).

### **5.3 Определение углеводов в биомассе микроводорослей анtronным методом**

Анtronный метод основан на реакции углеводов (моно-, олиго- и полисахаридов) с анtronом (9-оксиметил-антрацен) в присутствии концентрированной серной кислоты. В результате образуется зелёно-синий комплекс, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации углеводов. Оптическую плотность измеряют при 620–630 нм спектрофотометрически (26).

#### ***Средства измерения реактивы и материалы:***

#### **Материалы:**

- Спектрофотометр (с кюветами на 1 см или микропланшетный ридер).
- Водяная баня или термостат (для нагрева проб при 100°C).
- Центрифуга (до 10 000 g, для осаждения примесей).
- Пробирки (стеклянные или пластиковые, стойкие к H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
- Пипетки и дозаторы (для точного внесения реактивов).
- Колбы и мерные цилиндры (для приготовления растворов).

#### **Реактивы:**

- Анtron (9-оксиметил-антрацен) – 0,2% раствор в концентрированной серной кислоте.
- Концентрированная серная кислота (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, х.ч. или ч.д.а.).
- Стандартный раствор глюкозы (или другого моносахарида) – для построения калибровочной кривой (обычно 0,1–1,0 мг/мл).
- Дигидрофосфат калия - KН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>.
- Гидроксид натрия – NaOH.

#### ***Приготовление необходимых реактивов***

Калий-фосфатный буфер (pH 7.4) - смешать 25 мл раствора А + 15 мл раствора В, довести дистиллированной водой до 100 мл. Хранить при +4°C в течение 1 месяца.

- Раствор А: 0,2 н  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2,72 г растворить в 100 мл дистиллированной воды.
- Раствор В: 0,2 н  $\text{NaOH}$  – 0,8 г растворить в 100 мл дистиллированной воды.

Анtron - 200 мг антрана растворить в 100 мл концентрированной серной кислоты  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . (хранить в стеклянной таре при  $+4^\circ\text{C}$ , рекомендуемый срок хранения 2 недели).

### ***Приготовление растворов для построения калибровочной кривой***

Приготовить стандартный раствор (чаще всего – глюкозы) в концентрации 1 мг/мл. Для этого растворить 30 мг глюкозы в 30 мл дистиллированной воды. Затем этот раствор использовать для приготовления серии стандартных растворов для построения калибровочной кривой (таблица 3). Для приготовления стандартных растворов можно использовать стерильные чистые пластиковые фальконы объемом 15 мл.

Таблица 3. Состав растворов для построения калибровочной кривой.

№	Концентрация мг/мл	Количество исходного раствора глюкозы (мл)	Количество $\text{H}_2\text{O}$ (мл)
1	0.03	0.3	9.7
2	0.05	0.5	9.5
3	0.1	1.0	9.0
4	0.15	1.5	8.5
5	0.2	2.0	8.0
6	0.25	2.5	7.5
7	0.3	3	7.0
8	0.35	3.5	6.5
9	0.4	4	6.0
10	0.5	5	5.0

### ***Ход анализа при построении калибровочной кривой***

РАБОТЫ ПРОВОДЯТ СТРОГО ПОД ВЫТЯЖКОЙ. В стеклянную пробирку вносят 1 мл раствора сахаров и добавляют 3 мл реактива антрана. Пробирки помещают в стеклянную емкость, которую заполняют водой и

устанавливают на плитку. Нагревание осуществляют на водяной бане в течение 14 минут, отсчет времени начинают с момента появления первых крупных пузырей кипения. После нагревания пробирки немедленно охлаждают. Для этого их переносят в металлическую подставку и охлаждают под струей холодной воды, следя за тем, чтобы вода не попала внутрь пробирок. Перед измерением оптической плотности содержимое пробирок тщательно перемешивают пипетированием. Правильно проведенная реакция дает раствор зеленого цвета (изумрудных оттенков). Образцы, приобретшие коричневую или черную окраску, считаются непригодными для анализа. Измерение оптической плотности проводят в кюветах с толщиной слоя 10 мм на спектрофотометре при длине волны 780 нм, используя в качестве контроля дистиллированную воду. На основании полученных данных строят калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации сахаров и выводят уравнение регрессии для количественных расчетов. Все измерения рекомендуется проводить в одинаковых температурных условиях для минимизации погрешностей.

### *Ход анализа при работе с опытным образцом*

Для определения содержания углеводов в клетках микроводорослей проводят последовательные операции. Углеводы оценивают как в сухой, так и во влажной биомассе микроводорослей. Количество используемой биомассы определяется ее физическим состоянием:

Для свежих образцов рекомендуется навеска 100-200 мг;

Для сухих образцов достаточно 10-50 мг

Подготовка образцов проводится следующим образом:

Ресуспенсирование биомассы

Биомассу помещают в калий-фосфатный буфер (КФБ), при необходимости добавляя специальные реагенты. Объем буфера подбирают в зависимости от состояния образца:

Свежие образцы: 50 мл буфера

Сухие образцы: 2-4 мл буфера

Методы лизирования клеток:

Для разрушения клеточных структур применяют один из следующих подходов:

Ультразвуковая обработка: с охлаждением на льду – 15 мин;

Механическое разрушение: растирание с кварцевым песком или стеклянными шариками в присутствии жидкого азота;

Криогенный метод: 3 цикла замораживания (-80°C) и оттаивания (37°C).

Полученную центрифугируют при 3700 об/мин в течение 7-10 минут.

После центрифугирования супернатант аккуратно собирают в чистую пробирку. Осадок повторно ресуспенсируют в буфере, переносят в те же центрифужные пробирки и снова центрифугируют при указанных параметрах. Полученный супернатант объединяют с предыдущим, а осадок удаляют.

Для проведения количественной реакции 1 мл объединенного супернатанта переносят в стеклянную пробирку, добавляют 2 мл реактива антрана и тщательно перемешивают. Пробирки помещают на водяную баню и кипятят при 100°C в течение 14 минут. После завершения нагревания пробирки немедленно охлаждают, помещая их в стеклянные емкости с холодной водой. При этом необходимо следить, чтобы вода не попала внутрь пробирок с образцами.

Охлажденные образцы аккуратно перемешивают пипетированием и переносят в кюветы с толщиной оптического слоя 10 мм. Измерение оптической плотности проводят на спектрофотометре при длине волны 780 нм, используя дистиллированную воду в качестве контрольного образца (Ax).

При правильном выполнении анализа реакционная смесь приобретает характерное изумрудно-зеленое окрашивание. Образцы, получившие коричневую или черную окраску, требуют повторного анализа после предварительного разбавления в 5-10 раз. Для получения достоверных результатов все измерения рекомендуется проводить в трехкратной повторности. Важно отметить, что работу с реагентом антраном следует осуществлять под вытяжкой с соблюдением всех необходимых мер

безопасности. Данный метод служит для определения водорастворимых углеводов. Для количественной оценки полисахаридов в образцах микроводорослей необходимо провести предварительный гидролиз. Вместо этапов ресуспензирования и гомогенизации в стеклянную пробирку с завинчивающейся пробкой вливают 10 мл 2 М HCl (2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) и кипятят на водяной бане от 1 до 3 ч при 100°C. После охлаждения нейтрализуют 2 N NaOH до pH 7, добавляют от 5 до 10 мл дистиллированной воды, центрифугируют, для анализа используют супернатант. Количественную оценку проводят анtron-сернокислотным методом, описанным выше.

Содержание углеводов определяют по формуле:

$$C = \frac{(A - Ax) * V_{\text{экст}} * k * D}{m * V_{\text{аликв}}}$$

где:

A – оптическая плотность образца, ОЕ;

Ax – оптическая плотность холостой пробы, ОЕ;

k – калибровочный коэффициент;

V<sub>экст</sub> – объем экстракта, мл;

m – масса навески, г;

V<sub>аликв</sub> – объем аликовты, мл;

D – коэффициент разведения;

C – концентрация углеводов мг/г.

## **Глоссарий терминов**

АТФ - аденоzinтрифосфат;

НАДФ-Н - никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный;

RuBisCO - Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа);

Да - Дальтон (Da) внесистемная единица измерения массы, используемая в биохимии и молекулярной биологии для обозначения молекулярной массы белков, ДНК и других биополимеров.  $1 \text{ Да} \approx 1 \text{ атомная единица массы (а.е.м.)}$

НАК – незаменимые аминокислоты

ФАО/ВОЗ - Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций (ФАО, англ. Food and Agriculture Organization, FAO) — специализированное учреждение ООН, занимающееся вопросами продовольственной безопасности, сельского хозяйства и питания / Всемирная организация здравоохранения

ФАР - фотосинтетически активная радиация

КФБ – калий-фосфатный буфер;

ОЕ – оптические единицы

г – грамм;

мг – миллиграмм;

мл / мкл – миллилитр / микролитр;

мин / сек – минута / секунда;

С – градусы Цельсия;

ртм – обороты в минуту.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dolganyuk V, Belova D, Babich O, Prosekov A, Ivanova S, Katserov D, et al. Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules* [Internet]. 2020 Aug 1 [cited 2025 Jul 28];10(8):1153. Available from: <https://PMC7465300/>
2. Начатой В, Синетова М. Таксономическая характеристика штамма микроводорослей, изолированного из ассинского источника минеральных вод. 2021;
3. Дворецкий Д., Дворецкий С., Пешкова Е. Основы биотехнологии микроводорослей.
4. Дворецкий Д, Темнов М, Устинская Я. Перспективные биотехнологии микроводорослей. Издательский центр ФГБОУ ВО “ТГТУ.” 2022;
5. Прохоренко Н, Халиуллина Л, Демина Г. Ботаника: анатомия растений. Казань; 2017.
6. Олескин АВ, Боян Ц. Микроводоросли как объекты биомедицинских технологий: пребиотики, пребиотики, метабиотики. Москва, Шенъчжэн; 2022.
7. Леонтьев В, Ахрамович Т. БИОХИМИЯ Лабораторный практикум. 2008.
8. Kong W, Kong J, Feng S. Cultivation of microalgae–bacteria consortium by waste gas–waste water to achieve CO<sub>2</sub> fixation, wastewater purification and bioproducts production. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 2024 17:1. 2024 Feb;17(1):1–21.
9. Singh SP, Singh P. Effect of CO<sub>2</sub> concentration on algal growth: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2025 Jul 28];38:172–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114003682>
10. Lestari RAS, Nurlaili EP, Kusumo P. The effect of carbon dioxide concentration and the dimension of photobioreactor on the growth of microalgae *Nannochloropsis* sp. *AIP Conference Proceedings* [Internet]. 2019 Apr 23 [cited 2025 Jul 28];2097(1). Available from:

- /aip/acp/article/2097/1/030109/818551/The-effect-of-carbon-dioxide-concentration-and-the
11. Qiu R, Gao S, Lopez PA, Ogden KL. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO<sub>2</sub> addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2025 Jul 28];28:192–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926417305684>
  12. Reddy MMS, Tiwari S, Chauhan VS. Algal lipids, lipidomics, and biosurfactants. *Algae Materials: Applications Benefitting Health* [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2025 Jul 19];313–42. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780443188169000198>
  13. Carrillo M, Anchundia M. “Antimicrobial and antioxidant capacity of *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* and *Isochrysis galbana* and their potential use in food.” a systematic review. *CABI Agriculture and Bioscience*. 2024 Dec;5(1):1–16.
  14. Khan MI, Shin JH, Kim JD. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories* 2018 17:1. 2018 Mar;17(1):1–21.
  15. Gonçalves J, Freitas J, Fernandes I, Silva P. Microalgae as Biofertilizers: A Sustainable Way to Improve Soil Fertility and Plant Growth. *Sustainability* 2023, Vol 15, Page 12413 [Internet]. 2023 Aug 15 [cited 2025 Jul 21];15(16):12413. Available from: <https://www.mdpi.com/2071-1050/15/16/12413/htm>
  16. Gu X, Deng Y, Wang A. Engineering a marine microalga *Chlorella* sp. as the cell factory. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 2023 Dec;16(1):1–9.
  17. Wang M, Ye X, Bi H. Microalgae biofuels: illuminating the path to a sustainable future amidst challenges and opportunities. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 2024 17:1. 2024 Jan;17(1):1–24.

18. Д. С. Дворецкий, С. И. Дворецкий МС, Темнов, Е. В. Пешков ЕИА. Технология Получения Липидов Из Микроводорослей. 2015. 100 р.
19. Дубровная С, Мавлюдова Л. Систематика растений. Водоросли. Казань; 2013.
20. Dolganyuk V, Belova D, Babich O. Microalgae: A Promising Source of Valuable Bioproducts. *Biomolecules*. 2020 Aug;10(8):1153.
21. Сорокина К, Пилигаев А. Выделение и изучение свойств штаммов микроводорослей, производящих липиды, и их биокатализитическая переработка в биодизельное топливо. In 2018.
22. ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) ЛАБОРАТОРИИ МЕДИЦИНСКИЕ Требования безопасности. 2008. р. 41.
23. Гайсина ЛА, Фазлутдинова АИ, Кабиров РР. Современные Методы Выделения И Культивирования Водорослей. 2008. 152 р.
24. Гост 31960 2012 — Вода Методы определения токсичности по замедлению роста морских одноклеточных водорослей *Phaeodacylum tricornutum* Bohlin и *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve. 2012.
25. Folch j, lees m, sloane stanley gh. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1957 May 1 [cited 2025 Jul 19];226(1):497–509. Available from: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818648495?ref=car\\_js\\_challenge&fr=RR-103&arc=HV-4&rr=961a91b1f89cf0ff](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818648495?ref=car_js_challenge&fr=RR-103&arc=HV-4&rr=961a91b1f89cf0ff)
26. Koehler LH. Differentiation of Carbohydrates by Anthrone Reaction Rate and Color Intensity. *Analytical Chemistry* [Internet]. 1952 Oct 1 [cited 2025 Jul 19];24(10):1576–9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60070a014>