

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ
ТА ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ДОРОШ ІРИНА ВОЛОДИМИРІВНА

УДК 582.263.1:[604.2:547.979.8]

ДИСЕРТАЦІЯ
ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ БІОМАСИ
МІКРОВОДОРОСТЕЙ ЯК ДЖЕРЕЛА КОМПЛЕКСУ НУТРИЄНТІВ

03.00.20 – біотехнологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ І.В. Дорош

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор Марченко
Михайло Маркович

Чернівці-2025

АНОТАЦІЯ

Дорош І.В. Оптимізація умов культивування біомаси мікроводоростей як джерела комплексу нутрієнтів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2025.

Тема раціонального використання та відтворення водних біоресурсів вимагає все більшої уваги через зростаючий попит на продукти аквакультури. Розвиток сучасної біотехнології активно стимулює пошук ефективних методів вирощування водних мікроорганізмів, зокрема одноклітинних водоростей, які є основним джерелом природних кормів для багатьох водних організмів. Такий напрям є критично важливим для стабілізації екосистеми водойм, а також для підвищення продуктивності аквакультурних господарств.

Одноклітинні мікроводорості родини *Scenedesmaceae* вирізняються високим вмістом білка, поліненасичених жирних кислот та інших цінних біологічно активних речовин. Вони не лише виступають харчовим ресурсом для планктоноїдних риб, молюсків та зоопланктону, але й широко застосовуються в медицині, косметології та харчовій промисловості. Важливо зазначити, що якість біомаси водоростей залежить від умов культивування, що дозволяє керувати її складом та властивостями за допомогою змін умов культивування, зокрема складу живильного середовища.

Пошук альтернативних живильних середовищ для вирощування мікроводоростей є актуальним напрямом у біотехнології, особливо у контексті зниження витрат на культивування та підвищення ефективності

виробництва біомаси. Високі витрати на компоненти стандартних середовищ для вирощування мікроорганізмів стимулюють дослідників до пошуку доступніших джерел живлення, що здатні забезпечувати водорості всіма необхідними поживними речовинами.

Проте для досягнення високих показників продуктивності біомаси у середовищі з використанням скидної води часто необхідне застосування додаткових стимуляторів, таких як органічні та неорганічні добавки, що сприяють активному нарощенню клітинної маси. Особливої уваги заслуговують дослідження впливу різних добавок, що збагачують живильне середовище та активують синтез цільових продуктів у мікрководоростях, таких як каротиноїди, поліненасичені жирні кислоти та білки. Використання спеціальних добавок, що сприяють, зокрема, каротиногенезу є перспективним напрямом у підвищенні якості отриманої біомаси для подальшого використання у кормових сумішах для риб та ракоподібних. Каротиноїди, які є природними пігментами з антиоксидантними властивостями, виступають важливими компонентами у харчуванні аквакультурних організмів, адже вони не тільки сприяють забарвленню тіла риб, що підвищує їхню ринкову привабливість, але й зміцнюють їхню імунну систему.

Розробки технологій, що дозволяють регулювати вміст каротиноїдів та інших біоактивних речовин у біомасі водоростей, роблять їхню біомасу більш поживною та цінною з комерційної точки зору.

Дисертація присвячена вивченню ефективних методів культивування одноклітинних мікрководоростей *Desmodesmus armatus* (Chod.) HEGEW. та *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) TSARENKO з метою оптимізації їхнього хімічного складу для потреб аквакультури. Зокрема, досліджуються можливості використання як альтернативного живильного середовища скидних вод з установки замкненого водопостачання та вплив різноманітних стимуляторів на процеси накопичення цільових біологічно активних речовин, таких як каротиноїди. Аналізуються фактори, що впливають на

продуктивність та якісний склад біомаси, зокрема концентрації індукторів каротиногенезу та осморегуляторів. Ці дослідження спрямовані на підвищення ефективності аквакультурного виробництва та розробку нових підходів до раціонального використання водних ресурсів.

У роботі вперше проведені дослідження, які показали, що при вирощуванні *D. armatus* та *A. dimorphus* на скидній воді з УЗВ продуктивність цих водоростей залишалася високою протягом усього експерименту. Зростання біомаси протягом всього терміну культивування демонструвало стабільні позитивні показники, що досягали максимального рівня саме на 40-й день. Таким чином було показано, що скидна вода забезпечує досліджувані види мікроводоростей доступом до основних нутрієнтів, необхідних для їхнього росту, що робить її придатною для застосування в аквакультурі.

Однак, попри помітне зростання біомаси та продуктивності мікроводоростей, не було виявлено очікуваного підвищення вмісту каротиноїдів. Тому в роботі вперше використано методи індукції каротиногенезу шляхом введення у живильне середовище під час другої фази культивування на скидній воді з УЗВ спеціальних промоторів вільнорадикального окислення, зокрема суміші Fe^{2+} та H_2O_2 , а також осморегулятора NaCl. У результаті застосування цих речовин рівень вмісту каротиноїдів зріс від 14 мг/г до 27 мг/г у культурі *D. armatus* і від 12,5 мг/г до 24 мг/г у культурі *A. dimorphus*, що свідчить про значний стимулюючий ефект цих речовин на процес каротиногенезу в обох видах мікроводоростей.

Аналіз отриманих зразків показав, що під дією промоторів відбувається зміна складу каротиноїдів: спостерігалось зниження вмісту первинних каротиноїдів і, водночас, збільшення частки вторинних каротиноїдів. Це є важливим результатом, оскільки вторинні каротиноїди часто мають підвищену антиоксидантну активність і можуть бути особливо цінними для застосувань у різних галузях, зокрема у фармацевтиці та харчовій промисловості. Проте варто зазначити, що одночасно зі зростанням рівня

каротиноїдів відбулося пригнічення ростової активності обох культур. Це може бути пов'язано з оксидативним стресом, викликаним наявністю Fe^{2+} і H_2O_2 , які активують процес вільнорадикального окислення.

Інший аспект експерименту включав додавання до живильного середовища інших потенційних стимуляторів каротиногенезу — ацетату натрію (CH_3COONa) та глюкози ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). Ці речовини не спричиняли пригнічення ростової активності культур, що свідчить про їхню нетоксичність для мікрводоростей. Однак ефективного впливу на синтез каротиноїдів від цих компонентів не спостерігалось, що вказує на обмежену роль цих сполук у стимулюванні каротиногенезу в даних умовах культивування.

Таким чином, запропонована методика дозволяє індукувати процес каротиногенезу, забезпечуючи зростання вмісту вторинних каротиноїдів без використання дорогих добавок. Проте існує необхідність у подальших дослідженнях для оптимізації цього підходу, зокрема для зменшення негативного впливу на ріст культур та підвищення ефективності процесу. Це може включати комбінування різних концентрацій промоторів або використання додаткових антиоксидантів, що можуть знизити рівень стресу та покращити загальну продуктивність культур.

Вперше збагачені каротиноїдами культури використовувалися як кормовий субстрат для вирощування зоопланктону, зокрема для *Moina macroscopa* (Straus, 1820), *Simocephalus vetulus* (Müller, 1776) та *Daphnia magna* (Straus, 1820). Для визначення найефективніших умов спільного культивування фіто- і зоопланктону було опробовано чотири схеми внесення мікрводоростей у середовище із зоопланктоном.

Показано, що найбільш ефективною є схема внесення культур *D. amatus* та *A. dimorphus*, попередньо культивованих на скидній воді із УЗВ із додаванням промоторів вільнорадикального окислення, у середовище вирощування зоопланктону. Схема передбачає внесення 5 мл оводненої біомаси культур мікрводоростей, отриманих у фазу максимальної

продуктивності на 500 мл культурального середовища зоопланктону 1 раз на добу. Оптимальний термін культивування 15 діб. Застосування такої схеми дозволяє збагатити каротиноїдами культури *S. vetulus* до 7 мг/г, *D. magna* - 11 мг/г, *M. macroscopa* – 14 мг/г. Біомаса *D. magna* включала до свого складу 7 фракцій каротиноїдів: β -каротин, астаксантин, адоніксантин та їхні ефіри, кантаксантин, ехіненон, зеаксантин та лютеїн. При культивуванні *Moina macroscopa* з *D. armatus* відмічено збільшення кількості β -каротину, астаксантину, адоніксантину. У той же час, жодна з описаних схем не призвела до збільшення вмісту ехіненону, зеаксантину та лютеїну в культурах *D. magna*, *M. macroscopa* та *S. vetulus*.

Крім того, у ході досліджень встановлено, що зміна поживного складу мікроводоростей не знижує їхньої поживної цінності як кормового об'єкта. Отримана біомаса з підвищеним вмістом каротиноїдів та ліпідів виявилася ефективною для покращення якісних характеристик популяцій зоопланктону, що відкриває можливості для подальшого використання таких методів у біотехнологічних процесах виробництва живих кормів для аквакультури.

Таким чином, проведені дослідження вносять вагомий внесок у розвиток методик культивування мікроводоростей для аквакультури, де вдосконалення кормових субстратів дозволяє підвищити якість та продуктивність живих кормів для риби, ракоподібних та інших гідробіонтів.

У рамках дослідження було розроблено математичну модель для опису динаміки накопичення біомаси та цільових продуктів у процесі культивування мікроводоростей, а також витрат субстратів. Завдяки цьому вдається отримати цілісне уявлення про основні закономірності розвитку культури та її продуктивні характеристики.

Для реалізації моделей були створені спеціалізовані прикладні програми у середовищі Wolfram Mathematica, а також за допомогою мови програмування Python, які дозволяють легко модифікувати параметри системи та спостерігати вплив змін на поведінку культури мікроводоростей. Такі програми забезпечують можливість побудови графіків для візуалізації

динаміки біосинтезу каротиноїдів та росту біомаси, що дозволяє більш глибоко аналізувати процеси на різних стадіях культивування. Ці інструменти дозволяють дослідникам автоматизувати частину рутинних розрахунків та отримувати прогнози щодо ефективності різних умов культивування, що є особливо важливим для вибору оптимальних параметрів, які максимізують продуктивність.

Створені моделі та прикладні програми є універсальними інструментами для оптимізації процесів вирощування мікробіодоростей, зокрема для біосинтезу цільових продуктів, таких як каротиноїди.

Підходи, що розроблялися у дисертаційній роботі, дозволяють знизити витрати на виробництво, оптимізувати використання водних ресурсів, а також отримати більш збагачені корми для аквакультури, які сприяють покращенню росту, здоров'я та відтворювальних характеристик водних організмів.

Ключові слова: мікробіодорості, *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew., *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko, каротиногенез, скидні води з УЗВ.

SUMMARY

Dorosh I.V. Optimization of conditions for the cultivation of microalgae biomass as a source of nutrient complex. – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences, specialty 03.00.20 - biotechnology - Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University - Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2025.

The topic of rational use and reproduction of aquatic bioresources requires more and more attention due to the growing demand for aquaculture products. The development of modern biotechnology actively stimulates the search for effective methods of growing aquatic microorganisms, in particular unicellular algae, which are the main source of natural food for many aquatic organisms. This area is critical for stabilizing the ecosystem of water bodies and increasing the productivity of aquaculture farms.

Unicellular microalgae of the *Scenedesmaceae* family are characterized by a high content of protein, polyunsaturated fatty acids and other valuable biologically active substances. They not only serve as a food resource for planktonic fish, mollusks and zooplankton, but are also widely used in medicine, cosmetics and the food industry. It is important to note that the quality of algal biomass depends on the cultivation conditions, which allows us to control its composition and properties by changing the cultivation conditions, in particular the composition of the culture medium.

The search for alternative nutrient media for growing microalgae is a relevant area of biotechnology, especially in the context of reducing cultivation costs and increasing the efficiency of biomass production. The high cost of components of standard microbial growth media encourages researchers to search for more affordable nutrient sources that can provide algae with all the necessary nutrients.

However, in order to achieve high biomass productivity in a medium using wastewater, it is often necessary to use additional stimulants, such as organic and inorganic additives that promote active cell mass growth. Particularly noteworthy are studies of the effects of various additives that enrich the nutrient medium and activate the synthesis of target products in microalgae, such as carotenoids, polyunsaturated fatty acids, and proteins. The use of special additives that promote carotenogenesis, in particular, is a promising direction in improving the quality of the biomass obtained for further use in feed mixtures for fish and crustaceans. Carotenoids, which are natural pigments with antioxidant properties, are important components in the nutrition of aquaculture organisms, as they not only contribute to the color of fish bodies, which increases their market attractiveness, but also strengthen their immune system.

The development of technologies that allow regulating the content of carotenoids and other bioactive substances in algal biomass makes their biomass more nutritious and valuable from a commercial point of view.

The work is devoted to the study of efficient methods of cultivation of unicellular microalgae *Desmodesmus armatus* (Chod.) HEGEW. and *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) TSARENKO in order to optimize their chemical composition for aquaculture. In particular, the possibilities of using wastewater from recirculation aquatic systems (RAS) as an alternative nutrient medium and the effect of various stimulants on the processes of accumulation of target biologically active substances, such as carotenoids, are investigated. The factors affecting the productivity and quality composition of biomass, in particular the concentration of carotenogenesis inducers and osmoregulators, are analyzed. These studies are aimed at improving the efficiency of aquaculture production and developing new approaches to the rational use of water resources.

This study was the first to show that when *D. armatus* and *A. dimorphus* were grown on the wastewater from RAS, the productivity of these algae remained high throughout the experiment. The biomass growth during the entire cultivation period showed stable positive indicators, reaching a maximum level on day 40.

Thus, it was shown that the wastewater provides the studied microalgae species with access to the basic nutrients necessary for their growth, making it suitable for use in aquaculture.

However, despite a noticeable increase in the biomass and productivity of microalgae, the expected increase in carotenoid amount was not detected. Therefore, for the first time, we used methods of inducing carotenogenesis by introducing special promoters of free radical oxidation, in particular a mixture of Fe^{2+} and H_2O_2 , as well as the osmoregulator NaCl, into the culture medium during the second phase of cultivation on the waste water from RAS. As a result of the use of these substances, the level of carotenoids increased from 14 mg/g to 27 mg/g in *D. amatus* culture and from 12.5 mg/g to 24 mg/g *A. dimorphus* culture, indicating a significant stimulating effect of these substances on the process of carotenogenesis in both types of microalgae.

The analysis of the obtained samples showed that under the influence of the promoters, the composition of carotenoids changes: a decrease in the amount of primary carotenoids and, at the same time, an increase in the proportion of secondary carotenoids were observed. This is an important result, as secondary carotenoids often have increased antioxidant activity and can be particularly valuable for applications in various industries, including pharmaceuticals and food. However, it is worth noting that along with the increase of carotenoid level, there was a suppression of the growth activity of both crops. This may be due to oxidative stress caused by the presence of Fe^{2+} and H_2O_2 , which activate the process of free radical oxidation.

Another aspect of the experiment included the addition of other potential stimulants of carotenogenesis, sodium acetate (CH_3COONa) and glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) to the culture medium. These substances did not inhibit the growth activity of cultures, which indicates their non-toxicity to microalgae. However, no efficient influence on the synthesis of carotenoids from these components was observed, indicating a limited role of these compounds in stimulating carotenogenesis under these cultivation conditions.

Thus, the proposed methodology allows to induce the process of carotenogenesis, providing an increase in the amount of secondary carotenoids without the use of expensive additives. However, there is a need for further research to optimize this approach, in particular to reduce the negative impact on crop growth and increase the efficiency of the process. This may include combining different concentrations of promoters or using additional antioxidants that can reduce stress levels and improve overall crop performance.

For the first time, carotenoid-enriched cultures were used as a feed substrate for the cultivation of zooplankton, in particular for *Moina macrocopa* (Straus, 1820), *Simocephalus vetulus* (Müller, 1776) and *Daphnia magna* (Straus, 1820). To determine the most efficient conditions for the co-cultivation of phytoplankton and zooplankton, four schemes of microalgae introduction into the medium with zooplankton were tested.

It has been shown that the most effective scheme is the introduction of *D. armatus* and *A. dimorphus* cultures, pre-cultivated on the wastewater from RAS with the addition of free radical oxidation promoters, into the zooplankton culture medium. The scheme provides for the introduction of 5 ml of the hydrogenated biomass of microalgae cultures obtained in the phase of maximum productivity per 500 ml of zooplankton culture medium once a day. The optimal cultivation period is 15 days. The use of this scheme allows to obtain cultures of *S. vetulus* with carotenoid level up to 7 mg/g, *D. magna* up to 11 mg/g, *M. macrocopa* up to 14 mg/g. The biomass of *D. magna* included 7 fractions of carotenoids: β -carotene, astaxanthin, adonixanthin and their esters, canthaxanthin, echinenone, zeaxanthin, and lutein. When *Moina macrocopa* was cultivated with *D. armatus*, an increase in the amount of β -carotene, astaxanthin, and adonixanthin was observed. At the same time, none of the described schemes led to an increase in the content of echinenone, zeaxanthin and lutein in the cultures of *D. magna*, *M. macrocopa* and *S. vetulus*.

In addition, the study found that changing the nutritional composition of microalgae does not reduce their nutritional value as a feeding object. The obtained

biomass with a high content of carotenoids and lipids proved to be effective in improving the quality characteristics of zooplankton populations, which opens up opportunities for further use of such methods in biotechnological processes of live feed production for aquaculture.

Thus, our research makes a significant contribution to the development of microalgae cultivation methods for aquaculture, where the improvement of feed substrates can improve the quality and productivity of live feed for fish, crustaceans, and other aquatic organisms.

As part of the study, a mathematical model was developed to describe the dynamics of biomass and target products accumulation during microalgae cultivation, as well as substrate consumption. This allows us to get a holistic view of the main patterns of culture development and its productive characteristics.

To implement the models, specialized software was created using Wolfram Mathematica and Python. It allows for easy modification of system parameters and observation of the impact of changes on the behavior of the microalgae culture. The software provides the ability to build graphs to visualize the dynamics of carotenoid biosynthesis and biomass growth, which allows for a deeper analysis of processes at different stages of cultivation. These tools allow researchers to automate some of the routine calculations and obtain predictions about the efficiency of different cultivation conditions, which is especially important for selecting optimal parameters that maximize productivity.

The created models and applications are universal tools for optimizing microalgae cultivation processes, in particular for the biosynthesis of target products such as carotenoids.

The approaches developed in this work allow to reduce production costs, optimize the use of water resources, and obtain more enriched aquaculture feeds that improve the growth, health, and reproductive characteristics of aquatic organisms.

Key words: microalgae, *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew., *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko, carotenogenesis, wastewater from RAS.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. Marchenko, M.M., Dorosh, I.V. & Cheban, L.M. (2019). Induction of carotenogenesis in *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew cultivated on the closed waterside from recirculating aquaculture. *Biotechnologia Acta*, 12 (2), 46-55. <https://doi.org/10.15407/biotech12.02.046> (Особистий внесок здобувача: вирощування досліджуваної культури, проведення досліджень по каротиногенезу, опрацювання та аналіз отриманих експериментальних даних).
2. Cheban, L., Grynko, O. & Dorosh, I. (2018). Co-cultivation of *Daphnia magna* (Straus) and *Desmodesmus armatus* (chod.) Hegew. in recirculating aquaculture system wastewater. *Archives of Polish Fisheries*, 26, 57 – 64. Q3 <https://sciendo.com/downloadpdf/journals/aopf/26/1/article-p57.pdf> (Особистий внесок здобувача: культивування мікрowodоростей, планування схеми експерименту, опрацювання отриманих експериментальних даних).
3. Cheban, L.M., Dorosh, I.V. & Marchenko, M.M. (2018). Reaction of Cells *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. on the Induction of Carotynogenesis. *International Letters of Natural Sciences*, 72, 21-27. <https://doi.org/10.56431/p-ехха5т> (Особистий внесок здобувача: вирощування досліджуваної культури мікрowodоростей, проведення досліджень по каротиногенезу, опрацювання та аналіз отриманих експериментальних даних).
4. Khudyi, O., Marchenko, M., Cheban, L., Khuda, L., Kushniryk, O. & Malishchuk, I. (2016). Recirculating aquaculture systems waste water as a medium for increase of phytoplankton and zooplankton biomass. *International Letters of Natural Sciences*, 54, 1-7. <https://doi.org/10.56431/p-w7i7rc> (Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень з фітопланктоном).
5. Cheban, L., Malischuk, I. & Marchenko, M. (2015). Cultivating *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. in recirculating aquaculture systems (RAS) waste water. *Archives of Polish Fisheries*, 23(3), 155 – 162. <https://doi.org/10.1515/aopf-2015-0018> Q3 (Особистий внесок здобувача: планування та проведення

досліджень, опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті).

6. Чебан, Л.М., Маліщук, І.В., Гринько, О.Е. & Марченко, М.М. (2015). Вміст нутрієнтів у біомасі *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. та *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko, культивованій на скидній воді із УЗВ. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 7(2), 171–176. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nvchu_biol_2015_7_2_7 (Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання та аналіз експериментальних даних).

7. Маліщук, І.В., Чебан, Л.М. & Марченко, М.М. (2015). Продуктивність монокультури *Clorella vulgaris* Beijerinck, культивованої на скидній воді із установки замкнутого водопостачання. *Вісник Одеського національного університету*, 20, 1(36), 121–128. <http://visbio.onu.edu.ua/article/view/56917> (Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті).

8. Маліщук, І.В., Чебан, Л.М. & Марченко, М.М. (2015). Особливості культивування *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko на скидній воді із рибоводної установки замкнутого водопостачання. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. Спеціальний випуск: Гідроекологія*, 3-4 (64), 428-432. <http://dspace.tnpu.edu.ua/handle/123456789/5858> (Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті).

9. Чебан, Л.М., Маліщук, І.В., Лисак, В.Р. & Марченко, М.М. (2014). Ефективність вирощування *Anabaena hassalii* (kutz.) Wittr. за різних умов культивування. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 6 (2), 145-149. http://ibhb.chnu.edu.ua/uploads/files/vb/BS_T6_V2_2014.pdf (Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті).

Патенти:

1. Марченко, М. М., Чебан, Л. М., Гринько, О. Е., Худий, О. І., Кушнірик, О. В., Худа, Л. В., & Дорош, І. В. (2017). Спосіб вирощування *Daphnia magna* (Straus, 1820) сумісно з кормовим субстратом (мікродоростями) (Патент України № 121772). Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. <https://uapatents.com/patents/c12n-1-12> (*Особистий внесок здобувача: проведення досліджень із фітопланктоном, опрацювання отриманих результатів*).
2. Марченко, М. М., Худий, О. І., Чебан, Л. М., Худа, Л. В., & Маліщук, І. В. (2015). Спосіб культивування фітопланктону (Патент України № 101103). Державна служба інтелектуальної власності України. <https://ua.patents.su/7-101103-sposib-kultivuvannya-fitoplanktonu.html> (*Особистий внесок здобувача: культивування фітопланктону, аналіз експериментальних даних*).

Тези:

1. Dorosh, A., Dorosh, I., Cherevko, M., Marchenko, M. & Cheban, L. (2024). Mathematical modeling of biomass and carotenoid accumulation in microalgae. *2024 International Conference on Advanced Computer Information Technologies (ACIT)*, 18-21 вересня 2024 р., Чехія, 36–39. <https://doi.org/10.1109/ACIT 62333.2024.10712487>
2. Дорош, А. Б., Дорош, І. В. & Перцов, А. С. (2024). Моделювання динаміки накопичення біомаси та каротиноїдів у мікродоростях. (Тези доповіді). *10-а Міжнародна наукова конференція «Сучасні проблеми математичного моделювання, прогнозування та оптимізації» пам'яті почесного професора Кам'янець-Подільського національного університету імені Івана Огієнка*, 27 червня 2024 року, Кам'янець-Подільський, 84–85.
3. Дорош, І. В. & Чебан, Л. М. (2021). Дослідження можливості використання препарату Дон-1R для отримання кормової біомаси зелених водоростей. (Тези доповіді). *XV Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття»*, 23 квітня 2021 року, Київ, 36.

4. Чебан, Л. М., Дорош, І. В. & Ситник, М. Б. (2018). Вигодовування *Daphnia magna* (Straus, 1820) каротинвмісною біомасою *Desmodesmus* sp. (Тези доповіді). *Міжнародна науково-практична конференція «Екологічні проблеми навколишнього середовища та раціонального природокористування в контексті сталого розвитку»*, 25-26 жовтня 2018 року, Херсон, 520–524.
5. Дорош, І. В., Чебан, Л. М., & Ситник, М. Б. (2018). Вплив глюкози і ацетату натрію на продуктивність та каротиногенез *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. (Тези доповіді). *I Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні проблеми раціонального використання водних біоресурсів»*, 15-17 травня 2018 року, Київ, 102–104.
6. Маліщук, І. В., & Марченко, М. М. (2017). Зміни активності каталази, пероксидази та цитохром оксидази *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew за індукції каротиногенезу. (Тези доповіді). *Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 20-річчю заснування наукового фахового видання України «Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія Біологія»*, 20-22 квітня 2017 року, Тернопіль, 202-205.
7. Маліщук, І. В. & Чебан, Л. М. (2016). Індукція вторинного каротиногенезу у *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew в умовах двостадійного культивування. (Тези доповіді). *Актуальні проблеми біохімії та біотехнології. Тези доповідей конференції-конкурсу молодих учених*, 26-27 травня 2016 року, Київ, 33.
8. Маліщук, І. В., Чебан, Л. М. & Гринько, О. Е. (2016). Видовий склад фітопланктону річки Дністер. (Збірник тез). *Біотехнологія: звершення та надії: Збірник тез V Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених*, 12-13 травня 2016 року, Київ, 204.
9. Маліщук, І. В., Гринько, О. Е., & Чебан, Л. М. (2015). Амінокислотний склад *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew, культивованого на скидній воді із рибоводної установки замкнутого водопостачання. (Збірник тез).

«Біотехнологія XXI століття»: Тези доповідей IX Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 170-річчю від дня народження Іллі Мечникова, 24 квітня 2015 року, Київ, 63.

10. Маліщук, І. В., Ситник, М. Б., & Чебан, Л. М. (2015). Хлорофіли та каротиноїди *Chlorella vulgaris* Beijerinck при культивуванні на скидній воді із УЗВ. (Збірник тез). *Біотехнологія: звершення та надії: Збірник тез IV Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, 21-22 травня 2015 року, Київ, 150.*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	20
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1. ТЕОРЕТИЧНІ ЗАСАДИ ПРОДУКТИВНОСТІ ТА КОРЕКЦІЇ СКЛАДУ МІКРОВОДОРОСТЕЙ (огляд літератури)	27
1.1. Продуктивність мікробіоценозів та шляхи спрямованої корекції їх нутрієнтного складу	27
1.2. Індукція каротиногенезу у мікробіоценозах	31
1.3. Вплив складу живого корму на нарощення корисної біомаси веслоногих ракоподібних	37
1.4. Методологія моделювання живих систем	42
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	52
2.1. Структурно-логічний опис експериментальної роботи	52
2.2. Культивування альгокультур	53
2.2.1. Аналіз альгофлори верхів'я річки Дністер	53
2.2.2. Матеріал дослідження та умови культивування	54
2.2.3. Оцінка впливу комплексного препарату органічного походження	55
2.2.4. Вивчення впливу індукторів каротиногенезу	55
2.3. Методи дослідження альгокультур	56
2.4. Методи дослідження зоопланктону	57
2.5. Оцінка продуктивності зоопланктону при використанні біомаси водоростей як кормових організмів	59
2.6. Розробка математичної моделі та програмного продукту	60
2.7. Статистичний аналіз даних	60
РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЙ КУЛЬТИВУВАННЯ ВОДОРОСТЕЙ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ ЯК СУБСТРАТУ ДЛЯ ЗООПЛАНКТОНУ	61
3.1. Скринінг перспективних видів фітопланктону річки Дністер з метою розширення кормової бази нижчих ракоподібних та личинок риб	61
3.2. Розробка умов культивування <i>D. armatus</i> та <i>A. dimorphus</i> на альтернативному живильному середовищі	65
3.3. Використання комплексного препарату органічного походження з метою збільшення продуктивності культур <i>D. armatus</i> та <i>A. dimorphus</i>	73
3.4. Індукція каротиногенезу у клітинах зелених водоростей <i>D. armatus</i> та <i>A. dimorphus</i>	81

	19
3.5. Зміни ферментативної активності в <i>D. armatus</i> та <i>A. dimorphus</i> при індукції каротиногенезу	91
3.6. Використання мікроводоростей як кормового субстрату для зоопланктону	97
3.6.1. Розробка схеми використання мікроводоростей як кормового субстрату для культур <i>Daphnia magna</i> , <i>Semiocephalus vetulus</i> та <i>Moina macrocopa</i> в лабораторних умовах	97
3.6.2. Кокультивування зоопланктону та збагачених каротиноїдами мікроводоростей	109
РОЗДІЛ 4. КОМП'ЮТЕРНЕ І МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ БІОПРОДУКТИВНОСТІ МІКРОВОДОРОСТЕЙ <i>D. ARMATUS</i> ТА <i>A. DIMORPHUS</i>	120
4.1. Математичне моделювання процесу накопичення біомаси та каротиноїдів мікроводоростями	120
4.2. Комп'ютерне моделювання процесу накопичення біомаси та каротиноїдів мікроводоростями	129
УЗАГАЛЬНЕННЯ	138
ВИСНОВКИ	145
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	147
ДОДАТКИ	177
Додаток А	177
Додаток Б	182
Додаток В	185
Додаток Г	187
Додаток Д	189
Додаток Е	190

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

УЗВ – установка замкнутого водопостачання

АФК – активні форми кисню

ТШХ – тонкошарова хроматографія

НАДН - нікотинамідаденіндинуклеотид

НАДФН - нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. У галузі сучасної біотехнології та аквакультури надзвичайно важливою є розробка методів, які дозволяють раціонально використовувати та відтворювати водні біоресурси. Постійний ріст попиту на біомасу водних мікроорганізмів, зокрема одноклітинних водоростей, які становлять основу природних кормів для планктоноїдних риб, молюсків та зоопланктону, створює необхідність у пошуку ефективних методів їхнього вирощування. Крім того, тільки шляхом зміни складу живильного середовища можна досягти покращення продуктивних характеристик отриманої біомаси мікроводоростей [46,70,132].

Тому актуальною є потреба пошуку альтернативних живильних середовищ, які б ефективно забезпечували водорості необхідними поживними речовинами, а також зменшували витрати на їхнє вирощування. Ці дослідження сприяють також розумінню можливостей оптимізації використання водних ресурсів [2,42,75,135].

Використання скидної води із УЗВ дозволить здешевити процес культивування, але для отримання біомаси із підвищеним вмістом цільових продуктів слід застосовувати також і певні стимулятори нарощення біомаси. Дослідження, які включають вплив різних добавок на процеси культивування мікроводоростей, відкривають широкі можливості для розвитку сучасної аквакультури. Оскільки при розведенні риб в умовах аквакультури склад кормів формується штучно, введення каротиноїдів до раціону харчування є дуже важливим. Останні є незамінними компонентами кормів та преміксів у аквакультурі риб та ракоподібних. Аналіз впливу таких параметрів, як концентрація індукторів каротиногенезу та осморегуляторів, на вміст каротиноїдів у мікроводоростях може стати основою для розробки нових методів підвищення їхньої продуктивності [2,31,61,197,207].

Вивчення динаміки взаємодії мікроводоростей та зоопланктону в аквакультурних системах відкриває можливості для оптимізації вирощування

обох груп організмів. Розуміння цих взаємозв'язків дозволить розробити ефективніші стратегії управління аквакультурними екосистемами та підвищити їхню стійкість. Такі дослідження мають велике значення для промислових аквакультурних підприємств, оскільки можуть стати основою для розробки нових технологій вирощування водних біоресурсів [173,174,197].

Експериментальні дослідження, спрямовані на аналіз процесу культивування, виявляються часо- і ресурсозатратними. Розробка математичних моделей та програмних продуктів дозволить ефективно узагальнити ці результати та прогнозувати хід досліджень при різних умовах. Такі моделі стануть не лише інструментом для аналізу експериментальних даних, але й дадуть можливість оптимізувати умови культивування та раціонально використовувати ресурси у виробництві мікроводоростей [153,165,208].

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано на кафедрі біохімії та біотехнології Навчально-наукового інституту біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича в рамках науково-дослідних тем: «Біохімічні принципи застосування нутрієнтних факторів і вторинних метаболітів про- та еукаріот в попередженні і корекції патологічних станів» (№ 0111U002503), «Біотехнологічні підходи корекції функціонального стану та підвищення репродуктивного потенціалу об'єктів аквакультури» (№ 0120U102118).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було розробити підходи та принципи отримання та застосування каротиновмісної біомаси зелених водоростей *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. та *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko. Для цього передбачається оптимізувати умови культивування, дослідити динаміку біохімічних показників культур, вплив добавок на продуктивність, а також розробити математичну модель та програмний продукт для прогнозування процесу накопичення каротиноїдів.

Для досягнення поставленої мети вирішували такі завдання:

1. Оптимізувати умови культивування зелених водоростей *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. та *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko на скидній воді із УЗВ.
2. Дослідити динаміку основних морфологічних та біохімічних показників альгокультур в умовах накопичувального культивування.
3. Проаналізувати вплив індукторів каротиногенезу на процеси культивування мікрowodоростей для з'ясування їхнього потенціалу для підвищення продуктивності культури.
4. Дослідити особливості накопичення каротиноїдів та їх фракційний склад у біомасі досліджуваних культур.
5. Розглянути перспективні схеми сумісного культивування фіто- та зоопланктону.
6. Розробити математичну модель біотехнологічного процесу накопичення каротиноїдів у досліджуваних культурах.
7. Розробити програмний продукт для прогнозування динаміки накопичення біомаси, цільових продуктів та витрати субстрату в умовах *in vitro*.

Об'єкт дослідження: біотехнологія отримання біомаси зелених водоростей *Desmodesmus armatus* та *Acutodesmus dimorphus* на скидній воді з УЗВ, з метою вивчення динаміки їхнього росту та біохімічного складу, впливу добавок на процеси культивування, накопичення каротиноїдів, можливостей сумісного культивування з іншими видами планктону, розробки математичної моделі та програмного продукту для прогнозування динаміки культури.

Предмет дослідження: можливість застосування скидної води із УЗВ та використання комплексного препарату органічного походження при культивуванні кормових мікрowodоростей; вплив індукторів каротиногенезу на накопичення цільових метаболітів у біомасі мікрowodоростей *D. armatus* та *A. dimorphus*; можливість використання мікрowodоростей з удосконаленим нутрієнтним складом як корми для *Cladocera*; можливість оптимізувати

процес вивчення досліджуваних культур шляхом побудови математичної моделі та розробки програмного продукту, що дасть змогу описати динаміку накопичення біомаси, цільових продуктів та витрати субстрату з мінімальною кількістю експериментів.

Методи дослідження: накопичувальне культивування клітин мікроводоростей; сумісне культивування фіто- і зоопланктону, світлова мікроскопія, спектрофотометричні та фотоколориметричні методи визначення вмісту білків, ліпідів, пігментів; методи визначення ферментативної активності; хроматографічний аналіз амінокислот, методи кількісного та якісного аналізу каротиноїдів; методи статистики та комп'ютерного моделювання.

Наукова новизна одержаних результатів. Розроблено умови накопичувального культивування мікроводоростей *D. armatus* та *A. dimorphus* на скидній воді із УЗВ. Показана можливість корекції нутрієнтного складу культур *D. armatus* та *A. dimorphus* шляхом внесення у середовища індукторів каротиногенезу або комплексного препарату органічного походження. Розроблені схеми кокультивування мікроводоростей як кормового субстрату та культур зоопланктону (*Moina macrocopa* (Straus, 1820), *Simoccephalus vetulus* (Müller, 1776) та *Daphnia magna* (Straus, 1820)). Розроблено математичну модель та комп'ютерну програму біотехнологічного процесу накопичення каротиноїдів у досліджуваних культурах.

Практичне значення одержаних результатів. Результати здійснених досліджень можна застосовувати при виготовленні живих кормів чи кормових добавок на основі зелених водоростей в аквакультурі. Отримана каротиновмісна біомаса може бути використана для підвищення імунітету та покращення росту аквакультурних організмів. Розроблена математична модель та програмний продукт можуть стати основою для прогнозування продуктивності мікроводоростей та оптимізації біотехнологічних процесів у промисловому виробництві кормів. Матеріали дисертаційних досліджень

також можуть бути використані при плануванні науково-дослідних робіт зі спеціальності «Біотехнологія та біоінженерія».

Особистий внесок здобувача. Дисертантка самостійно підбрала та опрацювала літературні джерела; самостійно виконала експериментальну частину роботи та статистичну обробку отриманих даних. Результати дослідження інтерпретовано спільно з к.б.н., доцентом Чебан Л.М. Підготовка фактичного матеріалу до друку проведена разом зі співавторами. Аналіз та обговорення матеріалу, викладеного в дисертаційній роботі, проведено спільно з науковим керівником д.б.н., професором Марченком М.М., розробку математичної моделі проведено спільно з д.ф.-м.н., професором Черевком І.М.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень були представлені на 10-й Міжнародній науковій конференції «Сучасні проблеми математичного моделювання, прогнозування та оптимізації» пам'яті почесного професора Кам'янець-Подільського національного університету імені Івана Огієнка (Кам'янець-Подільський, 2024), на XV Всеукраїнській науково-практичній конференції «Біотехнологія XXI століття» (Київ, 2021), на Міжнародній науково-практичній конференції «Екологічні проблеми навколишнього середовища та раціонального природокористування в контексті сталого розвитку» (Херсон, 2018), I Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми раціонального використання водних біоресурсів» (Київ, 2018), Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 20-річчю заснування наукового фахового видання України «Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія Біологія» (Тернопіль, 2017), на конференції-конкурсі молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2016» (Київ, 2016), на V Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих учених (Київ, 2016), IX Всеукраїнській науково-практичній конференції, присвяченій 170 річниці від дня народження Іллі Мечникова (Київ, 2015), IV Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів,

аспірантів та молодих учених «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 2015).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 9 статей у наукових фахових виданнях, з них 4 статті у виданнях, включених до міжнародних науково-метричних баз (2 – Scopus, 2 - Web of Science), 5 – у виданнях України (категорія Б), 2 патенти на корисну модель, 10 тез доповідей у збірниках матеріалів міжнародних та всеукраїнських конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота включає вступ, чотири розділи (огляд літератури, матеріали та методи досліджень, два розділи результатів та їх обговорення), узагальнення, висновки, список використаних джерел літератури та додатки. Дисертацію викладено на 176 сторінках друкованого тексту та проілюстровано 31 рисунком та 9 таблицями. Список опрацьованої літератури включає 251 джерело. Додатки містять:

А – список публікацій здобувача за темою дисертації,

Б – таблицю «Видовий склад та сезонний розподіл фітопланктону середнього Дністра»,

В – таблицю «Показники масонакопичення та продуктивності зоопланктону при кокультивуванні з кормовими субстратами»,

Г – таблицю «Фракційний склад каротиноїдів у *D. magna*, *S. vetulus* та *M. macrocopa* при використанні *D. armatus* та *A. dimorphus* в якості кормових субстратів»,

Д – Фрагмент програмного коду в середовищі Wolfram Mathematica,

Е – Програмний код додатку мовою Python.

Подяки. Автор висловлює щире подяку науковому керівникові професору, д.б.н. Марченку М.М. за керівництво роботою. Також автор висловлює подяку науковцям Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України за надані колекційні культури зелених водоростей.

РОЗДІЛ 1

ТЕОРЕТИЧНІ ЗАСАДИ ПРОДУКТИВНОСТІ ТА КОРЕКЦІЇ СКЛАДУ МІКРОВОДОРОСТЕЙ

(огляд літератури)

1.1. Продуктивність мікроводоростей та шляхи спрямованої корекції їх нутрієнтного складу

Фітопланктон є основою трофічних ланцюгів більшості водойм, визначаючи кормову базу для консументів вищих порядків. Прісноводні та морські мікроводорості забезпечують водні організми енергією та поживними речовинами, такими як білки, ліпіди, каротиноїди, вітаміни, амінокислоти, поліненасичені жирні кислоти та мінерали [2, 248]. Мікроводорості також використовують як добавки до кормів риб при штучному вирощуванні, оскільки вони позитивно впливають на збільшення їхньої ваги, рівня тригліцеридів і акумуляцію білків у м'язах, сприяють підвищенню опірних сил організмів до хвороб [73, 93, 108, 122]. А їхня здатність забезпечити поліненасиченими жирними кислотами є визначальною при формуванні статевих продуктів риб, виживаності личинок тощо. Також мікроводорості вирощують в аквакультурі як живі корми для двостулкових моллюсків (устриць, гребінців, мідій), для ракоподібних, а також для зоопланктону, який є одним із ланок у харчових ланцюгах водойм [10, 66, 93].

Останніми роками зростаючі потреби в білку та висока вартість рибного борошна змушують шукати нові джерела нутрієнтів для аквакультури. За останні сорок років було розглянуто кілька сотень мікроводоростей як кормові добавки, проте менше двадцяти з них отримали широке застосування. Сьогодні такі мікроводорості, як *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* використовуються як джерело природних пігментів для креветок, лососевих та декоративних риб [50, 69, 148]. Водорості родів

Dunaliella sp., *Chlorella sp.* і *Spirulina sp.* успішно застосовують для синтезу цінних сполук, таких як ліпіди, білки й пігменти [69, 71, 123]. *Chlorella sp.* і *Spirulina sp.* зазвичай включають до кормів для акваріумних риб, для яких забарвлення і здоровий вигляд є основними критеріями ринку [140].

Крім того, зазначається, що комбінація різних видів водоростей забезпечує більш збалансоване харчування і сприяє кращому росту вирощуваних організмів порівняно з дієтою, що складається лише з одного виду водоростей [142, 200].

Мікрководорості, крім високої харчової цінності, повинні мати також низку важливих характеристик, щоб бути корисними в аквакультури. Найчастіше використовуються штами мікрководоростей, які не є токсичними, легко культивуються, мають необхідні розміри і форми. Вибір швидкоростучих штамів є критично важливим для успішного використання біомаси мікрководоростей і зниження вартості продуктів, одержаних з цієї біомаси. Швидкий ріст сприяє високій продуктивності біомаси, а це зменшує витрати на її культивування. Крім того, високі темпи росту зменшують ризик контамінації культури [73, 126, 201].

У лабораторних умовах для накопичення певних цінних метаболітів використовуються екстремофільні види мікрководоростей, здатні швидко адаптуватися до змін умов вирощування, змінюючи свої метаболічні шляхи та виробляючи різноманітні вторинні біологічно активні метаболіти, такі як пігменти і каротиноїди [97, 103, 130, 158, 231].

Найперспективнішими для аквакультури вважаються мікрководорості родів *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Scenedesmus*, *Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Nannochloropsis*, *Skeletonema* і *Thalassiosira*. Вони невибагливі до умов культивування, таких як температура, освітлення та склад живильного середовища [97, 172, 193, 223, 232].

Ці види, поряд із високою продуктивністю, відповідають вимогам до харчових організмів, що робить їх доцільними для використання в аквакультури. Їхня ключова перевага – виняткова здатність адаптуватися до

змін оточуючого середовища. Завдяки «пластичному» метаболізму їх можна культивувати з використанням як неорганічних, так і органічних джерел вуглецю [6, 57, 71, 149].

Існують практики вирощування кормових мікроводоростей для аквакультури у відкритих водоймах, що є значно дешевшим варіантом, але культури, вирощені за таких умов, легко піддаються контамінації. Тому більш поширеним і дослідженим є метод лабораторного вирощування мікроводоростей. Крім того, змінюючи умови культивування, можна регулювати вміст вуглеводів, ліпідів та білків у біомасі або ініціювати біосинтез окремих цільових продуктів [52, 107].

Важливим є співвідношення всіх чинників, що мають вплив на рівень акумуляції біомаси клітин і можливість ініціації біосинтезу цільових продуктів [142, 247]. До цих факторів належать вибір штаму, вихідна концентрація клітин у середовищі, інтенсивність освітлення, температура та склад живильного середовища. Крім того, склад живильного середовища може впливати на розподіл профілю вторинних нутрієнтів. При цьому збільшення вмісту ліпідів призводить до зміни часток інших компонентів біомаси – білків і вуглеводів [47, 121].

Для збільшення швидкості росту фототрофних організмів зазвичай використовують гетеро- або міксотрофні умови, використовуючи середовища з органічними джерелами вуглецю, такими як глюкоза, ацетат або гліцерин [28, 234].

Для покращення вмісту біомаси мікроводоростей застосовують різні методи, зокрема зміни умов культивування, таких як інтенсивність освітлення, температура й склад живильного середовища. Ці маніпуляції дозволяють налаштовувати склад нутрієнтів і, відповідно, оптимізувати їх загальний вихід та продуктивність [187, 204].

З метою здешевлення схем культивування використовують відходи сільського господарства й агропромислових комплексів як живильне середовище, оскільки вони містять усі необхідні макро- та мікроелементи для

росту водоростей [27, 136]. Таким чином, економічно вигідніше вирощувати мікроводорості у стічних водах. Ці підходи до культивування вже були вивчені для деяких видів, таких як *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* і *Ancistodesmus sp.*[129, 151, 243].

Види роду *Scenedesmus sp.* є перспективними для аквакультури, оскільки їх біомаса містить усі необхідні амінокислоти, а також велику кількість білків, ліпідів та мінеральних речовин. Крім того, для таких мікроводоростей вже було продемонстровано ефективне культивування на середовищах із різними концентраціями відходів промислових заводів [98, 243, 249].

Також відомо, що переважна більшість фотосинтезуючих водоростей може використовувати для свого росту іони нітрату або амонію, які досить часто зустрічаються у скидних водах. Деякі види водоростей віддають перевагу амонійному азоту, оскільки він є кінцевим продуктом у процесах відновлення нітрату, який водночас гальмує та пригнічує його засвоєння. Проте багато водоростей чутливі до аміаку, і його концентрація понад 1 ммоль/л може уповільнювати їхній ріст. Дефіцит азоту значно знижує швидкість накопичення біомаси культури, однак при цьому збільшується вміст ліпідів і жирних кислот у клітинах водоростей. [43]. У працях [60, 100, 123] вивчено вплив різних джерел азоту, таких як нітрат амонію, карбонат амонію, сечовина та відходи сільського господарства, на ріст мікроводоростей *Scenedesmus sp.* і *Chlorella sp.* [244]. З'ясовано, що використання азоту у формі нітрату або урини сприяє збільшенню біомаси водоростей [83, 175]. Крім того, такі скидні води містять усі необхідні для життєдіяльності та росту культур макро- і мікроелементи, включно з вітамінами та коферментами. Азот у сільськогосподарських відходах переважно представлений органічними сполуками, амонієм та нітрат-іонами. [237, 246].

Проте у складі таких стічних вод багатьох підприємств, крім сполук, що мають позитивний вплив на нарощення корисної біомаси

мікродоростей, є ряд сполук, що можуть і негативно впливати на культивування останніх [33, 104, 113]. Тому досі залишаються актуальними пошуки скидних вод зі складом, який би максимально підходив для досліджуваної культури і в той же час характеризувався дешевизною та простотою підготовки для культивування.

1.2. Індукція каротиногенезу у мікродоростях

Виробництво каротиноїдів у промислових масштабах має значний попит, який щороку зростає. Каротиноїди додаються до кормів у аквакультури, зокрема, щоб надати лососевим і ракоподібним характерного червонувато-помаранчевого кольору, який вважається важливим показником якості [62].

Каротиноїди, екстраговані з мікродоростей, є важливими для підтримання здоров'я людини. Вони виконують роль провітамінів та є потужними антиоксидантами, що запобігають віковим дегенеративним і онкологічним захворюванням. З хімічної точки зору, каротиноїди належать до тетратерпенів і представлені довгими розгалуженими вуглеводневими ланцюгами з подвійними зв'язками, які на одному або обох кінцях завершуються іононовим кільцем [171].

Розрізняють два основні класи каротиноїдів: каротини, які не містять атомів кисню (наприклад, α -, β - і γ -каротин), та ксантофіли, що включають кисень. Серед ксантофілів виділяють гідроксильні похідні, зокрема зеаксантин та лютеїн, а також епоксидні похідні, наприклад, віолаксантин і неоксантин, які містять як епоксидні, так і гідроксильні групи [88].

Розрізняють первинні (фотосинтетичні) і вторинні каротиноїди мікродоростей. Первинні каротиноїди, такі як лютеїн і β -каротин, виконують ключові функції у фотосинтезі, забезпечуючи захист фотосинтетичного апарату від фотоокислювального пошкодження та

підтримують його структуру [53, 211]. Вони локалізовані на тилакоїдних мембранах хлоропластів.

Вторинні каротиноїди не беруть участі у фотосинтезі й розташовуються у ліпідних включеннях цитоплазми або в стромі пластид [65]. Прикладами таких є астаксантин і кантаксантин. Їх синтез і накопичення відбувається у відповідь на несприятливі умови, такі як дефіцит поживних речовин, інтенсивне освітлення, підвищена температура або засоленість середовища. Цей процес називається вторинним каротиногенезом [29].

Основною функцією вторинних каротиноїдів є захист клітин мікроводоростей від наслідків оксидативного стресу, який виникає під впливом несприятливих зовнішніх чинників. У цей період метаболізм клітин перебудовується, утворюються спори або цисти. Це забезпечує виживання клітин шляхом переходу з вегетативного стану до стадії спокою.

На сьогодні відомо про наявність вторинних каротиноїдів у кількох десятків видів мікроводоростей, що належать до трьох відділів: *Chlorophyta*, *Euglenophyta* і *Eustigmatophyta*. Найбільше продуцентів кетокаротиноїдів виявлено серед представників відділу *Chlorophyta*. Хімічно вторинні або кетокаротиноїди представників *Chlorophyceae* є С40-кетокаротиноїдами, які є інтермедіатами ферментативного окислення β -каротину до астаксантину [154, 196].

На сьогоднішній день у промисловості β -каротин отримують із зеленої мікроводорості *Dunaliella salina* [26]. Основним джерелом природного астаксантину є зелена мікроводорість *Haematococcus pluvialis* [194]. Астаксантин є одним із ключових метаболітів вторинного каротиногенезу і широко використовується в аквакультурі лососевих риб [37]. Крім того, він є потужним антиоксидантом та імуностимулятором, регулятором роботи нервової та серцево-судинної систем [116, 224, 235].

Деякі види родини *Chlorophyceae* здатні накопичувати каротиноїди за певних умов культивування і можуть бути використані як продуценти для

вивчення аспектів каротиногенезу. До таких видів належать зелені кокоїдні мікроводорості родів *Chlorococcum*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Protosiphon*, *Scotiellopsis* та інші [105, 199]. Тому актуальним є пошук нових продуцентів каротиноїдів серед представників цієї родини та розробка методів їх отримання.

Зелені мікроводорості родини *Scenedesmaceae* живуть у прісноводних водоймах і вважаються перспективними продуцентами каротиноїдів через такі характеристики [186]:

- змінюють забарвлення від зеленого до помаранчевого під час старіння культури або під впливом несприятливих умов;
- описаний вторинний каротиногенез для деяких представників кокоїдних водоростей, зокрема *S. rubescens* і *S. obliquus*;
- наявність стадій спокою або цист [36,229].

Рід *Desmodesmus* включає одноядерні автоспорові, ценобіальні водорості, оболонка яких має додатковий спорополеніновий шар і здатна утворювати різні вирости. Розмножуються вони автоспорами, які ще в материнській клітині з'єднуються у новий ценобій [1]. Первинні каротиноїди в клітинах цих водоростей асоційовані з мембранами тилакоїдів і виконують важливі функції: збирають світло, захищають від фотоокислювального пошкодження та підтримують структуру фотосинтетичного апарату. Мембрани хлоропластів, що містять значну кількість ненасичених жирних кислот із трьома подвійними зв'язками, є дуже чутливими до фотодеструкції активними формами кисню. Ксантофіли віолоксантинового ряду можуть нейтралізувати триpletний хлорофіл і синглетний кисень [171, 212]. Таким чином, первинні каротиноїди за присутності кисню захищають хлорофіл та ліпіди від пошкоджень і забезпечують стійкість тилакоїдних мембран при високій інтенсивності світла. Водночас вторинні каротиноїди не беруть участі у фотосинтезі й не пов'язані з фотосистемами.

Екстремофільні види мікроводоростей, які живуть у тимчасових або сезонно висихаючих водоймах, здатні індукувати накопичення каротиноїдів

як реакцію на різкі зміни умов навколишнього середовища, таких як температура, освітленість, солоність або дефіцит живильних речовин [97, 218].

Вторинний каротиногенез є важливим фізіологічним та біохімічним механізмом адаптації для цих водоростей, який проявляється у накопиченні специфічних каротиноїдів, відмінних за структурою та функціями від первинних каротиноїдів, що беруть участь у фотосинтезі. Вторинні каротиноїди накопичуються в ліпідних включеннях цитоплазми або хромопластів, а не в тилакоїдних мембранах хлоропластів [216]. Дослідження, здійснені при використанні методів електронної та світлової мікроскопії, показали, що ці вторинні каротиноїди у переважній більшості мікрводоростей накопичуються в ліпідних везикулах поза хлоропластами [89, 196].

Каротиноїди мікрводоростей синтезуються через процес, характерний для всіх ізопреноїдів, де ацетат і мевалонова кислота є їхніми основними попередниками. В даний час існує також гіпотеза про два можливих шляхи біосинтезу ключових C5-ізопреноїдів, зокрема ізопентинілдифосфату і диметилалілдифосфату. Ці C5-ізопреноїди можуть утворюватися або в цитоплазмі шляхом ацетатно-мевалонового шляху, де ацетат використовується для синтезу стеролів, або з глюкози в хлоропластах (гліцеральдегід-3-фосфатно-піруватний шлях), де вони служать попередниками каротиноїдів [127, 176].

Синтез β -каротину відбувається в хлоропластах подібно до процесу біосинтезу каротиноїдів у інших органелах [164]. Утворення кетокаротиноїдів має місце в ліпідних включеннях цитоплазми, де β -каротин перетворюється через додавання кето- чи гідроксигруп до β -іононових циклів. У результаті цього складного метаболічного процесу з численними точками розгалуження утворюються астаксантин та його моно- і диацильні ефіри.

Багато мікроводоростей, окрім астаксантину, накопичують також його попередників [80]. Процес введення кето- та гідроксигруп у молекулу β -каротину є залежним як від специфічності ферментів, так і від фізико-хімічних характеристик індуктора, що пояснює різноманітність вторинних каротиноїдів у різних видів. Наприклад, у *H. pluvialis* астаксантин є майже єдиним вторинним каротиноїдом, виявленим у біомасі [120, 172]. У *Chlorococcum sp.* існує кілька шляхів біосинтезу астаксантину, тоді як у деяких видів *Chlorella sp.* кантаксантин утворюється з β -каротину через ехіненон, а астаксантин і адоніксантин - із зеаксантину. У більшості водоростей астаксантин зазвичай зустрічається у вигляді моно- і діацильних ефірів [109]. Якщо ферменти для синтезу астаксантину відсутні, як, наприклад, у *Dunaliella salina*, β -каротин накопичується як основний вторинний каротиноїд у хлоропластах [167].

Біосинтез вторинних каротиноїдів визначається наявністю їхніх попередників або хімічних сполук, які можуть стимулювати процес кетокаротиногенезу [90]. Незважаючи на те, що факт індукції синтезу вторинних каротиноїдів підтверджено, механізми цього процесу та його регуляція ще не до кінця зрозумілі. Відомо, що активні форми кисню (АФК) беруть участь у цьому процесі: додавання їх генераторів, таких як гіпохлорид натрію, перекис водню та пероксинітрит, спричинює підвищене утворення вторинних каротиноїдів. АФК, ймовірно, є вторинними месенджерами, які запускають шляхи біосинтезу вторинних каротиноїдів, таких як астаксантин і його ефіри, через активацію специфічних ферментів або індукцію експресії відповідних генів. Також спостерігається збільшення концентрації АФК під час осмотичного стресу або зниження ефективності фіксації вуглекислого газу [32, 180, 245].

Недостатність мінеральних елементів, зокрема азоту й фосфору, сприяє підвищенню синтезу астаксантину, оскільки сполуки, які блокують глютамінсинтазу і порушують поглинання азоту, стимулюють накопичення астаксантину у *H. pluvialis* [149].

У представників роду *Dunaliella* встановлена пряма залежність між інтенсивністю освітлення та рівнем біосинтезу вторинних каротиноїдів. Проте дані про роль світла в індукції каротиногенезу суперечливі, оскільки у випадку *H. pluvialis* відзначено, що культура може накопичувати астаксантин навіть у темряві за наявності органічного джерела вуглецю, такого як ацетат натрію чи глюкоза [148, 240, 242].

Додавання органічних джерел вуглеводів стимулює накопичення каротиноїдів у мікроводоростях, які здатні переходити з фототрофного на гетеротрофне живлення за несприятливих умов. Це було продемонстровано для *Trentepohlia aurea* при додаванні пептону, а також для *Chlorella protothecoides* при додаванні глюкози і сечовини [150]. У *C. zofingiensis*, коли в середовище додають моно- і дисахариди, біосинтез астаксантину посилюється. Найбільший ефект спостерігається при використанні глюкози чи сахарози, а менш виражений – при додаванні лактози. Аналоги глюкози не викликають такого ж ефекту, що свідчить про те, що це явище не можна пояснити тільки осмотичною активністю вуглеводів [156, 241]. Можливо, це пов'язано з тим, що глюкоза є попередником у біосинтезі каротиноїдів у хлоропластах.

Механізми індукції вторинного каротиногенезу за допомогою ацетату натрію та глюкози ще не до кінця зрозумілі. Можливо, ці сполуки через ацетил-КоА включаються в енергетичний та метаболічний процеси клітин мікроводоростей, забезпечуючи необхідну енергію і вуглець для синтезу кетокаротиноїдів, ліпідів і вуглеводів.

Найефективнішим методом для дослідження індукції каротиногенезу є двостадійне накопичувальне культивування [30, 160]. Цей підхід включає дві фази: на першій стадії культура вегетує, накопичуючи біомасу та збільшуючи кількість клітин. На другій стадії, після додавання хімічних активаторів, культура переходить у фазу накопичення каротиноїдів, що супроводжується морфологічними змінами клітин мікроводоростей [81].

При індукції каротиногенезу часто спостерігається перерозподіл основних нутрієнтів, таких як білки, вуглеводи й ліпіди. Зазвичай, це призводить до значного збільшення вмісту ліпідів при одночасному зменшенні кількості білків і пігментів [210].

Іноді, коли каротиногенез посилюється, спостерігається збільшення рівня білків, але це трапляється рідше. Зокрема, при активізації синтезу вторинних каротиноїдів може збільшуватися синтез білків, які включають ферменти, що беруть участь у біосинтезі каротиноїдів та стабілізації ліпідних структур. У деяких випадках, як у *H. pluvialis*, індукція каротиногенезу може відбуватися без помітного підвищення синтезу білків, можливо, завдяки попередньо синтезованим ферментам [172].

Незважаючи на те, що вміст основних нутрієнтів у зелених мікроводоростях може значно варіюватися в залежності від специфічних або неспецифічних індукторів у середовищі, він зазвичай залишається в межах, які забезпечують життєздатність клітин. Наприклад, кількість ліпідів може коливатися від 15% до 60%, білків – від 20% до 60%, а вуглеводів – від 10% до 50% від сухої маси [178]. Ці межі роблять біомасу зелених мікроводоростей корисною для різних галузей біотехнології. Однак це також підкреслює необхідність детального дослідження фракційного складу біомаси у контексті каротиногенезу для кожного потенційного продуцента, такого як *D. armatus* та *A. dimorphus*, в залежності від обраних методів і засобів індукції каротиногенезу.

1.3. Вплив складу живого корму на нарощення корисної біомаси веслоногих ракоподібних

У аквакультурі вирощування риб та їх личинок передбачає використання живих організмів у кормах, таких як мікроводорості, коловратки, веслоногі ракоподібні та артемії [3, 34].

Прісноводний зоопланктон має значну роль як джерело живої їжі. Ці організми містять різноманітні травні ферменти, зокрема протеази, пептидази, амілазу, ліпазу і навіть целюлазу, які виступають екзоферментами для кишечника тварин, які їх споживають. Наприклад, ракоподібні класу *Cladocera* широко використовуються в аквакультурі, а також для догляду за акваріумними рибами комерційного значення. *Cladocera* відрізняються високою швидкістю розмноження, здатністю витримувати різні температурні умови та успішно розвиватися на фітопланктоні й органічних відходах. Поживність цих організмів змінюється в залежності від їхнього віку та типу їжі. Зазвичай, вміст білка становить близько 30% від сухої маси. Дорослі особини мають більше жиру порівняно з молодими, з загальним вмістом ліпідів від 20% до 27% у дорослих і від 4% до 6% у молодняку [31, 80, 215].

Оскільки *Daphnia*, *Moina* і *Semiocephalus* є представниками зоопланктону, які вважаються найкращим живим кормом для молодих риб на початкових стадіях їхнього росту, їх масове виробництво з високим поживним значенням є важливим для багатьох аквакультур [17, 59, 61, 79]. Малі розміри, помірна рухливість та здатність до автоінгібування при високій щільності роблять ці організми цінними для масового вирощування як стартові живі корми. Їхні постійні рухи у вигляді дрібних трясок привертають увагу мальків риб, а їхній хімічний склад робить їх важливими для аквакультури [11]. Хоча ці організми багаті на поживні речовини, їхній вміст незамінних жирних кислот, зокрема (ω -3), та каротиноїдів є низьким. Щоб підвищити вміст цих компонентів, їх можна збагачувати, вирощуючи на спеціальних середовищах або шляхом інкапсуляції [111].

Вирощування веслоногих ракоподібних має свої труднощі. Кожен тип кормових організмів потребує особливих умов для вирощування, які відповідають їхнім біологічним вимогам. Процес вирощування та утримання таких організмів є досить трудомістким і вимагає значних матеріальних та часових витрат. Неправильні методи культивування можуть призвести до низької продуктивності. Незважаючи на численні дослідження в цій сфері,

методики культивування постійно вдосконалюються, і питання оптимізації їх вирощування залишається актуальним [102, 133, 155].

Веслоногі ракоподібні, які є седиментаторами, можуть живитися бактеріями, мікроводоростями або дріжджами. Мікроводорості є важливими для вирощування зоопланктону не лише через їхню харчову цінність, але й завдяки своїм розмірам, що коливаються від 5 до 25 мкм [174]. Це ідеально підходить для корму гіллястовусих ракоподібних та інших організмів. Сьогодні мікроводорості використовують як основне джерело їжі для всіх стадій морських молюсків (устриць, гребінців, раковин), червононогих (абалони, раковини), личинок риб (тріска, палтус, тилапія) і креветок *Penaeus* sp.[66]. Вони також важливі для ротифікаторів, копепод і креветок. Мікроводорості часто використовують разом із ротифікаторами для живлення молодих риб, що зазвичай покращує їх виживання та темпи росту [80, 101, 193, 220].

Дріжджі пекарських виробів також використовуються як додаткове джерело їжі для нижчих ракоподібних [144]. Вони можуть бути основним або додатковим джерелом живлення для зоопланктону, що вирощується для аквакультури, і є важливим компонентом штучних дієт для личинок. Дріжджі можуть бути оцінені як добавка або заміна мікроводоростям при годуванні креветок. Вони містять незамінні амінокислоти, білок, полісахариди та багаті екзогенними ферментами, що забезпечує їхню харчову цінність. Проте дріжджі можуть також забруднювати середовище культивування [238].

Мікроводорості є важливим компонентом для личинок, оскільки стимулюють ферментативний синтез і покращують живлення молодняка. Це сприяє вищій виживаності личинок риб на ранніх стадіях розвитку, підвищує їхні захисні властивості і, в подальшому, кормову цінність дорослих особин [83, 236].

Вибір корму для зоопланктону визначається їхніми розмірами та харчовими потребами. Мікроводорості є особливо цінними з кількох причин:

а) Деякі види мікроводоростей містять високі концентрації каротиноїдів і поліненасичених жирних кислот, які є важливими для нормального розвитку личинок риби. Оскільки прісноводні безхребетні кормові організми не можуть самостійно синтезувати ці сполуки, їх використання як корму забезпечує недостатність у цих важливих елементах. Насичення таких організмів мікроводоростями з високим вмістом каротиноїдів і жирних кислот робить їх більш поживними для риби [41].

б) Деякі мікроводорості можуть бути безпосередньо додані до середовища вирощування зоопланктону, що покращує якість середовища і знижує витрати на технології вирощування [44].

в) Деякі мікроводорості мають антибактеріальні властивості. Додавання таких водоростей до середовища вирощування допомагає зменшити кількість умовно патогенних мікроорганізмів і позитивно впливає на розвиток мікрофлори личинок риби [131, 250].

Вибір мікроводоростей для корму зумовлений їхніми розмірами та складністю культивування. Вони повинні легко адаптуватися до умов масового вирощування, швидко рости і не проявляти автоінгібування при високій щільності [91].

Щодо оптимізації методів вирощування веслоногих ракоподібних, це можна досягти шляхом коригування ряду факторів культивування, зокрема трофічних. Хоча в аквакультурі часто використовують штучні суміші солей, мікроводорості залишаються найкращим кормом для цих організмів. Вибір видів мікроводоростей та методи їх насичення (температура, щільність посадки) значно впливають на продуктивність кормових організмів [115]. Веслоногі ракоподібні можуть вибірково харчуватися, і на це впливають розмір та біохімічний склад клітин мікроводоростей [189].

Для оптимізації вирощування веслоногих ракоподібних, важливої складової біотехнологічної схеми культивування риби та їхніх личинок, необхідно враховувати ключові біологічні фактори, що впливають на розвиток культури, та підбирати відповідні види мікроводоростей.

Дослідження впливу попередньої трофічної адаптації веслоногих ракоподібних до різних видів водоростей допоможе вдосконалити існуючі методики культивування [86].

При визначенні поживної цінності водоростей для зоопланктону важливо враховувати кілька аспектів, включаючи розмір клітин, засвоюваність клітинної стінки, нетоксичність і хімічний склад. Хоча багато досліджень зосереджувалися на хімічному складі водоростей, інші аспекти, такі як розмір клітин і засвоюваність клітинної стінки, також мають значення. Водорості відповідного розміру можуть надходити до організмів, але не завжди забезпечують бажаний кормовий ефект. Лише обмежена кількість видів мікроводоростей відповідає трофічним потребам зоопланктону [114, 202, 230].

У питаннях харчування зоопланктону велика увага приділяється амінокислотному складу мікроводоростей. Останнім часом значний інтерес викликає також каротиноїдний склад, зокрема вміст астаксантину, який є важливим для вирощування личинок комерційно цінних видів риби [141, 166, 190].

Звичайною практикою вирощування личинок риби та креветок є додавання мікроводоростей до інтенсивних систем культивування разом із зоопланктоном, що стало популярним у наші дні. Живі харчові організми містять усі необхідні поживні речовини, такі як незамінні білки, ліпіди, вуглеводи, вітаміни, мінерали, амінокислоти та жирні кислоти, тому їх часто називають «живими капсулами живлення» [87, 191]. Забезпечення належної живої їжі в сучасний період відіграє ключову роль у досягненні максимального росту та виживання молодняку морських риби та моллюсків. Для досягнення максимальної продуктивності та рентабельності харчові компоненти натуральної їжі повинні бути визначені та кількісно виміряні. Харчовий статус організмів живої їжі можна покращити за допомогою різних методів збагачення та біокапсуляції. Сьогодні живі корми вдосконалюють, регулюючи їхні біохімічні процеси, контролюючи їхні дієти та доповнюючи

культури мікрокапсульованими кормами або емульгованими оліями [169, 177, 181].

Отже, хоча мікроводорості є широко використовуваною живою їжею в багатьох сферах аквакультури, їх використання має певні проблеми та обмеження. Постійно актуальним є пошук нових видів живих харчових організмів, які краще підходять для конкретних умов культивування. Для багатьох комерційних видів риби рекомендується підгодівля живими кормами під час вирощування. Незважаючи на те, що масштабне, інтенсивне виробництво мікроводоростей є дорогим та часто ненадійним, виробництво живих харчових організмів залишається важливим початковим кроком в аквакультурі. Сьогодні розуміння їхнього поживного потенціалу потребує додаткових досліджень. Живі корми піддаються збагаченню, що робить їх ідеальними кандидатами для масового виробництва. Тому доцільно проводити подальші дослідження для вдосконалення та стандартизації методів культивування живих харчових організмів.

1.4. Методологія моделювання живих систем

Живі організми є надзвичайно складними системами, де безліч біологічних процесів взаємодіють на різних рівнях організації. Для кращого розуміння цих процесів у біології застосовуються методи моделювання, які дозволяють створити спрощену, але водночас репрезентативну аналогію живого організму. Такі моделі служать потужним інструментом для дослідження та аналізу біологічних систем [39].

Моделювання в біології дозволяє вивчити, як зміни параметрів та різних умов впливають на біологічні процеси, та спрогнозувати можливі наслідки цих змін. Використовуючи моделі, науковці можуть досліджувати складні системи без необхідності проведення експериментів на живих організмах, які часто бувають дорогими, тривалими та етично неприйнятними [56].

Математичне моделювання є ключовим інструментом для опису та аналізу складних біологічних процесів. У основі цього підходу лежить створення моделей, що представляють собою системи математичних співвідношень. Ці співвідношення можуть описувати різноманітні технологічні, біологічні та інші процеси, дозволяючи формалізувати їх і детально вивчати.

Використання математичних моделей дозволяє науковцям проводити аналіз біологічних систем на різних рівнях — від молекулярного до екосистемного. Зазвичай, дослідження таких моделей здійснюється за допомогою спеціально розробленого програмного забезпечення та комп'ютерів, що забезпечує можливість опрацювання великих обсягів даних та складних обчислень [67].

Моделі росту популяцій є важливими математичними та статистичними інструментами, призначеними для аналізу змін чисельності популяцій організмів із часом. Вони дозволяють науковцям та дослідникам з'ясувати, як різні чинники впливають на зростання або зниження чисельності популяцій, і передбачити майбутні тенденції в їхній динаміці. Використання таких моделей допомагає вивчати питання, пов'язані зі збільшенням чи скороченням популяцій, впливом факторів довкілля, конкуренцією, хижацтвом, наявністю ресурсів та розмноженням. Завдяки цим моделям можна ефективніше прогнозувати зміни в популяціях і розробляти стратегії для їхнього управління в екологічних та природних системах [77].

Емпіричні моделі. Емпіричні моделі базуються на експериментальних даних і використовують статистичні методи для опису залежностей між змінними. Найпростішою для опису росту популяції є модель необмеженого росту, відома також як геометрична прогресія в дискретному вигляді або експонента в неперервному вигляді, або модель Мальтуса. Вона описує випадок необмеженого росту, коли певна популяція клітин заселяє середовище, де існує велика кількість вільних ресурсів.

Зрозуміло, що експоненціальний ріст популяції не триває вічно. З часом ресурси вичерпаються, і ріст популяції сповільниться. У практичній біології часто існує закономірність: від гострого збільшення чисельності особин до поступового сповільнення приросту при наближенні до певного рівня, після якого настає виродження популяції внаслідок вичерпання ресурсів. Так, модель Моно описує, як швидкість росту культури залежить від ліміту доступних поживних речовин [49, 147].

Кінетичні моделі. Кінетичні моделі є важливими інструментами для опису динаміки росту біомаси в мікробіологічних культурах та мікроводоростях. Ці моделі детально аналізують швидкості біохімічних реакцій, які відбуваються в клітинах, і їхній вплив на ріст біомаси та споживання субстрату. Кінетичні моделі враховують, як клітини використовують поживні речовини (субстрати) для своєї життєдіяльності та росту. Процес починається із засвоєння субстрату, коли клітини поглинають необхідні поживні речовини з навколишнього середовища. Далі поживні речовини використовуються в різних метаболічних шляхах, де вони перетворюються в енергію та будівельні блоки для клітин. Використовуючи продукти метаболізму, клітини синтезують необхідні біомолекули, такі як білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди, що забезпечують їхній ріст та поділ [40].

Кінетичні моделі також враховують вплив різних факторів на швидкість біохімічних реакцій та ріст біомаси. Наприклад, концентрація субстрату на початкових стадіях культивування може бути високою, що сприяє швидкому росту. Однак зі зменшенням концентрації субстрату швидкість росту знижується. Температура також відіграє важливу роль, оскільки оптимальні температури сприяють максимальній швидкості метаболічних реакцій, тоді як відхилення від оптимальної температури можуть уповільнити або навіть зупинити ріст. Крім того, рН середовища має велике значення, оскільки кожен організм має оптимальний діапазон рН, при якому його метаболічні процеси працюють найкраще. Концентрація кисню є критичним фактором для аеробних організмів, і доступ до кисню визначає

їхній ріст. Також на ріст можуть впливати інгібітори, такі як токсичні речовини або продукти метаболізму, які можуть інгібувати ріст.

Кінетичні моделі застосовуються для прогнозування росту біомаси, що дозволяє на основі поточних умов передбачити, як зміниться біомаса з часом. Вони також використовуються для оптимізації умов культивування, оскільки знання впливу різних факторів дозволяє налаштовувати умови для максимального росту та продуктивності. Крім того, кінетичні моделі допомагають у розробці біотехнологічних процесів, сприяючи створенню ефективних методів виробництва біопродуктів, таких як ферменти, антибіотики, біопаливо [95].

Розглянемо приклади застосування кінетичних моделей на мікродоростях. Для мікродоростей, таких як *Chlorella* та *Dunaliella*, кінетичні моделі враховують вплив світла, температури та концентрації CO₂ на процес накопичення біомаси. Це допомагає оптимізувати умови культивування для максимального отримання біомаси. Наприклад, у виробництві біопалива кінетичні моделі можуть допомогти оптимізувати умови світлового режиму та живильного середовища для максимального накопичення біомаси мікродоростей [124].

Метаболічні моделі. Метаболічні моделі націлені на детальне дослідження внутрішньоклітинних процесів, що відбуваються у живих організмах, і фокусуються на взаємодії між різними метаболічними шляхами та регуляторними механізмами. Основна мета таких моделей — зрозуміти, як клітини перетворюють поживні речовини на енергію та біомолекули, що необхідні для їхнього росту і функціонування [49].

У центрі метаболічних моделей перебуває концепція, що всі метаболічні реакції у клітині взаємопов'язані й формують складну мережу шляхів, які включають обмін речовин, енергетичні процеси і синтез структурних компонентів. Метаболічні моделі описують ці процеси на молекулярному рівні, детально вивчаючи, як різні ензими каталізують

реакції, які продукти формуються на кожному етапі метаболізму, і як ці продукти взаємодіють між собою.

Для створення метаболічних моделей використовуються різні підходи, включаючи системи рівнянь, які описують швидкість реакцій і концентрації різних метаболітів. Такі моделі дозволяють аналізувати, як зміни в одній частині метаболічної мережі можуть вплинути на інші частини, допомагаючи зрозуміти, які саме біохімічні реакції є критично важливими для росту та функціонування клітини [96].

Метаболічні моделі часто інтегрують дані з експериментів, таких як аналізи метаболітів, геномні дані й інформацію про білки, щоб забезпечити комплексне розуміння метаболічних шляхів. Наприклад, у моделі можуть бути враховані дані про те, як зростає концентрація певного метаболіту під час росту культури, або як зміна рівня певного білка впливає на загальний метаболічний профіль клітини.

Завдяки метаболічним моделям можна досліджувати, як різні фактори, такі як зміна умов середовища або наявність специфічних інгібіторів, впливають на метаболічні процеси. Це дозволяє оптимізувати умови для виробництва цінних продуктів, таких як біопаливо або фармацевтичні сполуки, шляхом регулювання метаболічних шляхів та процесів у клітинах.

Метаболічні моделі також є основою для розробки нових біотехнологій і терапевтичних стратегій. Вони дозволяють вивчити, як клітини можуть бути модифіковані для покращення їхньої продуктивності або для лікування певних захворювань шляхом коригування їхніх метаболічних шляхів [40].

Загалом, метаболічні моделі надають глибоке розуміння біохімічних процесів, що відбуваються всередині клітин, і є важливим інструментом для науки й промисловості, дозволяючи створювати більш ефективні стратегії для управління біологічними процесами та оптимізації виробництва біопродуктів.

Динамічні моделі. Динамічні моделі є потужним інструментом для вивчення й опису змін у біологічних системах протягом часу. Основним

завданням цих моделей є відображення того, як різні компоненти системи, такі як субстрати, продукти метаболізму та біомаса, змінюються з часом, і як ці зміни взаємодіють між собою. Для цього використовуються системи диференціальних рівнянь, які формують математичні залежності між різними змінними і параметрами системи.

У динамічних моделях концентрації субстратів, продуктів та біомаси змінюються з часом відповідно до заданих рівнянь, які описують швидкість їхньої зміни. Наприклад, диференціальні рівняння можуть описувати, як швидко субстрати споживаються клітиною, як накопичуються продукти метаболізму, і як біомаса змінюється в процесі культивування. Ці рівняння, зазвичай, враховують різні фактори, такі як швидкість реакцій, наявність ресурсів, темп росту клітин, різні умови середовища [124].

Динамічні моделі дозволяють дослідити вплив різних зовнішніх та внутрішніх факторів на процес росту. Наприклад, можна вивчати, як зміни в концентрації субстратів або зміни температури впливають на швидкість росту біомаси. Моделі можуть також включати ефекти конкуренції між різними організмами за ресурси або вплив токсичних речовин на метаболічні процеси. Завдяки цьому можна отримати глибше розуміння того, як різні змінні та умови взаємодіють і впливають на загальний процес [157].

Однією з основних переваг динамічних моделей є їхня здатність передбачати майбутні зміни в системі. Наприклад, на основі початкових умов і параметрів моделі можна прогнозувати, як змінюватиметься концентрація певних компонентів із часом. Це дозволяє приймати обґрунтовані рішення щодо оптимізації умов для досягнення бажаних результатів, таких як максимальний ріст біомаси або ефективне виробництво продуктів [96].

Динамічні моделі також використовуються для вивчення і моделювання складних біологічних процесів, таких як цикл росту мікроорганізмів, ферментаційні процеси, або вплив екологічних змін на біологічні системи. Вони допомагають зрозуміти, як різні етапи процесу

росту й розвитку взаємопов'язані і як вони можуть бути оптимізовані для досягнення конкретних цілей.

Завдяки розвитку комп'ютерних технологій і програмного забезпечення, динамічні моделі стають усе більш точними й складними, що дозволяє детальніше вивчати біологічні системи і отримувати цінну інформацію для наукових досліджень та промислових застосувань.

Математичні моделі використовувалися для опису росту популяції деяких мікроводоростей. Це допомагає оптимізувати умови культивування для максимального отримання біомаси. Для промислових мікробіологічних культур, таких як дріжджі або бактерії, моделі використовуються для оптимізації процесів ферментації та підвищення виходу продукції [208].

Комп'ютерне моделювання також поряд із математичним моделюванням займає центральне місце в сучасній біології, виступаючи важливим інструментом для дослідження складних біологічних процесів та систем. Це підхід, який дозволяє створювати віртуальні моделі біологічних об'єктів та процесів за допомогою комп'ютерів та спеціалізованого програмного забезпечення. Комп'ютерне моделювання охоплює широкий спектр методів, включаючи молекулярну динаміку, системну біологію, моделювання клітинних процесів, екологічне моделювання та багато іншого [96]

Однією з головних переваг комп'ютерного моделювання є можливість роботи з великими обсягами даних і високою складністю біологічних систем. Комп'ютерні моделі дозволяють вивчати динаміку біологічних процесів у реальному часі, прогнозувати поведінку систем при зміні умов та тестувати різні гіпотези без проведення експериментів на живих організмах [177].

У молекулярній біології комп'ютерне моделювання використовується для дослідження структури та функцій білків, взаємодії молекул, геномного аналізу й симуляції біохімічних реакцій. Наприклад, методи молекулярної динаміки дозволяють вивчати рухи атомів та молекул у білках, що допомагає

зрозуміти механізми їхнього функціонування та взаємодії з іншими молекулами.

В області системної біології комп'ютерне моделювання допомагає інтегрувати дані з різних рівнів біологічної організації для створення комплексних моделей, які відображають функціонування цілих біологічних систем. Це включає моделювання регуляторних мереж генів та метаболічних шляхів. Такі моделі сприяють розумінню, як різні компоненти біологічних систем взаємодіють між собою і як зміни в одному компоненті можуть впливати на всю систему.

Екологічне моделювання дозволяє вивчати взаємодію між організмами та їхнім середовищем, прогнозувати впливи змін клімату, оцінювати екологічні ризики й розробляти стратегії збереження біорізноманіття. Комп'ютерні моделі екосистем допомагають зрозуміти складні взаємозв'язки між різними видами та їхніми середовищами існування, а також передбачати наслідки антропогенних впливів [165].

Загалом, комп'ютерне моделювання є потужним інструментом, який дозволяє біологам вирішувати складні наукові завдання, оптимізувати дослідницькі процеси та сприяти інноваціям у медицині, біотехнологіях та охороні навколишнього середовища.

Комп'ютерні моделі можуть вивчати як окремі об'єкти, так і цілий клас об'єктів. Вони дозволяють проводити різноманітні дослідження та спрогнозувати реакцію системи на різні подразники, що важливо для подальшого вдосконалення моделей та прийняття обґрунтованих рішень.

Моделювання є корисним інструментом у роботі з живими системами, оскільки воно дозволяє подолати обмеженість реальних досліджень та зосередитись на розв'язанні конкретних завдань у сфері медицини, біології та інших прикладних наук [177].

У багатьох випадках отримати точний аналітичний розв'язок математичної моделі прикладної проблеми виявляється складним завданням.

У таких ситуаціях виникає потреба в застосуванні чисельних методів та комп'ютерного моделювання для знаходження наближеного розв'язку задачі.

Завданням кожної моделі є відображати дійсну систему чи процес настільки точно, наскільки це можливо.

Не дивлячись на різноманіття живих систем, усі вони володіють спільними рисами, які слід враховувати при побудові математичних моделей.

Складні системи характеризуються великою кількістю взаємозалежних компонентів та взаємодією між ними. Вони можуть мати різноманітну структуру й ієрархію, що ускладнює їх розуміння та аналіз. До інших загальних характеристик складних систем включають їхню динамічність, здатність до адаптації та еволюції, а також велику чутливість до початкових умов та зовнішніх впливів [208].

У зв'язку з цим, побудова математичних моделей для складних систем вимагає врахування всіх цих факторів і розгляд їхнього взаємозв'язку. Такі моделі повинні забезпечувати відтворення динаміки та поведінки складних систем для здійснення аналізу, прогнозування та прийняття відповідних рішень.

При моделюванні розрізняють аналітичний і імітаційний підходи. Аналітичне моделювання базується на створенні математичних (абстрактних) моделей реальних об'єктів у формі алгебраїчних, диференціальних чи інших рівнянь. Розв'язання таких моделей здійснюється шляхом проведення обчислювальних процедур, які дають точний або наближений результат.

Імітаційне моделювання використовує математичні моделі у вигляді алгоритмів, які відтворюють роботу досліджуваної системи через послідовне виконання багатьох елементарних операцій [124].

Імітаційне моделювання є окремим випадком математичного моделювання. Воно застосовується для об'єктів, для яких не існують аналітичні моделі або відсутні методи для їх розв'язання. У таких випадках аналітичні моделі замінюються імітаційними.

Існують два основні підходи до виконання імітаційних процедур:

- метод Монте-Карло (статистичні випробування);
- метод імітаційного моделювання (статистичне моделювання).

Для спрощення та автоматизації процесів математичного моделювання створено спеціалізовані системи комп'ютерної математики та програмні пакети, такі як Maple, Mathematica, Mathcad, MATLAB, MS Excel тощо [35, 213].

Ці програмні комплекси організовані для загального використання в певних проблемних областях і призначені для вирішення типових інженерних, економічних, наукових завдань, а також для автоматизації математичного моделювання.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Структурно-логічний опис експериментальної роботи

Розроблено схему культивування досліджуваних видів на скидній воді з УЗВ з метою здешевлення методики отримання збагаченої каротиноїдами біомаси мікроводоростей.

З метою отримання даних, що дозволять у подальшому визначити технологічні параметри процесу одержання живих кормів на основі культур *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew, *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko, нами було вивчено вплив досліджуваних протококових мікроводоростей як харчового субстрату на ріст *Moina macrocopa* (Straus, 1820), *Simocephalus vetulus* (Müller, 1776) та *Daphnia magna* (Straus, 1820) в лабораторних умовах. Розроблено схеми годування:

- порційного внесення біомаси мікроводоростей у культуральне середовище зоопланктону;
- спільного культивування мікроводоростей і зоопланктону.

Експериментальні дослідження процесу культивування мікроводоростей є процесом затратним по часу та ресурсах. Тому нами була побудована математична модель, яка дає змогу описати динаміку накопичення біомаси, цільових продуктів та витрат субстрату. Така математична модель, побудована на основі експериментальних даних, забезпечує можливість прогнозування ефективності культивування мікроводоростей за різних умов. Це дозволяє зменшити витрати на проведення численних експериментів, спрямованих на встановлення оптимальних технологічних параметрів.

Результати досліджень дозволяють оптимізувати процес отримання збагаченої біомаси мікроводоростей, що має важливе значення для розвитку аквакультури. Отримані результати можуть бути використані для розробки

промислових технологій виробництва кормів для аквакультури, а також для підвищення якості продукції за рахунок збагачення її каротиноїдами.

Експериментальні дослідження проводилися у 4 етапи (табл. 2.1)

Таблиця 2.1

Схема експериментальних досліджень

		Застосовували:	Вимірювали (проводили):
I	Вибір альтернативного середовища культивування та стимуляторів продуктивності культур мікроводоростей	- скидна вода зУЗВ; - середовище Фітцджеральда (як контроль); - скидна вода з УЗВ + комплексний препарат органічного походження.	Оцінка ростової активності; визначення кількості загальних білків, амінокислотного складу, загальних ліпідів, загальних вуглеводів, загальних каротиноїдів, хлорофілу а, хлорофілу b; вивчення каталазної, нітратредуктазної, сукцинатдегідрогеназної, глутаматдегідрогеназної, глутамінсинтазної активності.
I I	Індукція каротиногенезу	Скидна вода з УЗВ із додаванням індукторів: - FeSO ₄ (0,11, 0,22, 0,45мМ) з H ₂ O ₂ (10 ⁻⁴ мМ); - NaCl (50, 100, 200мМ); - C ₆ H ₁₂ O ₆ ; - CH ₃ COONa (10, 25, 50мМ).	Визначення кількості загальних білків, загальних ліпідів, загальних вуглеводів, загальних каротиноїдів, амінокислотного складу, фракційного складу каротиноїдів, виділення індивідуальних фракцій каротиноїдів; вивчення каталазної, цитохромоксидазної, пероксидазної активності.
I I I	Кокультивування зелених водоростей та зоопланктону	<i>Daphnia magna</i> , <i>Semiocephalus vetulus</i> , <i>Moina macrocopa</i> - схеми спільного культивування з мікроводоростями; - схеми спільного культивування з мікроводоростями, насичених каротиноїдами; - контроль – годування дріжджами.	Кількість особин, їхня середня довжина, маса; показники масонакопичення та продуктивності зоопланктону: трофічна активність, загальні білки, загальні ліпіди, загальні каротиноїди, фракційний склад каротиноїдів.
IV	Математичне моделювання процесів, створення програмного продукту	- середовище Wolfram Mathematica (функція ParametricNDSolveValue, TableForm та TableHeadings); - бібліотеки Python: NumPy, SciPy, Matplotlib, tkinter.	Зміни рівня біомаси, субстрату, продукту залежно від вказаних параметрів

2.2. Культивування альгокультур

2.2.1. Аналіз альгофлори верхів'я річки Дністер

Попередньо перед вивченням кормового потенціалу мікроводоростей нами було здійснено вибір перспективних кормових організмів. Для цього було зібрано проби фітопланктону у верхів'ях річки Дністер, у межах Галичини (акваторії м. Заліщики, с. Вікно, с. Митків), для аналізу їх структурно-функціональних характеристик. Упродовж досліджень зібрано і опрацьовано 96 альгологічних проб. Відбір проб здійснювали методом відстоювання та фільтрування через планктонну сітку Апштейна (№ 77). Зібраний матеріал фіксували 40%-м розчином формаліну. Для підрахунку чисельності клітин водоростей використовували камеру Фукса-Розенталя та мікроскоп тринокулярний MicroMed XS-3300. Повторні підрахунки однієї проби виконували тричі. Визначення видового складу водоростей проводили за загальноприйнятими альгологічними методиками, з використанням вітчизняних визначників і закордонних посібників, враховуючи сучасні флористичні зведення [1, 8, 10, 22, 55, 118, 225, 226, 227]. Обробку отриманих даних виконували у програмі Microsoft Excel [18].

2.2.2. Матеріал дослідження та умови культивування

Матеріалом дослідження слугували альгологічно чисті культури зелених мікроводоростей *Desmodesmus armatus* (Chod.) Chod. (IBASU-A), *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko (IBASU-A). Вихідні культури водоростей отримані із колекції Інституту ботаніки імені М.Г. Холодного НАН України (IBASU-A). Надалі культури водоростей підтримувалися в колекції кафедри біохімії та біотехнології ЧНУ імені Ю. Федьковича.

Досліджувані культури *D. armatus* та *A. dimorphus* вирощували на середовищі Фітцджеральда № 11 у модифікації Цендера і Горхема. Всі роботи з висіву культури, виконувались в умовах ламінар-боксу [14, 182].

Культивування здійснювали в кліматичній кімнаті при температурі 21 ± 2 °C, освітленні люмінесцентними лампами з інтенсивністю 2500–4000 лк, та 16-годинному фотоперіоді, у колби Ерленмейера об'ємом 500 мл.

Підготовку скидної води з рибоводної установки замкнутого водопостачання (механічний фільтр) здійснювали шляхом вилучення аліквот, які переносили в термостійкі ємкості з притертими корками. Ці проби автоклаували при 121 ± 2 °C протягом 30 ± 5 хв у паровому стерилізаторі. Після охолодження до кімнатної температури у ламінар-боксі висівали культури фітопланктону у співвідношенні інокулят:живильне середовище 1:10. Підготовлені ємності переносили в кліматичну кімнату для нарощування біомаси. Як контрольне середовище використовували середовище Фітцджеральда № 11 у модифікації Цендера і Горхема [15, 16, 25].

2.2.3. Оцінка впливу комплексного препарату органічного походження

Для дослідження впливу органічної компоненти на продуктивність культур зелених водоростей використовували комплексний препарат під торговою назвою DON-1R, який містить у своєму складі γ -кротонолактон і суміш органічних кислот (бурштинової, малеїнової, фумарової, мурашиної), а також похідні коричної кислоти та 2-бутенолідів, люб'язно наданий нам співробітниками кафедри технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету «Львівська політехніка», за що висловлюємо їм подяку. У дослідженнях використовували наступні концентрації препарату: $2,1 \cdot 10^{-3}$, $4,2 \cdot 10^{-3}$, $6,3 \cdot 10^{-3}$, $8,4 \cdot 10^{-3}$ мкг \cdot л⁻¹, які вносили у ємкості зі скидною водою об'ємом 500 мл, висівали культури фітопланктону у співвідношенні інокулят : живильне середовище 1:10 та поміщали в культивацийну кімнату.

2.2.4. Вивчення впливу індукторів коротиногенезу

Вивчення впливу індукторів каротиногенезу здійснювали під час другої фази культивування. Перша фаза накопичувального культивування тривала 16 діб до досягнення оптимальної щільності культур (5×10^6 кл/л). Біомаса першої фази використовувалася як джерело інокуляту, який додавали в середовище другої фази у співвідношенні 1:10 (рис.2.1).

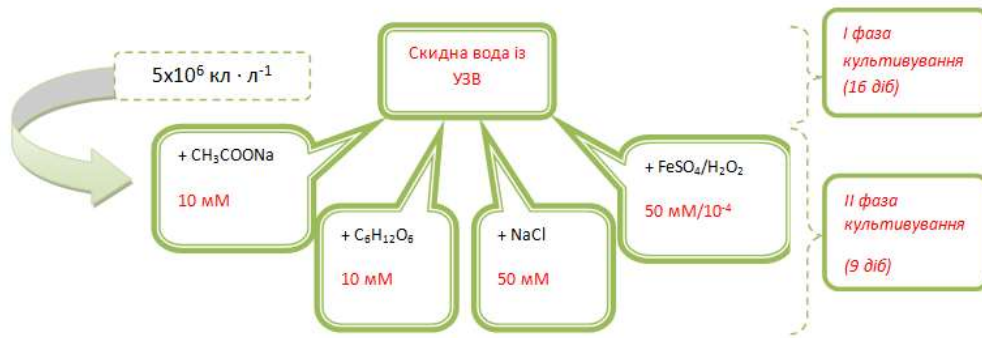


Рис. 2.1. Схема двостадійного накопичувального культивування культур

У кожне із середовищ вносили відповідний індуктор каротиногенезу: FeSO_4 (0,11, 0,22, 0,45мМ) з H_2O_2 (10⁻⁴мМ), NaCl (50, 100, 200мМ), $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ чи CH_3COONa (10, 25, 50мМ).

2.3. Методи дослідження альгокультур

Щільність альгокультур оцінювали спектрофотометрично, визначаючи густину культури за оптичним показником при 750 нм за допомогою CaryWin UV 60 (Agilent, США). Морфологічні характеристики досліджували мікроскопічно, використовуючи камеру Горяєва, тринокулярний мікроскоп MicroMed-3300 ($\times 1000$) (Україна) та програмне забезпечення Micam 2.0. Фізіологічний стан клітин оцінювали за допомогою цитохромоксидазного тесту[22].

Ліпіди екстрагували згідно методики Фолча [94, 138]. Вміст загального білка визначали за Лоурі [152]. Для дослідження вмісту вуглеводів застосовували кольорову реакцію з антроновим реактивом [195].

Визначення вмісту загальних каротиноїдів в ацетонових екстрактах визначали спектрофотометрично в діапазоні довжин хвиль 400 – 800 нм.

Для визначення фракційного складу каротиноїдів застосовували метод хроматографії в тонкому шарі сорбенту (ТШХ) на пластинках “Silufol – UV-254” (Чехія) висхідним способом в системі розчинників гексан : ацетон (9:1) відповідно до вимог Державної Фармакопеї.

Виділення індивідуальних каротиноїдів проводили шляхом препаративної ТШХ. Зони, що відповідають індивідуальним сполукам, знімали з носія та елюювали петролейним ефіром (каротини) та етанолом (ксантофіли). Чистоту отриманих фракцій та їхню кількість перевіряли спектрофотометрично за допомогою програмного забезпечення CaryWin UV.

Амінокислоти визначали методом іонообмінної рідинно-колонної хроматографії на автоматичному аналізаторі амінокислот Т339 (Прага, Чехія) в Інституті біохімії імені О.В. Палладіна НАН України. У зразках було отримано сукупне значення вмісту амінокислот Asn і Asp та Gln і Glu відповідно. Вміст амінокислоти Trp у зразках визначеним не був.

Визначення каталазної та пероксидазної активності проводили спектрофотометрично [63]. Визначення нітратредуктазної активності здійснювали шляхом спектрофотометричних вимірювань і відповідних розрахунків. Активність нітратредуктази виражали у нмоль $\text{NO}_2^- \text{ г}^{-1}$ сирої маси/год [72, 221]. Визначення сукцинатдегідрогеназної активності здійснювали за реакцією окислення сукцинату до фумарату за участю фероціаніду калію та вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 420 нм [119]. Визначення глутамінсинтазної активності проводили а збільшенням вмісту глутаміну, заміри проводились при довжині хвилі 700 нм [192]. Визначення глутаматдегідрогеназної активності проводили спектрофотометрично за швидкістю окислення НАДН або НАДФН у реакційній суміші [162]. Визначення цитохромоксидазної активності проводили за методом Novikoff и Goldfischer [170].

2.4. Методи дослідження зоопланктону

Матеріалом дослідження слугували чисті культури гіллястовусих ракоподібних *Moina macroscopa* (Straus, 1820), *Simocephalus vetulus* (Müller, 1776) та *Daphnia magna* (Straus, 1820), з колекції Інституту біології, хімії та біоресурсів Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича.

Умови культивування досліджуваних організмів. Початкову кількість особин (50 особин/л) поміщали в ємкості об'ємом 0,5 л зі скидною водою із УЗВ. Культивування здійснювали в умовах кліматичної кімнати. Контрольні проби містили культури ракоподібних *S. vetulus*, *M. macroscopa* та *D. magna*, які культивували на скидній воді з додаванням водної суспензії дріжджів. Дріжджі вносили через 24 год [111].

Підрахунок особин зоопланктону здійснювали за методом аліквот при використанні камери Богорова під тринокулярним мікроскопом MicroMed XS-3300. Вихідні культури мікроводоростей *D. armatus* та *A. dimorphus* отримували шляхом накопичувального культивування на скидній воді із УЗВ.

У систему спільного культивування вводили 50 мл культури мікроводоростей, відібраної в експоненціальну фазу росту (коли досягнуто кількості клітин ~ 3 млн кл/л). Сюди ж вносили організми *Daphnia magna*, *Moina macroscopa* чи *Simocephalus vetulus* (у розрахунку 25 екз. на 500 мл культурного середовища) відразу ж в той же день, через три або шість днів після внесення водоростей.

Таким чином, були сформовані три групи:

- 1) з одночасним введенням зоопланктону і фітопланктону;
- 2) із введенням зоопланктону через три дні після внесення фітопланктону;
- 3) із введенням зоопланктону через шість днів після внесення фітопланктону.

Паралельно з попередніми схемами було здійснено культивування досліджуваних представників зоопланктону окремо від водоростей, із

внесенням раз на дві доби дріжджів, *S. cerevisiae*, у тій же концентрації. Відбір проб для біохімічного аналізу здійснювали у фазі максимальної продуктивності.

На наступному етапі при вивченні біохімічного складу біомаси досліджуваних представників зоопланктону паралельно до попередніх трьох схем іще культивували зоопланктон окремо від водоростей і підгодовували 1 раз на добу досліджуваною культурою водоростей (по 5 мл) [120].

Залежність трофічної активності зоопланктону від щільності посадки визначали за показником зниження концентрації корму (біомаси водоростей) у середовищі спільного культивування. Зменшення кількості клітин водоростей в експерименті визначали шляхом підрахунку на камері Горєва у трикратному повторі.

2.5. Оцінка продуктивності зоопланктону при використанні біомаси водоростей як кормових організмів

Ліпіди екстрагували згідно методики Фолча [94]. Вміст загального білка визначали за Лоурі [152]. Визначення вмісту каротиноїдів у складі зоопланктону проводили спектрофотометрично. При визначенні масової частки каротиноїдів, проби попередньо екстрагували розчинами Карез I та Карез II з наступним очищенням петролейним ефіром. Аналізували зразки на спектрофотометрі CaryWin UV 60 (Agilent, США) в діапазоні довжин хвиль 400–800 нм.

Визначення фракційного складу каротиноїдів. Розділення суміші каротиноїдів на окремі фракції проводили з використанням методу тонкошарової препаративної хроматографії. При цьому було апробовано наступні розчинники: гексан-ацетон (7:3), гексан-бензол (7:3).

Визначення концентрацій окремих каротиноїдів. Визначення вмісту окремих фракцій каротиноїдів в ацетонових екстрактах визначали спектрофотометрично в діапазоні довжин хвиль 400–800 нм, відповідно до

літературних даних. Отримані показники перераховували на абсолютну суху масу.

2.6. Розробка математичної моделі та програмного продукту

Розв'язання математичної моделі було здійснено в середовищі Wolfram Mathematica. Для моделювання та аналізу системи диференціальних рівнянь з параметрами використовували функції `ParametricNDSolveValue`, `TableForm` та `TableHeadings`. Крім цього, був написаний програмний код мовою програмування Python. При цьому було застосовано бібліотеку `tkinter` з метою створення графічного інтерфейсу користувача. Бібліотека `NumPy` використовується для зручної обробки масивів даних та проведення математичних операцій. Бібліотека `SciPy` включає в себе функцію `solve_ivp`, яка використовується для чисельного розв'язання системи диференціальних рівнянь. `Matplotlib` використовується для створення графіків та візуалізації результатів наукового дослідження.

2.7. Статистичний аналіз даних

Для статистичного аналізу отриманих даних використовували за загальноприйнятими методиками (програмне забезпечення Microsoft Excel та метод однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з тестом Tukey HSD в пакеті STATISTIKA 6.0). Вірогідність відмінностей між результатами оцінювали при рівні значимості $p \leq 0,05$ за критерієм Ст'юдента.

РОЗДІЛ 3

РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЙ КУЛЬТИВУВАННЯ ВОДОРОСТЕЙ ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ ЯК СУБСТРАТУ ДЛЯ ЗООПЛАНКТОНУ

3.1. Скринінг перспективних видів фітопланктону річки Дністер з метою розширення кормової бази нижчих ракоподібних та личинок риб

На сьогоднішній день ведуться роботи по відтворенню аборигенних видів риб річки Дністер. Науковці кафедри біохімії та біотехнології ЧНУ ім. Ю. Федьковича займаються штучним розведенням стерляді з наступною реінтродукцією їх у природне середовище [3]. Дністер у Чернівецькій області зарибнюють цінними видами осетрових (форелі та стерляді). Для розведення личинок риб в умовах аквакультури використовують наступні гіллястоусі ракоподібні – *Moina macrocopa* (Straus, 1820), *Simocephalus vetulus* (Müller, 1776) та *Daphnia magna* (Straus, 1820). В той же час джерелом живлення у природній водоймі як для зоопланктону, так і для мальків риб є мікроводорості. Фітопланктон як первинна ланка трофічних ланцюгів є одним із основних продуцентів органічної речовини водних екосистем. З метою розширення кормової бази нижчих ракоподібних та личинок риб нами попередньо проведено скринінг перспективних видів фітопланктону річки Дністер. Аналіз його структури дозволяє визначити роль окремих видів чи угруповань фітопланктону у формуванні і розвитку альгофлори даної водойми, а також оцінити потенціал її кормової бази в цілому. Актуальним також є вирощування представників альгофлори, що є джерелом цінних нутрієнтів для зоопланктону та мальків риб природної акваторії річки Дністер, у лабораторних умовах. З однієї сторони це дасть можливість здешевити схему отримання кормів для установок штучного риборозведення, з іншої сторони – використання кормів, склад яких максимально наближений до природнього може полегшити адаптацію молоді риб при їх реінтродукції. В лабораторних умовах можливою є також корекція нутрієнтного складу

отриманої біомаси мікродоростей, що може в рази збільшувати цінність отриманих кормів.

За останнє десятиліття відома незначна кількість узагальнюючих робіт щодо складу фітопланктону річки Дністер [4, 5, 13, 18, 19, 23]. Авторами показано, що у витоків фітопланктон є збідненим, що пов'язано із специфічними умовами гірських річок. Лімітуючими факторами у даному випадку є висока швидкість течії, низька температура води, нестійкий гідрологічний режим та інтенсивна турбулентність. Тут переважають діатомові водорості. З потоком збільшується також різноманіття хлорококових (роди *Ankistodesmus*, *Scenedesmus*). Після виходу з ділянки гір збагачення видового різноманіття фітопланктону відбувається також за рахунок фітопланктону приток, які пов'язані із верхньо-дністрянськими болотами і озерами. На цій ділянці річки кількісний і якісний склад фітопланктону збагачується.

Розглядаючи сезонну динаміку розвитку фітопланктону нами було відмічено, що значення, які характеризують цей розвиток у якісному і кількісному аспектах, досить сильно коливаються протягом сезону і в різних частинах досліджуваної водойми (Додаток А).

Розвиток фітопланктону протягом року був нерівномірним і залежав від паводкового режиму. Фітопланктонний склад досліджуваних ділянок нараховував 99 видів та міжвидових таксонів, з яких *Cyanophyta* – 15, *Bacillariophyta* - 42, *Heterokontophyta* -1, *Euglenophyta* - 5, *Chlorophyta* – 36 (рис. 3.1). В період наших досліджень не було виявлено представників жовто-зелених, золотистих та десмідієвих водоростей, які, як відомо з літературних джерел, зустрічаються на інших ділянках річки (рис.3.1).

Водоростеві угруповання середнього Дністра мають гетерогенний характер за географічним поширенням, однак основну частину їх флористичного переліку складають види-космополіти (81 вид та внутрішньовидовий таксон, що становить 82%). Провідними родами

впродовж року були *Scenedesmus* – 4 % від загальної кількості, *Navicula* 5%, *Chlorella* 4,9%, *Pediastrum* 4%, *Diatoma* 3,3% відповідно.

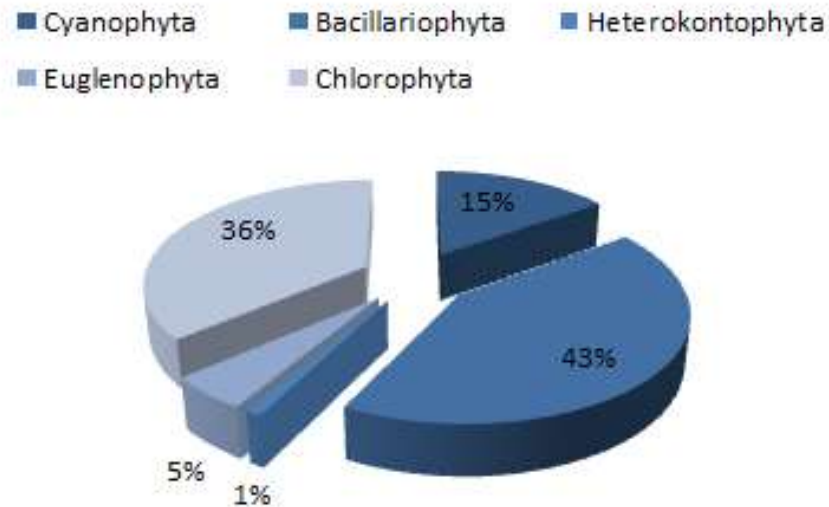


Рис. 3.1 Розподіл водоростей планктонних угруповань р. Дністер за систематичними групами (за результатами досліджень 2014–2015 рр.).

Сезонний розподіл водоростей фітопланктону річки Дністер показав зростання кількості видів досліджуваних водоростей від весни до літа, з подальшим зменшенням їх чисельності від літа до осені та від осені до зими.

Навесні в угрупованнях планктонних водоростей було виявлено 36 видів. Основну частину фітопланктону склали зелені водорості – 18 видів, що складає 50%, *Bacillariophyta* – 12 видів, що становить 33%, *Cyanoprocariota* – 6 видів (17%).

Влітку у фітопланктоні річки ідентифіковано 49 видів. У цей час угруповання водоростей формували: *Chlorophyta* – 27 видів, що складає 55%, *Euglenophyta* 3 (6%), *Bacillariophyta* 3 (6%), *Cyanophyta* – 16 (32,6%) відповідно.

Восени ідентифіковано 58 видів. Основний фон склали зелені та діатомові мікроводорості (31 та 22 види відповідно).

Зимою фітопланктон складається із холодолюбивих діатомових водоростей. У цей період фітопланктон річки налічував 42 види. Найбільшим

видовим та внутрішньовидовим різноманіттям характеризувалися відділи: *Bacillariophyta* – 26 видів та внутрішньовидових таксонів (62%), *Cyanophyta* – 4(1%), *Chlorophyta* – 11 (26 %), *Euglenophyta* – 1 (0,02%) відповідно.

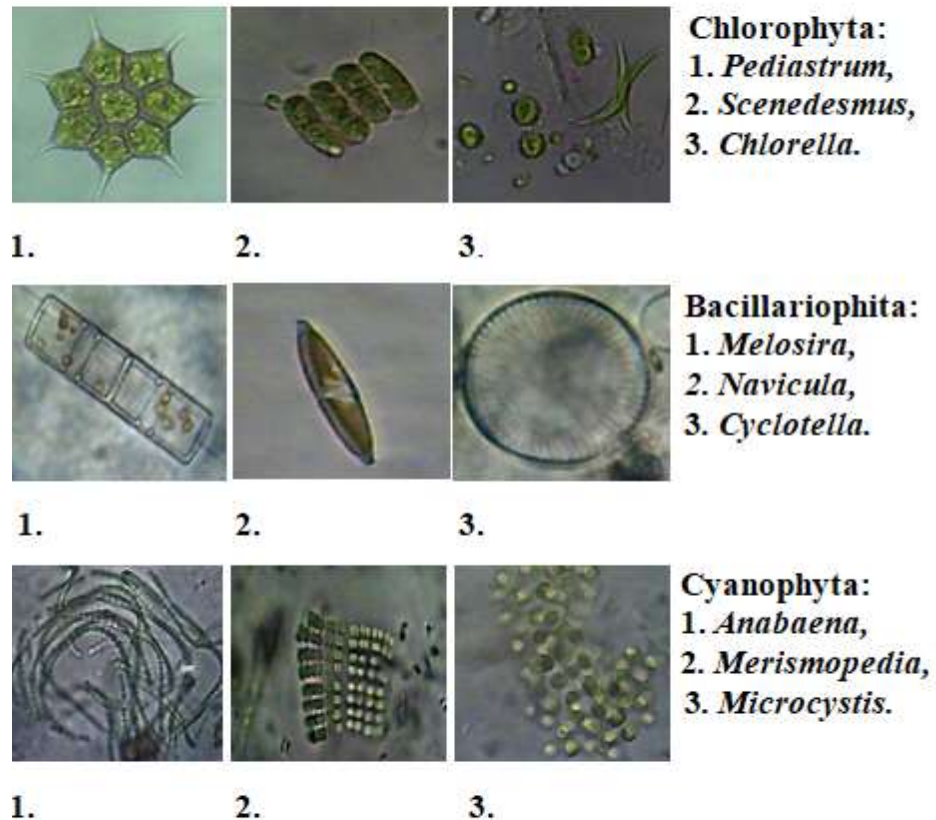


Рис. 3.2. Найпоширеніші представники зелених водоростей р.Дністер.

Найбільша чисельність фітопланктону відмічається в липні – серпні за рахунок інтенсивного розвитку в цей період ціанобактерій. За кількісним складом переважають зелені, діатомові водорості та ціанобактерії. За біомасою зелені водорості, які є основою кормової бази річки у липні-серпні сягають свого піку та становлять 5 - 6 г/м³. Діатомові водорості у максимальній кількості спостерігаються у зимово-весняний період, коли їх кількість сягала 38 млн. кл/л.

Отже, фітопланктон розвивається протягом всього року, досягаючи свого максимуму у літньо-осінній період. Так, високі показники температури води, оптимальний режим освітлення водних мас, збільшення світлового дня сприяли розвитку представників більшості груп водоростей.

Діатомові водорості, хоча і є продуцентами водних екосистем, внаслідок особливостей будови клітинної стінки як кормові організми використовуються рідко, найчастіше їх застосовують для індикації чистоти води. Також не доцільним є вирощування синьо-зелених водоростей з метою отримання живого корму, оскільки більшість їх видів володіють вираженою токсичністю та неконтрольованим ростом [128]. Однією з провідних груп альгофлори досліджуваних ділянок річки Дністер є зелені мікроводорості, зокрема протококові. Із наведених вище показників можна судити про те, що саме вони складають основну частку у формуванні кормової бази даної водойми.

Серед усіх виявлених видів було обрано два представники протикокових водоростей, зокрема *Desmodesmus armatus* та *Acutodesmus dimorphus*, оскільки останні характеризуються швидким нарощенням біомаси, невибагливістю до умов культивування, пластичним метаболізмом, а їх морфологія дозволяє використовувати їх як живі корми як для гіллястовусих ракоподібних, так і молоді риб [174]. Із результатів проведеної роботи зроблено висновок про те, що саме вони складають основну частку у формуванні кормової бази даної водойми [13].

3.2. Розробка умов культивування *D. armatus* та *A. dimorphus* на альтернативному живильному середовищі

Масовий збір мікроводоростей у природних водоймах не може забезпечити стабільне отримання біомаси живих кормів. Тому основним шляхом систематичного отримання маси кормових організмів є їх штучне розведення.

Для більшості видів мікроводоростей розроблені загальні рекомендації та методики щодо культивування їх в лабораторних умовах, які передбачають використання певного живильного середовища та створення відповідних умов кліматичної кімнати. Так, для зелених

мікроводоростей рекомендується застосовувати в якості живильних середовищ штучні суміші макро- та мікроелементів, зокрема середовище Тамія, Зарука, Фітцджеральда [2, 137, 139]. Однак, вартість компонентів даних живильних середовищ є досить високою. Крім того, тільки шляхом зміни складу живильного середовища можна досягти покращення продуктивних характеристик отриманої біомаси мікроводоростей. Тому актуальним є пошук альтернативних живильних середовищ, які забезпечували б альгокультуру в повній мірі всіма необхідними нутрієнтами, а також дозволили б зменшити собівартість процесу нарощення біомаси водоростей [38, 76, 233].

Одним із способів підвищення економічної ефективності вирощування культур є використання скидних вод, забруднених різними сполуками, які здатні виконувати роль компонентів живильних середовищ. Це дозволить, з однієї сторони здешевити біотехнологію отримання живих кормів, з іншої – вирішити проблеми очистки скидних вод [228]. Не дивлячись на те, що стічні води здатні забезпечити основний ресурс для росту культури, на сьогоднішній день вони не знайшли широкого застосування у промисловості [45, 146, 168]. Основна різниця між скидними водами і штучними живильними середовищами зумовлена складним хімічним складом перших. Концентрація таких елементів як фосфор і азот варіюють в них у великому діапазоні [21, 58, 209]. Крім того, часто азот тут представлений сполуками амонію, які у великих концентраціях можуть значно інгібувати ріст мікроводоростей [151]. Крім того, скидні води можуть також містити у своєму складі різні хімічні (кадмій, цинк, ртуть) чи біотичні інгібітори розвитку культур [92, 159, 243]. Склад скидних вод харчових промисловостей можуть стимулювати ріст інших мікроорганізмів що будуть конкурувати із мікроводоростями за засвоєння необхідних біогенів.

Великий інтерес на сьогодні складають дослідження до використання стічних вод рибоводних установок для накопичення біомаси мікроводоростей.

У процесі роботи рибоводних установок замкнутого водопостачання необхідно періодично змінювати частину води. Таку скидну воду можна використовувати як дешеве середовище культивування гідробіонтів, альтернативне традиційним середовищам Тамія та Фітцджеральда. Стічні води рециркуляційних систем багаті на неорганічні і органічні речовини, які потрапляють сюди з кормами, в результаті життєдіяльності риб.

За результатами наших досліджень, скидна вода з УЗВ збагачена різними формами азоту (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-), містить широкий спектр мінеральних елементів, кількість яких подекуди є вищою ніж у класичних середовищах (табл. 3.1). Це, в свою чергу, дозволяє передбачити позитивний вплив такого культиваційного середовища на приріст біомаси мікродоростей.

Таблиця 3.1

Фізико-хімічні показники культиваційних середовищ

Характеристика культиваційних середовищ	Скидна вода із УЗВ	Середовище Фітцджеральда
NO_3^- , мг/л	20,2±0,20	81,7±0,2
NO_2^- , мг/л	0,62±0,03	-
NH_4^+ , мг/л	0,48±0,02	-
PO_4^{3-} , мг/л	0,031±0,001	0,040±0,002
SO_4^{2-} , мг/л	0,094±0,002	0,031±0,001
CO_3^{2-} , мг/л	0,011±0,0005	0,012±0,0003
Cl, мг/л	0,064±0,03	0,011±0,0002
Fe^{2+} , мг/л	0,52±0,02	0,003±0,0001
pH	7,0-8,0	7,0-8,0
Провідність, $\mu\text{S}/\text{cm}^3$	555,0-693,0	452,0-690,0
Загальна мінералізація, мг/л	371,0-477,0	232,0-547,0
Редокс потенціал, mV	211,4-213,9	176,9-245,0
O_2 , мг О/л	7,5-7,8	6,5-7,5

Так, у процесі вирощування риб в установках замкнутого водопостачання (УЗВ) застосовуються збалансовані корми, які містять повний спектр речовини, що необхідні для нормального функціонування організму риб, частина з яких вимивається з кормів водою [14].

При функціонуванні УЗВ скидні води з рибних басейнів містять нерозчинні частки (залишки корму), що збагачують води неорганічними сполуками (нітратами, сульфатами, фосфатами, карбонатами, тощо). Також значна кількість біогенних елементів потрапляє у воду внаслідок життєдіяльності самих риб. Оскільки в установках замкнутого водопостачання риба вирощується в умовах високої щільності посадки, концентрація біогенних речовин у скиданих водах може бути досить високою, що може сприятливо вплинути на розвиток мікробіодоростей при їх лабораторному культивуванні [239].

Виходячи з вищевказаного, доцільним є культивування фітопланктону на скидній воді із УЗВ з метою отримання цінної біомаси.

Розробка схеми культивування фітопланктону на скидній воді із УЗВ.

Дана схема включала:

- Забір води з механічного фільтра рибоводної установки замкнутого водопостачання. Вилучення води саме на даному етапі роботи установки дозволяє отримати скидну воду з оптимальним співвідношенням різних форм нітрогену і також очищену при цьому від механічних завислих часток, що є необхідною умовою при культивуванні фітопланктону.
- Контроль складу біогенних елементів у скидній воді, рівня загальної мінералізації (450 ± 5 ppm) та рН (7-8) та порційний розподіл потенційного живильного середовища по термостійких ємкостях з притертими корками.
- Стерилізація забраної води шляхом автоклавування у паровому стерилізаторі при температурі 121 ± 2 °C протягом 30 ± 5 хв. Цей етап забезпечує отримання стерильної скидної води, вільної від мікрофлори,

запобігаючи повторному зараженню фітопланктону та підтримуючи стерильність протягом усього процесу культивування. Інокуляцію живильного середовища продуцентом у співвідношенні 1:10. Висів культур здійснювали на охолоджену скидну воду в умовах ламінар-боксу у вищезгаданому співвідношенні. Дане співвідношення є оптимальним для забезпечення альгокультури біогенними елементами на весь термін культивування.

- Накопичувальне культивування протягом 40 ± 5 діб в умовах культиваційної кімнати, де підтримувались такі параметри: 16-годинний фотоперіод, температура 21 ± 2 °C та інтенсивність освітлення близько 2,5 клк.

Як контрольне середовище використовувалося класичне середовище Фітцджеральда. Протягом культивування здійснювали моніторинг гідрохімічних показників культурального середовища (рН та загальна мінералізація). Кожні 10 діб під час процесу культивування визначали зміни гідрохімічних характеристик середовища, динаміку біомаси, вміст білка та фотосинтезуючих пігментів.

Оцінка культивування фітопланктону на скидній воді з УЗВ. Відомо, що продуктивність культури може суттєво змінюватися залежно від складу середовища культивування [9, 68, 203, 204]. Як на скидній воді з УЗВ, так і на контрольному середовищі кількість біомаси досліджуваних культур мікроводоростей змінювалася в залежності від тривалості культивування та сягала максимальних значень на 40 добу (рис. 3.3).

Протягом перших 5 діб культивування на скидній воді з УЗВ спостерігалася знижена ростова активність, що може бути пов'язано з адаптацією мікроводоростей до нових умов культивування. Це характерно для всіх досліджуваних видів. Дані культури переходили у стаціонарну фазу вже з 15 доби культивування. Стаціонарна фаза триває у всіх культур 40 діб включно. Подібна тенденція характерна для обох культур що вирощуються як на скидній воді з УЗВ, так і на контрольному середовищі.

Низька ростова активність культур мікрободоростей на воді з УЗВ упродовж перших 5 діб культивування зумовлена адаптацією мікрободорості до нових умов. Висока ростова активність у досліджуваних культурах з 6 по 40 доби культивування зумовлена достатнім вмістом доступних компонентів мінерального живлення.

Оптимальний термін культивування складає 40 діб. Починаючи з 40-ї доби експерименту альгокультури переходять до фази відмирання, а їхній ріст обмежується дефіцитом доступних живильних елементів та накопиченням продуктів метаболізму в культуральній рідині.

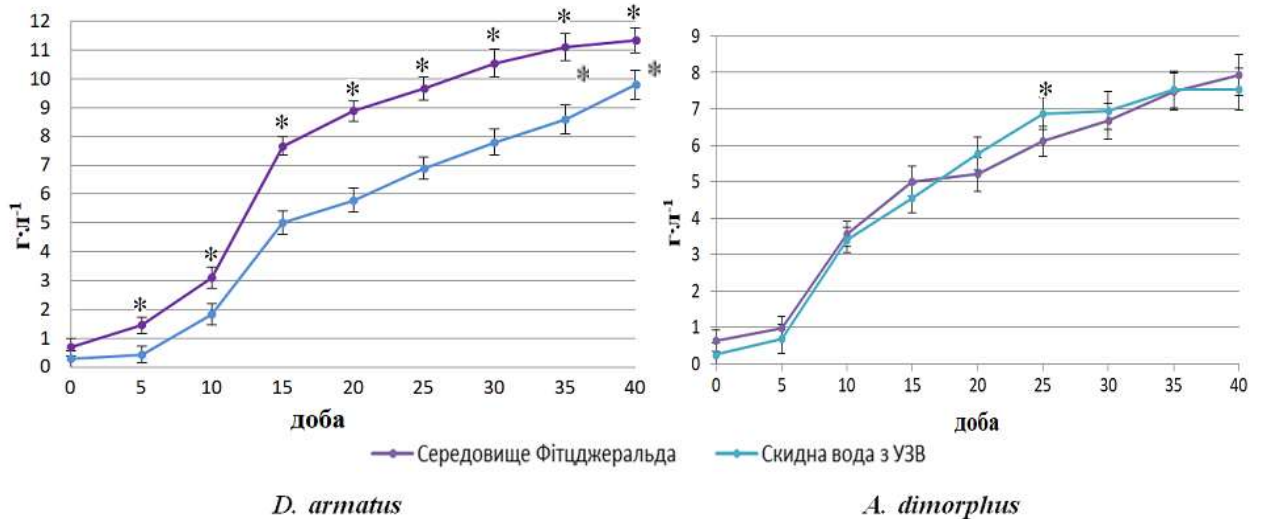


Рис. 3.3. Біомаса досліджуваних культур мікрободоростей при культивуванні на скидній воді та на середовищі порівняння

Примітка: * - відмінності, у порівнянні з контрольною групою, статистично вірогідні при: $p \leq 0,05$.

Максимальні значення вмісту білка в досліджуваних культурах при використанні скидної води як середовища культивування варіювали в межах 55-60% від сухої маси (табл. 3.2).

Для середовища порівняння ці показники є вищими, але різниця не перевищує 2% для *D.armatus* та 4% для культури *A. dimorphus*.

Таблиця 3.2

Показники продуктивності досліджуваних культур

	Білок, %		Ліпіди, %		Вуглеводи, %	
	Скидна вода	Середовище Фітцджеральда (контроль)	Скидна вода	Середовище Фітцджеральда (контроль)	Скидна вода	Середовище Фітцджеральда
<i>D. armatus</i>	60,1±1,04*	63,9±1,47	14,8±0,14	14,9±0,14	11,6±0,05	11,7±0,18
<i>A. dimorphus</i>	55,7±1,39	60,1±1,30	14,1±0,29	14,7±0,20	11,5±0,25	11,7±0,13

	Хлорофіл <i>a</i> , мг/г		Хлорофіл <i>b</i> , мг/г		Каротиноїди, мг/г	
	Скидна вода	Середовище Фітцджеральда	Скидна вода	Середовище Фітцджеральда	Скидна вода	Середовище Фітцджеральда
<i>D. armatus</i>	18,7±0,21	19,1±0,20	7,1±0,15	7,5±0,09	13,5±0,23	14,4±0,21
<i>A. dimorphus</i>	19,9±0,20	20,9±0,76	7,0±0,49	7,7±0,30	13,3±0,03	14,2±0,21

Примітка* - відмінності, у порівнянні з контрольною групою, статистично вірогідні при : $p \leq 0,05$.

У час максимальної продуктивності в біомасах обох досліджуваних культур виявлено всі протейногенні амінокислоти, як замінні, так і незамінні (табл. 3.3). Якісний амінокислотний склад для обох культур був ідентичним. Через особливості аналізатора амінокислот есенціальна амінокислота цистеїн визначається у формі цистину. Вміст аспартату та глутамату був домінуючим у культурі *D. armatus* і складав 0,322 та 0,350 мг•г⁻¹ сухої маси. Для культури *A. dimorphus* домінуючими були аланін та глутамінова кислота 0,203 та 0,327 мг•г⁻¹ сухої маси відповідно.

Серед незамінних амінокислот максимальних значень сягав вміст лейцину. Так, його кількість у біомасах культур *D. armatus* та *A. dimorphus*, вирощених на скидній воді із УЗВ, становила 0,189 та 0,187 мг•г⁻¹. Це у 1,5 рази більше, ніж при застосуванні контрольного середовища.

Отже, клітинна біомаса досліджених протикокових водоростей, культивованих на скидній воді з УЗВ, містить достатню кількість білка та широкий спектр амінокислот і може бути використана як кормовий об'єкт.

Порівнюючи вміст ліпідів та вуглеводів для обох видів, при вирощуванні на обох живильних середовищах, показано, що в усіх культурах відсотковий вміст цих сполук не мав статистично значущих відмінностей та

коливався в межах 14,1 – 15,6% сухої маси для ліпідів, та 10,9 – 11,7% для вуглеводів.

Таблиця 3.3

Амінокислотний склад біомаси *D. armatus* та *A. dimorphus*

Аміно-кислота	<i>D. armatus</i>		<i>A. dimorphus</i>	
	Вода з УЗВ, мг·г ⁻¹	Середовище Фітцджеральда мг·г ⁻¹	Вода з УЗВ, мг·г ⁻¹	Середовище Фітцджеральда мг·г ⁻¹
Lys	0,148	0,106	0,143	0,157
His	0,038	0,021	0,029	0,021
Arg	0,146	0,086	0,029	0,021
Asp	0,322	0,243	0,158	0,176
Thr	0,160	0,119	0,097	0,107
Ser	0,153	0,117	0,095	0,128
Glu	0,350	0,258	0,327	0,348
Pro	0,139	0,116	0,152	0,172
Gly	0,183	0,152	0,129	0,162
Ala	0,245	0,207	0,203	0,214
Cys2	0,010	0,006	0,016	0,009
Val	0,084	0,067	0,112	0,122
Met	0,008	0,006	0,023	0,003
Ile	0,045	0,036	0,045	0,047
Leu	0,189	0,152	0,157	0,185
Tyr	0,083	0,058	0,069	0,045
Phe	0,114	0,088	0,087	0,112
Сума	2,416	1,840	1,972	2,132

Динаміка пігментів в циклі росту альгокультур визначається особливостями накопичувального культивування та складом живильного середовища. Показник максимальної продуктивності хлорофілу *a* зелених мікродоростей, сягає 20 мг/г на обох живильних середовищах. Хлорофіл *b* у біомасі зелених водоростей знаходився в межах 7,0-7,7 мг/г на обох живильних середовищах (табл. 3.2).

Зміни кількості сумарних каротиноїдів відображають здатність альгокультури пристосовуватись до умов культивування. При адаптації до нових умов культивування (одним із факторів яких є мінеральне забезпечення), у клітинах активізуються процеси біосинтезу каротиноїдів. У наших дослідженнях цей показник для *D. armatus*, *A. dimorphus* коливався в

межах 13–14 мг/г сухої маси на обох живильних середовищах та суттєво не відрізнявся від контрольних значень.

Таким чином, при тривалому культивуванні у зв'язку із збільшенням кількості клітин, живильне середовище виснажується, крім того має місце дефіцит деяких мінеральних речовин. Одночасно через високу їхню щільність клітин спостерігається затінення культур мікроводоростей, що поступово призводить до встановлених нами закономірностей накопичення пігментів на обох живильних середовищах.

Ці значення не суттєво відрізняються від контрольних, тому можна стверджувати, що умови культивування та склад скидної води є достатніми для досягнення високої продуктивності культур, не створюючи стресового навантаження на досліджувані культури. Вирощування альгологічно чистих досліджуваних культур на скидній воді є економічно вигідним і перспективним способом отримання кормів або преміксів для культивування зоопланктону.

Отже, скидна вода з УЗВ може бути використана для культивування фітопланктону, сприяючи при цьому значному зростанню продуктивності досліджуваних культур гідробіонтів та покращенню їхньої поживної цінності для риб.

3.3. Використання комплексного препарату органічного походження з метою збільшення продуктивності культур *D. armatus* та *A. dimorphus*

Часто до скидних вод додають різні препарати з метою знищення сторонньої мікрофлори або як імуностимулятори для риб. У складі таких препаратів наявні комплекси органічних кислот (бурштинова, малеїнова, фумарова, мурашина), які є попередниками метаболітів циклу Кребса. Це дозволяє припустити, що їх використання може сприяти підвищенню продуктивності під час культивування фітопланктону. Даний комплексний

препарат включає γ -кротонолактон, суміш органічних кислот (янтарна, малеїнова, фумарова, мурашина), а також похідні коричної кислоти й 2-бутенолідів [134]. Відомо, що цей препарат впливає на обмінні процеси в організмі риб, а саме має безпосередній вплив на окисно-відновні процеси кінцевого перетворення поживних речовин (цикл Кребса), а це, в свою чергу, сприяє накопиченню білків і жирів. Оскільки препарат знаходиться на стадії експериментальних досліджень і його впровадження в промисловість ще обмежене, вивчення його впливу на метаболічні процеси представників альгофлори є актуальним [5].

Антимікробні властивості препарату зумовлені присутністю γ -кротонолактону. В той же час, наявність органічних кислот, які є попередниками метаболітів циклу Кребса, дозволяє прогнозувати підвищення продуктивності білків і ліпідів під час застосування препарату в культивуванні фітопланктону [24].

Для дослідження такого препарату нами було обрано 4 його концентрації. В культурі *D. armatus* при всіх досліджуваних дозах кількісний рівень біомаси перевищував контрольні показники (рис. 3.4).

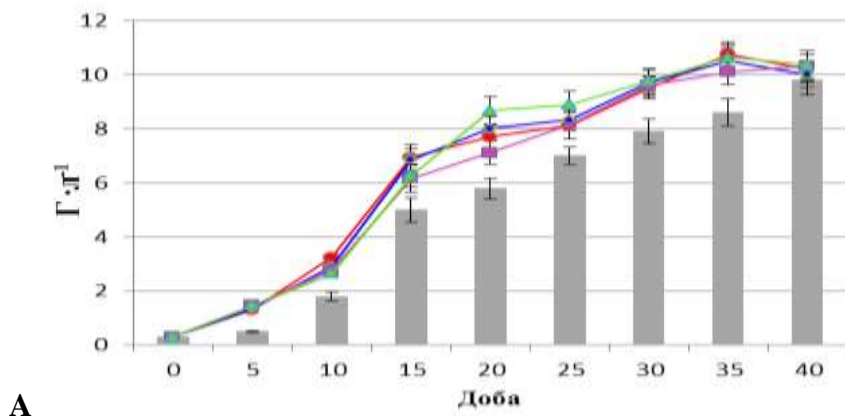
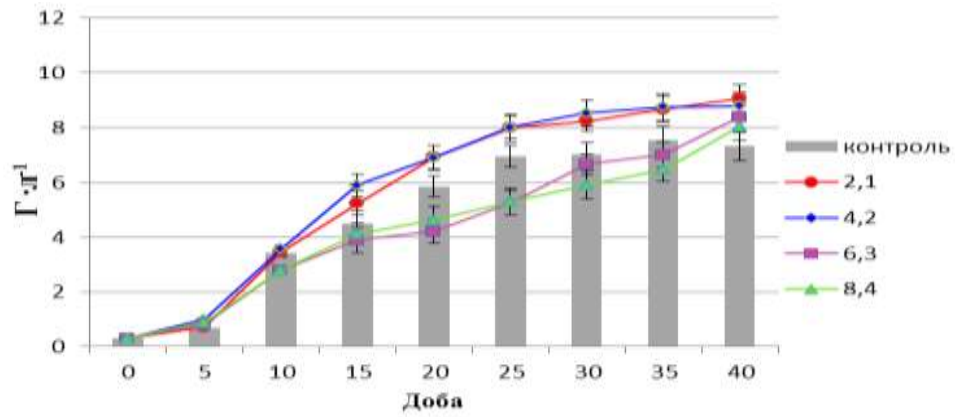


Рис. 3.4. Біомаса в культурі *D. armatus* (А) та *A. dimorphus* (Б) за умов використання комплексного препарату органічного походження (мкг·л⁻¹)



Б

Рис. 3.4. - продовження

У цей же час подібна тенденція спостерігалася й з ліпідним складом (табл. 3.4). Порівняння максимальної продуктивності показало, що вміст білків і ліпідів зростає приблизно на 10% у порівнянні з показниками на контрольному середовищі. Вміст вуглеводів при цьому зменшується у пробах.

Таблиця 3.4

Показники продуктивності культур *D. armatus* та *A. dimorphus* за умов використання комплексного препарату органічного походження

<i>A. dimorphus</i>				
	Білки, %	Ліпіди, %	Вуглеводи, %	Каротиноїди, мг/г
Контроль	55,7±1,05	14,1±0,42	11,5±0,27	13,3±0,32
(2,1·10 ³ мкг·л ⁻¹)	65,7±1,01*	19,3±0,91*	8,4±0,29*	13,0±0,37
(4,2·10 ³ мкг·л ⁻¹)	62,8±1,03	18,6±0,12	10,6±0,38	13,9±0,19
(6,3·10 ³ мкг·л ⁻¹)	66,0±1,85	17,8±0,65	9,7±0,24	14,2±0,22
(8,4·10 ³ мкг·л ⁻¹)	61,9±1,99	18,6±0,56	9,1±0,21	13,4±0,37
<i>D. armatus</i>				
	Білки, %	Ліпіди, %	Вуглеводи, %	Каротиноїди, мг/г
Контроль	60,1±1,86	14,8±0,79	11,6±0,27	13,5±0,24
(2,1·10 ³ мкг·л ⁻¹)	68,2±1,04*	18,9±0,51*	7,9±0,28*	13,1±0,27
(4,2·10 ³ мкг·л ⁻¹)	65,9±1,07	15,6±0,90	9,8±0,15	13,3±0,41
(6,3·10 ³ мкг·л ⁻¹)	62,0±1,11	15,3±0,21	10,1±0,46	14,0±0,30
(8,4·10 ³ мкг·л ⁻¹)	63,2±1,55	16,0±0,14	10,3±0,17	13,9±0,25

Примітка: *- відмінності, у порівнянні з контрольною групою, статистично вірогідні при $p \leq 0,05$.

У той же час кількість каротиноїдів при всіх досліджуваних концентраціях залишалася сталою, достовірної різниці при цьому не спостерігалось.

Проте одним із найпоказовіших критеріїв успішного формування продуктивних систем в організмі гідробіонтів є ефективність функціонування метаболічних систем. Тому досліджено функціонування ферментних систем мікроводоростей при дії досліджуваного комплексного препарату органічного походження.

До основних реакцій при адаптації до нових умов середовищ культивування та при внесенні стимуляторів належать зміни активності стресових ферментів, а також зміни ферментів білок-синтезуючої системи.

Так, зі збільшенням біомаси культур мікроводоростей у досліджуваних видів спостерігалися зміни рівня каталазної активності в клітинах (рис.3.5).

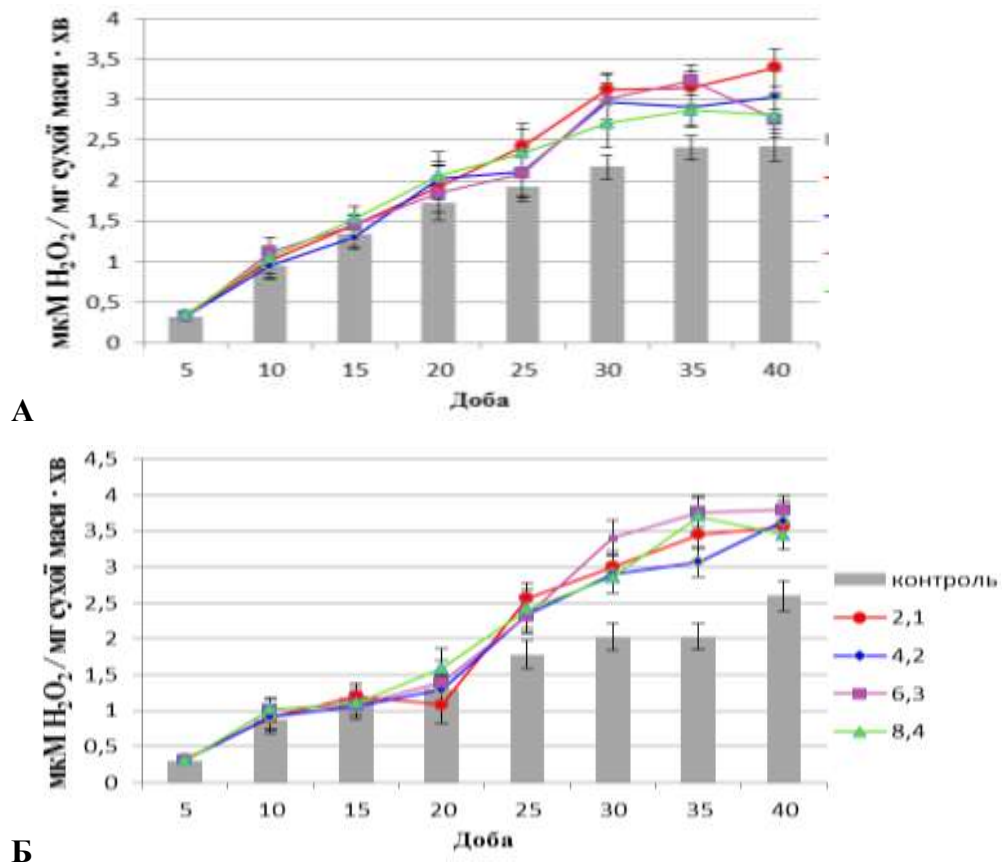


Рис.3.5. Каталазна активність у біомасі *D. armatus* (А) та *A. dimorphus* (Б) за умов використання комплексного препарату органічного походження($\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$)

До 30 доби культивування на альтернативному середовищі каталазна активність зростає, а до 40 доби її показники залишаються незмінними. Це може пояснюватись тим, що при тривалому культивуванні збільшується відсоток мертвих клітин, і з 30 доби розпочинається масовий автоліз. Крім того, в період з 30 по 40 добу максимуми каталазної активності також могли бути викликані зниженням концентрації кисню в середовищі [99, 167].

Аналізуючи отримані результати щодо нітратредуктазної активності, слід відзначити, що її активність визначається доступність азоту середовища (рис. 3.6).

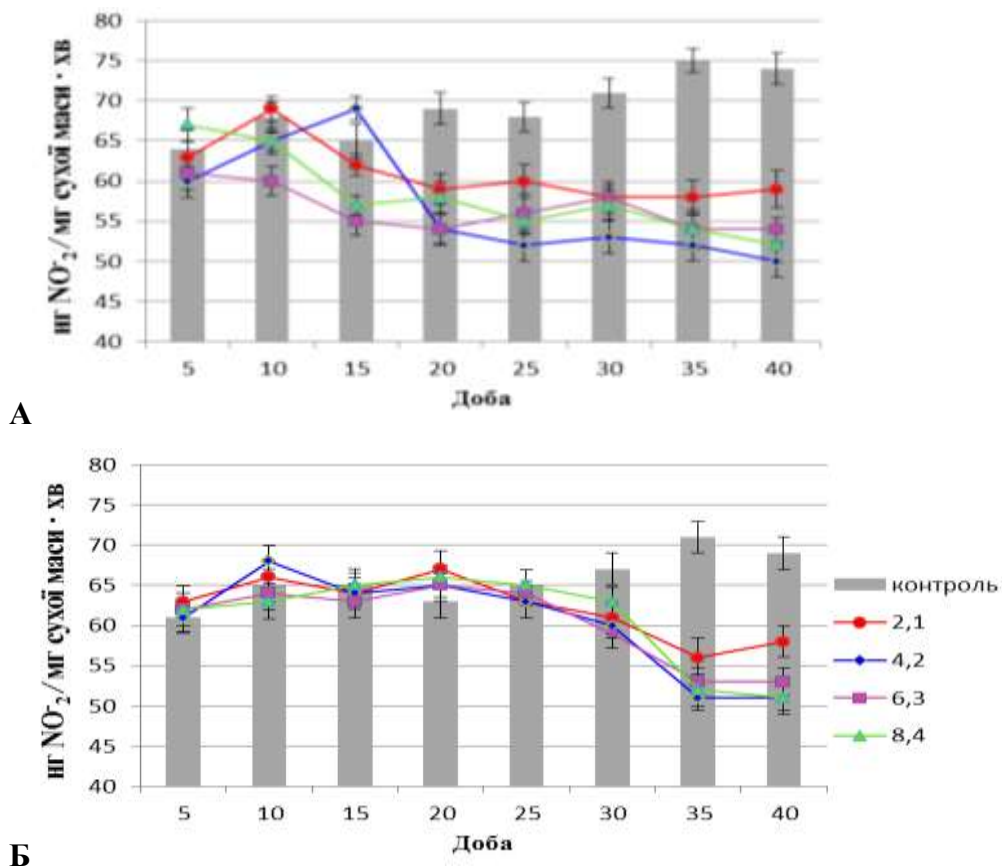


Рис.3.6. Нітратредуктазна активність у біомасі *D. armatus* (А) та *A. dimorphus* (Б) за умов використання комплексного препарату органічного походження ($\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$)

Крім того, при найвищій дослідній концентрації препарату активність даного ферменту до 40 доби культивування знижується, що можна пояснити

активнішими біосинтетичними процесами і, як наслідок, швидшим виснаженням живильного середовища [51, 72, 82, 217, 221].

Оскільки препарат поповнює пул попередників інтермедіатів циклу Кребса, було досліджено активність сукцинатдегідрогенази – ключового ферменту циклу, який каталізує окислення бурштинової кислоти до фумарової [119]. Активність даного ферменту є високою в стаціонарній фазі росту культури, при чому максимальними показниками вона характеризується при найвищій концентрації (рис. 3.7). Така активність ферменту свідчить про активізацію біосинтетичних процесів мікроводоростей. Цим можна пояснити збільшений на 10% вміст білка і ліпідів у даній культурі.

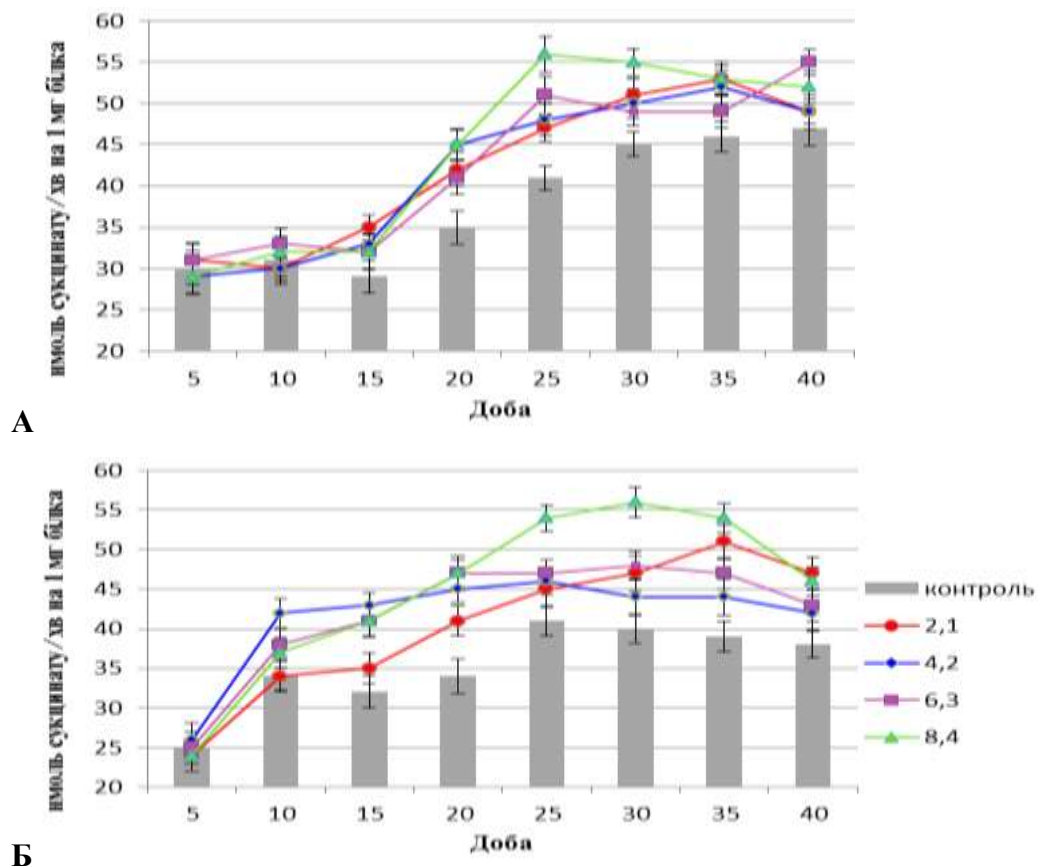


Рис.3.7. Сукцинатдегідрогеназна активність у біомасі *D. armatus* (А) та *A. dimorphus* (Б) за умов використання комплексного препарату органічного походження ($\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$)

Одним із основних етапів біосинтезу білка є приєднання амонійного азоту до α -кетоглутарової кислоти, що призводить до утворення глутамінової кислоти. Цей процес каталізується ферментом глутаматдегідрогеназою. [20, 78]. Центральне місце у біосинтезі білків займає також глутамінсинтаза [162, 196].

Дослідження функціонування ферментів за дії стимулятора росту показали, що їхня активність помітно зростає в експоненціальній фазі росту культури відповідно до збільшення концентрації, порівняно з контролем (рис. 3.8; рис. 3.9). Цим явищем можна пояснити високий вміст аланіну, глутаміну, аспарагіну.

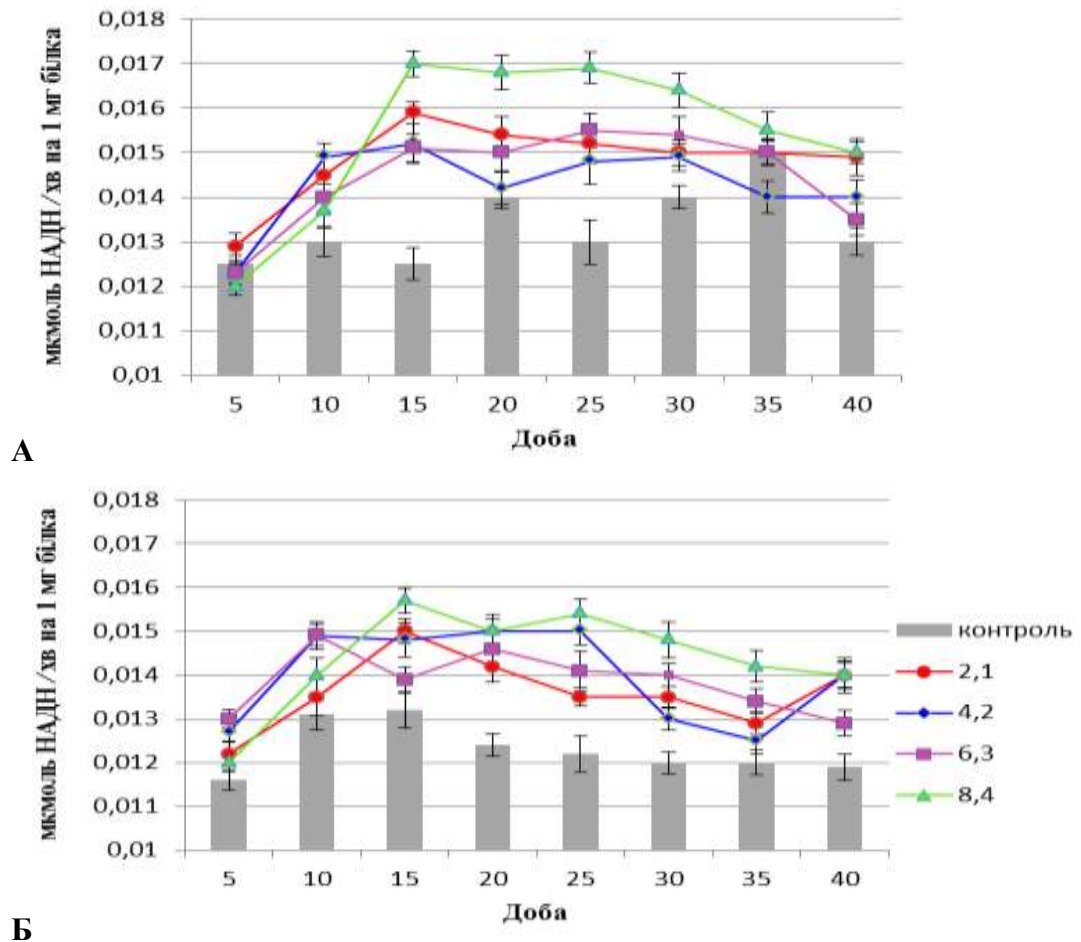


Рис. 3.8. Глутаматдегідрогеназна активність у біомасі *D. armatus* (А) та *A. dimorphus* (Б) за умов використання комплексного препарату органічного походження ($\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$)

Отже, комплекс органічних кислот у складі препарату є додатковим джерелом субстратів для підвищеного синтезу амінокислот, жирних кислот, збагачуючи клітини енергетично.

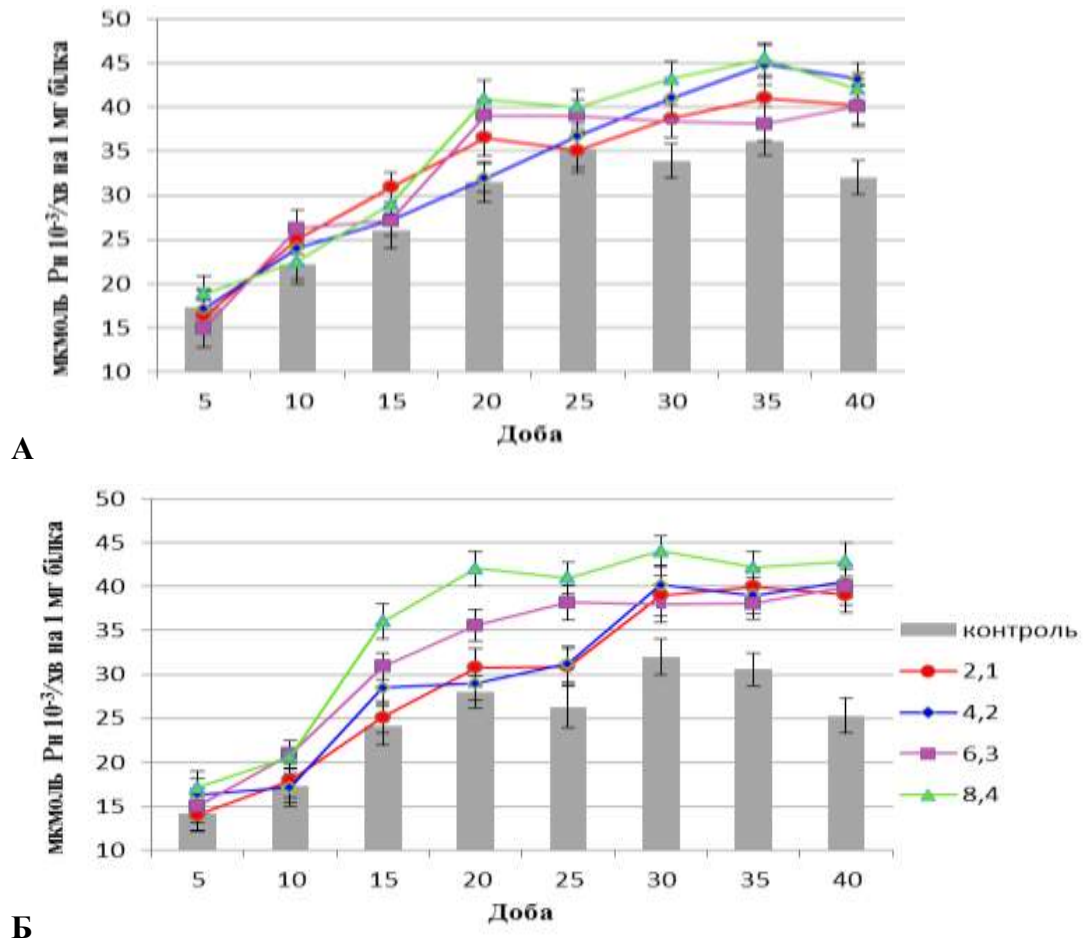


Рис.3.9 Глутамінсинтетазна активність у біомасі *D. armatus* (А) та *A. dimorphus* (Б) за умов використання комплексного препарату органічного походження ($\text{мкг}\cdot\text{л}^{-1}$)

При внесенні препарату концентрації $8,4 \cdot 10^{-1}$ мкл/л у середовище рівень метаболізму в досліджуваних видах водоростей активізується в напрямку синтезу амінокислот, ліпідів. При цьому зміна середовища культивування на дешевше не є стресовим чинником на функціонування клітин, про що свідчить низький рівень активності відповідних ферментів. Проте очікуваного збільшення вмісту каротиноїдів не відбувається. Тому є доцільними експерименти з індукторами каротиногенезу.

3.4. Індукція каротиногенезу у клітинах зелених водоростей *D. armatus* та *A. dimorphus*

Сучасні технології вирощування мікр водоростей здебільшого орієнтовані на вдосконалення їхнього нутрієнтного складу шляхом збагачення різноманітними есенціальними сполуками, зокрема каротиноїдами [36]. Ці сполуки використовують як харчові добавки, профілактичні засоби, а також вони є незамінними компонентами кормів та преміксів в аквакультури риб та ракоподібних [62]. Оскільки при розведенні риб в умовах аквакультури склад кормів формується штучно, введення каротиноїдів у раціон харчування є дуже важливим [212]. Так, астаксантин, зеаксантин, β -каротин відіграють важливу роль у забезпеченні антиоксидантного захисту, репродуктивних функцій, сприяють процесам росту та підвищенню імунітету [158]. Якісним природним джерелом каротиноїдів у складі кормів та преміксів виступають мікр водорості [53]. До таких, що здатні синтезувати затребувані в аквакультури β -каротин, астаксантин, належать тільки окремі представники. Так, комерційним джерелом β -каротину є зелена мікр водорість *Dunaliella salina*, а продуцентом природного астаксантину - *Haematococcus pluvialis* [148, 184]. Перша мікр водорість потребує високої солоності середовища, а при культивуванні іншої важко уникнути контамінації культури. Культивування їх на скидній воді з УЗВ може бути досить трудомістким. Тому актуальною є розробка схем їх отримання.

Нами було показано можливість використання культур *Desmodesmus armatus* та *Acutodesmus dimorphus*, зелених мікр водоростей, які входять до числа потенційних продуцентів вторинних каротиноїдів, вирощених на скидній воді з УЗВ, в якості достатнього за нутрієнтним складом кормового субстрату для зоопланктону [15]. Здатність даних мікр водоростей до швидкого накопичення біомаси, а також нескладна технологія промислового культивування робить їх перспективними об'єктами в аквакультури.

Основною перевагою цих мікроводоростей, у порівнянні з іншими мікроорганізмами, є не лише легкість їхнього культивування, але й здатність змінювати хімічний склад, що дає змогу здійснювати керований синтез цінних хімічних сполук [54, 154]. Проте, з огляду на наші попередні результати, для підвищення кормової цінності такої біомаси слід було б збільшити кількісний вміст цінних кетокаротиноїдів. Цього можна досягти шляхом введення до живильного середовища, яким виступає скидна вода з УЗВ, індукторів каротиногенезу. Для інших представників мікроводоростей показано, що в індукції синтезу вторинних каротиноїдів задіяні активні форми кисню (АФК), оскільки при додаванні в середовище їхніх генераторів (гіпохлориду натрію, пероксиду водню, пероксинітриту) запускався гіперсинтез вторинних каротиноїдів [64]. Найімовірніше, АФК виконують роль вторинних месенджерів, стимулюючи шляхи біосинтезу вторинних каротиноїдів, таких як астаксантину та його ефірів через активацію відповідних ферментів чи індукуючи експресію генів, які їх кодують. Під впливом осмотичного стресу чи зниження ефективності поглинання вуглекислого газу також спостерігається підвищення рівня АФК.

Відомі також механізми індукції вторинного каротиногенезу ацетатом натрію та глюкозою. Можливо, ці сполуки через ацетил-КоА включаються в енергетичний і конструктивний метаболізм клітин мікроводоростей [112, 179, 233].

Тому актуальною є розробка схем для отримання культур зелених мікроводоростей *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. та *Acutodesmus dimorphus* насиченими каротиноїдами в умовах двостадійного культивування на скидній воді з УЗВ із використанням попередників біосинтезу, індукторів або стимуляторів каротиногенезу.

При розробці схем індукції вторинного каротиногенезу на скидній воді з УЗВ за основу було обрано класичну схему двофазного накопичувального культивування і адаптовано для підвищення виходу вторинних каротиноїдів *D. armatus* та *A. dimorphus* (рис 2.1)[110].

З літературних джерел відомо, що найефективнішим методом отримання біомаси мікродоростей, збагаченої каротиноїдами, є саме двостадійне накопичувальне культивування [30, 81]. За таких умов на першій фазі створюються оптимальні умови для швидкого нарощення біомаси, а на другій індукується біосинтез цільових метаболітів [160]. Такий спосіб дозволяє уникнути біосинтезу цільового метаболіту у культурі, клітини якої активно діляться, оскільки поєднання обох процесів може бути неефективним. На першій фазі культивування інокулят вихідної культури вносили на свіже живильне середовище, яким служила скидна вода з УЗВ. Це дозволило отримати активно ростучі культури з високими продуктивними показниками кількості загальних білків, ліпідів та сумарних каротиноїдів. Крім того, до кінця I фази культивування спостерігалось швидке нарощення біомаси обох культур, зокрема до 13 г/л та 12,5 г/л відповідно (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Динаміка біомаси, кількості клітин, кількість загального білка, ліпідів та каротиноїдів на I фазі культивування у клітинах зелених водоростей

D. armatus* та *A. dimorphus

Доба культивування	Біомаса, г/л	Білки, %	Ліпіди, %	Каротиноїди, мг/г
<i>D. armatus</i>				
1	8,8±0,17	33,6±1,15	23,4±1,09	4,6±0,11
5	9,1±0,21	35,3±1,67	24,0±1,12	5,8±0,14*
10	10,7±0,45*	37,0±1,11*	25,7±1,11	6,3±0,14*
15	13,0±0,37*	37,9±1,67*	26,0±1,19*	7,5±0,17*
<i>A. dimorphus</i>				
1	9,3±0,29	27,9±1,29	26,0±1,18	4,3±0,10
5	10,0±0,19	28,4±1,03	23,5±1,16	4,2±0,11
10	10,1±0,17	32,6±1,33*	24,8±1,03	4,9±0,13
15	12,5±0,39*	35,1±1,24*	23,9±1,02	6,8±0,15*

Примітка: * - відмінності, у порівнянні з контрольною групою, статистично вірогідні при $p \leq 0,05$.

Це, мабуть, зумовлено доступністю компонентів мінерального живлення у скидній воді із УЗВ. При цьому в біомасі *D. armatus* виявлено 8 фракцій каротиноїдів (рис.3.10).

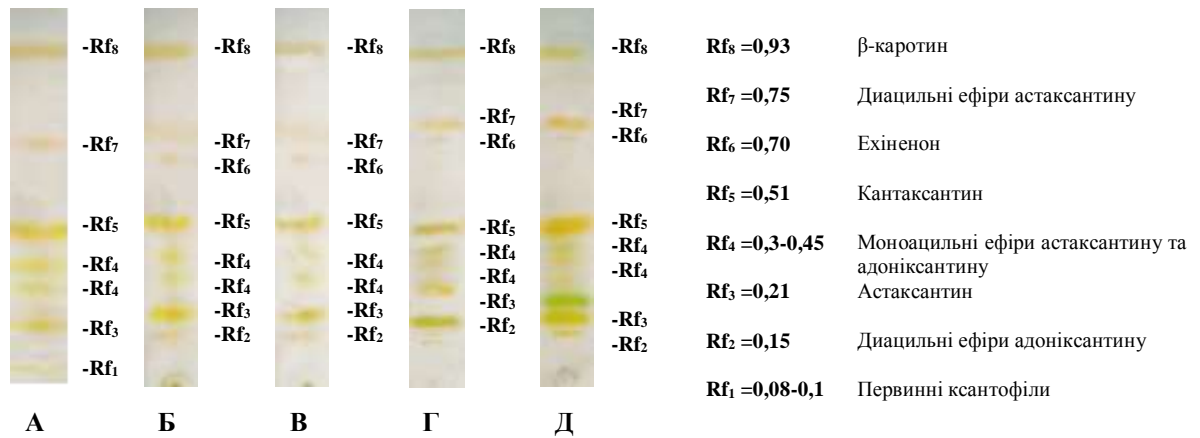


Рис. 3.10. Фракційний склад каротиноїдів *D. armatus* на I (А) та на II фазах культивування за умов внесення CH_3COONa (Б), $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (В), NaCl (Г), $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Д).

Біомаса *A. dimorphus* мала схожий каротиноїдний розподіл (рис. 3.11), різниця була відмічена у кількісному вмісті кожної з фракцій. Серед вказаних сполук більшість - первинні каротини, такі як зеаксантин, лютеїн, β-каротин. Також встановлена незначна кількість астаксантину, кантаксантину, а також ефірів адоніксантину та астаксантину.

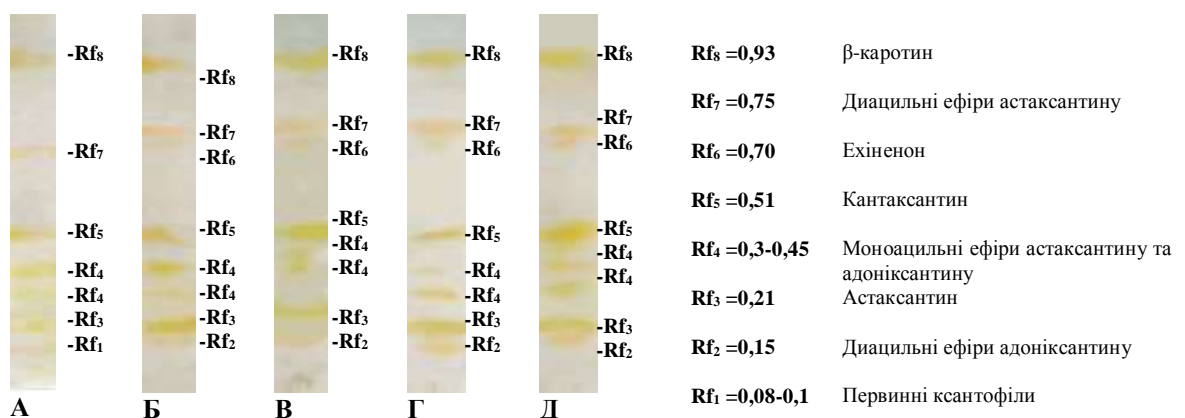


Рис. 3.11. Фракційний склад каротиноїдів *A. dimorphus* на I (А) та на II фазах культивування за умов внесення CH_3COONa (Б), $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (В), NaCl (Г), $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Д).

Отже, I стадія культивування дозволяє отримати культуру, з постійним приростом біомаси, високим вмістом білків, ліпідів, каротиноїдів. Таку культуру можна використовувати в подальшому для отримання цільових метаболітів, зокрема для накопичення вторинних каротиноїдів.

Перехід культури в другу фазу здійснювали шляхом додавання у культиваційне середовище попередників біосинтезу каротиноїдів ($C_6H_{12}O_6$, CH_3COONa), промоторів вільнорадикального окислення ($FeSO_4/H_2O_2$) чи осмотичного стресу ($NaCl$). При цьому важливо контролювати фізіологічний стан та ростову активність культури. У всіх випадках при внесенні індукторів не спостерігалось масової загибелі клітин (рис.3.12, 3.13).

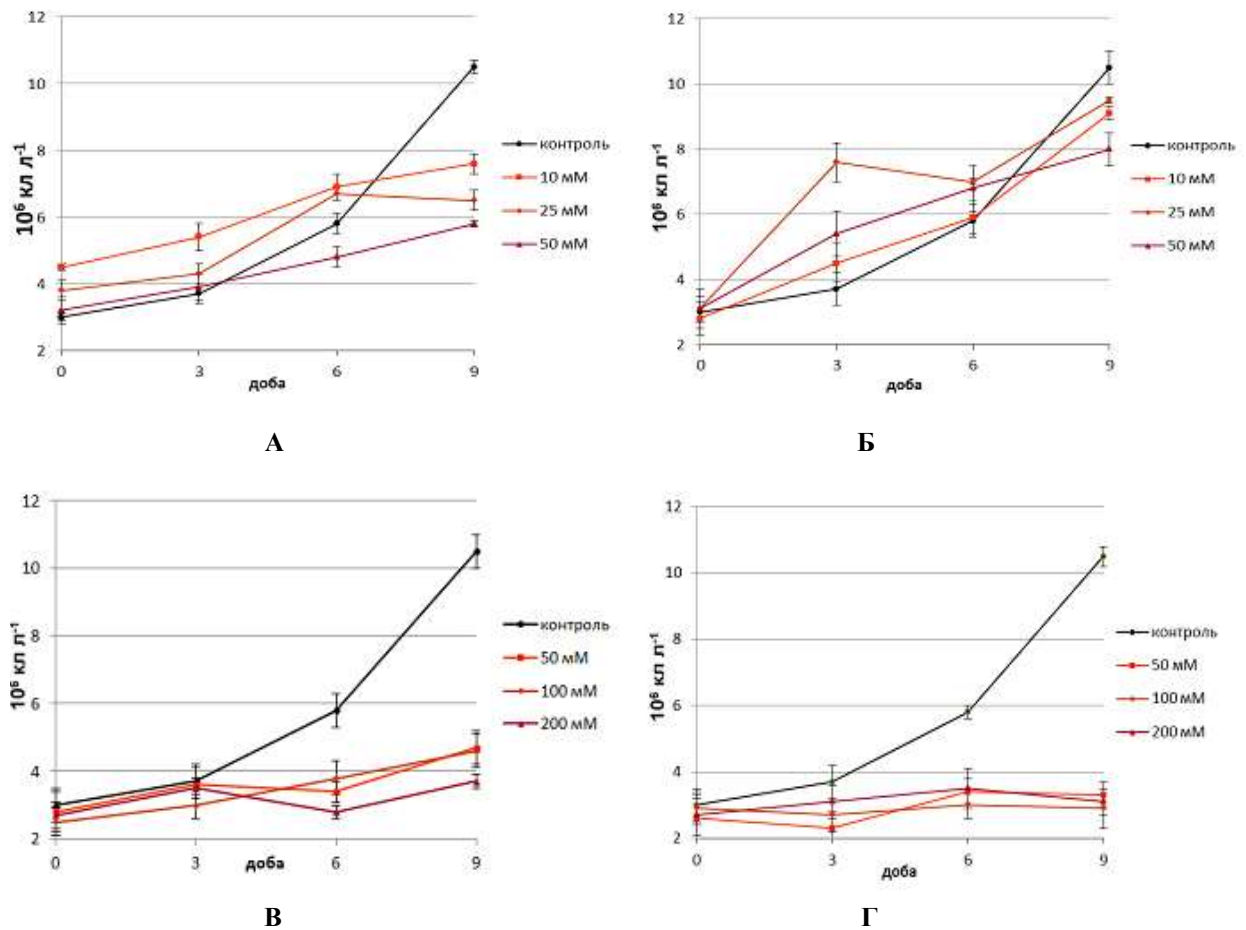


Рис. 3.12. Динаміка чисельності клітин *D. armatus* на II фазі культивування за умов внесення CH_3COONa (А), $C_6H_{12}O_6$ (Б) $NaCl$ (В), Fe^{2+}/H_2O_2 (Г)

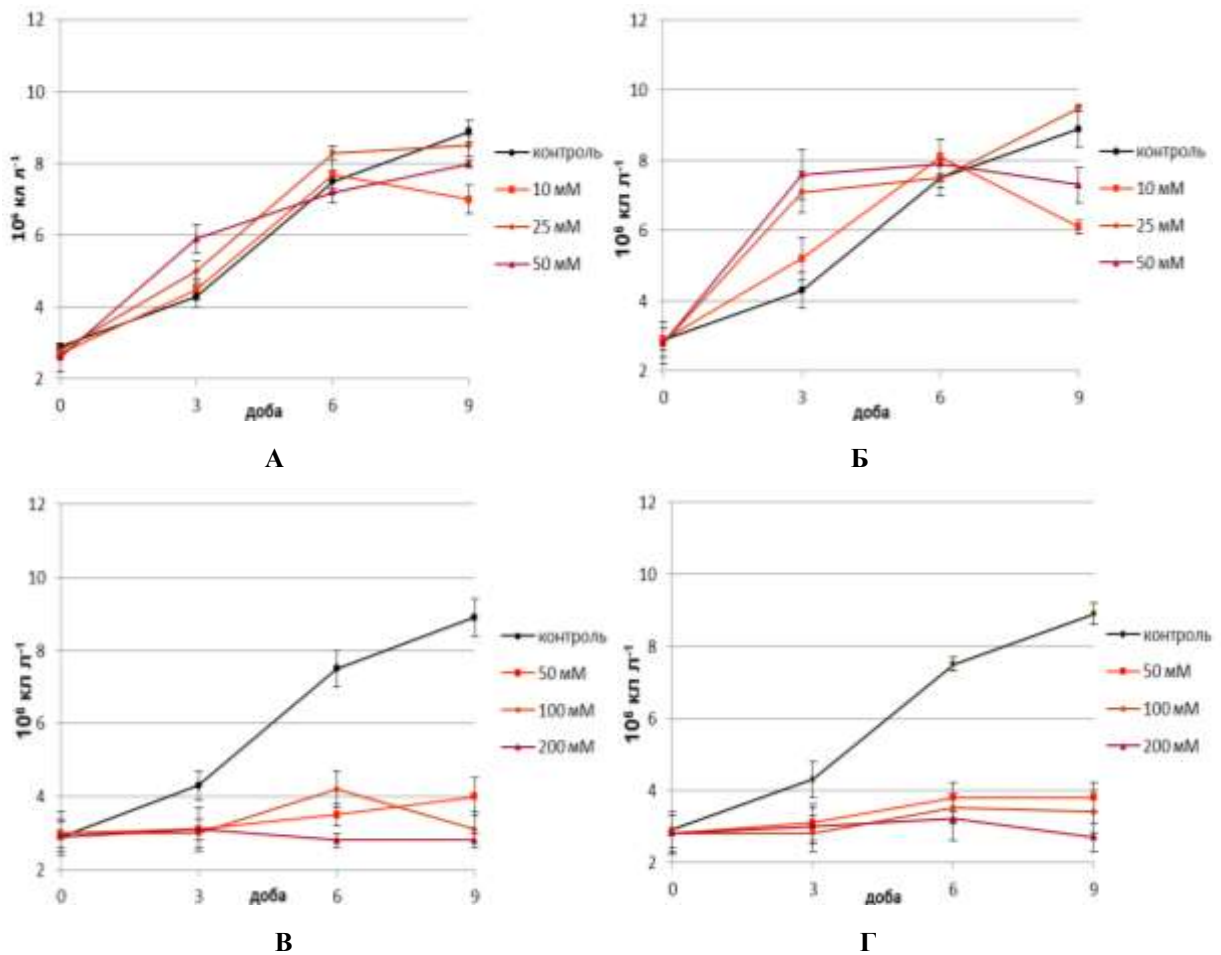


Рис. 3.13. Динаміка чисельності клітин *A. dimorphus* на II фазі культивування за умов внесення CH_3COONa (А), $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (Б) NaCl (В), $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (Г)

Внесення $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ та NaCl призводило до пригнічення ростової активності обох культур. За даних умов кількість клітин протягом усіх діб культивування залишалася на рівні першого дня II стадії культивування і на 9 добу знаходилась в межах $2-4 \cdot 10^6$ кл/л. Таке пригнічення ростової активності культури, можливо, викликано змінами осмотичної рівноваги чи накопиченням активних форм кисню. У той же час, при внесенні CH_3COONa на термінальному етапі кількість клітин не перевищувала $8 \cdot 10^6$ кл/л, а при внесенні $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ даний показник знаходився в межах $9 \cdot 10^6$ кл/л. Внесення індукторів у середовище в першу чергу впливає на ефективність накопичення пігментів. Так, застосування промоторів вільнорадикального окислення (Fe^{2+}

+ H₂O₂) та осморегуляторів (NaCl) призводить до підвищення кількості каротиноїдів від 14 мг/г до 27мг/г у культурі *D. amatus* та від 12,5 мг/г до 24 мг/г у культурі *A. dimorphus* (рис.3.14, 3.15).

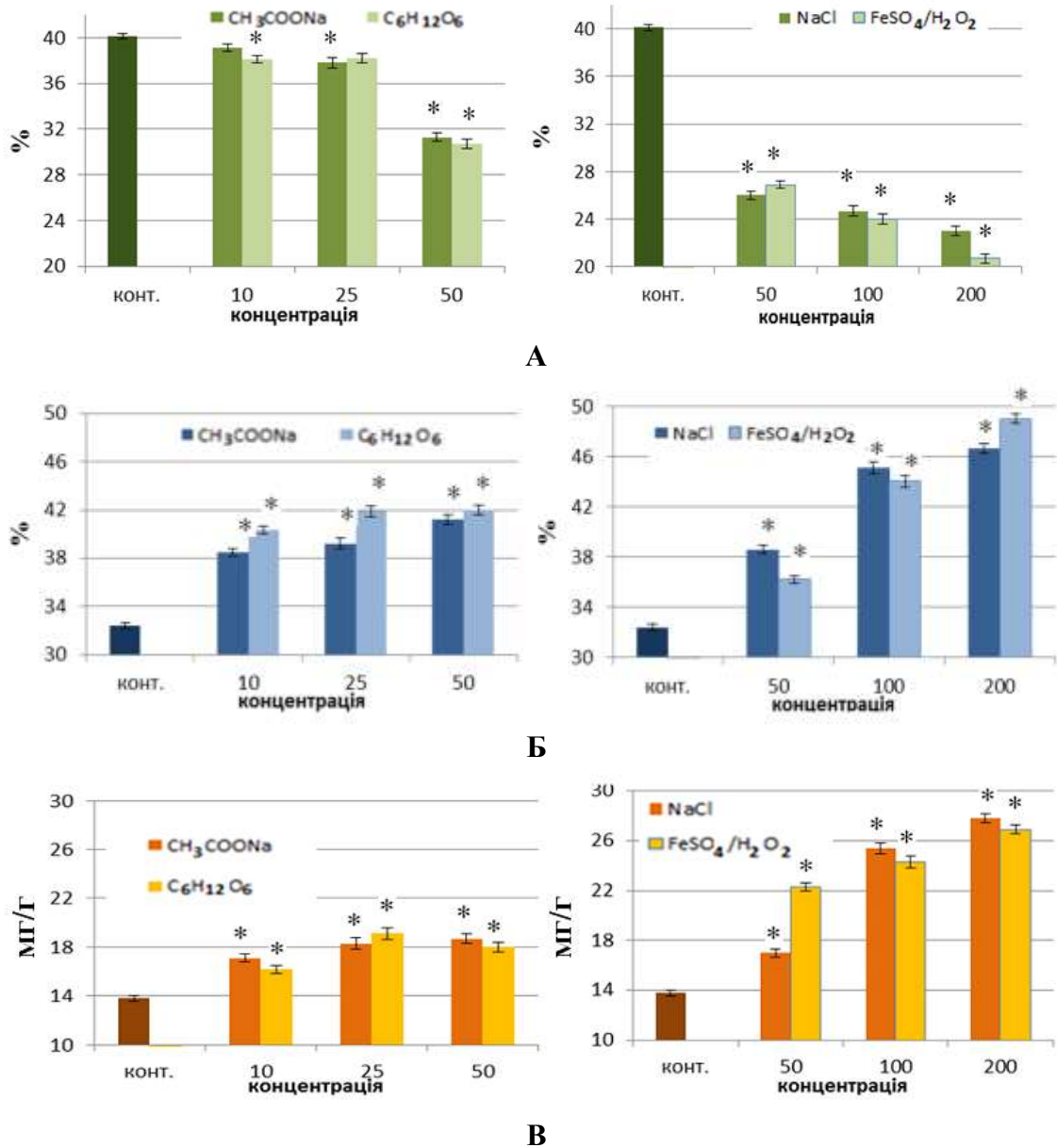


Рис. 3.14. Кількість загального білка (А), ліпідів (Б), каротиноїдів (В) *D. amatus* на кінець II фази культивування за дії індукторів каротиногенезу.

Примітка: * - відмінності, у порівнянні з контрольною групою, статистично вірогідні при $p \leq 0,05$.

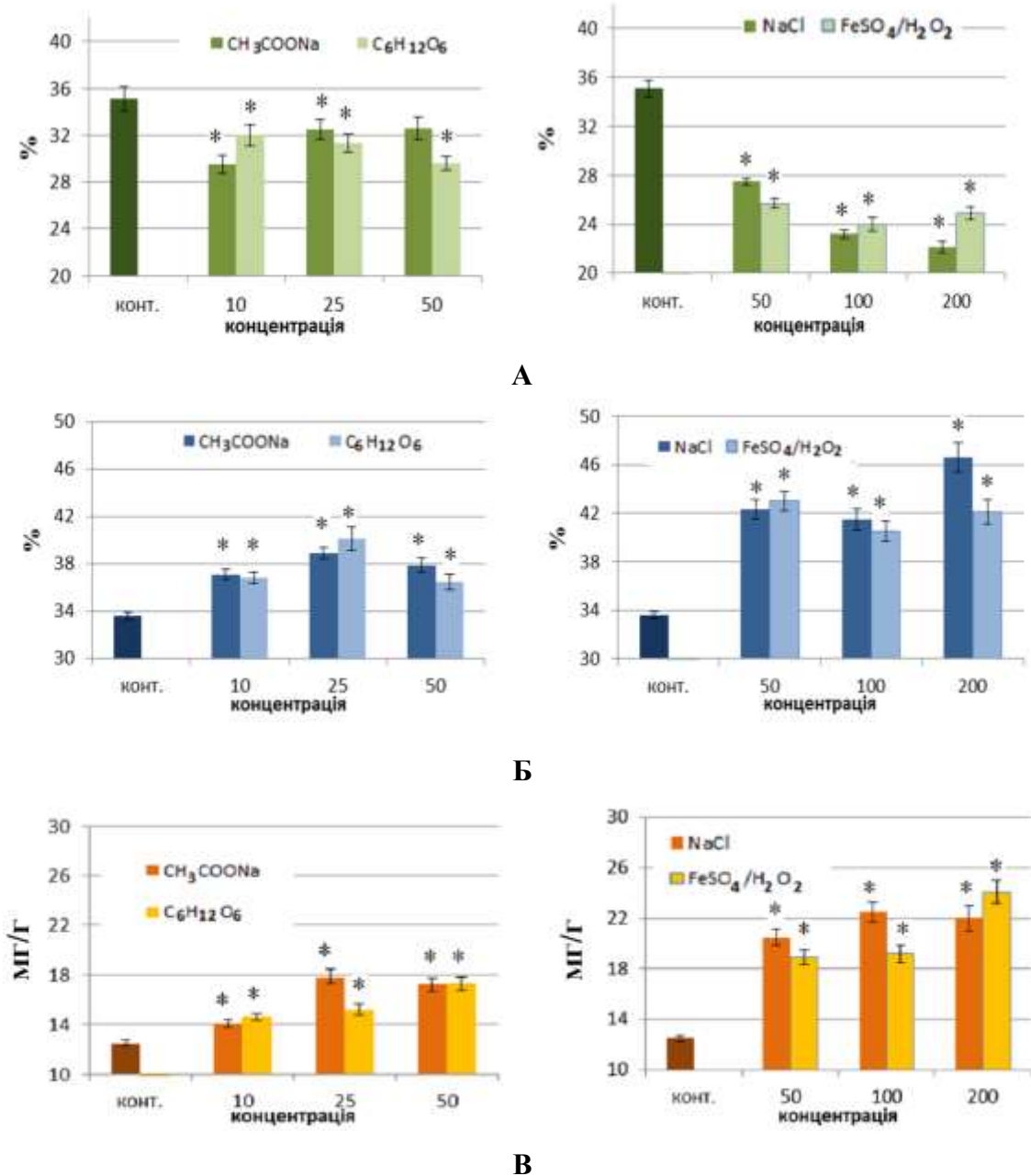


Рис. 3.15. Кількість загального білка (А), ліпідів (Б), каротиноїдів (В) *A. dimorphus* на кінець II фази культивування за дії індукторів каротиногенезу.

Примітка: * - відмінності, у порівнянні з контрольною групою, статистично вірогідні при $p \leq 0,05$.

У той же час результатом застосування глюкози та ацетату натрію є збільшення кількості каротиноїдів тільки до 18 мг/г у обох культурах. Проте зміни складу середовища культивування впливають не тільки на якісний склад каротиноїдів, але й на їхні кількісні характеристики. Так, за період

другої стадії культивування суттєво змінюється кількісний склад окремих фракцій каротиноїдів (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Фракційний склад каротиноїдів у біомасі

D. armatus та *A. dimorphus*

Фракція	CH ₃ COONa	C ₆ H ₁₂ O ₆	NaCl	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂	Конт.
<i>D. armatus</i>					
β-каротин	17,87±0,16*	23,70±1,14*	32,45±1,22	35,04±1,86*	29,1±1,16
монофіри астаксантину	5,17±0,16*	4,76±0,14*	13,19±0,89*	12,32±0,43*	5,11±0,13
дифіри астаксантину	2,30±0,11*	2,08±0,14*	11,76±0,47*	11,54±0,68*	3,04±0,18
астаксантин	12,52±0,55*	14,49±0,43*	20,23±1,65*	23,73±1,67*	13,6±0,67
<i>A. dimorphus</i>					
β-каротин	15,08±0,26*	18,18±0,75*	27,51±1,33	31,84±1,42*	25,2±1,02
монофіри астаксантину	5,09±0,10*	6,34±0,17*	9,45±0,48*	9,08±0,46*	1,14±0,05
дифіри астаксантину	2,93±0,10*	4,17±0,21*	5,37±0,25*	5,48±0,24*	0,57±0,11
астаксантин	6,33±0,34*	7,86±0,35*	14,32±0,31*	15,07±0,18*	9,23±0,36

Примітка: * - відмінності, у порівнянні з контрольною групою, статистично вірогідні при $p \leq 0,05$.

При внесенні попередників біосинтезу спостерігався перерозподіл профілю каротиноїдів. Зокрема, відмічено зменшення вмісту первинних каротиноїдів та збільшення частки вторинних каротиноїдів. За умов застосування промоторів вільнорадикалоного окислення (Fe²⁺ + H₂O₂) та осмотичного стресу (NaCl) збільшується частка β-каротину та астаксантину. Так, при застосуванні NaCl та FeSO₄/H₂O₂ вміст β-каротину збільшувався паралельно із вмістом вторинних каротиноїдів. У даному випадку, мабуть, β-каротин утворюється *de novo* у хлоропластах і транспортується у цитоплазму, де під дією кетолаз та гідроксилаз окислюється через ряд інтермедіатів до

астаксантину, тобто накопичується у клітинах мікроводоростей внаслідок абіотичного стресу. Таке явище може свідчити про функціонування двох головних шляхів біосинтезу вторинних каротиноїдів чи про їх розгалуження в ключових точках біфуркації [53].

Інтенсифікація каротиногенезу може також призводити до змін метаболізму інших нутрієнтів. Так, під час індукції біосинтезу вторинних каротиноїдів відбувається перерозподіл профілю основних нутрієнтів. Основну роль у стресових умовах відіграють адаптивні метаболічні системи, зокрема спостерігаються кількісні та якісні зміни в біосинтезі ліпідів і білків. Розглядаючи чинники, які активують каротиногенез, та фізіологічні ефекти їх накопичення, особливу увагу звертають на зв'язок біосинтезу вторинних каротиноїдів із активацією біосинтезу та накопичення ліпідів, що є енергетичним резервом [127, 161]. Накопичення біомаси при каротиногенезі в досліджуваних культурах відбувалося в основному за рахунок збільшення вмісту ліпідів (рис. 3.14, 3.15).

При внесенні в середовище попередників біосинтезу каротиноїдів у біомасі *D. armatus* збільшувався вміст загальних ліпідів до 42%, а в біомасі *A. dimorphus* – до 38% на фоні зменшення вмісту загального білка. За умов використання промоторів вільнорадикалоного окислення ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) та осмотичного стресу (NaCl) ці показники сягають позначок 49% та 46,6% відповідно. Збільшення кількості каротиноїдів завжди супроводжується збільшенням кількості ліпідів, оскільки жирні кислоти необхідні для етерифікації вільних ОН-груп у молекулах кетокаротиноїдів, а нейтральні ліпіди служать для їх розчинення та функціонування в цитоплазмі [117]. Щодо закономірностей накопичення білків у мікроводоростей в умовах посиленого каротиногенезу в літературних джерелах немає єдиної думки. За однією з них при посиленому каротиногенезі активується синтез білків, зокрема тих, які стабілізують ліпідні структури накопичення вторинних каротиноїдів. У інших випадках, і в нашому зокрема, індукція каротиногенезу протікає без інтенсифікації синтезу білків [196].

Отже, встановлено, що додавання до скидної води з УЗВ промоторів вільнорадикального окислення та осмотичного стресу, таких як NaCl (200 мМ) або комбінації Fe²⁺ (200 мМ) з H₂O₂ (10⁻⁴ мМ), у другій фазі культивування сприяє підвищенню вмісту β-каротину та астаксантину в біомасі мікроводоростей *A. dimorphus* та *D. armatus*, цінних для аквакультури риб і ракоподібних. При цьому поряд із процесами активації каротиногенезу відбувається перерозподіл профілю основних нутрієнтів та накопичення ліпідів, що не впливає на кормову цінність даної біомаси.

3.5. Зміни ферментативної активності в *D. armatus* та *A. dimorphus* при індукції каротиногенезу

Каротиноїди відіграють важливу роль в неферментативній антиоксидантній системі захисту клітин від пошкоджень. Первинні та вторинні каротиноїди у клітинах мікроводоростей виконують функцію антиоксидантного захисту. Перші з них беруть участь у поглинанні світла та фотозахисті мембран тилакоїдів. Інші розміщені в ліпідних включеннях цитоплазми чи на стромах пластид, захищають їх від наслідків дії стресових факторів [205].

Для деяких представників мікроводоростей, зокрема *Dunaliella salina*, показано, що в запуску синтезу вторинних каротиноїдів беруть участь активні форми кисню, оскільки при додаванні в середовище їх генераторів (гіпохлориду натрію, пероксиду водню, пероксинітриту) запускався гіперсинтез вторинних каротиноїдів. Ймовірно, активні форми кисню функціонують як вторинні месенджери, ініціюючи біосинтетичні шляхи для утворення вторинних каротиноїдів, таких як астаксантин та його ефіри, через активацію специфічних ферментів або стимулюючи експресію генів, що їх кодують [242]. Також спостерігається збільшення рівня активних форм кисню в умовах осмотичного стресу чи зниження ефективності фіксації вуглекислого газу. Попередньо нами було показано, що внесення у

середовище промоторів вільнорадикального окислення та осмотичного стресу (NaCl (200 мМ) чи Fe²⁺ (200 мМ) з H₂O₂ (10⁻⁴ мМ)) дозволяє збільшити вихід каротиноїдів у культурах до 4 разів [160]. При цьому відомо, що індуктори каротиногенезу можуть знижувати активність ферментативних механізмів антиоксидантного захисту (каталазної та пероксидазної активності) і накопичення каротиноїдів у якості компенсаторної реакції. У результаті злагодженої роботи цих ферментів за рахунок різної спорідненості зі субстратом здійснюється інактивація цілого ряду пероксидних сполук, що забезпечує гнучке регулювання рівня пероксидного окислення ліпідів у клітині й адекватну відповідь організму на дію окислюючого навантаження.

Комплексні дослідження різних компонентів системи антиоксидантного захисту мікрободоростей при дії осмотичного стресу та активних форм кисню дозволять виявити функції каротиноїдів у клітинах, механізм індукції їх накопичення та розробити методи керування каротиногенезом у культурі.

Каталаза (КФ 1.11.1.6), що входить у цей комплекс є ключовим ферментом. Вона відновлює супероксидний радикал до пероксиду водню. У комплексному антирадикальному захисті клітин, поряд із каталазою, мабуть, значну роль відіграє пероксидаза (КФ 1.11.1.7), яка відповідає за регуляцію концентрації H₂O₂ та органічних пероксидів у клітинах. Дані ферменти є одними з маркерних ферментів і практично першими активуються у відповідь на стрес [167].

При посиленні каротиногенезу важливо контролювати фізіологічний стан та ріст культури. Забезпечення нормального функціонування енергетичних систем та клітинних циклів є ключовим для ефективного формування стратегії виживання культури в умовах стресу. Одним із основних ферментів, що беруть участь у генерації енергії в клітині, є цитохромоксидаза (КФ 1.9.3.1), яка каталізує фінальний етап перенесення електронів на кисень під час окисного фосфорилування. Її активність є важливим показником метаболічної активності культури.

Тому актуальним є вивчення активності даних ферментів у клітинах мікроводоростей, культивованих в умовах індукції каротиногенезу з використанням промоторів вільнорадикального окислення (Fe^{2+} з H_2O_2) та осмотичного стресу (NaCl).

Додавання до культиваційного середовища сполук – генераторів активних форм кисню та промоторів осмотичного стресу ($\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ та NaCl) призводить до збереження вихідної чисельності клітин, збільшення виходу каротиноїдів і перерозподілу профілю основних нутрієнтів. При цьому на фоні зниження активності поділу клітин спостерігалось збільшення їх об'єму, агрегація та зміна кольору від зеленого до жовтого (агреговані клітини активно накопичують каротиноїди), що є характерним при активізації процесів каротиногенезу. (рис. 3.16).

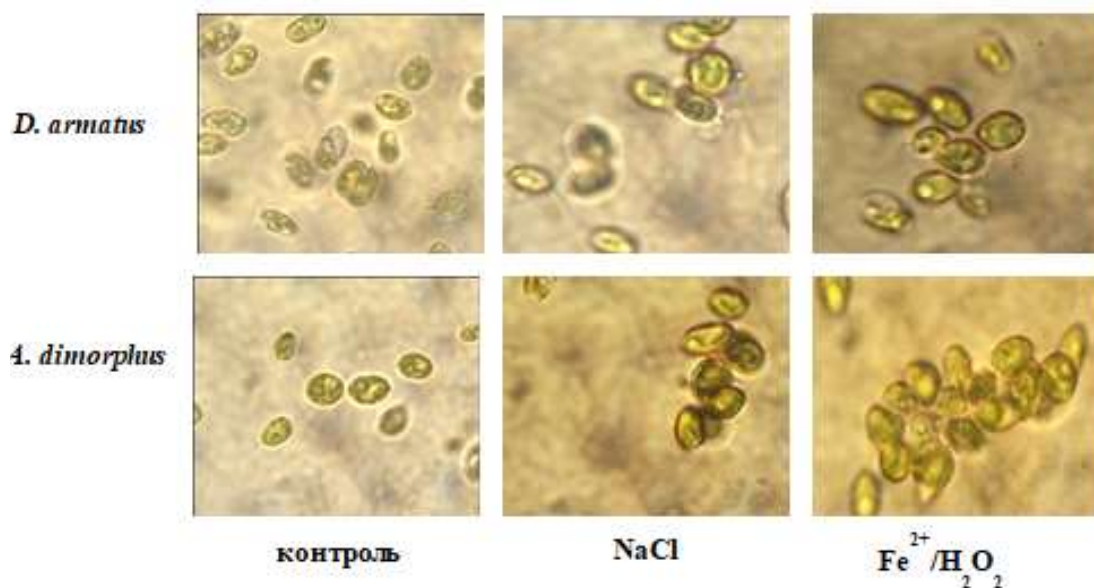


Рис. 3.16 Фізико-морфологічні зміни у культурах мікроводоростей за дії стрес-факторів.

Одним із показників стану альгокультури є її виживаність у стресових умовах, яку можна оцінити за накопиченням первинної біомаси. Так, протягом усього терміну культивування в середовищі з індукторами не відбувалося масової загибелі культур, разом із тим спостерігалася їхня низька ростова активність. За цей час кількість біомаси *D. armatus* знаходилася на

рівні першого дня культивування в межах 12-14 г/л, а кількість біомаси *A. dimorphus* дещо знижувалася до 9–11 г/л (рис. 3.17).

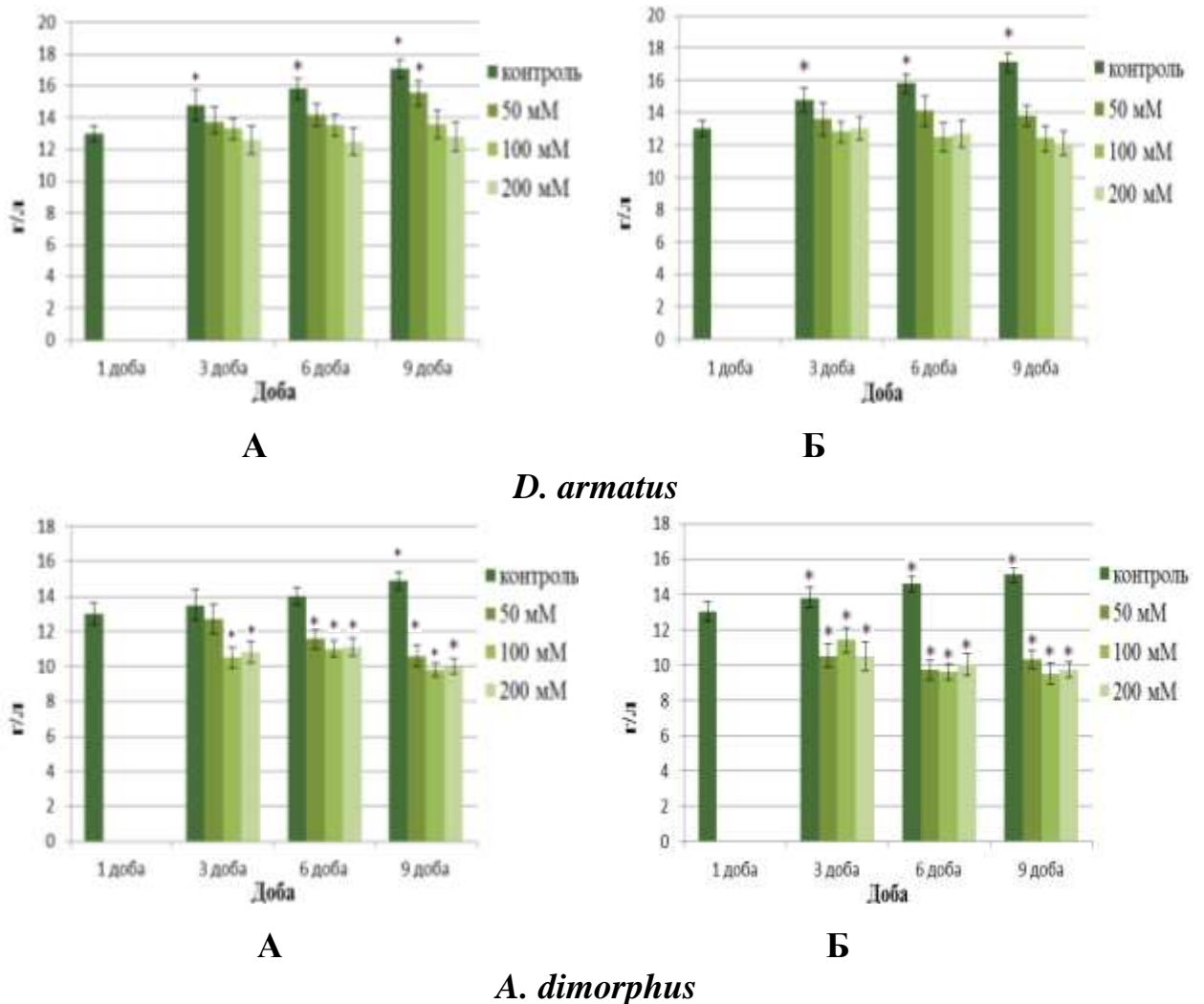


Рис. 3.17. Динаміка біомаси *D. armatus* та *A. dimorphus* на II фазі культивування за умов внесення промоторів вільнорадикального окислення (FeSO₄/H₂O₂) (А) та осмотичного стресу (NaCl) (Б)

Одним із показників метаболічної активності культури є активність цитохромоксидази. Цитохромоксидазний тест доводить, що при низькій ростовій активності пригнічуються також метаболічної активності культур (рис.3.18). Дія FeSO₄ з H₂O₂ призводила до зниження цитохромоксидазної активності в культурі *D. armatus* до 9 доби культивування втричі, а в культурі

A. dimorphus – у 4 рази. А вплив NaCl - до зниження такої активності у 2 рази уже на 3 добу вирощування обох культур.

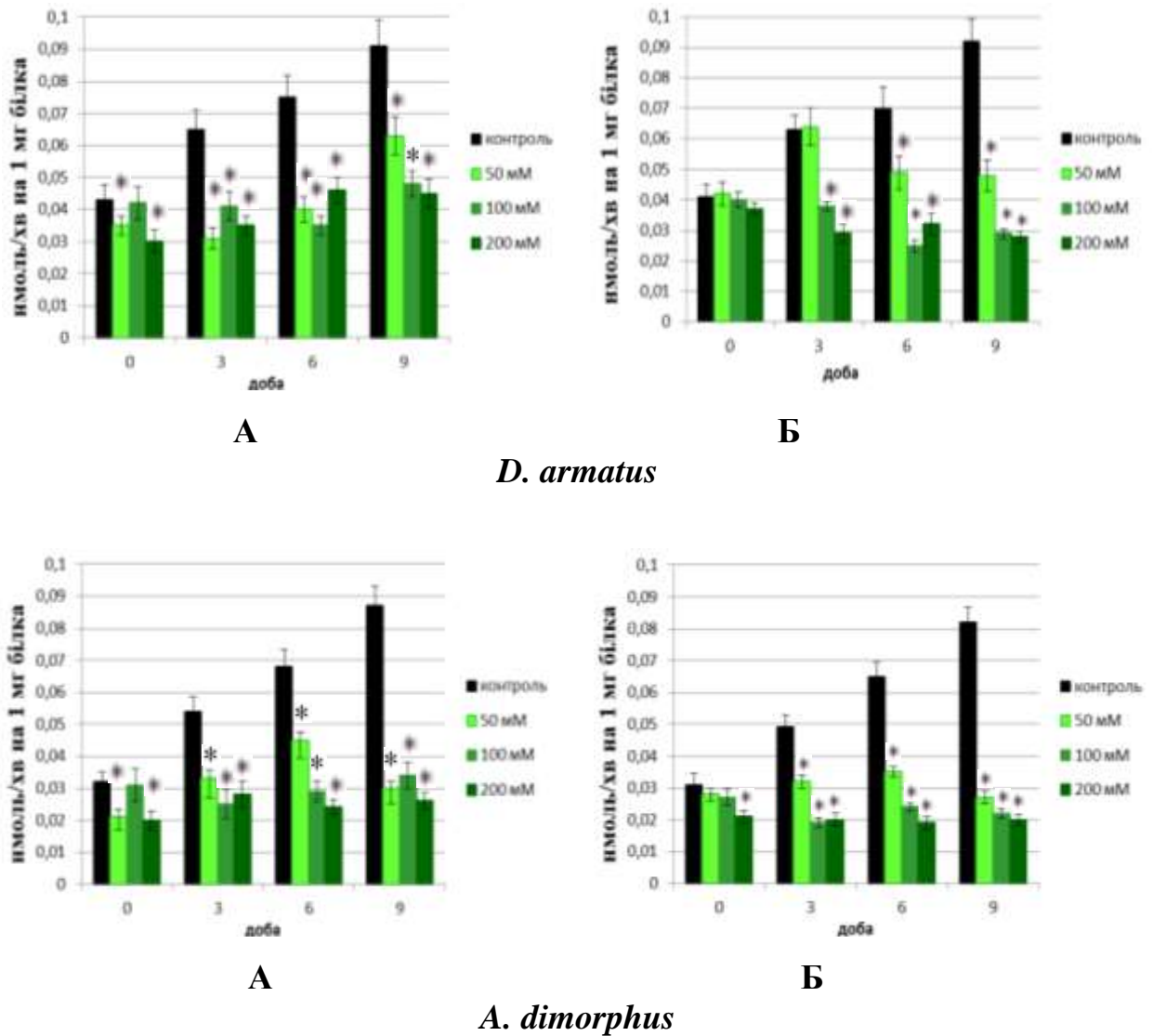


Рис.3.18. Динаміка цитохромоксидазної активності *D. armatus* та *A. dimorphus* на II фазі культивування за умов внесення NaCl (А), Fe²⁺/H₂O₂ (Б)

Ймовірно, порушення осмотичної рівноваги впливає на біосинтетичні процеси клітин так само, як і накопичення активних форм кисню.

Накопичення каротиноїдів може бути компенсаторною реакцією на активацію процесів антиоксидантного захисту, що зазвичай відбувається через підвищення активності окремих компонентів даної системи. Одним із перших ферментів, який активується у відповідь на стрес, є каталаза [99]. Її

активність збільшується вже при внесенні в середовище 50 мМ FeSO₄ з H₂O₂ та NaCl, а при концентрації 200 мМ даних індукторів ця активність зростає практично на вдвічі в усіх випадках (рис. 3.19).

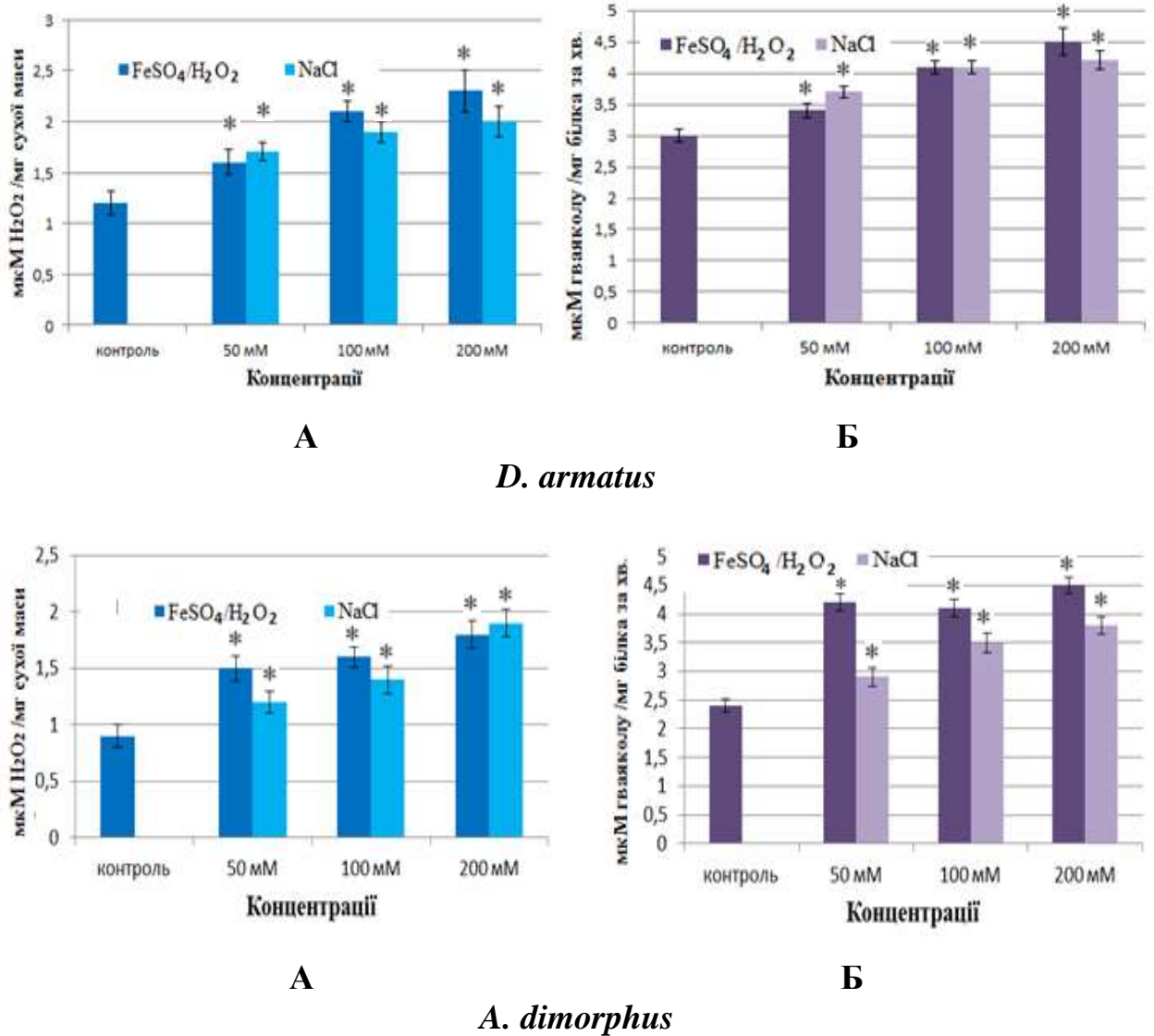


Рис. 3.19. Каталазна (А) та пероксидазна (Б) активність *D. armatus* та *A. dimorphus* на II фазі культивування за умов внесення NaCl, Fe²⁺/H₂O₂

Підвищення каталазної активності, ймовірно, пов'язано з підвищенням концентрації перексиду водню в клітинах. Зі збільшенням концентрації індукуючих агентів також зростає активність пероксидази. Пероксидаза бере також участь у метаболізмі фенольних сполук, а її висока активність може бути зумовлена як участю в процесах лігніфікації клітинних стінок, так і активізацією антиоксидантної системи захисту [51].

Таким чином, на фоні морфологічних змін та зниження ростової активності культури, викликаного введенням індукторів каротиногенезу (сульфат феруму з пероксидом водню та хлоридом натрію), спостерігається зменшення активності цитохромоксидази, що є індикатором метаболічної активності культури. Водночас, за таких умов, на тлі посиленого каротиногенезу, спостерігається активація антиоксидантних систем, що проявляється у підвищенні активності каталази та пероксидази.

3.6. Використання мікроводоростей як кормового субстрату для зоопланктону

3.6.1. Розробка схеми використання мікроводоростей як кормового субстрату для культур *Daphnia magna*, *Semiocephalus vetulus* та *Moina macroscopa* в лабораторних умовах

Масове вирощування здорової та життєздатної молоді риб обмежується нестачею повноцінних стартових кормів. Водночас, якість цих кормів значною мірою визначається часткою натуральних компонентів у їхньому складі [34, 61]. Застосування штучних сумішей без живого корму призводить до високої смертності личинок у перші дні вирощування та до їх низької життєздатності в подальшому. Тому при риборозведенні вважається обов'язковим використовувати живі корми протягом перших 6–10 днів підрощування личинок риб. [46].

Штучне розведення гідробіонтів є одним із основних способів забезпечення рибних господарств якісним кормом на різних етапах розвитку риб. У зв'язку з цим актуальним є масове вирощування дрібного живого корму, зокрема таких культур як *Daphnia magna*, *Semiocephalus vetulus* чи *Moina macroscopa* [79, 108, 174].

Усі ці культури заслуговують на увагу, оскільки є високопродуктивними видами, невибагливими до умов культивування

(чистоти води, рівня кисню у середовищі, температури, рН). Крім того, всі вищеназвані види слід розглянути при вивченні даного питання, оскільки відомо, що чим більш різноманітні за складом компонентів корми, тим вони повноцінніші [155].

Якість харчування риб живим кормом залежить насамперед від харчового субстрату, який споживає зоопланктон. Найчастіше для цих культур використовують зелені водорості, дріжджі (*Saccharomyces sp.*) або бактерії як харчові субстрати [31, 232, 238]. Перевагами використання водоростей є легке та швидке нарощування біомаси, якщо не враховувати необхідність періодичного перезапуску систем. Дріжджі також є хорошим харчовим субстратом для цих організмів, і їх можна отримати з мінімальними витратами на підготовку та підтримання культури. Однак дріжджі, на жаль, забруднюють середовище і є менш важливими з точки зору харчової цінності порівняно з водоростями [31]. У цьому випадку водорості як харчовий субстрат мають більше переваг, оскільки для досягнення тієї ж поживної цінності необхідно додавати в середовище більшу кількість дріжджів, ніж водоростей. Висока концентрація корму в середовищі може призвести до засмічення фільтраційного апарату зоопланктону та зниження рівня розчиненого кисню в культивацийному середовищі [206].

Дивлячись на вищесказане, використання дріжджів як корму, навіть у великих дозах, є малоефективним і нерентабельним. У зв'язку з цим важливим є використання інших субстратів і кормових сумішей та дослідження їх оптимальних доз. Існують експерименти з використання харчових дріжджів, збагачених лізином, кукурудзяним глютенном, кукурудзяним екстрактом, а також із додаванням культури *Chlorella sp.* Усі ці компоненти, за винятком *Chlorella sp.*, є ефективними стимуляторами бактеріальної флори в середовищі. Вони значно підвищують поживну цінність кормової суміші, проте це також суттєво збільшує її вартість [169].

Ідея використання водоростей як корму для зоопланктону не нова. Біомаса водоростей є доступною для зоопланктону та може забезпечити

усіма необхідними поживними речовинами. Серед усіх представників мікроводоростей *Chlorococcales* є найбільш поширеними кормами для зоопланктону. Найбільш відомі схеми отримання кормосумішей, як зазначалося вище, містять у своєму складі водорості. Додавання *Chlorella sp.* до середовища також має ряд недоліків. Використання високих концентрацій цієї культури може призвести до перенасичення середовища киснем і загибелі веслоногих ракоподібних через токсичні продукти життєдіяльності мікроводоростей. Особливо небезпечними є старі культури *Chlorella sp.*, які виділяють у середовище антибіотик хлоралін. Цей антибіотик не тільки сповільнює розвиток зоопланктону, але й може призвести до їх загибелі. [198].

Біомаса мікроводоростей родів *Desmodesmus* та *Acutodesmus* також може служити повністю альтернативним кормом для культивування ракоподібних *Cladocera* завдяки невеликим розмірам водоростей і достатньому вмісту амінокислот, білків, жирних кислот та каротиноїдів [84]. Залежно від умов вирощування, біомаса даних водоростей може містити від 45 до 70% білка з ліпідним діапазоном від 10 до 30% [25]. Профіль і кількість деяких жирних кислот та амінокислот також можна змінювати залежно від цілей культивування. Це дає можливість використання біомаси даних мікроводоростей як цінного джерела нутрієнтів для розробки схем харчування зоопланктону [31].

Тому актуальним є вивчення впливу таких протикокових мікроводоростей як харчового субстрату на ріст популяцій *Daphnia magna*, *Semiocephalus vetulus* та *Moina macroscopa* в лабораторних умовах з метою отримання даних, що дозволять у подальшому визначити технологічні параметри процесу одержання живих кормів на базі даних організмів. Крім того, мікроводості є основою кормової бази водойм. А це, в свою чергу, значно спрощує адаптацію риб при їх реінтродукції [250].

На сьогоднішній день великий інтерес для біотехнології риборозведення становлять схеми, для здійснення яких не потрібно

додаткових інвестицій, високовартісного обладнання чи технологій. Вибір живильного середовища, що забезпечуватиме потреби як зоо-, так і фітопланктону також важливий. Як було показано нами в попередньому дослідженні стічні води з УЗВ відповідають усім критеріям і можуть цілком задовольнити дані вимоги [85, 159]. Отримання цінної біомаси мікроводоростей на скидній воді з УЗВ значно спрощує схему отримання кормів. У той же час, у лабораторії ЧНУ показано ефективність використання цієї ж скидної води і для культивування веслоногих ракоподібних, зокрема *Daphnia magna*, *Moina macroscopa* та *Semiocephalus vetulus* [7]. Використання такого середовища може значно знизити витрати на кінцевий продукт. Використання мікроводоростей у розведенні даних об'єктів можна здійснювати у двох напрямках, зокрема сумісне культивування чи вирощування цінної біомаси з наступним згодовуванням.

Найбільш поширеною є схема з рекомендаціями регулярно вводити невеликі порції водоростей у систему вирощування. Відоме також спільне культивування зоопланктону разом із кормом [84]. Це дасть можливість економії витрат на живильне середовище та підтримання умов кліматичної кімнати. При розробці схеми сумісного культивування, в якій обидва кормові організми, зоопланктон та мікроводорість, яка виступає її кормом, одночасно присутні в системі. З одного боку, сумісне культивування значно економитиме час та ресурси. З іншого – отримання біомаси з наступною підгодівлею дозволить здійснювати корекцію нутрієнтного складу альгомаси, підвищуючи при цьому її продуктивні властивості. При сумісному культивуванні нами було сформовано три досліджувані групи:

- 1) з одночасним введенням зоопланктону і фітопланктону;
- 2) з введенням зоопланктону через три дні після внесення фітопланктону;
- 3) з введенням зоопланктону через шість днів після фітопланктону.

При аналізі результатів спільного культивування за трьома схемами нами було помічено, що в усіх досліджуваних схемах фітопланктон зростав

краще, коли кожна з культур зоопланктону була введена в середовище пізніше, через 3 чи 6 днів (рис. 3.20).

При внесенні зоопланктону через шість днів після фітопланктону, збільшення кількості клітин культур *D. armatus* та *A. dimorphus* носило накопичувальний характер. Така ж тенденція відзначалася і після введення зоопланктону через три дні після внесення даних культур. У той же час, кількість клітин водоростей зменшилася через день після додавання зоопланктону у схемах, де фітопланктон і зоопланктон були введені одночасно. Тут кількість клітин *D. armatus* та *A. dimorphus* теж поступово збільшувалася аж до середини вирощування, хоча даний показник становив половину від такого, що був встановлений у двох попередніх випадках.

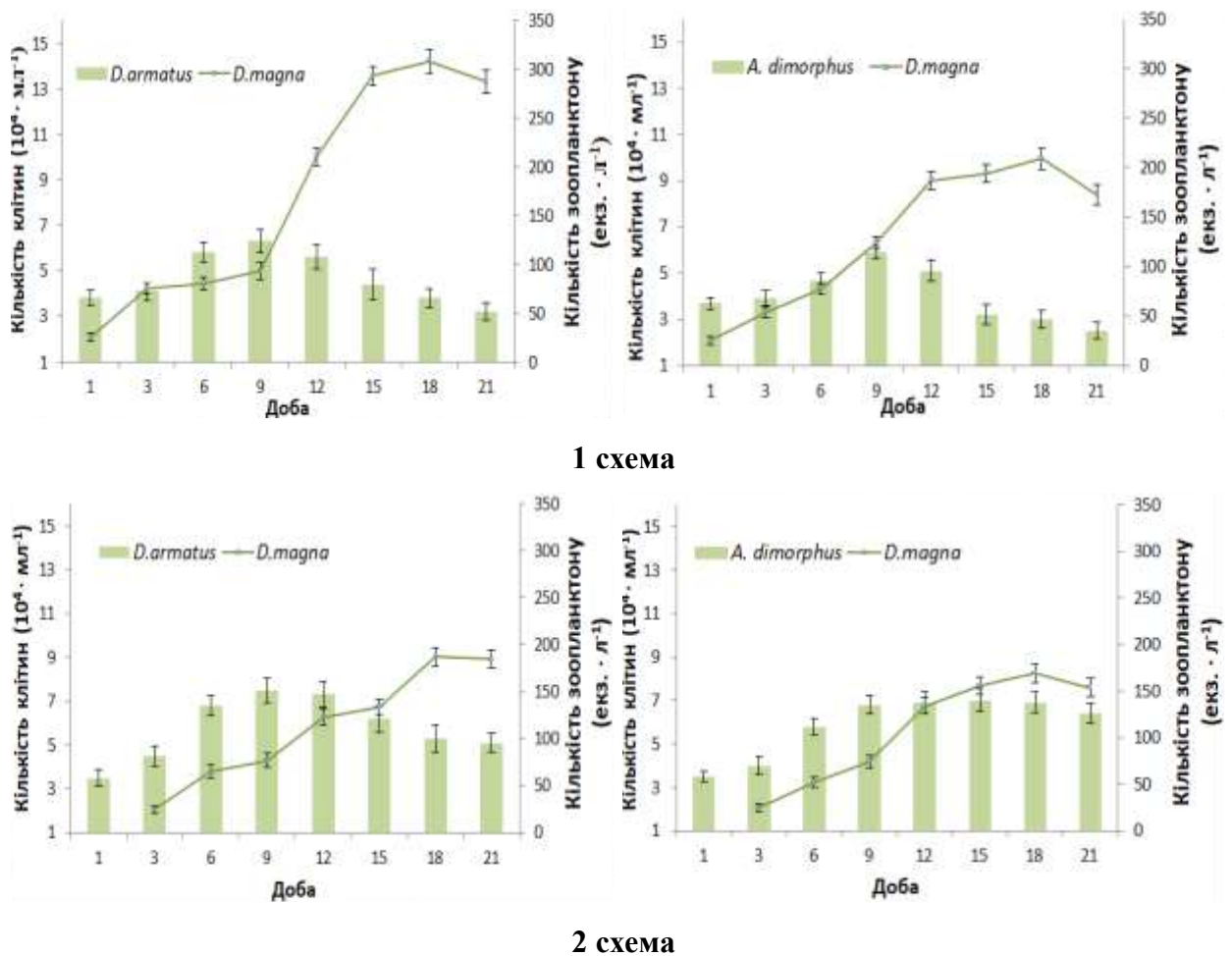
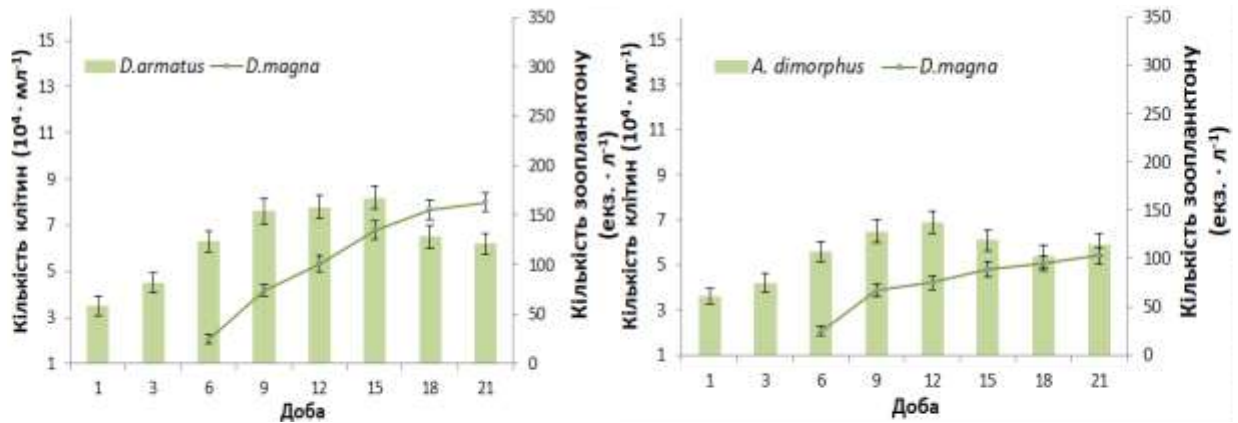


Рис. 3.20 Ефективність сумісного культивування *D. magna* та мікродоростей *D. armatus* та *A. dimorphus* при 1, 2 та 3 схемах спільного культивування.



3 схема

Рис. 3.20 продовження.

Отже, культури мікродоростей характеризувалися досить постійними показниками швидкості росту й кількості клітин у всіх досліджуваних схемах.

Найкращий ріст зоопланктону спостерігався при одночасному з фітопланктоном введенні у систему. Низька швидкість росту культур мікродоростей у цих умовах, з одного боку, забезпечувала трофічні потреби зоопланктону, а з іншого – не інгібувала розвиток досліджуваних культур.

Кількість особин *D. magna* збільшувалася пропорційно протягом усього терміну культивування і на термінальних етапах культивування досягала значення 306 екз. · л⁻¹ у схемі із *D. armatus* та 208 екз. · л⁻¹ - з *A. dimorphus*.

У випадку, коли зоопланктон вносили в систему після мікродоростей (на 3 чи 6 добу), кількість особин *D. magna* в культуральному середовищі зростала інтенсивно, проте ці числа не перевищували показники, які були встановлені при одночасному внесенні. Так, наприкінці культивування при внесенні на 3 добу дані числа були значно нижчими, ніж у попередньому експерименті, а при внесенні на 6 добу - вдвічі меншими, ніж коли обидва компоненти системи були введені одночасно. Таким чином, після введення зоопланктону в систему одночасно, розвиток культури *D. magna* був найпродуктивнішим, а через шість діб після фітопланктону спостерігався

найповільніший ріст кількості особин у порівнянні з двома попередніми схемами. Дані закономірності зберігалися для схем з обома культурами фітопланктону. На 21 добу культивування кількість особин *D. magna* в культуральному середовищі знижувалася для всіх застосованих схем. Крім того, темпи приросту біомас мікроводоростей теж поступово зменшувалися, що й призводило до зменшення кількості особин *D. magna*. Тому проводити культивування більше 18–21 дня не варто.

Динаміка накопичення кількості особин *S. vetulus* та *M. macroscopa* була схожою з динамікою, встановленою для культури *D. magna* (рис. 3.21, рис. 3.22).

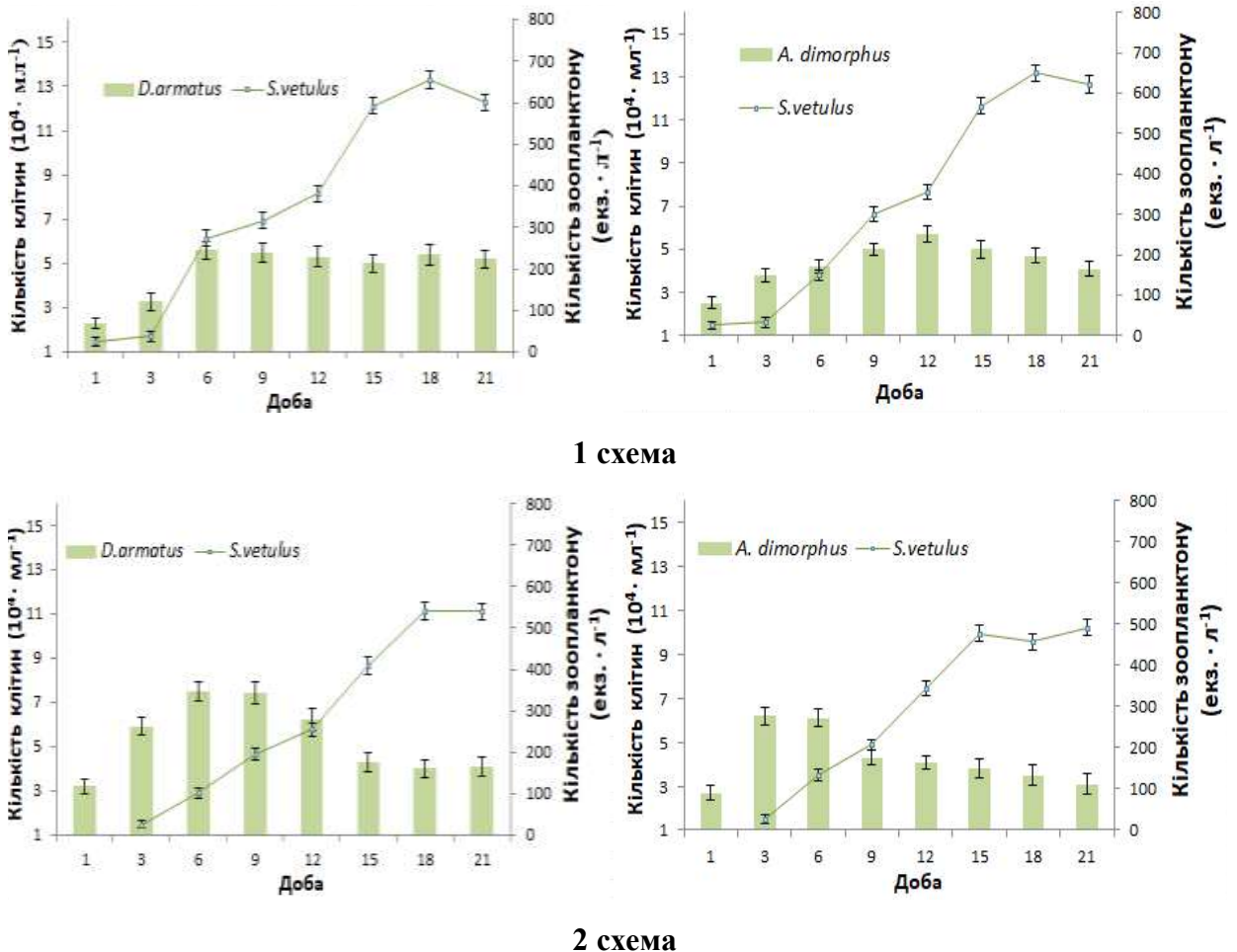
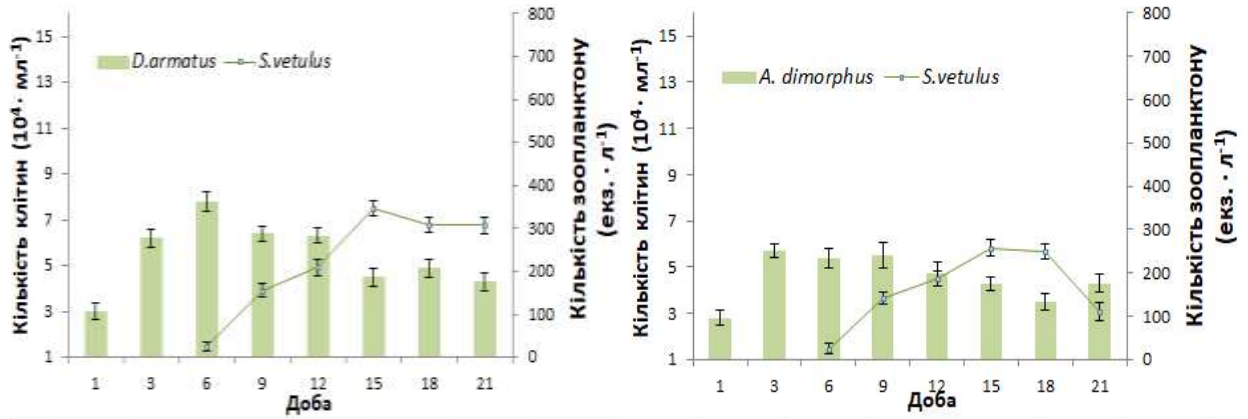


Рис. 3.21. Ефективність сумісного культивування *S. vetulus* та мікроводоростей *D. armatus* та *A. dimorphus* при 1, 2 та 3 схемах.



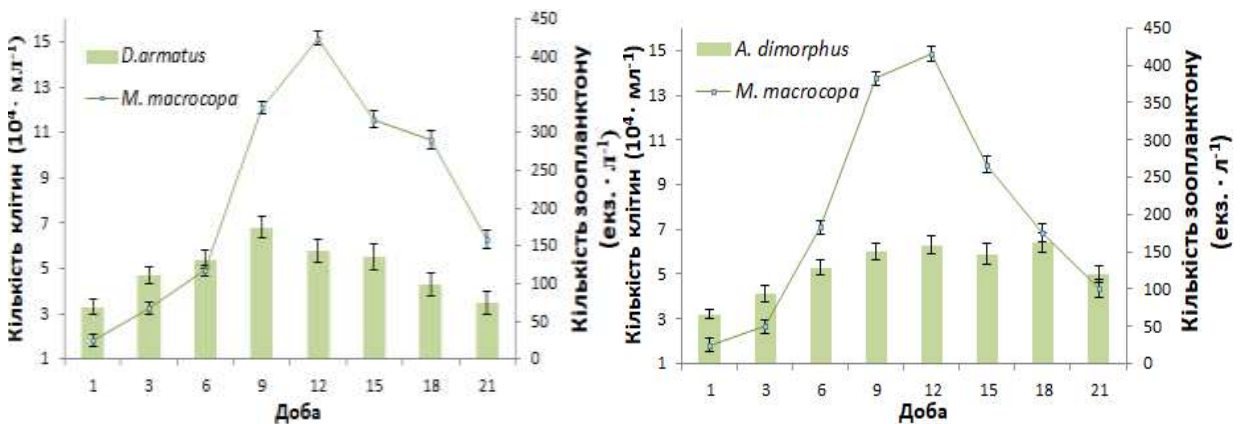
3 схема

Рис. 3.21. продовження

У зібраній біомасі зоопланкtonу після проведення кожної зі схем, нами були встановлені середні розміри особин у кожному із зразків. Показано, що після введення зоопланкtonу в систему на шосту добу кількість особин зоопланкtonу була меншою, але, в той же час, їхні розміри були більшими.

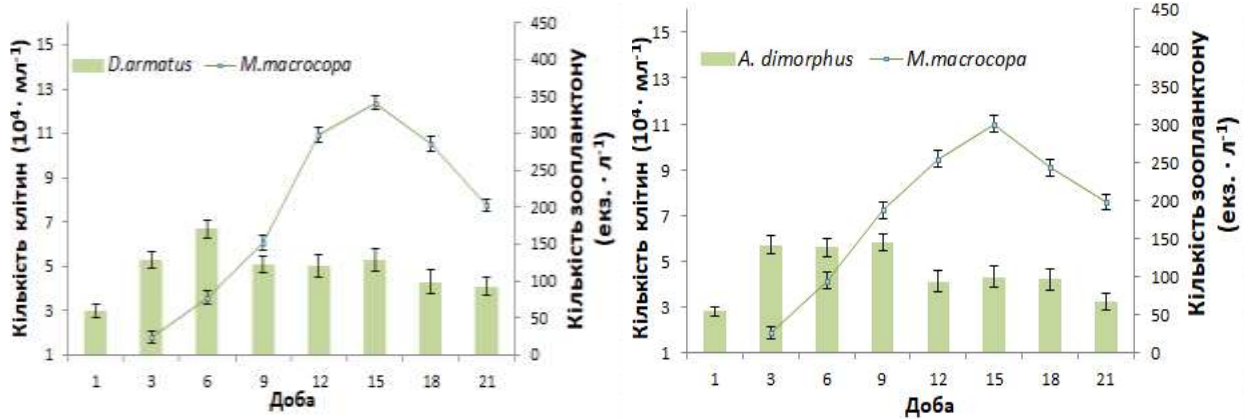
Біомаса зоопланкtonу, який отримував як кормовий субстрат дріжджі, характеризувалася найнижчим вмістом загального білка (на рівні 47–49%) в усіх експериментах із мікрободоростями. У той же час, найвищих значень даний показник сягав у схемах одночасного заселення фіто- і зоопланкtonу.

При одночасному внесенні культур до системи отримували високі значення, при внесенні на 3 і 6 добу ці значення були значно нижчими.

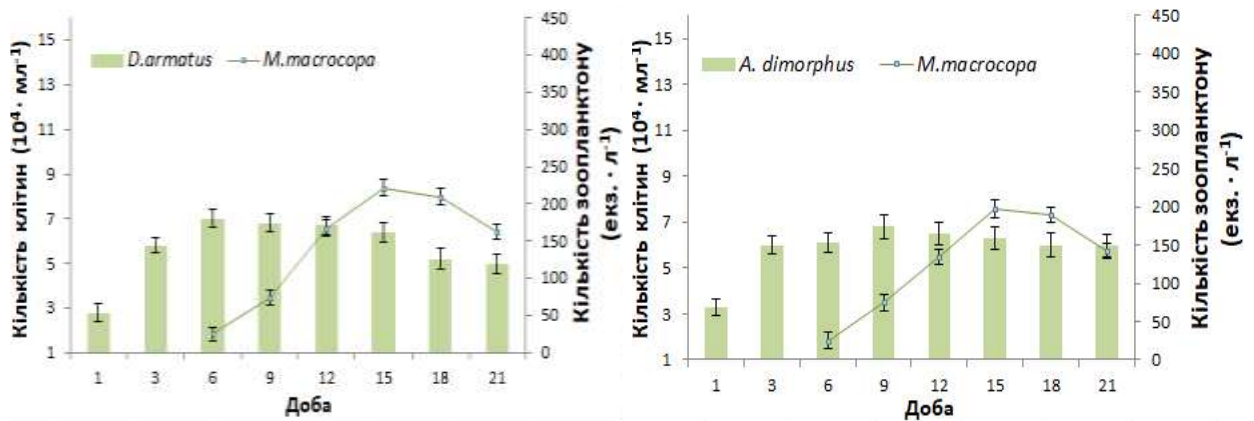


1 схема

Рис. 3.22. Ефективність сумісного культивування *M. macrospora* та мікрободоростей *D. armatus* та *A. dimorphus* при 1, 2 та 3 схемах.



2 схема



3 схема

Рис. 3.22. продовження

Аналіз ліпідів у зразках біомас зоопланктону вказував на деякі інші закономірності. Найбільший вміст ліпідів відзначається в біомасі зоопланктону, вирощеної на дріжджах. Коли фітопланктон вводили в систему порційно, вміст ліпідів був найнижчим. Даний показник мав тенденцію до зростання в міру відтермінування доби внесення фітопланктону до системи. У схемах вигодовування зоопланктону дріжджами вміст каротиноїдів був найнижчим. У схемах годування фітопланктону цей показник є вищим, хоча різниця є невеликою (1-2 мг/г) (Додаток Б).

Ефективність вирощування будь-якого гетеротрофного організму залежатиме, в першу чергу, від якості харчування. Хоча дафнії споживають дріжджі як їжу, основне їхнє призначення — це служити органічним добривом для розвитку бактерій та водоростей [110]. Годування

зоопланктону водоростями є альтернативою використанню дріжджів. Загальний вміст білка в біомасі водоростей залежить від їх систематичних особливостей і може становити від 30 до 55% сухої маси, коли культура досягає стаціонарної фази росту. Водорості також можуть виробляти різні типи ліпідів, такі як гліколіпіди, фосфоліпіди (полярні ліпіди) та гліцероліпіди [74, 107]. Водорості мають значні запаси нейтральних ліпідів та вільних жирних кислот. Вміст ліпідів у мікрководоростях може коливатися від 10 до 50%. Склад ліпідів та кількість окремих жирних кислот змінюються в залежності від виду водоростей і умов їх вирощування. Важливість водоростей як їжі для гідробіонтів зумовлена їхнім вмістом каротиноїдів, ксантофілів та пігментів хлорофілу [50]. Загалом, вміст каротиноїдів і хлорофілів у водоростях вищий, ніж у рослинах. Крім того, вони містять також і корисні антиоксиданти, такі як 0,01-3% токофероли (вітамін Е), 0,1-1,5% аскорбінової кислоти (вітамін С) і фенольні сполуки [48]. Наявність цих сполук в їжі є ключовим фактором, що визначає динаміку росту та щільність планктону, а отже, і їхню продуктивність. Трофічне забезпечення також може впливати на репродуктивний потенціал зоопланктону. Нестача певних компонентів може не лише обмежити родючість, але й спричинити підвищення рівня смертності [91]. Недостатня кількість їжі є безпосередньою причиною загибелі ракоподібних, особливо на ранніх стадіях розвитку. Щоб уникнути постійного підгодовування ракоподібних, ми намагалися розробити схему їх спільного культивування. При виконанні цих досліджень потрібно враховувати багато факторів, у тому числі склад культурального середовища, яке має задовольняти всі вимоги як для водоростей, так і для ракоподібних. Можливість вирощування зоопланктону на стічних водах УЗВ було попередньо показано в роботі [159]. Використання стічних вод з УЗВ для вирощування зоопланктону приводить до збільшення чисельності зоопланктону та біомаси. Це середовище є цінним джерелом усіх необхідних елементів для активно ростучих культур. Важливо враховувати розмір обох видів, коли проводять культивування фітопланктону і зоопланктону разом.

Багато водоростей не можна використовувати як корм для *Cladocera*, тому що вони заважають нормальним процесам фільтрації, що знижує рівень споживання доступних дрібних продуктів харчування [155].

Культура водоростей *D. armatus* характеризується невеликими розмірами і високим вмістом основних поживних речовин, що означає, що вона підходить для використання як корм для зоопланктону.

Ми розглянули кілька схем для введення ракоподібних *Cladocera* і кормів для культурального середовища. Початкова культура *Daphnia magna*, *Moina macrocopa* чи *Semiocephalus vetulus* вводилася в той же день або через 3, 6 діб. За такий термін кількість клітин водоростей значно зростає. В іншому випадку кожен культуру зоопланктону регулярно в один час годували порцією дріжджів.

Послідовність, в якій обидва культивовані види вводяться в систему також є важливою, оскільки наявність їжі для зоопланктону визначає її продуктивність. Були випробувані три схеми спільного вирощування, в яких час внесення зоопланктону до системи вирощування відрізнявся. Спільне введення зоо- і фітопланктону в систему показало, що перші адаптувалися досить швидко, активно споживаючи доступну їжу. Затримка ж введення культур зоопланктону в систему спільного вирощування привела до інтенсифікації росту мікроводоростей, що негативно відобразилося на збільшенні особин зоопланктону. Очевидно, що культури зоопланктону розвиваються повільніше тоді, коли їх вводили у системи вирощування пізніше. Очевидно, інтенсивний розвиток водоростей гальмував зростання зоопланктону. Пояснення щодо цього не було знайдено, але, швидше за все, це було викликано якісними змінами середовища культивування та масиву накопичення біомаси водоростей. Найбільшу кількість особин зоопланктону отримали, коли фітопланктон було введено в системи культивування порційно. Найімовірніше таке порційне внесення повністю задовольняє всі трофічні потреби зоопланктону. В той же час культура фітопланктону не

встигає розмножуватися і накопичувати метаболіти в культиваційному середовищі.

Оптимальним терміном культивування є 15 діб, через поступове споживання культури нижчими ракоподібними мікродоростей, зниження потенціалу живильного середовища і накопичення метаболітів *Cladocera* та водоростей у культуральному середовищі.

Безперервне культивування досліджуваних культур без оновлення середовища чи його очистки призводить до накопичення продуктів метаболізму. Тому актуальним є контроль фізико-хімічних показників такого середовища. У всіх випадках ми спостерігали незначне підвищення значень загальної мінералізації (від 440 до 578 мг/л) та електропровідності (650–745 $\mu\text{S}/\text{мл}$), в той же час значення рН залишалися в межах 7,0–8,0. Дані закономірності зберігалися для всіх досліджуваних культур і свідчили про стабільність таких систем. У подальшому вони дозволять значно спростити технологію отримання живих кормів, яка не вимагатиме жорсткого контролю його фізико-хімічних параметрів.

При дослідженні різних варіантів спільного культивування зоопланктону і фітопланктону показано, що кількість з'їдених клітин водоростей зростає пропорційно до збільшення кількості зоопланктону в розчині. Так, при одночасному заселенні зоо- і фітопланктону концентрація клітин водоростей є малою і збільшуватись це число не встигає через постійне виїдання, тому дефіцит корму є стимулом до збільшення швидкості поїдання водоростей.

При малій щільності посадки (25 особин/500 мл) у середовищі, де активно розмножується культура мікродоростей, швидкість поїдання мікродоростей була дуже низькою. Найімовірніше, причиною цього є переповнення шлунково-кишкового тракту і засмічення фільтрувального апарату через надлишок корму.

3.6.2. Кокультивування зоопланктону та збагачених каротиноїдами мікроводоростей

Зоопланктон, який використовують у якості живого корму, може накопичувати каротиноїди з їжі, але синтезувати їх не може [169]. Як показано нами раніше, розроблені схеми культивування з культурами *D. armatus* та *A. dimorphus* дозволяють отримати швидкоростучі культури зоопланктону з високими продуктивними характеристиками. Для виживання личинок риб та подальшого їхнього розвитку необхідними є корми з високим вмістом каротиноїдів, зокрема ксантофілів. Як і зоопланктон, синтезувати каротиноїди *de novo* риби не в змозі, проте на кожному з етапів розвитку потребують їх у великих кількостях. Якість кормів має великий вплив на виживаність, ріст і розвиток личинок риб [214]. Каротиноїди стимулюють функціонування імунної системи, захищають від ультрафіолетового випромінювання, підвищують стійкість до високих концентрацій азотних сполук і низького рівня кисню у воді, а також стимулюють ріст, прискорюють статеве дозрівання та покращують якість ікри. У риб родини лососевих каротиноїди визначають забарвлення м'язової тканини та ікри. Однак спроби додати β -каротин з витяжки моркви чи астаксантин до кормів для форелі не дали позитивних результатів [119]. В результаті таких експериментів показано, що дані препарати не мали ніякого позитивного впливу ні на життєдіяльність риб, ані на забарвлення зовнішніх покривів, м'язів та ікри лососевих, оскільки лососеві не засвоюють каротиноїди продуктів наземного походження [31]. Тільки астаксантин та кандаксантин здатні забарвлювати тканини лососевих риб у рожевий колір. До кормосумішей їх вводять найчастіше у складі препаратів Карофіл Рожевий (астаксантин), Карофіл Червоний (кантаксантин), Вітатон. Проте живі корми містять більш широкий спектр каротиноїдних сполук, і, в той же час, схема їх отримання в рази дешевша [155].

Тому актуальною є розробка методик не тільки підбору схем найоптимальнішого спільного культивування цих організмів, а ще і розгляд способів прижиттєвого насичення зоопланктону каротиноїдами. З даною метою як корм застосовують каротинсинтезуючі організми – зокрема водорості чи дріжджі. Щодо останніх, то, як згадувалося вище, при внесенні їх у культуральне середовище можливий розвиток і супутньої мікрофлори, що є небажаним ефектом. У той же, час інші кормові субстрати для вирощування *Cladocera*, зокрема відходи сільськогосподарських угідь, можуть забезпечити корми тільки органічними сполуками та потребують дорогавартісних каротиноїдовмісних добавок [135]. Позитивним є той момент, що у складі біомаси мікрководоростей можна коригувати не тільки якісний, а й кількісний склад каротиноїдів. З цією метою нами було апробовано схеми спільного культивування зоопланктону і мікрководоростей, нутрієнтний склад яких коригували шляхом додавання у середовище індукторів чи стимуляторів каротиногенезу. Раніше ми показали, що при одночасному з фітопланктоном введенні у систему, а також при порційному внесенні мікрководоростей ріст досліджуваних видів зоопланктону був найкращим. У даних експериментах ми спостерігали високі показники щільності культур та їхньої трофічної активності. Проте каротиноїдний вміст у всіх досліджуваних схемах був низьким. Тому на наступному етапі ми апробували схеми, які включали попередню корекцію нутрієнтного складу мікрководоростей *D. armatus* та *A. dimorphus* шляхом активізації каротиногенезу останніх. Як показано нами раніше, кращі показники нутрієнтного вмісту мікрководоростей отримані при застосуванні промоторів осмотичного стресу та вільнорадикального окислення, NaCl (200мМ) чи Fe²⁺ (200 мМ) з H₂O₂ (10⁻⁴ мМ) на другій фазі культивування. Отримані таким чином культури вводили у середовище із зоопланктоном за наступними варіантами:

1. Біомасу мікроводоростей, культивованих на скидній воді з УЗВ з додаванням NaCl (200 мМ) вносили у культиваційне середовище разом із зоопланктоном.
2. Біомасу мікроводоростей, культивованих на скидній воді з УЗВ Fe²⁺ (200 мМ) з H₂O₂ (10⁻⁴ мМ) вносили у культиваційне середовище разом із зоопланктоном.
3. Біомасу мікроводоростей, культивованих на скидній воді з УЗВ з додаванням NaCl (200 мМ) вносили у культиваційне середовище із зоопланктоном порційно.
4. Біомасу мікроводоростей, культивованих на скидній воді з УЗВ Fe²⁺ (200 мМ) з H₂O₂ (10⁻⁴ мМ) вносили у культиваційне середовище із зоопланктоном порційно.

У результаті проведених досліджень нами було показано, що в усіх варіантах годівлі досліджувані культури зоопланктону досягають своєї максимальної щільності на 15 добу культивування, після чого спостерігалось поступове зниження щільності у кожній із культур. Більшу кількість особин було зафіксовано в культурах зоопланктону при апробації 3 та 4 схем культивування, тобто показано, що ріст зоопланктону залежав не від виду мікроводорості чи від застосованого індуктора, а від способу внесення мікроводоростей у систему. Так, 3 та 4 схеми передбачають порційне внесення мікроводоростей, зібраних у фазу своєї максимальної продуктивності. В той же час, у 1 та 2 схемах, де всі культури вносяться одночасно, у зв'язку з конкуренцією за живильне середовище, культура мікроводоростей «старіє» швидше, і продуктивність її, відповідно, теж знижується.

При застосуванні як кормового субстрату культур *D. armatus* чи *A. dimorphus* не було відмічено достовірної різниці у прирості чисельності досліджуваних культур *Moina*, *Daphnia* чи *Semocerphalus* (рис.3.23). Обидві культури характеризуються схожою поживною цінністю та є взаємозамінними при культивуванні зазначених видів зоопланктону.

В усіх досліджуваних схемах культиваційне середовище не оновлювалося і не очищалося від продуктів обміну. Тому ми проводили аналіз фізико-хімічних показників даних середовищ із метою моніторингу стану культур в цілому.

При цьому значення рН середовищ було стабільним і коливалося в межах 7,5–8,5. А показники електропровідності та загальної мінералізації зростали тільки на термінальних стадіях культивування і вже не мали суттєвого впливу на стан досліджуваних культур.

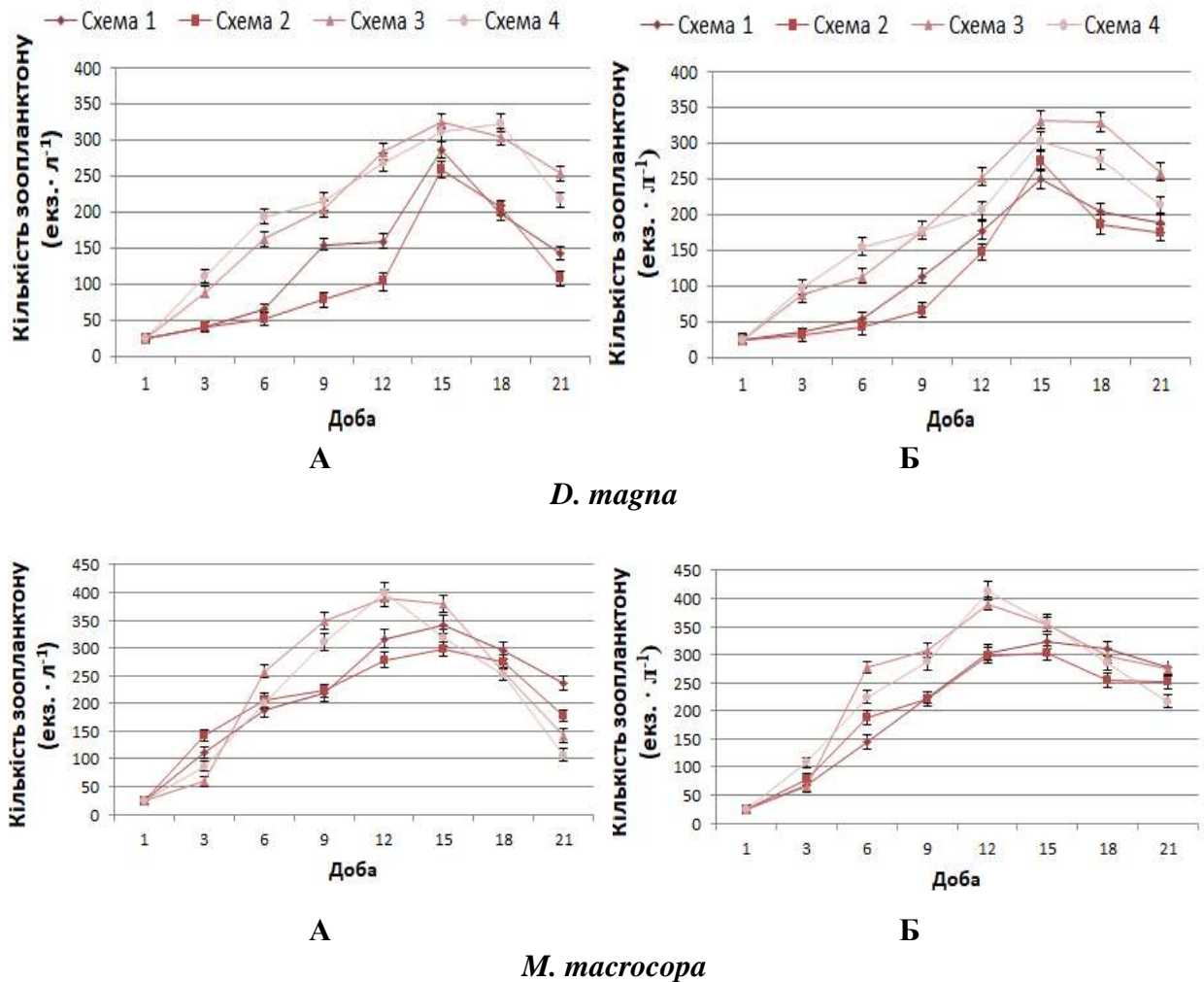


Рис. 3.23. Динаміка росту культур зоопланктону *D. magna*, *M. macroscopa*, *S. vetulus* за використання різних схем сумісного культивування із *D. armatus* (А) та *A. dimorphus* (Б)

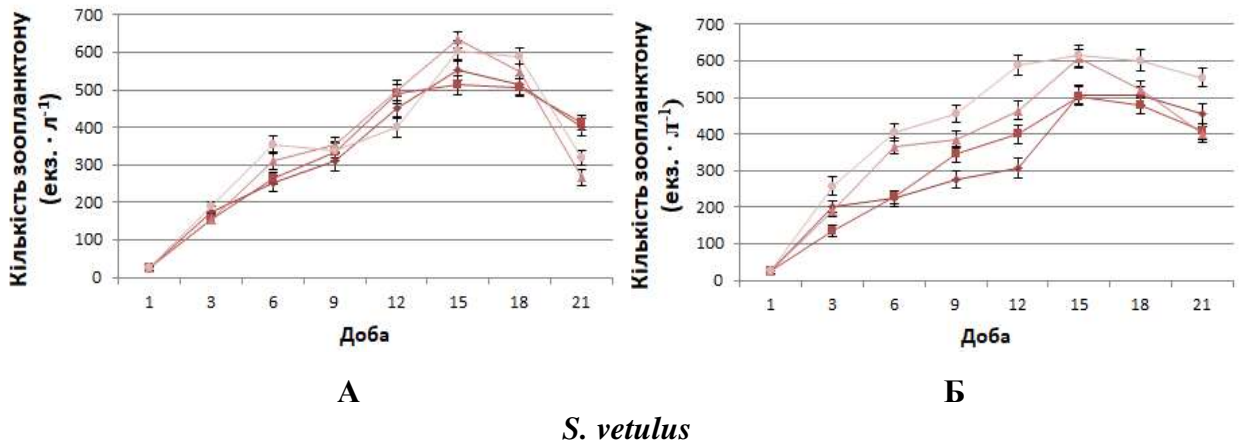


Рис. 3.23. продовження.

Застосування культур мікроводоростей, насичених каротиноїдами після попередньої індукції каротиногенезу, призводило також і до збільшення вмісту каротиноїдів у досліджуваних культурах зоопланктону. Максимальних значень даний показник сягав уже на 9 добу культивування в усіх досліджуваних схемах (рис. 3.24).

Вищі показники накопичення загальних каротиноїдів відмічені для 2 та 4 схеми культивування. В даному випадку визначальним був тип застосованого індуктора каротиногенезу.

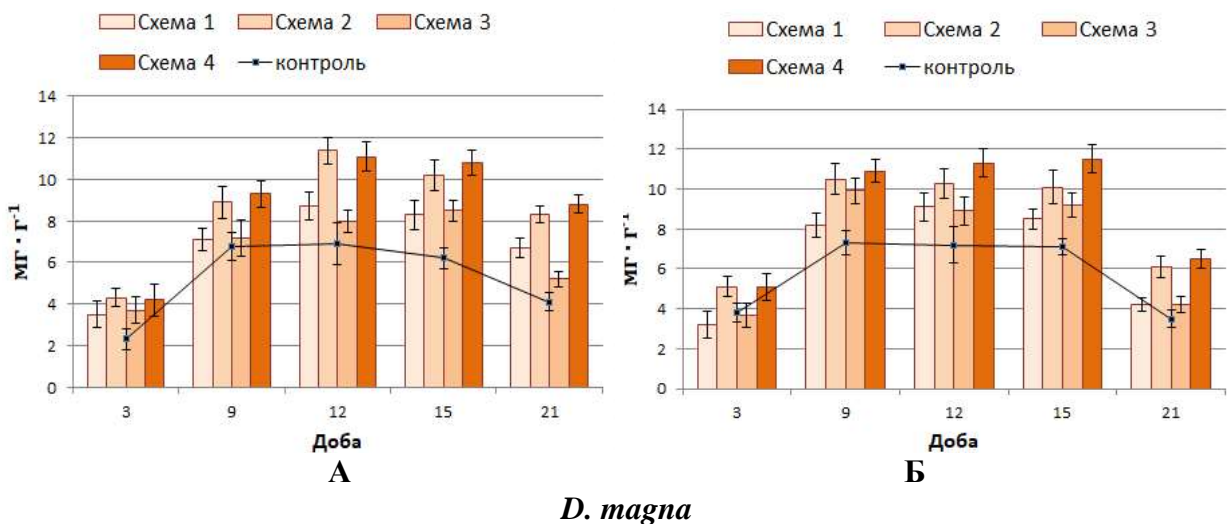


Рис. 3.24. Вміст загальних каротиноїдів у культурах зоопланктону *D. magna*, *M. macroscopa*, *S. vetulus* за використання різних схем сумісного культивування із *D. armatus* (А) та *A. dimorphus* (Б)

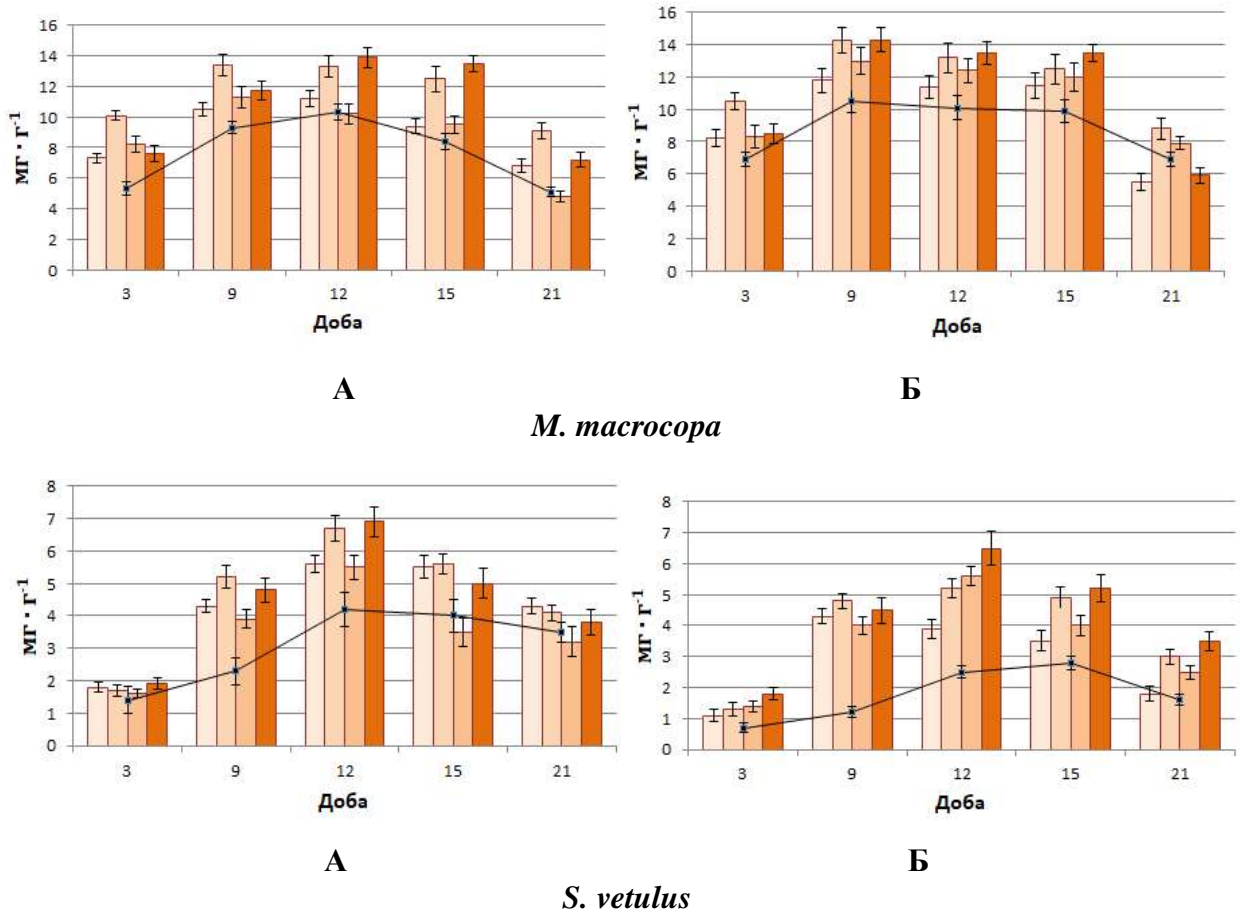


Рис. 3.24. продовження

У даних схемах ми використовуємо культури мікроводоростей, збільшення каротиноїдів у яких досягли шляхом використання промоторів вільно радикального окислення Fe^{2+} (200 мМ) з H_2O_2 (10^{-4} мМ).

У більшості випадків даний показник є вищим на чверть у порівнянні з таким, зафіксованим у 1 і 3 схемах. При чому спосіб внесення та вид мікроводоростей у системі значення не мали. Також слід відмітити, що високим вмістом каротиноїдів при такому культивуванні характеризувалися культури *D. magna* та *M. macroscopa* (до 14 мг/г).

Для культури *S. vetulus* даний показник не перевищував 7 мг/г. Найімовірніше, це зумовлено особливостями самої культури до накопичення каротиноїдів мікроводоростей, оскільки і в контрольних пробах ці значення значно нижчі порівняно з іншими культурами.

Поживну цінність зоопланктону як кормових організмів визначають не тільки загальний вміст каротиноїдів, а і їхній фракційний склад, оскільки

відомо, що на різних етапах розвитку потреби риб теж змінюються. Нами проведено вивчення фракційного складу каротиноїдів у фазу максимальної продуктивності методом препаративної тонкошарової хроматографії (Додаток В). Біомаса *D. magna* включала до свого складу 7 фракцій каротиноїдів: β -каротин, астаксантин, адоніксантин та їхні ефіри, кантаксантин, ехіненон, зеаксантин та лютеїн. При чому введення у системи культур мікроводоростей, збагачених каротиноїдами, призводило також і до змін концентрацій каротиноїдних фракцій. Результатом 1 та 3 схем культивування із *D. armatus* було збільшення вмісту β -каротину. А у 2 та 4 схемі – астаксантину.

В той же час, культивування з *A. dimorphus* приводило до зменшення фракції β -каротину в усіх досліджуваних схемах і збільшення астаксантину та кантаксантину. При культивуванні *Moina macroscopa* з *D. armatus* відмічено збільшення кількості β -каротину (2, 4 схеми), астаксантину (1,3 схеми), адоніксантину. Культивування з *A. dimorphus* теж призводило до незначного збільшення кількості зазначених фракцій у порівнянні з контрольними зразками.

Використання зазначених видів мікроводоростей, збагачених каротиноїдами шляхом культивування з Fe^{2+} (200 мМ) з H_2O_2 (10^{-4} мМ), для нарощення корисної біомаси *S. vetulus* призводило до збільшення β -каротину та астаксантину. Більшого ж вмісту кантаксантину можна досягти шляхом застосування біомаси мікроводоростей, що культивована на середовищі з додаванням хлориду натрію. У той же час, жодна з описаних схем не призвела до збільшення вмісту ехіненону, зеаксантину та лютеїну в культурах *D. magna*, *M. macroscopa* та *S. vetulus*.

Поживна цінність культур зоопланктону як кормових об'єктів визначається не лише каротиноїдним вмістом. Важливим є також і контроль вмісту інших нутрієнтів, зокрема протеїнів та ліпідів (рис. 3.25).

Нами показано, що попереднє культивування мікроводоростей на середовищі з індукторами каротиногенезу не мало суттєвого впливу на

накопичення загальних протеїнів та загальних ліпідів у досліджуваних культурах зоопланктону.

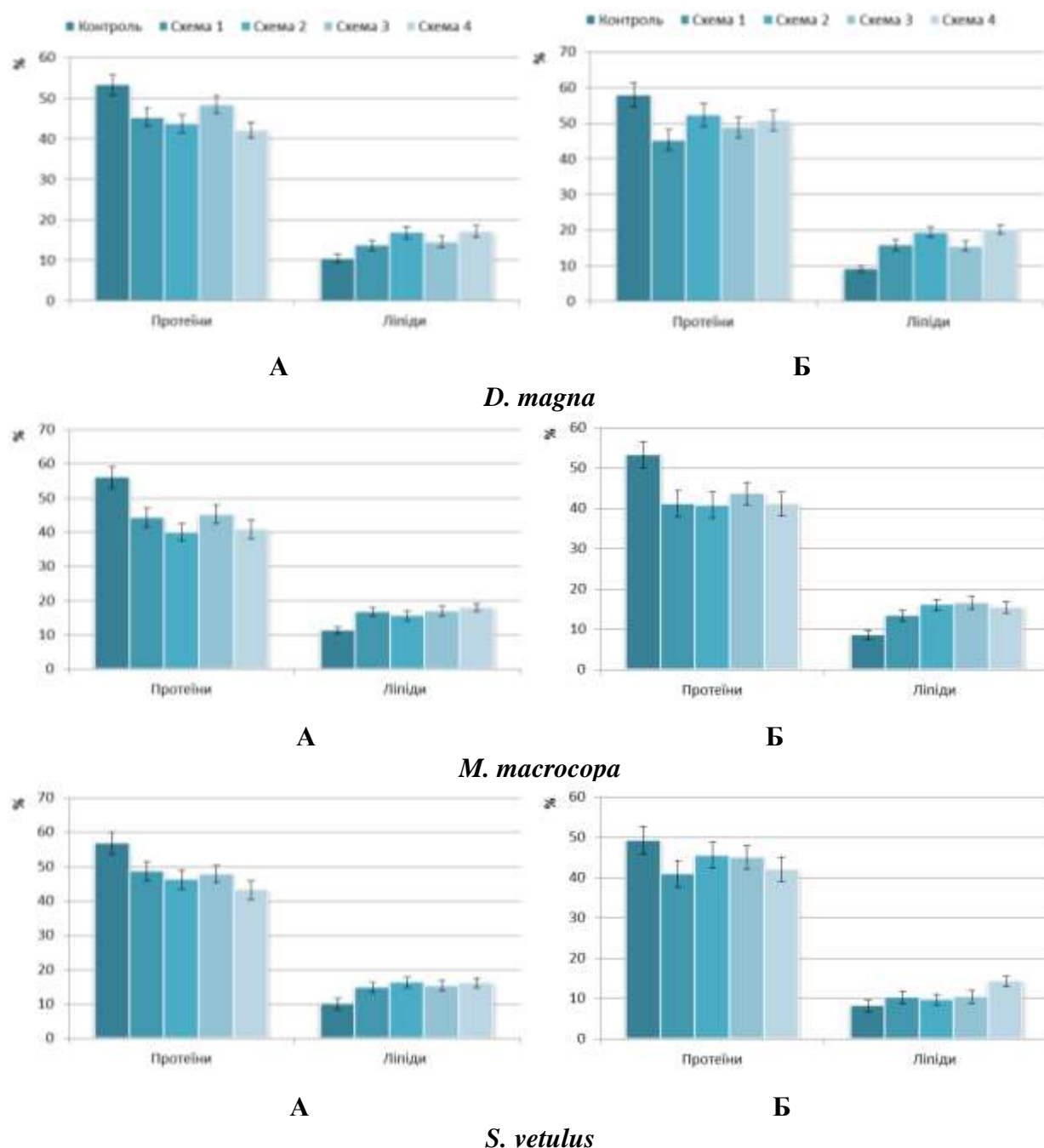


Рис. 3.25. Перерозподіл профілю основних нутрієнтів у культурах зоопланктону *D. magna*, *M. macroscopa*, *S. vetulus* за використання різних схем сумісного культивування із *D. armatus* (А) та *A. dimorphus* (Б)

Достовірної різниці вмісту не було відмічено, що свідчило про збереження поживної цінності культур *D. magna*, *M. macroscopa*, *S. vetulus*.

Отже, усі досліджувані схеми є ефективними. Завдяки таким маніпуляціям ми отримали культури з підвищеним вмістом каротиноїдів, при

цьому перерозподіл профілю основних нутрієнтів не зменшував загальної поживної цінності таких кормів.

Результати досліджень, описані у Розділі 3, опубліковані у наступних публікаціях:

1. Cheban, L., Grynko, O. & Dorosh, I. (2018). Co-cultivation of *Daphnia magna* (Straus) and *Desmodesmus armatus* (chod.) Hegew. in recirculating aquaculture system wastewater. *Archives of Polish Fisheries*, 26, 57 – 64.
2. Cheban, L., Malischuk, I. & Marchenko, M. (2015). Cultivating *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. in recirculating aquaculture systems (RAS) waste water. *Archives of Polish Fisheries*, 23(3), 155 – 162.
3. Cheban, L.M., Dorosh, I.V. & Marchenko, M.M. (2018). Reaction of Cells *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. on the Induction of Carotynogenesis. *International Letters of Natural Sciences*, 72, 21-27.
4. Khudyi, O., Marchenko, M., Cheban, L., Khuda, L., Kushniryk, O. & Malishchuk, I. (2016). Recirculating aquaculture systems waste water as a medium for increase of phytoplankton and zooplankton biomass. *International Letters of Natural Sciences*, 54, 1-7.
5. Marchenko, M.M., Dorosh, I.V. & Cheban, L.M. (2019). Induction of carotenogenesis in *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew cultivated on the closed waterside from recirculating aquaculture. *Biotechnologia Acta*, 12 (2), 46-55.
6. Чебан, Л.М., Маліщук, І.В., Гринько, О.Е. & Марченко, М.М. (2015). Вміст нутрієнтів у біомасі *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. та *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko, культивованій на скидній воді із УЗВ. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 7(2), 171 – 176.
7. Маліщук, І.В., Чебан, Л.М. & Марченко, М.М. (2015). Продуктивність монокультури *Clorella vulgaris* Beijerinck, культивованої на скидній воді із установки замкнутого водопостачання. *Вісник Одеського національного університету*, 20,1(36),121 – 128.

8. Маліщук, І.В., Чебан, Л.М. & Марченко, М.М. (2015). Особливості культивування *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko на скидній воді із рибоводної установки замкнутого водопостачання. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. Спеціальний випуск: Гідроекологія*, 3-4 (64), 428-432.
9. Чебан, Л.М., Маліщук, І.В., Лисак, В.Р. & Марченко, М.М. (2014). Ефективність вирощування *Anabaena hassalii* (kutz.) Wittr. за різних умов культивування. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 6 (2), 145-149.
10. Марченко, М. М., Худий, О. І., Чебан, Л. М., Худа, Л. В., & Маліщук, І. В. (2015). Спосіб культивування фітопланктону (Патент України № 101103). Державна служба інтелектуальної власності України.
11. Марченко, М. М., Чебан, Л. М., Гринько, О. Е., Худий, О. І., Кушнірик, О. В., Худа, Л. В., & Дорош, І. В. (2017). Спосіб вирощування *Daphnia magna* (Straus, 1820) сумісно з кормовим субстратом (мікродоростями) (Патент України № 121772). Міністерство економічного розвитку і торгівлі України.
12. Дорош, І. В. & Чебан, Л. М. (2021). Дослідження можливості використання препарату Дон-1R для отримання кормової біомаси зелених водоростей. (Тези доповіді). *XV Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття»*, 23 квітня 2021 року, Київ, 36.
13. Чебан, Л. М., Дорош, І. В. & Ситник, М. Б. (2018). Вигодовування *Daphnia magna* (Straus, 1820) каротинвмісною біомасою *Desmodesmus* sp. (Тези доповіді). *Міжнародна науково-практична конференція «Екологічні проблеми навколишнього середовища та раціонального природокористування в контексті сталого розвитку»*, 25-26 жовтня 2018 року, Херсон, 520–524.
14. Дорош, І. В., Чебан, Л. М., & Ситник, М. Б. (2018). Вплив глюкози і ацетату натрію на продуктивність та каротиногенез *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegen. (Тези доповіді). *I Міжнародна науково-практична*

конференція «Сучасні проблеми раціонального використання водних біоресурсів», 15-17 травня 2018 року, Київ, 102–104.

15. Маліщук, І. В., & Марченко, М. М. (2017). Зміни активності каталази, пероксидази та цитохром оксидази *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew за індукції каротиногенезу. (Тези доповіді). *Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 20-річчю заснування наукового фахового видання України «Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія Біологія»*, 20-22 квітня 2017 року, Тернопіль, 202-205.

16. Маліщук, І. В. & Чебан, Л. М. (2016). Індукція вторинного каротиногенезу у *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew в умовах двостадійного культивування. (Тези доповіді). *Актуальні проблеми біохімії та біотехнології. Тези доповідей конференції-конкурсу молодих учених*, 26-27 травня 2016 року, Київ, 33.

17. Маліщук, І. В., Чебан, Л. М. & Гринько, О. Е. (2016). Видовий склад фітопланктону річки Дністер. (Збірник тез). *Біотехнологія: звершення та надії: Збірник тез V Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених*, 12-13 травня 2016 року, Київ, 204.

18. Маліщук, І. В., Гринько, О. Е., & Чебан, Л. М. (2015). Амінокислотний склад *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew, культивованого на скидній воді із рибоводної установки замкнутого водопостачання. (Збірник тез). *«Біотехнологія XXI століття»: Тези доповідей IX Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 170-річчю від дня народження Іллі Мечникова*, 24 квітня 2015 року, Київ, 63.

19. Маліщук, І. В., Ситник, М. Б., & Чебан, Л. М. (2015). Хлорофіли та каротиноїди *Chlorella vulgaris* Beijerinck при культивуванні на скидній воді із УЗВ. (Збірник тез). *Біотехнологія: звершення та надії: Збірник тез IV Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених*, 21-22 травня 2015 року, Київ, 150.

РОЗДІЛ 4.
КОМП'ЮТЕРНЕ І МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ
БІОПРОДУКТИВНОСТІ МІКРОВОДОРОСТЕЙ *D. ARMATUS* ТА *A. DIMORPHUS*

4.1. Математичне моделювання процесу накопичення біомаси та каротиноїдів мікроводоростями

Побудова та аналіз математичної моделі. Проведені лабораторні дослідження показали, що попередньо розроблені схеми культивування культур *D. armatus* та *A. dimorphus* дозволяють отримати біомасу з високими продуктивними характеристиками. В той же час, такі експериментальні дослідження динаміки процесу культивування мікроводоростей є ресурсо- та часозатратними. Тому актуальною є робота над побудовою математичних моделей, які можуть спрогнозувати перебіг експериментів при різних значеннях параметрів, зокрема таких, які могли б описати динаміку накопичення біомаси, цільових продуктів, витрати субстрату, тощо.

Процес культивування зелених мікроводоростей показано на схемі (рис. 4.1):



Рис. 4.1. Схема процесу культивування мікроводоростей

Ефективність культивування біомаси зелених мікроводоростей залежить як від вхідних параметрів (концентрація лімітуючого субстрату (S),

кількість внесеної біомаси (C)), так і від внутрішніх параметрів [165]. При розробці математичної моделі накопичення каротиноїдів як цільового продукту в біомасі зелених мікроводоростей були враховані наступні аспекти:

1. Температура та освітлення в культиваційній кімнаті були постійними та оптимальними для розвитку й продуктивності досліджуваних видів мікроводоростей.

2. Рівень рН та гідродинамічний режим у робочому об'ємі були рівномірними та стабільними.

3. Культура була належним чином забезпечена іншими компонентами живильного середовища для нормального розвитку, які не впливали на результати досліджень.

4. У моделюванні процесу не враховувався вік клітин.

Проведені нами експериментальні дослідження дозволили обчислити значення коефіцієнтів, які входять у розглянуті нижче рівняння.

Закономірності накопичення біомаси. При безперервному перемішуванні культиваційних сумішей вважаємо, що весь об'єм культиватора заповнений однорідно, а концентрації клітин та субстрату в кожній точці культиватора однакові.

У наших дослідженнях ми розглядаємо культиватор як динамічну систему, в якій об'єм субстрату та кількість клітин мікроводоростей змінюються залежно від початкової кількості введеного субстрату та кількості біомаси. Саме періодичне культивування мікроводоростей, при якому можливий порційний збір біомаси, дає можливість збагачення цієї біомаси певними корисними нутрієнтами. Тому надалі розглянемо математичні закономірності саме для процесів накопичення каротиноїдів при періодичному культивуванні.

Характер залежності накопичення біомаси мікроводоростей під час періодичного культивування може бути описаний у контексті кількох ключових факторів та їх взаємодії [163]:

1. *Фаза росту.* Це період ініціації росту, під час якого вводяться необхідні компоненти для життєдіяльності мікрободоростей. У цей період відбувається інтенсивне нарощення біомаси, оскільки мікрободорості активно розмножуються, і збільшується чисельність їх клітин.

2. *Стабілізація росту.* Пізніше під час зростання концентрації клітин спостерігаємо стабілізацію росту культури. Це можна пояснити обмеженням деяких ресурсів, зокрема доступу до поживних речовин або світла.

3. *Стадія накопичення біомаси.* Це період активного нагромадження клітинної маси. В цей час може бути здійснено оптимальне збагачення біомаси поживними речовинами чи здійснено інші маніпуляції для підвищення концентрації цільових сполук.

4. *Момент збору.* Час збору біомаси визначається за показниками оптимальної концентрації клітин чи накопичення корисних продуктів. У цей період очікується максимальний вихід продукту чи корисної біомаси.

Ефективність даного процесу залежить від взаємодії різноманітних фізичних, хімічних і фізіологічних факторів під час періодичного культивування, які можна узагальнити за допомогою системи диференціальних рівнянь. Аналіз цих взаємодій є ключовим для ефективного управління процесом культивування та досягнення максимального виходу біомаси з певними характеристиками. Важливо зауважити, що всі наступні моделювання та розрахунки виконуються для одного періоду культивування - від моменту внесення індуктора до збору біомаси.

Найпростіші залежності збільшення кількості біомаси мікрободоростей від часу культивування описують наступним диференціальним рівнянням:

$$\frac{dC}{dt} = \mu C - \bar{\mu} C, \quad (4.1)$$

де: μ – питома швидкість накопичення біомаси (залежить від умов культивування та фізіологічних властивостей культури), $\bar{\mu}$ – питома швидкість відмирання біомаси.

Під час проведення експериментальних досліджень прослідковувалися чіткі межі між фазами росту досліджуваних культур. Можна чітко відрізнити 3 фази росту культур: експоненціальну (0-3 доба), лінійну (3-6 доба), а також фазу повільного росту (6-9 доба) (табл 4.1).

Таблиця 4.1

Математичні моделі росту культур мікроводоростей

<i>Фаза росту</i>	<i>Питома швидкість, μ</i>
Експоненціальна	$\mu = \mu_m$
Лінійна	$\mu = P_m/V$
Стаціонарна	$\mu = 0$

Найпростіші математичні моделі, які описують ріст культур досліджуваних мікроводоростей за фазами, розглядав Тренкеншу [177]. Вони показані у таблиці (таб. 4.1).

Проведені попередньо експериментальні дослідження дозволили обчислити усереднені по всіх періодах росту величини питомої швидкості росту (μ) досліджуваних культур мікроводоростей у кожному варіанті експерименту (табл. 4.2).

Таблиця 4.2

Усереднені по всіх фазах величини питомої швидкості росту (μ) досліджуваних культур мікроводоростей

<i>Концентрація субстрату</i>	<i>Швидкість росту культури (μ) для <i>D.armatus</i></i>	<i>Швидкість росту культури (μ) для <i>A. dimorphus</i></i>
Контроль (без субстрату)	0,87	0,71
25 мМ	0,85	0,65
50 мМ	0,55	0,59
100 мМ	0,26	0,31
200 мМ	0,084	0,090

При опрацюванні даних вирощування досліджуваних культур при різних початкових значеннях субстрату було показано, що процес інгібування росту біомаси підвищеними концентраціями субстрату можна описати рівнянням Бергтера (4.2) [95]:

$$\mu = \mu_m \frac{1}{1 + S / K_{CS}}, \quad (4.2)$$

де: K_{CS} – константа інгібування росту біомаси субстратом, S – концентрація субстрату, μ_m – питома швидкість накопичення біомаси, яка визначається фізіологічними особливостями культури, а також умовами культивування.

Для культури *D. armatus* встановлено такі значення коефіцієнтів: $\mu_m = 0,87$, $K_{CS} = 1200$. Для культури *A. dimorphus*: $\mu_m = 0,79$, $K_{CS} = 1010$.

Протягом усього терміну культивування проводилися заміри рН та температури середовища, і ці значення залишалися сталими протягом усього терміну культивування. Тому залежності швидкості нарощення біомаси та синтезу цільового продукту від даних параметрів ми не розглядали.

Якщо в дослідах використовувати стимулюючий субстрат, то залежність коефіцієнта μ від концентрації субстрату S описує модель Порта [96] наступним рівнянням:

$$\mu = \mu_m \frac{K_{CS}}{K_S + K_{CS}}, \quad (4.3)$$

де: K_S – гранично допустиме значення концентрації стимулюючого субстрату.

Дана модель враховує також, що при збільшенні щільності культури інтенсифікується міжклітинна конкуренція та відбувається відмирання клітин. Поки живильне середовище свіже, всі необхідні для росту й розвитку культур поживні речовини є в достатній кількості, відмирання мінімальне або низьке. Однак у результаті виснаження живильного середовища та нагромадження продуктів метаболічних процесів швидкість відмирання біомаси зростає.

Питома швидкість дисиміляції біомаси залежить від концентрації продуктів, що інгібують метаболізм. Такі процеси описував Рамкришна [106]:

$$\bar{\mu} = kP. \quad (4.4)$$

Значення коефіцієнту $\bar{\mu}$ для культури *D. armatus* було обраховано на рівні 0,843 для *A. dimorphus* відповідно 0,954.

Рівняння, яке описує динаміку накопичення біомаси в експерименті з інгібуючим субстратом, має наступний вигляд:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{\mu_m}{1 + S / K_{CS}} C - \bar{\mu}C. \quad (4.5)$$

Використання закономірностей для стимулюючого субстрату змінює рівняння до наступного вигляду:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{\mu_m K_{CS}}{K_S + K_{CS}} C - \bar{\mu}C. \quad (4.6)$$

Найкращим режимом культивування є такий, при якому отримуємо максимальні значення питомого приросту μ та густини біомаси. Це свідчить про високу ефективність проходження процесу культивування.

Закономірності біосинтезу продукту. Процес збільшення кількості каротиноїдів відбувається паралельно з накопиченням біомаси. Таку залежність описуємо рівнянням:

$$\frac{dP}{dt} = q_p C - \bar{q}_p, \quad (4.7)$$

де q_p – питома швидкість накопичення продукту, \bar{q}_p – швидкість деградації продукту в процесі культивування. Це сталі величини. Для кожної культури мікрководоростей ми обчислювали їх індивідуально.

Субстрат NaCl пригнічує нарощення біомаси як у культурі *D. armatus*, так і в культурі *A. dimorphus*. Проте внесення даної сполуки у середовище є виправданим через те, що вона позитивно впливає на накопичення продукту.

Тому, коли ми описуємо процес накопичення цільового продукту, вважаємо, що субстрат є не інгібуючим, а стимулюючим.

Оскільки такий субстрат сприяє активному накопиченню продукту лише до певних значень, ми розглянули модель Порта [96] для стимулюючого субстрату:

$$q_p = \frac{q_1 S}{K_s + S}. \quad (4.8)$$

У рівнянні q_1 – рівень впливу субстрату на швидкість накопичення продукту. Така модель підходить для наших експериментальних висновків, оскільки описує випадок, коли значення кількості продукту збільшуються тільки до певних лімітуючих показників.

У процесі культивування незначна частина цільового продукту використовується також для підтримки життєдіяльності культури. Тому розглянемо показник $\overline{q_p}$, який позначає загальну швидкість деградації продукту.

$$\overline{q_p} = kPC, \quad (4.9)$$

Як видно з рівняння, даний коефіцієнт залежить від багатьох факторів, зокрема від кількості наявної біомаси у середовищі, швидкості біосинтезу продукту та концентрації субстрату. Тому слід розглядати вплив цих факторів комплексно. В результаті, загальне рівняння балансу продукту має наступний вигляд:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{q_1 S}{K_s + S} C - kPC. \quad (4.10)$$

Із експериментальних даних було отримано наступні значення для *D. armatus*: $q_1 = 1.6, K_s = 1, k = 0.028$ та для *A. dimorphus*: $q_1 = 1.8, K_s = 1, k = 0.032$.

Часом для створення повноцінної моделі необхідно враховувати не лише зовнішні чинники. Проте врахування внутрішньоклітинних факторів

може бути досить складним: їх вимірювання та встановлення їхніх кінетичних параметрів часто вимагає значних зусиль.

Закономірності витрат субстрату. Для досягнення «матеріального балансу» розглянемо рівняння витрат субстрату на процеси росту культур, біосинтезу продуктів метаболізму та забезпечення життєдіяльності культур.

Стимулюючі субстрати, такі як ацетат натрію та глюкоза, відіграють ключову роль у вирощуванні культур мікрободоростей. Вони є джерелом вуглеводів та енергії для мікрободоростей, що сприяє активному росту та розвитку останніх. Важливо забезпечити оптимальні умови, такі як належне освітлення, температурний режим та рН середовища, для максимальної ефективності використання цих субстратів у процесі культивування мікрободоростей [68].

Інгібуючі субстрати - це речовини, які мають здатність гальмувати або припиняти ріст та розвиток мікрободоростей. Інгібуючі субстрати можуть змінювати хімічний склад середовища культивування, концентрації необхідних поживних речовин, впливати на фізіологічні процеси водоростей. У той же час, інгібуючі субстрати можуть стимулювати синтез таких продуктів метаболізму, високої кількості яких при звичайних умовах культивування досягти неможливо [68, 106].

Від цілей культивування та особливостей культур мікрободоростей залежить вибір відповідного типу субстрату.

Якщо з метою збільшення рівня каротиноїдів використовуємо стимулюючий субстрат (глюкозу, ацетат натрію), рівняння зменшення субстрату в процесі культивування матиме вигляд:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{CS}} \mu_m C + \frac{1}{Y_{PS}} q_p C. \quad (4.11)$$

У рівнянні 4.11:

Y_{CS} - коефіцієнт затрат субстрату на нарощення біомаси;

Y_{PS} - коефіцієнт затрат субстрату на синтез цільового продукту.

Математична модель балансу вирощування мікрободоростей, збагачених каротиноїдами при попередньому внесенні у середовище стимулюючого субстрату, в загальному випадку описується системою рівнянь:

$$\begin{aligned}\frac{dC}{dt} &= \frac{\mu_m K_{CS}}{K_S + K_{CS}} C - \bar{\mu} C. \\ \frac{dP}{dt} &= \frac{q_1 S}{K_S + S} C - k_P C. \\ -\frac{dS}{dt} &= \left(\frac{\mu_m}{Y_{CS}} + \frac{q_P}{Y_{PS}} \right) C.\end{aligned}\tag{4.12}$$

Розв'язок такої системи дозволить знаходити зміну з часом усіх основних параметрів даного біотехнологічного процесу, коли відомі початкові умови культивування.

У випадку використання інгібуючого субстрату ріст культур буде пригнічуватися, а його вплив у процесі культивування буде спрямований тільки на синтез цільового продукту. При складанні математичної моделі такі закономірності було враховано у рівняннях, які описують процеси накопичення біомаси та біосинтезу продукту. Оскільки NaCl – це неенергетичний субстрат, його затрат у процесі культивування не відбувається, хоч він має безпосередній вплив на зміни кількісних характеристик ключових показників продуктивності. В такому випадку коефіцієнти $Y_{CS} = Y_{PS} = 0$ [157].

Математична модель для інгібуючого субстрату має наступний вигляд:

$$\begin{aligned}\frac{dC}{dt} &= \frac{\mu_m K_{CS}}{K_S + K_{CS}} C - \bar{\mu} C. \\ \frac{dP}{dt} &= \frac{q_1 S}{K_S + S} C - k_P C. \\ -\frac{dS}{dt} &= 0.\end{aligned}\tag{4.13}$$

Отже, такі математичні моделі біотехнологічних процесів біосинтезу каротиноїдів та біомаси в досліджуваних культурах *D. armatus* та *A. dimorphus* складаються з рівнянь, розв'язання яких дасть можливість побачити наочну динаміку всіх основних параметрів даного процесу, а також дозволить підібрати параметри для досягнення оптимальних значень кінцевого цільового продукту.

4.2. Комп'ютерне моделювання процесу накопичення біомаси та каротиноїдів мікрободоростями

Розв'язання математичних моделей, що описують процеси накопичення каротиноїдів та біомаси у вигляді систем диференціальних рівнянь (4.12, 4.13) із врахуванням коефіцієнтів, отриманих на основі експериментальних даних для досліджуваних культур мікрободоростей, було здійснено в програмному середовищі Wolfram Mathematica. У нашій роботі для моделювання та аналізу системи диференціальних рівнянь з параметрами використовується функція `Parametric NDSolveValue`. Ця функція дає змогу чисельно розв'язати систему, що описує динаміку змін концентрацій біомаси, каротиноїдів та субстрату залежно від часу. Параметри системи передаються як аргументи функції [35, 213].

Результати розв'язку математичної моделі в середовищі Wolfram Mathematica представлено на графіку (рис. 4.2). Так, у наших дослідженнях, при візуалізації моделі з інгібуючим субстратом (NaCl), графік має відповідну динамічну поведінку.

Результати, отримані при моделюванні процесу накопичення каротиноїдів та біомаси в культурі *D. armatus* корелюють з експериментальними даними. Для візуалізації моделювання процесу накопичення каротиноїдів та біомаси в культурі *A. dimorphus* ми змінюємо лише значення коефіцієнтів у програмі, зазначаючи ті, які ми отримали в результаті експериментальних досліджень для даної культури, оскільки математичні закономірності для обох культур однакові.

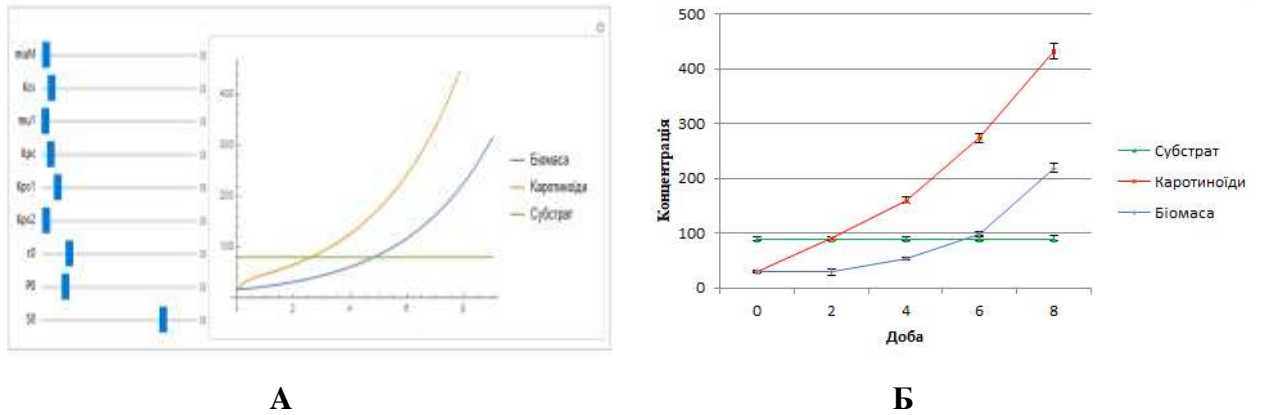


Рис. 4.2. Графік поведінки системи при використанні інгібуючого субстрату (візуалізація роботи програми (А) і експериментальних даних (Б) для культури *D. armatus*)

Результати числових експериментів підтверджують, що оскільки NaCl – це неенергетичний субстрат, його затрат у процесі культивування не відбувається, хоч він має безпосередній вплив на зміни кількісних характеристик ключових показників продуктивності.

У розробленій в роботі прикладній програмі передбачено набір маніпуляторів, які дозволяють простежити зміни динаміки поведінки математичної моделі при зміні будь-якого з параметрів, наприклад, початкової кількості біомаси, субстрату тощо. Проведені числові експерименти вказують, що при збільшенні початкової концентрації субстрату швидкість росту біомаси зменшується, а швидкість накопичення продукту збільшується до певної межі. Такі ж дані ми отримуємо візуально в середовищі Wolfram Mathematica

Оскільки середовище Wolfram Mathematica є платним і потребує фінансових витрат на купівлю ліцензії, то було також розроблено безкоштовний програмний продукт мовою програмування Python, який використовує графічний інтерфейс для інтерактивного моделювання та візуалізації динаміки поведінки біологічної системи.

Python – це об'єктно-орієнтована, інтерпретована високорівнева мова програмування, яка є зручною для швидкої розробки додатків. Python

використовує пакети, що сприяє модульності програм і повторному використанню коду.

Основними перевагами Python є [185]:

- проста структура та чітко визначений синтаксис, що дозволяє швидко розробляти прикладні програми;
- наявність великої кількості стандартних бібліотек, які сумісні між платформами Linux, Windows і macOS;
- забезпечення інтерактивного режиму, що дозволяє проводити тестування та налагодження окремих фрагментів коду;
- можливість розширення, легко можна додавати модулі низького рівня до інтерпретатора Python;
- можливість створення додатків із графічним інтерфейсом.

При написанні програмного продукту було створено 4 візуальні вікна:

- вибір математичної моделі;
- візуалізація математичної моделі при дії стимулюючого субстрату;
- візуалізація математичної моделі при дії інгібуючого субстрату;
- довідка.

Додаток підтримує українську та англійську мови.

Даний програмний продукт написаний мовою програмування Python із використанням бібліотеки `tkinter` для створення графічного інтерфейсу користувача. Крім цього, було використано модулі `os` та `subprocess` для взаємодії з операційною системою та виклику зовнішніх команд, відповідно.

Основний блок коду містить ініціалізацію головного вікна, створення об'єкта програми та запуск головного циклу обробки подій `tkinter`.

При написанні коду для візуалізації даних використано різноманітні бібліотеки та функції мови програмування Python для розв'язання систем диференціальних рівнянь та відображення графіків.

Бібліотека `NumPy` використовується для зручної обробки масивів числових даних та проведення математичних операцій. Бібліотека `SciPy`

включає в себе функцію `solve_ivp`, яка застосовується для чисельного розв'язання систем диференціальних рівнянь. `Matplotlib` використовується для створення графіків та візуалізації результатів наукового дослідження [185].

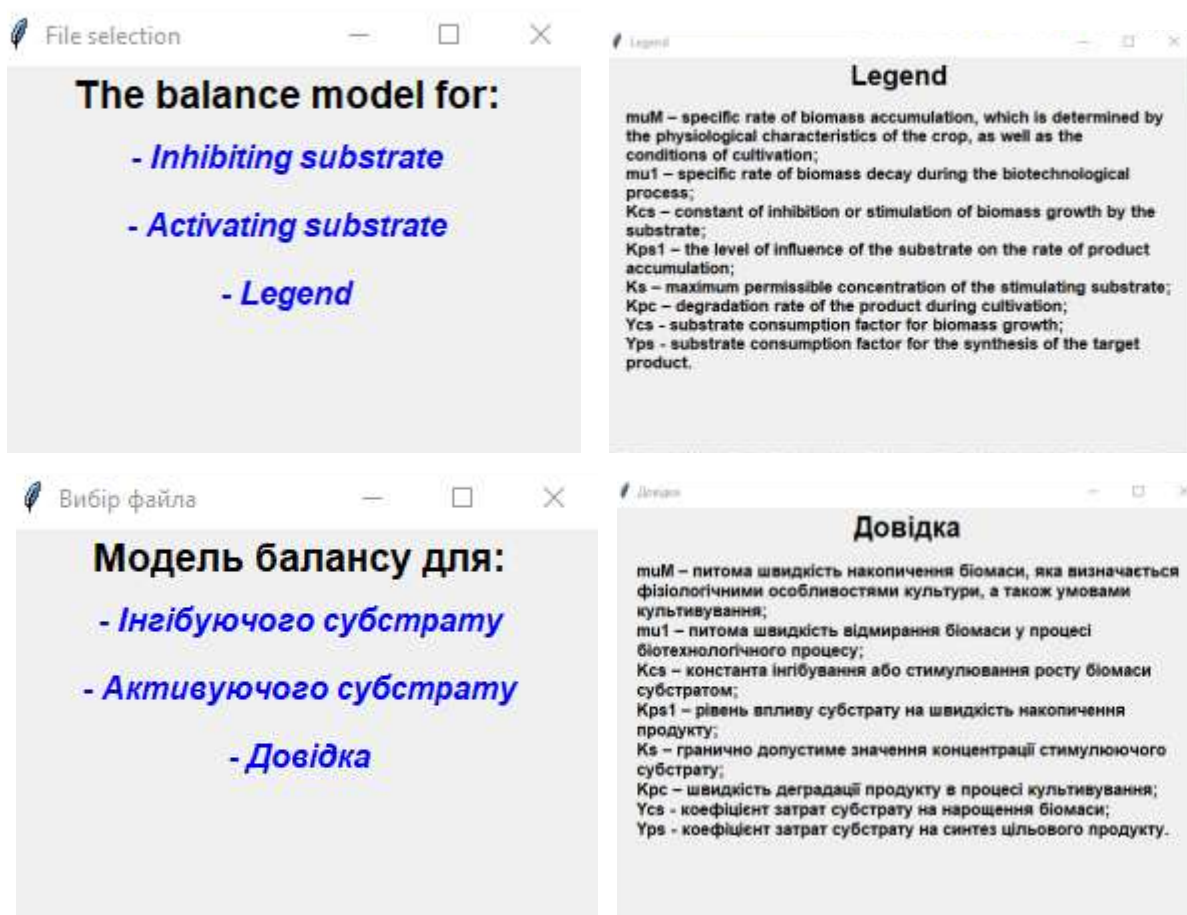


Рис. 4.3. Вікна вибору математичної моделі та довідки

`Tkinter`, яка є стандартною бібліотекою для створення графічного інтерфейсу в `Python`, використовується для розробки користувацького інтерфейсу програми. Клас `GUI` відповідає за відображення та організацію елементів інтерфейсу. Функції `update_plot` та `update_from_entry` служать для динамічного оновлення графіків і параметрів відповідно, що робить можливою інтерактивну взаємодію користувача з програмою.

Зазначений додаток розв'язує систему диференціальних рівнянь, використовуючи чисельні методи для знаходження розв'язку. Крім того,

користувацький інтерфейс дозволяє змінювати параметри системи та спостерігати за впливом цих змін на поведінку системи через графічне відображення в реальному часі. Такий підхід дозволяє легко визначати та аналізувати динаміку системи відповідно до змін параметрів, що є важливим у наукових дослідженнях.

Функція `parametric_ndsolve_value` знаходить числовий розв'язок системи диференціальних рівнянь.

Метод `GUI.__init__(self, master)` є конструктором класу `GUI`, який визначає та ініціалізує елементи інтерфейсу, включаючи мітки, маніпулятори, текстові поля та кнопки.

Метод `update_plot(self, *_)` відповідає за оновлення графіку при зміні значень маніпуляторів. Це важливо для відображення динаміки системи при змінах параметрів у режимі реального часу.

Метод `update_from_entry(self)` оновлює значення маніпуляторів та графіків відповідно до введених користувачем значень у текстових полях.

Метод `plot_solutions(self)` будує графік розв'язку системи диференціальних рівнянь із вказаними параметрами.

Також у коді створено клас `TooltipLabel`, який є розширенням стандартного елемента інтерфейсу `Tkinter Label`. Цей клас дозволяє відображати підказки (`tooltip`) при наведенні мишею на елемент інтерфейсу. Методи цього класу відповідають за відображення та приховування підказок [221].

Прикладна програма містить набір маніпуляторів, за допомогою яких користувач може експериментувати з параметрами моделі. Слайдери для кожного параметра дають можливість швидко та зручно змінювати їхні значення, спостерігаючи за впливом на результати. Користувач також може вводити точні значення параметрів у відповідних текстових полях.

Результати роботи даного програмного продукту корелюють із експериментальними даними, а також із результатами роботи програмного продукту в середовищі `Wolfram Mathematica`. Зокрема показано, що при

внесенні в систему культивування активуючого субстрату кількість каротиноїдів та біомаси *A. dimorphus* на 8 день експерименту збільшується вдвічі порівняно з 6 добою.

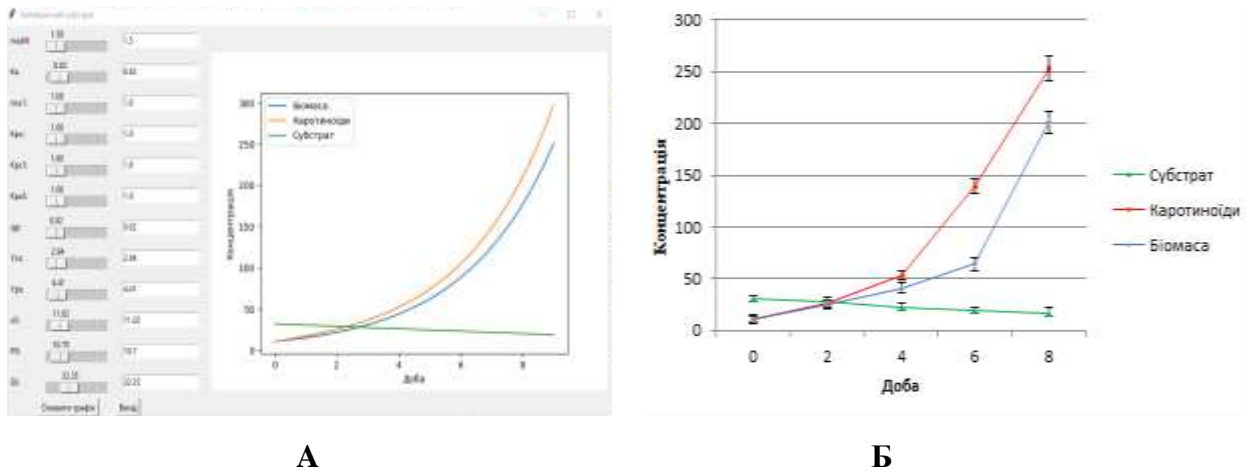


Рис 4.4. Візуалізація математичної моделі у програмі при дії стимулюючого субстрату (А) та експериментальних даних (Б) для культури *A. dimorphus*

Аналогічну закономірність спостерігаємо і при роботі з даними, отриманими в ході експериментальних досліджень.

Результати моделювання з наступною візуалізацією дозволяють зробити висновок, що при внесенні в систему культивування культури *D. armatus* NaCl як інгібуючого субстрату кількість каротиноїдів на 8 добу збільшується вдвічі порівняно із значеннями, отриманими за використання активуючого субстрату в цю ж добу культивування (рис. 4.5). Рівень біомаси за таких умов залишається незмінним.

Результати роботи програмного продукту мовою Python відповідають отриманим експериментальним висновкам. При введенні відповідних коефіцієнтів, обчислених експериментально для культури *A. dimorphus*, ми отримаємо аналогічні візуалізації, характерні для даної культури.

Прикладна програма надає зручні інструменти для аналізу та візуалізації отриманих результатів. Вона може бути використана в

лабораторних дослідженнях для оптимізації умов вирощування мікроорганізмів, а також для навчання студентів біотехнологічних напрямків.

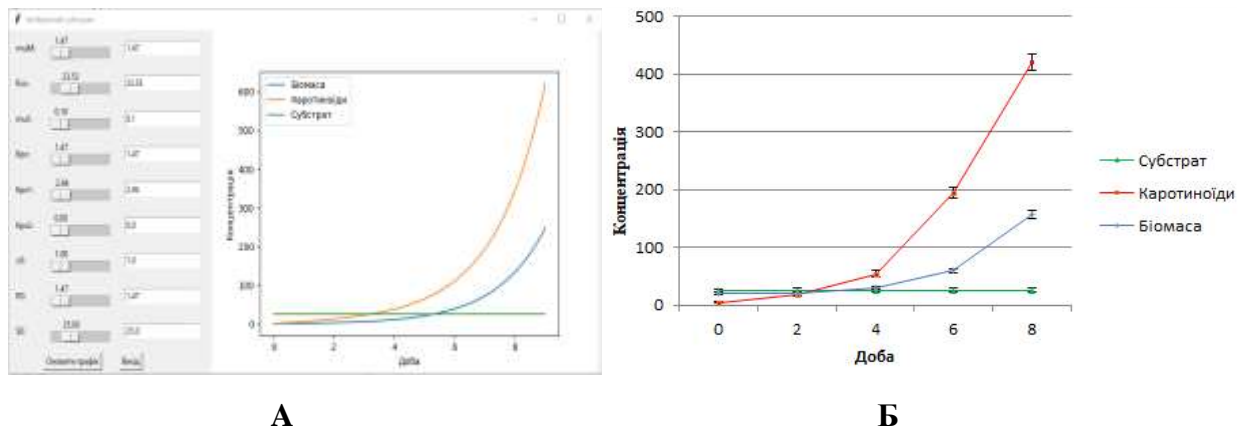


Рис 4.5. Візуалізація математичної моделі у програмі при дії інгібуючого субстрату (А) та експериментальних даних (Б) для культури *D. armatus*

Даний програмний продукт дозволяє дослідникам ефективно впроваджувати нові ідеї, проводити віртуальні експерименти та робити інформативні висновки, спираючись на точні й попередньо визначені модельні дані. Він є корисним інструментом для вдосконалення процесів рибозведення та підвищення ефективності використання мікроводоростей у цій галузі.

Розроблена прикладна програма відкриває можливості для глибшого розуміння біопроектів та їх оптимізації, що робить її корисною для дослідників, фахівців з рибозведення та спеціалістів у галузі біотехнології.

Інструкція використання розробленого програмного продукту.

Програма надає користувачеві можливість вибору математичної моделі, а також перегляду візуалізації результатів. Головні функціональні можливості:

1. *Вибір математичної моделі.* Користувач може обрати одну з наявних математичних моделей для дослідження, а саме модель з активуючим (стимулюючим) субстратом або інгібуючим.

2. *Візуалізація при дії активуючого субстрату*: Після вибору даної моделі користувач може переглядати візуалізацію реакції системи при дії стимулюючого субстрату. Вікно з графіками дозволяє в режимі реального часу спостерігати зміни в системі.

3. *Візуалізація при дії інгібуючого субстрату*. Аналогічно, користувач може вивчити вплив інгібуючого субстрату на систему, переглядаючи візуалізацію. Це дозволяє порівнювати реакції системи при різних параметрах.

4. *Маніпулятори для підбору параметрів*. Програма містить набір маніпуляторів, за допомогою яких користувач може експериментувати з параметрами моделі. Слайдери для кожного параметра дають можливість швидко та зручно змінювати їхні значення і спостерігати за впливом на поведінку системи.

5. *Введення коефіцієнтів вручну*. За потреби, користувач може вводити значення коефіцієнтів вручну у відповідні текстові поля. Це дає більший контроль та можливість вводити точні значення.

Отже, розроблений програмний продукт дозволяє користувачеві не лише моделювати поведінку біологічної системи в різних умовах, але й вивчати вплив різних параметрів на результати. Інтерактивний інтерфейс робить процес моделювання динаміки біологічної системи зручним навіть для фахівців без відповідної математичної освіти.

Результати досліджень, описані у Розділі 4, опубліковані у наступних статтях та тезах:

1. Dorosh, A., Dorosh, I., Cherevko, M., Marchenko, M., & Cheban, L. (2024). Mathematical modeling of biomass and carotenoid accumulation in microalgae. *2024 14th International Conference on Advanced Computer Information Technologies (ACIT)*, 36–39.

2. Дорош, А. Б., Дорош, І. В., & Перцов, А. С. (2024). Моделювання динаміки накопичення біомаси та каротиноїдів у мікрководоростях. *Тези 10-ї Міжнародної наукової конференції «Сучасні проблеми математичного моделювання, прогнозування та оптимізації» пам'яті почесного професора Кам'янець-Подільського національного університету імені Івана Огієнка, д.т.н., професора, почесного академіка НАПНУ Анатолія Федоровича Верланя, Кам'янець-Подільський, 84–85.*

УЗАГАЛЬНЕННЯ

З метою розширення кормової бази для нижчих ракоподібних та личинок риб ми попередньо провели скринінг перспективних видів фітопланктону річки Дністер. Було встановлено, що однією з основних груп альгофлори досліджуваних ділянок річки Дністер є зелені мікроводорості, зокрема протококові. Згідно результатів здійснених досліджень було зроблено висновок, що саме вони складають основну частку у формуванні кормової бази цієї водойми.

Для зниження вартості технології культивування досліджуваних мікроводоростей *D. armatus* та *A. dimorphus* ми використали скидну воду з установки замкнутого водопостачання (УЗВ) як живильне середовище. Біомаса досліджуваних культур мікроводоростей на скидній воді з УЗВ та на контрольному середовищі змінювалася залежно від тривалості культивування і досягала максимального значення на 40-у добу.

Досліджено, що клітинна маса протококових водоростей, вирощених на скидній воді з УЗВ, містить достатню кількість основних нутрієнтів, що дозволяє використовувати їх як кормовий об'єкт. Було показано, що скидну воду з УЗВ можна використовувати для культивування фітопланктону, не знижуючи продуктивності досліджуваних культур гідробіонтів та їхньої поживної цінності.

Для підвищення продуктивності культур застосували комплексний препарат органічного походження. Для дослідження цього препарату було обрано 4 різні концентрації. У культурах *D. armatus* та *A. dimorphus* при всіх досліджуваних дозах кількість біомаси була вищою, ніж у контрольних зразках на всіх етапах експерименту.

Було встановлено, що комплекс органічних кислот у складі препарату служить додатковим джерелом субстратів для посиленого синтезу жирних кислот, а також забезпечує клітини енергією. При внесенні препарату з концентрацією $8,4 \cdot 10^{-1}$ мкл/л у середовище метаболізм водоростей активізується в напрямку синтезу амінокислот і ліпідів, причому додавання

даного препарату не викликає стресу в клітинах, що підтверджується низькою активністю відповідних ферментів. Однак очікуване збільшення вмісту каротиноїдів не спостерігалось, що вказує на необхідність проведення експериментів з індукторами каротиногенезу.

Під час розробки схем індукції вторинного каротиногенезу на скидній воді з УЗВ ми застосували класичну двофазну схему накопичувального культивування й адаптували її для підвищення виходу вторинних каротиноїдів у культурах *D. armatus* та *A. dimorphus*. На першій фазі культивування інокулят вихідної культури було внесено у свіже живильне середовище, яким служила скидна вода з УЗВ. Це дозволило отримати активно ростучі культури з високими показниками загальних білків, ліпідів та сумарних каротиноїдів. До кінця першої фази культивування спостерігалось швидке зростання біомаси обох культур, зокрема до 13 г/л та 12,5 г/л відповідно.

У біомасі *D. armatus* було виявлено 8 фракцій каротиноїдів. Серед них були знайдені первинні каротини, такі як зеаксантин, лютеїн та β -каротин. Крім цього, було виявлено невелику кількість астаксантину, кантаксантину, а також ефірів адоніксантину та астаксантину. Біомаса *A. dimorphus* мала подібний розподіл каротиноїдів.

Перехід культури до другої фази стимулювали шляхом додавання до живильного середовища попередників біосинтезу каротиноїдів ($C_6H_{12}O_6$, CH_3COONa), промоторів вільнорадикального окислення ($FeSO_4/H_2O_2$) або осмотичного стресу ($NaCl$). При цьому відстежували фізіологічний стан та ростову активність культур. Додавання $FeSO_4/H_2O_2$ та $NaCl$ призводило до пригнічення ростової активності обох культур.

Було показано, що зміни в складі живильного середовища впливають як на якісний склад каротиноїдів, так і на їх кількісні характеристики. Відзначалося зменшення вмісту первинних каротиноїдів та збільшення частки вторинних каротиноїдів. Використання промоторів вільнорадикального окислення ($Fe^{2+} + H_2O_2$) й осмотичного стресу ($NaCl$)

призводило до збільшення частки β -каротину та астаксантину. Так, при застосуванні NaCl та $\text{FeSO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ вміст β -каротину збільшувався паралельно із вмістом вторинних каротиноїдів. Накопичення біомаси під час каротиногенезу в досліджуваних культурах відбувалося головним чином за рахунок збільшення вмісту ліпідів.

При цьому, поряд з активацією каротиногенезу, відбувався перерозподіл основних нутрієнтів та накопичення ліпідів, що не впливає на кормову цінність досліджуваної біомаси. На фоні морфологічних змін і зниження ростової активності культури, внаслідок додавання індукторів каротиногенезу, спостерігалось зниження цитохромоксидазної активності як показника метаболічної активності культури. Крім того, було встановлено, що за таких умов активуються антиоксидантні системи на фоні посиленого каротиногенезу.

Отже, була показана можливість збільшення в біомасі мікрводоростей *A. dimorphus* та *D. armatus* вмісту цінних для аквакультури риб і ракоподібних β -каротину та астаксантину шляхом внесення у скидну воду з УЗВ промоторів вільнорадикального окислення й осмотичного стресу NaCl (200 мМ) чи Fe^{2+} (200 мМ) з H_2O_2 (10^{-4} мМ) на другій фазі культивування.

Було досліджено вплив протококових мікрводоростей як харчового субстрату на ріст популяцій *Daphnia magna*, *Semiocephalus vetulus* та *Moina macroscopa* в лабораторних умовах. Мета дослідження – отримати дані, які допоможуть визначити технологічні параметри для виробництва живих кормів на основі цих організмів.

Для спільного культивування були сформовані три групи:

- 1) одночасне введення зоопланктону і фітопланктону;
- 2) введення зоопланктону через три дні після фітопланктону;
- 3) введення зоопланктону через шість днів після фітопланктону.

Біомаса зоопланктону, який отримувалася як кормовий субстрат дріжджі, характеризувалася найнижчим вмістом загального білка (на рівні 47–49%) в

усіх експериментах. У той же час, найвищих значень даний показник сягав у схемах одночасного заселення фіто- і зоопланктону.

Найбільший вміст ліпідів спостерігався в біомасі зоопланктону, який вирощувався на дріжджах. При порційному внесенні водоростей вміст ліпідів був найнижчим. Цей показник мав тенденцію до збільшення з відтермінуванням введення фітопланктону. В схемах годування зоопланктону дріжджами вміст каротиноїдів був найнижчим, а в схемах годування фітопланктоном цей показник був значно вищим.

Крім того, дослідження показало, що кількість з'їдених клітин водоростей збільшується пропорційно до кількості зоопланктону в середовищі. При одночасному заселенні зоо- і фітопланктону концентрація клітин водоростей залишається низькою через постійне поїдання, що стимулює збільшення швидкості їх споживання. При малій щільності заселення (25 особин на 500 мл) у середовище з культурою мікрководоростей, що активно розмножується, швидкість поїдання водоростей була дуже низькою. Ймовірно, це пов'язано з переповненням шлунково-кишкового тракту та засміченням фільтрувального апарату через надлишок корму.

Тому на наступному етапі ми апробували схеми, які включали попередню корекцію нутрієнтного складу мікрководоростей *D. armatus* та *A. dimorphus* шляхом активізації каротиногенезу останніх. Як показано нами раніше, кращі показники нутрієнтного вмісту мікрководоростей отримані при застосуванні промоторів осмотичного стресу та вільнорадикального окислення, NaCl (200мМ) чи Fe²⁺ (200 мМ) з H₂O₂ (10⁻⁴ мМ) на другій фазі культивування. Отримані таким чином культури вводили у середовище із зоопланктоном за наступними варіантами:

1. Біомасу мікрководоростей, культивованих на скидній воді з УЗВ із додаванням NaCl (200 мМ), вводили в культиваційне середовище разом із зоопланктоном.

2. Біомасу мікроводоростей, культивованих на скидній воді з УЗВ із додаванням Fe^{2+} (200 мМ) та H_2O_2 (10^{-4} мМ), вводили в культиваційне середовище разом із зоопланктоном.

3. Біомасу мікроводоростей, культивованих на скидній воді з УЗВ із додаванням NaCl (200 мМ), вводили в культиваційне середовище із зоопланктоном порційно.

4. Біомасу мікроводоростей, культивованих на скидній воді з УЗВ із додаванням Fe^{2+} (200 мМ) та H_2O_2 (10^{-4} мМ), вводили в культиваційне середовище із зоопланктоном порційно.

Усі випробувані схеми виявилися ефективними. Завдяки цим маніпуляціям ми отримали культури з підвищеним вмістом каротиноїдів, при цьому перерозподіл основних нутрієнтів не знижував поживної цінності кормів.

Експериментальні дослідження динаміки процесу культивування мікроводоростей є витратними за часом і ресурсами. Тому доцільно розробити математичну модель, яка дозволить адекватно описувати динаміку накопичення біомаси, цільових продуктів та витрати субстрату в процесі культивування.

Математична модель біотехнологічного процесу біосинтезу каротиноїдів і біомаси в культурах *D. armatus* та *A. dimorphus* при внесенні стимулюючого субстрату в середовище складається з системи диференціальних рівнянь:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{\mu_m K_{CS}}{K_S + K_{CS}} C - \bar{\mu}C.$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{q_1 S}{K_S + S} C - kPC.$$

$$-\frac{dS}{dt} = \left(\frac{\mu_m}{Y_{CS}} + \frac{q_p}{Y_{PS}} \right) C.$$

Розв'язання такої системи дозволяє визначити зміну з часом усіх основних параметрів даного біотехнологічного.

У випадку використання інгібуючого субстрату NaCl, який не є енергетичним субстратом, коефіцієнти третього рівняння дорівнюють нулю. Також враховано, що витрат індуктора в процесі культивування не відбувається, хоча він має безпосередній вплив на зміни кількісних характеристик ключових показників продуктивності. Тому математична модель для такого субстрату має наступний вигляд:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{\mu_m K_{CS}}{K_S + K_{CS}} C - \bar{\mu}C.$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{q_1 S}{K_S + S} C - kPC.$$

$$-\frac{dS}{dt} = 0.$$

Отже, такі математичні моделі біотехнологічних процесів біосинтезу каротиноїдів і біомаси в культурах *D. armatus* та *A. dimorphus* складаються з диференціальних рівнянь, розв'язання яких дозволяє спрогнозувати динаміку всіх основних параметрів процесу. Це також надає змогу підібрати параметри для досягнення оптимальних значень кількості кінцевого продукту.

У даній роботі комп'ютерне моделювання, яке описує процес накопичення каротиноїдів та біомаси у вигляді систем диференціальних рівнянь з урахуванням коефіцієнтів, отриманих з експериментальних досліджень, було виконано в середовищі Wolfram Mathematica та за допомогою прикладної програми, розробленої мовою програмування Python.

Отримані результати моделювання процесу накопичення каротиноїдів і біомаси в культурах *D. armatus* та *A. dimorphus* відповідають експериментальним даним.

Прикладна програма містить набір інструментів, за допомогою яких користувач може змінювати параметри моделі. Слайдери для кожного

параметра дозволяють швидко й зручно змінювати їхні значення та спостерігати за впливом на результати.

Розроблена прикладна програма надає можливість глибшого розуміння біопроеесів та їх оптимізації, що робить її корисним інструментом для дослідників, фахівців із риборозведення та спеціалістів у галузі біотехнології.

ВИСНОВКИ

Розроблено принципи та підходи отримання каротиновмісної біомаси зелених водоростей *Desmodesmus armatus* та *Acutodesmus dimorphus* на скидній воді з УЗВ. Підібрано методи індукції каротиногенезу шляхом введення у живильне середовище під час другої фази культивування на скидній воді з УЗВ промоторів вільнорадикального окислення ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) та осморегуляторів (NaCl). Запропоновано ефективну схему отримання зоопланктону із високою поживною цінністю: порційне внесення культури мікроводоростей, попередньо збагаченої каротиноїдами шляхом індукції Fe^{2+} (200 мМ) з H_2O_2 (10^{-4} мМ). Розроблено математичні моделі процесу накопичення каротиноїдів для випадків активуючого та інгібуючого субстратів. Створено спеціалізовані прикладні програми у середовищі Wolfram Mathematica та мовою програмування Python для прогнозування динаміки накопичення біомаси і витрат субстрату.

1. Доведено можливість використання скидної води з УЗВ як живильне середовище для культивування мікроводоростей *D. armatus* та *A. dimorphus* зі збереженням продуктивності досліджуваних культур. Рекомендована схема передбачає: забір аліквот із механічного фільтра, автоклавування при 121°C протягом 30 хвилин. Культивування слід проводити в 500 мл колбах Ерленмейєра за температури $21 \pm 2^\circ\text{C}$, освітлюванні люмінесцентними лампами з яскравістю 2500 люкс протягом 16-годинного фотоперіоду.

2. Показано, що оптимальним для культур *D. armatus* та *A. dimorphus* є культивування на скидній воді із УЗВ тривалістю 40 діб. При цьому вміст білків знаходиться в межах 55-60%, ліпідів - 14,1 – 15,6%, вуглеводів - 10,9 – 11,7%, каротиноїдів - 13–14 мг/г сухої маси. В біомасах обох досліджуваних культур виявлено всі протеїногенні амінокислоти. Вміст аспартату та глутамату був домінуючим у культурі *D. armatus* і складав 0,322 та 0,350 мг•г⁻¹ сухої маси. Для культури *A. dimorphus* домінуючими були аланін та глутамінова кислота 0,203 та 0,327 мг•г⁻¹ сухої маси відповідно.

3. Досягнуто підвищення кількості каротиноїдів до 27 мг/г у біомасі *D.*

amatus та до 24 мг/г у біомасі *A. dimorphus* шляхом внесення промоторів вільнорадикального окислення ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) та осморегуляторів (NaCl). При цьому зафіксовано збільшення вмісту β -каротину (до 31-35%) та вторинних каротиноїдів, зокрема ефірів астаксантину та адоніксантину.

4. При внесенні промоторів вільнорадикального окислення ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) та осморегуляторів (NaCl) впродовж культивування кількість біомаси *D. armatus* знаходилася в межах 12-14 г/л, а в *A. dimorphus* - 9-11 г/л, що супроводжувалося збільшенням кількості загальних ліпідів (46 - 49%) на фоні зменшення кількості білка. Також відмічено зниження цитохромоксидазної активності, збільшення каталазної та пероксидазної активності майже на 50%.

5. Розроблено схему годування зоопланктону біомасою зелених водоростей після індукції каротиногенезу. Схема передбачає внесення 5 мл оводненої біомаси *D. armatus* та *A. dimorphus*, отриманих у фазу максимальної продуктивності на 500 мл культурального середовища зоопланктону 1 раз на добу. Оптимальний термін культивування 15 діб. Застосування такої схеми дозволяє отримати збагачені каротиноїдами культури *S. vetulus* до 7 мг/г, *D. magna* – 11 мг/г, *M. macroscopa* – 14 мг/г. Годування зоопланктону каротиновмісною біомасою зелених водоростей дозволило також збільшити вміст фракцій β -каротину, астаксантину, адоніксантину.

6. Розроблено математичні моделі балансу для опису динаміки накопичення каротиноїдів та біомаси за різнонаправленої дії субстратів. Для реалізації моделей були створені спеціалізовані прикладні програми у середовищі Wolfram Mathematica, а також за допомогою мови програмування Python, які дозволяють легко модифікувати параметри системи та спостерігати за впливом змін на поведінку культури мікрводоростей.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Барінова, С. С., Білоус, О. П., & Царенко, П. М. (2020). *Альгоіндикація водних об'єктів України: методи і перспективи*. Київ: Хайфа. 367 с.
2. Вогнівенко, Л. П., Євтушенко, М. Ю., & Шевряков, М. В. (2009). *Біохімія гідробіонтів*. Херсон: Олді-плюс. 536 с.
3. Галоян, Л. Л., Худий, О. І., Тертерян, С. В., Мрук, А. І., & Худа, Л. В. (2016). Застосування продукційних кормів різних виробників при вирощуванні радужної форелі в умовах індустриальної аквакультури. *Біологічні системи*, 8(2), 189–194.
4. Гаркуша, Д. В., & Дерезюк, Н. В. (2015). Видовий склад угруповань фітопланктону у водних об'єктах дельти р. Дністер та дністровського лиману (влітку 2013–2014 рр.). *Збірник наукових праць "Біологічні дослідження-2015"*, Житомир, 240–242.
5. Доманчук, А. Г., Коржик, В. П., & Худий, О. І. (2017). Відтворення аборигенних видів риб у Дністрі: перші кроки. *Регіональні аспекти флористичних і фауністичних досліджень: Матеріали четвертої міжнародної науково-практичної конференції*, Чернівці, 7–14.
6. Дорош, І. В., Чебан, Л. М., & Ситник, М. Б. (2018). Вплив глюкози і ацетату натрію на продуктивність та каротиногенез *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegen. (Тези доповіді). *I Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні проблеми раціонального використання водних біоресурсів»*, Київ, 102–104.
7. Дорош, І. В. & Чебан, Л. М. (2021). Дослідження можливості використання препарату Дон-1R для отримання кормової біомаси зелених водоростей. (Тези доповіді). *XV Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття»*, Київ, 36.
8. Електронна міжнародна база водоростей. Algaebase. (n.d.). *Algaebase: The world's largest online database of algae*. Retrieved November 18, 2024, from <http://www.algaebase.org>

9. Кірпенко, Н. І. (2010). Фракційний склад білків у біомасі альгологічно чистих та змішаних культур водоростей. *Український ботанічний журнал*, 67(1), 136–141. <https://dspace.nbuiv.gov.ua/handle/123456789/30149>
10. Кондратьєва, Н. В. (2001). *Альгологія. Енциклопедія Сучасної України*. НАН України, Інститут енциклопедичних досліджень НАН України. 823 с.
11. Кононенко, Р. В. (2016). *Інтенсивні технології в аквакультурі*. Херсон: Олді-плюс, 492 с.
12. Маліщук, І. В. & Чебан, Л. М. (2016). Індукція вторинного каротиногенезу у *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew в умовах двостадійного культивування. (Тези доповіді). *Актуальні проблеми біохімії та біотехнології. Тези доповідей конференції-конкурсу молодих учених*, Київ, 33.
13. Маліщук, І. В., Чебан, Л. М. & Гринько, О. Е. (2016). Видовий склад фітопланктону річки Дністер. (Збірник тез). *Біотехнологія: звершення та надії: Збірник тез V Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених*, Київ, 204.
14. Маліщук, І.В., Чебан, Л.М. & Марченко, М.М. (2015). Особливості культивування *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko на скидній воді із рибоводної установки замкнутого водопостачання. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. Спеціальний випуск: Гідроекологія*, 3-4 (64), 428-432.
15. Маліщук, І.В., Чебан, Л.М. & Марченко, М.М. (2015). Продуктивність монокультури *Clorella vulgaris* Beijerinck, культивованої на скидній воді із установки замкнутого водопостачання. *Вісник одеського національного університету*, 20,1(36), 121 – 128. <http://visbio.onu.edu.ua/article/download/56917/53170>
16. Марченко, М. М., Худий, О. І., Чебан, Л. М., Худа, Л. В., & Маліщук, І. В. (2015). Спосіб культивування фітопланктону (Патент України № 101103). Державна служба інтелектуальної власності України.

17. Марченко, М. М., Чебан, Л. М., Гринько, О. Е., Худий, О. І., Кушнірик, О. В., Худа, Л. В., & Дорош, І. В. (2017). Спосіб вирощування *Daphnia magna* (Straus, 1820) сумісно з кормовим субстратом (мікроводоростями) (Патент України № 121772). Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. <https://uapatents.com/patents/c12n-1-12>
18. Матвієнко, О. М. (Ред.). (1938–1993). *Визначник прісноводних водоростей України*. Томи 1–12. Наукова думка.
19. Меленчук, Г. В., & Гуляєва, О. О. (2010). Фітопланктон Дністровського водосховища в період паводку 2008 року. *Гідрологія, гідрохімія і гідроекологія*, 3, 154–159.
20. Незбрицька, І. М., Курейшевич, А. В., & Василенко, О. В. (2015). Вплив температурних умов на ростові процеси та активність глутаматдегідрогенази у деяких видів *Chlorophyta* і *Cyanoprokaryota*. *Гідробіологічний журнал*, 51(5), 112–120.
21. Романенко, П. О., & Яровий, О. О. (2015). Асиміляція сполук фосфору мікроводоростями при культивуванні на стічних водах. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія*, (3-4), 587–590.
22. Ткаченко, Ф. П., Герасим'юк, В. П., Назарчук, Ю. С., & Бабенко, О. А. (2016). *Мікроскопічні і гістохімічні методи дослідження водоростей, грибів та лишайників: Методичні вказівки до великого спецпрактикуму*. Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 60 с.
23. Фрунза, О., & Худий, О. (2022). Оцінка видової структури угруповань молоді риб у Дністровському водосховищі. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 14(1), 56–61. <https://doi.org/10.31861/biosystems2022.01.056>
24. Чебан, Л. М., & Мегера, Х. А. (2016). Вплив препарату DON-1R на монокультури *Microcystis sp.* *Біологічні системи*, 8(2), 176–181. <https://doi.org/10.31861/biosystems2016.02.176>

25. Чебан, Л.М., Маліщук, І.В., Гринько, О.Е. & Марченко, М.М. (2015). Вміст нутрієнтів у біомасі *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. та *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko, культивованій на скидній воді із УЗВ. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 7(2), 171 – 176. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nvchu_biol_2015_7_2_7
26. Abd El-Baky, H. H., & El-Baroty, G. S. (2010). Enhancement of carotenoids in *Dunaliella salina* for use as dietary supplements and in the preservation foods. *Food and Chemical Toxicology*, 4, 20. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.04.025>
27. Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi journal of biological sciences*, 19(3), 257-275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
28. Abreu, A. P., Morais, R. C., Teixeira, J. A., & Nunes, J. (2022). A comparison between microalgal autotrophic growth and metabolite accumulation with heterotrophic, mixotrophic and photoheterotrophic cultivation modes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 159, 112247. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112247>
29. Aburai, N., Sumida, D., & Abe, K. (2015). Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp.(*Chlorophyceae*). *Algal Research*, 8, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.01.005>.
30. Aguilar, C. P., González, M., Cifuentes, A. S., & Silva, M. (2004). Growth and accumulation of total carotenoids in two strains of *Dunaliella salina* Teod.(*Chlorophyceae*) from the northern and central coast of Perú. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 49(1), 69-74. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072004000100012>
31. Ahmad, A., W. Hassan, S., & Banat, F. (2022). An overview of microalgae biomass as a sustainable aquaculture feed ingredient: Food security and circular economy. *Bioengineered*, 13(4), 9521-9547. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2061148>

32. Ahmed, F., Fanning, K., Netzel, M., Turner, W., Li, Y., & Schenk, P. M. (2014). Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters. *Food chemistry*, 165, 300-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.107>.
33. Al-Enazi, N. M. (2020). Salinization and wastewater effects on the growth and some cell contents of *Scenedesmus bijugatus*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(7), 1773-1780. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.05.021>
34. Altaff, K., & Vijayaraj, R. (2021). Micro-algal diet for copepod culture with reference to their nutritive value—a review. *International Journal of Current Research and Review*, 13(7), 86-96. <http://dx.doi.org/10.31782/IJCRR.2021.13705>
35. Alvaro, H. S. S., & Leonel, L. P. P. (2010). Simulation of Monod's model with mathematica 7.0. *Far East Journal of Applied Mathematics*, 47(2), 125-135.
36. Ambati, R. R., Gogisetty, D., Aswathanarayana, R. G., Ravi, S., Bikkina, P. N., Bo, L., & Yuepeng, S. (2019). Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(12), 1880-1902. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1432561>
37. Ambati, R. R., Phang, S. M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications—A review. *Marine drugs*, 12(1), 128-152. <https://doi.org/10.3390/md12010128>
38. Andersen, R. A. (2013). The microalgal cell. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*, 1-20. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch6>
39. Andras, P. (2011). Modeling Living Systems. In: Kampis, G., Karsai, I., Szathmáry, E. (eds) *Advances in Artificial Life. Darwin Meets von Neumann. ECAL 2009. Lecture Notes in Computer Science*, vol 5778. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-21314-4_26
40. Andrews, J. F. (1968). A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. *Biotechnology and bioengineering*, 10(6), 707-723. <https://doi.org/10.1002/bit.260100602>.

41. Ansari, F. A., Guldhe, A., Gupta, S. K., Rawat, I., & Bux, F. (2021). Improving the feasibility of aquaculture feed by using microalgae. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(32), 43234-43257. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14989x>.
42. Ansari, F. A., Singh, P., Guldhe, A., & Bux, F. (2017). Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: integrated biomass generation and nutrient remediation. *Algal research*, 21, 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.015>
43. Arumugam, M., Agarwal, A., Arya, M. C., & Ahmed, Z. (2013). Influence of nitrogen sources on biomass productivity of microalgae *Scenedesmus bijugatus*. *Bioresource technology*, 131, 246-249. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.159> сценедесмус нітроген
44. Aswazi, A. B., Azfaralarriff, A., Law, D., Eziwar Dyari, H. R., Othman, B. A., Shahid, M., ... & Fazry, S. (2023). Growth Interaction of *Moina* sp. and *Chlorella* sp. for Sustainable Aquaculture. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 46(1), 91-106. <https://doi.org/10.47836/pjtas.46.1.06>
45. Baldev, E., Ali, D. M., Pugazhendhi, A., & Thajuddin, N. (2021). Wastewater as an economical and ecofriendly green medium for microalgal biofuel production. *Fuel*, 294, 120484. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120484>
46. Bec, A., Desvillettes, C., Véra, A., Fontvieille, D., & Bourdier, G. (2003). Nutritional value of different food sources for the benthic *Daphnidae* *Simocephalus vetulus*: role of fatty acids. *Archiv für Hydrobiologie*, 156(2), 145-163. <https://doi.org/10.1127/0003-9136/2003/0156-0145>
47. Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), 207-210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>.
48. Becker, N. and Richmond, A. (2013). Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology, 2nd edition, Wiley-Blackwell.
49. Bellouquid, A., & Delitala, M. (2006). Mathematical modeling of complex biological systems. Birkhäuser Boston.

50. Benedetti, M., Vecchi, V., Barera, S., & Dall'Osto, L. (2018). Biomass from microalgae: the potential of domestication towards sustainable biofactories. *Microbial Cell Factories*, 17, 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1019-3>
51. Berges, J. A. (1997). Miniview: algal nitrate reductases. *European Journal of Phycology*, 32(1), 3-8. <https://doi.org/10.1080/09541449710001719315>
52. Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
53. Bogacz-Radomska, L., & Harasym, J. (2018). β -Carotene—properties and production methods. *Food Quality and Safety*, 2(2), 69-74. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy004>
54. Borisova, E.V., Nogina, T.M. and Stupina, V.V. (2000). Bacteria accompanying *Scenedesmus acutus* Meyen in laboratory cultures. *Int. J. Algae*. 2(2), 113–121.
55. Borysova, O.V., Tsarenko, P.M., Konishchuk, M.O. (2014). *Microalgae Culture Collection IBASU-A*. Kyiv. 110 p.
56. Brauer, F. (2012). *Mathematical Models in Population Biology and Epidemiology*, Carlos Castillo-Chavez.
57. Brett, M. T., Kainz, M. J., Taipale, S. J., & Seshan, H. (2009). Phytoplankton, not allochthonous carbon, sustains herbivorous zooplankton production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(50), 21197-21201. <https://doi.org/10.1073/pnas.090412910>
58. Brett, M. T., Müller-Navarra, D. C., & Sang-Kyu, P. (2000). Empirical analysis of the effect of phosphorus limitation on algal food quality for freshwater zooplankton. *Limnology and Oceanography*, 45(7), 1564-1575. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.7.1564>
59. Burns, C. W. (2013). Predictors of invasion success by *Daphnia* species: influence of food, temperature and species identity. *Biological invasions*, 15, 859-869. <https://doi.org/10.1007/s10530-012-0335-5>

60. Carrera, J., Jubany, I., Carvallo, L., Chamy, R., & Lafuente, J. (2004). Kinetic models for nitrification inhibition by ammonium and nitrite in a suspended and an immobilised biomass systems. *Process Biochemistry*, 39(9), 1159-1165. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00214-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00214-0).
61. Castro, M. J., Castro, M. G., Rivera, R. A. O., Flores, G. A. F., & Castro, C. A. E. (2020). Population density and reproductive potential comparison of *Simocephalus vetulus* (Müller, 1776) cultured with a mixed diet with chlorophytes (*Scenedesmus sp*+ *Chlorococcum sp.*) and diatoms (*Pinnularia sp.*) at different.
62. Cezare-Gomes, E. A., Mejia-da-Silva, L. D. C., Pérez-Mora, L. S., Matsudo, M. C., Ferreira-Camargo, L. S., Singh, A. K., & de Carvalho, J. C. M. (2019). Potential of microalgae carotenoids for industrial application. *Applied biochemistry and biotechnology*, 188, 602-634. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-02945-4>
63. Chance, B., & Maehly, A. C. (1955). Assay of catalases and peroxidases, 2, 764-775. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8)
64. Chen, B., Wan, C., Mehmood, M. A., Chang, J. S., Bai, F., & Zhao, X. (2017). Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—A review. *Bioresource technology*, 244, 1198-1206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.170>
65. Chen, J. H., Kato, Y., Matsuda, M., Chen, C. Y., Nagarajan, D., Hasunuma, T., ... & Chang, J. S. (2021). Lutein production with *Chlorella sorokiniana* MB-1-M12 using novel two-stage cultivation strategies—metabolic analysis and process improvement. *Bioresource technology*, 334, 125-200. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125200>
66. Cheng, P., Zhou, C., Chu, R., Chang, T., Xu, J., Ruan, R., ... & Yan, X. (2020). Effect of microalgae diet and culture system on the rearing of bivalve mollusks: Nutritional properties and potential cost improvements. *Algal Research*, 51, 102076. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102076>
67. Ciarletta, P. H., Hillen, T., Othmer, H., & Trucu, D. (2016). Mathematical models and methods for living systems (p. 332). Cham: Springer.

68. Coêlho, D. D. F., Tundisi, L. L., Cerqueira, K. S., Rodrigues, J. R. D. S., Mazzola, P. G., Tambourgi, E. B., & Souza, R. R. D. (2019). Microalgae: cultivation aspects and bioactive compounds. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62, e19180343. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180343>
69. Colusse, G. A., Mendes, C. R. B., Duarte, M. E. R., de Carvalho, J. C., & Nosedá, M. D. (2020). Effects of different culture media on physiological features and laboratory scale production cost of *Dunaliella salina*. *Biotechnology Reports*, 27, e00508. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00508>
70. Cottingham, K. L., Glaholt, S., & Brown, A. C. (2004). Zooplankton community structure affects how phytoplankton respond to nutrient pulses. *Ecology*, 85(1), 158-171. <https://doi.org/10.1890/02-0570>
71. Crofcheck, C. L., Monstross, M., Xinyi, E., Shea, A. P., Crocker, M., & Andrews, R. (2012). Influence of media composition on the growth rate of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus* utilized for CO₂ mitigation. Dallas, Texas, *American Society of Agricultural and Biological Engineers*. <https://doi.org/10.13031/2013.41734>
72. Curtis, L. (1985). Regulation of nitrate reductase activity in soybeans.
73. Daniel, N., Sivaramakrishnan, T., Saravanan, K., Shalini, B., Arunjyoti, B., Sankar, R., & Dann Roy, S. (2016). A review on microalgae as potential fish feed ingredient. *J. Andaman. Sci. Assoc*, 1, 140-144.
74. Das, P., Aziz, S. S., & Obbard, J. P. (2011). Two phase microalgae growth in the open system for enhanced lipid productivity. *Renewable Energy*, 36(9), 2524-2528.
75. De Alva, M. S., Luna-Pabello, V. M., Cadena, E., & Ortíz, E. (2013). Green microalga *Scenedesmus acutus* grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. *Bioresource technology*, 146, 744-748. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.061>
76. De Camargo, E.C., Casali, C. A., Lombardi, A. T., Salgueiro, M. I. (2015) Post-Graduate Program in Ecology and Natural Resources; Department of Botany, Federal University of São Carlos. *J. Algal Biomass Utiln.* 6 (1), 88- 94.

77. De Vries, G., Hillen, T., Lewis, M., Müller, J., & Schönfisch, B. (2006). A course in mathematical biology: quantitative modeling with mathematical and computational methods. *Society for Industrial and Applied Mathematics*.
78. De- Bashan, L. E., Magallon, P., Antoun, H., & Bashan, Y. (2008). Role of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in *Chlorella vulgaris* during assimilation of ammonium when jointly immobilized with the microalgae- growth- promoting bacterium *azospirillum brasilense* *Journal of Phycology*, 44(5), 1188-1196. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00572.x>
79. Deng, D., & Xie, P. (2003). Effect of food and temperature on the growth and development of *Moina irrasa* (Cladocera: Moinidae). *Journal of Freshwater Ecology*, 18(4), 503-513. <https://doi.org/10.1080/02705060.2003.9663991>
80. Dhont, J., Dierckens, K., Støttrup, J., Van Stappen, G., Wille, M., & Sorgeloos, P. (2013). Rotifers, *Artemia* and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. In *Advances in aquaculture hatchery technology* (pp. 157-202). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857097460.1.157>
81. Di Caprio, F., Visca, A., Altimari, P., Toro, L., Masciocchi, B., Iaquaniello, G., & Pagnanelli, F. (2016). Two stage process of microalgae cultivation for starch and carotenoid production. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 415-420. <https://doi.org/10.3303/CET1649070>
82. Diez, J., Chaparro, A., Vega, J. M., & Relimpio, A. (1977). Studies on the regulation of assimilatory nitrate reductase in *Ankistrodesmus braunii*. *Planta*, 137, 231-234.
83. Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katsarov, D., ... & Sukhikh, S. (2020). Microalgae: A promising source of valuable bioproducts. *Biomolecules*, 10(8), 1153. <https://doi.org/10.3390/biom10081153>
84. Dorosh I., Cheban L., Grynko O. (2018). Co-cultivation of *Daphnia magna* (Straus) and *Desmodesmus armatus* (chod.) Hegew. in recirculating aquaculture system wastewater. *Arch.Pol.Fish*, 26, 57 – 64. <https://doi.org/10.2478/aopf-2018-0007>

85. Dorosh I.V., Marchenko M.M., Cheban L.M. (2019). Induction of carotenogenesis in *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew cultivated on the closed waterside from recirculating aquaculture. *Biotechnologia acta*, 12 (2), 46-55. <https://doi.org/10.15407/biotech12.02.046>
86. Drillet, G., Frouël, S., Sichlau, M. H., Jepsen, P. M., Højgaard, J. K., Joarder, A. K., & Hansen, B. W. (2011). Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. *Aquaculture*, 315(3-4), 155. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.027>
87. Duong, V. T., Ahmed, F., Thomas-Hall, S. R., Quigley, S., Nowak, E., & Schenk, P. M. (2015). High protein-and high lipid-producing microalgae from northern Australia as potential feedstock for animal feed and biodiesel. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3, 53. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00053>.
88. Elumalai, S., Santhose, B. I., & Kanna, G. R. (2014). Extraction of carotenoid and thin layer chromatography (TLC), GC-MS, FT-IR and HPLC analysis of pharmaceutically important pigment astaxanthin from a new strain of *Haematococcus pluvialis*. *Weekly Science Research Journal*, 2(8), 2321-7871. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.010>
89. Erdoğan, A., Karataş, A. B., Demir, D., Demirel, Z., Aktürk, M., Çopur, Ö., ... & Conk-Dalay, M. (2024). Comprehensive Analysis of Lutein and Loroxanthin in *Scenedesmus obliquus*: From Quantification to Isolation. *Molecules*, 29(6), 1228. <https://doi.org/10.3390/molecules29061228>.
90. Erdoğan, A., Karataş, A. B., Demirel, Z., & Dalay, M. (2022). Induction of lutein production in *Scenedesmus obliquus* under different culture conditions prior to its semipreparative isolation. *Turkish Journal of Chemistry*, 46(3), 796-804. <https://doi.org/10.55730/1300-0527.3369>
91. Fernández, R., Nandini, S., Sarma, S. S. S., & Castellanos- Paez, M. E. (2014). Effects of cyanobacteria, fish kairomones, and the presence of ostracods on the demography of *Simocephalus vetulus* (Cladocera). *Invertebrate Biology*, 133(4), 371-380. <https://doi.org/10.1111/ivb.12069>

92. Fernández-Linares, L. C., Barajas, C. G., Páramo, E. D., & Corona, J. A. B. (2017). Assessment of *Chlorella vulgaris* and indigenous microalgae biomass with treated wastewater as growth culture medium. *Bioresource Technology*, 244, 400-406. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.141>
93. Fiedor, J., & Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6(2), 466-488. <https://doi.org/10.3390/nu6020466>
94. Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509.
95. Forrest-Owen, O. (2016). Mathematical Modelling and it's Applications in Biology, Ecology and Population Study.
96. Fowler, A. C. (1997). Mathematical models in the applied sciences (Vol. 17). Cambridge University Press.
97. Fu, W., Paglia, G., Magnúsdóttir, M., Steinarsdóttir, E. A., Gudmundsson, S., Palsson, B. Ø., ... & Brynjólfsson, S. (2014). Effects of abiotic stressors on lutein production in the green microalga *Dunaliella salina*. *Microbial cell factories*, 13, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-3>
98. García-Chavarría, M., & Lara-Flores, M. (2013). The use of carotenoid in aquaculture. *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology*, 8(2), 38-49.
99. Gechev, T. S., Gadjev, I., Van Breusegem, F., Inzé, D., Dukiandjiev, S., Toneva, V., & Minkov, I. (2002). Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59, 708-714. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8459-x>
100. Geisseler, D. J. (2009). Nitrogen acquisition strategies of soil microorganisms as affected by carbon and nitrogen availability. University of California, Davis.
101. German, C. C. I., del Carmen, M. D. M., & Daniel, B. C. (2016). Laboratory production of *Daphnia magna* (Straus 1820) fed with microalgae and active dry yeast. *J. Entomol. Zool. Stud*, 4, 548-553.

102. Gladyshev, M. I., Makhutova, O. N., Kravchuk, E. S., Anishchenko, O. V., & Sushchik, N. N. (2016). Stable isotope fractionation of fatty acids of *Daphnia* fed laboratory cultures of microalgae. *Limnologica*, 56, 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2015.12.001>
103. Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology advances*, 34(8), 1396-1412. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.005>
104. Gudvilovich, I.N., Lelekov, A.S., Maltsev, E.I. et al. Growth of *Porphyridium purpureum* (Porphyridiales, Rhodophyta) and Production of B-Phycoerythrin under Varying Illumination. *Russ J Plant Physiol* 68, 188–196 (2021). <https://doi.org/10.1134/S1021443720060059>
105. Guedes, A. C., Amaro, H. M., & Malcata, F. X. (2011). Microalgae as sources of carotenoids. *Marine drugs*, 9(4), 625-644. <https://doi.org/10.3390/md9040625>
106. Guo, Z., Liu, Y., Guo, H., Yan, S., & Mu, J. (2013). Microalgae cultivation using an aquaculture wastewater as growth medium for biomass and biofuel production. *Journal of Environmental Sciences*, 25, S85-S88. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(14\)60632-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(14)60632-X)
107. Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in lipid research*, 45(2), 160-186. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.001>
108. Hakima, B., Khémisa, C., & Boudjéma, S. (2013). Effects of food limitation on the life history of *Simocephalus expinosus* Koch (Cladocera: Daphniidae). *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, B. Zoology*, 5(2), 25-31. <https://doi.org/10.21608/eajbsz.2013.13502>
109. Han, D., Li, Y., & Hu, Q. (2013). Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. *Algae*, 28(2), 131-147. <https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.2.131>

110. Han, J., Thomsen, L., Pan, K., & Thomsen, C. (2018). Two-step process: enhanced strategy for wastewater treatment using microalgae. *Bioresource technology*, 268, 608-615. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.054>
111. Harris, R., Wiebe, P., Lenz, J., Skjoldal, H. R., & Huntley, M. (Eds.). (2000). ICES zooplankton methodology manual. Elsevier.
112. Hawrot-Paw, M., & Ratomski, P. (2024). Efficient Production of Microalgal Biomass—Step by Step to Industrial Scale. *Energies*, 17(4), 944. <https://doi.org/10.3390/en17040944>
113. Hawrot-Paw, M., Koniuszy, A., Gałczyńska, M., Zając, G., & Szyszlak-Bargłowicz, J. (2019). Production of microalgal biomass using aquaculture wastewater as growth medium. *Water*, 12(1), 106. <https://doi.org/10.3390/w12010106>
114. Haydarov, S. M., Mirzayeva, D. A., Khujamshukurov, N. A., Shakirov, Z. S., Kuchkarova, D. K., & Abdinazarov, K. K. (2020). The Role of Microalgae in the Cultivation of Zooplankton (*Daphnia*). *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 9(5), 3356-3365. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.905.399>
115. He, Z. H., Qin, J. G., Wang, Y., Jiang, H., & Wen, Z. (2001). Biology of *Moina mongolica* (Moinidae, Cladocera) and perspective as live food for marine fish larvae. *Hydrobiologia*, 457, 25-37. <https://doi.org/10.1023/A:1012277328391>
116. Hejazi, M. A., Holwerda, E., & Wijffels, R. H. (2004). Milking microalga *Dunaliella salina* for β - carotene production in two- phase bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 85(5), 475-481. <https://doi.org/10.1002/bit.10914>
117. Henríquez, V., Escobar, C., Galarza, J., & Gimpel, J. (2016). Carotenoids in microalgae. *Carotenoids in nature: biosynthesis, regulation and function*, 79, 219-237. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_8
118. Herasimiuk, V. P., Gerasymova, O. V., Struk, M. O. (2009). Algae of Ukraine: Diversity, Nomenclature, Taxonomy, Ecology and Geography. Vol. 2. Bacillariophyta / Eds.: P. M. Tsarenko, S. Wasser and E. Nevo. Rugell: A.R.G. Gantner Verlag, 419 p.

119. Hollywood, K. A., Shadi, I. T., & Goodacre, R. (2010). Monitoring the succinate dehydrogenase activity isolated from mitochondria by surface enhanced Raman scattering. *The Journal of Physical Chemistry*, 114(16), 7308-7313. <https://doi.org/10.1021/jp908950x>
120. Hu, J., Lu, W., Lv, M., Wang, Y., Ding, R., & Wang, L. (2019). Extraction and purification of astaxanthin from shrimp shells and the effects of different treatments on its content. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29, 24-29. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.11.004>
121. Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., & Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal*, 54(4), 621-639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x>
122. Hyman, M., Wang, Q., Wilson, A. E., Adhikari, S., & Higgins, B. T. (2021). Production of *Daphnia* zooplankton on wastewater-grown algae for sustainable conversion of waste nutrients to fish feed. *Journal of Cleaner Production*, 310, 127501. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127501>
123. Ikarán, Z., Suárez-Alvarez, S., Urreta, I., & Castañón, S. (2015). The effect of nitrogen limitation on the physiology and metabolism of *Chlorella vulgaris* var L3. *Algal Research*, 10, 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.023>
124. Ingalls, B. P. (2013). *Mathematical modeling in systems biology: an introduction*. MIT press.
125. Ishaq, A. G., Matias-Peralta, H. M., & Basri, H. (2016). Bioactive compounds from green microalga-*Scenedesmus* and its potential applications: a brief review.
126. Jacob-Lopes, E., Mérida, L. R., Queiroz, M. I., & Zepka, L. Q. (2015). Microalgal biorefineries. *Biomass production and uses*, 5, 81-106. <https://doi.org/10.5772/59969>
127. Jahns, P., Latowski, D., & Strzalka, K. (2009). Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1787(1), 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2008.09.013>

128. Jepsen, P. M., Syberg, K., Drillet, G., & Hansen, B. W. (2020). Planktonic crustacean culture—live planktonic crustaceans as live feed for finfish and shrimps in aquaculture. *Fisheries and Aquaculture: Volume 9*, 341.

129. Kalra, R., Gaur, S., & Goel, M. (2021). Microalgae bioremediation: A perspective towards wastewater treatment along with industrial carotenoids production. *Journal of Water Process Engineering*, 40, 101794. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101794>

130. Kan, G., Shi, C., Wang, X., Xie, Q., Wang, M., Wang, X., & Miao, J. (2012). Acclimatory responses to high-salt stress in *Chlamydomonas* (Chlorophyta, Chlorophyceae) from Antarctica. *Acta Oceanologica Sinica*, 31, 116-124. <https://doi.org/10.1007/s13131-012-0183-2>

131. Kaparapu, J. (2018). Application of microalgae in aquaculture. *Phykos*, 48(1), 21-26.

132. Kar, S., Das, P., Das, U., Bimola, M., Kar, D., & Aditya, G. (2017). Culture of the zooplankton as fish food: observations on three freshwater species from Assam, India. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 10(5), 1210-1220. <http://www.bioflux.com.ro/aacl>

133. Karpenyuk, T. A., Orazova, S. B., Tzurkan, Y. S., Goncharova, A. V., Kairat, B. K., Mukasheva, T. D., ... & Berzhanova, R. Z. (2014). Influence of Culture Conditions on the Growth and Fatty Acid Composition of Green Microalgae *Oocystis rhomboideus*, *Scenedesmus obliquus*, *Dictyochlorella globosa*. *International Journal of Environmental and Ecological Engineering*, 8(6), 626-630.

134. Khuda, L., Khudiyi, O., & Cheban, L. (2021). Optical methods for assessing the effect of DON-1R on the histological structure of fish liver. In *Fifteenth International Conference on Correlation Optics*, 322-328. <https://doi.org/10.1117/12.2615589>.

135. Khudiyi, O., Marchenko, M., Cheban, L., Khuda, L., Kushniryk, O., & Malishchuk, I. (2016). Recirculating aquaculture systems waste water as a medium for increase of phytoplankton and zooplankton biomass. *International Letters of Natural Sciences*, 54. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILNS.54.1>
136. Kim, M. K., Park, J. W., Park, C. S., Kim, S. J., Jeune, K. H., Chang, M. U., & Acreman, J. (2007). Enhanced production of *Scenedesmus spp.*(green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. *Bioresource technology*, 98(11), 2220-2228. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.031>
137. Kirpenko, N. I., Leontieva, T. O., & Tsarenko, P. M. (2021). Morphometric characteristics of green microalgae in culture. *Hydrobiological Journal*, 57(3). <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v57.i3.40>
138. Knight, J. A., Anderson, S., & Rawle, J. M. (1972). Chemical basis of the sulfo-phospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clinical chemistry*, 18(3), 199-202.
139. Kondratyeva, N.V., Tsarenko, P.M., Kislova, O.A. (2010). Algological studies in the M.G. Kholodny Institute of Botany NAS of Ukraine. Kyiv. 144 p.
140. Kopylov, A. I., Kosolapov, D. B., Romanenko, A. V., & Degermendzhy, A. G. (2002). Structure of planktonic microbial food web in a brackish stratified Siberian lake. *Aquatic Ecology*, 36(2), 179-204. <https://doi.org/10.1023/A:1015678918611>
141. Kosamkar, P. K., & Kulkarni, D. V. (2019). Agriculture crop simulation models using computational intelligence. *International Journal of Computer Engineering and Technology*, 10(3).
142. Krzemińska, I., Pawlik-Skowrońska, B., Trzcińska, M., & Tys, J. (2014). Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37, 735-741. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1044-x>
143. Kushniryk, O., Khudiyi, O., Khuda, L., & Marchenko, M. (2018). Differences in nutritional value and amino acid composition of *Moina macrocopa*

(Straus) using yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodotorula glutinis* as fodder substrates. *International Letters of Natural Sciences*, 68.

144. Kushniryk, O., Khudiyi, O., Khuda, L., Kolman, R., & Marchenko, M. (2015). Cultivating *Moina macrocopa* Straus in different media using carotenogenic yeast *Rhodotorula*. *Fisheries & Aquatic Life*, 23(1), 37-42.

145. Lee, J., Sim, S. J., Bott, M., Um, Y., Oh, M. K., & Woo, H. M. (2014). Succinate production from CO₂-grown microalgal biomass as carbon source using engineered *Corynebacterium glutamicum* through consolidated bioprocessing. *Scientific reports*, 4(1), 5819. <https://doi.org/10.1038/srep05819>

146. Leontieva, T. A., & Kirpenko, N. I. (2020). Chlorophyta Growth Rate on Different Cultivation Media. *International Journal on Algae*, 22(1). Volume 22, Issue 1, 2020, pp. 69-76 <https://doi.org/10.1615/InterJAlgae.v22.i1.60>

147. Levenspiel, O. (1980). The Monod equation: a revisit and a generalization to product inhibition situations. *Biotechnology and bioengineering*, 22(8), 1671-1687. <https://doi.org/10.1002/bit.260220810>.

148. Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S., & Wang, G. (2011). An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology advances*, 29(6), 568-574. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.001>

149. Lim, K. C., Yusoff, F. M., Shariff, M., & Kamarudin, M. S. (2018). Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. *Reviews in aquaculture*, 10(3), 738-773. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12200>

150. Lin, J. H., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2015). Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. *Bioresource Technology*, 184, 421-428. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.099>

151. López-Pacheco, I. Y., Castillo-Vacas, E. I., Castañeda-Hernández, L., Gradiz-Menjívar, A., Rodas-Zuluaga, L. I., Castillo-Zacarías, C., ... & Parra-Saldívar, R. (2021). CO₂ biocapture by *Scenedesmus* sp. grown in industrial wastewater. *Science of the Total Environment*, 790, 148222. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148222>

152. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
153. Luong, J. H. T. (1987). Generalization of Monod kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, 29(2), 242-248. <https://doi.org/10.1002/bit.260290215>.
154. Lüring, M. F. L. L. W. (2003). Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, 39, No. 2, 85-101. <https://doi.org/10.1051/limn/2003014>
155. Ma, M., & Hu, Q. (2024). Microalgae as feed sources and feed additives for sustainable aquaculture: prospects and challenges. *Reviews in Aquaculture*, 16(2), 818-835. <https://doi.org/10.1111/raq.12869>
156. Macías- Sánchez, M. D., Mantell Serrano, C., Rodríguez Rodríguez, M., Martínez de la Ossa, E., Lubián, L. M., & Montero, O. (2008). Extraction of carotenoids and chlorophyll from microalgae with supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent. *Journal of separation science*, 31(8), 1352-1362. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700503>
157. Makinia, J., & Zaborowska, E. (2020). Mathematical modelling and computer simulation of activated sludge systems. IWA publishing.
158. Malavasi, V., Soru, S., & Cao, G. (2020). Extremophile microalgae: the potential for biotechnological application. *Journal of phycology*, 56(3), 559-573. <https://doi.org/10.1111/jpy.12965>
159. Malishchuk I., Khudyi O., Marchenko M., Cheban L., Khuda L., Kushniryk O. (2016). Recirculating aquaculture systems waste water as a medium for increase of phytoplankton and zooplankton biomass. *International Letters of Natural Sciences*, 54, 1-7. <https://doi.org/10.56431/p-w7i7rc>.
160. Malishchuk I.V., Cheban L.M., Marchenko M.M. (2018). Reaction of Cells *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. on the Induction of Carotynogenesis. *International Letters of Natural Sciences*, 72, 21-27. <https://doi.org/10.56431/p-exxa5m>.

161. Markou, G., & Nerantzis, E. (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: a review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology advances*, 31(8), 1532-1542. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.011>
162. Mifflin, B. J., & Habash, D. Z. (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *Journal of experimental botany*, 53(370), 979-987. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.979>
163. Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures, *Annual Review of Microbiology*.
164. Mulders, K. J., Lamers, P. P., Martens, D. E., & Wijffels, R. H. (2014). Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. *Journal of phycology*, 50(2), 229-242. <https://doi.org/10.1111/jpy.12173>
165. Müller, J. C. (2015). *Methods and Models in Mathematical Biology, Textbook*.
166. Müller- Solger, A. B., Jassby, A. D., & Müller- Navarra, D. C. (2002). Nutritional quality of food resources for zooplankton (*Daphnia*) in a tidal freshwater system (Sacramento- San Joaquin River Delta). *Limnology and Oceanography*, 47(5), 1468-1476. <https://doi.org/10.4319/lo.2002.47.5.1468>
167. Murthy, K. C., Vanitha, A., Rajesha, J., Swamy, M. M., Sowmya, P. R., & Ravishankar, G. A. (2005). In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina*—a green microalga. *Life sciences*, 76(12), 1381-1390. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.10.015>
168. Nagappan, S., Das, P., AbdulQuadir, M., Thaher, M., Khan, S., Mahata, C., ... & Kumar, G. (2021). Potential of microalgae as a sustainable feed ingredient for aquaculture. *Journal of Biotechnology*, 341, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.09.003>.

169. Nandini, S., & Sarma, S. S. S. (2003). Population growth of some genera of cladocerans (*Cladocera*) in relation to algal food (*Chlorella vulgaris*) levels. *Hydrobiologia*, 491, 211-219. <https://doi.org/10.1023/A:1024410314313>.
170. Novikoff, A. B., & Goldfischer, S. (1969). Visualization of peroxisomes (microbodies) and mitochondria with diaminobenzidine. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 17(10), 675-680.
171. Novoveská, L., Ross, M. E., Stanley, M. S., Pradelles, R., Wasiolek, V., & Sassi, J. F. (2019). Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. *Marine drugs*, 17(11), 640. <https://doi.org/10.3390/md17110640>
172. Oslan, S. N. H., Tan, J. S., Oslan, S. N., Matanjun, P., Mokhtar, R. A. M., Shapawi, R., & Huda, N. (2021). *Haematococcus pluvialis* as a potential source of astaxanthin with diverse applications in industrial sectors: current research and future directions. *Molecules*, 26(21), 6470. <https://doi.org/10.3390/molecules26216470>
173. Ottinger, M., Clauss, K., & Kuenzer, C. (2016). Aquaculture: Relevance, distribution, impacts and spatial assessments. A review. *Ocean & Coastal Management*, 119, 244-266. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2015.10.015>
174. Ovie, S. I., & Egborge, A. M. (2002). The effect of different algal densities of *Scenedesmus acuminatus* on the population growth of *Moina micrura* Kurz (*Crustacea: Anomopoda, Moinidae*). *Hydrobiologia*, 477, 41-45. <https://doi.org/10.1023/A:1021060510355>
175. Pancha, I., Chokshi, K., George, B., Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2014). Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus sp.* CCNM 1077. *Bioresource technology*, 156, 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025>
176. Paniagua-Michel, J., Olmos-Soto, J., & Ruiz, M. A. (2012). Pathways of carotenoid biosynthesis in bacteria and microalgae. Microbial carotenoids from bacteria and microalgae: *Methods and protocols*, 1-12. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-879-5_1.

177. Pavé, A. (2012). *Modeling of Living Systems: From Cell to Ecosystem*. John Wiley & Sons.
178. Pereira da Costa, D., & Campos Miranda-Filho, K. (2020). The use of carotenoid pigments as food additives for aquatic organisms and their functional roles. *Reviews in Aquaculture*, 12(3), 1567-1578. <https://doi.org/10.1111/raq.12398>
179. Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 45(1), 11-36. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
180. Pérez-López, P., González-García, S., Jeffryes, C., Agathos, S. N., McHugh, E., Walsh, D., ... & Moreira, M. T. (2014). Life cycle assessment of the production of the red antioxidant carotenoid astaxanthin by microalgae: from lab to pilot scale. *Journal of cleaner production*, 64, 332-344. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.07.011>
181. Pinto-Coelho, R. M., Giani, A., & Bezerra-Neto, J. F. (2005). The nutritional status of zooplankton in a tropical reservoir: effects of food quality and community structure. *Brazilian Journal of Biology*, 65, 313-324. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842005000200016>
182. Pirt, S. J. (1975). *Principles of microbe and cell cultivation*. 274 p.
183. Pradhan, V. P. (2014). Zooplankton diversity in freshwater Wunna Lake. *Int. J. of Life Sciences*, 2(3), 268-272.
184. Pratiwi, D. Y. (2020). A mini review-effect of *Dunaliella salina* on growth and health of shrimps. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 8, 317-319. <https://doi.org/10.9734/ajfar/2020/v10i230176>
185. Python NumPy [Electronic resource]: <https://numpy.org/>
186. Qin, S., Liu, G. X., & Hu, Z. Y. (2008). The accumulation and metabolism of astaxanthin in *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae). *Process biochemistry*, 43(8), 795-802. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.03.010>
187. Rai, M. P., Gautam, T., & Sharma, N. (2015). Effect of salinity, pH, light intensity on growth and lipid production of microalgae for bioenergy application.

- OnLine Journal of Biological Sciences*, 15(4), 260-267.
<https://doi.org/10.3844/ojbsci.2015.260.267>
188. Ranga Rao, A., Raghunath Reddy, R. L., Baskaran, V., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2010). Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(15), 8553-8559.
189. Rasdi, N. W., & Qin, J. G. (2016). Improvement of copepod nutritional quality as live food for aquaculture: a review. *Aquaculture Research*, 47(1), 1-20.
<https://doi.org/10.1111/are.12471>
190. Rasdi, N. W., Arshad, A., Ikhwanuddin, M., Hagiwara, A., Yusoff, F. M., & Azani, N. (2020). A review on the improvement of cladocera (*Moina*) nutrition as live food for aquaculture: Using valuable plankton fisheries resources. *Journal of Environmental Biology*, 41, 1239-1248.
[http://doi.org/10.22438/jeb/41/5\(SI\)/MS_16](http://doi.org/10.22438/jeb/41/5(SI)/MS_16)
191. Rasdi, N. W., Qin, J. G., & Li, Y. (2016). Effects of dietary microalgae on fatty acids and digestive enzymes in copepod *Cyclopina kasignete*, a potential live food for fish larvae. *Aquaculture Research*, 47(10), 3254-3264.
<https://doi.org/10.1111/are.12778>
192. Rees, T. A. V., Larson, T. R., Heldens, J. W., & Huning, F. G. (1995). In situ glutamine synthetase activity in a marine unicellular alga (development of a sensitive colorimetric assay and the effects of nitrogen status on enzyme activity). *Plant physiology*, 109(4), 1405-1410.
193. Rippingale, R. J., & Payne, M. F. (2001). Intensive cultivation of a calanoid copepod for live food in fish culture. Department of Environmental Biology, Curtin University of Technology.
194. Rizzo, A., Ross, M. E., Norici, A., & Jesus, B. (2022). A two-step process for improved biomass production and non-destructive Astaxanthin and carotenoids accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Applied Sciences*, 12(3), 12-61.
<https://doi.org/10.3390/app12031261>

195. Roe, J. H. (1955). The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, 212, 334-343.
196. Rosas-Saavedra, C., & Stange, C. (2016). Biosynthesis of carotenoids in plants: enzymes and color. *Carotenoids in nature: biosynthesis, regulation and function*, 35-69. https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_2
197. Roy, K., Gupta, S., & Nandy, S. K. (2016). Checklist of Commonly Occurring Phytoplankton and Zooplankton Genera of Urban and Rural Ponds of Raipur, Chhattisgarh. *International Journal of Research in Biological Sciences*, 6(1), 1-6.
198. Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 35, 265-278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
199. Saini, R. K., & Keum, Y. S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food chemistry*, 240, 90-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
200. Salama, E. S., Kim, H. C., Abou-Shanab, R. A., Ji, M. K., Oh, Y. K., Kim, S. H., & Jeon, B. H. (2013). Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36, 827-833. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0919-1>
201. Sales, R., Lopes, R. G., Derner, R. B., & Tsuzuki, M. Y. (2022). Concentrated microalgal biomass as a substitute for fresh microalgae produced on site at hatcheries. *Aquaculture Research*, 53(17), 5771-5786. <https://doi.org/10.1111/are.16072>
202. Samek, D., Mišurcová, L., Machu, L., Buòka, F., & Fišera, M. (2013). Influencing of amino acid composition of green freshwater algae and cyanobacterium by methods of cultivation. *Turkish Journal of Biochemistry*, 38(4), 360-368. <https://doi.org/10.5505/tjb.2013.42104>

203. Samek, D., Mišurcová, L., Machu, L., Buòka, F., & Fišera, M. (2013). Influencing of amino acid composition of green freshwater algae and cyanobacterium by methods of cultivation. *Turkish Journal of Biochemistry*, 38(4), 360-368. <https://doi.org/10.5505/tjb.2013.42104>
204. Sharma, K. K., Schuhmann, H., & Schenk, P. M. (2012). High lipid induction in microalgae for biodiesel production. *Energies*, 5(5), 1532-1553. <https://doi.org/10.3390/en5051532>
205. Shetty, P., Gitau, M. M., & Maróti, G. (2019). Salinity stress responses and adaptation mechanisms in eukaryotic green microalgae. *Cells*, 8(12), 1657. <https://doi.org/10.3390/cells8121657>.
206. Siehoff, S., Hammers- Wirtz, M., Strauss, T., & Ratte, H. T. (2009). Periphyton as alternative food source for the filter- feeding cladoceran *Daphnia magna*. *Freshwater biology*, 54(1), 15-23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2008.02087.x>
207. Soeder J., Hegewald E. 1988. *Scenedesmus*. In: Microalgal Biotechnology. Cambridge: Cambridge Univ. Press. Pp. 58–84.
208. Sousa, C. A., Sousa, H., Vale, F., & Simões, M. (2021). Microalgae-based bioremediation of wastewaters-Influencing parameters and mathematical growth modelling. *Chemical Engineering Journal*, 425, 131412. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131412>
209. Sriram, S., & Seenivasan, R. (2012). Microalgae cultivation in wastewater for nutrient removal. *Algal Biomass Utln*, 3(2), 9-13. <https://doi.org/10.1007/s40095-021-00383-3>
210. Srivastava, A., Kalwani, M., Chakdar, H., Pabbi, S., & Shukla, P. (2022). Biosynthesis and biotechnological interventions for commercial production of microalgal pigments: A review. *Bioresource technology*, 352, 127071. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127071>
211. Stahl, W., & Sies, H. (2012). β -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. *The American journal of clinical nutrition*, 96(5), 1179S-1184S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.034819>

212. Stange, C. (Ed.). (2016). Carotenoids in nature: biosynthesis, regulation and function (Vol. 79). Springer.
213. Stephen, H. (1999). *Wolfram*. Cambridge University Press, New York.
214. Stevčić, Č., Pulkkinen, K., & Pirhonen, J. (2020). Efficiency of *Daphnia magna* in removal of green microalgae cultivated in Nordic recirculating aquaculture system wastewater. *Algal Research*, 52, 102108. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102108>
215. Støttrup, J. G. (2003). Production and nutritional value of copepods. *Live feeds in marine aquaculture*, 145-205.
216. Sun, T., Tadmor, Y., & Li, L. (2020). Pathways for carotenoid biosynthesis, degradation, and storage. *Plant and food carotenoids: methods and protocols*, 3-23. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9952-1_1.
217. Syrett, P. J. (1973). Measurement of nitrate- and nitrite- reductase activities in whole cells of *Chlorella*. *New Phytologist*, 72(1), 37-46.
218. Takaichi, S. (2011). Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. *Marine drugs*, 9(6), 1101-1118. <https://doi.org/10.3390/md9061101>
219. Tanaka, Y. (1978). Comparative biochemical studies on carotenoids in aquatic animals. *Mem. Fac. Fish.*, 27, 355-422.
220. Teimouri, M., Amirkolaie, A. K., & Yeganeh, S. (2013). The effects of *Spirulina platensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 396, 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.009>
221. Tischner, R. (1976). On the induction of nitrate-and nitrite-reductase in synchronized *Chlorella cultures*. *Planta*, 132, 285-290.
222. Tkinter documentation [Electronic resource]: <https://docs.python.org/3/library/tk.html>
223. Tomaselli, L. (2004). The microalgal cell. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, 1, 3-19. <https://doi.org/10.1002/9780470995280>

224. Torregrosa-Crespo, J., Montero, Z., Fuentes, J. L., Reig Garcia-Galbis, M., Garbayo, I., Vílchez, C., & Martínez-Espinosa, R. M. (2018). Exploring the valuable carotenoids for the large-scale production by marine microorganisms. *Marine Drugs*, 16(6), 203. <https://doi.org/10.3390/md16060203>
225. Tsarenko, P.M., Wasser S. and Nevo, E. (2006). *Algae of Ukraine: Diversity, Nomenclature, Taxonomy, Ecology and Geography*. Vol. 1. Cyanoprocaryota, Euglenophyta, Chrysophyta, Xanthophyta, Raphidophyta. Phaephyta, Dinophyta, Cryptophyta, Glaucocystophora and Rhodophyta, Rugell: A.R.G. Gantner Verlag, 713 p.
226. Tsarenko, P. M., Wasser, S. and Nevo, E. (2009). *Algae of Ukraine: Diversity, Nomenclature, Taxonomy, Ecology and Geography*. Vol. 1. Cyanoprokaryota, Euglenophyta, Chrysophyta, Xanthophyta, Raphidophyta. Phaeophyta, Dinophyta, Cryptophyta, Glaucocystophora and Rhodophyta, Rugell: A.R.G. Gantner Verlag, Vol. 2. Bacillariophyta. – 2009, 413 p.; 511 p.; Vol. 4. – Charophyta. – 2014, 703 p.
227. Tsarenko, P. M., Wasser, S. and Nevo, E. (2011). *Algae of Ukraine: Diversity, Nomenclature, Taxonomy, Ecology and Geography*. Vol. 3. Chlorophyta, Rugell: A.R.G. Gantner Verlag, 511 p.
228. Úbeda, B., Gálvez, J. Á., Michel, M., & Bartual, A. (2017). Microalgae cultivation in urban wastewater: *Coelastrum* cf. *pseudomicroporum* as a novel carotenoid source and a potential microalgae harvesting tool. *Bioresource technology*, 228, 210-217. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.095>
229. Varela, J. C., Pereira, H., Vila, M., & León, R. (2015). Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges. *Photosynthesis research*, 125, 423-436. <https://doi.org/10.1007/s11120-015-0149-2>. Epub 2015 Apr 29.
230. Vargas, C. A., Escribano, R., & Poulet, S. (2006). Phytoplankton food quality determines time windows for successful zooplankton reproductive pulses. *Ecology*, 87(12), 2992-2999. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87)
231. Varshney, P., Mikulic, P., Vonshak, A., Beardall, J., & Wangikar, P. P. (2015). Extremophilic micro-algae and their potential contribution in

- biotechnology. *Bioresource technology*, 184, 363-372.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.040>
232. Vizcaíno, A. J., López, G., Sáez, M. I., Jiménez, J. A., Barros, A., Hidalgo, L., & Alarcón, F. J. (2014). Effects of the microalga *Scenedesmus almeriensis* as fishmeal alternative in diets for gilthead sea bream, *Sparus aurata*, juveniles. *Aquaculture*, 431, 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.010>
233. Vuppaladadiyam, A. K., Prinsen, P., Raheem, A., Luque, R., & Zhao, M. (2018). Microalgae cultivation and metabolites production: a comprehensive review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(2), 304-324. <https://doi.org/10.1002/bbb.1864>
234. Vyas, S., Patel, A., Risse, E. N., Krikigianni, E., Rova, U., Christakopoulos, P., & Matsakas, L. (2022). Biosynthesis of microalgal lipids, proteins, lutein, and carbohydrates using fish farming wastewater and forest biomass under photoautotrophic and heterotrophic cultivation. *Bioresource Technology*, 359, 127494. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127494>
235. Wade, N. M., Gabaudan, J., & Glencross, B. D. (2017). A review of carotenoid utilisation and function in crustacean aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 9(2), 141-156. <https://doi.org/10.1111/raq.12109>
236. Wagner, N.D., Yang, Z., Scott, A.B. et al. Effects of algal food quality on free amino acid metabolism of *Daphnia*. *Aquat Sci.* 79, 127–137 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00027-016-0484-1>
237. Wang, J., Zhou, W., Chen, H., Zhan, J., He, C., & Wang, Q. (2019). Ammonium nitrogen tolerant *Chlorella* strain screening and its damaging effects on photosynthesis. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3250. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03250>
238. Wang, K., Li, K., Shao, J., Hu, W., Li, M., Yang, W., ... & Lin, Q. (2017). Yeast and corn flour supplement to enhance large-scale culture efficiency of marine copepod *Tisbe furcata*, a potential live food for fish larvae. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 69. <https://doi.org/10.46989/001c.20892>

239. Wang, S., Cao, M., Wang, B., Deng, R., Gao, Y., & Liu, P. (2019). Optimization of growth requirements and scale- up cultivation of freshwater algae *Desmodesmus armatus* using response surface methodology. *Aquaculture Research*, 50(11), 3313-3325. <https://doi.org/10.1111/are.14290>
240. Wen, X., Wang, Z., Ding, Y., Geng, Y., & Li, Y. (2020). Enhancing the production of astaxanthin by mixotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in open raceway ponds. *Aquaculture International*, 28, 625-638. <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00483-2>
241. Wichuk, K., Brynjólfsson, S., & Fu, W. (2014). Biotechnological production of value-added carotenoids from microalgae: *Emerging technology and prospects*. *Bioengineered*, 5(3), 204-208. <https://doi.org/10.4161/bioe.28720>.
242. Wolf, L., Cummings, T., Müller, K., Reppke, M., Volkmar, M., & Weuster- Botz, D. (2021). Production of β - carotene with *Dunaliella salina* CCAP19/18 at physically simulated outdoor conditions. *Engineering in Life Sciences*, 21(3-4), 115-125. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000044>
243. Wu, L. F., Chen, P. C., Huang, A. P., & Lee, C. M. (2012). The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresource Technology*, 113, 14-18. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.128>
244. Xie, Y., Ho, S. H., Chen, C. N. N., Chen, C. Y., Ng, I. S., Jing, K. J., ... & Lu, Y. (2013). Phototrophic cultivation of a thermo-tolerant *Desmodesmus sp.* for lutein production: effects of nitrate concentration, light intensity and fed-batch operation. *Bioresource technology*, 144, 435-444. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.064>.
245. Xie, Y., Lu, K., Zhao, X., Ma, R., Chen, J., & Ho, S. H. (2019). Manipulating Nutritional Conditions and Salinity- Gradient Stress for Enhanced Lutein Production in Marine Microalga *Chlamydomonas sp.* *Biotechnology Journal*, 14(4), 1800380. <https://doi.org/10.1002/biot.201800380>.
246. Xin, L., Hong-ying, H., Ke, G., & Jia, Y. (2010). Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* LX1 under different

- kinds of nitrogen sources. *Ecological Engineering*, 36(4), 379-381.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.11.003>
247. Yun, C. J., Hwang, K. O., Han, S. S., & Ri, H. G. (2019). The effect of salinity stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703. *Biomass and Bioenergy*, 127(2), 105277.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.105277>
248. Zachleder, V., Bišová, K., Vítová, M., Kubín, Š., & Hendrychová, J. (2002). Variety of cell cycle patterns in the alga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta) as revealed by application of illumination regimes and inhibitors. *European Journal of Phycology*, 37(3), 361-371. <https://doi.org/10.1017/S0967026202003815>
249. Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., & De Rosso, V. V. (Eds.). (2018). *Progress in Carotenoid Research*. BoD—Books on Demand.
250. Zmora, O., Grosse, D. J., Zou, N., & Samocha, T. M. (2013). Microalga for aquaculture: practical implications. *Handbook of microalgal culture: Applied phycology and biotechnology*, 628-652.
251. Zolotaryova, O.K., Schnyukova E.L. Sivash O.O., Mykhailenko, N.F. (2008). *Perspectives for applications of microalgae in biotechnology*. Kyiv: Alterpress. 234 p.

ДОДАТКИ

Додаток А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті:

1. Marchenko, M.M., Dorosh, I.V. & Cheban, L.M. (2019). Induction of carotenogenesis in *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew cultivated on the closed waterside from recirculating aquaculture. *Biotechnologia Acta*, 12 (2), 46-55. *Особистий внесок здобувача: вирощування досліджуваної культури, проведення досліджень по каротиногенезу, опрацювання та аналіз отриманих експериментальних даних.*
Doi: 10.15407/biotech12.02.046 (Index Copernicus),
<https://doi.org/10.15407/biotech12.02.046>
2. Cheban, L., Grynko, O. & Dorosh, I. (2018). Co-cultivation of *Daphnia magna* (Straus) and *Desmodesmus armatus* (chod.) Hegew. in recirculating aquaculture system wastewater. *Archives of Polish Fisheries*, 26, 57 – 64. Q3 *Особистий внесок здобувача: культивування мікродоростей, планування схеми експерименту, опрацювання отриманих експериментальних даних.*
Doi: 10.2478/aopf-2018-0007, (Scopus),
<https://sciendo.com/downloadpdf/journals/aopf/26/1/article-p57.pdf>
3. Cheban, L.M., Dorosh, I.V. & Marchenko, M.M. (2018). Reaction of Cells *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. on the Induction of Carotynogenesis. *International Letters of Natural Sciences*, 72, 21-27. *Особистий внесок здобувача: вирощування досліджуваної культури мікродоростей, проведення досліджень по каротиногенезу, опрацювання та аналіз отриманих експериментальних даних.*
Doi: 10.56431/p-exxa5m (Web of Science),
<https://doi.org/10.56431/p-exxa5m>
4. Khudyi, O., Marchenko, M., Cheban, L., Khuda, L., Kushniryk, O. & Malishchuk, I. (2016). Recirculating aquaculture systems waste water as a medium for increase of phytoplankton and zooplankton biomass. *International Letters of*

Natural Sciences, 54, 1-7. *Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень з фітопланктоном.*

Doi: 10.56431/p-w7i7rc (Web of Science),

<https://doi.org/10.56431/p-w7i7rc>

5. Cheban, L., Malischuk, I. & Marchenko, M. (2015). Cultivating *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. in recirculating aquaculture systems (RAS) waste water. *Archives of Polish Fisheries*, 23(3), 155 – 162. Q3 *Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті.*

Doi: 10.1515/aopf-2015-0018 (Scopus),

<https://doi.org/10.1515/aopf-2015-0018>

6. Чебан, Л.М., Маліщук, І.В., Гринько, О.Е. & Марченко, М.М. (2015). Вміст нутрієнтів у біомасі *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. та *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko, культивованій на скидній воді із УЗВ. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 7(2), 171–176. *Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання та аналіз експериментальних даних.* (Index Copernicus).

7. Маліщук, І.В., Чебан, Л.М. & Марченко, М.М. (2015). Продуктивність монокультури *Clorella vulgaris* Beijerinck, культивованої на скидній воді із установки замкнутого водопостачання. *Вісник Одеського національного університету*, 20, 1(36), 121–128. *Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті.* (Index Copernicus).

<http://visbio.onu.edu.ua/article/view/56917>

8. Маліщук, І.В., Чебан, Л.М. & Марченко, М.М. (2015). Особливості культивування *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko на скидній воді із рибоводної установки замкнутого водопостачання. *Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. Спеціальний випуск: Гідроекологія*, 3-4 (64), 428-

432. *Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті.* (Index Copernicus).

<http://dspace.tnpu.edu.ua/handle/123456789/5858>

9. Чебан, Л.М., Маліщук, І.В., Лисак, В.Р. & Марченко, М.М. (2014). Ефективність вирощування *Anabaena hassalii* (kutz.) Wittr. за різних умов культивування. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 6 (2), 145-149. *Особистий внесок здобувача: планування та проведення досліджень, опрацювання та аналіз експериментальних даних, написання статті.* (Фахове видання).

http://ibhb.chnu.edu.ua/uploads/files/vb/BS_T6_V2_2014.pdf

Патенти:

1. Марченко, М. М., Чебан, Л. М., Гринько, О. Е., Худий, О. І., Кушнірик, О. В., Худа, Л. В., & Дорош, І. В. (2017). Спосіб вирощування *Daphnia magna* (Straus, 1820) сумісно з кормовим субстратом (мікрводоростями) (Патент України № 121772). Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. *Особистий внесок здобувача: проведення досліджень із фітопланктоном, опрацювання отриманих результатів.*

<https://uapatents.com/patents/c12n-1-12>.

2. Марченко, М. М., Худий, О. І., Чебан, Л. М., Худа, Л. В., & Маліщук, І. В. (2015). Спосіб культивування фітопланктону (Патент України № 101103). Державна служба інтелектуальної власності України. *Особистий внесок здобувача: культивування фітопланктону, аналіз експериментальних даних.*

<https://ua.patents.su/7-101103-sposib-kultivuvannya-fitoplanktonu.html>

Тези:

1. Dorosh, A., Dorosh, I., Cherevko, M., Marchenko, M. & Cheban, L. (2024). Mathematical modeling of biomass and carotenoid accumulation in microalgae. *2024 International Conference on Advanced Computer Information Technologies (ACIT)*, 18-21 вересня 2024 р., Чехія, 36–39.

Doi: 10.1109/ACIT62333.2024.10712487, (Scopus),

<https://doi.org/10.1109/ACIT62333.2024.10712487>

2. Дорош, А. Б., Дорош, І. В. & Перцов, А. С. (2024). Моделювання динаміки накопичення біомаси та каротиноїдів у мікрководоростях. (Тези доповіді). *10-а Міжнародна наукова конференція «Сучасні проблеми математичного моделювання, прогнозування та оптимізації» пам'яті почесного професора Кам'янець-Подільського національного університету імені Івана Огієнка*, 27 червня 2024 року, Кам'янець-Подільський, 84–85. (Онлайн участь, доповідь).
3. Дорош, І. В. & Чебан, Л. М. (2021). Дослідження можливості використання препарату Дон-1R для отримання кормової біомаси зелених водоростей. (Тези доповіді). *XV Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія XXI століття»*, 23 квітня 2021 року, Київ, 36. (Заочна участь).
4. Чебан, Л. М., Дорош, І. В. & Ситник, М. Б. (2018). Вигодовування *Daphnia magna* (Straus, 1820) каротинвмісною біомасою *Desmodesmus* sp. (Тези доповіді). *Міжнародна науково-практична конференція «Екологічні проблеми навколишнього середовища та раціонального природокористування в контексті сталого розвитку»*, 25-26 жовтня 2018 року, Херсон, 520–524. (Заочна участь).
5. Дорош, І. В., Чебан, Л. М., & Ситник, М. Б. (2018). Вплив глюкози і ацетату натрію на продуктивність та каротиногенез *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew. (Тези доповіді). *I Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні проблеми раціонального використання водних біоресурсів»*, 15-17 травня 2018 року, Київ, 102–104. (Заочна участь).
6. Маліщук, І. В., & Марченко, М. М. (2017). Зміни активності каталази, пероксидази та цитохром оксидази *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew за індукції каротиногенезу. (Тези доповіді). *Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, присвячена 20-річчю заснування наукового фахового видання України «Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія Біологія»*, 20-22 квітня 2017 року, Тернопіль, 202-205. (Заочна участь).

7. Маліщук, І. В. & Чебан, Л. М. (2016). Індукція вторинного каротиногенезу у *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew в умовах двостадійного культивування. (Тези доповіді). *Актуальні проблеми біохімії та біотехнології. Тези доповідей конференції-конкурсу молодих учених, 26-27 травня 2016 року, Київ, 33.* (Очна участь, доповідь).
8. Маліщук, І. В., Чебан, Л. М. & Гринько, О. Е. (2016). Видовий склад фітопланктону річки Дністер. (Збірник тез). *Біотехнологія: звершення та надії: Збірник тез V Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, 12-13 травня 2016 року, Київ, 204.* (Заочна участь).
9. Маліщук, І. В., Гринько, О. Е., & Чебан, Л. М. (2015). Амінокислотний склад *Desmodesmus armatus* (Chod.) Hegew, культивованого на скидній воді із рибоводної установки замкнутого водопостачання. (Збірник тез). *«Біотехнологія XXI століття»: Тези доповідей IX Всеукраїнської науково-практичної конференції, присвяченої 170-річчю від дня народження Іллі Мечникова, 24 квітня 2015 року, Київ, 63.* (Заочна участь).
10. Маліщук, І. В., Ситник, М. Б., & Чебан, Л. М. (2015). Хлорофіли та каротиноїди *Chlorella vulgaris* Beijerinck при культивуванні на скидній воді із УЗВ. (Збірник тез). *Біотехнологія: звершення та надії: Збірник тез IV Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених, 21-22 травня 2015 року, Київ, 150.* (Заочна участь).

**Видовий склад та сезонний розподіл фітопланктону середнього
Дністра (2014 -2015 р.)**

Вид		осінь	зима	весна	Літо
<i>Actinastrum hantzschii</i> Lagerh.	Chlorophycophyta	+	-	+	+
<i>Actinastrum raphidioides</i> Brunnth.	Chlorophycophyta	+	-	-	-
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	Chlorophycophyta	+	-	+	+
<i>Amphora ovalis</i> var. <i>peduculus</i> Kutz.	Bacillariophyta	-	+	+	-
<i>Anabaena flos-aquae</i> (Lyngb.) Bred.	Cyanobacteria	-	-	+	+
<i>Anabaena spiroides</i> Klebs.	Cyanobacteria	-	-	-	+
<i>Ankistrodesmus acicularis</i> (A.Br.) Korsch.	Chlorophycophyta	+	-	+	+
<i>Ankistrodesmus angustus</i> Bern.	Chlorophycophyta	-	-	+	+
<i>Aphanizomenon flos – aquae</i> (L.) Ralfs	Cyanobacteria	+	-	+	+
<i>Aphanizomenon issatschenkoi</i> Pr.-Larv.	Cyanobacteria	-	-	+	+
<i>Aulacoseira distans</i> (Ehr.) Sim.	Bacillariophyta	-	+	-	-
<i>Aulacoseira subarctica</i> (O.Müll.) E.Y.Haw	Bacillariophyta	-	-	+	-
<i>Chlorella vulgaris</i> Beijer.	Chlorophycophyta	+	+	+	+
<i>Closterium calosporum</i> Witttr.	Chlorophycophyta	+	-	-	+
<i>Closterium exiquum</i> W. et G.S.West	Chlorophycophyta	+	-	-	-
<i>Closterium gracile</i> Breb. f. <i>gracile</i>	Chlorophycophyta	+	-	-	+
<i>Cocconeis placentula</i> Her.	Bacillariophyta	-	+	+	-
<i>Coelastrum microporum</i> Naeg.	Chlorophytophyta	+	-	-	-
<i>Coelastrum sphaericum</i> Naeg.	Chlorophycophyta	+	-	-	-
<i>Cosmarium margaritifерum</i> Menegh.	Chlorophycophyta	+	-	-	+
<i>Crucigenia apiculata</i> Schmidle	Chlorophycophyta	+	-	-	+
<i>Crucigenia quadrata</i> Morren.	Chlorophycophyta	+	-	+	-
<i>Crucigenia tetrapedia</i> (Kirch.)W. et G.S. West	Chlorophycophyta	+	-	-	-
<i>Cyclotella chaetoceros</i> Lemm.	Bacillariophyta	-	+	+	-
<i>Cyclotella comta</i> (Ehr.) Kütz.	Bacillariophyta	+	+	+	-
<i>Cyclotella melosiroides</i> (Kirch.) Lemm.	Bacillariophyta	-	+	+	-
<i>Cymatopleura solea</i> (Breb.) W. Sm.	Bacillariophyta	-	+	-	-
<i>Cymbella affinis</i> Kütz. var. <i>affinis</i>	Bacillariophyta	+	+	-	-
<i>Cymbella cistula</i> (Ehrenb.) Kirchn.	Bacillariophyta	-	+	-	-
<i>Cymbella cymbiformis</i> C.Agardh var. <i>cymbiformis</i>	Bacillariophyta	-	+	+	-
<i>Cymbella lanceolata</i> (C.Agardh) C.Agardh	Bacillariophyta	-	+	-	-
<i>Cymbella prostrata</i> (Berk.) Cl.	Bacillariophyta	-	+	-	-
<i>Diatoma vulgare</i> Bory. var. <i>vulgare</i>	Bacillariophyta	+	+	+	-
<i>Desmodesmus armatus</i>	Chlorophycophyta	+	+	+	+
<i>Epithemia sores</i> Kütz. var. <i>sores</i>	Bacillariophyta	-	+	-	-
<i>Eudorina elegans</i> Ehr.	Chlorophycophyta	+	-	+	+
<i>Euglena acus</i> Ehr. var. <i>acus</i>	Euglenophyta	+	-	-	-
<i>Euglena gracilis</i> Klebs.	Euglenophyta	-	-	-	+

<i>Euglena proxima</i> Dang.	Euglenophyta	+	-	-	-
<i>Fragilaria crotonensis</i> Kitt.	Bacillariophyta	+	+	+	-
<i>Gomphonema parvulum</i> (Kutz.) Grun.	Bacillariophyta	+	-	-	-
<i>Gomphosphaeria lacustris</i> Chod.	Cyanobacteria	-	-	-	+
<i>Koliella longiseta</i> (Visch.) Hindak.	Chlorophycophyta	+	-	-	-
<i>Melosira granulata</i> (Ehr.) Ralfs.	Bacillariophyta	+	+	-	-
<i>Melosira italica</i> (Ehr.) Kutz. var. <i>italica</i>	Bacillariophyta	+	+	-	-
<i>Melosira varians</i> Ag.	Bacillariophyta	+	-	-	-
<i>Merismopedia elegans</i> A. Br.	Cyanobacteria	-	-	+	+
<i>Merismopedia glauca</i> (Ehr.) Näg.	Cyanobacteria	-	-	-	+
<i>Microcystis aeruginosa</i> Kutz.	Cyanobacteria	-	-	+	+
<i>Microcystis ichtyoblade</i> Kutz.	Cyanobacteria	-	-	+	+
<i>Microcystis pulvereae</i> (Lemm.) Elenk.	Cyanobacteria	-	-	-	+
<i>Microcystis viridis</i> (A.Br.) Lemm.	Cyanobacteria	-	-	-	+
<i>Navicula anglica</i> Ralfs var. <i>anglica</i>	Bacillariophyta	+	+	-	-
<i>Navicula bacilliformis</i> Grun.	Bacillariophyta	-	+	-	-
<i>Navicula cryptocephala</i> Kütz.	Bacillariophyta	+	+	+	-
<i>Navicula cuspidata</i> Kütz. var. <i>cuspidata</i>	Bacillariophyta	+	+	-	-
<i>Navicula gracilis</i> Ehr.	Bacillariophyta	-	+	-	+
<i>Navicula lanceolata</i> (Ag.) Kütz.	Bacillariophyta	-	+	-	-
<i>Navicula pupula</i> W. Sm.	Bacillariophyta	-	+	+	-
<i>Navicula radiosa</i> Kütz.	Bacillariophyta	+	+	-	-
<i>Navicula rynechocephala</i> Kütz.	Bacillariophyta	+	+	-	-
<i>Navicula tuscula</i> (Ehr.) Grun. f. <i>tuscula</i>	Bacillariophyta	+	+	-	+
<i>Navicula vulpina</i> Kütz.	Bacillariophyta	+	+	-	-
<i>Nitzschia acuminata</i> (W. Sm.) Grun.	Bacillariophyta	+	+	-	-
<i>Nitzschia angustata</i> (W. Sm.) Grun.	Bacillariophyta	+	+	-	-
<i>Nitzschia denticulata</i> Grun.	Bacillariophyta	-	+	+	-
<i>Nitzschia palea</i> (Kutz.) W. Sm. var. <i>palea</i>	Bacillariophyta	-	+	-	-
<i>Nitzschia sigma</i> (Kutz.) W. Sm.	Bacillariophyta	-	+	-	-
<i>Nitzschia subtilis</i> (Kutz.) Grun.	Bacillariophyta	+	+	-	-
<i>Oscillatoria amphibia</i> C.Agardh	Cyanobacteria	-	-	-	+
<i>Oscillatoria limosa</i> Ag. f. <i>limosa</i>	Cyanobacteria	-	-	-	+
<i>Oscillatoria tenuis</i> Ag. f. <i>tenuis</i>	Cyanobacteria	+	-	-	+
<i>Pandorina morum</i> (Mull.) Bory	Chlorophytophyta	+	-	+	+
<i>Pediastrum boryanum</i> var. <i>longicorne</i> Reisch.	Chlorophytophyta	+	+	+	+
<i>Pediastrum clathratum</i> var. <i>punctatum</i>	Chlorophytophyta	+	+	+	+
<i>Pediastrum duplex</i> Meyen var. <i>duplex</i>	Chlorophytophyta	+	-	+	+
<i>Pediastrum simplex</i> Meyen	Chlorophytophyta	+	+	-	+
<i>Pediastrum tetras</i> (Her.) Ralfs.	Chlorophytophyta	+	+	+	+
<i>Phacus orbicularis</i> Hübner.	Euglenophyta	-	-	-	+
<i>Phacus pyrum</i> (Ehr.) Stein.	Euglenophyta	-	-	-	+
<i>Phormidium mucicola</i> Hub.-Pestalozzi et Naum.	Cyanobacteria	-	-	-	+
<i>Pinnularia viridis</i> (Nitzsch.) Her.	Bacillariophyta	+	-	-	-

<i>Scenedesmus acuminatus</i> (Lagerh.) Chod.	Chlorophytophyta	+	-	+	+
<i>Scenedesmus arcuatus</i> Lemm.	Chlorophytophyta	+	-	+	+
<i>Scenedesmus echinulatus</i> Deduss.	Chlorophytophyta	+	-	+	+
<i>Scenedesmus obliquus</i> (Turp.) Kutz.	Chlorophytophyta	+	-	+	+
<i>Scenedesmus opoliensis</i> Richt.	Chlorophytophyta	+	-	+	+
<i>Scenedesmus quadricauda</i> (Turp.) Breb.	Chlorophytophyta	+	+	+	+
<i>Siderocelis ornata</i> Fott.	Chlorophytophyta	-	-	-	+
<i>Sphaerocystis schroeteri</i> Chod.	Chlorophytophyta	+	-	-	+
<i>Staurostrum anatinum</i>	Chlorophytophyta	+	-	-	+
<i>Staurostrum paradoxum</i> Meyen.	Chlorophytophyta	-	-	-	+
<i>Stephanodiscus astraea</i> (Ehr.) Grun. var. <i>Astraea</i>	Bacillariophyta	+	+	-	+
<i>Stephanodiscus hantzschii</i> Grun.	Bacillariophyta	+	+	-	-
<i>Synechocystis minuscula</i> Woronich.	Cyanobacteria	-	-	-	+
<i>Synedra acus</i> Kütz.	Bacillariophyta	-	+	-	-
<i>Synedra ulna</i> (Nitzsch) Ehr.	Bacillariophyta	+	+	-	-
<i>Tetradesmus lunatus</i> Korsch.	Chlorophytophyta	-	-	-	+
<i>Tetrastrum elegans</i> Playf.	Chlorophytophyta	+	-	-	+
<i>Tribonema affine</i> G.S. West.	Heterokontophyta	+	-	-	-
<i>Volvox aureus</i> Ehr.	Chlorophytophyta	+	-	+	+

Додаток В

**Показники масонакопичення та продуктивності зоопланктону при
кокультивуванні з кормовими субстратами
($M \pm m$, $n=3$, $p \leq 0,05$)**

Показники	годування дріжджами	годування водоростями	одночасне заселення зоо- і фітопланктону	заселення зоопланктону на 3 добу	заселення зоопланктону на 6 добу
<i>Daphnia magna/Desmodesmus armatus</i>					
Кількість особин, екз./л	212±9,5	301±9,6 ^a	308±8,8	187±7,1 ^c	156±6,8
Середня довжина тіла, мм	1,9-2,1	1,9 – 2,1	1,9 – 2,1	1,9 – 2,2	2,0 – 2,3
Середня маса однієї дафнії, мг	0,19±0,006	0,19±0,007	0,19±0,007	0,21±0,008	0,27±0,001 ^c
Масонакопичення культурою, мг	40,28±1,56	57,19±1,87 ^a	58,52±1,45	39,27±1,20	42,12±1,83
Трофічна активність, %	-	85,3 ±4,02 ^b	73,4 ±2,84	45,8 ±1,22 ^c	23,1 ±0,29
Протеїни, %	47,2±2,01	51±2,14	66±2,92 ^b	55±2,15	48±2,03
Ліпіди, %	11,5±0,42	8,9±0,31	8,8±0,25	9,2±0,46	10,3±0,34
Каротиноїди, %	7,6±0,11	9,5±0,34	10,5±0,31	10,1±0,35	10,4±0,38
<i>Daphnia magna/ Acutodesmus dimorphus</i>					
Кількість особин, екз./л	186±8,3	215±9,21 ^a	209±8,5	169±5,7 ^c	103±4,4
Середня довжина тіла, мм	1,9-2,1	1,9 – 2,1	1,9 – 2,1	1,9 – 2,1	2,0 – 2,2
Середня маса однієї дафнії, мг	0,18±0,005	0,18±0,003	0,18±0,002	0,19±0,007	0,26±0,007 ^c
Масонакопичення культурою, мг	35,28±1,63	38,7±1,05	37,62±1,28	32,11±1,56 ^c	26,78±1,07
Трофічна активність, %	-	90,2 ±4,18 ^b	68,8 ±2,75	37,5 ±1,12 ^c	15,3 ±0,33
Протеїни, %	48,5±1,92	61±2,51 ^a	63±2,87	51±2,45	49±1,87
Ліпіди, %	12,8±0,19	7,8±0,35 ^a	6,9±0,22	7,8±0,35	11,8±0,26 ^c
Каротиноїди, %	8,0±0,15	8,6±0,20	9,1±0,25	10,5±0,30	10,9±0,24
<i>Moina macrocopa/Desmodesmus armatus</i>					
Кількість особин, екз./л	388±13,9	431±13,0 ^a	425±12,1	342±9,8 ^c	222±10,7
Середня довжина тіла, мм	0,8 – 1,0	0,8 – 1,0	0,8 – 1,0	0,8 – 1,1	0,9 – 1,1
Середня маса однієї дафнії, мг	0,07±0,001	0,07±0,001	0,07±0,001	0,08±0,001	0,09±0,002
Масонакопичення культурою, мг	27,16±1,13	30,17±1,14	29,75±1,33	27,46±1,00 ^c	19,98±0,91
Трофічна активність, %	-	89,5 ±3,69 ^b	73,8 ±3,15	46,7±2,25 ^c	21,6 ±1,07
Протеїни, %	48,2±1,77	63,7±2,05 ^a	62,1±2,18	55,8±2,15	51,4±1,99
Ліпіди, %	12,1±0,20	10,2±0,25 ^b	8,9±0,17	9,8±0,16	12,0±0,23
Каротиноїди, %	10,0±0,27	10,7±0,21	10,2±0,22	10,3±0,21	10,1±0,25

<i>Moina macrocopa</i> / <i>Acutodesmus dimorphus</i>					
Кількість особин, екз./л	356±13,8	448±14,7 ^a	415±10,1	300±10,7 ^c	197±11,3
Середня довжина тіла, мм	0,8 – 1,0	0,8 – 1,0	0,8 – 1,0	0,8 – 1,0	0,9 – 1,1
Середня маса однієї дафнії, мг	0,07±0,0006	0,07±0,0007	0,07±0,0006	0,07±0,001	0,09±0,0008
Масонакопичення культурою, мг	24,92±1,01	31,36±1,06 ^a	29,05±1,15	21,00±0,92 ^c	17,73±0,85
Трофічна активність, %	-	85,1 ±7,19 ^b	59,3 ±4,11	26,3 ±0,19 ^c	11,4 ±0,09
Протеїни, %	47,8±4,07	55,6±4,49	67,3±5,69	51,7±4,70	49,1±3,32
Ліпіди, %	13,2±1,05	9,7±0,76 ^a	8,6±0,93	10,9±0,88	13,0±1,16
Каротиноїди, %	7,9±0,71	8,4±0,62	9,7±0,55	10,8±0,69	10,7±0,93
<i>Semocephalus vetulus</i> / <i>Desmodesmus armatus</i>					
Кількість особин, екз./л	502±19,5	683±21,1 ^a	655±20,6	542±20,9 ^c	346±18,4
Середня довжина тіла, мм	1,3 – 1,7	1,3 – 1,7	1,3 – 1,7	1,3 – 1,8	1,3 – 1,8
Середня маса однієї дафнії, мг	0,14±0,005	0,14±0,005	0,14±0,004	0,17±0,005	0,19±0,008
Масонакопичення культурою, мг	70,28±6,81	95,62±9,02	91,7±8,87	92,14±8,93 ^c	65,74±5,34
Трофічна активність, %	-	88,1 ±4,15	64,2 ±3,17	52,8 ±2,38 ^c	32,3 ±1,53
Протеїни, %	49,2±2,15	51,9±2,48	58,8±2,09	51,3±2,11	51,9±2,19
Ліпіди, %	14,3±0,67	11,6±0,47	11,4±0,38	10,8±0,41	10,7±0,45
Каротиноїди, %	10,4±0,43	10,8±0,29	10,5±0,39	11,9±0,45	10,1±0,47
<i>Simocephalus vetulus</i> / <i>Acutodesmus dimorphus</i>					
Кількість особин, екз./л	484±17,9	674±20,0 ^a	650±19,9	492±18,7 ^c	257±11,0
Середня довжина тіла, мм	1,3 – 1,7	1,3 – 1,7	1,3 – 1,7	1,3 – 1,8	1,3 – 1,8
Середня маса однієї дафнії, мг	0,14±0,004	0,14±0,005	0,14±0,005	0,17±0,006	0,18±0,007
Масонакопичення культурою, мг	67,76±2,71	94,36±4,54 ^a	91,00±4,07	83,64±3,85 ^c	46,26±2,19
Трофічна активність, %	-	90,0 ±4,16 ^b	73,2 ±3,44	51,7 ±2,23 ^c	41,2 ±2,01
Протеїни, %	48,1±2,01	48,9±1,99	54,3±2,34	52,6±2,05	53,3±2,19
Ліпіди, %	13,3±0,55	12,1±0,41	11,3±0,41	11,4±0,36	12,1±0,43
Каротиноїди, %	9,2±0,35	10,5±0,49	10,3±0,44	10,7±0,21	10,9±0,36

Примітка: ^a – достовірна різниця між значеннями годування водоростями і дріжджами; ^b - достовірна різниця між годуванням водоростями та одночасним заселенням; ^c - достовірна різниця між показниками при заселенні зоопланктону на 3 і 6 добу

Додаток Г

**Фракційний склад каротиноїдів у *D. magna*, *S. vetulus* та *M. macrocopa*
при використанні *D. armatus* та *A. dimorphus* в якості кормових
субстратів.**

Каротиноїди	Rf	Контроль	Схема 1	Схема 2	Схема 3	Схема 4
<i>D. magna</i> + кормовий субстрат <i>D. armatus</i>						
β-каротин	0,93	25,64±1,34	40,81±1,84*	18,67±0,83	42,07±1,91*	22,34±1,07
Астаксантин та його ефіри	0,75 0,3 - 0,45	21,38±0,85	18,12±0,85	32,65±1,10*	20,63±0,76	41,15±1,66*
Адоніксантин та його ефіри	0,3 - 0,45 0,15	14,31±0,40	13,78±0,59	4,42±0,20*	9,17±0,41*	0,03±0,001*
Кантаксантин	0,51	38,49±1,54	23,56±0,61*	35,13±1,44	20,09±0,81*	25,47±1,02*
Ехіненон	0,70	0,04±0,001	0,07±0,01	0,01±0,0004	0,03±0,003	-
Зеаксантин	0,14	0,06±0,001	0,08±0,01	-	0,09±0,002	-
Лютеїн	0,2	0,08±0,002	0,15±0,007	0,12±0,47	0,09±0,002	0,01±0,005
<i>D. magna</i> + кормовий субстрат <i>A. dimorphus</i>						
β-каротин	0,93	45,32±1,77	19,67±0,73*	11,09±0,50*	16,09±0,22*	14,63±0,31*
Астаксантин та його ефіри	0,75 0,3- 0,45	14,04±0,32	24,86±1,47*	31,40±1,05*	27,41±1,33*	29,05±1,04*
Адоніксантин та його ефіри	0,3 - 0,45 0,15	5,63±0,33	7,68±0,34	0,08±0,003*	9,54±0,43*	0,125±0,006*
Кантаксантин	0,51	34,89±1,58	28,63±1,16*	45,26±1,66*	31,62±1,38	41,42±1,79*
Ехіненон	0,70	0,08±0,002	0,05±0,53	0,08±0,002	0,08±0,006	0,07±0,003
Зеаксантин	0,14	-	-	-	0,01±0,0001	-
Лютеїн	0,2	0,04±0,001	0,01±0,0001	0,09±0,003	0,05±0,001	0,06±0,002
<i>M. macrocopa</i> + кормовий субстрат <i>D. armatus</i>						
β-каротин	0,93	24,94±1,15	36,02±1,61*	42,36±2,10*	32,84±1,31*	44,28±2,02*
Астаксантин та його ефіри	0,75 0,3- 0,45	21,75±1,18	30,85±1,06*	17,30±0,37	41,10±2,09*	17,69±0,71
Адоніксантин та його ефіри	0,3 - 0,45 0,15	6,39±0,30	11,32±0,48*	20,11±1,00*	13,69±0,59*	18,52±,31*
Кантаксантин	0,51	26,42±1,35	12,06±0,47*	17,18±0,26*	11,00±0,57*	14,44±0,25*
Ехіненон	0,70	0,05±0,004	0,05±0,004	0,04±0,003	0,06±0,004	0,05±0,002
Зеаксантин	0,14	0,03±0,006	-	-	0,01±0,001	-
Лютеїн	0,2	0,02±0,004	-	0,01±0,001	-	0,02±0,001
<i>M. macrocopa</i> + кормовий субстрат <i>A. dimorphus</i>						
β-каротин	0,93	20,08±1,00	25,89±1,11	31,16±1,64*	22,07±1,07	29,57±1,17*
Астаксантин та його ефіри	0,75 0,3- 0,45	26,07±1,08	27,54±1,15	36,75±1,78*	29,38±1,39*	32,64±1,53*

Адоніксантин та його ефіри	0,3 – 0,45 0,15	13,24±0,65	27,22±1,35*	5,83±0,22*	26,28±1,24*	8,97±0,35*
Кантаксантин	0,51	22,58±1,05	19,29±0,95*	24,77±1,11	22,23±1,06	25,58±1,15*
Ехіненон	0,70	0,03±0,005	-	0,03±0,005	-	0,06±0,002
Зеаксантин	0,14	0,02±0,001	-	-	-	-
Лютеїн	0,2	0,05±0,007	0,06±0,001	0,06±0,001	0,04±0,001	0,08±0,003
<i>S. vetulus</i> + кормовий субстрат <i>D. armatus</i>						
β-каротин	0,93	36,55±1,56	32,17±1,53	43,62±1,15*	39,84±1,63*	44,51±2,22*
Астаксантин та його ефіри	0,75 0,3- 0,45	19,64±0,85	31,63±1,53*	35,85±1,65*	29,22±1,45*	31,80±1,47*
Адоніксантин та його ефіри	0,3 – 0,45 0,15	21,97±0,86	2,64±0,13*	4,06±0,07*	2,03±0,10*	7,17±0,35*
Кантаксантин	0,51	21,74±1,05	33,56±1,65*	15,80±0,74*	28,91±1,32*	16,25±0,81*
Ехіненон	0,70	0,06±0,001	-	-	-	-
Зеаксантин	0,14	0,05±0,001	-	0,07±0,003	-	0,07±0,001
Лютеїн	0,2	-	-	-	-	-
<i>S. vetulus</i> + кормовий субстрат <i>A. dimorphus</i>						
β-каротин	0,93	31,28±1,51	34,34±1,45	40,63±1,87*	40,84±1,83*	38,65±1,11*
Астаксантин та його ефіри	0,75 0,3- 0,45	21,74±1,05	30,74±1,43*	36,93±1,36*	25,36±1,42	37,51±1,52*
Адоніксантин та його ефіри	0,3 – 0,45 0,15	23,22±1,10	5,73±0,28*	11,62±0,55*	6,24±0,33*	10,42±0,47*
Кантаксантин	0,51	23,71±1,05	29,19±1,14*	10,82±0,39*	27,56±1,07*	13,40±0,28*
Ехіненон	0,70	0,01±0,001	-	-	-	-
Зеаксантин	0,14	0,03±0,001	-	0,01±0,001	-	0,02±0,001
Лютеїн	0,2	-	-	-	-	-

Примітка: * - відмінності між групами схем і контролю є статистично значущими $p \leq 0,05$.

Фрагмент програмного коду в середовищі Wolfram Mathematica

- при дії активуючого субстрату:

```
sol=ParametricNDSolveValue[{
c'[t]==(muM*Ks/(Kps2+Ks))*c[t]*S[t]-mu1*c[t],
P'[t]==(Kps1*S[t]/(Kps2+S[t]))*c[t]-Kpc*P[t],
S'[t]== -(muM/Ycs+qp/Yps)*c[t],
c[0]==c0,P[0]==P0,S[0]==S0},{c,P,S},{t,0,9},{muM,Ks,mu1,Kpc,Kps1,Kps2,qp,Yc
s,Yps,c0,P0,S0}]
```

```
TableForm[Table[{sol[0.87,1200,0.843,0.028,1.6,1,0.017,0.021,0.009,11.02,10.7,
5.16][[i]][t]},{t,0,9,3},{i,1,3}],
TableHeadings->{None,{"c[t]","P[t]","S[t]"}}]
```

```
Manipulate[Plot[Evaluate[#][t]
```

- при дії інгібуючого субстрату:

```
sol = ParametricNDSolveValue[{
c'[t] == muM/(1 + S[t]/Kcs)*c[t] - mu1*c[t],
P'[t] == (Kps1*S[t]/(Kps2 + S[t]))*c[t] - Kpc*P[t],
S'[t] == 0,
c[0] == c0, P[0] == P0, S[0] == S0}, {c, P, S}, {t, 0, 9}, {muM, Kcs, mu1, Kpc,
Kps1, Kps2, c0, P0, S0}]
```

```
TableForm[Table[>(*t,*) sol[0.87, 1200, 0.843, 0.028, 1.6, 1, 11.02, 10.7, 0][[i]][t],
{t, 0, 9, 3}, {i, 1, 3}],
TableHeadings -> {None, {(*"Доба(t)",*)"c[t]", "P[t]", "S[t]"}}]
```

```
Manipulate[Plot[Evaluate[#][t] & /@ sol[muM, Kcs, mu1, Kpc, Kps1, Kps2, c0, P0,
S0]], {t, 0, 9}, PlotLegends -> {Біомаса, Каротиноїди, Субстрат}], {{muM, 0.87},
0, 100}, {{Kcs, 1200}, 0, 2000}, {{mu1, 0.843}, 0, 100}, {{Kpc, 0.028}, 0, 100},
{{Kps1, 1.6}, 0, 100}, {{Kps2, 1}, 0, 100}, {{c0, 11.02}, 0, 100}, {{P0, 10.7}, 0,
100}, {{S0, 0}, 0, 100}]
```

Програмний код додатку мовою Python**- вікно вибору моделі**

```
import tkinter as tk
import os
import subprocess
from tkinter import scrolledtext

class FileOpenerApp:
    def __init__(self, root):
        self.root = root
        self.root.title("Вибір файлу для відкриття")

        window_width = 300
        window_height = 200
        screen_width = root.winfo_screenwidth()
        screen_height = root.winfo_screenheight()
        x_coordinate = (screen_width - window_width) // 2
        y_coordinate = (screen_height - window_height) // 2

        root.geometry(f"{window_width}x{window_height}+{x_coordinate}+{y_coordinate}
        ")

        custom_bold_font = ("Helvetica", 14, "bold")
        self.bold_label = tk.Label(root, text="Модель балансу для:",
        font=custom_bold_font)
        self.bold_label.pack()

        #self.label = tk.Label(root, text="Модель балансу для:")
        #self.label.pack(pady=10)

        # Гіперпосилання на main.py
        custom_font = ("Arial", 12, "bold italic")
```

```

self.main_link = tk.Label(root, text="- Інгібуючого субстрату", fg="blue",
cursor="hand2", font=custom_font)
self.main_link.pack(pady=5)
self.main_link.bind("<Button-1>", lambda event: self.open_file("main.py"))

# Гіперпосилання на app.py
custom_font = ("Arial", 12, "bold italic")
self.app_link = tk.Label(root, text="- Активууючого субстрату", fg="blue",
cursor="hand2", font=custom_font)
self.app_link.pack(pady=5)
self.app_link.bind("<Button-1>", lambda event: self.open_file("app.py"))

def open_file(self, file_name):
    file_path = os.path.join(os.path.dirname(__file__), file_name)
    subprocess.run(["python", file_path])

if __name__ == "__main__":
    root = tk.Tk()
    app = FileOpenerApp(root)
    root.mainloop()

```

- вікно «Інгібуючий субстрат»

```

import numpy as np
from scipy.integrate import solve_ivp
import matplotlib.pyplot as plt
from tkinter import *
from tkinter import ttk
import tkinter as tk
from tkinter import Tk
from matplotlib.backends.backend_tkagg import FigureCanvasTkAgg

def parametric_ndsolve_value(t, y, muM, Kcs, mu1, Kpc, Kps1, Kps2):
    c, P, S = y
    dc_dt = muM / (1 + S / Kcs) * c - mu1 * c
    dP_dt = Kpc * c + Kps1 * S / (Kps2 + S)

```

```

dS_dt = 0
return [dc_dt, dP_dt, dS_dt]

c0 = 11.02
P0 = 10.7
S0 = 0

muM = 0.87
Kcs = 1200
mu1 = 0.843
Kpc = 0.028
Kps1 = 1.6
Kps2 = 1

t_eval = np.linspace(0, 9, 1000)

sol = solve_ivp(parametric_ndsolve_value, (0, 9), [c0, P0, S0], args=(muM, Kcs, mu1,
Kpc, Kps1, Kps2), t_eval=t_eval)

global_master = None
class GUI:
    def __init__(self, master):
        self.master = master
        global_master = master
        master.title("Інгібууючий субстрат")

        self.muM_label = Label(master, text="muM:")
        self.muM_slider = Scale(master, from_=0, to=100, resolution=0.01,
orient=HORIZONTAL, command=self.update_plot)
        self.muM_slider.set(muM)
        self.muM_entry = Entry(master)

        self.Kcs_label = Label(master, text="Kcs:")
        self.Kcs_slider = Scale(master, from_=0, to=1000, resolution=1,
orient=HORIZONTAL, command=self.update_plot)

```



```

self.Kcs_slider.set(Kcs)
self.Kcs_entry = Entry(master)

self.mu1_label = Label(master, text="mu1:")
self.mu1_slider = Scale(master, from_=0, to=100, resolution=0.01,
orient=HORIZONTAL, command=self.update_plot)
self.mu1_slider.set(mu1)
self.mu1_entry = Entry(master)

self.Kpc_label = Label(master, text="Kpc:")
self.Kpc_slider = Scale(master, from_=0, to=100, resolution=0.01,
orient=HORIZONTAL, command=self.update_plot)
self.Kpc_slider.set(Kpc)
self.Kpc_entry = Entry(master)

self.Kps1_label = Label(master, text="Kps1:")
self.Kps1_slider = Scale(master, from_=0, to=100, resolution=0.01,
orient=HORIZONTAL, command=self.update_plot)
self.Kps1_slider.set(Kps1)
self.Kps1_entry = Entry(master)

self.Kps2_label = Label(master, text="Kps2:")
self.Kps2_slider = Scale(master, from_=0, to=100, resolution=0.01,
orient=HORIZONTAL, command=self.update_plot)
self.Kps2_slider.set(Kps2)
self.Kps2_entry = Entry(master)

self.c0_label = Label(master, text="c0:")
self.c0_slider = Scale(master, from_=0, to=100, resolution=0.01,
orient=HORIZONTAL, command=self.update_plot)
self.c0_slider.set(c0)
self.c0_entry = Entry(master)

self.P0_label = Label(master, text="P0:")

```

```

        self.P0_slider = Scale(master, from_=0, to=100, resolution=0.01,
orient=HORIZONTAL, command=self.update_plot)
        self.P0_slider.set(P0)
        self.P0_entry = Entry(master)

        self.S0_label = Label(master, text="S0:")
        self.S0_slider = Scale(master, from_=0, to=100, resolution=0.01,
orient=HORIZONTAL, command=self.update_plot)
        self.S0_slider.set(S0)
        self.S0_entry = Entry(master)

        self.quit_button = Button(master, text="Вихід", command=master.destroy)

        self.update_button = Button(master, text="Оновити графік",
command=self.update_from_entry)

        self.muM_label.grid(row=0, column=0, padx=10, ipady=1, sticky=W)
        self.muM_slider.grid(row=0, column=1, padx=10, ipady=1, sticky=W)
        self.muM_entry.grid(row=0, column=2, padx=10, ipady=1, sticky=W)

        self.Kcs_label.grid(row=1, column=0, padx=10, ipady=1, sticky=W)
        self.Kcs_slider.grid(row=1, column=1, padx=10, ipady=1, sticky=W)
        self.Kcs_entry.grid(row=1, column=2, padx=10, ipady=1, sticky=W)

        self.mu1_label.grid(row=2, column=0, padx=10, ipady=1, sticky=W)
        self.mu1_slider.grid(row=2, column=1, padx=10, ipady=1, sticky=W)
        self.mu1_entry.grid(row=2, column=2, padx=10, ipady=1, sticky=W)

        self.Kpc_label.grid(row=3, column=0, padx=10, ipady=1, sticky=W)
        self.Kpc_slider.grid(row=3, column=1, padx=10, ipady=1, sticky=W)
        self.Kpc_entry.grid(row=3, column=2, padx=10, ipady=1, sticky=W)

        self.Kps1_label.grid(row=4, column=0, padx=10, ipady=1, sticky=W)
        self.Kps1_slider.grid(row=4, column=1, padx=10, ipady=1, sticky=W)
        self.Kps1_entry.grid(row=4, column=2, padx=10, ipady=1, sticky=W)

```

```

self.Kps2_label.grid(row=5, column=0, padx=10, ipady=1, sticky=W)
self.Kps2_slider.grid(row=5, column=1, padx=10, ipady=1, sticky=W)
self.Kps2_entry.grid(row=5, column=2, padx=10, ipady=1, sticky=W)

```

```

self.c0_label.grid(row=6, column=0, padx=10, ipady=1, sticky=W)
self.c0_slider.grid(row=6, column=1, padx=10, ipady=1, sticky=W)
self.c0_entry.grid(row=6, column=2, padx=10, ipady=1, sticky=W)

```

```

self.P0_label.grid(row=7, column=0, padx=10, ipady=1, sticky=W)
self.P0_slider.grid(row=7, column=1, padx=10, ipady=1, sticky=W)
self.P0_entry.grid(row=7, column=2, padx=10, ipady=1, sticky=W)

```

```

self.S0_label.grid(row=8, column=0, padx=10, ipady=1, sticky=W)
self.S0_slider.grid(row=8, column=1, padx=10, ipady=1, sticky=W)
self.S0_entry.grid(row=8, column=2, padx=10, ipady=1, sticky=W)

```

```

self.quit_button.grid(row=9, column=2, pady=1, sticky=W)
self.update_button.grid(row=9, column=1, pady=1, sticky=W)

```

```

self.plot_solutions()

```

Функція для зміни значення текстового поля.

```

def set_text(self, text_field, new_value):

```

```

    text_field.delete(0,END)
    text_field.insert(0,new_value)
    return

```

```

def update_plot(self, t=None):

```

```

    muM = self.muM_slider.get()
    Kcs = self.Kcs_slider.get()
    mu1 = self.mu1_slider.get()
    Kpc = self.Kpc_slider.get()
    Kps1 = self.Kps1_slider.get()

```

```

Kps2 = self.Kps2_slider.get()
c0 = self.c0_slider.get()
P0 = self.P0_slider.get()
S0 = self.S0_slider.get()

# Оновлюємо значення текстових полів на основі значень повзунків
self.set_text(self.muM_entry,muM)
self.set_text(self.Kcs_entry,Kcs)
self.set_text(self.mu1_entry,mu1)
self.set_text(self.Kpc_entry,Kpc)
self.set_text(self.Kps1_entry,Kps1)
self.set_text(self.Kps2_entry,Kps2)

self.set_text(self.c0_entry,c0)
self.set_text(self.P0_entry,P0)
self.set_text(self.S0_entry,S0)

self.plot_solutions(muM, Kcs, mu1, Kpc, Kps1, Kps2, c0, P0, S0)

def update_from_entry(self):
    muM_entry_value = self.muM_entry.get()
    Kcs_entry_value = self.Kcs_entry.get()
    mu1_entry_value = self.mu1_entry.get()
    Kpc_entry_value = self.Kpc_entry.get()
    Kps1_entry_value = self.Kps1_entry.get()
    Kps2_entry_value = self.Kps2_entry.get()

    c0_entry_value = self.c0_entry.get()
    P0_entry_value = self.P0_entry.get()
    S0_entry_value = self.S0_entry.get()

    self.muM_slider.set(muM_entry_value)
    self.Kcs_slider.set(Kcs_entry_value)
    self.mu1_slider.set(mu1_entry_value)
    self.Kpc_slider.set(Kpc_entry_value)

```

```

self.Kps1_slider.set(Kps1_entry_value)
self.Kps2_slider.set(Kps2_entry_value)

self.c0_slider.set(c0_entry_value)
self.P0_slider.set(P0_entry_value)
self.S0_slider.set(S0_entry_value)

self.update_plot(t=None)

def plot_solutions(self, muM=muM, Kcs=Kcs, mu1=mu1, Kpc=Kpc, Kps1=Kps1,
Kps2=Kps2, c0=c0, P0=P0, S0=S0):
    sol = solve_ivp(parametric_ndsolve_value, (0, 9), [c0, P0, S0], args=(muM, Kcs,
mu1, Kpc, Kps1, Kps2), t_eval=t_eval)

    plt.clf()

    plt.plot(sol.t, sol.y[0], label='Біомаса')
    plt.plot(sol.t, sol.y[1], label='Каротиноїди')
    plt.plot(sol.t, sol.y[2], label='Субстрат')
    plt.xlabel('Доба')
    plt.ylabel('Концентрація')
    plt.legend()

    canvas = FigureCanvasTkAgg(plt.gcf(), master=self.master)
    canvas.draw()
    canvas.get_tk_widget().grid(row=0, column=3, rowspan=10, padx=10, pady=0,
sticky=W)

root = Tk()
app = GUI(root)
root.mainloop()

class TooltipLabel(tk.Label):
    def __init__(self, master=None, tooltip_text="", **kwargs):
        super().__init__(master, **kwargs)

```

```

self.tooltip_text = tooltip_text
self.tooltip_toplevel = None
self.bind("<Enter>", self.show_tooltip)
self.bind("<B1-Motion>", self.hide_tooltip)
self.bind("<ButtonRelease-1>", self.hide_tooltip)

def show_tooltip(self, event):
    x, y, _, _ = self.bbox("insert")
    x += self.winfo_rootx() + 25
    y += self.winfo_rooty() + 25

    self.tooltip_toplevel = tk.Toplevel(self.master)
    self.tooltip_toplevel.overrideredirect(True)
    self.tooltip_toplevel.geometry(f"+{x}+{y}")

    tooltip_label = tk.Label(self.tooltip_toplevel, text=self.tooltip_text,
background="#ffffe0", relief="solid", borderwidth=1)
    tooltip_label.pack()

    self.tooltip_toplevel.transient(self.master)
    self.tooltip_toplevel.wait_visibility()
    self.tooltip_toplevel.lift()

def hide_tooltip(self, event):
    if self.tooltip_toplevel:
        self.tooltip_toplevel.destroy()

if __name__ == "__main__":
    root = tk.Tk()

    label = TooltipLabel(root, text="... ", tooltip_text="... ")
    label.pack(padx=20, pady=20)

    root.mainloop()

```

- **вікно «Активуєчий субстрат»**

```

import numpy as np
from scipy.integrate import solve_ivp
import matplotlib.pyplot as plt
from tkinter import *
from tkinter import ttk
from matplotlib.backends.backend_tkagg import FigureCanvasTkAgg

def parametric_ndsolve_value(t, y, muM, Ks, mu1, Kpc, Kps1, Kps2, qp, Ycs, Yps,
c0, P0, S0):
    c, P, S = y
    dc_dt = (muM * Ks / (Kps2 + Ks)) * c * S - mu1 * c
    dP_dt = (Kps1 * S / (Kps2 + S)) * c - Kpc * P
    dS_dt = - (muM / Ycs + qp / Yps) * c + Kps1 * S / (Kps2 + S)
    return [dc_dt, dP_dt, dS_dt]

c0 = 11.02
P0 = 10.7
S0 = 5.16

muM = 0.87
Ks = 1200
mu1 = 0.843
Kpc = 0.028
Kps1 = 1.6
Kps2 = 1
qp = 0.017
Ycs = 0.021
Yps = 0.009

t_eval = np.linspace(0, 9, 1000)

sol = solve_ivp(parametric_ndsolve_value, (0, 9), [c0, P0, S0],

```

```

        args=(muM, Ks, mu1, Kpc, Kps1, Kps2, qp, Ycs, Yps, c0, P0, S0),
        t_eval=t_eval)

def update_and_plot_solution(muM, Ks, mu1, Kpc, Kps1, Kps2, qp, Ycs, Yps, c0, P0,
S0):
    sol = solve_ivp(parametric_ndsolve_value, (0, 9), [c0, P0, S0],
        args=(muM, Ks, mu1, Kpc, Kps1, Kps2, qp, Ycs, Yps, c0, P0, S0),
        t_eval=t_eval)

    plt.clf()

    plt.plot(sol.t, sol.y[0], label='Біомаса')
    plt.plot(sol.t, sol.y[1], label='Каротиноїди')
    plt.plot(sol.t, sol.y[2], label='Субстрат')
    plt.xlabel('Доба')
    plt.ylabel('Концентрація')
    plt.legend()

    canvas = FigureCanvasTkAgg(plt.gcf(), master=window)
    canvas.draw()
    canvas.get_tk_widget().grid(row=0, column=3, rowspan=13, padx=10, pady=0,
sticky=W)

window = Tk()
window.title("Активуючий субстрат")

parameters = ["muM", "Ks", "mu1", "Kpc", "Kps1", "Kps2", "qp", "Ycs", "Yps",
"c0", "P0", "S0"]
slider_values = [muM, Ks, mu1, Kpc, Kps1, Kps2, qp, Ycs, Yps, c0, P0, S0]

entry_variables = []
sliders = []

def set_slider_value(param, value):

```



```

index = parameters.index(param)
slider_values[index] = float(value)
slider.set(slider_values[index])
entry_var.set(value)
update_and_plot_solution(*slider_values)

for i, param in enumerate(parameters):
    label = Label(window, text=f"{param}:")
    slider = Scale(window, from_=0, to=100, resolution=0.01, orient=HORIZONTAL,
command=lambda val, param=param: set_slider_value(param, val))
    slider.set(slider_values[i])
    sliders.append(slider)

    entry_var = StringVar(value=str(slider_values[i]))
    entry = Entry(window, textvariable=entry_var)
    entry.bind("<Return>", lambda event, param=param: set_slider_value(param,
entry_var.get()))

    entry_variables.append(entry_var)

    label.grid(row=i, column=0, padx=10, ipady=1, sticky=W)
    slider.grid(row=i, column=1, padx=10, ipady=1, sticky=W)
    entry.grid(row=i, column=2, padx=10, ipady=1, sticky=W)

def update_entry_values():
    for i, entry_var in enumerate(entry_variables):
        slider_values[i] = float(entry_var.get())
        sliders[i].set(slider_values[i])
    update_and_plot_solution(*slider_values)

quit_button = Button(window, text="Вихід", command=window.destroy)
update_button = Button(window, text="Оновити графік",
command=update_entry_values)
quit_button.grid(row=len(parameters), column=2, pady=1, sticky=W)
update_button.grid(row=len(parameters), column=1, pady=1, sticky=W)

```

```
update_and_plot_solution(muM, Ks, mu1, Kpc, Kps1, Kps2, qp, Ycs, Yps, c0, P0,
S0)
```

```
window.mainloop()
```

```
import tkinter as tk
```

```
class FileOpenerApp:
```

```
    def __init__(self, root):
```

```
        self.root = root
```

```
        self.root.title("Довідка")
```

```
        window_width = 600
```

```
        window_height = 400
```

```
        screen_width = root.winfo_screenwidth()
```

```
        screen_height = root.winfo_screenheight()
```

```
        x_coordinate = (screen_width - window_width) // 2
```

```
        y_coordinate = (screen_height - window_height) // 2
```

```
root.geometry(f"{window_width}x{window_height}+{x_coordinate}+{y_coordinate
}")
```

```
    custom_bold_font = ("Helvetica", 20, "bold")
```

```
    self.bold_label = tk.Label(root, text="Довідка", font=custom_bold_font)
```

```
    self.bold_label.pack()
```

```
    text_content = (
```

```
        "muM – питома швидкість накопичення біомаси, яка визначається  
фізіологічними особливостями культури, а також умовами культивування;\n"
```

```
        "mu1 – питома швидкість відмирання біомаси у процесі  
біотехнологічного процесу;\n"
```

```
        "Kcs – константа інгібування або стимулювання росту біомаси  
субстратом;\n"
```

```
        "Kps1 – рівень впливу субстрату на швидкість накопичення продукту;\n"
```

```
        "Ks – гранично допустиме значення концентрації стимулюючого  
субстрату;\n"
```

" K_{pc} – швидкість деградації продукту в процесі культивування;\n"
 " Y_{cs} - коефіцієнт затрат субстрату на нарощення біомаси;\n"
 " Y_{ps} - коефіцієнт затрат субстрату на синтез цільового продукту.")

#text_content = (

 #" μ_M – specific rate of biomass accumulation, which is determined by the physiological characteristics of the crop, as well as the conditions of cultivation;\n"

 #" μ_l – specific rate of biomass decay during the biotechnological process;\n"

 #" K_{cs} – constant of inhibition or stimulation of biomass growth by the substrate;\n"

 #" K_{psl} – the level of influence of the substrate on the rate of product accumulation;\n"

 #" K_s – maximum permissible concentration of the stimulating substrate;\n"

 #" K_{pc} – degradation rate of the product during cultivation;\n"

 #" Y_{cs} - substrate consumption factor for biomass growth;\n"

 #" Y_{ps} - substrate consumption factor for the synthesis of the target product."

text_font = ("Helvetica", 13, "bold")

self.text_label = tk.Label(root, text=text_content, wraplength=550, justify=tk.LEFT, font=text_font)

self.text_label.pack(pady=10)

if __name__ == "__main__":

 root = tk.Tk()

 app = FileOpenerApp(root)

 root.mainloop()