

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

Факультет харчових технологій та біотехнологій

Кафедра біотехнологій та радіології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня магістра

**на тему: «Дослідження впливу фізико-хімічних факторів
на ріст мікроводоростей *Tetraselmis* sp. для підвищення
продуктивності їх біомаси в умовах лабораторного
культивування»**

Виконала: студентка 2 курсу,
групи 1, спеціальності
G21 Біотехнології та біоінженерія
Шигда О. С.

Керівник: Малишева Х. В.

Рецензент: Руденко О. П.

Робота заслухана на засіданні кафедри біотехнології та радіології і
рекомендована до захисту, протокол № __ від ____ 2025 р.

Завідувач кафедри біотехнології та радіології

Буцяк В. І.

ЛЬВІВ – 2025

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького

Інститут, факультет, відділення факультет харчових технологій та біотехнологій

Кафедра, циклова комісія кафедра біотехнологій та радіології

Освітньо-кваліфікаційний рівень магістр

Спеціальність G21 Біотехнології та біоінженерія

ОПП Біотехнології та біоенергетика

ЗАТВЕРДЖУЮ

завідувач кафедри, голова циклової
комісії _____ **Буцяк В.І.**
“ _____ ” _____ 2025 року

**ЗАВДАННЯ
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧА**

Шигди Ольги Степанівни

1. Тема кваліфікаційної роботи «Дослідження впливу фізико-хімічних факторів на ріст мікроводоростей *Tetraselmis* sp. для підвищення продуктивності їх біомаси в умовах лабораторного культивування»

Керівник кваліфікаційної роботи

Малишева Христина Володимирівна, к.б.н.

затверджені наказом вищого навчального закладу від 20.06.2025 року №497-4

2. Строк подання кваліфікаційної роботи 18.11.2025 року

3. Вихідні дані до кваліфікаційної роботи.

Вихідні матеріали до виконання роботи: культура морської мікроводорості *Tetraselmis* sp.; поживні середовища; стандартне лабораторне обладнання для клітинної та мікроводоростевої біотехнології (кабінет біобезпеки II класу, автоклав, шейкер-інкубатор, рН-метр, система аерації та подачі CO₂, фітосвітильник, мікроскоп Carl Zeiss AxioLab A1 FL з цифровою камерою, гемоцитометр, спектрофотометр); програмне забезпечення Microsoft Excel для статистичної обробки результатів досліджень.

4. Зміст кваліфікаційної роботи (перелік питань, які потрібно розробити) Вступ, огляд літератури, матеріали та методи досліджень, результати власних досліджень та їх обговорення, висновки, список використаної літератури.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень) графіки, діаграми, рисунки, технологічні схеми, технологічні лінії) Рисунки: внутрішня будова і зовнішній вигляд *Tetraselmis* sp.; щільність клітин

Tetraselmis sp. за різних варіантів мінерального забезпечення (Walne, Conway, f/2 у концентраціях 0,5×, 1×, 2×); оптична густина (OD₆₈₀) культури *Tetraselmis* sp. за різних варіантів мінерального забезпечення (Walne, Conway, f/2 у концентраціях 0,5×, 1×, 2×); вплив температури на щільність клітинної суспензії *Tetraselmis* sp.; вплив кислотно-лужних умов (pH) на щільність клітинної суспензії *Tetraselmis* sp.; вплив солоності на щільність клітинної суспензії *Tetraselmis* sp.; вплив режимів аерації та CO₂ на ріст *Tetraselmis* sp.; вплив спектрального складу світла на щільність клітинної суспензії *Tetraselmis* sp. за сталої інтенсивності освітлення; вплив тривалості фотоперіоду на біомасоутворення *Tetraselmis* sp. Таблиці: порівняльні біохімічні характеристики видів роду *Tetraselmis* за даними літератури; склад поживних середовищ, використаних у дослідженні; показники росту культури *Tetraselmis* sp. за різних температурних умов; вплив pH на кінцеву щільність культури *Tetraselmis* sp.

6. Консультанти розділів кваліфікаційної роботи

Розділ	Консультант ПІБ, посада	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
1.Літературний огляд	ст.викл. Малишева Х.В.		
2.Методика експерименту та основні методи досліджень	ст.викл. Малишева Х.В.		
3.Експериментальна частина	ст.викл. Малишева Х.В.		
4.Висновки	ст.викл. Малишева Х.В.		

7. Дата видачі завдання 8.09.2025 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання	Примітка
1.	Літературний огляд.		
	I атестація:	07.10.25 р.	30%
2.	Методика експерименту та основні методи досліджень.		20%
3.	Експериментальна частина.		35%
	II атестація:	10.11.25 р.	55%
4.	Висновки		5%
	III атестація:	17.11.25 р.	15%
	Допущено до захисту.	10.12.25 р.	100%

Здобувач

Ольга ШИГДА

(підпис)

(прізвище та ініціали)

Керівник кваліфікаційної роботи

Христина МАЛИШЕВА

(підпис)

(прізвище та ініціали)

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	6
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	8
ВСТУП.....	9
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	11
1.1. Загальна характеристика роду <i>Tetraselmis</i> як об'єкта біотехнологічних досліджень.....	11
1.1.1. Таксономічне положення та філогенетична різноманітність роду <i>Tetraselmis</i>	11
1.1.2. Морфологічні та ультраструктурні особливості представників роду <i>Tetraselmis</i>	12
1.1.3. Ріст і фізіолого-біохімічні особливості представників роду <i>Tetraselmis</i> ..	14
1.1.5. Екологічна пластичність і толерантність представників роду <i>Tetraselmis</i>	18
1.1.6. Розмноження та життєвий цикл представників роду <i>Tetraselmis</i>	20
1.2. Поживні середовища для морських мікроводоростей	21
1.2.1. Типи поживних середовищ для морських мікроводоростей.....	21
1.2.2. Макроелементи.....	22
1.2.3. Мікроелементи	22
1.2.4. Вітаміни.....	23
1.2.5. Солоність, буферні системи та водна основа поживних середовищ	23
1.2.6. Регулювання поживного складу та експериментальна оптимізація.....	23
1.3. Вплив ключових фізико-хімічних факторів ріст <i>Tetraselmis</i> spp.	24
1.3.1. Інтенсивність світла, фотоперіод та спектральний склад.....	24
1.3.2. Температура.	25
1.3.3. pH та подача вуглецю (CO ₂ /аерація).	25
1.3.4. Солоність.....	25
1.3.5. Мінеральний склад.....	26
1.3.6. Комплексна оптимізація факторів середовища	26
1.4. Показники росту й якості біомаси.....	26

	3
1.4.1. Суха маса та беззольна суха маса.....	27
1.4.2. Питома швидкість росту.....	27
1.4.3. Вміст хлорофілу <i>a</i>	27
1.4.4. Вміст білків, вуглеводів і ліпідів	27
1.4.5. Пігментний склад та антиоксидантні властивості.....	28
1.4.6. Морфологічні характеристики та життєздатність клітин	28
1.4.7. Інтегральна оцінка якості біомаси.....	29
1.5. Підходи до оптимізації умов культивування	29
1.5.1. Дизайн Плакета–Бермана	30
1.5.2. Повні та дробні факторні дизайни.....	30
1.5.3. Методологія поверхні відгуку	31
1.5.4. Підхід із використанням функції бажаності.....	32
1.5.5. Інтегроване застосування та переваги	32
1.6. Стерильність, контроль контамінацій, якість води та відтворюваність у культивуванні <i>Tetraselmis</i> spp.....	33
1.6.1. Стерильність та асептичні техніки.....	34
1.6.2. Джерела та типи контамінацій.....	34
1.6.3. Якість води.....	35
1.6.4. Відтворюваність та система забезпечення якості.....	36
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	38
2.1. Об'єкт дослідження.....	38
2.2. Поживні середовища.....	38
2.3. Умови культивування	40
2.3.1. Температурний режим	41
2.3.2. Контроль рН.....	41
2.3.3. Параметри світлового режиму.....	41
2.3.4. Параметри осмотичного та газового режимів.....	42
2.4. Морфологічний та кількісний аналіз культури.....	42
2.5. Визначення сухої маси та беззольної сухої маси.....	43
2.6. Визначення питомої швидкості росту.....	44

	4
2.7. Визначення вмісту хлорофілів <i>a</i> і <i>b</i>	45
2.8. Визначення вмісту білків.....	46
2.9. Визначення вмісту ліпідів	46
2.10. Статистична обробка даних	47
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	49
3.1. Вплив мінерального складу поживних середовищ на ріст та фізіологічний стан <i>Tetraselmis</i> sp.	49
3.1.1. Морфологічні характеристики клітин <i>Tetraselmis</i> sp. за різного мінерального складу середовищ.....	49
3.1.2. Динаміка ростових показників культури <i>Tetraselmis</i> sp. за різних концентрацій мінеральних компонентів.....	50
3.2. Вплив температури та кислотно-лужних умов (pH) на ріст культури <i>Tetraselmis</i> sp.....	53
3.2.1. Температурна чутливість та її вплив на ростові й морфологічні характеристики клітин <i>Tetraselmis</i> sp.....	53
3.2.2. Вплив pH на ріст та фізіологічний стан клітин <i>Tetraselmis</i> sp.	55
3.3. Вплив солоності та аерації/CO ₂ на біомасоутворення <i>Tetraselmis</i> sp.	57
3.3.1. Морфологічна оцінка клітин <i>Tetraselmis</i> sp. у різних умовах солоності та газообміну.	57
3.3.2. Динаміка ростових показників <i>Tetraselmis</i> sp. за різних умов солоності..	58
3.3.3. Вплив аерації та CO ₂ на ріст <i>Tetraselmis</i> sp.	59
3.4. Вплив спектрального складу світла та фотоперіоду на ріст <i>Tetraselmis</i> sp.	61
3.4.1. Морфологічна реакція клітин <i>Tetraselmis</i> sp. на різні режими освітлення	61
3.4.2. Вплив спектрального складу світла на ріст культури <i>Tetraselmis</i> sp.....	62
3.4.3. Вплив тривалості фотоперіоду на біомасоутворення <i>Tetraselmis</i> sp.	63
3.5. Оцінка показників росту та якості біомаси <i>Tetraselmis</i> sp.	65
3.5.1. Суха маса (DW) та беззольна суха маса (AFDW).....	65
3.5.2. Питома швидкість росту (μ).....	65
3.5.3. Вміст хлорофілів <i>a</i> (Chl <i>a</i>) і <i>b</i> (Chl <i>b</i>)	66
3.5.4. Вміст білків у біомасі.....	66

	5
3.5.5. Вміст ліпідів у біомасі	66
ВИСНОВКИ.....	68
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	70

АНОТАЦІЯ

Актуальність. Зростання потреби в ефективних біотехнологічних системах підсилює інтерес до мікроводоростей як продуктивних джерел біомаси. Представники *Tetraselmis* мають високий біотехнологічний потенціал, проте їх продуктивність значною мірою визначається фізико-хімічними умовами культивування. Оптимізація цих параметрів є ключовою для підвищення біомасоутворення та розширення використання *Tetraselmis* spp. в аквакультури, біоенергетиці та інших сферах.

Метою роботи є визначення оптимальних фізико-хімічних умов культивування *Tetraselmis* sp., які забезпечують високу продуктивність та стабільні біохімічні характеристики біомаси, на основі експериментального аналізу ростових, фотосинтетичних і біохімічних показників культури.

Відповідно до мети кваліфікаційної роботи були поставлені наступні завдання:

- проаналізувати сучасні літературні дані щодо біології, біотехнологічного потенціалу та підходів до культивування мікроводоростей роду *Tetraselmis*;
- дослідити вплив мінерального складу поживних середовищ на ростові й морфологічні характеристики *Tetraselmis* sp.;
- визначити оптимальні діапазони температури та рН для забезпечення стабільного росту культури;
- оцінити вплив солоності та режимів газообміну на біомасоутворення;
- встановити ефект спектрального складу світла та тривалості фотоперіоду на інтенсивність росту;
- охарактеризувати основні показники росту та якість біомаси *Tetraselmis* sp.;
- сформулювати практичні рекомендації щодо оптимальних умов культивування *Tetraselmis* sp. у лабораторних системах для подальшого біотехнологічного використання.

Об'єкт дослідження: морська зелена мікроводорість *Tetraselmis* sp. як перспективний біотехнологічний продуцент біомаси.

Предмет дослідження: вплив основних фізико-хімічних факторів культивування — мінерального складу середовища, температури, pH, солоності, режимів газообміну, спектрального складу світла та фотоперіоду — на ріст і якісні характеристики біомаси *Tetraselmis* sp. у лабораторних умовах.

Методи дослідження. Ріст *Tetraselmis* sp. оцінювали методом прямого підрахунку клітин та спектрофотометрично, визначаючи динаміку біомасоутворення за різних фізико-хімічних умов. Фізіологічний та біохімічний стан культури характеризували за показниками сухої маси, беззольної сухої маси, вмісту хлорофілів, білків і ліпідів, а морфологічні зміни — за результатами світлової та флуоресцентної мікроскопії.

Наукова новизна одержаних результатів полягає у вперше визначеному оптимальному комплексі умов культивування *Tetraselmis* sp. та кількісній оцінці впливу абіотичних факторів. Установлені кореляції між параметрами середовища й рівнями хлорофілів уточнюють механізми фотосинтетичної відповіді та адаптивності культури.

Практичне значення. Визначені оптимальні умови культивування *Tetraselmis* sp. можуть бути використані для підвищення продуктивності біомаси в лабораторних, навчальних та малих біотехнологічних системах. Отримані результати слугують основою для оптимізації технологій аквакультури та виробництва біопродуктів на основі мікроводоростей і можуть бути адаптовані до подальшого масштабування.

Структура роботи. Кваліфікаційна робота складається з анотації, вступу, трьох розділів, висновків та списку використаних джерел, що налічує 71 найменування. Основний зміст роботи викладено на 57 сторінках і містить графіки, таблиці та ілюстративні матеріали.

Ключові слова: мікроводорості, *Tetraselmis* sp., біотехнологія мікроводоростей, фізико-хімічні фактори, оптимізація умов культивування.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

AFDW	англ. ash-free dry weight, беззольна суха маса
ANOVA	англ. analysis of variance, дисперсійний аналіз
Chl <i>a</i>	хлорофіл <i>a</i>
Chl <i>b</i>	хлорофіл <i>b</i>
Chl_{заг}	сумарний вміст хлорофілів (<i>a</i> + <i>b</i>)
CO₂	вуглекислий газ
DW	англ. dry weight, суха маса
LED	англ. light-emitting diode, світлодіодне джерело світла
OD₆₈₀	англ. optical density, оптична густина при 680 нм
PSU	англ. practical salinity unit, практична одиниця солоності
SD	англ. standard deviation, стандартне відхилення
μ (mu)	питома швидкість росту

ВСТУП

Зростаючий глобальний попит на альтернативні біологічні ресурси, стрімкий розвиток аквакультури та необхідність упровадження екологічно сталих біотехнологій стимулюють пошук високопродуктивних і адаптивних мікроорганізмів для отримання біомаси. Морські мікроводорості сьогодні розглядаються як одна з найперспективніших біологічних платформ завдяки високим темпам росту, значній біохімічній цінності та здатності до культивування в широкому діапазоні фізико-хімічних умов [20, 42, 52, 53, 62]. Водночас ефективність їх вирощування значною мірою залежить від оптимізації фізико-хімічних параметрів середовища, які безпосередньо впливають на фотосинтетичну активність, засвоєння поживних речовин та роботу метаболічних шляхів [11, 31, 42, 51, 52].

Серед морських зелених мікроводоростей особливе наукове та прикладне значення мають представники роду *Tetraselmis*. Ці евригалінні, мезофільні та високопластичні мікроорганізми здатні швидко нарощувати біомасу та синтезувати білки, ліпіди, пігменти, антиоксидантні сполуки та інші цінні метаболіти [2, 8, 20, 42, 52, 62]. Їхня фізіологічна активність та продуктивність суттєво залежать від інтенсивності та спектрального складу світла, температури, рН, солоності, забезпечення вуглецем та складу мінеральних компонентів поживного середовища [11, 31, 32, 42, 51, 52]. Тому цілеспрямована оптимізація цих факторів є необхідною умовою підвищення продуктивності та біохімічної якості біомаси *Tetraselmis* sp. у лабораторних і промислових системах культивування [11, 31, 32, 42, 51, 52].

Світовий досвід показує зростаючий інтерес до штамів *Tetraselmis* як універсальних біологічних ресурсів для аквакультури, біоенергетики, харчових технологій і косметичної промисловості. У країнах ЄС, США, Південної Кореї та Китаї активно впроваджуються сучасні технології культивування, зокрема замкнуті фотобіореактори, напіввідкриті річкові системи (англ. raceway), а також методи інтенсифікації росту за рахунок контрольованого освітлення, аерації та

регульованого внесення поживних речовин [42, 52, 53, 62]. Попри це, багато лабораторій стикаються з проблемами стабільності культур, контролю контамінацій та забезпечення відтворюваності експериментів — чинниками, що мають ключове значення під час масштабування процесів [2, 42, 51, 52, 53].

Сучасні аналітичні методи — спектрофотометрія, флуориметрія, визначення сухої маси та зольованої сухої маси, розрахунок питомої швидкості росту, кількісне визначення хлорофілів *a* і *b*, білків і ліпідів — забезпечують комплексну оцінку фізіологічного стану *Tetraselmis* sp. та його чутливості до змін фізико-хімічних параметрів [11, 31, 32, 42, 51, 52]. Ці методи становлять основу для визначення оптимальних режимів культивування та підвищення ефективності отримання біомаси у контрольованих умовах [11, 31, 32, 42, 51, 52].

Отже, вивчення впливу ключових фізико-хімічних чинників на ріст *Tetraselmis* sp. має важливе теоретичне й прикладне значення. Поєднання експериментальних методів із сучасними біотехнологічними підходами формує наукове підґрунтя для оптимізації процесів культивування мікроводоростей, сприяючи розвитку екологічно орієнтованих технологій отримання біомаси та біопродуктів в Україні та світі [8, 12, 20, 42, 52, 53, 62].

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Рід *Tetraselmis* (відділ *Chlorophyta*, клас *Chlorodendrophyceae*) – це різноманітна група переважно морських зелених мікроводоростей, до якої належать евригалінні та швидкорослі види, здатні до ефективного росту за широкого діапазону абіотичних умов. Завдяки високій фізіолого-біохімічній пластичності представники роду *Tetraselmis* широко використовуються в аквакультурі та біотехнологічному виробництві як джерело цінної біомаси, білків, ліпідів, пігментів і біологічно активних сполук. Клітини цих мікроводоростей характеризуються наявністю чотирьох джгутиків, чашоподібного хлоропласту з піреноїдом та видоспецифічними ультраструктурними ознаками, які відображають їхню екологічну адаптацію й визначають біотехнологічний потенціал роду [7, 29, 41, 68].

1.1. Загальна характеристика роду *Tetraselmis* як об'єкта біотехнологічних досліджень

1.1.1. Таксономічне положення та філогенетична різноманітність роду *Tetraselmis*. Рід *Tetraselmis* належить до класу *Chlorodendrophyceae* (відділ *Chlorophyta*) і об'єднує численні морфологічно та генетично диференційовані види, внутрішньородова таксономія яких залишається недостатньо визначеною та потребує застосування інтегративного підходу для її уточнення. Сучасні оглядові та молекулярно-філогенетичні дослідження засвідчують домінування морських і евригалінних таксонів, а також активне виявлення нових видів і штамів, що вирізняються специфічними фізіолого-біохімічними характеристиками [29].

Рід *Tetraselmis* вважається таксономічно складною групою зелених мікроводоростей, у межах якої спостерігаються неоднозначності на видовому

рівні, що зумовлює необхідність застосування інтегративних підходів до систематики. Найефективнішим способом уточнення видової належності є поєднання ультраструктурних досліджень із молекулярними аналізами, зокрема вивчення послідовностей гену малої субодиниці рРНК (SSU rRNA / 18S rRNA) та ITS-регіонів, що дозволяє більш чітко розмежовувати близькоспоріднені таксони [28, 29].

Серед представників роду описано низку видів, які мають важливе екологічне та прикладне значення. Так, *Tetraselmis marina* AC16-MESO, ізольований з Антофагасті (Чилі), характеризується широкою толерантністю до коливань солоності та стабільністю росту в культурі, що робить його перспективним об'єктом для аквакультури [42]. *Tetraselmis jejuensis* sp. nov., описаний із супраліторальних припливних водойм із солоністю 0,3–3,1 ‰, відзначається діагностичними особливостями поверхневих субодиниць, а також специфічною організацією хлоропластів і піреноїдів [7]. *Tetraselmis indica*, ізольований з гіперсолоних соляних ставків, характеризується вираженим вічком, прямокутним ядром, численними тільцями Гольджі та характерним типом клітинного поділу; цей вид трапляється як у морських, так і в екстремально солоних середовищах (до ~350 ‰) [44]. Ультраструктурні дослідження, проведені в Китаї та Чилі, описали додаткові нові види, зокрема *Tetraselmis guangdongensis* sp. nov., і запропонували підродові групування, що ґрунтуються на архітектоніці піреноїдів та структурі теки [28, 41].

Результати молекулярно-філогенетичних аналізів (SSU/ITS) і порівняння вторинної структури ITS-2 дозволили виокремити клади, що відповідають як описаним, так і ще неописаним таксонам. У різних регіонах світу ідентифіковано численні локально адаптовані штами, що свідчить про високий рівень внутрішньовидової та внутрішньородової генетичної різноманітності роду *Tetraselmis* [7, 28].

1.1.2. Морфологічні та ультраструктурні особливості представників роду *Tetraselmis*. Морфологічні та ультраструктурні характеристики представників роду *Tetraselmis* є ключовими таксономічними маркерами, що

водночас відображають екологічну адаптацію та особливості росту культур в умовах лабораторного культивування. За результатами світлової та електронної мікроскопії виявлено набір консервативних структурних ознак, характерних для представників цього роду, зокрема наявність чотирьох джгутиків, пір'ястої (англ. pinnate) теки та чашоподібного хлоропласту з піреноїдом. Водночас спостерігається видоспецифічна варіабельність у поверхневих орнаментах, організації каналіків піреноїда, розташуванні вічка та ступені шаруватості теки [7, 41] (рис. 1.1).

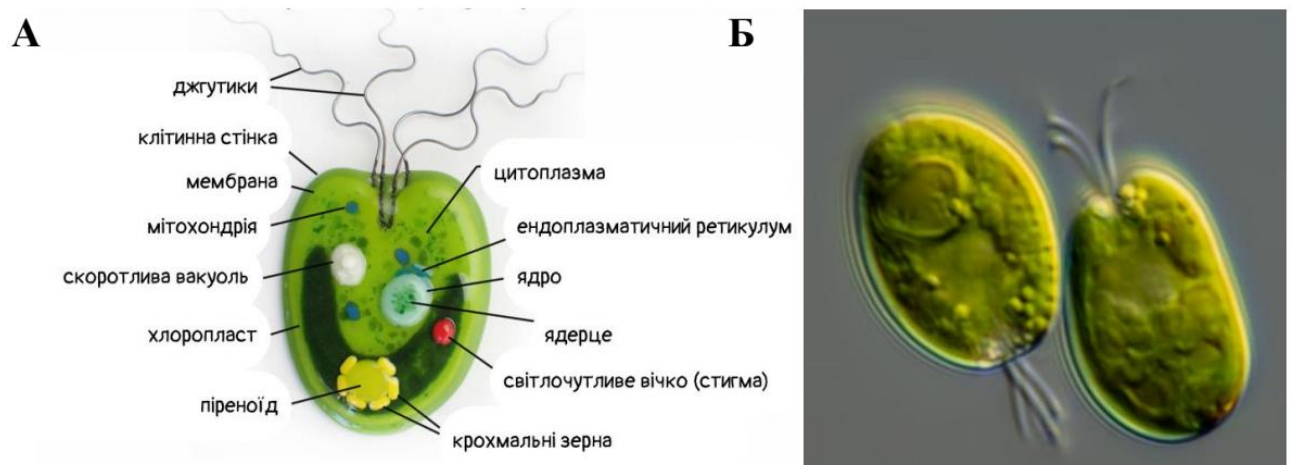


Рис. 1.1 Внутрішня будова (А) і зовнішній вигляд (Б) *Tetraselmis* sp.
(джерело: <https://mikro-foto.de/>)

Клітини *Tetraselmis* зазвичай мають овальну або сплюснену форму, а їхні розміри варіюють у мікрометровому діапазоні залежно від виду. Для окремих таксонів, зокрема *T. jejuensis*, характерне виражене сплюснення клітини [7]. У більшості видів наявні чотири джгутики, які виходять двома протилежними парами з апікального заглиблення, що є типовою морфологічною ознакою роду [7, 41]. Діагностичне значення має також наявність одного або двох типів волосків джгутикової ямки, а також морфологічна варіабельність самої ямки, яка використовується для розмежування близьких видів [41, 44].

Клітинний покрив і тека характеризуються складною архітектонікою: поверхня клітин часто має регулярний або шестикутно-комірчастий рисунок субодиниць теки, описаний, зокрема, у *T. jejuensis* та інших представників роду [7, 41]. Стратифікація теки, тобто багатошаровість її будови, варіює між видами

та має важливе систематичне значення, особливо у недавно описаних таксонів [41].

Більшість видів мають чашоподібний хлоропласт із єдиним піреноїдом, оточеним крохмальними оболонками. Ультраструктурною ознакою підродового рівня є наявність каналіків (англ. canaliculi), які проникають у піреноїд із цитоплазми [7, 28, 41]. Ця особливість розглядається як один із ключових критеріїв для уточнення філогенетичних зв'язків усередині роду *Tetraselmis*.

Вічко (стигма) має різну будову та локалізацію серед представників роду: у деяких видів спостерігаються розсіяні осміофільні глобули, чітко видимі на електронних мікрофотографіях [7]. Серед інших органел характерними є виражене тільки Гольджі (іноді множинне) і прямокутне ядро — ці ознаки мають діагностичне значення у таких видів, як *T. indica* [44].

Усі наведені ультраструктурні характеристики базуються на інтегративних дослідженнях світлової та трансмісійної електронної мікроскопії (ТЕМ) у поєднанні з молекулярно-філогенетичними аналізами, що дозволило описати нові види та уточнити підродові класифікаційні групи всередині роду *Tetraselmis* [7, 28, 41, 44].

1.1.3. Ріст і фізіолого-біохімічні особливості представників роду *Tetraselmis*. Види роду *Tetraselmis* характеризуються швидкими темпами росту, високою фізіологічною пластичністю та здатністю адаптуватися до широкого спектра абіотичних факторів середовища. Показники росту, оптимальні умови культивування та реакції на стресові чинники залежать від виду та штаму, що відкриває можливості для цілеспрямованого регулювання біохімічного складу біомаси з метою отримання певних цільових продуктів. Результати контрольованих експериментів і виробничих досліджень засвідчують високу продуктивність культур *Tetraselmis* за оптимізованих параметрів освітлення, живлення, солоності та температури [29, 49].

Загальна динаміка росту та ефективність культивування демонструють високу продуктивність і добру масштабованість культур. Так, для *Tetraselmis striata* у лабораторних умовах зафіксовано продуктивність до 83,2

мг·л⁻¹·доб⁻¹, а в пілотних масштабах — вміст білка сягав до 45,3 % сухої маси, а вміст ліпідів — до 27,6 % у перерахунку на суху речовину за умови внесення мінеральних добрив [49]. Евригалінні штами, зокрема *Tetraselmis* MUR-230 та MUR-233, продемонстрували стабільний напівбезперервний ріст у відкритих гонкових фотобіореакторах зі середньою питомою швидкістю росту $\approx 0,19$ доб⁻¹ і максимальною продуктивністю біомаси 9–10 г·м⁻²·доб⁻¹ протягом кількох місяців [56].

Світлові умови та спектральний склад є визначальними факторами у фотосинтетичній активності *Tetraselmis*. Підвищення інтенсивності фотонного потоку стимулює накопичення біомаси, тоді як червоне світло може підвищувати швидкість росту, а біле світло сприяє максимальному синтезу ліпідів у *Tetraselmis subcordiformis* за оптимізованих режимів освітлення [59]. Регулювання інтенсивності світла та режимів живлення дозволяє балансувати енергетичну ефективність і продукцію пігментів, що є важливим для промислового виробництва хлорофілу, каротиноїдів і лютеїну [49, 59].

Толерантність до солоності та температури у представників роду *Tetraselmis* є однією з ключових фізіологічних переваг. Багато штамів виявляють евригалінність, тобто здатність витримувати широкий діапазон солоності. Цілеспрямоване регулювання цього параметра, зокрема шляхом використання гіперсолоних середовищ, сприяє підвищенню продуктивності жирних кислот і зменшенню ризику контамінації у відкритих морських системах культивування [60, 68]. Для *T. striata* оптимальні умови росту визначено при температурі близько 25 ± 1 °C і рН ≈ 8 , тоді як *T. suecica* демонструє найвищу продуктивність біомаси в межах 20–60 ‰ солоності, із суттєвим пригніченням росту нижче 10 ‰ [6, 51].

Типи живлення та розподіл вуглецю також істотно впливають на продуктивність. Перехід до міксотрофного культивування змінює напрямок вуглецевого метаболізму, сприяючи накопиченню коротколанцюгових насичених жирних кислот і підвищенню частки небілкових компонентів у біомасі порівняно з фототрофним ростом, що показано для *T. suecica* [45]. Для

деяких генетично модифікованих штамів гетеротрофні умови забезпечують вищу ефективність асиміляції поживних речовин, ніж фотоавтотрофні режими [3].

Реакції на стрес та перебудова ліпідного метаболізму є важливими аспектами регуляції росту. Комбінований вплив високої температури та підвищеної солоності призводить до змін у складі гліцероліпідів, зниження рівня гліколіпідів і модифікації накопичення триацилгліцеролів (ТАГ). Для *T. striata* (штам СТР4) зафіксовано підвищення продуктивності ТАГ при високих температурах, хоча спостерігалось певне обмеження виживання клітин [52]. Поєднання азотного голодування зі зниженням солоності після гіперсолонного культивування сприяє підвищенню виходу жирних кислот, що підтверджено в польових експериментах із морськими системами культивування [60].

Узагальнюючи, численні дослідження свідчать, що оптимізація освітлення, живлення, солоності та температури є ключовими факторами підвищення швидкості росту та біохімічної продуктивності культур *Tetraselmis*. Інтегроване регулювання цих параметрів забезпечує основу для ефективних біотехнологічних стратегій культивування, орієнтованих на виробництво біомаси для аквакультури, ліпідних продуктів і пігментів [49, 52, 56, 59, 60].

1.1.4. Біохімічні та метаболічні особливості представників роду *Tetraselmis*. Представники роду *Tetraselmis* синтезують широкий спектр біомолекул, зокрема білки, ліпіди (включаючи ω -3 поліненасичені жирні кислоти, ПНЖК), пігменти (хлорофіли, лютеїн, β -каротен), вуглеводи та мінеральні сполуки. Відносний вміст цих компонентів залежить від виду, штаму та умов культивування, що дає змогу цілеспрямовано регулювати біохімічний склад біомаси для отримання нутрицевтичних, кормових і біотехнологічних продуктів [42, 50].

Порівняльні дослідження показують, що для *Tetraselmis* характерні консервативні жирнокислотні профілі (C16:0, C18:3 ω 3, C18:1) і типовий для класу *Chlorophyceae* набір каротиноїдів, хоча кількісний вміст сполук високої біологічної цінності значно варіює між видами та штамми [42, 50] (табл. 1).

Порівняльні біохімічні характеристики видів роду *Tetraselmis* за даними літератури

Вид	Білок (% сухої маси)	Ліпіди (% сухої маси)	Характеристика метаболітів та примітки
<i>T. suecica</i>	до 56,9 % (за солоності 15 г/л) [51]	до 27,7 % (за солоності 30 г/л) [51]	Високий вміст білка та варіабельність ліпідного профілю залежно від солоності середовища; вміст пігментів — 2,8–5,5 % за різних світлових та трофічних режимів [51].
<i>T. striata</i>	41,8 % (лабораторні умови) та до 45,3 % (пілотна установка) [49]	25,7 % (лабораторні умови) та до 27,6 % (пілотна установка) [49]	У ряді досліджень встановлено високий вміст ейкозапентаєнової кислоти (ЕПК); внесення мінеральних добрив сприяло підвищенню продуктивності та покращенню якісного складу біомаси [49].
<i>T. chuii</i>	56,4 % (у середовищі Conway із додаванням стічних вод) [63]	44 % (у середовищі Conway із додаванням стічних вод) [63]	Культивування у стічних водах значно підвищувало вихід біомаси та резервних речовин [63].
<i>Tetraselmis</i> sp. JK-46 (глибинна морська вода)	27,2 %	37,1 %	Культивування у глибинній морській воді забезпечувало близько 50 % ПНЖК у складі загального пулу жирних кислот; екстракти демонстрували виражену антиоксидантну та антимікробну активність [13].

Основними жирними кислотами *Tetraselmis* є пальмітинова (C16:0), α -ліноленова (C18:3 ω 3) та олеїнова (C18:1), які виявляються у всіх досліджених видах. Вміст ЕПК (C20:5 ω 3) варіює між штамми; наприклад, *T. suecica* CCAP 66/38 продукує близько $3,10 \pm 0,20$ мг ЕПК $\cdot$ г⁻¹ сухої маси [50]. Серед пігментів постійно присутні лютеїн, віолаксантин, неоксантин, β -каротен та хлорофіли *a/b*,

співвідношення яких визначається спектральним складом освітлення й режимом живлення [50, 59].

У фазі активного росту *T. subcordiformis* накопичує значну кількість ТАГ, що становлять до 57 % від загальної кількості ліпідів на 11-й день культивування у гонковому фотобіореакторі. У стаціонарній фазі (приблизно 15-й день) досягається максимальний вміст цінних ліпідів і пігментів, що має практичне значення для промислових процесів біосинтезу [18].

Представники роду *Tetraselmis* характеризуються високою метаболічною пластичністю, тобто здатністю змінювати співвідношення основних метаболітів залежно від умов живлення. При міксотрофному та гетеротрофному культивуванні змінюється довжина вуглецевого ланцюга жирних кислот і вміст резервних речовин, що дає змогу створювати «дизайнерські» варіанти біомаси під конкретні технологічні потреби [45].

Біологічна активність екстрактів *Tetraselmis*, зокрема отриманих із культур, вирощених у глибинній морській воді, охоплює антиоксидантну, антикоагулянтну та антимікробну дію, що підтверджує високу біотехнологічну цінність біомаси не лише як джерела макронутрієнтів, а й як постачальника біологічно активних сполук [13].

Таким чином, біохімічні дослідження роду *Tetraselmis* засвідчують поєднання консервативних метаболічних шляхів (синтез основних жирних кислот, білків і пігментів) із вираженим штамоспецифічним потенціалом до регуляції складу біомаси. Оптимізація умов культивування — освітлення, живлення, солоності та температури — забезпечує можливість контрольованого накопичення білка, ліпідів і вторинних метаболітів, що відкриває перспективи створення вискоєфективних біотехнологічних продуктів — від кормових добавок до нутрицевтичних і фармацевтичних засобів [13, 18, 49, 50].

1.1.5. Екологічна пластичність і толерантність представників роду *Tetraselmis*. Рід *Tetraselmis* об'єднує таксони, адаптовані до морських, солонуватих, супраліторальних і гіперсолоних середовищ, що свідчить про високу екологічну пластичність цих мікроводоростей. Багато штамів є

евригалінними (витримують широкий діапазон солоності) та евритермними (стійкі до температурних коливань), що робить їх придатними для відкритого культивування в умовах мінливих або екстремальних параметрів середовища. Межі екологічної толерантності варіюють між видами та визначають як природне поширення *Tetraselmis*, так і технологічні стратегії культивування [29, 68].

Різні штами *Tetraselmis* ізольовано з морських, солонуватих і гіперсолоних водойм, що підтверджує їх здатність до широкого спектра осмотичної адаптації. Зокрема, *T. suecica* стабільно росте в межах 20–60 ‰ солоності, не втрачаючи основних біохімічних характеристик біомаси, тоді як *T. indica* демонструє екстремальну солестійкість — до ~350 PSU [44, 51].

Евригалінні штами становлять особливий інтерес для відкритих систем культивування: їхня ізоляція та селекція дозволили отримати високопродуктивні культури, здатні підтримувати ефективний ріст у широкому діапазоні солоності. Використання гіперсолоних середовищ не лише знижує ризик контамінації, але й може підвищувати продуктивність жирних кислот, що є важливо для промислових процесів [60, 68].

Також *Tetraselmis* демонструє високу термічну адаптивність. У польових експериментах ізоляти *Tetraselmis* MUR-230 і *Tetraselmis* MUR-233 підтримували стабільний ріст при добових коливаннях температури від ~0 до ~40 °C, що вказує на їхню евритермність та придатність до культивування в умовах змінного клімату [56].

Світлова адаптація має вирішальне значення для фізіології *Tetraselmis*. Синтез пігментів і швидкість росту залежать від інтенсивності та спектрального складу освітлення: оптимальна інтенсивність визначається цілями культивування — чи то максимізація біомаси, чи підвищення концентрації пігментів [49, 59].

Еврихалінні штами *Tetraselmis* демонструють високу конкурентоспроможність у природних і штучних екосистемах. У досліджах на відкритому повітрі вони здатні витіснити діатомові водорості, що підтверджує

їхню екологічну стійкість і перевагу для масового культивування у відкритих фотобіореакторах і ставкових системах [17, 68].

Таким чином, *Tetraselmis* — це екологічно пластичний рід зелених мікроводоростей, здатний до адаптації у широкому діапазоні солоності, температури та освітлення, що забезпечує його ефективне використання в біотехнологічних і аквакультурних процесах.

1.1.6. Розмноження та життєвий цикл представників роду *Tetraselmis*.

Ультраструктурні дослідження *Tetraselmis* описують характерні механізми поділу клітин і поведінки теки, що мають діагностичне значення для систематики роду. Для окремих таксонів виявлено апікальне відділення протопласта та інверсію теки, які супроводжують клітинний поділ. Зокрема, для *T. indica* визначено унікальний тип поділу, що відрізняється специфічною поведінкою клітинної оболонки та має таксономічне значення при порівнянні між видами [41, 44].

На сьогодні немає достатніх доказів для детального опису статевих процесів, типів спарювання або повного життєвого циклу у представників роду *Tetraselmis*. Існуючі літературні дані не дозволяють реконструювати повну онтогенетичну схему, а також визначити, чи відбувається у цих мікроводоростей чергування статевих і безстатевих фаз. Подальші дослідження із застосуванням молекулярно-цитологічних методів необхідні для з'ясування цих аспектів розвитку.

Аналіз екологічних і експериментальних даних свідчить, що вибір оптимального штаму має вирішальне значення для успішного культивування *Tetraselmis*. Природно евригалінні та евритермні штами забезпечують високу стійкість до коливань параметрів середовища, що дозволяє керовано змінювати солоність, температуру, освітлення та живлення з метою формування бажаного біохімічного складу біомаси. Така адаптивна стратегія культивування робить *Tetraselmis* перспективним об'єктом для аквакультури, виробництва біопалива та біопродуктів [52, 56, 60, 68].

1.2. Поживні середовища для морських мікроводоростей

Ефективне культивування морських мікроводоростей, зокрема представників роду *Tetraselmis*, потребує використання поживних середовищ, що забезпечують клітини необхідними макро- і мікроелементами, вітамінами. Хімічний склад середовища є одним із ключових чинників, що визначає фізіологічні параметри росту, морфологічну організацію клітин, біохімічний профіль, а також загальну продуктивність біомаси. Відповідно, правильний підбір складу поживного середовища має фундаментальне значення для оптимізації ростових характеристик, регуляції метаболічної активності та цільового накопичення біомолекул у лабораторних і промислових умовах [12, 32, 36, 52].

1.2.1. Типи поживних середовищ для морських мікроводоростей. Для культивування *Tetraselmis* spp. розроблено та стандартизовано низку живильних середовищ, які відрізняються концентраціями макро- та мікроелементів, буферними системами й джерелами органічних компонентів. Найбільш поширеними є середовища f/2 (Guillard, 1975), Walne (Walne, 1970) та Conway (Tompkins et al., 1995).

Середовище f/2 є універсальним стандартом для культивування морських хлорофіт, оскільки містить збалансовані співвідношення макроелементів (N, P, Si), мікроелементів (Fe, Mn, Zn, Co, Cu, Mo) та трьох вітамінів (тіамін, біотин, ціанкобаламін). Середовище Conway характеризується стійкою буферною системою, що забезпечує стабільність pH і сприяє масштабуванню процесів культивування, тоді як середовище Walne містить підвищену концентрацію азоту та мікроелементів, що стимулює швидке нарощування біомаси [5, 34, 36, 38].

Вибір середовища залежить від мети дослідження: для отримання біомаси, продукції вторинних метаболітів або фізіолого-біохімічних спостережень [12, 52].

1.2.2. Макроелементи. Азот (N). Азот є основним елементом білкового та пігментного обміну клітини. У середовищах для *Tetraselmis* spp. він зазвичай додається у вигляді нітратів (NaNO_3 або KNO_3), проте також можуть використовуватись амонійні сполуки чи сечовина. Концентрація NaNO_3 у стандартному середовищі f/2 становить близько 0,88 мМ.

Наявність азоту визначає рівень фотосинтетичної активності, синтез хлорофілу та вміст білка в біомасі. За умов азотного голодування у клітинах *Tetraselmis* активується ліпідний метаболізм, що призводить до накопичення ТАГ і жирних кислот. Використання альтернативних джерел азоту (NH_4Cl , сечовина, гліцин, дріжджовий екстракт) дозволяє цілеспрямовано модифікувати біохімічний склад клітин [32, 36, 71].

Фосфор (P). Фосфор бере участь у процесах енергетичного обміну (АТФ), синтезі нуклеїнових кислот і фосфоліпідів. У середовищах для морських мікроводоростей він зазвичай додається у формі $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ або K_2HPO_4 . У складі середовища f/2 концентрація фосфатів становить близько 36 мМ.

Оптимальне співвідношення азоту до фосфору ($\text{N:P} \approx 16:1$ за Редфілдом) забезпечує стабільний ріст культур, тоді як його порушення викликає стресові реакції, уповільнення поділу клітин та зміщення метаболічних потоків у бік накопичення запасних речовин [39, 71].

1.2.3. Мікроелементи. Залізо (Fe). Залізо є ключовим елементом фотосинтетичного апарату, входить до складу цитохромів і фередоксину, забезпечуючи перенесення електронів у реакційних центрах фотосистем. У поживних середовищах воно додається у вигляді хелатованого комплексу $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ з ЕДТА, що запобігає його осадженню в умовах морської солоності. У середовищі f/2 концентрація заліза становить близько $1,17 \times 10^{-5}$ М. Його нестача призводить до хлорозу, зниження фотосинтетичної ефективності та росту культури [12, 36].

Інші мікроелементи. До комплексу необхідних мікроелементів входять марганець ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), цинк ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), кобальт ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), мідь ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) та молібден ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Вони виконують функції

кофакторів ферментів, беруть участь у редокс-процесах і реакціях азотного метаболізму. Їхні концентрації ретельно збалансовані для запобігання токсичного ефекту [36, 39].

1.2.4. Вітаміни. Вітаміни є незамінними кофакторами ферментативних реакцій, що регулюють клітинний метаболізм. У складі середовища f/2 передбачено три основні вітаміни:

- *тіамін* (B_1) — необхідний для вуглеводного та енергетичного обміну;
- *біотин* (B_7) — бере участь у карбоксилюванні та синтезі жирних кислот;
- *ціанкобаламін* (B_{12}) — є кофактором у реакціях метилювання та поділу клітин.

Хоча деякі штами *Tetraselmis* spp. здатні синтезувати частину вітамінів або одержувати їх симбіотично від супутньої бактеріальної мікрофлори, повна відсутність вітамінів у середовищі зазвичай призводить до пригнічення росту та зниження продуктивності [12, 52].

1.2.5. Солоність, буферні системи та водна основа поживних середовищ. Для приготування середовищ використовують як природну, так і штучну морську воду. Оптимальна солоність для росту більшості штамів *Tetraselmis* spp. становить 25–35 PSU, хоча евригалінні форми можуть витримувати ширший діапазон.

Для стабілізації pH використовуються буфери Tris-HCl або NaHCO_3 , які підтримують значення pH у межах 8,0–8,2. Таке середовище забезпечує сталі умови для фотосинтетичної активності, біодоступності мікроелементів і метаболічної стабільності культури [36, 52].

1.2.6. Регулювання поживного складу та експериментальна оптимізація. Модулювання складу поживних середовищ є важливим інструментом регулювання метаболічних процесів у представників роду *Tetraselmis*. Зокрема, обмеження азоту призводить до підвищення вмісту ліпідів, насамперед ТАГ, тоді як дефіцит фосфору знижує інтенсивність поділу клітин і сприяє накопиченню запасних вуглеводів. Збагачення середовища залізом,

навпаки, підвищує концентрацію хлорофілу й загальну ефективність фотосинтезу, а додаткове введення вітамінів здатне стимулювати ріст культур за умов дії стресових факторів [32, 66, 71].

Таке цілеспрямоване регулювання складу середовища дозволяє керувати біосинтетичними процесами, забезпечуючи накопичення білків, ліпідів, пігментів або вторинних метаболітів, що мають біотехнологічне значення.

Таким чином, ефективність культивування *Tetraselmis* spp. безпосередньо залежить від збалансованості поживного середовища. Оптимальні співвідношення макро- (N, P), мікроелементів (Fe, Mn, Zn, Co, Cu, Mo) та вітамінів (B₁, B₇, B₁₂) забезпечують стабільний ріст, високу фотосинтетичну активність і метаболічну продуктивність. Середовище f/2 залишається найпоширенішим стандартом для лабораторного культивування *Tetraselmis* spp., проте адаптація його складу під конкретний штам і мету дослідження є необхідною умовою для досягнення максимального біотехнологічного потенціалу — від аквакультури до виробництва біомолекул і біоенергетичних субстратів.

1.3. Вплив ключових фізико-хімічних факторів ріст *Tetraselmis* spp.

Ріст, морфологічні особливості та біохімічна продуктивність видів роду *Tetraselmis* значною мірою визначаються екологічними та фізико-хімічними факторами, такими як освітлення, температура, рівень рН, солоність, подача CO₂ та мінеральний склад середовища. Оптимальне регулювання цих параметрів є вирішальним для максимізації продуктивності біомаси та підтримання клітинного гомеостазу як у лабораторних умовах, так і у великомасштабних системах культивування [10, 11, 16, 24, 31, 36, 44, 51, 62].

1.3.1. Інтенсивність світла, фотоперіод та спектральний склад. Світло є головним джерелом енергії для *Tetraselmis*, безпосередньо впливаючи на швидкість росту, синтез пігментів, ліпідний обмін і морфологію клітин. Помірна інтенсивність світла (100–250 мкмоль фотонів м⁻² с⁻¹ або 3000–8000 люксів)

зазвичай є оптимальною, тоді як надмірне освітлення викликає фотопригнічення та окисний стрес. Низький рівень освітлення знижує фіксацію вуглецю, але сприяє підвищенню вмісту хлорофілу для покращення засвоєння світла [16, 24, 31, 43, 44, 45, 62].

Фотоперіод 16:8 год або безперервне освітлення здатні підвищувати продуктивність, однак постійне світло може викликати метаболічний стрес [43, 51, 67].

Спектральна якість освітлення також має значення: червоне світло підвищує фотосинтетичну ефективність і синтез хлорофілу, синє стимулює поділ клітин, а поєднання спектрів забезпечує максимальну продуктивність і нагромадження ліпідів [31, 62].

1.3.2. Температура. *Tetraselmis* spp. є мезофільними, із оптимальним діапазоном росту 22–30 °C. Вищі температури (>32 °C) спричиняють денатурацію білків і зниження фотосинтетичної ефективності, тоді як нижчі температури сповільнюють метаболізм [11, 31, 36, 51, 58, 62]. Деякі штами демонструють широкий температурний діапазон толерантності, що підтримує можливість відкритого культивування у кліматично мінливих умовах [11, 36, 62].

1.3.3. pH та подача вуглецю (CO₂/аерація). Оптимальний рівень pH для росту *Tetraselmis* spp. зазвичай становить 7,0–8,5. Поглинання CO₂ під час фотосинтезу призводить до підвищення pH, що може зумовити осадження карбонатів і зниження доступності мікроелементів. Безперервна аерація або подача повітря, збагаченого CO₂ (1–2 %), забезпечує стабільність pH і підвищує фіксацію неорганічного вуглецю, сприяючи зростанню біомаси та рівномірності культури [10, 11, 31, 51].

1.3.4. Солоність. *Tetraselmis* spp. мають високу евригалінність і можуть рости при солоності 10–60 PSU, з оптимумом у межах 25–35 PSU. Підвищена солоність може пригнічувати поділ клітин, але стимулює синтез осмозахисних сполук і ліпідів; низька солоність, навпаки, викликає осмотичний стрес і знижує фотосинтетичну активність [11, 24, 36, 51, 62, 65, 67].

Адаптивні реакції до змін солоності включають перебудову складу мембранних ліпідів і накопичення осмолітичних речовин [11, 24, 51, 62].

1.3.5. Мінеральний склад. Мікроелементи, такі як залізо, марганець, цинк, мідь, кобальт і молібден, необхідні для активності ферментів, підтримання окисно-відновного балансу та структурної стабільності клітинних органел. Залізо є особливо важливим для синтезу хлорофілу та транспорту електронів. Магній і кальцій критично важливі для структури хлорофілу та стабільності клітинної оболонки. Дефіцит цих елементів пригнічує ріст і метаболізм, тоді як їх оптимальна концентрація забезпечує високу фотосинтетичну та біосинтетичну активність [12, 31, 32, 36, 44, 51].

1.3.6. Комплексна оптимізація факторів середовища. Комбіноване регулювання параметрів середовища дозволяє цілеспрямовано контролювати метаболізм і продуктивність культур: висока інтенсивність світла у поєднанні з обмеженням азоту сприяє підвищеному нагромадженню ліпідів [16, 31, 62]; збалансовані поживні речовини та помірна температура забезпечують стабільний ріст і синтез білків [11, 31, 51]; контрольована подача CO₂ та заліза підвищує фотосинтетичну ефективність і синтез пігментів [10, 31, 51]. Комплексне розуміння взаємодії цих факторів є ключем до ефективного використання *Tetraselmis* у біотехнологічних цілях [11, 31, 36, 51, 62].

1.4. Показники росту й якості біомаси

Оцінювання показників росту та якості біомаси, таких як суха маса (англ. dry weight, DW), беззольна суха маса (англ. ash-free dry weight, AFDW), питома швидкість росту (μ), вміст хлорофілу *a* (Chl *a*), білків, вуглеводів і ліпідів, є фундаментальним для визначення фізіологічного стану, продуктивності та біотехнологічного потенціалу видів роду *Tetraselmis*. Ці показники є важливими як для наукових досліджень, так і для промислових застосувань — зокрема, у галузях аквакультури, нутрицевтики та виробництва біопалива [1, 17, 27, 37, 51, 52, 53, 54, 60].

1.4.1. Суха маса та беззольна суха маса. *Суха маса (DW)* характеризує загальну кількість біомаси після видалення вологи та є базовим показником продуктивності культури. Її визначають методом фільтрування певного об'єму культури з подальшим висушуванням при 105 °C до постійної маси [37, 53].

Беззольна суха маса (AFDW) відображає органічну фракцію біомаси, оскільки враховує лише частину без неорганічного (зольного) залишку, що визначається після прожарювання при 450–550 °C. Цей параметр особливо важливий під час аналізу енергетичної цінності біомаси для виробництва біопалива або біохімічних досліджень, оскільки корелює з вмістом органічного вуглецю та потенційною енергоємністю [17, 53, 70].

1.4.2. Питома швидкість росту. *Питома швидкість росту (μ)* описує швидкість експоненційного збільшення біомаси та є ключовим індикатором фізіологічного стану культури. Для *Tetraselmis* spp. μ зазвичай коливається в межах 0,5–1,2 доб⁻¹ за оптимальних умов, знижується при дефіциті поживних речовин або за стресових впливів середовища [17, 23, 27, 52, 60].

1.4.3. Вміст хлорофілу *a*. *Хлорофіл *a* (Chl *a*)* є основним фотосинтетичним пігментом *Tetraselmis* і слугує важливим показником фотосинтетичної активності та фізіологічного стану клітин. Його кількість визначають спектрофотометрично після екстракції в ацетоні або метанолі. Високий вміст Chl *a* вказує на активне зростання і достатнє забезпечення поживними речовинами, тоді як його зниження свідчить про стрес або дефіцит елементів живлення [1, 16, 37, 51, 52, 61].

1.4.4. Вміст білків, вуглеводів і ліпідів. *Білки.* Основна фракція біомаси (30–60 % сухої маси), визначається за допомогою колориметричних (метод Бредфорда, Лоурі) або азотних методів (за К'ельдалем). Високий вміст білка спостерігається за достатнього рівня азоту, тоді як азотне обмеження призводить до його зниження та стимулює синтез ліпідів [23, 27, 51, 52, 54, 60].

Вуглеводи. Зазвичай становлять 10–30 % сухої маси, визначаються фенольно-сірчаноокислим методом. Вуглеводи виконують структурну й енергетичну функцію [51, 52, 54, 60].

Linidu. Їхній вміст варіює від 10 до 40 % сухої маси. Визначають після екстракції органічними розчинниками (суміш хлороформу та метанолу) за методами Блайга–Дайєра або Фолча. Кількість та якість ліпідів є критичними показниками при оцінюванні потенціалу *Tetraselmis* як сировини для виробництва біопалива та нутрицевтиків [1, 15, 17, 27, 51, 52, 53, 54, 60].

1.4.5. Пігментний склад та антиоксидантні властивості. *Tetraselmis* spp. продукує додаткові пігменти — хлорофіл *b*, каротиноїди та ксантофіли, які захищають клітини від окисного стресу. Пігментний профіль аналізують методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), тоді як антиоксидантну активність визначають за допомогою тестів уловлювання вільних радикалів — DPPH (2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил) та ABTS (2,2'-азино-біс(3-етилбензтіазолін-6-сульфонова кислота)). Висока антиоксидантна здатність підвищує комерційну цінність біомаси *Tetraselmis* для виробництва функціональних харчових продуктів і косметичних засобів [1, 20, 54, 61].

1.4.6. Морфологічні характеристики та життєздатність клітин. Мікроскопічні дослідження є важливою складовою оцінювання фізіологічного стану культур *Tetraselmis* spp., оскільки дозволяють аналізувати морфологічні особливості, рухливість та структурну цілісність клітин. Морфометричні показники, зокрема форма, розмір, стан джгутиків і характер їхньої роботи, доповнюють дані про ріст і біохімічний профіль біомаси.

Застосування барвників для визначення життєздатності — таких як флуоресцеїновий діацетат (англ. fluorescein diacetate, FDA), що накопичується у метаболічно активних клітинах, та пропідій йодид (англ. propidium iodide, PI), який проникає лише у клітини з порушеною мембранною цілісністю — дає змогу чітко розмежовувати живі, стресовані й нежиттєздатні клітини. Поєднання флуоресцентної мікроскопії з диференційним фарбуванням забезпечує високу точність оцінювання життєздатності популяції та дозволяє своєчасно виявляти вплив стресових факторів або змін умов культивування [1, 37].

Такий підхід забезпечує комплексне уявлення про функціональний стан культури та є необхідним для коректної інтерпретації результатів експериментів, оптимізації параметрів культивування й підвищення якості біомаси.

1.4.7. Інтегральна оцінка якості біомаси. Поєднання фізичних (DW, AFDW, оптична щільність), фізіологічних (μ , Chl *a* і *b*) та біохімічних (вміст білків, вуглеводів, ліпідів, пігментів) показників дозволяє визначати оптимальні умови культивування для досягнення цільових біотехнологічних результатів. Наприклад, для отримання кормових білкових добавок доцільно підтримувати азотне живлення, тоді як для підвищення ліпідного вмісту — використовувати стратегію обмеження азоту [1, 17, 27, 37, 51, 52, 53, 54, 60].

Комплексний аналіз цих показників забезпечує наукове обґрунтування для оптимізації технологічних параметрів культивування *Tetraselmis* spp. у системах біоенергетики, аквакультури та виробництва біологічно активних речовин.

1.5. Підходи до оптимізації умов культивування

Оптимізація умов культивування культур *Tetraselmis* spp. є ключовим етапом у підвищенні швидкості росту, біохімічної продуктивності та ефективності біотехнологічного процесу. На фізіологічну активність і біосинтетичну здатність *Tetraselmis* впливає велика кількість екологічних та поживних чинників, які часто взаємодіють між собою у складний, нелінійний спосіб. Традиційні методи оптимізації типу «один фактор за раз» не дозволяють достовірно врахувати такі взаємозв'язки.

Для вирішення цього завдання широко застосовуються статистичні та математичні методи планування експерименту (англ. Design of Experiments, DoE) — зокрема дизайн Плакета–Бурмана, повні та дробові факторні плани, методологія поверхні відгуку (англ. Response Surface Methodology, RSM) і функції бажаності (англ. Desirability Functions, DF). Ці підходи використовуються в біотехнології мікродоростей для систематичної ідентифікації, моделювання та оптимізації ключових параметрів, що визначають

ріст і синтез метаболітів [4, 21, 22, 33, 35, 47, 48, 57]. Такі багатофакторні моделі дозволяють одночасно оцінювати дію кількох чинників, прогнозувати їхні взаємодії та визначати оптимальні умови культивування з високою статистичною достовірністю.

1.5.1. Дизайн Плакета–Бермана. Дизайн Плакета–Бермана є двофакторним дробним планом, який використовується для попереднього скринінгу з метою швидкого визначення найвпливовіших чинників серед великої кількості змінних при мінімальній кількості дослідів. Він базується на оцінюванні головних ефектів кожного фактора за припущенням, що взаємодії між ними є незначними.

У контексті культивування *Tetraselmis* spp. дизайн Плакета–Бермана застосовують для скринінгу таких параметрів, як концентрації нітратів, фосфатів, заліза, солоність, інтенсивність освітлення та температура, які впливають на продуктивність біомаси, вміст хлорофілу *a*, ліпідну продукцію та синтез біоактивних сполук [14, 19, 21, 33, 48, 57].

Основні переваги дизайну Плакета–Бермана полягають у простоті, низькій вартості та ефективності в ідентифікації ключових факторів. Водночас цей метод не дозволяє оцінити взаємодії між чинниками, тому для подальшої оптимізації застосовують повні або фракційні факторіальні моделі, а також методологію поверхні відгуку.

1.5.2. Повні та дробні факторні дизайни. Повний факторний дизайн передбачає дослідження всіх можливих комбінацій факторів та їх рівнів, що забезпечує повний аналіз як основних, так і взаємних ефектів. Наприклад, дизайн 2^3 дозволяє вивчити три фактори на двох рівнях (мінімальному та максимальному), виконуючи вісім дослідів, які дають змогу оцінити вплив кожного фактора і їхніх взаємодій на показники росту або ліпідного синтезу.

У дослідженнях представників роду *Tetraselmis* такі плани застосовують для вивчення комбінованого впливу інтенсивності освітлення, температури й концентрації поживних речовин на продуктивність біомаси та склад метаболітів. Проте зі збільшенням кількості факторів експоненційно зростає кількість

необхідних дослідів, що зменшує практичність цього підходу для складних систем.

Дробний факторний дизайн дозволяє дослідити лише частину комбінацій факторів, зберігаючи можливість оцінити основні ефекти та ключові взаємодії при суттєвому зменшенні кількості експериментів. Обидва підходи забезпечують отримання статистично надійних даних для побудови емпіричних моделей і детальної характеристики процесу [19, 21, 22, 47, 48, 57]. Вони особливо корисні на початкових етапах оптимізації або масштабування процесів культивування мікробіодоростей.

1.5.3. Методологія поверхні відгуку. Методологія поверхні відгуку (RSM) — це розвинений багатофакторний статистичний метод, який використовується для моделювання і оптимізації процесів із взаємодією кількох незалежних змінних. RSM зазвичай застосовують після попереднього скринінгу (наприклад, за дизайном Плакета–Бермана) і використовують для побудови квадратичних (другого порядку) рівнянь регресії, що описують залежність між факторами та відгуком системи.

На основі отриманих моделей створюють поверхні відгуку і контурні діаграми, які наочно демонструють взаємодію параметрів та дають змогу визначити оптимальні комбінації факторів.

Найпоширенішими RSM-дизайнами є центрально-комполітний дизайн (англ. Central Composite Design, CCD) і дизайн Бокса–Бенкена (англ. Box–Behnken Design, BBD), які дозволяють ефективно отримувати моделі другого порядку при мінімальній кількості експериментів. Методологія RSM широко застосовується в біотехнології мікробіодоростей для оптимізації складу поживних середовищ (співвідношення N:P, концентрації мікроелементів), pH, солоності, рівня CO₂ та інтенсивності освітлення з метою підвищення виходу біомаси або вторинних метаболітів [4, 21, 22, 26, 33, 35, 48, 57, 69].

Основною перевагою RSM є можливість прогнозування комбінованого впливу факторів і точного визначення реальних оптимумів у межах

досліджуваного простору, що створює наукове підґрунтя для масштабування систем культивування від лабораторного до промислового рівня.

1.5.4. Підхід із використанням функції бажаності. У процесах, де потрібно одночасно оптимізувати кілька показників (наприклад, досягти максимальної біомаси за збереження високого вмісту ліпідів і білків), ефективним є підхід на основі функції бажаності (DF).

Кожен цільовий показник (відгук) перетворюють у безрозмірну величину бажаності в інтервалі від 0 (повністю небажаний результат) до 1 (оптимальний результат). Подальше об'єднання індивідуальних значень бажаності у загальний індекс (зазвичай як геометричне середнє) дозволяє оцінити загальну ефективність процесу.

Поєднання DF із RSM або факторними моделями забезпечує можливість багатоцільової оптимізації та визначення компромісу між конкуруючими показниками [4, 22]. Для *Tetraselmis* цей підхід дозволяє одночасно оптимізувати показники росту, ліпідної продуктивності й пігментного складу в межах єдиної аналітичної моделі.

1.5.5. Інтегроване застосування та переваги. Інтеграція методів Плакета–Бермана, факторних планів, RSM і DF формує ієрархічну стратегію оптимізації:

1. *Скринінг (дизайн Плакета–Бермана)* — визначення найбільш впливових факторів.
2. *Моделювання (факторні дизайни)* — оцінка головних і взаємних ефектів.
3. *Оптимізація (RSM)* — прогнозування оптимальних значень параметрів.
4. *Багатоцільова оцінка (DF)* — узгодження кількох критеріїв ефективності.

Такий інтегрований підхід на основі DoE підвищує відтворюваність результатів, покращує статистичну надійність даних і дозволяє істотно скоротити кількість необхідних дослідів порівняно з класичними емпіричними методами. Крім того, він забезпечує кількісне розуміння взаємозв'язків між

екологічними та поживними параметрами, що визначають фізіологію та біохімічну продуктивність *Tetraselmis* spp. [4, 21, 22, 33, 35, 48, 47, 57].

Інтегроване застосування статистичних методів оптимізації забезпечує точний контроль умов культивування, сприяє масштабуванню процесів від лабораторного до промислового рівня та створює основу для розроблення економічно ефективних і екологічно сталих біотехнологічних процесів на основі представників роду *Tetraselmis*.

Застосування сучасних методів планування експерименту — дизайну Плакета–Бермана, факторних планів, RSM та DF — є фундаментом оптимізації біотехнологічних процесів культивування мікроводоростей. Використання цих підходів у дослідженнях *Tetraselmis* забезпечує кількісну оцінку впливу факторів, точне прогнозування оптимальних умов і ефективну багатоцільову оптимізацію.

Інтеграція статистичних методів дозволяє підвищити продуктивність, забезпечити відтворюваність і створити науково обґрунтовані технології культивування *Tetraselmis* spp. для виробництва біомаси, біоенергії, кормових добавок і біологічно активних речовин.

1.6. Стерильність, контроль контамінацій, якість води та відтворюваність у культивуванні *Tetraselmis* spp.

Забезпечення стерильності, підтримання чистоти культури та контроль якості води й технологічних процесів є ключовими умовами надійного культивування *Tetraselmis* spp. як у лабораторних, так і в промислових системах. Потрапляння контамінантів, наявність домішок у воді чи недотримання стандартних процедур можуть істотно знизити відтворюваність результатів, зменшити вихід біомаси та змінити біохімічний профіль культури. Тому дотримання суворих асептичних технік, контроль якості води та впровадження стандартизованих операційних процедур (СОП) є критично важливими для

збереження цілісності культури та стабільності її фізіолого-біохімічних характеристик [9, 25, 36, 40, 42, 51, 64].

1.6.1. Стерильність та асептичні техніки. Стерильність у контексті культивування *Tetraselmis* spp. означає відсутність сторонніх мікроорганізмів — бактерій, грибів, ціанобактерій чи найпростіших, які можуть конкурувати за поживні речовини, виділяти інгібуючі метаболіти або змінювати фізико-хімічні умови середовища. Дотримання асептичних технік є обов'язковим на всіх етапах роботи з культурою: підготовка інокуляту, приготування поживних середовищ, пересівання, відбір проб. До основних процедур належать стерилізація середовищ і посуду (автоклавування, фільтрація, УФ-опромінення), дезінфекція робочих поверхонь та робота під ламінарним боксом [9, 36].

У промислових системах досягнення повної стерильності є практично неможливим. Проте впровадження санітарно-гігієнічних протоколів — пастеризація морської води, попередня фільтрація, регулярне очищення фотобіореакторів — суттєво знижує ризик контамінації. Для високовартісних біотехнологічних процесів, таких як виробництво фармацевтичних, нутрицевтичних або біоактивних речовин, перевагу надають закритим фотобіореакторам, які забезпечують кращий захист від аероконтамінантів і коливань зовнішніх умов [25, 36, 42].

1.6.2. Джерела та типи контамінацій. Контамінація в культурах *Tetraselmis* spp. може виникати з різних джерел: потрапляння мікроорганізмів із повітря, бактерій чи спор із води, перехресне зараження під час пересівання або відбору проб, а також наявність біоплівки у недостатньо очищеному обладнанні. Найпоширенішими контамінантами є гетеротрофні бактерії (наприклад, *Pseudomonas*, *Vibrio*), плісняві гриби (*Aspergillus*, *Penicillium*), ціанобактерії (*Synechococcus* spp.) та дрібні джгутикові найпростіші [25, 40, 64].

Такі організми можуть виснажувати поживні речовини, змінювати рН і рівень розчиненого кисню або виділяти токсичні сполуки, що призводить до зниження росту або повного руйнування культури. Раннє виявлення контамінації

є критичним і здійснюється за допомогою мікроскопії, висіву на селективні середовища, а також моніторингу оптичної густини чи флуоресценції.

До профілактичних заходів належать стерилізація посуду й середовищ, фільтрація повітря для аерації через мембрани 0,22 μm , а в окремих випадках — короточасне використання антибіотиків або протигрибкових засобів [9, 55, 64]. Проте тривале застосування антибіотиків у великих системах не рекомендується через ризик розвитку резистентності та негативний вплив на подальше використання біомаси.

1.6.3. Якість води. Вода є основною складовою будь-якого середовища культивування мікроводоростей і визначає осмотичний баланс, розчинність поживних речовин та доступність мікроелементів. Її хімічна чистота та стабільність фізико-хімічних параметрів безпосередньо впливають на фізіологічну активність і відтворюваність результатів культивування *Tetraselmis* spp. [9, 40, 51].

До ключових параметрів якості води належать: провідність і солоність, рН і лужність, вміст мікроелементів (Fe, Zn, Cu, Mn), відсутність органічних домішок та мікробіологічна чистота. Для лабораторних досліджень рекомендовано використовувати ультрачисту або зворотноосмотичну воду (резистивність $\geq 18 \text{ МОм} \cdot \text{см}$, стандарт ISO 3696 тип I).

У промислових умовах морська вода має проходити попередню фільтрацію ($\leq 5 \text{ мкм}$), стерилізацію (УФ-опромінення, хлорування-дегазація або пастеризація) та регулярний контроль на вміст мікроорганізмів, важких металів і органічного вуглецю [9, 40].

Доведено, що ультрафільтрована морська вода (пори 20 нм) ефективно запобігає паразитарній контамінації та підвищує щільність клітин *Tetraselmis*, покращуючи стабільність і продуктивність культури [9]. Підтримання стабільної солоності (25–35 PSU) та рН (7,8–8,2) у різних серіях культивування є обов'язковою умовою для забезпечення відтворюваності росту та біохімічного складу.

1.6.4. Відтворюваність та система забезпечення якості. Відтворюваність результатів — здатність отримувати подібні показники росту й складу біомаси у незалежних експериментах — є основним критерієм наукової достовірності. У процесі культивування *Tetraselmis* spp. вона забезпечується точним контролем параметрів середовища, правильним приготуванням поживних сумішей і дотриманням стандартизованих операційних процедур. Основні показники (температура, інтенсивність освітлення, фотоперіод, рН, аерація, концентрація поживних речовин) повинні постійно контролюватися та фіксуватися автоматично, особливо у фотобіореакторних системах [36, 51].

Біологічну варіабельність можна мінімізувати шляхом використання синхронізованих культур і стандартизованих щільностей інокуляту. Регулярна калібровка приладів (спектрофотометри, рН-метри, аналітичні ваги) забезпечує точність вимірювань.

Системи гарантії якості (англ. Quality Assurance, QA) та контролю якості (англ. Quality Control, QC), адаптовані з принципів належної виробничої практики (англ. Good Manufacturing Practice, GMP), дедалі частіше впроваджуються в біотехнології мікроводоростей [36, 42, 51]. QA зосереджується на профілактиці відхилень шляхом стандартизації документації, навчання персоналу та валідації процесів, тоді як QC охоплює систематичне тестування чистоти культур, фізико-хімічних параметрів і біохімічного складу біомаси.

Надзвичайно важливою є прозорість і трасованість даних, зокрема зберігання метаданих про серії середовищ, умови культивування, походження інокуляту тощо, що дозволяє забезпечити достовірні порівняння та довгостроковий моніторинг [36, 51].

1.6.5. Інтегроване управління стерильністю, якістю води та відтворюваністю. Інтегроване управління, яке поєднує забезпечення стерильності, контроль контамінацій та моніторинг якості води, є основою відтворюваного культивування *Tetraselmis* spp. [9, 25, 36, 40, 42, 51, 64].

Запобіжні заходи, постійний моніторинг параметрів середовища та система коригувального контролю, інтегровані у систему управління якістю (ангд. Quality Management System, QMS), мінімізують ризики контамінації, підвищують стабільність процесу й забезпечують наукову достовірність отриманих результатів.

Підтримання асептичних умов, контроль складу води та дотримання стандартизованих протоколів дозволяють отримувати стабільні показники росту, прогнозований біохімічний профіль і масштабованість біотехнологічних процесів.

Таким чином, забезпечення стерильності, чистоти та відтворюваності є не лише технічною вимогою, а й науково-етичним принципом сучасної біотехнології мікробіодоростей, що гарантує достовірність, безпечність і сталий розвиток технологій на основі *Tetraselmis*.

Отже, рід *Tetraselmis* вирізняється високою фізіолого-біохімічною пластичністю та здатністю накопичувати значні кількості білків, ліпідів, пігментів і біологічно активних сполук, що визначає його перспективність як для лабораторного культивування, так і для промислових біотехнологічних застосувань. Водночас у літературі зберігаються прогалини щодо оптимальних діапазонів фізико-хімічних факторів, впливу поживних середовищ на біохімічний склад біомаси та застосування багатфакторних статистичних методів оптимізації. Тому для ефективного використання *Tetraselmis* необхідно враховувати біологічні особливості клітин, оптимізований склад середовищ і ключові абіотичні чинники, поєднуючи їх із сучасними підходами до планування експериментів; це підкреслює актуальність подальших досліджень, спрямованих на одержання високопродуктивної біомаси з прогнозованими властивостями.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Об'єкт дослідження

У роботі використовували культуру морської мікроводорості *Tetraselmis* sp., отриману з колекції мікроводоростей навчальної лабораторії кафедри біотехнології та радіології Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Штам підтримували у стерильних умовах і застосовували для постановки серії експериментів, спрямованих на оптимізацію складу поживного середовища та параметрів культивування.

Усі операції з культурою проводили відповідно до вимог біобезпеки у кабінеті біологічної безпеки II класу Streamline SC2-4S1 (Esco, Сінгапур), що забезпечувало надійний захист культури від контамінацій та підтримання необхідного рівня стерильності під час роботи.

2.2. Поживні середовища

Для культивування *Tetraselmis* sp. використовували три варіанти поживних середовищ: класичне f/2, Walne та Conway. Ці середовища є стандартом у культивуванні морських мікроводоростей і відрізняються балансом макро- та мікроелементів, що визначають темпи росту, метаболічну активність і якість отриманої біомаси.

Середовище f/2 є половинною модифікацією класичного середовища f і містить оптимізовані концентрації макроелементів (нітрат, фосфат, силікат), мікроелементів (Fe, Mn, Zn, Co, Cu, Mo) та вітамінів (ціанкобаламін, біотин,

тіамін), що забезпечує стабільний ріст широкого спектра морських мікроводоростей.

Середовище Walne вирізняється підвищеним вмістом мікроелементів та вітамінів, завдяки чому створює сприятливі умови для інтенсивного росту культур, що традиційно застосовуються як кормові об’єкти в аквакультурі.

Середовище Conway має збалансований склад, оптимізований для продуктивності *T. chuii*, і застосовується для накопичення біомаси з високим вмістом білка та ліпідів (табл. 2).

Таблиця 2

Склад поживних середовищ, використаних у дослідженні (на 1 л штучної морської води, солоність 30–32 ‰)

Компонент	f/2	Walne	Conway
Макроелементи			
NaNO ₃ (мг)	75	100	100
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (мг)	5	20	20
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O (мг) (для діатомових водоростей)	30	—	—
Мікроелементи			
FeCl ₃ ·6H ₂ O (мг)	3,15	4,36	4,36
Na ₂ EDTA·2H ₂ O (мг)	4,36	4,36	4,36
MnCl ₂ ·4H ₂ O (мг)	0,36	0,9	0,9
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (мг)	0,022	0,11	0,11
CoCl ₂ ·6H ₂ O (мг)	0,01	0,04	0,04
CuSO ₄ ·5H ₂ O (мг)	0,01	0,04	0,04
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (мг)	0,006	0,02	0,02
Вітаміни			
Тіамін (B ₁) (мкг)	200	200	200
Біотин (B ₇) (мкг)	1	2	2
Ціанкобаламін (B ₁₂) (мкг)	1	1	1

Примітка. Наведені дані узагальнені на основі офіційних протоколів NCMA (Bigelow Laboratory), CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa) та літературних джерел (Guillard, 1975; Walne, 1970; Ahmad et al., 2024).

Для вивчення впливу мінерального складу поживних середовищ концентрації ключових компонентів варіювали у межах $0,5\times$; $1\times$ і $2\times$ відносно стандартної формули f/2 та відповідних складів середовищ Walne і Conway. Це забезпечувало можливість визначення діапазону оптимуму мінерального забезпечення та оцінки чутливості культури до дефіциту чи надлишку окремих елементів.

Штучну морську воду (AquaForest, Польща) для приготування поживних середовищ готували на основі дистильованої води, доводячи солоність до рівня 30–32 PSU, що відповідає умовам природної морської води середньої солоності. За необхідності розчин додатково стерилізували методом мембранної фільтрації через стерильні фільтри (Biosigma, Італія) з діаметром пор 0,22 мкм, що забезпечувало видалення мікробних контамінантів і гарантувало стерильність середовищ.

Основні компоненти поживних середовищ стерилізували в автоклаві YXQ-LS-18SI (Shanghai Boxun Medical Biological Instrument Corp., Китай) при 121 °C протягом 20 хв. Термолабільні інгредієнти (вітаміни, окремі концентрати мікроелементів) стерилізували шляхом фільтрації через мембранні фільтри (0,22 мкм) і додавали до середовищ асептично після їх охолодження до кімнатної температури.

Усі процедури приготування та змішування середовищ проводилися в умовах стерильності у кабінеті біологічної безпеки II класу Streamline SC2-4S1 (Esco, Сінгапур), що забезпечувало високий рівень біозахисту та мінімізувало ризики мікробного забруднення.

2.3. Умови культивування

Культивування проводили у прозорих скляних колбах об'ємом 250 мл із робочим об'ємом середовища 100 мл. Процес культивування здійснювався на орбітальному шейкер-інкубаторі ES-20 (BioSan, Латвія), що забезпечувало рівномірне перемішування культур і підтримання стабільних умов інкубації.

Для уніфікації стартових умов і забезпечення коректності порівняння експериментальних варіантів суспензію *Tetraselmis* sp. перед інокуляцією стандартизували за допомогою фотометричного контролю до оптичної густини $OD_{680} = 0,10 \pm 0,01$. Обраний рівень інокулюму відповідає початку лінійної фази росту і мінімізує варіабельність, пов'язану з різною початковою концентрацією біомаси. Оптичну густину вимірювали за допомогою фотоколориметра КФК-2.

2.3.1. Температурний режим. Для встановлення оптимальних температурних умов росту культури *Tetraselmis* sp. інкубацію проводили в діапазоні 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C та 35 °C. Культивування здійснювали у шейкер-інкубаторі ES-20 (BioSan, Латвія), оснащеному системою прецизійного термоконтролю, що забезпечувало підтримання заданої температури з точністю $\pm 0,5$ °C. Такий підхід дозволив мінімізувати вплив температурних флуктуацій та забезпечити коректність порівняння експериментальних варіантів.

2.3.2. Контроль рН. Для дослідження впливу кислотно-лужних умов на ріст *Tetraselmis* sp. значення рН поживного середовища перед інокуляцією встановлювали у межах 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5 та 9,0. Корекцію рН здійснювали за допомогою розчинів 0,1 М NaOH або 0,1 М HCl, що забезпечувало прецизійне налаштування параметра без суттєвого впливу на іонний склад середовища. Подальший моніторинг значення рН проводили щоденно з використанням лабораторичного рН-метра ADWA AD1020 (ADWA, Угорщина).

2.3.3. Параметри світлового режиму. Для дослідження впливу світлових умов на ріст *Tetraselmis* sp. освітлення забезпечували фітосвітильником повного спектра LED-Story Florian PRO, 30 W (Chip Bridgelux), який створював стабільну інтенсивність 150 100–250 мкмоль фотонів $m^{-2} s^{-1}$. Спектральні режими формували за рахунок LED-модулів відповідних діапазонів: білого (повний спектр), синього (450–470 нм), червоного (620–660 нм) та комбінованого синьо-червоного світла у співвідношенні 70% синього і 30% червоного. Фотоперіод встановлювали відповідно до експериментального дизайну у трьох варіантах: 12:12 год (світло:темрява), 16:8 год (світло:темрява) та 24:0 год (безперервне освітлення). Усі режими освітлення задавали перед інокуляцією культури.

2.3.4. Параметри осмотичного та газового режимів. Для дослідження впливу осмотичних умов на ріст *Tetraselmis* sp. солоність штучної морської води перед інокуляцією встановлювали в межах 20, 25, 30, 35, 40 та 50 PSU. Робочі розчини готували на основі стерильної морської солі, розчиненої у дистильованій воді.

У дослідженні впливу газообміну оцінювали три режими аерації. Контрольний варіант утримували без подачі повітря, що дозволяло оцінити базовий рівень біомасоутворення за умов природної дифузії кисню та CO₂. У другому варіанті забезпечували постійну аерацію стерильним повітрям зі швидкістю 0,5 л/хв, що сприяло стабілізації рівня розчиненого кисню та інтенсифікації масообмінних процесів у суспензії. Третій варіант передбачав подачу повітря, збагаченого 1% CO₂; газову суміш пропускали через PTFE-фільтри з розміром пор 0,22 мкм для запобігання контамінації. Додавання CO₂ дозволяло стабілізувати рН середовища та підвищити доступність неорганічного вуглецю, необхідного для фотосинтетичних реакцій.

Усі режими солоності та аерації встановлювали перед інокуляцією культури *Tetraselmis* sp., а протягом експерименту контролювали параметри середовища, включаючи солоність, рН, температуру та інтенсивність аерації. Такий підхід забезпечував відтворюваність умов та дозволяв чітко оцінити реакцію культури на осмотичне та газове навантаження.

2.4. Морфологічний та кількісний аналіз культури

Для мікроскопічних досліджень використовувався мікроскоп Carl Zeiss AxioLab A1 FL (Німеччина), обладнаний системою для світлової та флуоресцентної мікроскопії. Для реєстрації зображень застосовувалася кольорова цифрова камера AxioCam 208 color (8 Мпікс), інтегрована з мікроскопом. У комплекті використовувалося спеціалізоване програмне забезпечення, що забезпечувало виведення «живого» зображення на екран комп'ютера, регулювання параметрів камери, захоплення та збереження

зображень, нанесення анотацій (масштабні лінійки, текстові та графічні позначки), проведення ручних морфометричних вимірювань (довжина, ширина, площа, кути) та запис відеороликів.

Візуалізація клітин проводилася щоденно у світловому (англ. bright field) режимі при збільшеннях $\times 200$ – 1000 . Це дозволяло контролювати морфологічний стан клітин, оцінювати форму, розмір та рухливість, а також виявляти можливі ознаки стресу або контамінації. Флуоресцентна мікроскопія застосовувалася для додаткової оцінки стану хлоропластів та рівня пігментації.

Кількісний аналіз культури здійснювали шляхом підрахунку клітин у гемоцитометричній камері при збільшенні $\times 400$. Перед підрахунком клітини знерухомлювали шляхом додавання краплі розчину Люголя для запобігання їх руху та забезпечення коректності підрахунку. Паралельно визначали щільність культури спектрофотометричним методом, вимірюючи оптичну густину при довжині хвилі 680 нм, що відповідає піку поглинання хлорофілу *a*.

2.5. Визначення сухої маси та беззольної сухої маси

Визначення сухої маси (DW) та беззольної сухої маси (AFDW) є стандартним методом оцінки продуктивності мікроводоростей, який дозволяє кількісно охарактеризувати як загальну, так і органічну фракцію біомаси.

Культуру *Tetraselmis* sp. центрифугували при 5000 g протягом 10 хв для відділення клітинного осаду від середовища. Осад двічі промивали дистильованою водою для видалення солей та залишків компонентів поживного середовища, що можуть спотворювати реальні значення маси.

Для визначення DW очищений біомасовий осад переносили на попередньо висушені та зважені фільтри (целюлозні мембрани). Зразки висушували у сушильному шафі при 105 °C до сталої маси, зазвичай протягом 12–24 год. Повторне зважування виконували після охолодження у ексікаторі, що запобігало поглинанню вологи з повітря.

DW розраховували за формулою:

$$DW \text{ (г/л)} = \frac{m_{105} - m_{\text{фільтра}}}{V_{\text{зразка}}}$$

де

m_{105} — маса фільтра із зразком після висушування при 105 °С, г;

$m_{\text{фільтра}}$ — маса чистого фільтра, г;

$V_{\text{зразка}}$ — об'єм проаналізованої суспензії, л.

Для визначення органічної складової DW зразки додатково прокалювали у муфельній печі при 550 °С протягом 4 год. Ця температура забезпечує повне окиснення органічної речовини, не викликаючи значних втрат мінеральної фракції. Після прокалювання фільтри зразками охолоджували в ексікаторі і повторно зважували.

AFDW розраховували як:

$$AFDW \text{ (г/л)} = DW \text{ (г/л)} - \text{Зола (г/л)}$$

де:

$$\text{Зола (г/л)} = \frac{m_{550} - m_{\text{фільтра}}}{V_{\text{зразка}}}$$

m_{550} — маса фільтра після прокалювання (г),

$m_{\text{фільтра}}$ — маса чистого фільтра (г),

$V_{\text{зразка}}$ — об'єм проаналізованої проби (л).

2.6. Визначення питомої швидкості росту (μ)

Питому швидкість росту розраховували за експоненційною моделлю на основі зміни чисельності клітин у лог-фазі росту. Підрахунок клітин виконували у гемоцитометричній камері при збільшенні $\times 400$. Значення μ обчислювали за формулою:

$$\mu \text{ (доб}^{-1}\text{)} = \frac{\ln(N_2) - \ln(N_1)}{t_2 - t_1}$$

де

N_1 та N_2 — щільність культури у відповідні моменти часу, клітин/мл;

t_1 та t_2 — час культивування, доби.

2.7. Визначення вмісту хлорофілів a і b

Вміст фотосинтетичних пігментів визначали спектрофотометричним методом за Lichtenthaler та Buschmann (Lichtenthaler et al., 2005). Для аналізу відбирали 5 мл культури, які двічі відмивали охолодженою дистильованою водою для видалення залишків середовища. Осаджену біомасу ресуспендували у 1 мл дистильованої води та переносили у скляні пробірки, після чого додавали 4 мл чистого ацетону. Пробірки закривали алюмінієвою фольгою з метою захисту від світла та інкубували при 4 °C до повного екстрагування пігментів, що підтверджувалося знебарвленням біомаси [51].

Оптичну густину одержаних екстрактів вимірювали на спектрофотометрі при довжинах хвиль 663 та 647 нм. Концентрацію хлорофілу a , хлорофілу b та їх сумарного вмісту розраховували за рівняннями Lichtenthaler і Buschmann:

$$\text{Chl } a \text{ (мг/л)} = 12.25 \cdot A_{663} - 2.79 \cdot A_{647}$$

$$\text{Chl } b \text{ (мг/л)} = 21.50 \cdot A_{647} - 5.10 \cdot A_{663}$$

$$\text{Chl}_{\text{заг.}} \text{ (мг/л)} = \text{Chl } a + \text{Chl } b$$

де

$\text{Chl } a$ (мг/л) — концентрація хлорофілу a в ацетоновому екстракті;

$\text{Chl } b$ (мг/л) — концентрація хлорофілу b в ацетоновому екстракті;

$\text{Chl}_{\text{заг.}}$ (мг/л) — сумарний вміст хлорофілів ($a + b$);

A_{663} — оптична густина екстракту при довжині хвилі 663 нм;

A_{647} — оптична густина екстракту при довжині хвилі 647 нм;

12.25, 2.79, 21.50, 5.10 — емпіричні коефіцієнти Lichtenthaler і Buschmann, що враховують внесок відповідних пігментів у поглинання світла.

Результати виражали у перерахунку на вміст пігментів у вологій біомасі.

Усі процедури проводили при мінімальному освітленні для запобігання фотодеградації пігментів.

2.8. Визначення вмісту білків

Лужну екстракцію білків проводили за модифікованим методом Pruvost et al. (2011). Осади мікроводоростей, отримані після центрифугування, ресуспендували у 100 мкл дистильованої води, після чого до суспензії додавали 100мкл 2 N NaOH. Суміш інкубували при 95 °C протягом 6 хв, що забезпечувало лужну деструкцію клітинних структур та перехід білкових компонентів у розчин. Після завершення інкубації проби нейтралізували додаванням мк 1,6 N HCl та використовували для подальшого визначення концентрації білка.

Вміст загального білка визначали модифікованим методом Лоурі (Lowry et al., 1951; Safi et al., 2014). До аліквот лужного екстракту додавали 2 мл робочого лужного мідного реактиву, що містив $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, натрій-калій тартрат та Na_2CO_3 , розчинені у 0,5 N NaOH у співвідношенні 1:1:50. Після перемішування проби інкубували при 25 °C протягом 10 хв. Далі до реакційної суміші додавали 3 мл 10-кратного розведення реактиву Фоліна—Чокальтеу, повторно перемішували та інкубували ще 10 хв за кімнатної температури. Оптичну густину отриманих зразків вимірювали при 750 нм на спектрофотометрі. Концентрацію білка визначали за калібрувальною кривою, побудованою на основі стандартних розчинів бичачого сироваткового альбуміну в діапазоні 0–2000 мкг/мл.

2.9. Визначення вмісту ліпідів

Вміст ліпідів у сухій біомасі визначали гравіметричним методом за модифікованим методом Фолча (Folch et al., 1951). Для екстракції ліпідів

використовували попередньо висушену біомасу, до якої додавали суміш хлороформу та метанолу у співвідношенні 2:1 (v/v). Суміш ретельно перемішували до повного вилучення ліпідів у органічну фазу. Отриманий екстракт переносили у ділильну лійку та промивали 0,88 % (w/v) розчином KCl з метою видалення водорозчинних домішок та забезпечення чіткого фазового розділення. Нижню хлороформну фазу, що містила ліпідну фракцію, відбирали та осушували над безводним сульфатом натрію (Na_2SO_4). Після осушування екстракт фільтрували через знежирений фільтрувальний папір у заздалегідь зважену круглодонну колбу. Розчинник видаляли шляхом випаровування до отримання сухого ліпідного залишку. Масову частку ліпідів виражали у відсотках від сухої маси клітин (% d.w.) [51].

Розрахунок проводили за формулою:

$$\text{Ліпіди, \% d.w.} = \frac{m_{\text{ліпідів}}}{m_{\text{сухої біомаси}}} \times 100,$$

де

$m_{\text{ліпідів}}$ — маса виділених ліпідів, г;

$m_{\text{сухої біомаси}}$ — маса сухої біомаси, взятої для аналізу, г.

2.10. Статистична обробка даних

Статистичну обробку результатів досліджень проводили із використанням програмного забезпечення Microsoft Office 365. Усі експериментальні варіанти виконували у трьох біологічних повторах, а кожен показник вимірювали щонайменше у трьох технічних повторах.

Отримані дані подано у вигляді $M \pm SD$ (середнє значення $\pm$ стандартне відхилення). Середні значення та стандартні відхилення обчислювали штатними статистичними функціями Microsoft Excel (AVERAGE, STDEV.S).

Для оцінки відмінностей між варіантами умов культивування (температура, рН, мінеральний склад середовищ, солоність, режими газообміну, спектральний склад світла, фотоперіод) застосовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA), реалізований у модулі Data Analysis Microsoft Excel. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Графічну візуалізацію даних (стовпчикові та лінійні графіки) виконували засобами Microsoft Excel із відображенням похибок (SD), що характеризують варіабельність між біологічними повторами.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив мінерального складу поживних середовищ на ріст та фізіологічний стан *Tetraselmis* sp.

Для оцінки ролі мінерального забезпечення у рості *Tetraselmis* sp. було закладено серію дослідів із варіюванням концентрацій ключових компонентів поживних середовищ Walne, Conway та f/2. Для кожного середовища готували три варіанти: 0,5×, 1× (стандартний склад) та 2×. Такий підхід дозволив встановити діапазон оптимальної забезпеченості мінеральними елементами та визначити чутливість культури до їх дефіциту або надлишку. Культивування проводили за стандартних умов, рекомендованих у літературі для *Tetraselmis* sp., зокрема при температурі 25 °C, солоності 30 PSU, інтенсивності освітлення 150 мкмоль фотонів м⁻² с⁻¹ та фотоперіоді 12:12 (світло : темрява) [11, 16, 51]. Дотримання цих параметрів забезпечувало оптимальний фізіологічний стан культури та відтворюваність експериментальних результатів.

3.1.1. Морфологічні характеристики клітин *Tetraselmis* sp. за різного мінерального складу середовищ. Упродовж перших 2–4 діб культивування морфологія клітин *Tetraselmis* sp. у варіантах 1× і 2× для всіх трьох середовищ залишалася типовою: клітини мали веретеноподібну форму, чітко виражений хлоропласт та активну рухливість. У варіантах 0,5× відзначалося помірне зниження інтенсивності руху та рівня пігментації, особливо у культурах на середовищах f/2 та Conway. Це свідчило про початкову реакцію клітин на нестачу макро- та мікроелементів, зокрема N, P та Fe.

На 7–10 добу було виявлено суттєві морфологічні відмінності залежно від концентрації компонентів. У варіантах 2× Walne і 2× Conway спостерігалися щільні асоціації клітин, інтенсивне зелене забарвлення хлоропластів та

поодинокі випадки збільшення їх розміру, що може свідчити про накопичення запасних речовин (переважно ліпідів та пігментів). У варіанті $2 \times f/2$ відзначали поодинокі зміни у структурі цитоплазми, зокрема легку вакуолізацію, що може бути реакцією на надлишок окремих солей.

У варіантах $0,5 \times$ у всіх типах середовищ спостерігали ознаки стресу: зниження рухливості, нерівномірна пігментація, поява клітин із невеликою деформацією контурів. Найбільш виражені зміни були у $0,5 \times f/2$, що вказує на низьку здатність цього середовища компенсувати мінеральний дефіцит.

3.1.2. Динаміка ростових показників культури *Tetraselmis* sp. за різних концентрацій мінеральних компонентів. Аналіз отриманих даних для дев'яти варіантів поживних середовищ виявив чітку залежність росту культури від рівня мінерального забезпечення. Максимальні значення щільності культури спостерігалися у варіантах $2 \times$ Walne та $2 \times$ Conway, де на 12-ту добу показники досягали $14,1 \times 10^6$ та $12,8 \times 10^6$ клітин/мл відповідно (рис. 3.1).

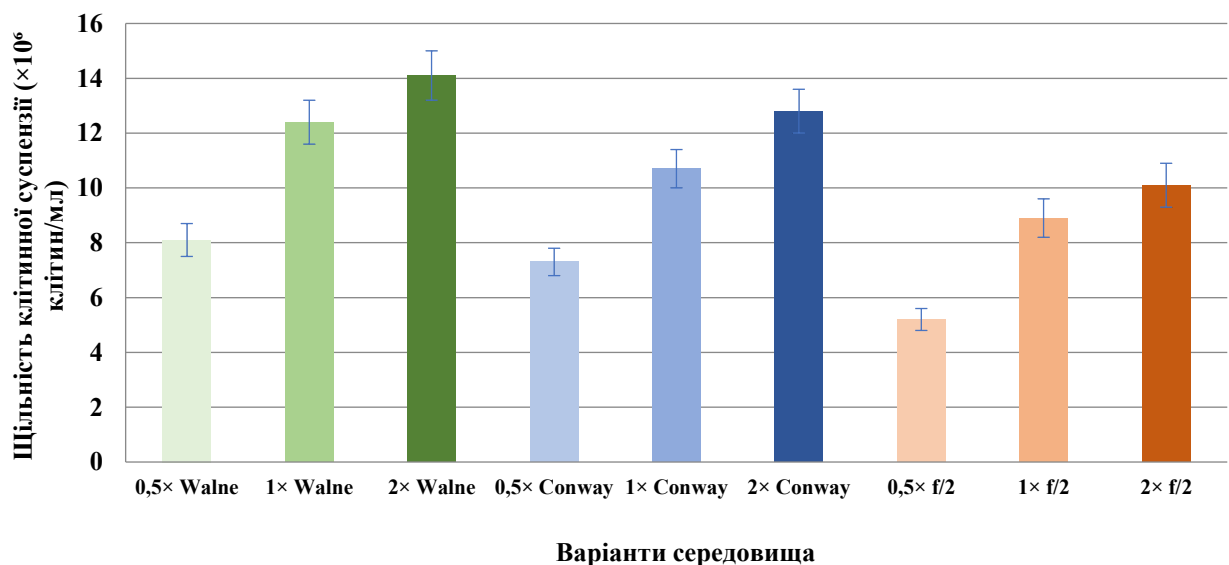


Рис. 3.1 Щільність клітин *Tetraselmis* sp. за різних варіантів мінерального забезпечення (Walne, Conway, f/2 у концентраціях $0,5 \times$, $1 \times$, $2 \times$). По осі абсцис наведені дослідні варіанти, по осі ординат — середня щільність суспензії ($\times 10^6$ клітин/мл). Дані представлені як Mean $\pm$ SD.

Порівняно з базовими концентраціями ($1 \times$), ці значення були статистично вищими ($p < 0,05$). Таке зростання свідчить про виражений позитивний ефект

підвищеної концентрації макро- та мікроелементів на пролонгування ростової активності клітин *Tetraselmis* sp.

У варіантах із базовими концентраціями ($1\times$) у всіх трьох середовищах спостерігалася стабільна динаміка росту з характерними максимальними значеннями, наближеними до показників контрольного експерименту. Це підтверджує, що концентрація $1\times$ забезпечує фізіологічно комфортні умови для культури та є близькою до оптимуму для даного штаму.

Найнижчі значення щільності клітин спостерігалися у варіантах $0,5\times$, що свідчить про обмеження ростових процесів за умов дефіциту ключових елементів мінерального живлення. Зниження рівня біомаси у цих варіантах було статистично значущим порівняно з варіантом $1\times$ ($p < 0,05$) та корелювало зі скороченням тривалості експоненційної фази й появою мікроскопічних ознак стресу, що підтверджує чутливість *Tetraselmis* sp. до нестачі макро- та мікроелементів.

Отримані показники оптичної густини (OD_{680}) свідчать про суттєві відмінності у рівні пігментації культури *Tetraselmis* sp. залежно від концентрації мінеральних компонентів поживного середовища. Найвищі значення OD_{680} були зафіксовані у варіантах $2\times$ Walne та $2\times$ Conway, де оптична густина становила відповідно 0,98 та 0,90. Порівняно з варіантом $1\times$, ці значення були статистично вищими ($p < 0,05$), що вказує на підвищений вміст фотосинтетичних пігментів, передусім Chl *a*, що є характерною ознакою активного фотосинтетичного апарату.

У варіантах $1\times$ рівень показник OD_{680} залишався стабільним і відповідав середньостатистичним значенням для культури в оптимальних умовах, що добре корелює з отриманими показниками щільності клітин. Найнижчі значення OD_{680} спостерігалися у середовищах $0,5\times$, особливо у варіанті $0,5\times$ f/2, де оптична густина не перевищувала 0,40. Зниження показника OD_{680} було статистично значущим порівняно з $1\times$ ($p < 0,05$), що свідчить про зменшення пігментації та пригнічення фотосинтетичної активності клітин (рис. 3.2).

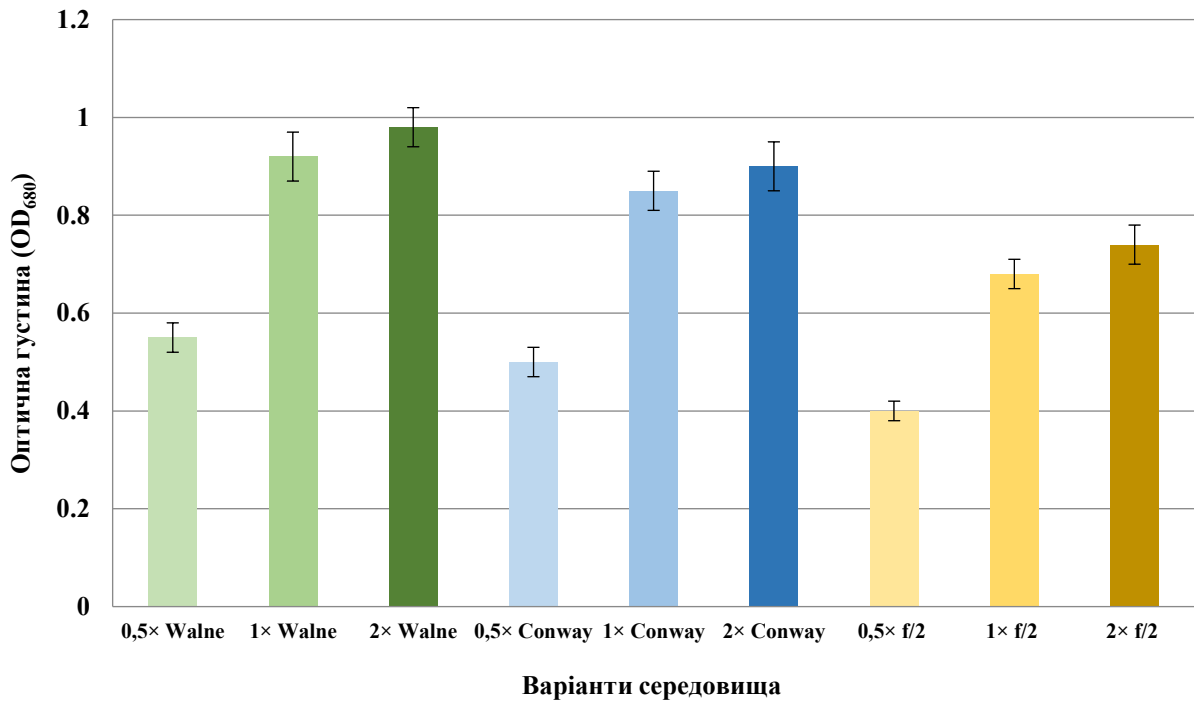


Рис. 3.2 Оптична густина (OD₆₈₀) культури *Tetraselmis* sp. за різних варіантів мінерального забезпечення (Walne, Conway, f/2 у концентраціях 0,5×, 1×, 2×). По осі абсцис наведені дослідні варіанти, по осі ординат — середнє значення OD₆₈₀. Дані представлені як Mean ± SD.

Порівняння дев'яти варіантів середовищ демонструє чітку тенденцію: збільшення концентрації мінеральних компонентів (1× → 2×) сприяє інтенсивнішому накопиченню пігментів, тоді як їх дефіцит (0,5×) призводить до зниження OD₆₈₀ та погіршення фотосинтетичної активності клітин. Найбільш виражений позитивний ефект підвищеної мінералізації відзначено у середовищі Walne, що узгоджується з його високим вмістом мікроелементів та оптимальним співвідношенням поживних солей.

Таким чином, рівень оптичної густини при 680 нм є чутливим індикатором фізіологічного стану культури *Tetraselmis* sp. і виразно відображає реакцію клітин на різне мінеральне забезпечення. Варіанти 1× і 2× Walne та Conway забезпечують оптимальні умови для пігментного апарату, тоді як знижена концентрація розчинних мінеральних компонентів у варіантах 0,5× призводить до зменшення інтенсивності пігментації та ознак стресу.

Узагальнюючи отримані дані, можна стверджувати, що *Tetraselmis* sp. демонструє високу чутливість до рівня мінерального забезпечення, а реакція культури суттєво залежить від складу поживного середовища. Підвищення концентрації компонентів до $1\times$ – $2\times$ сприяло інтенсивнішому росту та накопиченню пігментів, тоді як дефіцит мінералів ($0,5\times$) призводив до пригнічення ростових процесів та ознак стресу. Найвищі показники щільності клітин та OD₆₈₀ були зафіксовані у варіанті $2\times$ Walne, що свідчить про оптимальне співвідношення макро- та мікроелементів у цьому середовищі. Саме тому середовище Walne у концентрації $2\times$ було обране для проведення наступних експериментів.

3.2. Вплив температури та кислотно-лужних умов (pH) на ріст культури *Tetraselmis* sp.

3.2.1. Температурна чутливість та її вплив на ростові й морфологічні характеристики клітин *Tetraselmis* sp. Мікроскопічні спостереження та ростові показники свідчать, що температура є одним із визначальних фізико-хімічних факторів, який суттєво впливає на фізіологічний стан та динаміку росту *Tetraselmis* sp. Упродовж перших 3–4 діб культивування в досліджуваному температурному діапазоні (15–35 °C) у культурах, інкубованих при 20–30 °C, клітини зберігали типовий веретеноподібний вигляд із чотирма джгутиками, чітко вираженим хлоропластом та високою рухливістю. При 25 °C спостерігалася найбільш інтенсивна рухливість, однорідність суспензії та насичене зелене забарвлення, що вказує на активний фотосинтез.

При 15 °C спостерігалася сповільнення метаболічної активності: рухливість знижувалася, частина клітин набувала округлої форми, а інтенсивність пігментації була помірною. При підвищенні температури до 35 °C з'являлися виражені ознаки стресу: клітини демонстрували знижену рухливість, у цитоплазмі відзначалися вакуолі, окремі клітини втрачали джгутики, що свідчить про теплову дестабілізацію клітинних структур.

Динаміка ростових показників культури *Tetraselmis* sp. при різних температурах наведена на рис. 3.3 і у табл. 3.1.

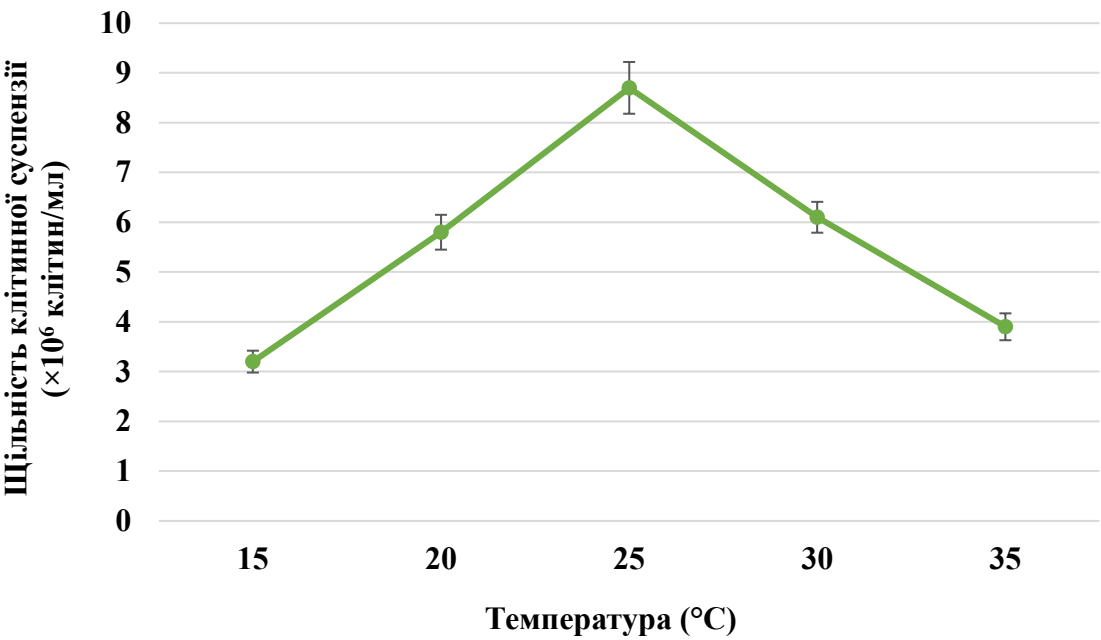


Рис. 3.3 Вплив температури на щільність клітинної суспензії *Tetraselmis* sp. По осі абсцис наведено температуру культивування (°C), по осі ординат — щільність клітинної суспензії (×10⁶ клітин/мл). Дані представлені як Mean ± SD.

Таблиця 3.1

Показники росту культури *Tetraselmis* sp. за різних температурних умов

Температура, °C	Максимальна щільність (×10 ⁶ клітин/мл)	OD ₆₈₀	Морфологічний стан
15	5,6 ± 0,4	0,41 ± 0,03	Помірний стрес, знижена рухливість
20	10,4 ± 0,6	0,78 ± 0,04	Нормальний ріст
25	11,8 ± 0,7	0,89 ± 0,05	Найкращий стан, максимальна активність
30	9,3 ± 0,5	0,72 ± 0,03	Добрий ріст, початкові ознаки стресу
35	4,3 ± 0,3	0,33 ± 0,02	Виражений тепловий стрес

Найвищу кінцеву щільність культури було зафіксовано при 25 °C — $11,8 \pm 0,7 \times 10^6$ клітин/мл, що було статистично достовірно вище, ніж при 15 °C та 35 °C ($p < 0,05$). Значення при 20 °C та 30 °C — відповідно $10,4 \pm 0,6$ і $9,3 \pm 0,5 \times 10^6$ клітин/мл — також були достовірно нижчими від показників при 25 °C ($p < 0,05$), але між собою не відрізнялися статистично значущо ($p > 0,05$).

При 15 °C та 35 °C ріст був пригнічений: щільність культури не перевищувала $5,6 \pm 0,4$ та $4,3 \pm 0,3 \times 10^6$ клітин/мл відповідно. Різниця між цими двома екстремальними температурами була статистично недостовірною ($p > 0,05$), тоді як обидві умови достовірно відрізнялися від оптимальних температур ($p < 0,05$) (див. табл. 3.1).

Таким чином, оптимальним температурним діапазоном для даного штаму *Tetraselmis sp.* є 22–28 °C, з абсолютним максимумом росту при 25 °C ($p < 0,05$). Температури нижче 20 °C та вище 30 °C призводять до значного зниження росту та погіршення морфологічних характеристик клітин.

3.2.2. Вплив pH на ріст та фізіологічний стан клітин *Tetraselmis sp.*
Дослідження росту *Tetraselmis sp.* за умов початкового pH 6,5–9,0 дозволило оцінити межі кислотно-лужної толерантності штаму. Найкращі морфологічні та фізіологічні показники фіксувалися у діапазоні pH 7,5–8,5: клітини характеризувалися високою рухливістю, типовою формою та однорідною пігментацією. При pH 6,5 спостерігалися ознаки кислотного стресу — сповільнення рухливості та деформації клітинних контурів. Лужний стрес при $\text{pH} \geq 8,5$ проявлявся у вигляді вакуолізації, потовщення клітинної стінки та зниження рухливості.

Ростові показники демонструють виражену залежність біомасоутворення від кислотно-лужного режиму. Найвищу кінцеву щільність культури отримано при pH 8,0 ($12,1 \pm 0,8 \times 10^6$ клітин/мл) (рис. 3.4 і табл. 3.2).

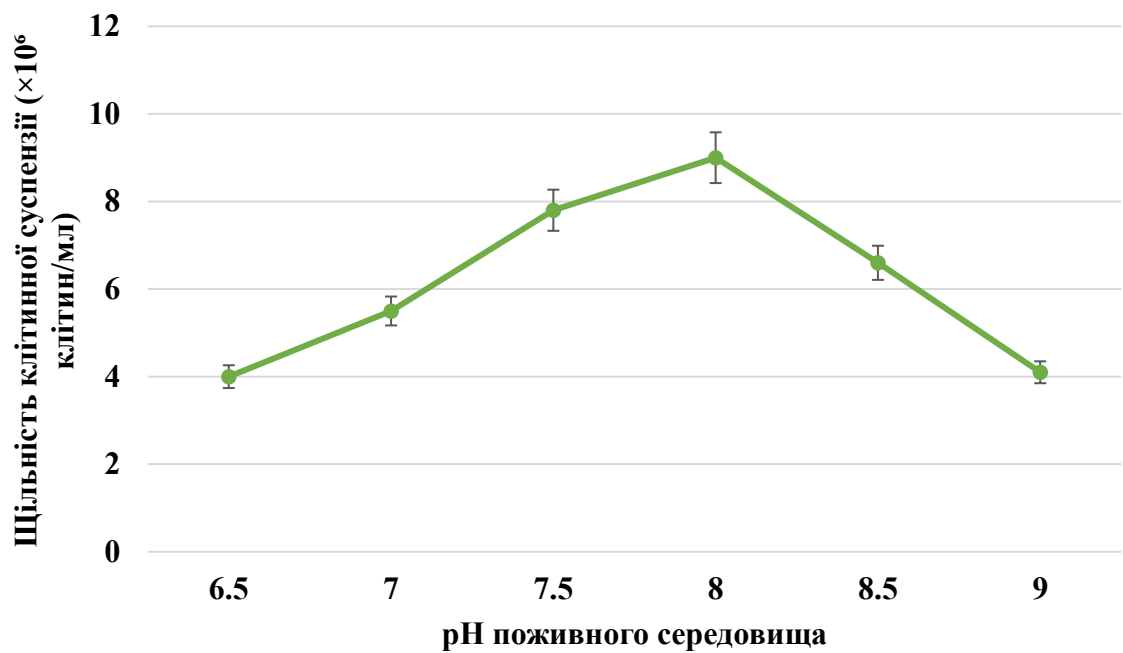


Рис. 3.4 Вплив кислотно-лужних умов (pH) на щільність клітинної суспензії *Tetraselmis* sp. По осі абсцис наведено значення pH, по осі ординат — щільність клітинної суспензії ($\times 10^6$ клітин/мл). Дані представлені як Mean $\pm$ SD.

Таблиця 3.2

Вплив pH на кінцеву щільність культури *Tetraselmis* sp.

pH	Максимальна щільність ($\times 10^6$ клітин/мл)	OD ₆₈₀	Морфологічний стан
6,5	6,1 $\pm$ 0,4	0,46 $\pm$ 0,03	Кислотний стрес
7,0	9,7 $\pm$ 0,5	0,71 $\pm$ 0,04	Задовільний ріст
7,5	11,3 $\pm$ 0,7	0,82 $\pm$ 0,04	Висока активність
8,0	12,1 $\pm$ 0,8	0,91 $\pm$ 0,05	Оптимальний стан
8,5	10,9 $\pm$ 0,6	0,79 $\pm$ 0,04	Дещо підвищена лужність
9,0	5,3 $\pm$ 0,3	0,38 $\pm$ 0,02	Виражений лужний стрес

Найвищу кінцеву щільність було отримано при pH 8,0 — $12,1 \pm 0,8 \times 10^6$ клітин/мл, що статистично достовірно перевищувало показники при pH 6,5, 7,0 та 9,0 ($p < 0,05$). Значення при pH 7,5 ($11,3 \pm 0,7$) та pH 8,5 ($10,9 \pm 0,6$) також належали до групи високої ростової активності та не відрізнялися статистично між собою ($p > 0,05$), але були достовірно нижчими, ніж при pH 8,0 ($p < 0,05$). При pH 6,5 та 9,0 ріст був пригнічений: кінцева щільність клітин не

перевищувала відповідно $6,1 \pm 0,4$ та $5,3 \pm 0,3 \times 10^6$ клітин/мл, що достовірно відрізнялося від оптимальних умов ($p < 0,05$), але не демонструвало статистично значущої різниці між собою ($p > 0,05$) (див. табл. 3.2). Це підтверджує, що як кислотний, так і лужний стрес знижують фізіологічну активність культури.

Таким чином, оптимальний pH для стабільного росту *Tetraselmis* sp. знаходиться в межах 7,5–8,5, із найвищими показниками біомасоутворення при pH 8,0 ($p < 0,05$). Отримані результати свідчать, що температурний режим і кислотно-лужний баланс середовища є ключовими факторами, які визначають інтенсивність росту, рівень пігментації та морфологічний стан клітин *Tetraselmis* sp. Найсприятливішими умовами для культивування цього штаму є температура 25 ± 1 °C та pH $8,0 \pm 0,2$, що забезпечують максимальне накопичення біомаси та підтримання стабільного фізіологічного стану культури. Ці параметри узгоджуються з літературними даними щодо мезофільної та слабколужної природи представників роду *Tetraselmis* [6, 51].

З урахуванням отриманих результатів, зазначені умови були обрані як базові для подальших експериментів, спрямованих на оптимізацію складу поживного середовища та вивчення біохімічних характеристик культури.

3.3. Вплив солоності та аерації/CO₂ на біомасоутворення *Tetraselmis* sp.

3.3.1. Морфологічна оцінка клітин *Tetraselmis* sp. у різних умовах солоності та газообміну. Мікроскопічні дослідження показали, що культура *Tetraselmis* sp. демонструє чутливу реакцію на зміну солоності середовища та інтенсивність газообміну. У варіантах із помірною солоністю (25–35 PSU) клітини протягом перших 3–4 діб зберігали типовий веретеноподібний вигляд, чітко структурований хлоропласт та високу рухливість. Рівномірне зелене забарвлення клітин вказувало на активний фотосинтез та задовільний фізіологічний стан.

За умов зниженої солоності (20 PSU) частина клітин проявляла ознаки осмотичного стресу: спостерігалось зниження рухливості, поява дрібних

вакуолей та локальне «розбухання» клітинних оболонок. Ці зміни свідчать про підвищене навантаження на осморегуляторні системи клітини.

При підвищенні солоності до 40–50 PSU фіксувалися ознаки гіперосмотичного стресу: уповільнення руху, поява клітин зі зменшеним об'ємом та поодинокі деформації контурів. Щільніше цитоплазматичне наповнення та зміни пігментації вказували на порушення водного балансу.

У варіантах з аерацією та додаванням CO₂ клітини демонстрували підвищену інтенсивність пігментації, стабільні обриси хлоропласта та вищу рухливість порівняно з неаерованим контролем. Найбільш виражений позитивний ефект спостерігався у варіанті аерації з 1% CO₂, що свідчить про покращення карбоксилазної активності та активне біосинтетичне навантаження.

3.3.2. Динаміка ростових показників *Tetraselmis* sp. за різних умов солоності. Порівняльний аналіз росту *Tetraselmis* sp. у діапазоні солоності 20–50 PSU свідчить про наявність чітко окресленого оптимального осмотичного діапазону (рис. 3.5).

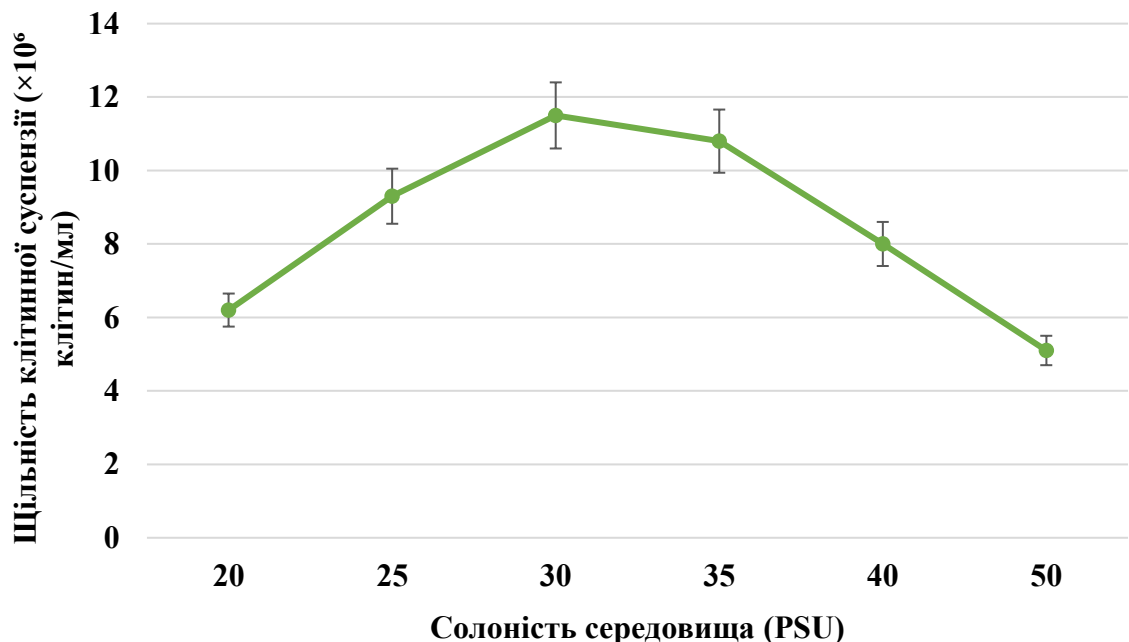


Рис. 3.5 Вплив солоності на щільність клітинної суспензії *Tetraselmis* sp. По осі абсцис — солоність середовища (PSU), по осі ординат — щільність клітинної суспензії (×10⁶ клітин/мл). Дані представлені як Mean ± SD.

Максимальні показники біомасоутворення були зафіксовані при 30–35 PSU, де щільність клітинної суспензії становила $10,8 \pm 0,8 - 11,5 \pm 0,9 \times 10^6$ клітин/мл. Така реакція свідчить про адаптованість штаму до умов середньої морської солоності, що забезпечує оптимальний іонний баланс та стабільність клітинних структур.

У варіанті зниженої солоності (20 PSU) спостерігалось істотне зниження інтенсивності росту ($p < 0,05$): максимальна щільність культури становила лише $6,2 \pm 0,4 \times 10^6$ клітин/мл. Це може бути наслідком підвищених енергетичних витрат на осморегуляцію та порушення мембранної цілісності.

При солоності 40 PSU фіксувалися помірні ознаки гіперосмотичного стресу, що зумовлювало зниження щільності до $8,0 \pm 0,6 \times 10^6$ клітин/мл. Подальше підвищення солоності до 50 PSU призводило до різкого пригнічення росту ($5,1 \pm 0,4 \times 10^6$ клітин/мл), що свідчить про порушення водного балансу та зміну структурних властивостей клітин.

Таким чином, оптимальний ріст та найбільш інтенсивне біомасоутворення *Tetraselmis* sp. забезпечуються у діапазоні солоності 30–35 PSU, тоді як відхилення в бік нижчих або вищих значень супроводжуються пригніченням ростових процесів.

3.3.3. Вплив аерації та CO₂ на ріст *Tetraselmis* sp. Дослідження росту *Tetraselmis* sp. за різних режимів газообміну продемонструвало суттєвий вплив як аерації, так і збагачення середовища діоксидом вуглецю на інтенсивність біомасоутворення та фізіологічний стан клітин. Порівняння трьох експериментальних варіантів — без аерації, з аерацією повітрям та із подачею 1% CO₂ — показало встатистично значущу ($p < 0,05$) диференціацію ростових показників та морфологічних характеристик культури.

У варіанті без аерації максимальна щільність становила $7,1 \pm 0,4 \times 10^6$ клітин/мл. Спостерігалися ознаки часткової деколорації, помірна вакуолізація та зниження метаболічної активності, що може бути пов'язано з обмеженим надходженням кисню та нерівномірним забезпеченням CO₂, необхідного для фотосинтезу.

Аерація повітрям зі швидкістю 0,5 л/хв забезпечила істотне покращення росту: щільність культури становила $10,2 \pm 0,7 \times 10^6$ клітин/мл. Мікроскопічно клітини зберігали високу рухливість, однорідність морфології та інтенсивну пігментацію. Постійне надходження кисню сприяло оптимізації дихальних та фотосинтетичних процесів.

Найвищі показники біомасоутворення були отримані у варіанті з аерацією, збагаченою 1% CO₂ — $12,8 \pm 0,8 \times 10^6$ клітин/мл ($p < 0,05$ порівняно з усіма іншими варіантами) (рис. 3.6).

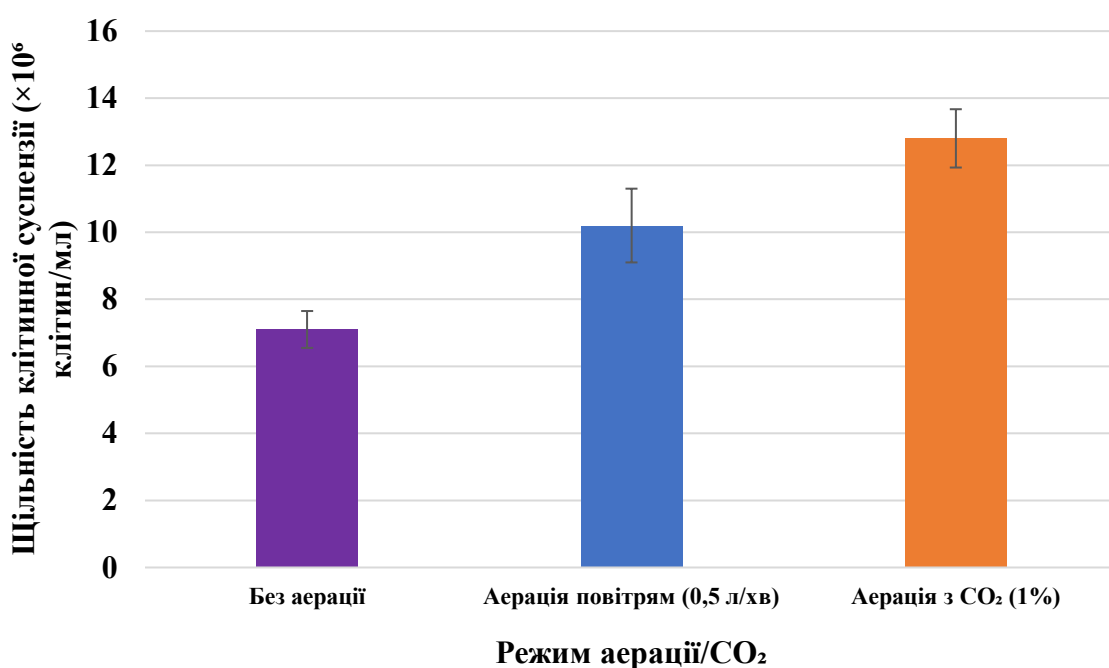


Рис. 3.6 Вплив режимів аерації та CO₂ на ріст *Tetraselmis* sp. По осі абсцис — режим аерації (0, 0,5 л/хв, 1% CO₂), по осі ординат — щільність клітинної суспензії ($\times 10^6$ клітин/мл). Дані представлені як Mean $\pm$ SD.

Клітини демонстрували насичене зелене забарвлення, високу активність та відсутність ознак стресу. Надходження CO₂ забезпечувало стабілізацію рН та оптимальний рівень неорганічного вуглецю, необхідного для фотосинтезу та синтезу органічних сполук.

Результати дослідження демонструють, що солоність та режими газообміну є критичними параметрами, які визначають інтенсивність росту та

здатність *Tetraselmis* sp. до накопичення біомаси. Найвищі показники були отримані за умов солоності 30–35 PSU та активної аерації із додаванням 1% CO₂.

Зниження солоності до 20–25 PSU викликало осмотичний дисбаланс і пригнічення ростових процесів, тоді як підвищення до 40–50 PSU призводило до гіперосмотичного стресу та зменшення продуктивності. Відсутність аерації спричиняла найнижчі показники росту, тоді як збагачення середовища CO₂ забезпечувало інтенсивний фототрофний метаболізм і максимальне біомасоутворення.

Отже, оптимальні умови культивування *Tetraselmis* sp. включають солоність 30–35 PSU та активну аерацію із збагаченням повітря 1% CO₂, що може бути рекомендовано як базові параметри для подальших біотехнологічних досліджень і масштабування процесів культивування.

3.4. Вплив спектрального складу світла та фотоперіоду на ріст *Tetraselmis* sp.

3.4.1. Морфологічна реакція клітин *Tetraselmis* sp. на різні режими освітлення. Дослідження впливу світлових умов на ріст *Tetraselmis* sp. проводили за сталої інтенсивності освітлення 150 мкмоль фотонів м⁻² с⁻¹, що відповідає середньому рівню PAR для культивування морських мікроводоростей. Оцінювали два чинники: спектральний склад світла та тривалість фотоперіоду.

Протягом перших діб культивування у всіх спектральних варіантах клітини зберігали типовий веретеноподібний вигляд, чітко виражений хлоропласт та активну рухливість. Найбільш інтенсивна пігментація спостерігалася у варіантах із синіми LED (450–470 нм) та комбінованим синьо-червоним спектром (70% синє світло : 30% червоне світло). Ці режими забезпечували насичене зелене забарвлення, чітку структуру хлоропласта та високу рухливість, що свідчить про ефективний фотосинтез. У варіанті з червоним світлом (620–660 нм) морфологія клітин залишалася стабільною,

однак пігментація була менш інтенсивною. При повному спектрі (white full spectrum) культура демонструвала збалансовану морфологію, але без виражених акцентів на окремих пігментних структурах. Вплив фотоперіоду проявлявся переважно через зміни рухливості та рівня пігментації. При режимі 12L:12D (12 год світла, 12 год темряви) клітини демонстрували рівномірну пігментацію та стабільний ріст. Подовження світлової фази до 16L:8D посилювало пігментацію та збільшувало щільність суспензії. Безперервне освітлення 24L:0D призводило до появи ознак світлового стресу: окремі клітини втрачали рухливість, у хлоропластах спостерігалися локальні ділянки депігментації.

3.4.2. Вплив спектрального складу світла на ріст культури *Tetraselmis* sp. Отримані дані показали, що за рівної інтенсивності освітлення різні спектральні діапазони по-різному впливають на ріст *Tetraselmis* sp. (рис. 3.7).

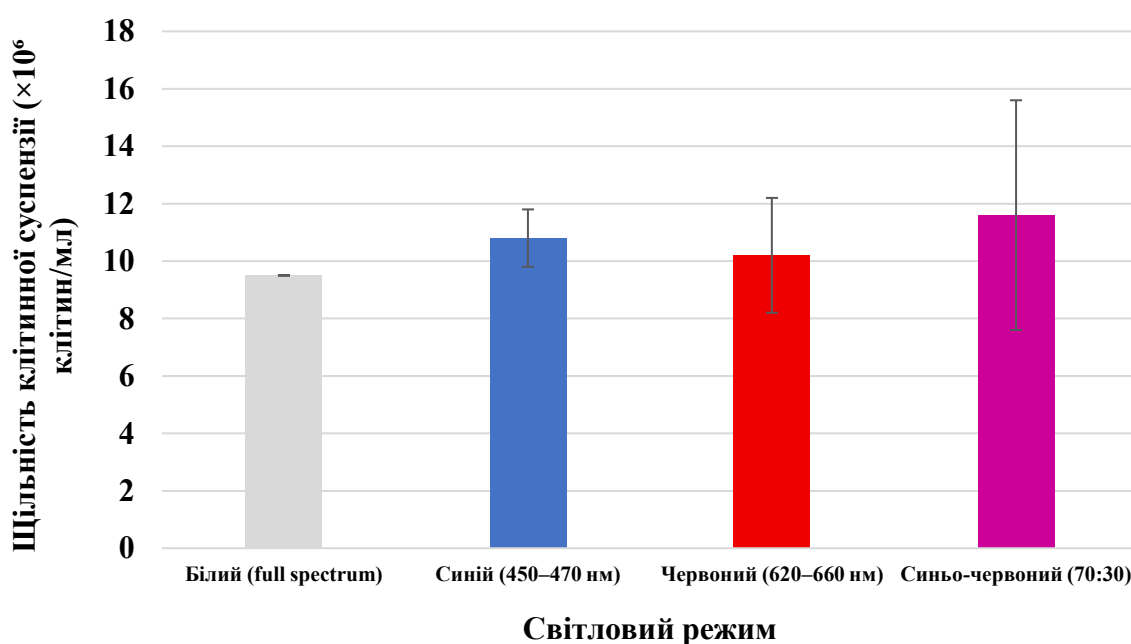


Рис. 3.7 Вплив спектрального складу світла на щільність клітинної суспензії *Tetraselmis* sp. за сталої інтенсивності освітлення ($150 \text{ мкмоль фотонів м}^{-2} \text{ с}^{-1}$). По осі абсцис наведено режими освітлення (білий, синій 450–470 нм, червоний 620–660 нм, комбінований — 70% синє світло : 30% червоне світло), по осі ординат — середню щільність клітинної суспензії ($\times 10^6$ клітин/мл). Дані представлені як Mean $\pm$ SD.

Найвищі показники щільності клітинної суспензії та OD₆₈₀ спостерігалися у варіанті комбінованого синьо-червоного освітлення (70% синє світло : 30% червоне світло), де культура демонструвала інтенсивне зелене забарвлення та максимальні темпи фотосинтезу. Значення достовірно перевищували показники всіх інших варіантів освітлення ($p < 0,05$), що узгоджується з відомими закономірностями поглинання світла Chl *a* та *b*, які найбільш активно засвоюють фотони у синьому та червоному діапазонах.

Синє світло (450–470 нм) забезпечувало високу пігментацію та стабільний ріст культури, однак кінцеві значення біомаси були статистично нижчими за комбінований варіант ($p < 0,05$). Це може свідчити про ефективну роботу фотосистем, але обмежений баланс між фотохімічною активністю та метаболічними витратами. Червоний спектр (620–660 нм) підтримував достатню фотосинтетичну активність, але ріст культури був помірним; відмінності між червоним та білим світлом були незначними ($p > 0,05$), проте обидва варіанти демонстрували значно нижчі значення порівняно з комбінованим режимом ($p < 0,05$). Найнижчі показники спостерігалися при освітленні повним спектром. Це може бути пов'язано з широким, але менш селективним характером поглинання світла, що не забезпечує оптимального співвідношення фотонів для максимальної ефективності фотосинтетичного апарату.

3.4.3. Вплив тривалості фотоперіоду на біомасоутворення *Tetraselmis* sp. Тривалість світлової та темної фаз виявилася важливим фактором, що визначає баланс між фотосинтетичною активністю та метаболічним відновленням клітин у темряві. За фотоперіоду 12L:12D культура *Tetraselmis* sp. демонструвала стабільний, хоча й помірний ріст. Щільність клітинної суспензії залишалася рівномірною, а значення OD₆₈₀ відповідали середнім характеристикам культури в умовах достатнього, але не надмірного освітлення.

Подовження світлової фази до 16L:8D призводило до істотного підвищення біомасоутворення. Саме у цьому режимі було зафіксовано максимальні значення щільності клітинної суспензії та OD₆₈₀, причому

відмінності були статистично значущими порівняно з режимом 12L:12D ($p < 0,05$). Темнова фаза тривалістю 8 годин виявилася достатньою для відновлення клітинного апарату після активного фотоперіоду, що дозволяло уникати розвитку світлового стресу та сприяло підтриманню інтенсивного фотосинтетичного метаболізму.

Безперервне освітлення 24L:0D, навпаки, спричиняло зниження темпів росту та появу характерних ознак світлового стресу. Значення біомасоутворення були достовірно нижчими, ніж у режимі 16L:8D ($p < 0,05$), що свідчить про недостатність відновлювальних процесів за умов відсутності темної фази. У таких умовах клітини частіше демонстрували нерівномірну пігментацію, знижену рухливість та окремі морфологічні відхилення, що свідчить про недостатність відновлювальних процесів та високе навантаження на фотосистеми за відсутності темної фази (рис. 3.8).

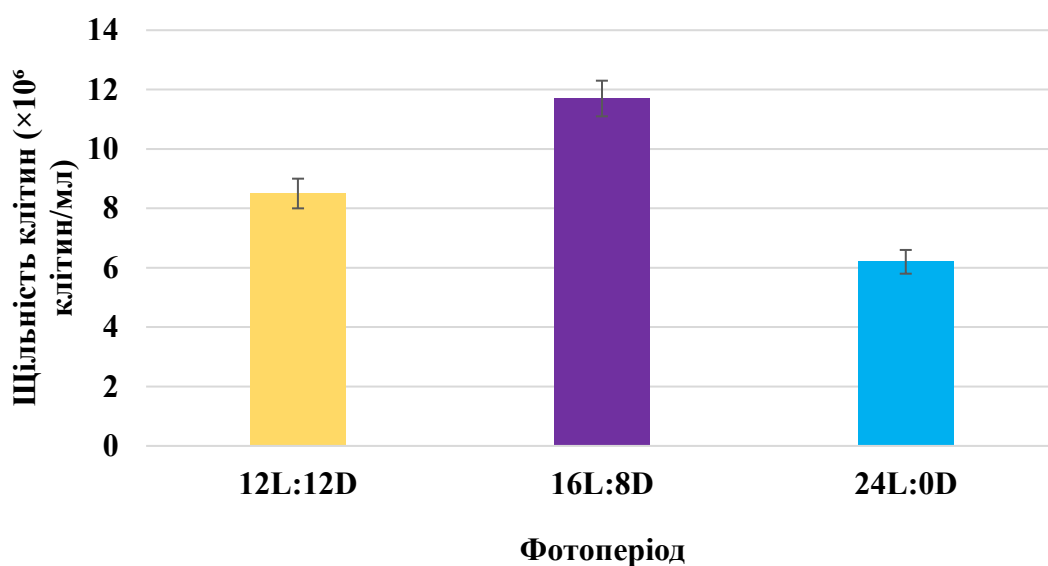


Рис. 3.8 Вплив тривалості фотоперіоду на біомасоутворення *Tetraselmis* sp. По осі абсцис наведено режими фотоперіоду (12L:12D, 16L:8D, 24L:0D), по осі ординат — середня щільність клітинної суспензії ($\times 10^6$ клітин/мл). Дані представлені як Mean $\pm$ SD.

Отримані результати свідчать, що культура *Tetraselmis* sp. найефективніше росте за поєднання таких світлових параметрів: комбінованого синьо-червоного

освітлення (70% синє світло : 30% червоне світло), сталої інтенсивності 150 мкмоль фотонів $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$ та фотоперіоду 16L:8D. Саме такі умови забезпечують оптимальний баланс між поглинанням світла пігментами, високою фотосинтетичною активністю та можливістю клітинного апарату проходити повноцінне відновлення в темну фазу. У результаті це сприяє максимальному накопиченню біомаси та стабільному фізіологічному стану культури.

3.5. Оцінка показників росту та якості біомаси *Tetraselmis* sp.

Після встановлення оптимальних умов культивування — середовище Walne у концентрації 2×, температура 25 °C, pH 8,0, солоність 30–35 PSU, аерація із подачею 1 % CO_2 та фотоперіод 16L:8D — було проведено оцінку продуктивності культури та біохімічних характеристик біомаси. Аналіз включав визначення сухої маси, беззольної сухої маси, питомої швидкості росту, вмісту Chl *a* і *b*, загального білка та ліпідів. Усі параметри розраховували відповідно до методик, наведених у розділі 2 «Матеріали і методи».

3.5.1. Суха маса (DW) та беззольна суха маса (AFDW). Показники DW відображають загальну продуктивність культури, тоді як AFDW дозволяє оцінити органічну фракцію, яка визначає біотехнологічну цінність отриманої біомаси. За результатами вимірювань, суха маса становила $0,84 \pm 0,05$ г/л, тоді як AFDW дорівнювала $0,71 \pm 0,04$ г/л. Мінеральна (зольна) частка складала 15,5% від DW. Висока частка органічної фракції підтверджує активний метаболізм культури *Tetraselmis* sp. та відповідає типовим значенням для зелених мікроводоростей у фазі інтенсивного росту.

3.5.2. Питома швидкість росту (μ). Питома швидкість росту була розрахована за стандартною експоненційною моделлю на основі зміни чисельності клітин між другою та шостою добою культивування. Початкова кількість становила $3,1 \times 10^6$ клітин/мл, кінцева — $11,8 \times 10^6$ клітин/мл. Обчислене значення μ дорівнювало $0,32 \pm 0,02$ доб⁻¹. Така швидкість росту

характерна для мезофільних зелених мікроводоростей у оптимальних фізико-хімічних умовах і підтверджує ефективність підібраного режиму культивування.

3.5.3. Вміст хлорофілів *a* (Chl *a*) і *b* (Chl *b*). Вміст фотосинтетичних пігментів у біомасі *Tetraselmis* sp. визначали спектрофотометричним методом за Lichtenthaler та Buschmann. За результатами аналізу, вміст Chl *a* становив $0,92 \pm 0,05$ мг/г вологій біомаси, тоді як вміст Chl *b* дорівнював $0,38 \pm 0,03$ мг/г. Сумарний вміст хлорофілів складав $1,30 \pm 0,06$ мг/г. Співвідношення Chl *a* до Chl *b* перебувало в межах, характерних для зелених мікроводоростей, і свідчило про сформований та функціонально активний фотосинтетичний апарат. Отримані значення вказують на високий рівень пігментації клітин *Tetraselmis* sp. за оптимальних умов освітлення та підтверджують інтенсивне функціонування фотосинтетичних систем у період максимального росту культури.

3.5.4. Вміст білків у біомасі. Вміст загального білка у біомасі *Tetraselmis* sp. визначали за методикою лужної екстракції з подальшим спектрофотометричним аналізом за модифікованим методом Лоурі при 750 нм. За результатами аналізу, вміст білка у біомасі *Tetraselmis* sp. становив $22,8 \pm 1,2$ % від сухої маси. Отримане значення узгоджується з літературними даними для зелених мікроводоростей у фазі активного росту та відображає високий рівень синтетичної активності клітин у оптимальних умовах культивування. Порівняно високий білковий профіль свідчить про наявність інтенсивно функціонуючих біосинтетичних шляхів, що робить біомасу *Tetraselmis* sp. перспективною для використання у кормах для аквакультури, збагаченні харчових добавок, а також у біотехнологічних процесах, де необхідна високопродуктивна білкова сировина.

3.5.5. Вміст ліпідів у біомасі. Вміст ліпідів у біомасі *Tetraselmis* sp. визначали за модифікованим методом Фолча. За отриманими даними, ліпідна фракція становила $15,8 \pm 0,7\%$ від сухої маси, що відповідає типовим значенням для активно культивованих зелених мікроводоростей і підтверджує збалансованість умов росту, за яких культура не переходила у стресовий режим ліпідної акумуляції.

Таким чином, комплексна оцінка ростових та біохімічних характеристик *Tetraselmis* sp. засвідчує, що за встановлених оптимальних умов культивування — середовище Walne у концентрації 2×, температура 25 °C, pH 8,0, солоність 30–35 PSU, інтенсивна аерація з додаванням 1% CO₂ та фотоперіод 16L:8D — культура демонструє високу продуктивність і стабільні показники якості біомаси. За цих параметрів формувалася суха маса на рівні $0,84 \pm 0,05$ г/л, з яких органічна фракція становила $0,71 \pm 0,04$ г/л, а питома швидкість росту досягала $0,32 \pm 0,02$ доб⁻¹. Показники пігментації (Chl *a* — $0,92 \pm 0,05$ мг/г, Chl *b* — $0,38 \pm 0,03$ мг/г, Chl_{заг} — $1,30 \pm 0,06$ мг/г), підтверджують оптимальний стан фотосинтетичного апарату та ефективність світлового режиму. Біохімічний склад біомаси, зокрема вміст білків $22,8 \pm 1,2$ % від сухої маси та ліпідів $15,8 \pm 0,7$ % від сухої маси, свідчить про високу харчову та технологічну цінність культури та її перспективність для подальшого біотехнологічного використання.

ВИСНОВКИ

У кваліфікаційній роботі здійснено комплексне дослідження впливу ключових фізико-хімічних факторів на ріст і біохімічні характеристики *Tetraselmis* sp. в умовах лабораторного культивування. Аналіз літературних джерел засвідчив, що, попри високий біотехнологічний потенціал представників роду *Tetraselmis*, недостатньо вивченими залишаються оптимальні умови культивування та взаємодія абіотичних чинників, що визначило актуальність проведеного дослідження та необхідність експериментальної оптимізації параметрів середовища.

1. У ході огляду сучасних даних узагальнено біологічні особливості *Tetraselmis* та їхнє значення як перспективних продуцентів біомаси; визначено фактори, що найбільше впливають на ріст і метаболізм культури. Це дало наукове підґрунтя для формування експериментального дизайну дослідження.

2. Дослідження впливу мінерального складу поживних середовищ показало переваги середовища Walne у концентрації 2×, яке забезпечувало найвищі темпи росту, стабільну морфологію клітин та формування біомаси із насиченими пігментними характеристиками та підвищеною часткою органічної речовини.

3. Встановлено, що оптимальною температурою культивування є 25 °C, за якої досягнуто максимальну питому швидкість росту ($\mu = 0,32 \pm 0,02 \text{ доб}^{-1}$), найвищі значення сухої маси та відсутність ознак температурного стресу. Відхилення від цього значення спричинювали погіршення пігментації, сповільнення росту та морфологічні зміни.

4. Оптимальним кислотно-лужним режимом визначено pH 8,0, який забезпечував стабільний приріст біомаси, високий рівень фотосинтетичної активності та збереження пігментного профілю. Крім того, показано, що солоність 30–35 PSU у поєднанні з аерацією та подачею 1 % CO₂ є найбільш сприятливою для біомасоутворення. За цих умов культура формувала $0,84 \pm 0,05$ г/л сухої речовини, з яких $0,71 \pm 0,04$ г/л припадало на органічну фракцію, що

свідчить про ефективне засвоєння неорганічного вуглецю та адаптованість до морських умов.

5. Найефективнішими світловими режимами виявилися фотоперіод 16L:8D та комбіноване LED-освітлення з домінуванням білого та синього спектра при інтенсивності $150 \text{ мкмоль фотонів м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. За цих режимів показники пігментації (Chl *a* — $0,92 \pm 0,05 \text{ мг/г}$; Chl *b* — $0,38 \pm 0,03 \text{ мг/г}$; Chl_{заг} — $1,30 \pm 0,06 \text{ мг/г}$) свідчили про оптимальний стан фотосинтетичного апарату та ефективність фотосинтетичних процесів.

6. Біохімічний склад біомаси, зокрема вміст білків $22,8 \pm 1,2 \%$ та ліпідів $15,8 \pm 0,7 \%$ від сухої речовини, підтверджує високу харчову, кормову та технологічну цінність *Tetraselmis* sp. і підкреслює її перспективність для біотехнологічного застосування.

7. На основі інтеграції отриманих результатів сформовано науково обґрунтовані практичні рекомендації щодо оптимальних умов культивування *Tetraselmis* sp. у лабораторних біотехнологічних системах. Вони можуть бути використані в аквакультурі, у виробництві біопродуктів на основі мікроводоростей, а також для отримання біомаси з кормовою та нутрицевтичною цінністю.

Узагальнюючи результати, у роботі розв'язано наукову проблему визначення оптимальних фізико-хімічних параметрів культивування *Tetraselmis* sp. та показано їх критичну роль у формуванні високопродуктивної та якісної біомаси. Отримані дані мають важливе теоретичне та практичне значення для розвитку біотехнології мікроводоростей, удосконалення лабораторних протоколів та подальшого впровадження у навчальних і виробничих системах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Aljabri H., Cherif M., Siddiqui S., Bounnit T., Saadaoui I. Evidence of the drying technique's impact on the biomass quality of *Tetraselmis subcordiformis* (Chlorophyceae). *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 2023. Vol. 16. doi:10.1186/s13068-023-02335-x.
2. Andreotti V., Solimeno A., Rossi S., Ficara E., Marazzi F., Mezzanotte V., García J. Bioremediation of aquaculture wastewater with the microalgae *Tetraselmis suecica*: Semi-continuous experiments, simulation and photo-respirometric tests. *Science of the Total Environment*. 2020. Vol. 738. 139859. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139859.
3. Asghari T., Ahmadifard N., Nikoo M. Effect of phytohormone kinetin on cell density, photosynthetic pigments, antioxidant enzymes, and fatty acid composition of the microalgae *Tetraselmis suecica*. *Aquaculture Research*. 2023. Article ID 5967771. doi:10.1155/2023/5967771.
4. Bezerra M., Santelli R., Oliveira E., Villar L., Escalera L. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 2008. Vol. 76, N5. P. 965–977. doi:10.1016/j.talanta.2008.05.019.
5. Coelho A., Barros M., Bezerra J., Silva J., Moreira R., Farias W. Growth of the microalgae *Tetraselmis tetrathele* and nitrate depletion in culture medium Guillard f/2 and Conway. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 2013. Vol. 35. P. 163–168. doi:10.4025/actascibiols.v35i2.13971.
6. Conde T. A. et al. Cross-stress lipid response of *Tetraselmis striata* CTP4 to temperature and salinity variation. *Algal Research*. 2023. Article 103218. doi:10.1016/j.algal.2023.103218.
7. Conlon T. J., Parkes R., Fierli D., Touzet N. Comparative pigment and fatty acid profiling of marine species within the chlorophyte genus *Tetraselmis*. *Food Bioscience*. 2024. Vol. 58. 103660. doi:10.1016/j.fbio.2024.103660.

8. Conlon T., Touzet N. Bioactive metabolites and extracellular vesicles from the marine chlorophyte genus *Tetraselmis*: Review. *Biotechnology Advances*. 2025. Vol. 83. 108662. doi:10.1016/j.biotechadv.2025.108662.
9. Cordier C., Guyomard K., Stavrakakis C., Sauvade P., Coelho F., Moulin P. Culture of microalgae with ultrafiltered seawater: A feasibility study. *SciMedicine Journal*. 2020. doi:10.28991/scimedj-2020-0202-2.
10. Coulombier N., Blanchier P., Déan L., Barthelemy V., Lebouvier N., Jauffrais T. The effects of CO₂-induced acidification on *Tetraselmis* biomass production, photophysiology and antioxidant activity: A comparison using batch and continuous culture. *Journal of Biotechnology*. 2021. doi:10.1016/j.jbiotec.2020.10.005.
11. Dammak M., Hadrich B., Barkallah M., Hentati F., Hlima H., Pichon C., Denis M., Fendri I., Michaud P., Abdelkafi S. Modelling *Tetraselmis* sp. growth-kinetics and optimizing bioactive-compound production through environmental conditions. *Bioresource Technology*. 2018. Vol. 249. P. 510–518. doi:10.1016/j.biortech.2017.10.028.
12. Dammak M., Hadrich B., Miladi R., Barkallah M., Hentati F., Hachicha R., Laroche C., Michaud P., Fendri I., Abdelkafi S. Effects of nutritional conditions on growth and biochemical composition of *Tetraselmis* sp. *Lipids in Health and Disease*. 2017. Vol. 16. doi:10.1186/s12944-016-0378-1.
13. Dritsas P., Asimakis E., Lianou A., Efstratiou M. A., Tsiamis G., Aggelis G. Microalgae from the Ionian Sea (Greece): Isolation, molecular identification and biochemical features of biotechnological interest. *Algal Research*. 2023. Article 103210. doi:10.1016/j.algal.2023.103210.
14. El-Sheekh M., Gheda S., Khairy H., El-Shenody R. Optimization of medium components using Plackett–Burman design for high production of protein, carbohydrates and lipids in the microalga *Tetraselmis chuii*. *Egyptian Journal of Experimental Biology*. 2015. Vol. 11. P. 77–88.
15. Fakhri M., Amrulloh A., Yuniarti A., Supriatin F., Arifin N. Effect of different sodium nitrate concentrations on the growth, biomass, and biochemical

composition of *Tetraselmis chuii*. *Journal of Aquaculture and Fish Health*. 2025. Vol. 14, N1. doi:10.20473/jafh.v14i1.64564.

16. Farahin A., Natrah I., Nagao N., Katayama T., Imaizumi Y., Mamat N., Yusoff F., Shariff M. High intensity of light: A potential stimulus for maximizing biomass by inducing photosynthetic activity in marine microalga *Tetraselmis tetraele*. *Algal Research*. 2021. Article 102523. doi:10.1016/j.algal.2021.102523.

17. Fon-Sing S., Borowitzka M. A. Isolation and screening of euryhaline *Tetraselmis* spp. suitable for large-scale outdoor culture in hypersaline media for biofuels. *Journal of Applied Phycology*. 2016. Vol. 28. P. 1–14. doi:10.1007/s10811-015-0560-2.

18. González M. A., Aguayo P., Inostroza I., Castro P. A., Fuentes G., Gómez P. I. Ultrastructural and molecular characterization of *Tetraselmis* strains (*Chlorodendrophyceae*, *Chlorophyta*) isolated from Chile. *Gayana Botanica*. 2015. Vol. 72, N1. P. 47–57. doi:10.4067/S0717-66432015000100007.

19. Gregor M., Grznár P., Mozol Š., Mozolová L. Plackett–Burman design. *Acta Simulatio*. 2024. Vol. 10, N1. doi:10.22306/asim.v10i1.104.

20. Grubišić M., Šantek B., Zorić Z., Čošić Z., Vrana I., Gašparović B., Čož-Rakovac R., Šantek M. Bioprospecting of microalgae isolated from the Adriatic Sea: Characterization of biomass, pigment, lipid and fatty acid composition, and antioxidant and antimicrobial activity. *Molecules*. 2022. Vol. 27. doi:10.3390/molecules27041248.

21. Gündoğdu T., Deniz I., Çalışkan G., Şahin E., Azbar N. Experimental design methods for bioengineering applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2014. Vol. 36. P. 368–388. doi:10.3109/07388551.2014.973014.

22. Hanrahan G., Lu K. Application of factorial and response surface methodology in modern experimental design and optimization. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2007. Vol. 36. P. 141–151. doi:10.1080/10408340600969478.

23. Haris N., Manan H., Jusoh M., Khatoon H., Katayama T., Kasan N. Effect of different salinity on the growth performance and proximate composition of isolated indigenous microalgae species. *Aquaculture Reports*. 2022. Article 100925. doi:10.1016/j.aqrep.2021.100925.

24. Hotos G. The effect of various salinities and light intensities on the growth performance of five locally isolated microalgae [*Amphidinium carterae*, *Nephroselmis* sp., *Tetraselmis* sp. (var. red pappas), *Asteromonas gracilis* and *Dunaliella* sp.] in laboratory batch cultures. *Journal of Marine Science and Engineering*. 2021. doi:10.20944/preprints202111.0141.v1.
25. Hosseini H., Saadaoui I., Cherif M., Siddiqui S., Sayadi S. Exploring the dynamics of algae-associated microbiome during the scale up process of *Tetraselmis* sp. microalgae: A metagenomics approach. *Bioresource Technology*. 2024. Article 129991. doi:10.1016/j.biortech.2023.129991.
26. Huang J., Zhang G., Zheng L., Lin Z., Wu Q., Pan Y. Plackett–Burman design and response surface optimization of conditions for culturing *Saccharomyces cerevisiae* in *Agaricus bisporus* industrial wastewater. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*. 2019. Vol. 18, N1. P. 65–74. doi:10.17306/j.afs.0620.
27. Huerlimann R., De Nys R., Heimann K. Growth, lipid content, productivity, and fatty acid composition of tropical microalgae for scale-up production. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010. Vol. 107. doi:10.1002/bit.22809.
28. Hyung J.-H., Kim E.-J., Moon S.-J., Kang N. S., Park J. Y. *Tetraselmis jejuensis* sp. nov. (Chlorodendrophyceae), a euryhaline microalga found in supralittoral tide pools at Jeju Island, Korea. *Plants*. 2021. Vol. 10, N7. 1289. doi:10.3390/plants10071289.
29. Islam Z., Hasan J., Rahman T., Rahman S. Marine microalgae of Bangladesh: Nutritional profile and application. In: *Science, Technology and Development in Asia*. 2024. P. 1–21. doi:10.9734/bpi/stda/v1/2687.
30. Khatoon H. et al. Growth, proximate composition and pigment production of *Tetraselmis chuii* cultured with aquaculture wastewater. *Journal of Ocean University of China*. 2018. Vol. 17, N3. P. 641–646. doi:10.1007/s11802-018-3428-7.
31. Khan A., Ullah S., Ali R., Rehman M., Moshawih S., Goh K., Ming L., Gew L. Machine learning optimization of environmental factors influencing biomass and nutritional composition in local algal species. *Royal Society Open Science*. 2025. Vol. 12. doi:10.1098/rsos.241336.

32. Kim G., Mujtaba G., Lee K. Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis* sp. for lipid production. *Algae*. 2016. Vol. 31. P. 257–266. doi:10.4490/algae.2016.31.8.18.
33. Kim H., Park W., Lee B., Seon G., Suh W., Moon M., Chang Y. Optimization of heterotrophic cultivation of *Chlorella* sp. HS2 using screening, statistical assessment, and validation. *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9. doi:10.1038/s41598-019-55854-9.
34. Lananan F., Jusoh A., Ali N., Lam S., Endut A. Effect of Conway medium and f/2 medium on the growth of six genera of South China Sea marine microalgae. *Bioresource Technology*. 2013. Vol. 141. P. 75–82. doi:10.1016/j.biortech.2013.03.006.
35. Lee M., Lu W., Lu M., Chang F. A hybrid of response surface methodology and artificial neural network in optimization of culture conditions of mycelia growth of *Antrodia cinnamomea*. *Biomass and Bioenergy*. 2022. doi:10.1016/j.biombioe.2022.106349.
36. Lee W., Ryu Y., Choi W., Kim T., Park A., Lee Y., Jeong Y., Lee C., Kang D. Year-round cultivation of *Tetraselmis* sp. for essential lipid production in a semi-open raceway system. *Marine Drugs*. 2021. Vol. 19. doi:10.3390/md19060314.
37. Lee W., Ryu Y., Kim T., Park A., Lee Y., Sunwoo I., Koh E., Oh C., Choi W., Kang D. Enhanced photosynthetic pigment production using a scaled-up continuously circulated bioreactor. *Marine Drugs*. 2023. Vol. 21, N11. 576. doi:10.3390/md21110576.
38. Lourenço S., Marquez U., Mancini-Filho J., Barbarino E., Aida E. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. *Aquaculture*. 1997. Vol. 148. P. 153–168. doi:10.1016/S0044-8486(96)01416-0.
39. Maltsev Y., Kulikovskiy M., Maltseva S. Nitrogen and phosphorus stress as a tool to induce lipid production in microalgae. *Microbial Cell Factories*. 2023. Vol. 22. doi:10.1186/s12934-023-02244-6.

40. Markou G., Wang L., Ye J., Unc A. Using agro-industrial wastes for the cultivation of microalgae and duckweeds: Contamination risks and biomass safety concerns. *Biotechnology Advances*. 2018. Vol. 36. P. 1238–1254. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.04.003.
41. Mata T. M., Camerón H., Avalos V., Riquelme C. Identification and characterization of a novel microalgal strain from the Antofagasta coast *Tetraselmis marina* AC16-MESO (Chlorophyta) for biotechnological applications. *Plants*. 2023. Vol. 12, N19. 3372. doi:10.3390/plants12193372.
42. Mehariya S., Annamalai S., Taher M., Quadir M., Khan S., Rahmanpoor A., Kashem A., Faisal M., Sayadi S., Hawari A., Al-Jabri H., Das P. A comprehensive review on versatile microalga *Tetraselmis*: Potential applications in wastewater remediation and bulk chemical production. *Journal of Environmental Management*. 2024. Vol. 365. 121520. doi:10.1016/j.jenvman.2024.121520.
43. Meseck S., Alix J., Wikfors G. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga *Tetraselmis chui* (PLY429). *Aquaculture*. 2005. Vol. 246. P. 393–404. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.02.034.
44. Michael A., Yussuf Y. S. Isolation, culture trials, and biochemical composition of microalga *Tetraselmis* from coastal waters of Tanzania. *Western Indian Ocean Journal of Marine Science*. 2024. Vol. 23, N1. P. 81–90. doi:10.4314/wiojms.v23i1.8.
45. Montes-González O., González-Silvera A., Valenzuela-Espinoza E., Santamaría-del-Ángel E., López-Calderón J. Effect of light intensity and nutrient concentration on growth and pigments of the green microalga *Tetraselmis suecica*. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 2021. Vol. 49, N3. P. 431–441. doi:10.3856/vol49-issue3-fulltext-2632.
46. Montoya L. M. M., Pérez A. A. A., Calderón N. D. G., Garcés L. A. Analysis of cell growth, photosynthetic behavior and fatty acid profile in *Tetraselmis subcordiformis* under different lighting scenarios. *Journal of Applied Phycology*. 2024. Vol. 36. P. 1679–1695. doi:10.1007/s10811-024-03208-y.

47. Moreno-Paz S., Schmitz J., Suárez-Diez M. In silico analysis of design of experiment methods for metabolic pathway optimization. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2024. Vol. 23. P. 1959–1967. doi:10.1016/j.csbj.2024.04.062.
48. Nisar K., Abdullah R., Kaleem A., Iqtedar M., Saleem F., Iftikhar T., Aslam F. Application of Plackett–Burman and Box–Behnken design for the optimization of α -glucosidase production by thermophilic *Thermomyces dupontii*. *Revista de Chimie*. 2020. Vol. 9. P. 32–38. doi:10.37358/rc.20.9.8314.
49. Ntzouvaras A. et al. New records of *Tetraselmis* sp. strains with biotechnological potential isolated from Greek coastal lagoons. *Water*. 2023. Vol. 15, N9. 1698. doi:10.3390/w15091698.
50. Park H. et al. Improvement of biomass and fatty acid productivity in ocean cultivation of *Tetraselmis* sp. using hypersaline medium. *Journal of Applied Phycology*. 2018. Vol. 30, N5. P. 2725–2735. doi:10.1007/s10811-018-1388-3.
51. Patrino V., Daskalaki A., Kampantais D., Kanakis D., Economou C., Bokas D., Kotzamanis Y., Aggelis G., Vayenas D., Tekerlekopoulou A. Optimization of cultivation conditions for *Tetraselmis striata* and biomass quality evaluation for fish feed production. *Water*. 2022. Vol. 14, N19. 3162. doi:10.3390/w14193162.
52. Patrino V., Patsialou S., Daskalaki A., Economou C., Aggelis G., Vayenas D., Tekerlekopoulou A. Laboratory- and pilot-scale cultivation of *Tetraselmis striata* to produce valuable metabolic compounds. *Life*. 2023. Vol. 13, N2. 480. doi:10.3390/life13020480.
53. Pereira H., Paramo J., Silva J., Marques A., Barros A., Mauricio D., Santos T., Schulze P., Barros R., Gouveia L., Barreira L., Varela J. Scale-up and large-scale production of *Tetraselmis* sp. CTP4 (Chlorophyta) for CO₂ mitigation: From an agar plate to 100-m³ industrial photobioreactors. *Scientific Reports*. 2018. Vol. 8. 5112. doi:10.1038/s41598-018-23340-3.
54. Pereira H., Silva J., Santos T., Gangadhar K., Raposo A., Nunes C., Coimbra M., Gouveia L., Barreira L., Varela J. Nutritional potential and toxicological evaluation of *Tetraselmis* sp. CTP4 microalgal biomass produced in industrial

photobioreactors. *Molecules*. 2019. Vol. 24, N17. 3192. doi:10.3390/molecules24173192.

55. Pleissner D., Lindner A., Ambati R. Techniques to control microbial contaminants in nonsterile microalgae cultivation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2020. Vol. 192. P. 1376–1385. doi:10.1007/s12010-020-03414-7.

56. Pugkaew W., Meetam M., Yokthongwattana K., Leeratsuwan N., Pokethitiyook P. Effects of salinity changes on growth, photosynthetic activity, biochemical composition, and lipid productivity of marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Journal of Applied Phycology*. 2019. Vol. 31. P. 969–979. doi:10.1007/s10811-018-1619-7.

57. Rajput K., Jassim A., Mohammed A., Al-Tawaha A., Karnwal A., Malik T. Statistical optimization of culture conditions for enhanced biomass yield of *Lactobacillus acidophilus* CM1 using Plackett–Burman and response surface methodology. *International Journal of Food Science*. 2025. Article 5576637. doi:10.1155/ijfo/5576637.

58. Rukminasari N., Omar S., Lukman M. Effects of increasing temperature and nitrate concentration on cell abundance, growth rate, biomass and free fatty acid of *Tetraselmis* sp. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2019. Vol. 370. 012059. doi:10.1088/1755-1315/370/1/012059.

59. Saadaoui I. et al. Unveiling *Tetraselmis subcordiformis* lipidome dynamics during large-scale cultivation in open raceway pond. *Journal of Applied Phycology*. 2024. Vol. 36. P. 1125–1134. doi:10.1007/s10811-023-03166-x.

60. Sas A., Turki A., Affan A., Al-Taisan W., Das S., Su S., Cob Z. The influence of temperature and nutrient concentrations on growth rate, biomass, chlorophyll-a, and biochemical compositions of *Tetraselmis suecica* (Chlorophyta). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2021. Vol. 880. 012014. doi:10.1088/1755-1315/880/1/012014.

61. Schmid B., Navalho S., Schulze P., Van De Walle S., Van Royen G., Schöler L., Maia I., Bastos C., Baune M., Januschewski E., Coelho A., Pereira H., Varela J., Navalho J., Rodrigues A. Drying microalgae using an industrial solar dryer:

A biomass quality assessment. *Foods*. 2022. Vol. 11, N13. 1873. doi:10.3390/foods11131873.

62. Schöler L., Santos T., Pereira H., Duarte P., Gangadhar K., Florindo C., Schulze P., Barreira L., Varela J. Improved production of lutein and β -carotene by thermal and light intensity upshifts in the marine microalga *Tetraselmis* sp. CTP4. *Algal Research*. 2020. Vol. 45. 101732. doi:10.1016/j.algal.2019.101732.

63. Smith J. K. P., Hughes A. D., McEvoy L., Thornton B., Day J. G. The carbon partitioning of glucose and DIC in mixotrophic, heterotrophic and photoautotrophic cultures of *Tetraselmis suecica*. *Biotechnology Letters*. 2021. Vol. 43. P. 729–743. doi:10.1007/s10529-020-03073-y.

64. Syed M., Rafeie M., Vandamme D., Asadnia M., Henderson R., Taylor R., Warkiani M. Selective separation of microalgae cells using inertial microfluidics. *Bioresource Technology*. 2018. Vol. 252. P. 91–99. doi:10.1016/j.biortech.2017.12.065.

65. Trovão M., Pereira H., Silva J., Paramo J., Quelhas P., Santos T., Silva J., Machado A., Gouveia L., Barreira L., Varela J. Growth performance, biochemical composition and sedimentation velocity of *Tetraselmis* sp. CTP4 under different salinities using low-cost lab- and pilot-scale systems. *Heliyon*. 2019. Vol. 5. e01553. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01553.

66. Udayantha H., Kim S., Chen Y., Long J., Bathige S., Park K. Enhancing lipid accumulation in *Tetraselmis* sp.: Integrating nitrogen deprivation and glucose supplementation for biofuel production. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 2025. Vol. 18. 57. doi:10.1186/s13068-025-02654-1.

67. Vallejo C., Cárdenas A. Crecimiento de *Tetraselmis* sp. empleando fertilizante como medio de cultivo. *Revista Ion*. 2021. Vol. 34, N2. doi:10.18273/revion.v34n2-2021005.

68. Venckus P., Cicchi B., Zittelli G. C. Effects of medium salinity on growth and biochemical composition of the green microalga *Tetraselmis suecica*. *Journal of Applied Phycology*. 2021. Vol. 33. P. 3555–3563. doi:10.1007/s10811-021-02560-7.

69. Venkataraghavan R., Thiruchelvi R., Sharmila D. Statistical optimization of textile dye effluent adsorption by *Gracilaria edulis* using Plackett–Burman design and response surface methodology. *Heliyon*. 2020. Vol. 6. e05219. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05219.
70. Weil J., Trudel M., Tucker S., Brodeur R., Juanes F. Percent ash-free dry weight as a robust method to estimate energy density across taxa. *Ecology and Evolution*. 2019. Vol. 9. P. 13244–13254. doi:10.1002/ece3.5775.
71. Yaakob M., Mohamed R., Al-Gheethi A., Ravishankar G., Ambati R. Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: An overview. *Cells*. 2021. Vol. 10, N2. 393. doi:10.3390/cells10020393.