

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА
Навчально-науковий інститут біології, хімії та біоресурсів
Кафедра біохімії та біотехнології

**Застосування каротиногенних дріжджів *Rhodotorula minuta* як
кормового субстрату для *Daphnia magna***

Кваліфікаційна робота

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Виконала:
студентка 4 курсу, 407 групи
Гах Валерія Володимирівна
Керівник:
кандидат біологічних наук,
доцент **Худа Л.В.**

До захисту допущено
на засіданні кафедри
протокол № _____ від _____ 2024 р.
Зав. кафедрою _____ проф Копильчук Г. П.

Чернівці – 2024р.

Анотація

Ключові слова: каротиноїди; *Rhodotorula minuta*; кормовий субстрат; *Daphnia magna*; біоінкапсуляція.

Бакалаврська робота присвячена оцінці можливості застосування каротиногенних дріжджів *Rhodotorula minuta* як кормового субстрату для *Daphnia magna*. Показано, що застосування *Rhodotorula minuta* як кормового субстрату призводить до накопичення каротиноїдів в організмі *Daphnia magna*. Вміст загальних каротиноїдів дафній збільшується на 54% у порівнянні з контролем при насиченні родоторулами в кількості 0,06 г/л культурального середовища. Вміст загальних каротиноїдів *Daphnia magna* статистично не відрізняється при застосуванні *Rhodotorula minuta* в кількості 0,06 г/л та 0,25 г/л. Вживаність дафній при застосуванні *Rhodotorula minuta* залишається стабільно високою при всіх досліджуваних концентраціях родоторул. При вмісті каротиногенних дріжджів 0,06 г/л загальна вживаність дафній склала 92,6%, 0,25 г/л - 91,06%. Відмінності в динаміці кількості дафній протягом експерименту у порівнянні з контролем зареєстровані лише при застосуванні дріжджів в концентрації 0,25 г/л.

Abstract

Keywords: carotenoids; *Rhodotorula minuta*; fodder substrate; *Daphnia magna*; bioencapsulation.

The bachelor's thesis is devoted to the evaluation of the possibility of using the carotenogenic yeast *Rhodotorula minuta* as a feed substrate for *Daphnia magna*. It was shown that the use of *Rhodotorula minuta* as a feed substrate leads to the accumulation of carotenoids in the body of *Daphnia magna*. The content of total carotenoids in *Daphnia magna* increases by 54% compared to the control when saturated with *Rhodotorula* in the amount of 0.06 g/l of culture medium. The content of total carotenoids of *Daphnia magna* is not statistically different when *Rhodotorula minuta* is applied in the amount of 0.06 g/l and 0.25 g/l. The survival rate of daphnia when using *Rhodotorula minuta* remains consistently high at all studied concentrations of *rhodotorula*. At the content of carotenogenic yeast of 0.06 g/l, the total survival rate of daphnia was 92.6%, 0.25 g/l - 91.06%. Differences in the dynamics of the number of daphnia during the experiment compared to the control were recorded only when using yeast at a concentration of 0.25 g/l.

Кваліфікаційна робота містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів наукових досліджень інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

_____ В.В. Гах

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1 Характеристика живих кормів, які використовуються в аквакультурі.....	7
1.2 Використання каротинсинтезуючих дріжджів роду <i>Rhodotorula</i>	10
1.3 <i>Daphnia magna</i> – як живий корм.....	16
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	22
2.1. Матеріали дослідження.....	22
2.2. Культивування каротинсинтезуючих дріжджів.....	22
2.3. Метод підрахунку мікроорганізмів в камерах Горяєва.....	23
2.4. Визначення вмісту загальних каротиноїдів <i>Daphnia magna</i>	24
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	26
3.1. Вміст загальних каротиноїдів <i>Daphnia magna</i> за умов застосування <i>Rhodotorula minuta</i>	26
3.2. Оцінка виживаності <i>Daphnia magna</i> за умов застосування <i>Rhodotorula minuta</i> як кормового субстрату	28
3.3. Динаміка кількості особин <i>Daphnia magna</i> впродовж насичення каротиновмісними дріжджами	29
ВИСНОВКИ.....	33
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	34
ДОДАТОК А.....	39

Вступ

У прісноводній аквакультури як живий корм для риб найчастіше використовують представників ряду гіллястовусих ракоподібних *Cladocera*, зокрема дафній, особливо *Daphnia magna*, які вирізняються високою плодючістю, швидким ростом і витривалістю до несприятливих умов середовища. [10].

Дафнії багаті мікро- та макронутрієнтами, легко засвоюються і сприяють хорошому росту та розвитку риб, особливо на початкових етапах їхнього розвитку. В цілому, дафнії є відмінними представниками живого корму для риб, забезпечуючи повний набір поживних речовин та стимулюючи природну поведінку під час годування. Однак, зоопланктон, який зазвичай використовується як живий корм в аквакультури, не здатний синтезувати каротиноїди. Для солоноводних представників (наприклад, артемії) специфіка живлення зумовлює істотне накопичення каротиноїдів в організмі. Натомість для прісноводного зоопланктону (дафній) характерний низький вміст цих есенціальних сполук. [1]. У цьому аспекті перспективним напрямком може бути використання каротиновмісних добавок або мікробної біомаси з підвищеним вмістом каротиноїдів. [14].

Каротиногенні дріжджі, які є природними джерелами каротиноїдів, можуть бути використані для виробництва кормів. Ці дріжджі синтезують пігменти під час свого росту та метаболізму, що робить їх ефективними для збагачення кормових організмів каротиноїдами.

Для вирощування лабораторних культур планктонних ракоподібних стандартно використовують дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* як кормовий субстрат. Для збагачення живих кормів каротиноїдами доцільно застосовувати дріжджі, здатні до каротиногенезу, зокрема дріжджі виду *Rhodotorula spp* [25].

Вирощування каротинсинтезуючих дріжджів може включати їх культивування на відповідному субстраті або поживному середовищі.

Дріжджі можуть бути вирощені до певної стадії розвитку, на якій вони накопичують достатню кількість каротиноїдів.

Використання каротинсинтезуючих дріжджів як джерела каротиноїдів може бути альтернативним методом їх накопичення для кормового зоопланктону. Це забезпечить отримання кормів організмів, насичених цінними есенціальними нутрієнтами, які є важливими на початкових етапах онтогенезу риб. Слід зауважити, що зоопланктон поряд з каротиноїдами з цими дріжджами отримує комплекс поживних речовин, що дає можливість розглядати родоторул як цінний кормовий субстрат для вирощування та насичення зоопланктону.

Попередніми роботами на кафедрі біохімії та біотехнології показана ефективність застосування *Rhodotorula glutinis* і *Rhodotorula rubra* в біоінкапсуляції каротиноїдів у *Simoccephalus vetulus* та *Moina macroscopa*

Метою роботи була оцінка можливості застосуванн дріжджів *Rhodotorula minuta* як кормового субстрату для *Daphnia magna* з метою насичення їх каротиноїдами.

Для досягненн мети були поставлені такі **завдання**:

- 1) Забезпечити інкапсуляцію *Rhodotorula minuta* в організм *Daphnia magna* шляхом їх використання як кормового субстрату;
- 2) Визначити вміст загальних каротиноїдів *Daphnia magna* за умов використання *Rhodotorula minuta* як кормового субстрату
- 3) Оцінити виживаність *Daphnia magna* за умов інкапсуляції каротигенними дріжджами.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика живих кормів, які використовуються в аквакультурі

Залежно від технології виробництва риби різних вікових груп, з урахуванням видових особливостей конкретних об'єктів культивування, використовують різноманітні корми.

Класифікація кормів у цьому плані ґрунтується на певній системі, за якою розрізняють існуючі корми, а також враховує можливі шляхи їх удосконалення та створення нових кормів для різноманітних видів риб, яких вирощують у штучних умовах. [10].

У аквакультурі, що є промисловим вирощуванням риби, моллюсків, ракоподібних та інших водних організмів, розроблено різноманітні типи кормів. Серед них можна виділити природні та живі корми.

Природні корми в аквакультурі включають у себе рослини та тварини, які знаходяться у воді. Це можуть бути водорості, креветки, моллюски та інші безхребетні, які є складовою частиною природного дієтичного раціону багатьох водних організмів.

Так, природні корми в аквакультурі включають різні групи гідробіонтів рослинного і тваринного походження. Ці організми служать їжею для відповідних видів риб і визначають приріст рибної продукції, тобто сприяють природній рибопродуктивності. Риби за характером живлення можуть бути фітофагами (харчуються рослинами), зоофагами (харчуються тваринами) або зоофітофагами (харчуються організмами, які походять із водоростей). Кожна з цих груп може поділятися на більш дрібні підгрупи в залежності від властивостей риб та їхнього середовища.

Безхребетні тварини, які перебувають у водоймах і пасивно рухаються, часто є джерелом високої харчової цінності для риб. Ці організми, які плавають за течією і не можуть активно протистояти їй, утворюють групу, відому як зоопланктон. Майже всі види риб споживають цей зоопланктон на

початкових етапах свого екзогенного живлення, незалежно від їхньої подальшої харчової спеціалізації. [10].

Природні корми у формі зоопланктону та зообентосу є важливим джерелом поживних речовин для риби у водоймах. Вони забезпечують рибу всіма необхідними складовими для здорового росту і розвитку, включаючи амінокислоти, мікроелементи, вітаміни та інші біологічно активні речовини. Ракоподібні, зокрема дафнії, є одними з найбільш повноцінних кормів для риби. Суха речовина прісноводного зоопланктону містить значну кількість білка (приблизно 50%), жирів (приблизно 10%) і золи (приблизно 20%). [16].

Представники ряду *Cladocera* займають одне з провідних місць у використанні як живого корму для риби. У практиці культивування часто застосовуються дафнії (особливо *Daphnia magna*) та моїни (*Moina macroscopa*, *M. rectirostris*). Ці види відзначаються високою плодючістю, швидким ростом і витривалістю до несприятливих умов середовища. [10].

Використання природних кормів може мати свої складнощі через їх обмежену доступність і сезонність. Крім того, існує ризик внесення шкідливих або хвороботворних організмів у аквакультурне середовище. Тому важливо ретельно контролювати походження природних кормів і застосовувати необхідні заходи безпеки для запобігання можливим негативним наслідкам.

Живі корми вважаються найповноціннішими для риби. Вони містять всі необхідні поживні речовини для риби і легко споживаються нею. На рибоводних заводах вирощують такі живі корми, як коловертки, ракоподібні (дафнії, моїни, артемії, гаммаруси та інші), олігохети, личинки комах (хірономіди та інші), інфузорії, нематоди. Кормові організми, що вирощуються, володіють високою харчовою цінністю, швидким дозріванням, інтенсивним ростом і високою плодючістю. [3].

Живий корм, що складається з різноманітних водних організмів (мікроорганізми, водорості та безхребетні тварини), можна легко отримувати в необхідній кількості та в потрібний термін. Живі корми вирощують як у

водоймах рибництва, так і у спеціальних культиваторах. Це краще за інші методи, оскільки менше забруднює воду, що є дуже важливим фактором при регулярному годуванні. [16].

У сфері аквакультури часто вирощують живі корми, щоб задовольнити потреби у харчуванні риб та інших водних організмів. Найпоширеніші серед них молюски, такі як артемія, дафнії, мідії та інші водні організми. Ці корми часто характеризуються високим вмістом білка, жирів, вітамінів та мінералів, що робить їх цінними для забезпечення росту та розвитку аквакультурних організмів.

Усі види риб, незалежно від їх належності до різних екологічних груп за характером живлення, на личинковій стадії розвитку з переходом до екзогенного харчування споживають дрібних зоопланктонних організмів. У личинок риб досить малий ротовий отвір, ще менший просвіт глотки, низька активність травних ферментів, а хеморецепторні особливості не дозволяють ефективно використовувати штучні корми. Завдяки наявності дрібних водних безхребетних, таких як бактерії, інфузорії, коловертки, з високим вмістом низькомолекулярних пептидів і вільних амінокислот, відбувається засвоєння цих організмів без значної обробки їх у травному тракті.

Велике значення живих кормів полягає не лише у їх повноті харчування, але й у активному впливі на ферментну систему личинок, що стимулює біохімічні процеси в організмі. Ці обставини призвели до впровадження у технологію годівлі риб специфічного напрямку – вирощування живих кормів, що дозволяє збагатити раціони харчування багатьох видів риб, які штучно вирощуються в умовах сучасних рибницьких ферм. При цьому живих кормів можна безпосередньо годувати риб, включати до складу штучних кормів або додавати у вигляді вологих гранул як складовий компонент харчування. [7].

1.2 Використання каротинсинтезуючих дріжджів

Каротиноїди - це група розчинних у ліпідах природних терпеноїдних пігментів. У цій групі β -каротин є передкурсором вітаміну А і відіграє важливу роль у захисті клітин і тканин від пероксидів як антиоксидант. [4].

β -каротин дійсно відіграє важливу роль у забезпеченні багатьох фізіологічних функцій організму. Він сприяє нормальному росту та розвитку, а також підвищує активність статевих гормонів. Крім того, β -каротин має антимуtagenні, антиканцерогенні і радіопротекторні властивості. Молекула β -каротину, зв'язана з подвійними зв'язками $C = C$, здатна поглинати різні вільні радикали, що захищає клітини від мутагенного та канцерогенного впливу, іонізуючої радіації і хімічних мутагенів. [9].

Сьогодні, в зв'язку з ростом потреби в природних барвниках у різних галузях промисловості, таких як фармацевтична, харчова, косметична та сфера здоров'я, люди змушені використовувати природні ресурси. Широкий спектр забарвлень від жовтого і помаранчевого до червоного і фіолетового у рослин, тварин і мікроорганізмів зумовлений наявністю пігментів, одним з найважливіших з яких є каротиноїди. Цей пігмент є одним з найважливіших і цінних вторинних метаболітів [16].

Каротиноїди є одними з найважливіших компонентів харчування. Як природні барвники, вони мають вирішальний вплив на забарвлення багатьох харчових продуктів. З поживної точки зору деякі каротиноїди є попередниками вітаміну А. [10].

Зокрема, різні види мікроорганізмів активно розглядаються як потенційні джерела каротиноїдів, конкурентоспроможних у промисловому виробництві. Це пов'язано з їхньою високою швидкістю росту, яка перевершує швидкість росту багатьох рослин та тварин, що також виробляють ці речовини. Таким чином, мікроорганізми стають перспективною альтернативою для нових біотехнологічних виробництв. [16].

Каротиноїди можуть бути виробляються дріжджами, бактеріями та грибами. [10]. Дріжджі, які здатні до синтезу каротиноїдів, стали важливими

у біотехнології. Ще в ХХ столітті науковці виявили цю потенційну можливість у деяких видів дріжджів, таких як *Sporobolomyces*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* та інші, які виробляють різноманітні каротиноїди [31].

Каротиноїдні пігменти, що продукуються зазначеними дріжджами, відзначаються високою біологічною активністю. Приблизно 10% з них вважаються попередником вітаміну А, відомого як ретинол. Крім того, ці сполуки використовуються для лікування та профілактики широкого спектру захворювань, а також використовуються як харчові добавки до продуктів [5].

Синтез великої кількості цінних біотехнологічних сполук дріжджами роду *Rhodotorula* створює можливість їх використання для виробництва завдяки наявності каротиноїдних пігментів. Ці пігменти знайшли застосування у різних сферах промисловості, включаючи фармацевтику, хімію, кормову та харчову промисловість.

Широке використання дріжджів цього роду обумовлене їх корисними властивостями, такими як здатність до синтезу барвників, а також їх антиоксидантна, канцеропротекторна та імуномодулююча дія. Крім того, дріжджі можуть виробляти інші корисні біологічно активні сполуки, такі як ергостерол, ліпіди та екзополісахариди[32].

Дріжджі роду *Rhodotorula* можуть виробляти значну кількість цінних біотехнологічних сполук. Це широке застосування обумовлене цінними властивостями цих речовин: вони фарбують, є передкурсорами вітаміну А і мають антиоксидантні, канцеропротекторні та імуномодулюючі властивості. [22].

Певні види дріжджів нагромаджують каротиноїдні пігменти як частину вторинного метаболізму, зазвичай синтез каротиноїдів може залежити від їх росту. Оптимальне накопичення каротиноїдів відбувається в стаціонарній фазі росту культури, оскільки клітини старіють, і, можливо, це загальний

механізм захисту від окисного стресу. Наявність потрібного джерела вуглецю відіграє важливу роль у біосинтезі каротиноїдів [33].

Дріжджі продукують такі речовини як торулін, торулородин, β -каротин і γ -каротин. [26]. Види *Rhodotorula* є пігментованими базидіальними дріжджами сімейства *Sporidiobolaceae* [21]. Більшість видів *Rhodotorula* утворюють колонії, які можуть мати від помаранчевого до коралового кольору, але також можуть бути від оранжевого до червоного на агарі Сабуро завдяки наявності каротиноїдних пігментів.



Рис. 1.2.1 Вирощування роду *Rhodotorula* на твердому поживному середовищі [22]

Колонії видів *Rhodotorula* характеризуються м'якою, гладкою, вологою та іноді слизькою морфологією. Ці види дріжджів не вибагливі в живленні, легко зростають у більшості середовищ і відзначаються швидкими темпами росту. Під мікроскопом вони виглядають як круглі або овальні клітини, що рухаються. Іноді може утворюватися слабка капсула. Родина *Rhodotorula* характеризується виділенням ферменту уреазу та відсутністю фермента для переробки вуглеводів. Вони відрізняються від *Cryptococcus* своєю неспроможністю використовувати інозит, а від *Candida* - наявністю пігментованих колоній та відсутністю псевдогіф. [22].

Їх мікробіологічна ідентифікація базується на виробленні каротиноїдного пігменту, який надає їм різноманітний відтінок від лососево-рожевого до

коралово-червоного. Форма дріжджів може коливатися від яйцевидної до сферичної (розміри $2-3 \times 5-7$ мкм), вони можуть з'являтися окремо або у ланцюгах, часто мають багатосторонній бруньковий вигляд. Вони не утворюють міцелію або псевдоміцелію, не ферментують вуглеводи та позитивно реагують на уреазу. *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutinis* та *Rhodotorula minuta* вважаються найбільш клінічно значущими видами роду. [20].

Rhodotorula minuta — це вид дріжджів, який входить до роду *Rhodotorula*. Ці пігментовані дріжджі зазвичай формують колонії від жовтого до оранжевого кольору. *Rhodotorula minuta* зустрічається у різних середовищах, таких як ґрунт, повітря, вода та продукти харчування.



Рис. 1.2.2 Вигляд колоній *Rhodotorula minuta* [6]

Rhodotorula minuta вивчається з метою застосування як кормової добавки або пробіотики для водних організмів. Вона може бути джерелом потрібних поживних речовин, таких як білки, ліпіди, вітаміни та мінерали. *Rhodotorula minuta* також може використовуватися в аквакультурі як живий корм для риби та інших водних організмів. Раніше масляні дріжджі *Rhodotorula minuta* використовувалися як біоцид і для виробництва β -каротину. Дослідження показують, що *Rhodotorula minuta* може виробляти до 40% ліпідів, що свідчить про його високу швидкість росту. [6].

Rhodotorula rubra, вид дріжджів з роду *Rhodotorula*, часто поширений у різноманітних середовищах, таких як ґрунт, вода та повітря. Відмітною особливістю *Rhodotorula rubra* є характерний червоно-рожевий відтінок, який дає йому його назву.



Рис. 1.2.3 Культура *Rhodotorula rubra* на агарі Сабуро [19].

Rhodotorula rubra привертає увагу науковців через її потенціал в біотехнології та промислових процесах. Цей вид дріжджів відомий своєю здатністю виробляти каротиноїдні пігменти, які мають значну комерційну цінність як природні харчові барвники та антиоксиданти. Крім цього, деякі штами *Rhodotorula rubra* вивчаються як потенційні виробники ліпідів та біопалива. Колонії *Rhodotorula rubra* на агарі Сабуро мають дріжджоподібну форму, є м'якими та гладкими, мають круглу або овальну форму з багатосторонніми бруньками та капсулами, виробляють фермент уреазу та не ферментують вуглеводи. [19].

Rhodotorula glutinis - це аеробні дріжджі, які формують жовті гладкі колонії з вологою консистенцією. У стані повної зрілості клітини мають діаметр 3-5 мікрон і можуть мати круглу, овальну або подовжену форму, групуючись у вигляді мукоїдних колоній. [23].

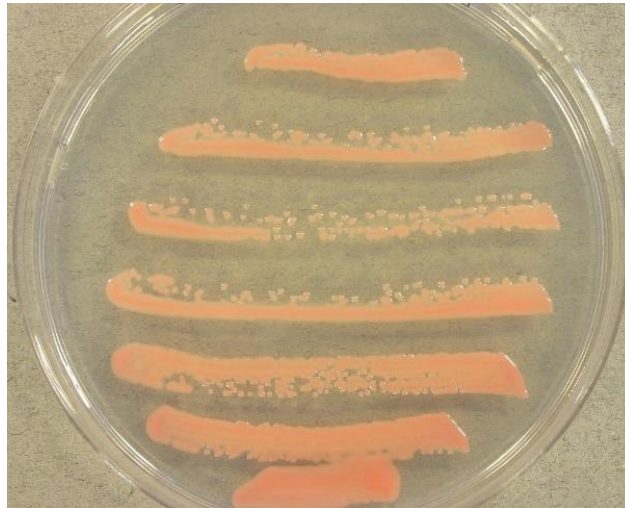


Рис. 1.2.4 *Rhodotorula glutinis* [22]

Rhodotorula glutinis може розвиватися як у рідинному, так і у твердому середовищі. Середовище, в якому вона живе, повинне бути багатим на вуглець, азот, вуглеводи та мінерали. Зазвичай для цього використовують такі середовища, як ЕМС і Сабуро. Оптимальний температурний діапазон для її зростання зазвичай коливається між 20 і 30°C. Найбільш підходяще значення рН зазвичай знаходиться у діапазоні від 3 до 7. Для синтезу каротиноїдів потрібне належне освітлення, і цей процес можна розділити на два етапи. Перший етап - це фотохімічна реакція, яка не залежить від температури, а другий - біохімічна реакція, яка не потребує освітлення. [22].

У біотехнології вирощування зоопланктону розглядається використання дріжджів, здатних до каротиногенезу, замість традиційно застосовуваних *Saccharomyces cerevisiae*. Це відкриває перспективи для використання каротиносинтезуючих дріжджів як джерела поживних речовин для зоопланктону. Ефективність цього підходу пов'язана з мікробіологічним механізмом отримання каротиноїдів, що може бути економічно вигідним. [25].

Зокрема, окремі штами дріжджів, такі як *Saccharomyces cerevisiae*, застосовуються у кормах для тварин у якості пробіотиків або добавок, оскільки вони можуть покращувати функцію кишечника, травлення та

імунітету. Ці штами дріжджів спеціально відібрані і культивуються через їх корисні властивості і додаються до раціону тварин у конкретних дозах.

Проте слід зазначити, що зоопланктон, який часто використовується як живий корм для тварин, не здатний синтезувати каротиноїди, але може їх накопичувати. [25].

1.3 Застосування *Daphnia magna* як живого корму

Рід прісноводних ракоподібних *Daphnia* є універсальною модельною системою, яка використовується у різних галузях наукових досліджень [18]. Крім цього, *Daphnia spp.*, як частина живого зоопланктону, вважаються важливим джерелом їжі для малих прісноводних риб, а також використовуються як інгредієнт для виробництва промислових кормів.

Гіллястовусі ракоподібні - це дрібні планктонні істоти з розміром тіла від 0,25 до 10,0 мм. Їхнє тіло складається з головного, грудного і черевного (абдомінального) відділів, утворюючи голову, тулуб і постабдомен, який утворює кауду. Покрив їх тіла - це панцир, який у деяких видів може бути присутній лише на спині. Передня частина головного панциря часто має вигляд витягнутого дзьоба, утворюючи роstrum. Також є 4-6 пар грудних плекатих листовидних кінцівок, які мають щетинки. З передньої частини голови виходять короткі антени, відомі як антенули. Біля основи голови, з обох боків, розташована друга пара антен, які виконують функцію органів руху. Кожна антена складається з внутрішнього та зовнішнього сегментів. У кожній антені знаходиться придаток, який є зябровою пластинкою та бере участь у диханні, відомий як ендит. Дихання здійснюється за допомогою зябрових придатків грудних ніг, а в деяких випадках - за допомогою заднього відділу кишечника (кишкове дихання) або поверхні тіла (дифузне дихання). В головній частині тіла є пара щелеп, відомі як мандібули та максилі [34].

Над входом у ротову порожнину знаходиться верхня губа. Зі ротового отвору виходить тонкий стравохід, який переходить у середню кишку, а далі

- у задню кишку, що має отвір у задньому відрізку кауди. У кінці рухливої кауди є пара кігтів. На спинній стороні кауди розташована пара великих щетинок, які іноді можуть бути короткими. В місці продовження кауди внутрішні органи включають печінкові відростки. У цих організмів кровоносна система є незамкненою, а на спинній стороні грудного відділу знаходиться серце, через яке кров циркулює лакунами [34, 35].

Нервова система складається з мозку, який простягається двома ланцюгами вздовж тулуба. Органами дотику є сенсорні щетинки на антенах і постабдомені - на черевному краї. Головне око є непарним і рухливим. Крім того, у ракоподібних є додаткове око у вигляді пігментної плями [35].

Самці мають довжину від 2,0 до 2,2 мм, і у них хвостова голка надзвичайно коротка. Передній край стулок спереду витягнутий у формі кута і густо опушений. Голова низька, з тупим рострумом, і великим оком. Передні антени мають довгу, звужену всередині основу. На базі передніх антен розташовується двохчлениковий джгутик, що закінчується дрібними щетинками, естетасками, чутливою щетинкою і малим чутливим виступом. Розвинені лише нижні абдомінальні вирости. Дистальна частина постабдомена витягнута у формі соска і озброєна зубчиками. Краї анального отвору опуклі, оточені з кожного боку 10–12 зубцями [36].

У кладоцер явно виражений статевий диморфізм. Самці, на відміну від самок, мають менший розмір, більш витягнутий постабдомен та антenuли. Найчастіше їх можна зустріти у водоймах влітку та восени.

Самці кладоцерів менші за самок, мають більш видовжений постабдомен і антenuли з іншою структурою, і частіше зустрічаються у водоймах влітку та восени. У самок з обох боків кишківника знаходяться парні яєчники, а яйцеводи відкриваються у зародкову камеру на спині. У самців є парні сім'яники з сім'япроводами. Гіллястовусі ракоподібні демонструють явище гетерогонії, тобто зміну статевого і партеногенетичного розмноження. Швидкість дозрівання і тривалість життя варіюються між видами.

Наприклад, *Daphnia magna* живе від 5 до 6 місяців, а *Moina rectirostris* – лише до 1 місяця [30].

Влітку, за умови достатньої кількості їжі, народження молоді та надходження нових яєць у вивідкову камеру відбувається щодня, що сприяє швидкому зростанню чисельності рачків. Зазвичай народження молоді супроводжується линянням самок [37].

Дафнії розмножуються безстатевим способом. Вони мають вивідкову камеру на спинці, яка утворена обома сторонами панциря, де розміщені яйця та ненароджені дафнії. У весняний та літній періоди у ставках переважають самки, а восени, а також при нестачі їжі у літні місяці, починають з'являтися самці. Спарювання призводить до утворення зимових яєць, які мають темну оболонку і вкладаються у вивідкові камери. Ці яйця дуже стійкі до негоди і можуть переносити заморозки. Вважається, що заморожені зимові яйця є життєздатними, навіть перебуваючи в льоду. Поява зимових яєць у літній період вказує на недостатню кількість їжі для ракоподібних. Тому необхідно терміново додавати добрива для стимулювання росту фітопланктону [30].

Дафнії є фільтраторами і живляться дрібними зваженими у воді частинками. Їжа збирається за допомогою фільтруючого апарату, що складається з філоподіїв, що є сплюснутими листоподібними ніжками, які створюють потік води. Цей потік спрямований від передньої частини тіла до задньої, і таким чином дафнії збирають частинки, які за допомогою спеціальних щетинок переносяться у харчову канавку. Хоча цей апарат настільки ефективний, що може зібрати навіть бактеріальні клітини. Раціон дафній зазвичай складається переважно з планктонних водоростей. Дафнії зазвичай споживають частинки розміром від 1 мікрону до 50 мікронів, хоча частинки діаметром до 70 мікронів можуть іноді потрапляти в кишечник великих особин [29].

Деякі види дафній, такі як *Daphnia magna*, іноді прикріплюються до рослин або інших субстратів. Крім того, вони можуть сканувати поверхню субстрату, щоб зібрати з нього дрібні частинки. Така поведінка стає більш помітною в

умовах недостатньої доступної їжі і, ймовірно, допомагає збагачувати раціон дафній. Рух води від дафній перетворює дрібні частинки на субстраті в суспензію, яка потім поглинається за допомогою звичайного для дафній процесу фільтрування [18].

Серед основних видів дафній, що використовуються в аквакультури, можна відзначити два наступні:

- *Daphnia magna*: Цей вид досягає довжини 6 мм у самок і 2 мм у самців, а личинки лише 0,7 мм. Вони досягають статевої зрілості за 4-14 днів і відкладають яйця кожні 12-14 днів. У кладці може розвиватися до 80 яєць одночасно, а середній період життя становить 110-150 днів.
- *Daphnia pulex*: Самки цього виду досягають довжини 3-4 мм. У кладці може бути до 25 яєць, і вони відкладаються кожні 3-5 днів. Середня тривалість життя становить від 26 до 47 днів. [1].

Характеристики *Daphnia magna* роблять їх корисними для проведення експериментів і випробувань з кількома перевагами порівняно з іншими видами. Наприклад, для них можна створити зручні та прості умови культивування, які включають утримання культури у чистій природній воді, відсівання молоді від дорослих самок щодня і регулярне годування. Молодь є генетично однорідною завдяки партеногенезу, а дорослі особини дуже швидко дозрівають - це зазвичай займає всього 5-8 днів при оптимальній температурі і належному харчуванні. Крім того, вони мають складну організацію, включаючи кровоносну і нервову системи, і достатньо великі розміри, що дозволяє проводити спостереження за багатьма реакціями. І, нарешті, вони дуже чутливі до більшості забруднюючих речовин. [15].



Рис. 1.3.1 Самка *Daphnia magna* [4]

Переваги в культивуванні дафній у штучних умовах включають швидкий темп росту, високу плодючість, значну харчову цінність, адаптабельність до умов середовища та здатність існувати при великій щільності популяції. [13].

Самки *Daphnia magna* можуть мати довжину від 2,2 до 6,0 мм, у той час як самці зазвичай мають розмір від 2,0 до 2,2 мм. Ці організми розмножуються як статевим, так і партеногенетичним шляхом. Одна самка може відкласти від 100 до 200 яєць. Статева зрілість настає у *Daphnia magna* протягом 6-8 днів після народження. Виходження молоді відбувається кожні 2–3 доби. Очікувана тривалість життя цих організмів становить приблизно 4-5 місяців. [14].

Для культивування гіллястовусих ракоподібних *Daphnia magna* рекомендується використовувати бетонні резервуари або невеликі ставки, які мають глибину до 1 метра і наповнюються водою з будь-якого прісноводного джерела.

Оптимальна температура води для утримання *Daphnia magna* коливається в діапазоні 15—25 °С, рН від 6,8 до 7,8, концентрація кисню від 3 до 6 мг/л, а оксигеновмісність від 15 до 26 мг O₂/л. Початкова щільність культури рачків повинна становити приблизно 10 г/м³. [10].

Daphnia magna використовують для годування молоді риб, а також під час раннього нересту і в період підрощування. Масовий розвиток гіллястовусих ракоподібних свідчить про високу продуктивність водойми [38].

Каротиноїди представляють собою сполуки, які присутні у широкому спектрі живих організмів, включаючи рослини, водорості та тварини. У дафній каротиноїди відіграють ряд важливих ролей. Одна з головних функцій каротиноїдів у дафній полягає в їхньому захисному впливі на клітини бактерій.

Каротиноїди проявляють високу антиоксидантну активність, що дозволяє їм захищати клітини дафній від ушкоджень, спричинених окислювальними процесами. Вони здатні поглинати вільні радикали та інші шкідливі сполуки, що запобігає окислювальному стресу та зараженню клітин.

Крім того, каротиноїди також впливають на забарвлення. Деякі види каротиноїдів, такі як астаксантин, надають червону або рожеву окраску організмам. Це може впливати на привабливість самців під час розмноження та залучення партнерів.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали дослідження

Як джерело каротиноїдів для біоінкапсуляції використовували культуру *Rhodotorula minuta* УКМ У-1349.

Біомасу каротигенних дріжджів використовували в якості кормового субстрату при культивуванні *Daphnia magna*. Як контроль використовували культуру *Daphnia magna*, яку вигодовували *Saccharomyces cerevisiae*.

Daphnia magna відбирали з маточної культури та поміщали в 6 скляних ємкостей на 300 мл. У кожен ємкість наливали по 250 відстояної води та переміщали туди по 15 екземплярів дафній. Культивування здійснювали при температурі $22\pm 1^\circ\text{C}$ з 16-годинним фотоперіодом в умовах кліматичної кімнати [25].

Як контрольний кормовий субстрат для зоопланктону використовували культуру дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, стандартизовану до 24×10^6 КУО/л клітин.

З метою визначення оптимальної концентрації каротинсинтезуючих дріжджів для процедури біоінкапсуляції досліджувані організми були поділені на 6 дослідних груп відповідно до використаного кормового субстрату:

1. *Rhodotorula minuta* (0,25 г/мл);
2. *Rhodotorula minuta* (0,125 г/мл);
3. *Rhodotorula minuta* (0,06 г/мл);
4. *Saccharomyces cerevisiae* (0,25 г/мл);
5. *Saccharomyces cerevisiae* (0,125 г/мл);
6. *Saccharomyces cerevisiae* (0,06 г/мл).

Насичення каротиноїдами *Daphnia magna* проводилось впродовж 9 днів.

2.2. Культивування каротинсинтезуючих дріжджів

Для культивування *Rhodotorula minuta* використовували середовище Сабуро.

Для підготовки живильного середовища Сабуро використали 10 г глюкози та 2,5 г пептону, які розчинили та довели в дистильованій воді до об'єму 250 мл у конічній скляній колбі. Отриману суміш стерилізували протягом 30 хвилин. Потім, за умов ламінарного потоку, в середовище Сабуро вводили штамп *Rhodotorula minuta* петлею об'ємом 5 мл та поміщали в пробірку під струменем стерильного повітря. Культивування інокуляту проводили в термостаті протягом 48 годин при температурі 28°C. До готового середовища Сабуро додавали ще 5 мл інокуляту. Посівний матеріал вирощували протягом трьох днів при температурі 28°C. [5].

Після культивування було відібрано 6 центрифужних пробірок: 3 для дослідної проби з *Rhodotorula minuta* та 3 для контрольної проби з дріжджами *Saccharomyces cerevisie*. Перед центрифугуванням пробірки були зважені та відібрані по 7 мл кожної культури *Rhodotorula minuta* та *Saccharomyces cerevisie*.

Після відбирання проб, мікробну суспензію центрифугували протягом 20 хвилин при 3000 обертів за хвилину, щоб відокремити культуральну рідину від біомаси дріжджів. Після центрифугування клітини підраховували за допомогою камери Горяєва під бінокулярним мікроскопом MicroMed XS-3300.

2.3. Метод підрахунку мікроорганізмів в камері Горяєва

Для виміру кількості дріжджів, невелику краплю дріжджової суспензії наносили скляною паличкою на поверхню лічильної камери. Покриваючи її покривним скельцем, притискали великими пальцями до бокових стінок камери, щоб об'єм відповідав суспензії.

Потім камеру розміщували на предметному столику мікроскопа та налаштовували об'єктив на 10х, шукаючи зображення. За допомогою гвинтів предметного столика визначали квадрати, починаючи підрахунок з великого

верхнього квадрата і просуваючись по діагоналі, рахували клітини всередині квадрата. [24].

Після здійснення маніпуляцій з камерою Горяєва, робили розрахунки кількості клітин дріжджів *Rhodotorula minuta* та *Saccharomyces cerevisiae* в 1 мл суспензії.

«Розрахунки проводили за формулою:

$$M = \frac{a \cdot 1000}{h \cdot S} n, \text{ де}$$

M – кількість клітин в 1 мл суспензії;

a – середнє значення кількості клітин в квадраті;

h – глибина камери, в мм ($h = 0,1$);

S – площа великого квадрата сітки в мм² ($S = 0,004$);

n – розведення досліджуваної суспензії ($n = 0,1$);

$1000\text{мм}^3 = 1\text{мл}$ » [24].

2.4 Визначення вмісту загальних каротиноїдів *Daphnia magna*

Дафнії відбирали з культиваційних ємкостей та викладали на фільтрувальний папір, де їх зважували. Подальшу гомогенізацію проводили у 1 мл 100% ацетону, поступово доводячи об'єм до 4 мл.

Гомогенати переносили в ультразвукову ванну, де витримували їх упродовж 180 секунд з метою руйнування екзоскелету. Надалі пробірки залишали в темряві та холодильній камері на 24 години.

Далі пробірки з гомогенатами піддавали центрифугуванню протягом 10 хвилин при 3000 об/хв, після чого вимірювали вміст загальних каротиноїдів.

Вимірювання проводили за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 450 нм з використанням ацетону як референсу.

«Підрахунок вмісту загальних каротиноїдів здійснювали за формулою:

$$X = \frac{D \cdot V \cdot 100}{260 \cdot m}, \text{ де}$$

D – оптична густина;

V – об'єм екстракту (мл);

m – маса сировини (г);

260 – питомий показник поглинання 1% β -каротину» [5].

Вживаність дафній при проведенні біоінкапсуляції розраховували у відсотках за формулою: «

$$x = \frac{y \cdot 100}{n}, \text{ де}$$

y – кількість особин, що вижила;

n – кількість особин, що використовувалась для дослідження » .

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вміст загальних каротиноїдів *Daphnia magna* за умов застосування *Rhodotorula minuta*

Оскільки представники ряду *Cladocera* не здатні самостійно синтезувати каротиноїди, перед нами було поставлене завдання збагатити безхребетних ракоподібних цими есенціальними сполуками. Для цього ми використовували каротинсинтезуючі дріжджі *Rhodotorula minuta* УКМ У-1349. В якості контролю використовували дріжджі *Saccharomyces cerevisie*, які є стандартними кормовим субстратом для *Daphnia magna* [25].

Накопичення загальних каротиноїдів у ракоподібних відбувається у жирових клітинах, стінках кишечника, яйцях, інколи вони накопичуються в крові, проте у епідермісі та кутикулі вони відсутні.

Каротиноїди в дріжджах роду *Rhodotorula* виконують різноманітні функції, такі як: антиоксидантна, фотопротекторна, надають специфічного забарвлення [11].

Дослідженнями, проведеними на кафедрі біохімії та біотехнології, для накопичення каротиноїдів у ракоподібних *Daphnia magna* використовували опромінену культуру *Rhodotorula glutinis* та асоційовану з молочнокислими бактеріями. Результатом експерименту стало підвищення вмісту загальних каротиноїдів у 5,7 та 8 разів відповідно [25].

У нашій роботі для насичення каротиноїдами *Daphnia magna* було використано нативні культури дріжджів *Rhodotorula minuta*. З метою підбору ефективної концентрації дріжджів для проведення біоінкапсуляції апробували три різні концентрації дріжджів: 0,25 г/л, 0,125 г/л, 0,06 г/л. В якості контролю застосовували такі ж кількості *Saccharomyces cerevisie*. Насичення тривало 9 діб. Після закінчення експерименту було визначено кількісний вміст загальних каротиноїдів спектрофотометричним методом при довжині хвилі 450 нм.

На графіку 3.1.1. зображено результати досліджень вмісту загальних каротиноїдів у дафній за умов насичення *Rhodotorula minuta*.

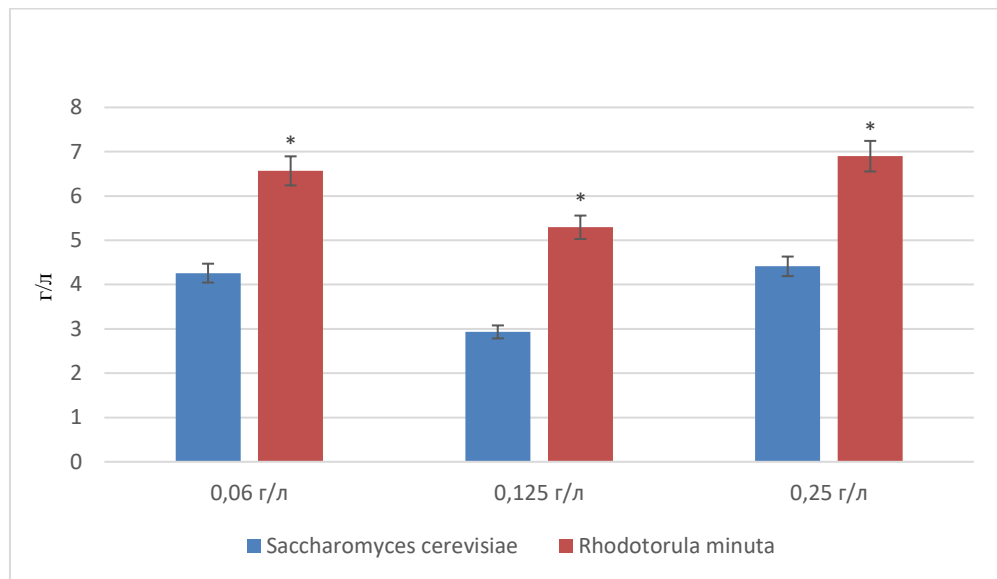


Рис. 3.1.1. Вміст загальних каротиноїдів у *Daphnia magna* за умов використання біомаси *Rhodotorula minuta* в якості кормового субстрату

Примітка: * - різниця порівняно з контролем (кормовий субстрат *Saccharomyces cerevisiae*) достовірна ($p \leq 0,05$)

Проведені дослідження показали ефективність усіх застосованих кількостей родоторули для накрпичення в організмі дафній каротиноїдів. Так, результатом біоінкапсуляції *Rhodotorula minuta* в кількості 0,06 г/л культурального середовища стало підвищення вмісту загальних каротиноїдів на 54%. При підвищенні концентрації дріжджів до 0,125 г/л і 0,25 г/л спостерігається збільшення вмісту загальних каротиноїдів у *Daphnia magna* на 80% та на 56% відповідно.

Примітно, що вміст каротиноїдів статистично не відрізняється при застосуванні *Rhodotorula minuta* в кількості 0,06 г/л та 0,25 г/л.

Проаналізувавши дані, можна припустити, що при високих концентраціях дріжджів виникають умови, які менш сприятливі для засвоєння каротиноїдів дафнією. Причинами цього можуть бути зміни

якості води, доступності кисню чи інших факторів середовища. Тому слід використовувати концентрації дріжджів до 0,125 г/л.

3.2. Оцінка виживаності у *Daphnia magna*

Виживаність виду *Daphnia magna* залежить від різних факторів, включаючи умови середовища, температуру, якість води, наявність їжі. Дафнії живляться мікроскопічними водоростями, бактеріями та дріжджами. Відсутність або нестача їжі призводить до зниження виживаності та їх росту[10].

Як відомо, *Daphnia magna* не здатна самостійно синтезувати каротиноїди. Завданням нашої роботи було збагатити їх цими есенціальними сполуками та визначити виживаність цих організмів.

На рисунку 3.2.1. показані результати дослідження виживаності *Daphnia magna* після інкапсуляції *Rhodotorula minuta*

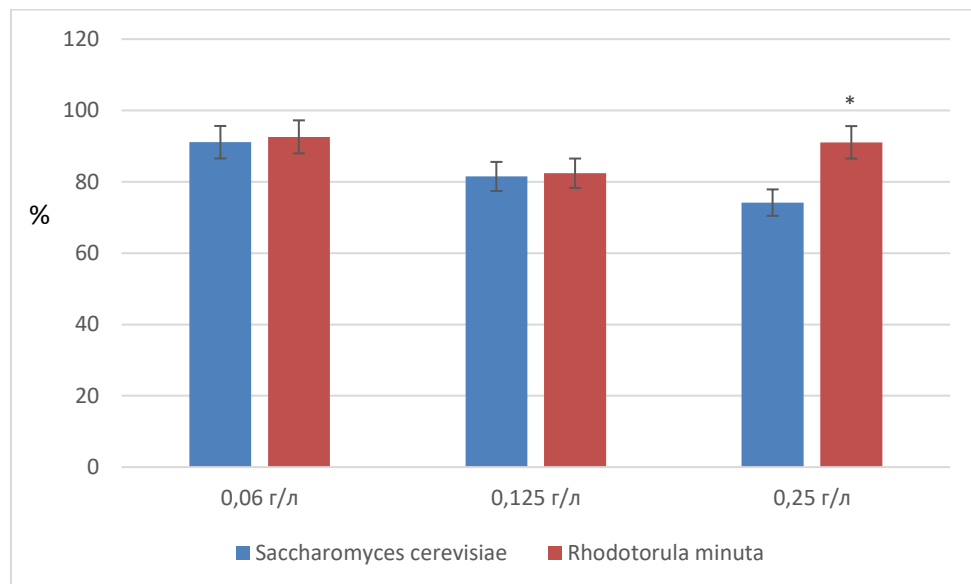


Рис. 3.2.1. Виживаність *Daphnia magna* після інкапсуляції *Rhodotorula minuta* в якості кормового субстрату

Примітка: * - різниця порівняно з контролем (кормовий субстрат *Saccharomyces cerevisiae*) достовірна ($p \leq 0,05$)

Згідно отриманих даних виживаність дафній відрізняються при різних концентраціях кормового субстрату. Привертає увагу той факт, що збільшення концентрації класичного кормового субстрату для дафній – дріжджів *Saccharomyces cerevisie* призводить до поступового зниження виживаності. Низький рівень розчиненого кисню значно знижує виживаність і репродуктивні показники дафній. Надмірна кількість дріжджів в середовищі створює своєрідну ‘плівку’, яка містить ліпіди, білки та інші речовини, які в свою чергу перешкоджають надходження кисню в організм дафній, що призводить до загибелі ракоподібних. Оптимальна температура для дафній коливається в межах 18-24°C. Виживаність знижується при температурних екстремумах (дуже високих або дуже низьких температурах). Ці зміни також можуть впливати на метаболізм і ріст дафній. Прісноводні ракоподібні реагують на зміни у світловому режимі, які впливають на їх біологічні ритми і поведінку. Світло може впливати на процеси метаболізму і розмноження цих організмів [17].

Натомість виживаність дафній при насиченні *Rhodotorula minuta*, залишається однаково високою при всіх досліджуваних концентраціях родоторул. При вмісті каротиногенних дріжджів 0,06 г/л виживаність дафній склала 92,6%, 0,25 г/л - 91,06%). Нижча концентрація дріжджів *Rhodotorula minuta* зменшує можливість накопичення токсинів, органічних речовин та інших шкідливих речовин у воді, які можуть виникнути при вищих концентраціях. Це створює більш сприятливе середовище для дафній, підвищуючи їхню виживаність.

3.3. Динаміка кількості *Daphnia magna* впродовж насичення каротиновмісними дріжджами

Каротиноїди можуть, стимулювати ріст та розвиток особин, а також покращувати імунну відповідь у дафній, що особливо важливо в умовах стресу або забруднення навколишнього середовища.

Rhodotorula minuta містять високий рівень каротиноїдів, ліпідів та білків, що робить їх потужним поживним субстратом для *Daphnia magna*, [27].

На рисунку 3.3.1. показана зміна кількості особин *Daphnia magna* за умов застосування *Rhodotorula minuta* в кількості 0,25 г/л культурального середовища

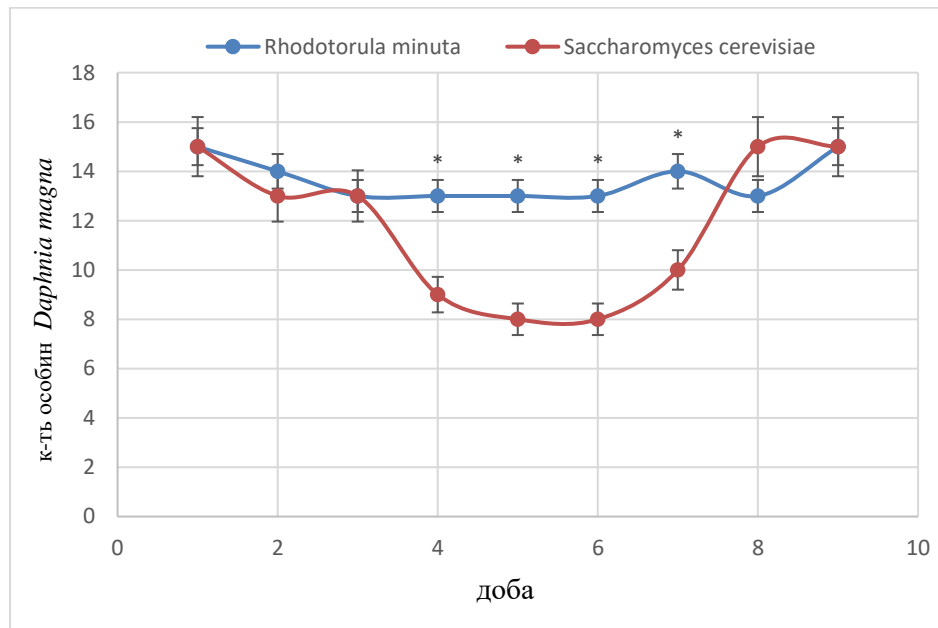


Рис. 3.3.1. Динаміка кількості особин *Daphnia magna* за умов застосування *Rhodotorula minuta* в кількості 0,25 г/л культурального середовища

Примітка: * - різниця порівняно з контролем (кормовий субстрат *Saccharomyces cerevisiae*) достовірна ($p \leq 0,05$)

Встановлено, що використання дріжджів *Rhodotorula minuta* як кормового субстрату для *Daphnia magna* забезпечує стабільну кількість особин протягом усього періоду спостереження. Кількість особин *Daphnia magna* за умов застосування *Rhodotorula minuta* в концентрації 0,25 г/л культурального середовища протягом 1 - 2 доби культивування була стабільна і не змінювалась порівняно із контрольною пробою. Натомість з 2-ї по 6-у добу в контрольних пробах відбулось суттєве зниження чисельності та

спостерігалась достовірна різниця з дослідною групою, де таких коливань відмічено не було.

Використання дріжджів *Rhodotorula minuta* для *Daphnia magna* забезпечує кращі умови для виживання і стабільності популяції дафній, порівняно з *Saccharomyces cerevisiae*, який в свою чергу викликає значні коливання чисельності.

На рисунку 3.3.2. показана зміна кількості особин *Daphnia magna* за умов застосування *Rhodotorula minuta* в кількості 0,125 г/л культурального середовища

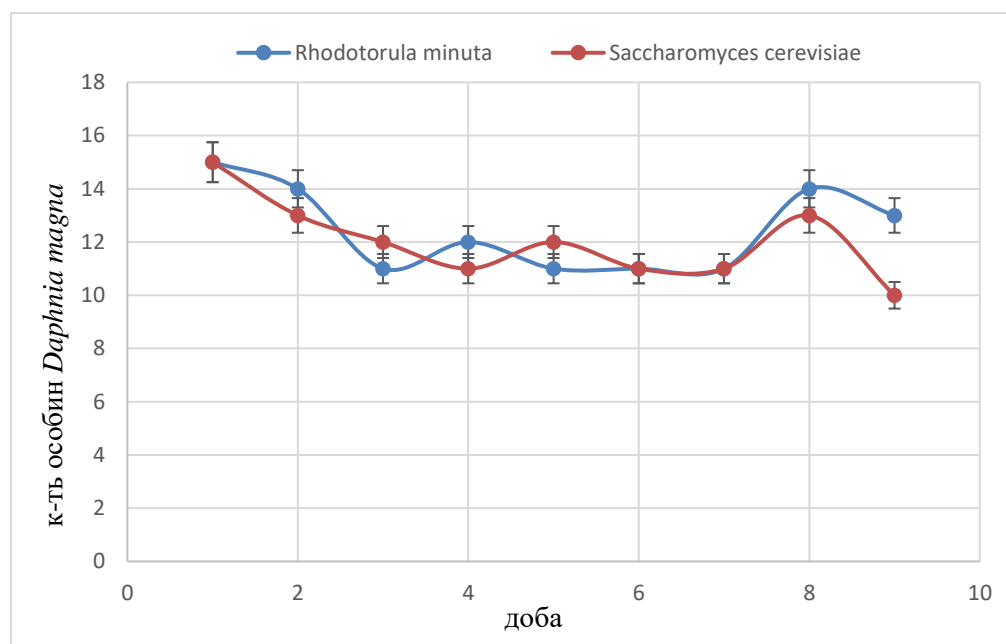


Рис. 3.3.2. Зміна кількості особин *Daphnia magna* за умов застосування *Rhodotorula minuta* в кількості 0,125 г/л культурального середовища

Відзначимо, що кількість особин *Daphnia magna* за умов використання *Rhodotorula minuta* в кількості 0,125 г/л культурального середовища протягом перших трьох діб стрімко зменшується з подальшими коливаннями чисельності з досягненням піку на 8-у добу експерименту. Слід відмітити, що на кінцевому етапі біоінкапсуляції кількість виживших дафній в дослідній групі є вищою у порівнянні з контролем. Аналізуючи результати можна припустити, що при перших добах насичення дафній каротиноїдами кількість

особин зменшувалась, що можливо пов'язане із адаптацією організмів до нових умов існування в культуральному середовищі [27].

На рисунку 3.3.3. подана динаміка чисельності *Daphnia magna* впродовж експерименту при концентрації родоторул 0,06 г/л

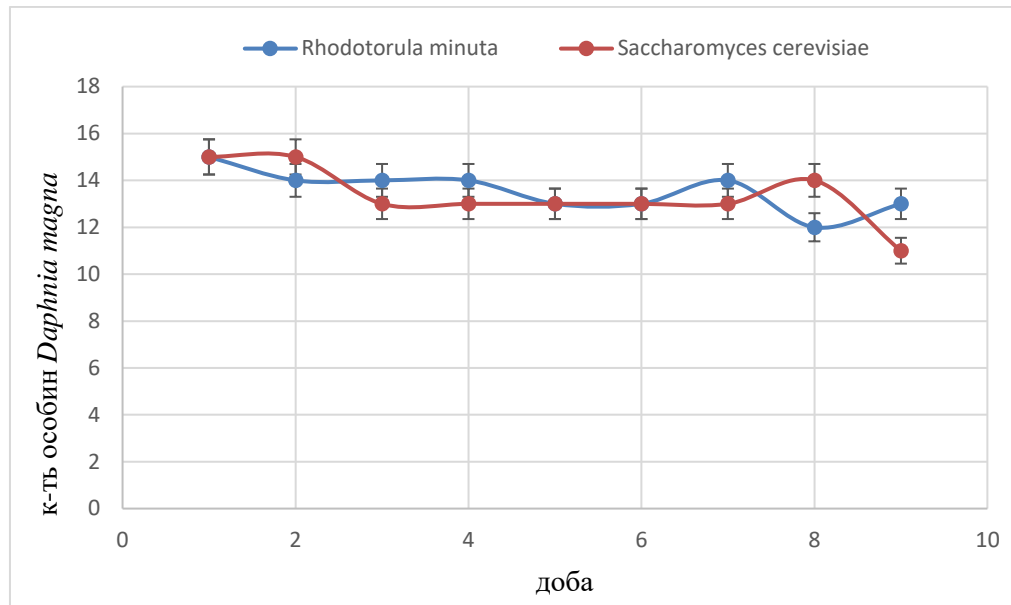


Рис. 3.3.3. Зміна кількості особин *Daphnia magna* за умов застосування *Rhodotorula minuta* в кількості 0,06 г/л культурального середовища

Застосування найменшої з досліджуваних концентрацій каротиновмісних дріжджів з метою інкапсуляції в організм дафній показало відносно стабільну динаміку кількості зоопланктону. Статистично достовірні різниці у порівнянні з контролем були зареєстровані лише на останній добу експерименту.

Отже, використання *Rhodotorula minuta* як єдиного джерела корму може забезпечити швидкий ріст і досягнення статевої зрілості в оптимальні терміни [28].

ВИСНОВКИ

1. Застосування *Rhodotorula minuta* як кормового субстрату призводить до накопичення каротиноїдів в організмі *Daphnia magna*. Вміст загальних каротиноїдів дафній збільшується на 54% у порівнянні з контролем при насиченні родоторулами в кількості 0,06 г/л культурального середовища.

2. Вміст загальних каротиноїдів *Daphnia magna* статистично не відрізняється при застосуванні *Rhodotorula minuta* в кількості 0,06 г/л та 0,25 г/л.

3. Виживаність дафній при застосуванні *Rhodotorula minuta* залишається стабільно високою при всіх досліджуваних концентраціях родоторул. При вмісті каротиногенних дріжджів 0,06 г/л загальна виживаність дафній склала 92,6%, 0,25 г/л - 91,06%. Відмінності в динаміці кількості дафній протягом експерименту у порівнянні з контролем зареєстровані лише при застосуванні дріжджів в концентрації 0,25 г/л.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабкіна, О. О., & Гарлінська, А. М. (2016). Дафнії (*Daphnia*) басейну річки Тетерів (фауна, екологія). Біологічні дослідження–2016: Збірник наукових праць, с.144-145.
2. Бургаз, М. І., & Соборова, О. М. (2016). Годівля риб: методичні вказівки для лабораторних робіт.
3. Бургаз, М. І., & Матвієнко, Т. І. (2015). Організація виробництва та стандартизація продукції аквакультури: конспект лекцій.
4. Буценко, Л. М., Пенчук, Ю. М., & Пирог, Т. П. (2010). Технології мікробного синтезу лікарських засобів. 323 с
5. Кирица, Е. (2005). Спрямований синтез каротиноїдів у дріжджів та перспектива їх використання: дис. ... доктора біології: 03.00.23 / Е. Кирица. – Кишинів, 129 с.
6. Крупей, К. С. (2014). Дріжджі *Rhodotorula mucilaginosa* 1394–біоіндикатори забруднення довкілля важкими металами. Питання біоіндикації та екології, (19, № 1), 226-235.
7. Сломчинський, М. М., Бабенко, С. П., Кузьменко, О. А., Титарьова, О. М., & Чернявський, О. О. (2022). Годівля риб: методичні вказівки для виконання лабораторно-практичних занять. 20-21с
8. Мацелюх Б.П., Кунщикова Є.О., Кунщикова І.С., Стенько А.С., Горна М.С., Безкоровайна Н.К., Бондар І.В. Штам К2 гриба *Blakeslea trispora* – продуцент бета-каротину. Україна. – 6.12.1994.
9. Рябовол, А. К. (2023). Вплив опромінення на найпростіших ракоподібних. с.218
10. Радов, В. П. (2011). Годівля риб: конспект лекцій. с.34
11. Сімахіна, Г. О. (2010). Функціональна роль каротиноїдів та особливості їх використання у харчових технологіях. Наукові праці НУХТ, (33), 45-48.

12. Сломчинський, М. М., Бабенко, С. П., Кузьменко, О. А., Титарьова, О. М., & Чернявський, О. О. (2022). Годівля риб: методичні вказівки для виконання лабораторно-практичних занять. 20-21с
13. Тучапська, А. Я., & Кражан, С. А. (2014). Культивування гіллястовусих ракоподібних для підвищення забезпеченості цьоголіток коропа природними кормами (огляд). Рибогосподарська наука України, (2), 55-68.
14. Федоненко, О. В., Шарамок, Т. С., & Маренков, О. М. (2014). Основи аквакультури: культивування мікроводоростей та безхребетних. Навчальний посібник. Дніпропетровськ.
15. Шашкова, Т. Л., & Григорєв, Ю. С. (2013). Порівняльна оцінка чутливості показників виживаності та трофічної активності *Daphnia magna* при визначенні токсичності води. Поволзький екологічний журнал, (4), 439-444.
16. Шерман, І., Шерман, І., & Євтушенко, М. (2011). Теоретичні основи рибництва. с.50
17. Coone, M., Vanoverberghe, I., Houwenhuysse, S., Verslype, C., & Decaestecker, E. (2023). The effect of hypoxia on *Daphnia magna* performance and its associated microbial and bacterioplankton community: A scope for phenotypic plasticity and microbiome community interactions upon environmental stress. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11, 1131203.
18. Ebert, D. (2005). Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in *Daphnia*. National Library of Medicine.
19. Facklam, R. R., Sahm, D. F., Teixeira, L. M., Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., ... & Tenover, R. C. (1985). Manual of clinical microbiology. Eds. Lennette EH, Balows A., Hausler WJ, Shadomy HJ, Amer. Soc. for Microbiol., Washington, DC, 154-175.
20. Falces-Romero, I., Cendejas-Bueno, E., Romero-Gómez, M. P., & García-Rodríguez, J. (2018). Isolation of *Rhodotorula mucilaginosa* from blood cultures in a tertiary care hospital. *Mycoses*, 61(1), 35-39.

21. Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., & Statzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(3), 1351-1371.
22. Frengova, G. I., & Beshkova, D. M. (2009). Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 36(2), 163.
23. Hernández-Almanza, A., Montañez, J. C., Aguilar-Gonzalez, M. A., Martínez-Avila, S., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2014). *Rhodotorula glutinis* as a source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*, 5, 64-72
24. Kudinova, O. V., Kiiko, V. V., & Sboeva, A. M. (2011). *Tekhnichna mikrobiolohiia: metodychni rekomendatsii shchodo vykonannia laboratornykh robit dlia studentiv dennoi ta zaochnoi form navchannia fakultetu restoranno-hotelnoho biznesu napriamiv pidhotovky 6.051701, 6.140101. Donetsk National University of Economics and Trade named after Mykhailo Tugan-Baranovsky. pp. 54.*
25. Kushniryk, O. V., Marchenko, M. M., Khudyi, O. I., Vasina, L. M., Khuda, L. V., & Kavulya, O. M. (2014). Застосування каротинсинтезуючих дріжджів *Rhodotorula glutinis* для культивування *Simoscephalus vetulus* (Müller, 1776) у лабораторних умовах. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 6(1), 24-29.
26. Mihalcea, A., Ungureanu, C., Ferdes, M., Chirvase, A. A., & Tanase, C. (2011). The influence of operating conditions on the growth of the yeast *Rhodotorula rubra* ICCF 209 and on torularhodin formation. *Culture*, 11, 12.
27. Pan, Y., Yan, S. W., Li, R. Z., Hu, Y. W., & Chang, X. X. (2017). Lethal/sublethal responses of *Daphnia magna* to acute norfloxacin contamination and changes in phytoplankton-zooplankton interactions induced by this antibiotic. *Scientific reports*, 7(1), 40385.

28. Petrik, S., Marova, I., Haronikova, A., Kostovova, I., & Breierova, E. (2013). Production of biomass, carotenoid and other lipid metabolites by several red yeast strains cultivated on waste glycerol from biofuel production—a comparative screening study. *Annals of microbiology*, 63, 1537-1551.
29. Pukalo, P. Y., Bazaeva, A. V., Bepaly, A. V., & Panchishnyy, M. A. (2020). The Influence of Anthropogenic Factors on Aquatic Ecosystems. *Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, (3), 33-36.
30. Spaak, P., Fox, J., & Hairston Jr, N. G. (2012). Modes and mechanisms of a *Daphnia* invasion. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1740), 2936-2944.
31. Sudenko, V. I., Kvasnykov, E. I., Vaskivniuk, V. T., & Hrynberh, T. A. (1980). Carotene-synthesizing yeast. *Naukova Dumka*. 171p.
32. Marova, I., Certik, M., & Breierova, E. (2011). Production of enriched biomass by carotenogenic yeasts-application of whole-cell yeast biomass to production of pigments and other lipid compounds. *Biomass-detection, production and usage*, 345-384.
33. Moliné, M., Libkind, D., del Carmen Diéguez, M., & van Broock, M. (2009). Photoprotective role of carotenoids in yeasts: response to UV-B of pigmented and naturally-occurring albino strains. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 95(3), 156-161.
34. Glime, J. M. (2017). Arthropods: Crustacea—Copepoda and Cladocera. Chapter 10-1. *Bryophyte ecology*, 2.
35. Gannon, J. E., & Stemberger, R. S. (1978). Zooplankton (especially crustaceans and rotifers) as indicators of water quality. *Transactions of the American Microscopical Society*, 16-35.
36. Aladin, N. V., & Potts, W. T. W. (1995). Osmoregulatory capacity of the Cladocera. *Journal of Comparative Physiology B*, 164, 671-683.
37. Haberman, J. (1996). Contemporary state of the zooplankton in Lake Peipsi. *Hydrobiologia*, 338, 113-123.

- 38.Lazareva, V. (2022). Structure and dynamics of zooplankton in the Rybinsk Reservoir. Litres. 171p.

ДОДАТОК А**Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях**

Дозволяється працювати лише на заземлених об'єктах.

Приміщення хімічних лабораторій обладнуються вентиляцією, а місця можливого накопичення шкідливих хімічних речовин – відсмоктувачами.

Підлоги лабораторій повинні мати рівну, неслизьку, зручну для очищення поверхню, бути стійкими до дії механічних навантажень, вологи і агресивних середовищ.

Кожен працівник у лабораторії повинен мати закріплене за ним робоче місце.

Перед початком роботи слід одягти спецодяг (халат).

У спецодязі забороняється знаходитись за межами лабораторії.

При можливості скляний посуд і скляні частини замінюють пластиковими.

Нагріваючи рідину в пробірці або інших посудинах, їх тримають спеціальними утримувачами так, щоб отвір був спрямований від себе і працюючих поруч.

При перенесенні посудин із гарячою рідиною користуються рушником, посудину при цьому тримають обома руками: однією за дно, а другою за горловину.

При переливанні рідин (крім тих, що містять біологічний матеріал) користуються лійкою.

При розведенні речовин, що супроводжуються виділенням тепла, користуються термостійким хімічним посудом.

При роботі з кислотами та лугами виконують такі заходи безпеки:

- усю роботу з концентрованими кислотами та лугами проводять у витяжній шафі, користуючись при цьому окулярами, гумовими рукавичками та фартухом;

- концентровану кислоту відбирають із посудини тільки за допомогою спеціальної піпетки з грушею або сифоном;

- при приготуванні розчинів кислот спочатку в посудину наливають необхідну кількість води, а потім додають кислоту. Забороняється додавати воду в кислоту;

- при приготуванні розчинів лугів наважку лугу опускають у велику широкогорлу посудину, заливають необхідною кількістю води і старанно перемішують. Шматки лугу варто брати тільки щипцями;

- концентровані кислоти і луги виливають у раковину після попередньої їх нейтралізації.

При роботі з легкозаймистими речовинами (ефір, бензин, бензол, ацетон, спирт та ін.) дотримуються такої вимоги:

- усі роботи проводяться у витяжній шафі при ввімкненій вентиляції, вимкнутих газових пальниках і нагрівальних електроприладах.

Категорично забороняється:

- доручати проведення робіт із вогнебезпечними речовинами недосвідченому співробітнику;

- під час роботи в приміщенні запалювати сірники, палити, включати прилади, при роботі яких може виникнути іскра.

Після закінчення роботи із шкідливими речовинами необхідно:

- привести в порядок робоче місце;
- залишки шкідливих речовин здати на зберігання;
- старанно вимити руки з милом.

Забороняється використовувати речовини без етикеток та із закінченим терміном зберігання;

Після закінчення роботи необхідно вимити та висушити посуд, прибрати робоче місце, провітрити приміщення, відключити всі нагрівальні та освітлювальні прилади, закрутити водопровідні та газові крани.

Категорично забороняється працювати в лабораторії одному.

Виходячи з лабораторії, обов'язково перевірити, чи вимкнені газ, вода, електроенергія.

Надання першої допомоги

При виникненні пожежі в лабораторії необхідно негайно вимкнути газ та нагрівальні прилади, прибрати легкозаймисті рідини, вогонь засипати піском. Великий вогонь гасять за допомогою вогнегасника. Не можна задувати палаючу рідину або заливати її водою. Якщо на людині палає одяг, її треба швидко закутати в ковдру, халат або покласти на підлогу і, перекочуючи, збивати полум'я.

У всіх лабораторіях у доступному постійному місці має бути аптечка з набором необхідних матеріалів і медикаментів.

При теплових опіках роблять примочку з розчином 2 %-го KMnO_4 , а потім наносять мазь від опіків.

При хімічних опіках шкіри необхідно насамперед видалити речовину, що викликала опік, відповідним розчинником, а потім уражену ділянку обробити етиловим спиртом і змастити маззю від опіків.

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

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

При порізах склом у першу чергу необхідно пінцетом, попередньо промитим спиртом, видалити з рани видимі шматочки скла, рану промити дистильованою водою або протерти тампоном, змоченим в етиловому

спирті, а далі змастити 5 %-вим розчином йоду та забинтувати. Невеликі порізи можна заклеїти антисептичним пластиром.

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

При інгаляційних ураженнях потрібно негайно вийти на свіже повітря.