

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Agnieška Voitechovič

**Lantano junginių poveikis *Haematococcus pluvialis*
žaliadumbliams**

Magistro baigiamasis darbas

Mikrobiologijos studijų programa

Darbo vadovas

Lekt. Petras Venckus

Darbas atliktas

GMC Biomokslų instituto

Botanikos ir genetikos katedroje

Vilnius 2025

Turinys

Santrumpos.....	3
Įvadas	4
Darbo tikslas ir uždaviniai.....	6
1. Literatūros apžvalga	7
1.1. <i>Haematococcus pluvialis</i>	7
1.1.1. Organizmas ir jo gyvenamoji aplinka.....	7
1.1.2 Gyvenimo ciklas ir morfologija.....	9
1.2. Astaksantinas.....	10
1.2.1. Charakteristika.....	10
1.2.2. Šaltiniai.....	12
1.2.3. Poveikis ir panaudojimas.....	13
1.2.4. Reikšmė <i>H. pluvialis</i>	13
2. Medžiagos ir metodai	20
2.1. Medžiagos	20
2.2. Metodai.....	20
2.2.1. Pradinės kultūros ir augimo sąlygos (1 eksperimentų etapas).....	20
2.2.2 Pradinės kultūros ir augimo sąlygos (2 eksperimentų etapas).....	22
2.2.3 Dumblių sauso svorio matavimas.....	24
2.2.4. Dumblių ląstelių skaičiavimas šviesiniu mikroskopu	24
2.2.5. Astaksantino koncentracijos matavimas.....	25
3. Rezultatai.....	26
3.1.1. Biomės prieaugio bei astaksantino pokytis (1 eksperimento etapas).....	26
3.1.2. Biomės prieaugio pokytis (2 eksperimento etapas).....	29
3.2. Ląstelių koncentracija terpėje.....	33
3.3. Vidutinis ląstelės svoris.....	36
3.4. Astaksantino koncentracija biomasėje	38
4. Rezultatų aptarimas	42
5. Išvados.....	45
Autoriaus asmeninis indėlis.....	46
Padėka	47
Santrauka.....	49
Literatūros sąrašas	50

Santrumpos

BBM – Bold's Basal terpė

dH₂O – dejonizuotas vanduo

DMSO – dimetilsulfoksidas

HpR – *H. pluvialis* kultūra, laikyta jai nepalankiomis stresinėmis sąlygomis, įgavusi raudoną spalvą

HpŽ – *H. pluvialis* kultūra, laikyta jai palankiomis sąlygomis, įgavusi žalią spalvą

ROS (ang. *reactive oxygen species*) – reaktyvios deguonies formos

rpm (ang. *rotations per minute*) – apsisukimai per minutę

OT – optinis tankis

GMC – Gyvybės mokslų centras

VU – Vilniaus universitetas

Ivadas

Pastaraisiais metais didėja susidomėjimas retųjų žemių junginiais, tokiais kaip lantanidai. Lantanidai atlieka nemažai vaidmenų įvairiuose srityse – įskaitant chemiją, biologiją, mediciną bei pramonę (Oliveira et al., 2012). Lantano junginiai tapo būtini daugelyje šiuolaikinių technologijų dalimi (Revel et al., 2025), tačiau dėl padidėjusio šio junginių panaudojimo, taip pat padidėjo ir jų išmetimas į mus supančią biosferą. Lantanidai laikomi nepagrindiniais elementais, kurie gyvame organizme gali sukelti tiek teigiamas, tiek neigiamas fiziologines reakcijas (Goecke, Jerez, et al., 2015; Goecke, Zachleder, et al., 2015). Jie nėra būtini jokiame žinomame medžiagų apykaitos procesui (Goecke, Jerez, et al., 2015), tačiau tam tikromis sąlygomis gali turėti teigiamą poveikį. Skirtingai nuo sunkiųjų metalų, kurių toksiškumas plačiai ištirtas, lantanidų poveikiui, ypač jų poveikiui vandens aplinkai, susijusiam su lantanidų eksploatavimu, nebuvo iki šiol skiriama pakankamai dėmesio (Goecke, Zachleder, et al., 2015). Vandens užterštumas metalais yra pasaulinė problema, o metalų išgavimas iš nuotekų ir pramoninių atliekų yra svarbus ne tik ekologiniu požiūriu, bet ir dėl tvaraus šių medžiagų prieinamumo.

Lantanas (La), naudojamas vandens telkinių valymui ir apsaugai, daugiausia dėl jų gebėjimo veiksmingai surišti fosfatus (Rajendran et al., 2024). Lantano chloridas (LaCl_3) ir jo dariniai plačiai naudojami kaip medžiagos, mažinančios fosforo biologinį prieinamumą vandenyje (Xie et al., 2014) ir taip neutralizuojančios eutrofikaciją bei fitoplanktono, ypač cianobakterijų, žydėjimą. Nors šių junginių veiksmingumas mažinant per didelę planktono biomasės produkciją patvirtintas daugeliu tyrimų, jų poveikis kitiems vandens ekosistemų komponentams, ypač mikrodumbliams, vis dar nepakankamai ištirtas (Goecke, Zachleder, et al., 2015). Žalieji mikrodumbliai, tokie kaip *Chlorella*, *Scenedesmus* ir *Haematococcus pluvialis*, vaidina svarbų vaidmenį vandens telkinių trofinei būklei ir pasižymi dideliu jautrumu sunkiesiems metalams ir retųjų žemių elementams (Peng et al., 2019).

Lantano junginiai, ypač lantano chloridas (LaCl_3) ir jo hidratuotos formos, paprastai naudojami kaip fosfatus surišančios medžiagos vandens gelmėse ir dugno nuosėdose, veiksmingai mažinančios fosforo biologinį prieinamumą, taigi ir fitoplanktono, įskaitant vandens žydėjimą sukeliančias cianobakterijas, augimą (Kajjumba & Marti, 2022). Nors šių preparatų veiksmingumas mažinant fosforo kiekį yra gerai dokumentuotas, jų poveikis kitiems vandens ekosistemos komponentams, ypač mikrodumbliams, vis dar mažai suprantamas ir kelia susirūpinimą.

Žalieji mikrodumbliai - pagrindinė pirminės produkcijos grandis vandens ekosistemose - į retųjų žemių junginius reaguoja sudėtingomis fiziologinėmis ir biocheminėmis reakcijomis. Lantano junginiai gali slopinti ląstelių augimą ir sukelti oksidacinį stresą, taip pat paveikti medžiagų apykaitos

kelių, atsakingų už fotosintezės ir apsauginių pigmentų sintezę, raišką (Goecke et al., 2017). Tai ypač pastebimą stebint karotenoidus, tokius kaip astaksantinas, luteinas arba β - karotenas, kurie pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis. Literatūros duomenimis, tam tikros lantano koncentracijų sukeltas stresas gali stimuliuoti karotenoidų kaupimąsi, o didesnės koncentracijos gali turėti toksinį poveikį, dėl kurio sumažėja astaksantino biosintezė ir yra pažeidžiamos ląstelės (Goecke et al., 2017).

Atsižvelgiant į tai, kad vis dažniau lantano junginiai yra naudojami vandens eutrofikacijai kontroliuoti, jų poveikio pigmentų gamybai, dumblių augimui, lantano junginių poveikio tyrimai yra būtini. Šitie tyrimai leis geriau suprasti pusiausvyrą tarp cheminio eutrofikacijos mažinimo veiksmingumo ir retųjų žemių metalų pagrindu taikomų metodų biosaugumo, taip pat gali padėti kurti novatoriškas strategijas, padedančias tiek aplinkos apsaugai, tiek biotechnologinei didelės vertės antrinių metabolitų gamybai.

Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas: nustatyti lantano junginių poveikį skirtingų stadijų *Haematococcus pluvialis* dumblių kultūrų augimui ir astaksantino koncentracijai biomasėje.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti skirtingų koncentracijų lantano junginių terpėje poveikį žaliadumblių *H. pluvialis* kultūrų biomasės augimui;
2. Nustatyti skirtingų koncentracijų lantano chlorido heptahidrato terpėje poveikį skirtingų stadijų *H. pluvialis* žaliadumblių ląstelių skaičiui bei dydžiui;
3. Nustatyti skirtingų koncentracijų lantano junginių terpėje poveikį skirtingų stadijų *H. pluvialis* žaliadumblių kultūrų astaksantino sintezei.

1. Literatūros apžvalga

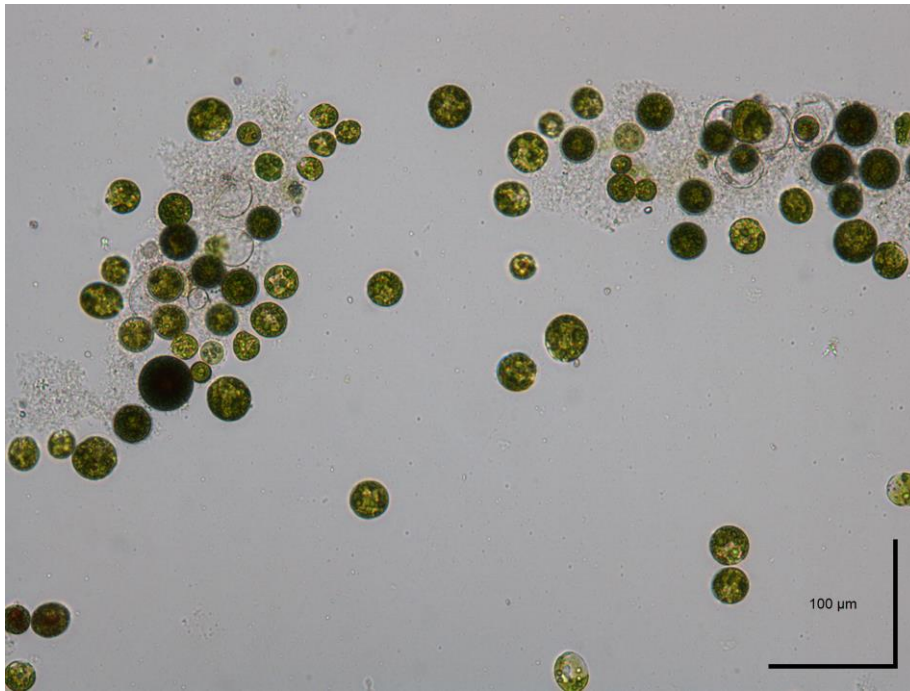
1.1. *Haematococcus pluvialis*

1.1.1. Organizmas ir jo gyvenamoji aplinka

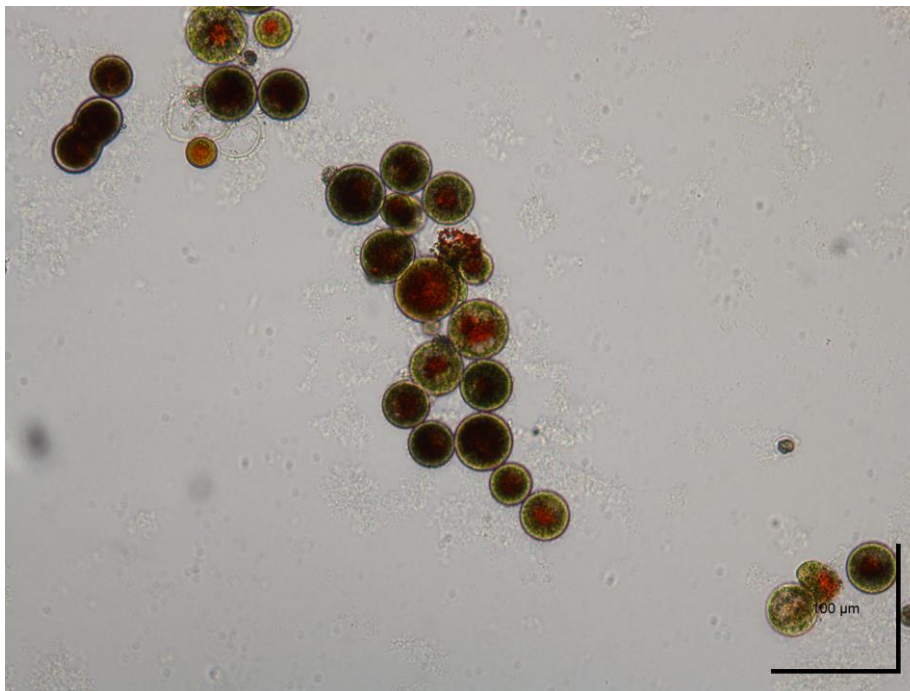
1 lentelė. *H. pluvialis* klasifikacija pagal www.algaebase.org.

Domenas	<i>Eukaryota</i> (Chatton, 1925)
Karalystė	<i>Plantae</i> (Haeckel, 1866)
Skyrius	<i>Chlorophyta</i> (Reichenbach, 1834)
Klasė	<i>Chlorophyceae</i> (Wille, 1884)
Eilė	<i>Chlamydomonadales</i> (Fritsch in West ir Fritsch, 1927)
Šeima	<i>Haematococcaceae</i> (G. M. Smith, 1950)
Gentis	<i>Haematococcus</i> (J. Von Flotow, 1844)
Rūšis	<i>Haematococcus pluvialis</i> (J. Von Flotow, 1844)

Haematococcus pluvialis – tai vienaląstis *Haematococcaceae* šeimos gėlavandenis žaliadumblis, kuris buvo aprašytas vokiečių botaniko Julius Von Flotow 1844 metais (1 lentelė). Kaip sinonimą literatūroje taip pat yra naudojamas *Haematococcus lacustris* pavadinimas. *H. pluvialis* pasižymi aiškiu dvifaziu gyvybiniu ciklu, kurį sudaro vegetatyvinė fazė (žalia – HpŽ, 1 pav.) ir ramybės fazė (raudona – HpR, 2 pav.). Vegetatyvinės fazės ląstelės yra kiaušiniškos arba elipsoidinės, su dviem vienodo ilgio lazdelėmis, chloroplastu su vienu ar keliais pirenoidais ir raudona stigma (akių dėme), leidžiančia fototaksi. Protoplastą nuo ląstelės sienelės skiria plonas citoplazmos sluoksnis, o ląstelės būna 8-50 µm dydžio (Evens et al., 2008). Reaguodamos į nepalankias aplinkos sąlygas, pavyzdžiui, intensyvią šviesą, maistinių medžiagų trūkumą ar sunkiųjų metalų buvimą, ląstelės virsta ramybės formomis (aplanosporomis), kurioms būdinga stora ląstelės sienelė ir intensyvi raudona spalva dėl astaksantino kaupimosi (Boussiba, 2000).



1 pav. Vegetacinės fazės *H. pluvialis* ląstelės (HpŽ).



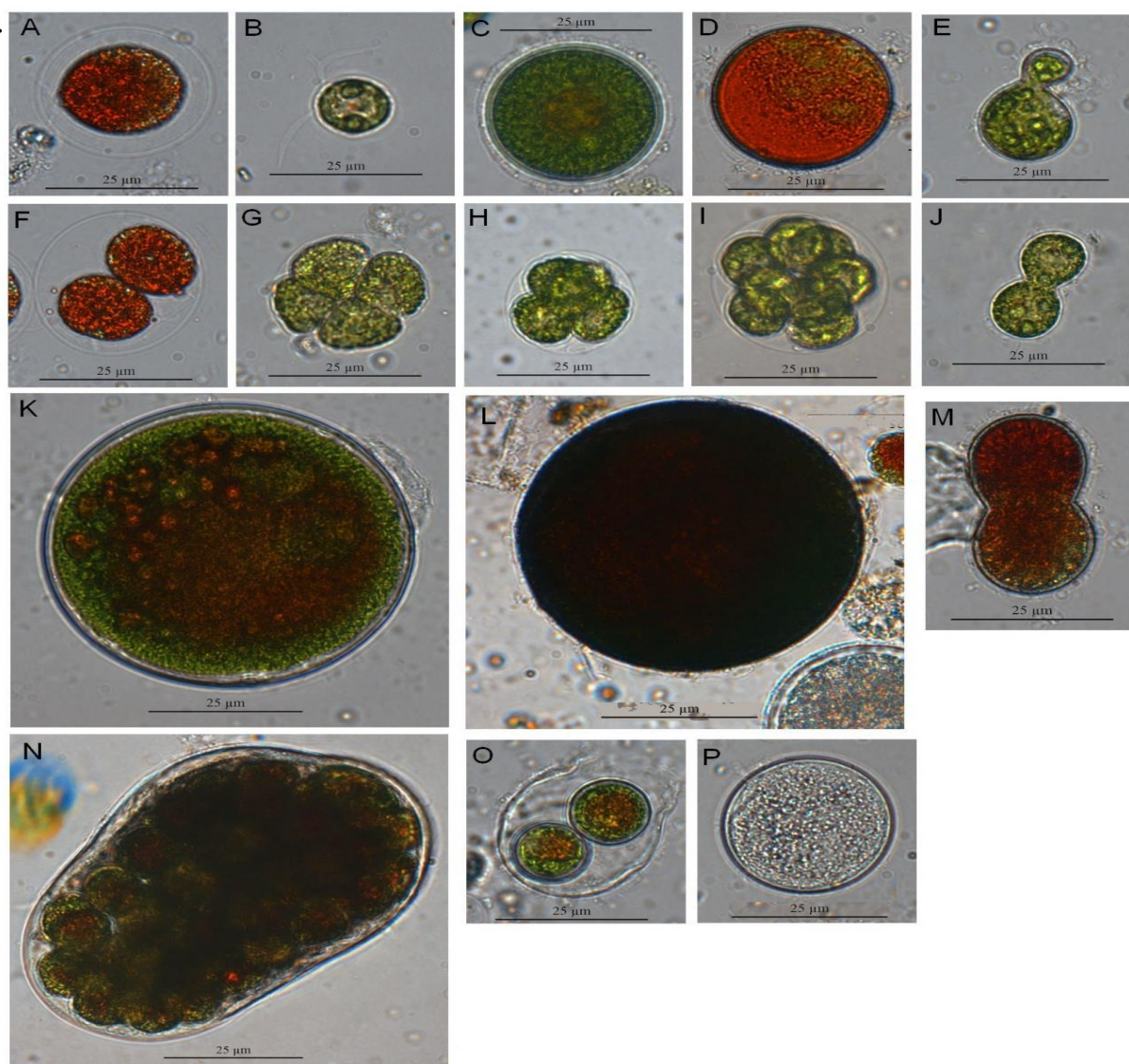
2 pav. Rėmybės fazės *H. pluvialis* ląstelės (HpR).

Šis žaliadumblis gali būti aptinkamas įvairiose buveinėse, tiek natūraliose, kaip lietaus balos, uolienų daubos, tiek dirbtinėse, kaip baseinai (Burchardt et al., 2006), stogo šlaitai (Kim et al., 2015). *H. pluvialis* yra aptinkamas esant įvairioms aplinkos sąlygoms: nuo arktinio klimato Svalbardo saloje prie $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Klochova et al., 2013), didelio druskingumo vandens telkiniuose (Chekanov et al., 2014).

Laboratorinėmis sąlygomis *H. pluvialis* paprastai kultivuojama dviem etapais: vegetatyvinis etapas, kai ląstelės auga optimaliomis sąlygomis (20-27 °C temperatūra, pH 7-8, balta šviesa (Gencer & Turan, 2025)), ir astaksantino indukcijos etapas, kai astaksantino gamybai paskatinti naudojami tokie stresoriai kaip intensyvi šviesa (iki 240 μmol fotonų $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Evens et al., 2008)), maistinių medžiagų (pvz., azoto) ribojimas arba padidintas druskingumas (Usai et al., 2022).

1.1.2 Gyvenimo ciklas ir morfologija

H. pluvialis dumbliai turi išskirtinai sudėtingą gyvenimo ciklą su morfologiškai besiskiriančiomis stadijomis, todėl nemažai autorių ciklą aprašo skirtingai (2 pav.). Zhang ir kt. (2017) bei Han ir kt. (2013) išskyrė 4 ląstelės fazes: makrozoidą (arba zoosporą), mikrozoidą, palmelę ir hematocistą (arba aplanosporą).



3 pav. *H. pluvialis* ląstelės skirtingose stadijose. A, B – judri ląstelė; C, D – nejudri ląstelė; E – pumpuravimas; F – dvi zoosporos sporangėje; G – keturios zoosporos sporangėje; H – šešios zoosporos sporangėje; I – aštuonios zoosporos sporangėje; J, M – mitotiškas skilimas pusiau; K – padidėjusi nejudri ląstelė su centre matomomis astaksantino sankaupomis lipidų lašeliuose; L – padidėjusi nejudri ląstelė, turinti daug astaksantino; N – gametocista; O – aplanosporų paleidimas iš sporangės; P – negyva ląstelė (Ieva Endriukaitytė, 2023).

Makrozoidai (3 pav. A, B), tai rutuliškos, elipsoidinės arba kriaušės formos vegetatyvinės ląstelės, kurios turi du žiūželius ir chloroplastą (Han et al., 2013). Kai sąlygos žaliadumblių augimui yra palankios ląstelės yra judrios ir tipiškai žalios spalvos dėl chlorofilo sankaupų, bet gali įgauti raudoną spalvą arba turėti tik dalinį paraudonavimą centrinėje ląstelės dalyje dėl susikaupusio lipidiniuose lašeliuose astaksantino. Zoosporos su žiūželiais yra greitai augančios vegetatyvinės ląstelės, kurios gali dalintis į dukterines ląsteles mitozės būdu (3 pav. J, M).

Kai aplinkos sąlygos tampa mažiau palankios, ląstelė pradeda sintezuoti daugiau karotenoido astaksantino ir įgauna raudoną spalvą. Makrozoidai praranda savo žiūželius ir tampa nejudriomis palmelėmis (3 pav. C, D) ir po to yra formuojamos aplanosporos – nejudrios aseksualios sporos, su storomis bei standžiomis ląstelių sienelėmis, kuriose kaupiasi didelis kiekis antrinių karotenoidų – tarp jų ir astaksantino (Han et al., 2013). Kai ląstelėms sudaromos optimalios augimo sąlygos, tai aplanosporą suformuoja zoosporas, kurios pradeda naują vegetatyvinę ląstelės ciklą (3 pav. F – I).

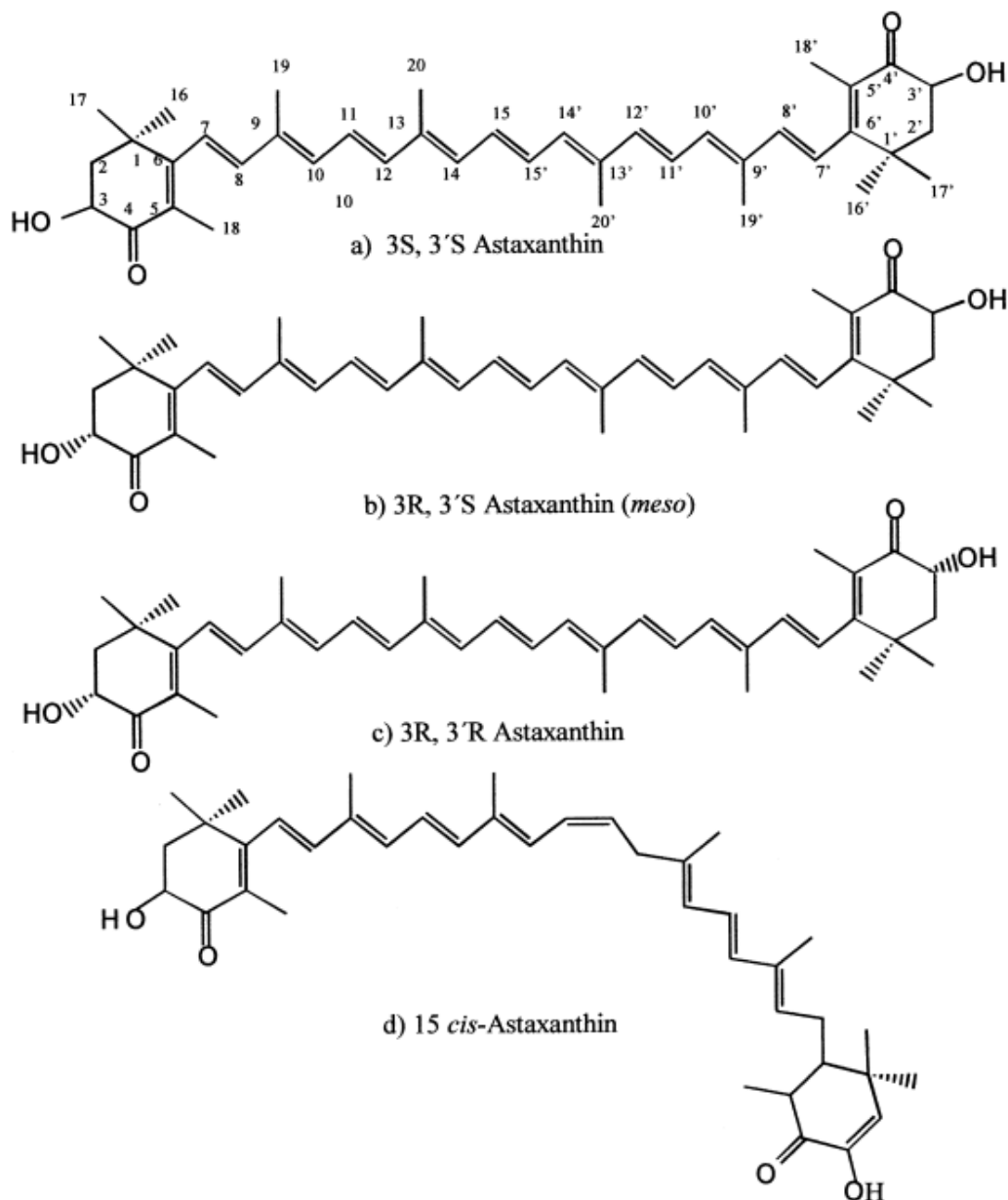
Lytinis dauginimasis yra pastebimas ganėtinai retai *H. pluvialis*, dažniausiai organizmas dauginasi vegetatyviniu būdu (Han et al., 2013). Lytinis dauginimasis gali vykti veikiant itin nepalankioms sąlygoms, kaip pavyzdžiui užšaldymas, išdžiovimas, maistinių medžiagų stoka, susidaro aplanosporos, kuriose, kai aplinka susidaro palanki, gali vykti gametogenezė (Gudin, C & Triki, A., 1997).

1.2.Astaksantinas

1.2.1. Charakteristika

Karotenoidai tai vieni labiausiai paplitusių natūralių pigmentų, jie yra būdingi daugelio taksonų organizmams (Vershinin, 1999). Karotenoidai yra tetraterpeniniai pigmentai, randami augaluose, dumbliuose, grybuose, gyvūnuose (kurie negali jų sintetinti, todėl gauna iš maisto), kai kuriose fotosintetinančiose bakterijose ir archėjose. Organizmuose jie atlieka vitaminų ir hormonų pirmtakų, antioksidantų, apsaugos nuo saulės spindulių ir spalvos funkcijas (Mularczyk et al., 2020).

Karotinoidai skirstomi į dvi klases: karotenus (pvz., β -karotiną, likopeną), kuriuos sudaro tik anglies ir vandenilio atomai, ir ksantofilus (pvz., zeaksantiną, liuteiną), kurių sudėtyje yra deguonies atomas (Vershinin, 1999). Tarp šitų karotenoidų yra ir astaksantinas (4 pav.) (Domínguez-Bocanegra et al., 2004).



4 pav. Astaksantino konfigūracijos izomerai (a-c) ir geometrinis *cis* izomeras (d) (Higuera-Ciapara et al., 2006).

1.2.2. Šaltiniai

Daugeliui organizmų astaksantinas yra vienu pagrindiniu ląstelių pigmentu. Krevetės, lašišos ir flamingai dėl astaksantino nusidažo raudonai, tačiau šie gyvūnai patys negamina astaksantino, jie jo gauna iš mikrodumblių, kuriais minta ir kurie yra pagrindiniai astaksantino gamintojai (Ambati et al., 2014). Pramoniniu mastu astaksantinas paprastai gaminamas sintetiniu būdu iš cheminių darinių, mikrobiologinės fermentacijos arba išgaunamas iš krabų ir krevečių (Debnath et al., 2024). Sintetinis astaksantinas yra identiškas gyvuose organizmuose susidaranti molekulėi ir susideda iš izomerų (3S, 3S), (3R, 3S) ir (3R, 3R) mišinio 1:2:1 santykiu (4 pav.). Tai pagrindinis karotenoidas, kuris yra naudojamas pramonėje. Tačiau didėjanti natūralių maisto produktų paklausa ir didelė sintetinių pigmentų kaina paskatino ieškoti natūralių astaksantino šaltinių, kuriuos būtų galima pramoniniu būdu panaudoti.

Ekonomiškai konkuruoti su sintetiniu astaksantinu gali tik keli mikrobiniai šaltiniai: žalieji mikrodumbliai *Haematococcus pluvialis* ir raudonosios mielės *Phaffia rhodozyma*. Jų gamybos metodai yra apžvelgiami keliuose tyrimuose ((Johnson & An, 1991), (Nelis & De Leenheer, 1991)).

Astaksantiną gamina daugelis mikrodumblių, tačiau gėlųjų vandenų žalieji dumbliai *H. pluvialis* yra dominuojanti rūšis, iš kurios astaksantinas gaminamas komerciniais tikslais. *H. pluvialis* turi nuo 1,5 % iki 3 % (3S,3'S) - astaksantino, skaičiuojant nuo sausos masės, daugiausia monoesterų pavidalu (Lorenz & Cysewski, 2000). Paprastai dumbliai auginami dviejų etapų kultūroje. Pirmasis etapas (vegetatyvinis arba žaliasis etapas - HpŽ) yra augimo etapas, kai tiekama pakankamai maistinių medžiagų, kontroliuojamas pH ir temperatūra bei yra ne itin didelis apšvietimas (Domínguez-Bocanegra et al., 2004). Antrajame etape, raudonojoje fazėje (HpR), ląstelės patiria stresą dėl didelio šviesos kiekio, maistinių medžiagų (daugiausia azoto ir fosfatų) trūkumo ir aukštos temperatūros ir (arba) druskų koncentracijos (Mota et al., 2022).

Aprašyta nemažai astaksantiną gaminančių bakterijų, daugiausia priklausančių *Paracoccus* genčiai ((Tsubokura et al., 1999), (Harker et al., 1998)). Daugelis augalų sintetina karotenoidus, tačiau kol kas astaksantiną natūraliai sintetina tik *Adonis* genties augalai, astaksantinas randamas šių augalų žiedlapiuose, kuriuose randama iki 1 % astaksantino biomasėje (Li et al., 2021).

1.2.3. Poveikis ir panaudojimas

Astaksantinas pasižymi antioksidaciniu poveikiu, anti – lipidų peroksidaciniu bei priešūždegiminiu aktyvumu, imunomoduliaciniu poveikiu (Ambati et al., 2014) dėl to dažniausiai yra naudojamas kaip maisto papildas žmonėms bei gyvūnams (Mularczyk et al., 2020). Taip pat pastebėta, kad astaksantinas gali sumažinti hiperglikemijos sukeltą oksidacinį stresą kasos β ląstelėse, taip pat pagerinti gliukozės ir serumo insulino kiekį (Uchiyama et al., 2002).

Astaksantinas gali apsaugoti kasos β ląsteles nuo gliukozės toksiškumo. Taip pat pranešama, kad šis antioksidantas yra gera imunologinė priemonė atkuriant su cukriniu diabetu sergančių žiurkių limfocitų disfunkcijas (Otton et al., 2010). Astaksantino antioksidacinės savybės gali sumažinti oksidacinį stresą, kuris yra susijęs su kardiovaskuliarinėmis ligomis, kas reiškia, kad šis junginys gali būti potencialiai naudojamas terapijai prieš aterosklerozinę širdies ir kraujagyslių ligą (Fassett & Coombes, 2011).

1.2.4. Reikšmė *H. pluvialis*

H. pluvialis žaliadumbliai, kaip ir kiti fotosintetinantys organizmai, chloroplastuose kaupia ROS, pagamintus fotosintezės metu. Paprastai šie radikalai yra neutralizuojami superoksido dismutazės, katalazės bei peroksidazės. Aplinkos sąlygoms pasikeitus į nepalankias, pavyzdžiui, padidėjus šviesos kiekiui, druskingumui, sunkiųjų metalų kiekiui ir pan., pusiausvyra tarp ROS gamybos ir neutralizavimo sutrinka, todėl atsiranda oksidacinis stresas. *H. pluvialis* dumbliuose tokiam stresui užsitęsęs pradedamas kaupti astaksantinas, kuris veikia kaip ilgalaikė apsaugos priemonė (Jannel ir kt., 2020).

Astaksantinas apsaugo *H. pluvialis* ląsteles nuo stresinių sąlygų trimis būdais. Pirma, karotenoidas tiesiogiai veikia kaip apsauga nuo saulės, iš esmės sustabdydamas žalingiausią mėlynąją šviesą. Pastebėta, kad astaksantinas pradedamas sintetinti centrinėje ląstelės dalyje, o didėjant šviesos kiekiui lipidų lašeliai persikelia į ląstelės periferiją, taip apsaugodami chloroplastus nuo fotooksidacinės žalos. Taip pat pastebėta, kad naktį lipidų lašeliai perkeliama atgal į ląstelės centrą (Jannel et al., 2020). Antroji funkcija - deguonies atomų suvartojimas fotosintezės metu. Tai vyksta karotinogenezės metu, nes deguonies atomai reikalingi astaksantinui susidaryti. Be to, deguonis, kurį išskiria terminalinė plastidinė oksidazė, gali būti paverčiamas į vandens molekulę naudojant elektronus, susidarančius karotinogenezės desaturazės etapuose. Manoma, kad astaksantinas sintetinamas ląstelėje sunaudojant šiuos atomus ir yra galutinis produktas, o ne sintetinamas specialiai

gynybos tikslais. Galiausiai, kaip ir kituose organizmuose, karotinoidas atlieka antioksidanto funkciją visoje ląstelėje, naikindamas laisvuosius radikalus ir saugodamas nuo oksidacinio streso (Han et al., 2013).

Superoksido dismutazės, katalazės ir peroksidazės genų raiška padidėja esant oksidaciniam stresui, stipriam apšvietimui ir/arba maistinių medžiagų trūkumui, tačiau jų raiška yra įprastai greitai slopinama (Kobayashi et al., 1997). Tai rodo, kad gynybos sistema per antioksidacinius fermentus yra pirminis atsakas į oksidacinį stresą, o ilgalaikis oksidacinis stresas sukelia ilgalaikę gynybą per astaksantino sintezę (Han et al., 2013).

1.3. Lantanidai ir lantano junginiai

1.3.1. Lantanidų charakteristika

Lantanidai atlieka svarbų vaidmenį biologijos, medicinos ir chemijos srityse (Oliveira et al., 2012). Nors šiuolaikinės technologijos nemažai priklauso nuo šių elementų, jų prieinamumas biosferoje yra ganetinais ribotas. Dėl padidėjusio lantanidų poreikio šie elementai patenka į biosferą, o tai gali sukelti nemažai iššūkių aplinkai, todėl svarbu atsižvelgti į padidėjusio lantanidų kiekio poveikį aplinkai ir jį spręsti. Dumblių giminingumas šiems elementams gali kelti rimtą grėsmę aplinkai arba tapti unikalia galimybe užterštoms teritorijoms valyti.

Lantanidai nedalyvauja jokiose medžiagų apykaitos procesuose, todėl yra laikomi nepagrindiniais ir gali turėti tiek teigiamą, tiek neigiamą poveikį biologinei gyvybei (Goecke, Jerez, et al., 2015). Sudėtingame vandens ekosistemų pasaulyje yra akivaizdus tyrimų trūkumas, ypač kalbant apie lantanidų trikdymą vandens aplinkoje (Herrmann et al., 2016). Skirtingai nuo toksiškų sunkiųjų metalų, kurių grėsmė yra įrodyta ir plačiai ištirta, lantanidų tyrimuose vis dar yra spragų (Liang et al., 2014). Tarp įvairių ekologinių iššūkių, metalų išgavimas iš pramoninių ir nuotekų vandenų yra pagrindinė problema, siekiant išteklių ir aplinkos tvarumo, todėl tai tampa globali problema.

1.3.2. Lantanidai dumbliuose

Nepriklausomai nuo to, ar jie yra mikrodumbliai, ar makrodumbliai, dumblių tipas (*Chlorophyta*, *Rhodophyta*, *Charophyta*), ar net cianobakterijos (Hou & Yan, 1998) - visose dumblių rūšyse yra randama lantanidų. Tyrimai rodo, kad lantanidų koncentracija jūros dumbliuose gali būti 10-20 kartų didesnė nei sausumos augaluose (Hou & Yan, 1998). Laboratorinėmis

sąlygomis bendras lantanidų kiekis gali svyruoti nuo 1 iki 1,3 $\mu\text{g/g}$ dumblių biomasės ir yra gana lengvai pasiekiamas, o natūraliomis sąlygomis (gėlas ar jūros vanduo) bendras lantanidų kiekis yra nuo 10⁻³ iki 10⁻¹ $\mu\text{g/g}$ dumblių biomasės (Liang et al., 2014).

Darbu, kuriuose nagrinėjami lantanidų koncentracijos skirtumai skirtinguose kartu gyvenančiuose organizmuose, tarp kurių yra ir dumblių, yra ganetinais nedaug. Šiuose tyrimuose pabrėžiama organizmų visumos svarba ir išskiriamos koegzistuojančios organizmų grupės. Toks didelis konkrečioje teritorijoje gyvenančių organizmų skaičius gali lemti lantanidų koncentraciją dėl:

- (i) vandens sudedamųjų dalių;
- (ii) biologinių ir cheminių procesų, būdingų tik kiekvienai dumblių rūšiai, ląstelių sienelių komponentų, fermentų, baltymų ir t. t.;
- (iii) kvalifikacinių veiksnių, tokių kaip temperatūra, šviesa, pH ir azotas tam tikrose teritorijose du ankstesni veiksniai (Jayasekera & Rossbach, 1996).

Pagal Schacht et al. (Schacht et al., 2010), klimato pokyčiai, požeminio vandens judėjimas ir vulkaninė veikla didina gamtoje aptinkamų lantanidų koncentraciją, o kai kurios kitos žmogaus veiklos rūšys, pavyzdžiui, fosforo mineralinių trąšų naudojimas, pramoninės nuotekos ir kasyba, taip pat didina jų koncentraciją (Liang et al., 2014). Dėl gebėjimo kaupti šiuos elementus savo ląstelėse dumbliai gali būti naudojami kaip bioindikatoriai.

1.3.3. Lantanidų privalumai

Lantanidų jonų spinduliai ir koordinaciniai skaičiai yra panašūs į tokių elementų kaip Ca, Mn, Mg, Fe ar Zn, o tai rodo, kad jie potencialiai gali turėti biologinį poveikį gyvoms ląstelėms. Kita jų savybė - gebėjimas jungtis su organinėmis molekulėmis ir sudaryti stabilius kompleksus (Valcheva-Traykova et al., 2014).

Lantanidai jau daugelį metų naudojami kaip žemės ūkio trąšos, ypač Kinijoje, tačiau mažai žinoma, kaip konkrečiai jie veikia augalus ir dumblius. Buvo nustatyta, kad lantanidai teigiamai veikia naminių gyvūnų ir pasėlių augimą (Hu et al., 2004). Buvo pašalintas metalų trūkumas, padidintas maisto medžiagų pasisavinimas, perdavimas ir medžiagų apykaita, pastebėtas fermentinio aktyvumo sukeltas medžiagų apykaitos padidėjimas. Taip pat nustatyta, kad lantanidai turi įtakos fotosintezai arba atsparumui tokiems stresiniams veiksniams kaip rūgštūs lietūs, sausra ir/arba pavojingi metalai (L. Wang et al., 2014). Tačiau lantanidų veikimo mechanizmai augaluose ar dumbliuose vis dar nežinomi.

Ln^{2+} ir Ca^{2+} jonai yra labai panašūs cheminiu požiūriu, vienas iš lantanidų privalumų yra jų gebėjimas sumažinti kalcio trūkumą. Dėl šių panašumų ir dėl to, kad lantanidų valentingumas yra didesnis nei kalcio, Ln jonai gali lengvai pakeisti Ca^{2+} ir su didesniu afinitetu prisijungti prie daugelio receptorių. Priklausomai nuo pakeisto metalo poveikio, tai gali turėti skirtingą poveikį medžiagų apykaitai.

Dauguma tyrimų, susijusių su dumbliais ir lantanidais, buvo sutelkti į dumblių augimo savybes, nebandant nustatyti mechanizmo ar mechanizmų, kuriais grindžiamas teigiamas poveikis. Todėl neaišku, ar teigiamą lantanidų poveikį lemia jų gebėjimas neutralizuoti slopinamąjį sunkiųjų metalų poveikį, jų dalyvavimas tam tikrose fiziologinėse reakcijose, pavyzdžiui, laisvųjų deguonies radikalų šalinime (Valcheva-Traykova et al., 2014), ar maistinių medžiagų trūkumo mažinimas, kaip pastebėta augaluose (Goecke, Jerez, et al., 2015).

1.3.4. Lantanidų toksiškumas

Pagal Hodžo-Sternerio klasifikavimo sistemą lantanidai pasižymi nedideliu toksiškumu, nors jis priklauso nuo jų cheminės formos ir apdorojimo, tačiau lantanidų perteklius dirvožemyje ir vandenyje gali būti kenksmingas žmonėms ir gyvūnams (Abramczuk, 1985). Ce, La ir Gd poveikis sveikatai yra labiausiai ištirtas; kitų poveikis sveikatai vis dar nežinomas (Pagano et al., 2016). Daugelyje ataskaitų išsamiai aprašytas lantanidų toksiškumas įvairiems organizmams (X. Wang et al., 2003), tačiau trūksta aiškumo dėl didžiausių leistinų koncentracijų, slenksčių ir toksiškumo lygių.

Įrodyta, kad lantanidai toksiškai veikia įvairius mikroorganizmus, tačiau nepakanka duomenų, kad būtų galima daryti išvadas, kaip jie apskritai veikia dumblius. Ištirtas tik nedidelis skaičius būrių, įskaitant *Chlorophyta* (Jin et al., 2009) ir *Cyanobacteria* (Y. Wang et al., 2012). Tačiau daugumoje kitų dumblių tyrimų apie lantanidų biologinį prieinamumą rasta mažai informacijos arba jos iš viso nerasta. Taigi ryšys tarp lantanidų koncentracijos ir stimuliuojančio ar slopinančio poveikio toms pačioms dumblių rūšims yra nevienodas.

Dabartiniuose lantanidų toksiškumo dumbliams tyrimuose daugiausia dėmesio skiriama maistinių medžiagų išeikvojimui, o ne pačiam junginių toksiškumui. Remiantis šiais tyrimais, lantanidai gali absorbuoti tam tikras gyvybiškai svarbias maistines medžiagas, pavyzdžiui, fosfatus, o tai gali turėti įtakos augimui (mirtis dėl maistinių medžiagų stokos) (Kajjumba & Marti, 2022).

Kadangi dumbliai yra pirminiai gamintojai, numatomas lantanidų judėjimas maisto grandine. Todėl būtina atkreipti dėmesį į lantanidų toksiškumą dumbliams, nes bet koks žalingas poveikis gali išplisti į aukštesnių trofinių lygių organizmus.

1.3.5. Biologinis lantanidų panaudojimas

Lantanidai naudojami biologinėse sistemose kaip trąšos, vandens žydėjimo naikintojai, augimo stimulatoriai ir aptikimo priemonės (bioindikatoriai, žymekliai). Įvairiems gyvūnams, įskaitant kiaules ir kitus naminius gyvulius, lantanidus siūloma naudoti kaip augimo stimulatorius (He & Rambeck, 2000). Dumbliai, kuriuose yra daug lantanidų, gali būti funkcinių maisto produktų ar maisto papildų pakaitalas. Tačiau lantanidais praturtintos dumblių biomasės, kaip augimo stimulatoriaus, veiksmingumas įrodytas tik viename tyrime (Aladaileh et al., 2020). Todėl būtų labai svarbu atlikti daugiau tyrimų, kad būtų surinkta tinkama informacija apie lantanidų perdavimo pasekmes ir įvertinta poveikio žmonėms per gyvūninės kilmės maistą galimybė.

Daugybė mikroorganizmų, pavyzdžiui, melsvabakterės (tokios kaip *Microcystis* ar *Alexandrium spp.*), gali sukelti vandens žydėjimą, kuris turi žalingą poveikį aplinkai, žmonių sveikatai ir ekonomikai. Vandens žydėjimo metu susidaro žmonėms ir gyvūnams kenksmingi toksinai, pavyzdžiui, saksitoksinais ir mikrocistinais (Lürling & Van Oosterhout, 2013). Tyrimas su *Microcystis aeruginosa* parodė, kad lantanidai turi įtakos mikrocistinų kiekiui ir gali pakeisti dumblių fiziologiją, o fosforo kiekis, lantanidai ir cianobakterijų augimo požymiai buvo glaudžiai susiję (Shen et al., 2018).

Kuriant naujus, jautrius aptikimo metodus buvo įsigyti ir išbandyti aktyvūs lantanidų chelatai. Jie naudojami kaip itin jautrūs fluorescenciniai zondai arba fono slopinimui jautriuose imunofermentiniuose tyrimuose, kaip pavyzdžiui cianotoksino mikrocistino (Santos et al., 2013).

1.3.6. Lantanidų atliekų valymas ir jų regeneravimas

Kinija ir kitos šalys, turinčios gausių lantanidų išteklių, naudoja šiuos elementus kaip trąšas žemės ūkio produkcijai didinti. Kartu su augančiu vartojimu smarkiai ir sparčiai daugėja atliekų, kuriuose yra įvairios koncentracijos įvairių lantanidų. Žemės ūkio gamybos ekosistemose randami lantanidai gali patekti į gruntinius vandenius ir iš jų patekti į upes, ežerus ar vandenyną. Nors buvo

atlikta keletas tyrimų apie lantanidų bioakumuliacijos ekologinį poveikį ir galimus pavojus, tačiau jie yra per trumpi, kad būtų galima daryti platesnes išvadas.

Be to, nenustatyta jokių taikytinų taisyklių ar gairių, susijusių su ribinėmis vertėmis ir dozėmis dėl lantanidų kiekio aplinkoje (L. Wang et al., 2014). Lantanidai yra laikomi naujai atsirandančiais teršalais, todėl būtina nustatyti lantanidų emisijos ir koncentracijos aplinkoje ribines vertes (Pagano et al., 2016). Todėl šių lantanidų teršalų pašalinimas yra labai svarbus, siekiant sumažinti didėjančią aplinkos taršą vandens aplinkai.

1.3.7. Cheminis perdirbimas

Lantanidai gali būti perdirbami iš atliekų chemiškai atskiriant juos iš tirpalų (pvz., chemiškai nusodinant, atskiriant elektrocheminiu būdu, atskiriant membranomis, atvirkštiniu osmosu ir t. t.) (Barmettler et al., 2016). Šie metodai yra palyginti brangūs, be to, juos taikant dažnai susidaro kitų formų neorganinių atliekų.

Tokie metodai, kaip pirometalurgija ir hidrometalurgija, skirti lantanidams išgauti iš rūdų, gali padaryti didelę žalą aplinkai, be to, yra brangūs (Binnemans et al., 2013). Kiti rimti trūkumai būtų priklausomybė nuo vieno ir potencialiai riboto šaltinio, naudojant kitus išekvotus gamtinius išteklius. Be to, šie tradiciniai fizikiniai-cheminiai procesai yra brangūs ir net neveiksmingi valant mažesnės koncentracijos metalų jonus, esančius nuotekose (Binnemans et al., 2013). Papildoma tradicinių metodų problema yra didelis užteršto vandens kiekis, aukšta temperatūra ir didelės cheminių medžiagų sąnaudos (Ponou et al., 2014). Todėl mokslininkai daugiausia dėmesio skiria pigesnių būdų ir kartu aplinkai nekenksmingų technologijų paieškoms.

1.3.8. Biosorbcija

Biosorbcija, tai biotechnologinis metodas, yra potencialiai veiksmingesnis ir pigesnis lantanidų perdirbimo variantas, palyginus su įprastais cheminiais metodais. Daug įvairių gyvūninės ar augalinės kilmės organinių liekanų, tokių kaip aktyvinta anglis ar įvairių organizmų (dumблиų, grybų ir bakterijų) biomasė, pasižymi gebėjimu adsorbuoti įvairius lantanidus, todėl šios medžiagos gali būti tiriamos kaip potencialūs biosorbentai (Anastopoulou et al., 2016). Nustatyta, kad naudojant aerobinę, genetiškai modifikuotą *Caulobacter crescentus* bakteriją galima taikyti konkretų biologiškai tinkamą lantanidų regeneravimo naudojant biosorbentų medžiagas metodą (Park et al., 2016). Buvo įvertinti įvairūs kiti biosorbentai, įskaitant dumблиus, bakterijas, grybus ir mieles (Das & Das, 2013). Nustatyta, kad kai kurie vienaląsčiai dumблиai, įskaitant *Chlorella spp.* ir

Nannochloropsis spp., taip pat cianobakterijos *Microcystis spp.* yra aktyvūs lantanidų (La^{3+} ir Ce^{3+}) biosorbentai (Richards & Mullins, 2013).

1.3.9. Lantanidų kaupimasis gyvoje ląstelėje

Biologinis lantanidų perdirbimas naudojant gyvas ląsteles yra sprendimas, turintis pranašumų, palyginti su cheminiais ir adsorbcijos metodais. Lantanidų surinkimas iš aplinkos yra pigus, be to, nesusidaro daug antrinių atliekų. Šis metodas teikia papildomų privalumų, nes juo galima perdirbti labai mažos koncentracijos lantanidus vandeniniame tirpale, kai tai sunkiau padaryti cheminiais ir adsorbcijos metodais, ir perdirbti lantanidus iš kitų atliekų srautų, kurių koncentracija yra daug mažesnė, nei paprastai yra tvari taikant kitus metodus.

Vienaląsčiai raudonieji dumbliai *Galdieria sulphuraria* gali autotrofiniu arba heterotrofiniu būdu įsisavinti anglį, kurią sudaro įvairūs cukrai ir (arba) polioliai, ir išgyventi esant maždaug 1,5 pH ir 56 °C temperatūrai (Oesterhelt et al., 2007). Buvo pranešta, kad *G. sulphuraria* efektyvumas yra didesnis nei 90 % vandeninių tirpalų, kuriuose yra Nd^{3+} , Dy^{3+} ir La^{3+} mišinio, esant maždaug 2,5 pH ir 0,5 ppm pradinei lantanidų koncentracijai (Minoda et al., 2015). Esant pH 1,5-2,5, efektyvumas nepakito.

Pagal Jacinto et al. tyrimą, parodančio jūros dumblius, kuriame *Gracilaria gracilis* sugebėjo pašalinti mažos koncentracijos (0,5 mg/l) lantanidus > 70 % išeiga. Taigi *G. gracilis* turi galimybių pašalinti lantanidus (Y, Ce, Nd, Eu ir La) iš mažos koncentracijos nuotekų, o tai potencialiai gali padėti įveikti iki šiol didžiausią šių elementų perdirbimo iššūkį – proceso pajėgumą (Jacinto et al., 2018). Todėl gyvų dumblių naudojimas lantanidams kaupti yra daug žadanti alternatyva šių elementų perdirbimo iš nuotekų technologija.

Dumbliai yra ekologiškai svarbūs organizmai, esantys pačioje mitybos grandinės apačioje. Bet kokia neigiama ar teigiama dumblių sąveika su metalais persiduoda kitiems organizmams. Atsižvelgiant į tai, kad dumbliai gali pasisavinti lantanidus, tai gali paveikti juos supančią aplinką, o tai gali kelti grėsmę ir suteikti galimybių tolesniems tyrimams ir panaudojimui. Dėl susipynusių gebėjimų bioakumuliuotis ir galimo teigiamo ar toksiško lantanidų poveikio gali būti sunku tiksliai numatyti ekologines grėsmes. Dumbliai su lantanidais arba be jų gali būti įvairiai naudojami, įskaitant bioindikatorius, trąšas, toksinų detektorius, fitoremediacijos ir perdirbimo priemones. Todėl svarbu suprasti dumblių organizmų ir lantanidų junginių ryšius. Kai turėsime gerų žinių apie molekulinis mechanizmus, kuriais šie junginiai veikia, pagerės jų panaudojimo galimybės.

2. Medžiagos ir metodai

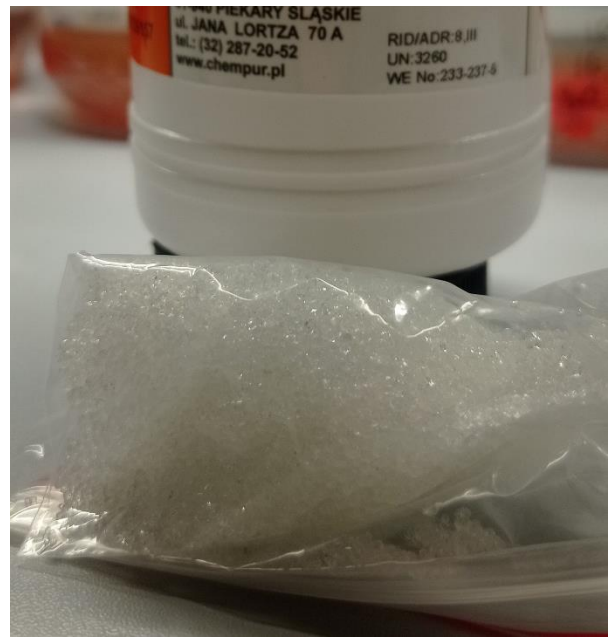
2.1. Medžiagos

Lantano junginiai

Tyrimui buvo panaudoti du lantano junginiai – lantano nitratas – LaNO_3 , bei lantano chlorido heptahidratas – $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$.

Lantano(III) nitratas sudaro bespalvius (baltus) kristalus, kurie išsisklaido ore. Jis gerai tirpsta vandenyje, silpnai hidrolizuojamas katijonų. Tirpsta etanolyje, etilendiamine. Sudaro kristalinį hidratą, kurio cheminė formulė - $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Lantano (III) chloridas yra dvimatis neorganinis junginys, lantano metalo ir druskos rūgšties druska, kurio formulė LaCl_3 . Tai - bespalviai kristalai, kurie tirpsta vandenyje, sudaro kristalinį hidratą. Jis priklauso cheminių junginių lantanidų trichloridų grupei, kurių formulė yra LnCl_3 , kur Ln reiškia metalo lantanidą.



6 pav. Tyrimė naudoti lantano nitrato milteliai (iš kairės) bei lantano chlorido heptahidrato kristalai (iš dešinės).

2.2. Metodai

2.2.1. Pradinės kultūros ir augimo sąlygos (1 eksperimentų etapas)

Bandymams naudoti *Haematococcus pluvialis* žaliadumbliai.

Paruoštos ir bandymams naudojamos dvi skirtingų stadijų kultūros:

- HpŽ – kultūra, laikyta jai palankiomis sąlygomis, įgavusi žalią spalvą.
- HpR – kultūra, laikyta jai nepalankiomis stresinėmis sąlygomis, įgavusi raudoną spalvą.

H. pluvialis HpŽ kultūra auginama jai palankiomis augimo sąlygomis. Naudojama autoklavuota BB terpė. Kultūra auginama 500 ml talpos Erlenmejerio kolbose po 50 ml BB terpės, užkimšta vatos kamščiu. Laikoma 21 °C temperatūroje, $(14,43 \pm 0,8) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ apšvietime naudojant baltos šviesos LED (16 W 3500 K) lempas.

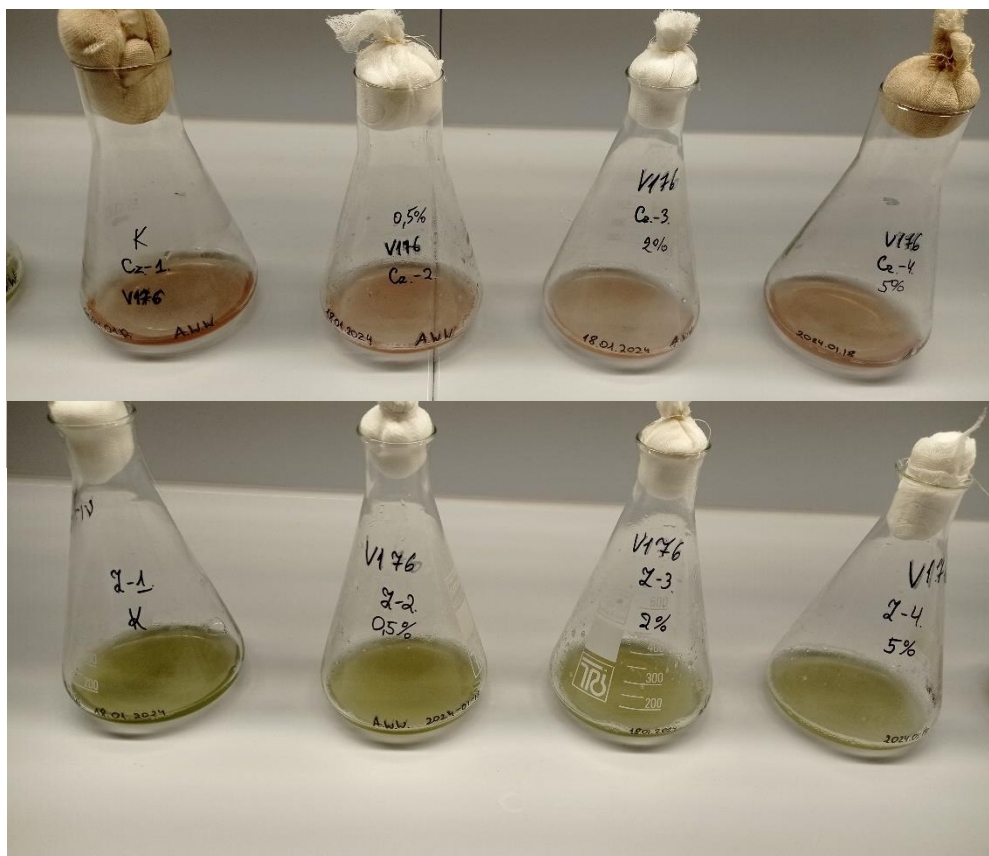
H. pluvialis HpR kultūra auginama jai nepalankiomis augimo sąlygomis. Naudojama autoklavuota BB terpė (modifikuota be azoto). Kultūra auginama 500 ml talpos Erlenmejerio kolbose po 50 ml BB terpės, užkimšta vatos kamščiu. Laikoma 21 °C temperatūroje, $(14,43 \pm 0,8) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ apšvietime naudojant baltos šviesos LED (16 W 3500 K) lempas.

Eksperimento pradžioje nustatomas pradinės kultūros sausas svoris. Atsižvelgiant į pradinės kultūros koncentraciją ji yra skiedžiama autoklavuota BB terpe iki 0,5 g/L biomasės koncentracijos. Praskiesta kultūra su BB terpe išpilstoma po 50 mL į aštuonias 500 mL talpos Erlenmejerio kolbas. Kultūros koncentracija – 0,5 g/L. Auginant HpŽ kultūrą naudojama BB terpė; HpR kultūrą naudojama BB terpė be azoto. Likusi kultūra auginama tolimesniems eksperimentams naudojant standartinę BB terpę. Tyrimo metu buvo naudojamos skirtingos lantano nitrato bei natrio nitrato koncentracijos (mol/L) BB terpėje, tam kad nustatyti skirtingų koncentracijų poveikį *Haematococcus pluvialis* žaliadumbliams:

2 lentelė. Lantano nitrato koncentracija eksperimentinėje terpėje 1 tyrimo etapo metu.

Eksperimento numeris	Lantano nitrato koncentracija (mol/L)			
	0	0,5	2	5
1	0	0,5	2	5
2	0	0,1	0,3	0,5
3	0	0,01	0,05	0,1
4	0	0,01	0,05	0,1

Pirmo bei antro eksperimento metu mėginiai buvo laikomi savaitę, trečio bei ketvirto – mėnesį.



7 pav. HpR kultūra (viršuje) bei HpŽ kultūra (apačioje), 1 eksperimento pradžioje.

2.2.2 Pradinės kultūros ir augimo sąlygos (2 eksperimentų etapas)

H. pluvialis HpŽ kultūra auginama jai palankiomis augimo sąlygomis. Naudojama autoklavuota BB terpė. Kultūra auginama 1000 mL talpos bioreaktoriuose po 500 mL BB terpės, prijungti prie oro vamzdžio. Laikoma 21 °C temperatūroje, $(14,43 \pm 0,8) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ apšvietime naudojant baltos šviesos LED (16 W 3500 K) lempas.

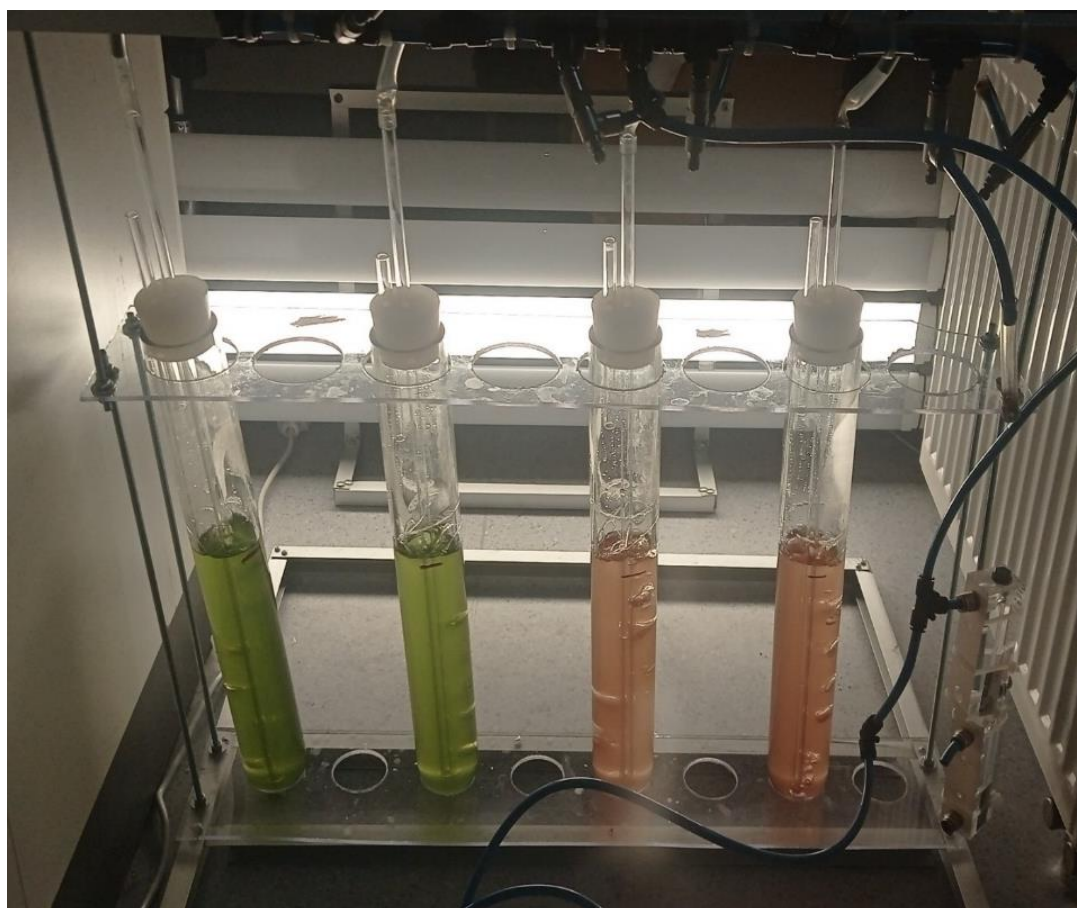
H. pluvialis HpR kultūra auginama jai nepalankiomis augimo sąlygomis. Naudojama autoklavuota BB terpė (modifikuota be azoto). Kultūra auginama 500 ml talpos Erlenmejerio kolbose po 50 ml BB terpės, užkimšta vatos kamščiu. Laikoma 21 °C temperatūroje, $(14,43 \pm 0,8) \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ apšvietime naudojant baltos šviesos LED (16 W 3500 K) lempas.

Eksperimento pradžioje nustatomas pradinės kultūros sausas svoris. Atsižvelgiant į pradinės kultūros koncentraciją ji yra skiedžiama autoklavuota BB terpe iki 0,5 g/L biomasės koncentracijos. Praskiesta kultūra su BB terpe išpilstoma po 500 mL į aštuonias 1000 mL talpos bioreaktorius. Kultūros koncentracija – 0,5 g/L. Auginant HpŽ kultūrą naudojama BB terpė; HpR kultūrą naudojama BB terpė be azoto. Likusi kultūra auginama tolimesniems eksperimentams naudojant standartinę BB terpę. Tyrimo metu buvo naudojamos skirtingos lantano chlorido bei natrio chlorido

koncentracijos (mol/L) BB terpėje, tam kad nustatyti skirtingų koncentracijų poveikį *Haematococcus pluvialis* žaliadumbliams :

3 lentelė. Lantano nitrato koncentracija eksperimentinėje terpėje 2 tyrimo etapo metu.

Eksperimento numeris	Junginio koncentracija					
	0	0,0013	0,0027	0,0054	0,0081	0,0135
1 (HpR NaCL)	0	0,0013	0,0027	0,0054	0,0081	0,0135
2 (HpŽ NaCL)	0	0,0013	0,0027	0,0054	0,0081	0,0135
3 (HpR LaCl ₃ * 7H ₂ O)	0	0,0013	0,0027	0,0054	0,0081	0,0135
4 (HpŽ LaCl ₃ * 7H ₂ O)	0	0,0013	0,0027	0,0054	0,0081	0,0135



8 pav. Tyrimui naudotas bioreaktorius su HpŽ ir HpR kultūromis.

2.2.3 Dumblių sauso svorio matavimas

Imamas žinomas tūris *H. pluvialis* kultūros, centrifuguojama 7000 rpm 10 min, supernatantas nupilamas, resuspenduojama 15 mL dejonizuotu vandeniu. Centrifuguojama 7000 rpm 5 min, supernatantas nupilamas. Likusi biomasė surenkama pipete, supilama į pasvertas plastikines lėkšteles. Džiovinama džiovinimo spintoje 5 valandas 70 °C temperatūroje. Tuomet lėkštelės vėl sveriamos ir pagal 1 formulę apskaičiuojamas dumblių sausas svoris ir koncentracija mėginyje.

$$DK = \frac{(LS-LB) \times 1000 \text{ mL}}{V} \quad (1 \text{ formulė})$$

DK – dumblių koncentracija, g/L;

LS – lėkštelės su išdžiovintais dumbliais svoris, g;

LB – lėkštelės be dumblių svoris, g;

V – mėginio tūris, mL.

2.2.4. Dumblių ląstelių skaičiavimas šviesiniu mikroskopu

H. pluvialis dumbliai stebimi ir skaičiuojamos jų morfologiškai skirtingos ląstelės šviesiniu mikroskopu prieš užsėjant tyrimui ir po tyrimo analizuojant rezultatus. Stebima „Olympus BX51“ šviesiniu mikroskopu, daromos nuotraukos naudojant „QImaging MicroPublisher 3.3 RTV“ kamerą ir „Image-Pro Plus 7.0“ kompiuterinę programą.

Ląstelių skaičiavimui naudojamas „Bürker“ hemocitometras. Ant gardelės uždedamas lašas mėginio, fiksuoto 5 % liugolio tirpalu. Gardelėje ląstelės skaičiuojamos dvi langelių eilutės suskaičiuojant, dvi praleidžiant ir t.t. iki pasiekiant bent 100 ląstelių. Langelyje įskaičiuojamos tos ląstelės, kurios liečia apatinę ir dešinę kvadrato kraštinę, liečiančios viršutinę ir kairę langelio kraštinę neįskaičiuojamos. Ląstelių skaičius nustatomas pagal 2 formulę išreiškiant ląstelių skaičių mililitre.

$$\frac{L_{\text{ąst.}}}{\text{mL}} = \frac{C \times 250000}{P} \quad (2 \text{ formulė})$$

C – suskaičiuotų ląstelių suma;

P – suskaičiuotų langelių skaičius.

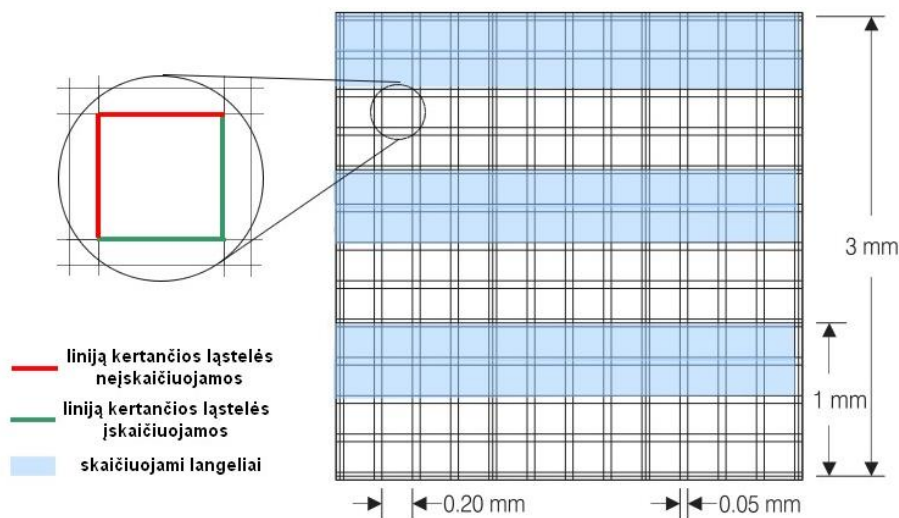
Pagal gautus duomenis ir 3 formulę apskaičiuojama ląstelių masė mėginyje, taip nustatant, ar ląstelių dydis yra pakitęs.

$$M = \frac{DK \times (1 \times 10^{-6})}{A} \quad (3 \text{ formulė})$$

M – ląstelių masė, μg ;

DK – dumblių koncentracija, g/L;

A – visų ląstelių mėginyje skaičius.



9 pav. Ląstelių skaičavimo schema „Bürker“ hamocitometro gardelėje (Ieva Endriukaitytė, 2023).

2.2.5. Astaksantino koncentracijos matavimas

Astaksantino analizei atsveriami dumblių masė (~ 10 mg HpŽ, ~5 mg HpR kultūros atvejais (masės skirtingos atsižvelgiant į astaksantino koncentraciją, kurios būtų galima tikėtis)). Dedama į plastikinius mėgintuvėlius ir įpilama 30 μL dejonizuoto vandens. Laikoma 10-30 min, tuomet pridedama 5 ml 5 % KOH tirpalo 30 % metanolio tirpale. Mėgintuvėliai dedami į iki 70 °C įkaitintą vandens vonią ir laikoma 15 min, tuomet centrifuguojama 5 min. 7000 rpm. Supernatantas su ištirpusiu chlorofilu nupilamas ir nebenaudojamas. Ant likusios biomasės pridedami 200 μL ledinės acto rūgšties ir 5 mL dimetilsulfoksido (DMSO). Mėginiai vorteksuojami ir kaitinami 10 min. vandens vonioje. Centrifuguojama 5 min. 7000 rpm, supernatantas nupilamas į 25 mL tūrio

matavimo kolbas. Reakcija su DMSO ir ledine acto rūgštimi kartojama 3 – 4 kartus, kol nuosėdos tampa baltos ar pilkos, o supernatantas nebeturi rausvos spalvos. Tuomet matavimo kolbos užpildomos su DMSO iki 25 mL ribos. Spektrofotometru „LAMBDA 25 (PerkinElmer)“ matuojamas supernatanto optinis tankis (OT) ties 490 nm ir 750 nm bangos ilgiais. Astaksantino koncentracija procentais sausoje biomasėje apskaičiuojama pagal 4 formulę.

$$A = \frac{(OT_{490} - OT_{750}) \times 5,6 \times MT}{BM} \times 100 \% \quad (4 \text{ formulė})$$

A – astaksantino koncentracija biomasėje, %;

OT – optinis tankis ties nurodytu bangos ilgiu;

5,6 – sugerties koeficientas;

MT – mėginio tūris, L;

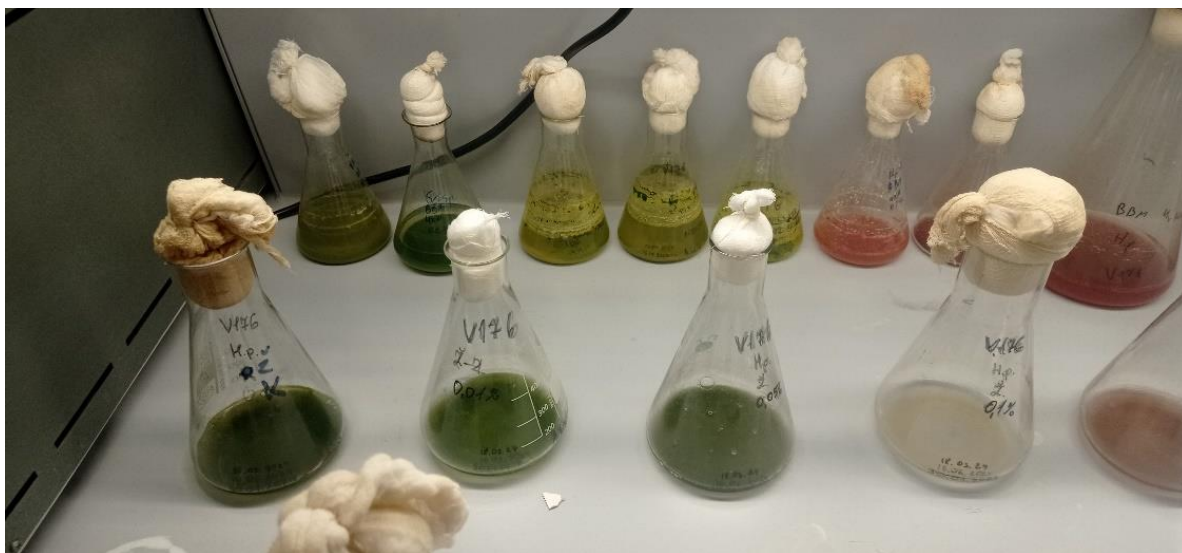
BM – biomasės masė, mg.

3. Rezultatai

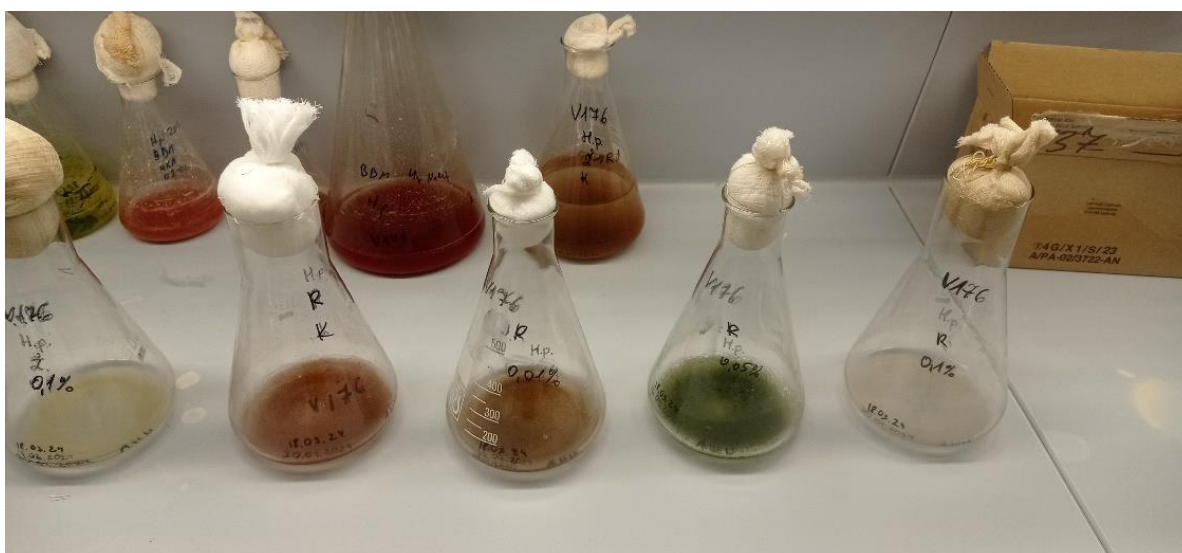
3.1.1. Biomasės prieaugio bei astaksantino pokytis (1 eksperimento etapas)

Pirmo bei antro eksperimento kolbose metu buvo pastebėta greita kultūros žūtis visuose mėginiuose savaitės bėgyje.

3 eksperimento metu buvo pastebėtas spartus biomasės prieaugis ir HpŽ ir HpR kultūrose, taip pat buvo pastebėtas drastiškas spalvos pokytis HpR mėginiuose – mėginiai pažaliavo 0,01 mol/L (laikina, maždaug 2 savaitėms) bei 0,05 mol/L (nuo antros tyrimo savaitės iki eksperimento pabaigos) koncentracijose.

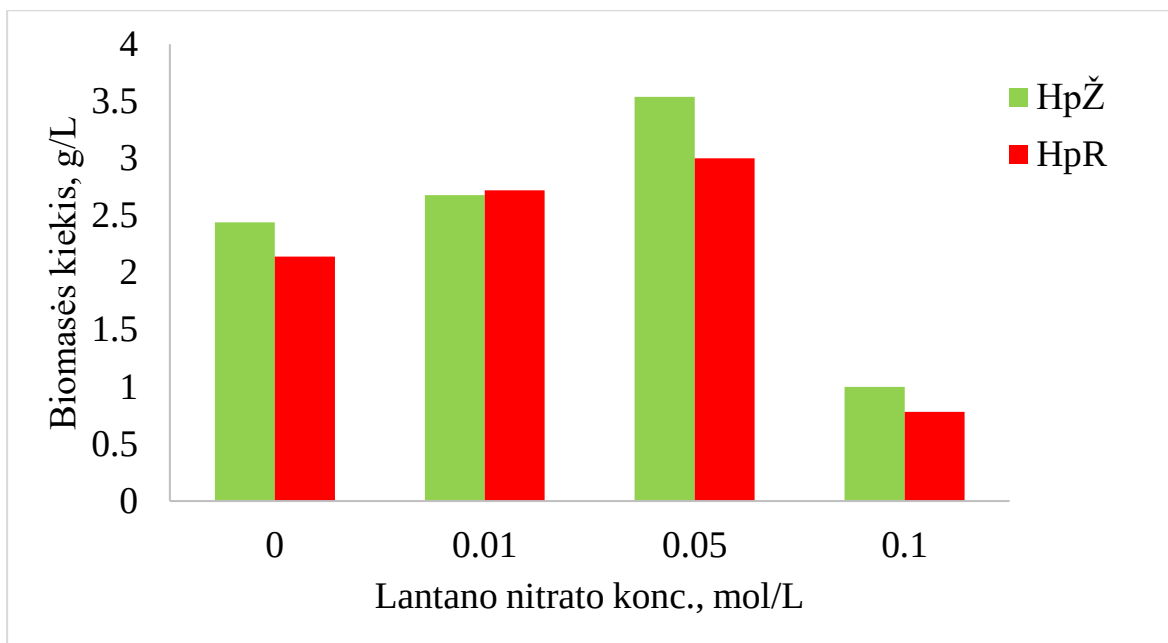


10 pav. HpŽ kultūra 4 eksperimento pabaigoje.



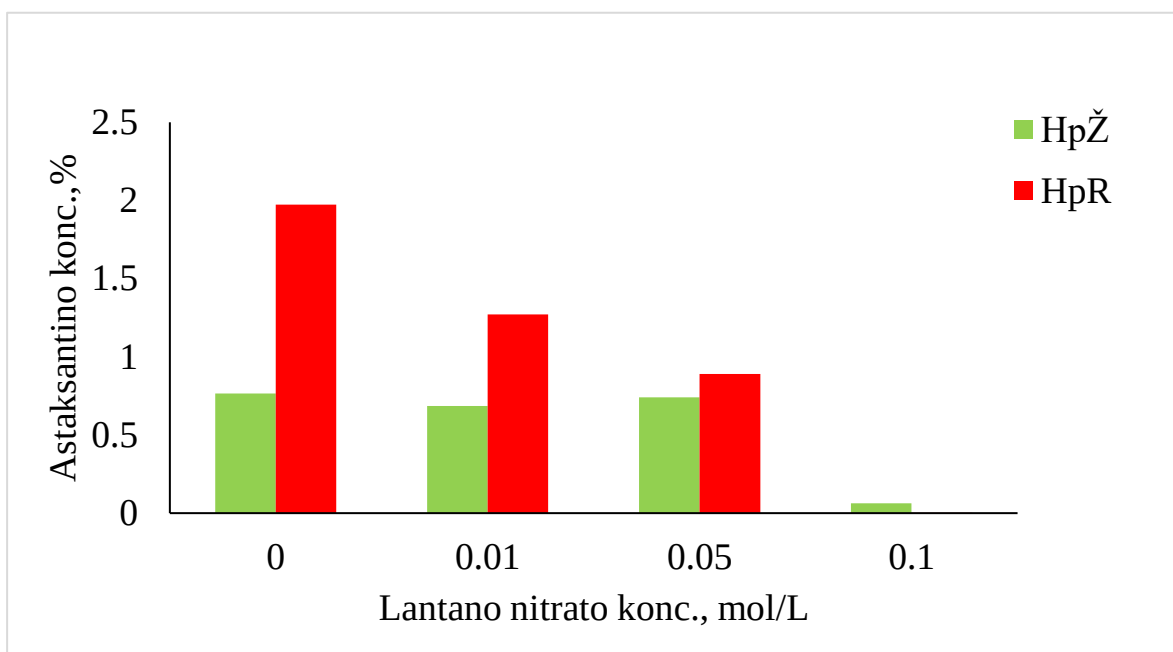
11 pav. HpR kultūra 4 eksperimento pabaigoje.

Dėl šito rezultato buvo nuspręsta atkartoti eksperimentą dar kartą, papildomai patikrinant astaksantino koncentraciją bei biomasės kiekį mėginiuose:



12 pav. 4 eksperimento biomasės kiekis priklausant LaNO_3 koncentracijai terpėje.

Ketvirto eksperimento metu buvo pastebėtas nemažas biomasės prieaugis mėginiuose su lantano nitrato 0,01 mol/L (HpŽ – 2,68 g/L, HpR – 2,72 g/L) bei 0,05 mol/L (HpŽ – 3,54 g/L, HpR – 3,0 g/L) koncentracijose, lyginant su kontrole ir HpŽ ir HpR mėginiuose.

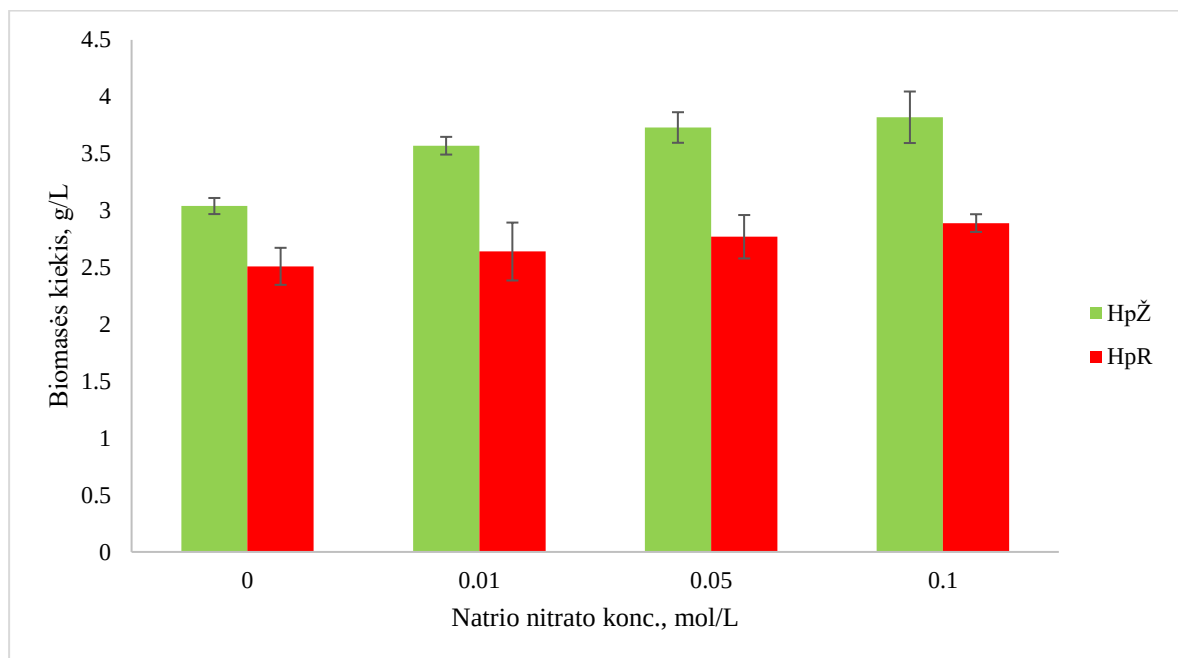


13 pav. 4 eksperimento astaksantino koncentracija priklausant LaNO_3 koncentracijai terpėje.

Astaksantino koncentracijos kito nuo 0,06 % (0,1 mol/L lantano nitrato) iki 0,7 % (0,05 mol/L lantano nitrato) panašiai kaip ir kontrolėje HpŽ kultūroje, o HpR kultūroje nuo 0,0003 % (0,1 mol/L lantano nitrato) iki 1,27 % (0,01 mol/L lantano nitrato), kas buvo mažiau (1,97 %) kontrolėje.

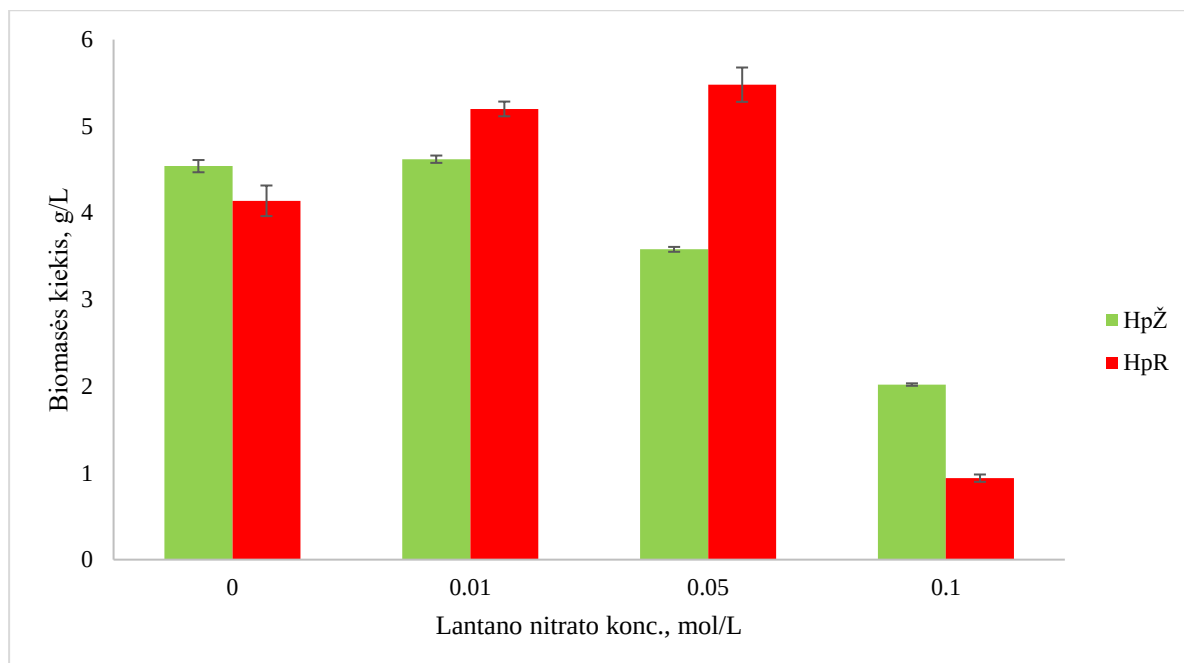
3.1.2. Biomasės priaugio pokytis (2 eksperimento etapas)

Bioreaktoriuose eksperimento metu, panašiai kaip ir kolbose, buvo pastebėta greita kultūros žūtis visuose 5 mol/L - 0,1 mol/L lantano nitrato koncentracijų mėginiuose savaitės bėgyje.



14 pav. HpR bei HpŽ kultūrų biomasės priklausant NaNO_3 koncentracijai terpėje paskutinę eksperimento dieną. Paklaidų stulpeliai žymi standartinę nuokrypį.

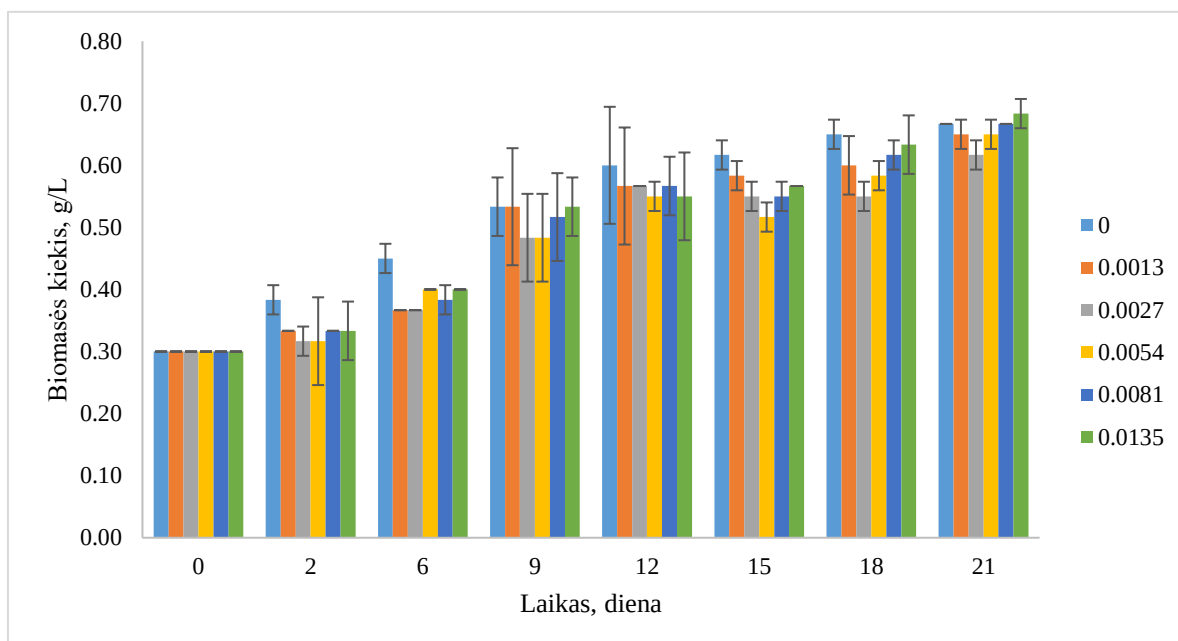
Atlikus kultūrų biomasės priaugio matavimus sauso svorio skaičiavimais, mėginiuose su natrio nitratu buvo pastebėtas palaipsnis biomasės didėjimas HpŽ (vidutiniškai nuo 3,04 g/L iki 3,82 g/L) bei HpR (vidutiniškai nuo 2,51 g/L iki 2,89 g/L) kultūruose.



15 pav. HpR bei HpŽ kultūrų biomasės kiekis priklausant LaNO₃ koncentracijai terpėje paskutinę eksperimento dieną. Paklaidų stulpeliai žymi standartinę nuokrypį.

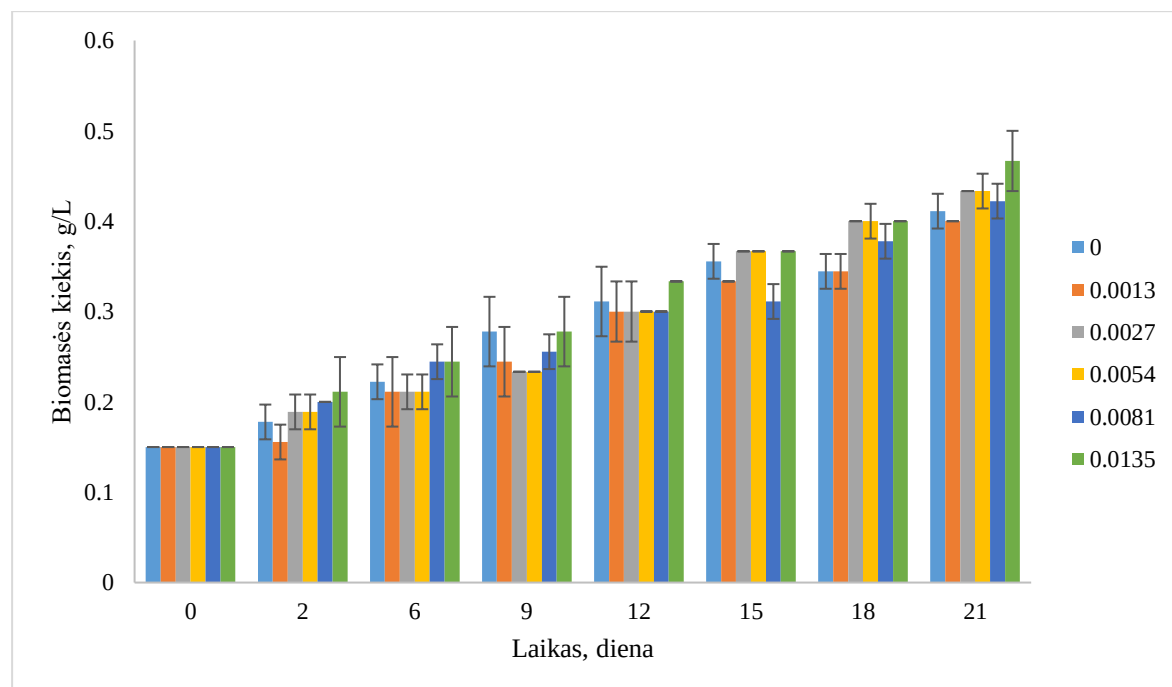
Panašiai kaip ir kolbose atliktame eksperimente, bioreaktoriuose buvo pastebėtas nemažas biomasės priaugis mėginiuose su lantano nitratu 0,01 mol/L (HpŽ – 4,62 g/L, HpR – 5,2 g/L) bei 0,05 mol/L (HpŽ – 3,58 g/L, HpR – 5,48 g/L) lyginant su kontrole ir HpŽ (4,54 g/L) ir HpR (4,14 g/L) mėginiuose. Mėginiuose su 0,01 mol/L lantano nitrato koncentracija buvo pastebėtas biomasės nuokrytis lyginant su kontrole ir HpŽ (2,02 g/L) ir HpR (0,94 g/L) kultūrose.

Mėginiuose su natrio chloridu bei lantano chlorido heptahidratu biomasės bei ląstelių koncentracijos pokytis buvo tikrinamas kas porą dienų:

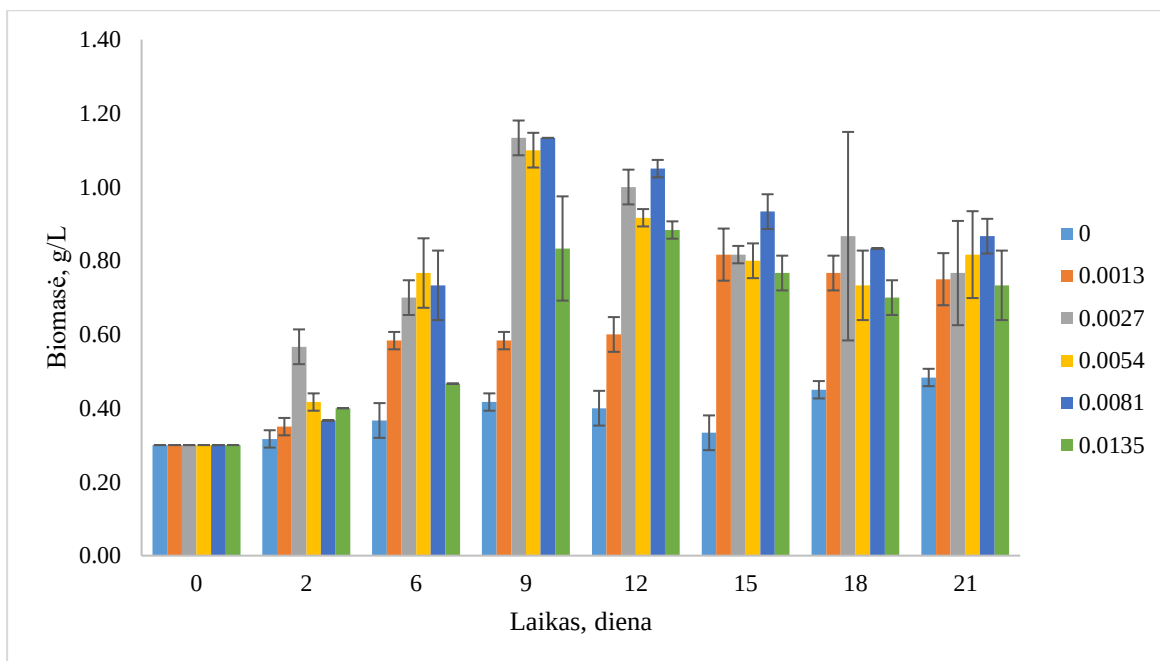


16 pav. HpR kultūros biomasės kiekis priklausant natrio chlorido koncentracijai terpėje eksperimento metu. Paklaidų stulpeliai žymi standartinį nuokrypį. Legendoje – lantano chlorido heptahidrato koncentracija mol/L.

Vidutinis biomasės prieaugis bandyme su natrio chloridu kito nuo 0,3 g/L iki 0,68 g/L HpR kultūroje (16 pav.) bei nuo 0,15 g/L iki 0,5 g/L HpŽ kultūroje (17 pav.).

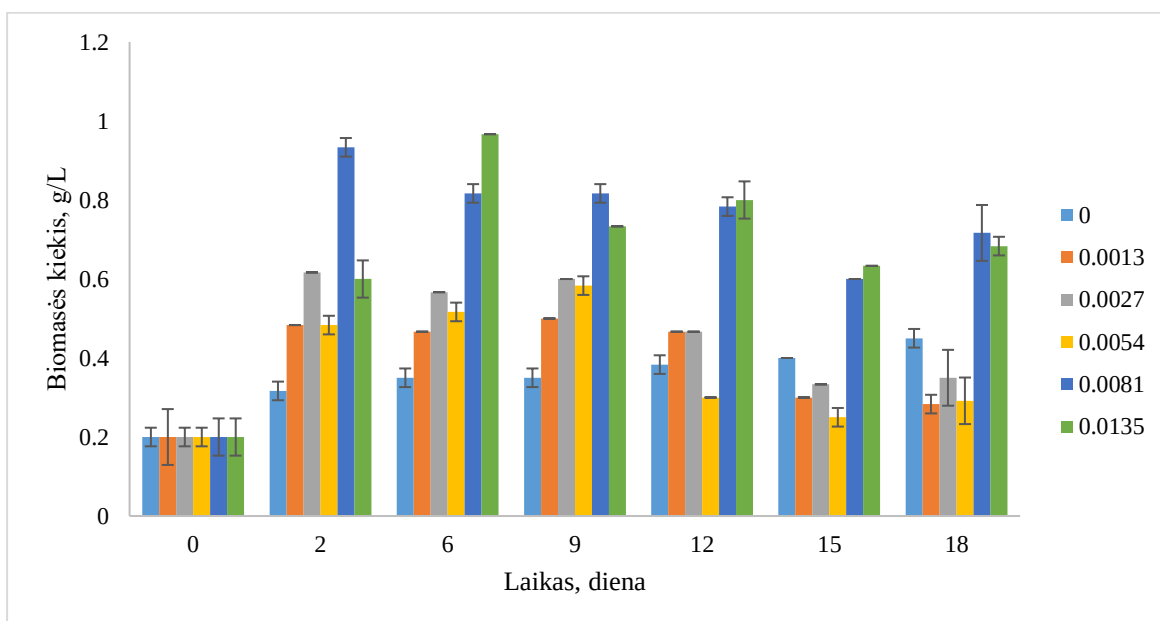


17 pav. HpŽ kultūros biomasės kiekis priklausant NaCl koncentracijai terpėje eksperimento metu. Paklaidų stulpeliai žymi standartinį nuokrypį. Legendoje – lantano chlorido heptahidrato koncentracija mol/L.



18 pav. HpR kultūros biomasės kiekis priklausant $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ koncentracijai terpėje eksperimento metu. Paklaidų stulpeliai žymi standartinę nuokrypį. Legendoje – lantano chlorido heptahidrato koncentracija mol/L.

Vidutinis biomasės prieaugis bandyme su lantano chlorido heptahidratu kito nuo 0,3 g/L iki 1,13 g/L 9 tyrimo dieną HpR kultūroje ir po to pradėjo mažėti iki 0,73 g/L (18 pav.). HpŽ kultūroje biomasė pakito nuo 0,2 g/L iki 0,97 g/L 6 tyrimo dieną, pradedant nuo 9 tyrimo dienos biomasės kiekis pradėjo palaipsniui mažėti iki 0,29 g/L 18 tyrimo dieną (19 pav.).

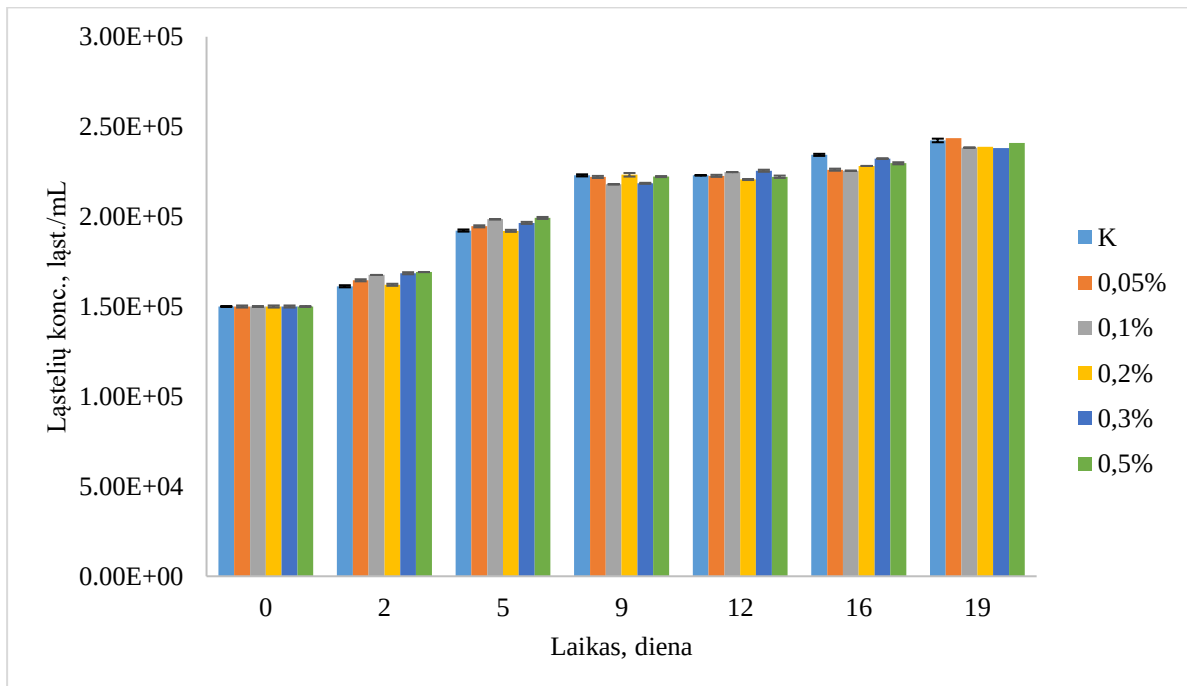


19 pav. HpŽ kultūros biomasės kiekis priklausant $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ koncentracijai terpėje eksperimento metu. Paklaidų stulpeliai žymi standartinę nuokrypį. Legendoje – lantano chlorido heptahidrato koncentracija mol/L.

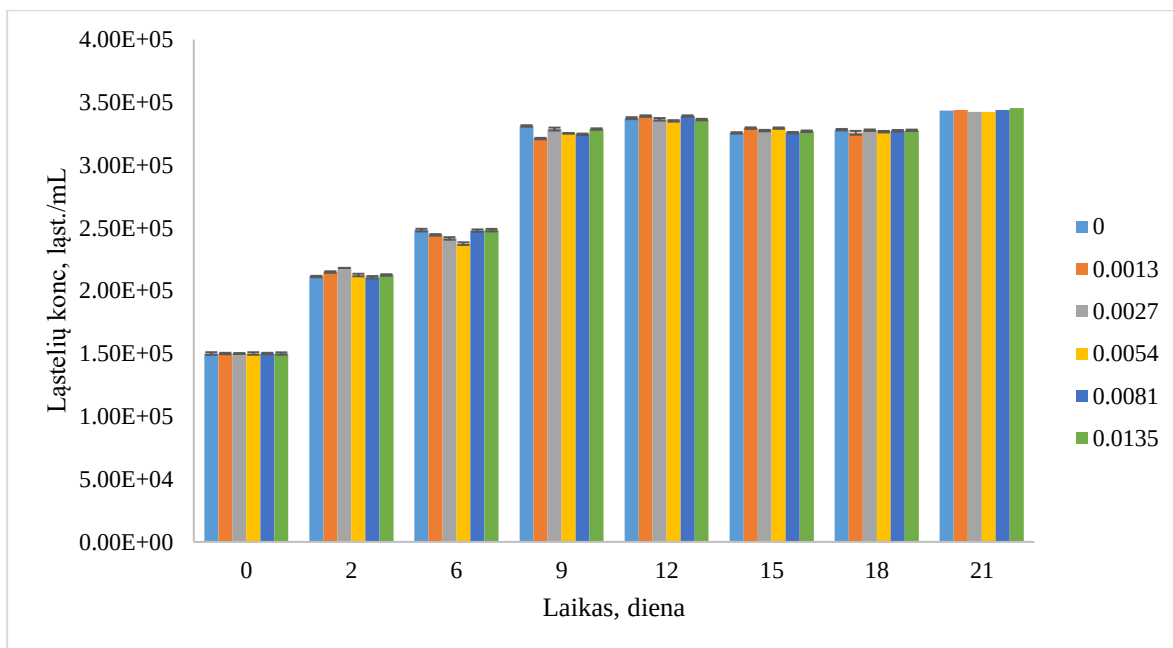
3.2. Ląstelių koncentracija terpėje

Ekspimento su natrio chloridu metu buvo pastebėtas stabilus dumblių prieaugis. Devintą dieną patikrinti mėginiai parodė vidutinę ląstelių koncentracijos prieaugį nuo $2,18 \cdot 10^5$ iki $2,23 \cdot 10^5$ ląst./mL HpR kultūroje, tokia tendencija (20 pav.) buvo stebima beveik viso atlikto tyrimo su natrio chloridu metu.

HpŽ kultūroje taip pat pastebėtas palaipsnis ląstelių koncentracijos padidėjimas viso eksperimento metu. Devintą dieną mėginiuose ląstelių koncentraciją vidutiniskai pakito nuo $3,21 \cdot 10^5$ iki $3,31 \cdot 10^5$ ląst./mL. Panaši tendencija išlyko iki paskutinės eksperimento dienos (21 pav.).

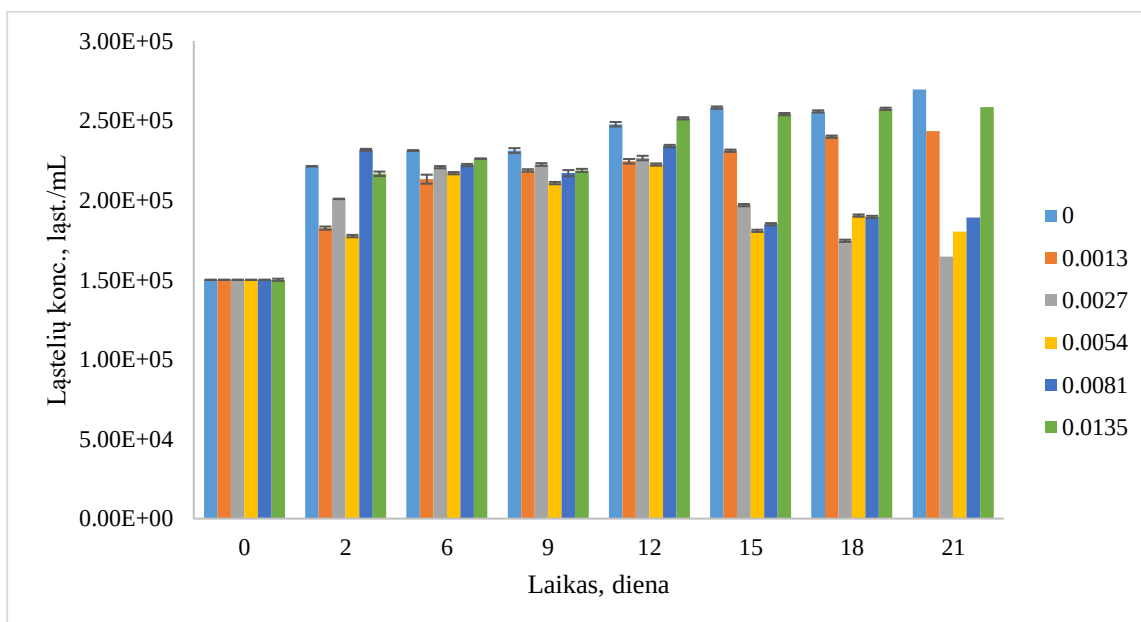


20 pav. HpR kultūros ląstelių koncentracijos pokyčiai priklausomai nuo NaCl koncentracijos tyrimo metu. Paklaidų stulpeliai žymi standartinę nuokrypį. Legendoje – natrio chlorido koncentracija mol/L.



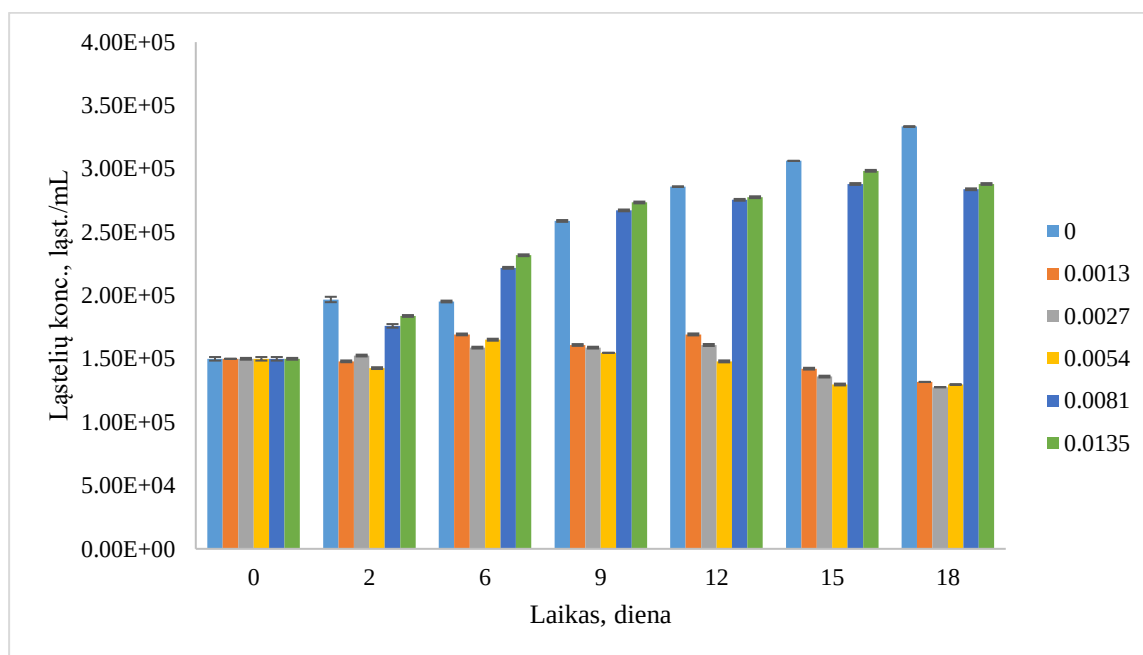
21 pav. HpŽ kultūros ląstelių koncentracijos pokyčiai priklausomai nuo NaCl koncentracijos tyrimo metu. Paklaidų stulpeliai žymi standartinę nuokrypį. Legendoje – natrio chlorido koncentracija mol/L.

Mėginiuose su lantano chlorido heptahidratu HpR kultūroje buvo pastebėtas ląstelių koncentracijos sumažėjimas 0,0027 mol/L, 0,0054 mol/L bei 0,0081 mol/L koncentracijose, pradedant nuo 15 tyrimo dienos iki eksperimento pabaigos. Mėginyje su 0,0135 mol/L lantano chlorido heptahidrato koncentracija terpėje buvo pastebėtas stabilus vidutinis ląstelių koncentracijos prieaugis nuo $2,17 \cdot 10^5$ iki $2,59 \cdot 10^5$ ląst./mL (22 pav.).



22 pav. HpR kultūros ląstelių koncentracijos pokyčiai priklausomai nuo $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ koncentracijos tyrimo metu. Paklaidų stulpeliai žymi standartinę nuokrypį. Legendoje – lantano chlorido heptahidrato koncentracija mol/L.

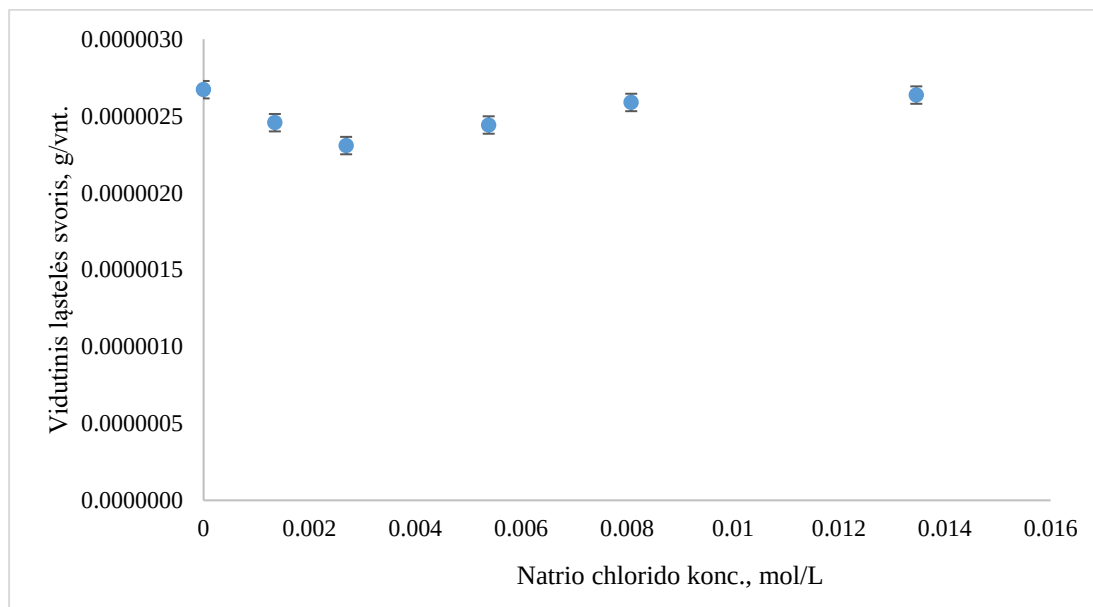
HpŽ kultūroje buvo pastebėtas ląstelių koncentracijos sumažėjimas 0,0013 mol/L, 0,0027 mol/L bei 0,0054 mol/L koncentracijų mėginiuose pradedant nuo devyntos eksperimento dienos. Mėginyje su 0,0081 mol/L bei 0,0135 mol/L lantano chlorido heptahidrato koncentracija terpėje buvo pastebėtas kultūros perėjimas iš žalios judrios fazės į nejudrią raudoną fazę bei stabilus ląstelių prieaugis nuo $1,5 \cdot 10^5$ iki $2,88 \cdot 10^5$ ląst./mL, kas buvo mažiau negu kontrolėje paskutinę eksperimento dieną ($3,33 \cdot 10^5$ ląst./mL) (23 pav.).



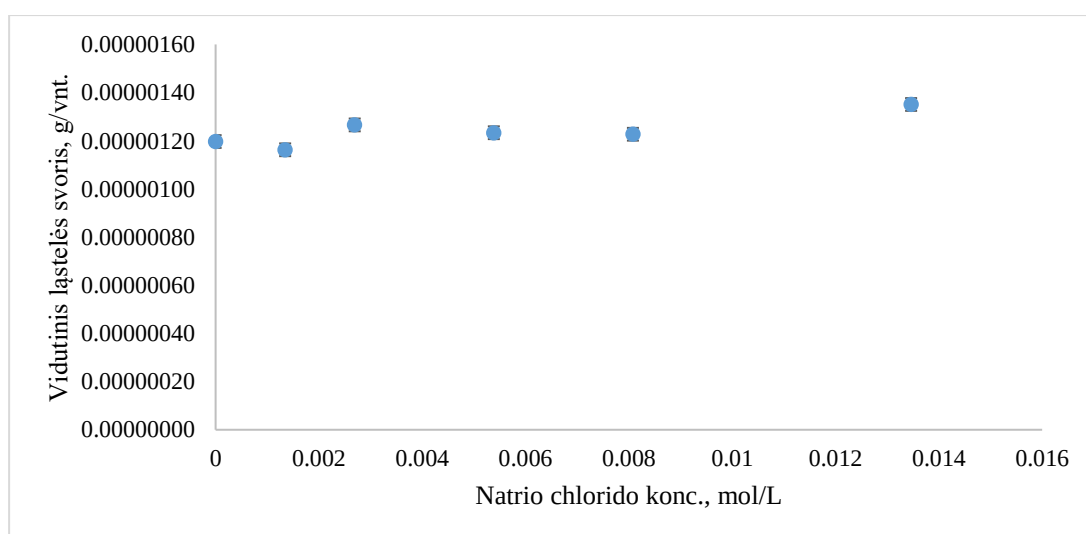
23 pav. HpŽ kultūros ląstelių koncentracijos pokyčiai priklausomai nuo $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ koncentracijos tyrimo metu. Paklaidų stulpeliai žymi standartinį nuokrypį. Legendoje – lantano chlorido heptahidrato koncentracija mol/L.

3.3. Vidutinis ląstelės svoris

Nustačius bendrą ląstelių skaičių mėginyje ir sausą svorį buvo apskaičiuota ląstelių vidutinė masė NaCl koncentracijai kintant nuo 0 mol/L iki 0,0135 mol/L HpR ir HpŽ kultūroje. HpR kultūroje vidutinis ląstelės svoris varijavo nuo 2,5 $\mu\text{g/vnt.}$ iki 2,6 $\mu\text{g/vnt.}$ (24 pav). Tuo tarpu HpŽ kultūroje 1,16 $\mu\text{g/vnt.}$ (0,0027 mol/L NaCl koncentracijoje) iki 2,6 $\mu\text{g/vnt.}$ (0,0135 mol/L NaCl koncentracijoje) (25 pav.).

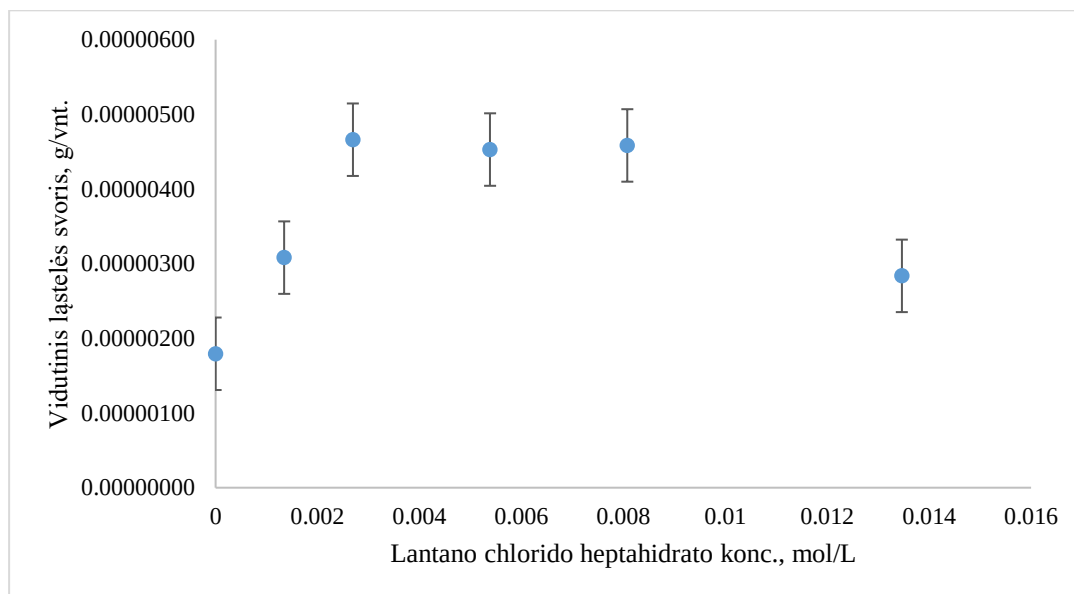


24 pav. HpR kultūros vidutinis ląstelių svoris priklausomai nuo NaCl koncentracijos paskutinę eksperimento dieną. Paklaidų stulpeliai žymi standartinę nuokrypį.

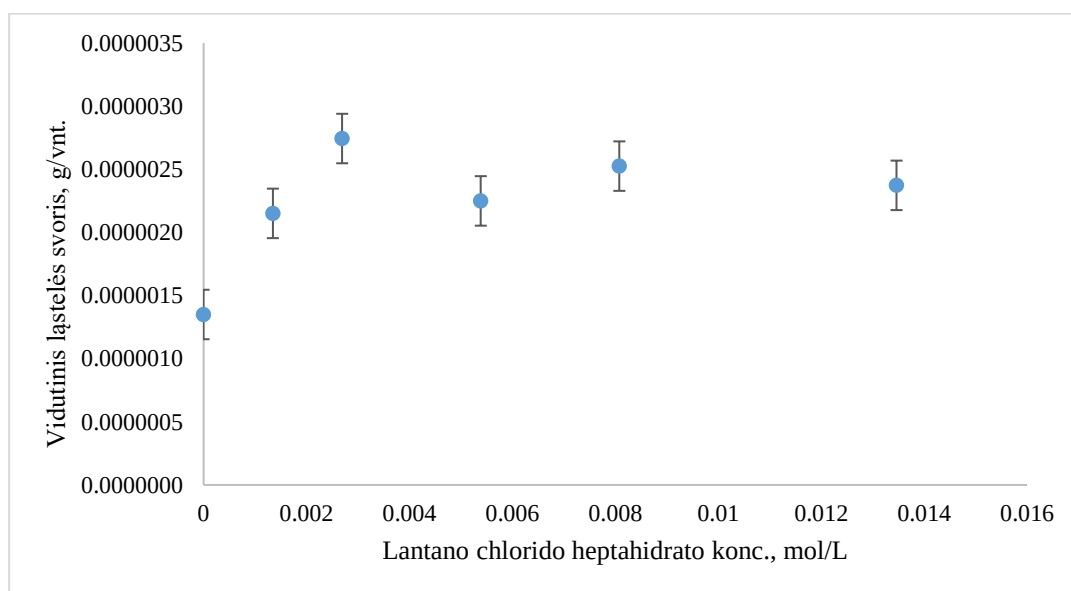


25 pav. HpŽ kultūros vidutinis ląstelių svoris priklausomai nuo NaCl koncentracijos paskutinę eksperimento dieną. Paklaidų stulpeliai žymi standartinę nuokrypį.

Mėginiuose su lantano chlorido heptahidratu HpR kultūroje vidutinis ląstelės svoris variavo nuo 1,79 $\mu\text{g/vnt.}$ (kontrolė) iki 4,66 $\mu\text{g/vnt.}$ (0,0027 mol/L $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ koncentracijoje) (26 pav.). Tuo tarpu HpŽ kultūroje nuo 1,4 $\mu\text{g/vnt.}$ (kontrolė) iki 2,7 $\mu\text{g/vnt.}$ (0,0027 mol/L $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ koncentracijoje) (27 pav.).



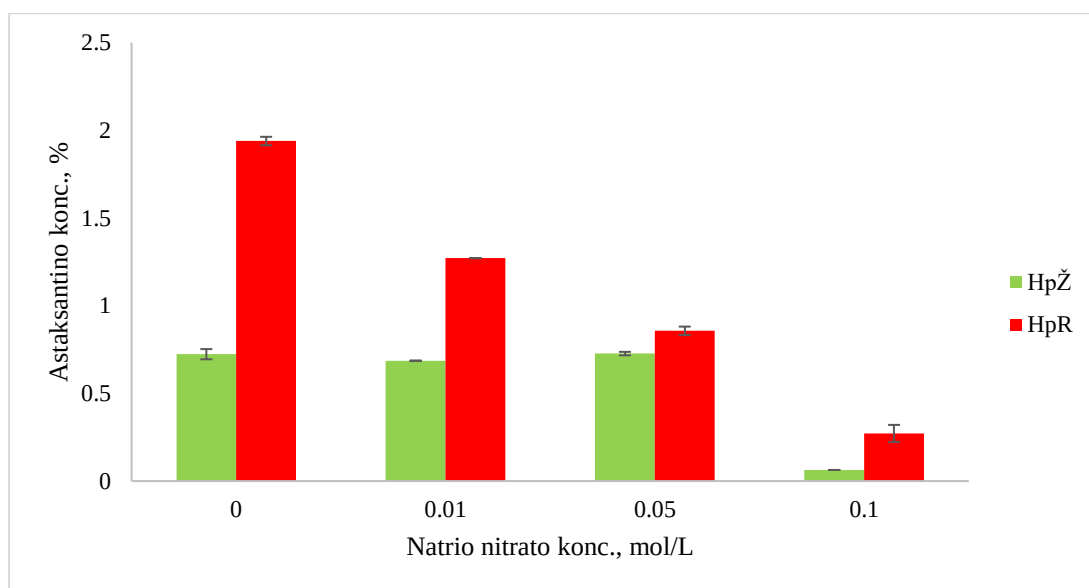
26 pav. HpR kultūros vidutinis ląstelių svoris priklausomai nuo $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ koncentracijos paskutinę eksperimento dieną. Paklaidų stulpeliai žymi standartinę nuokrypį.



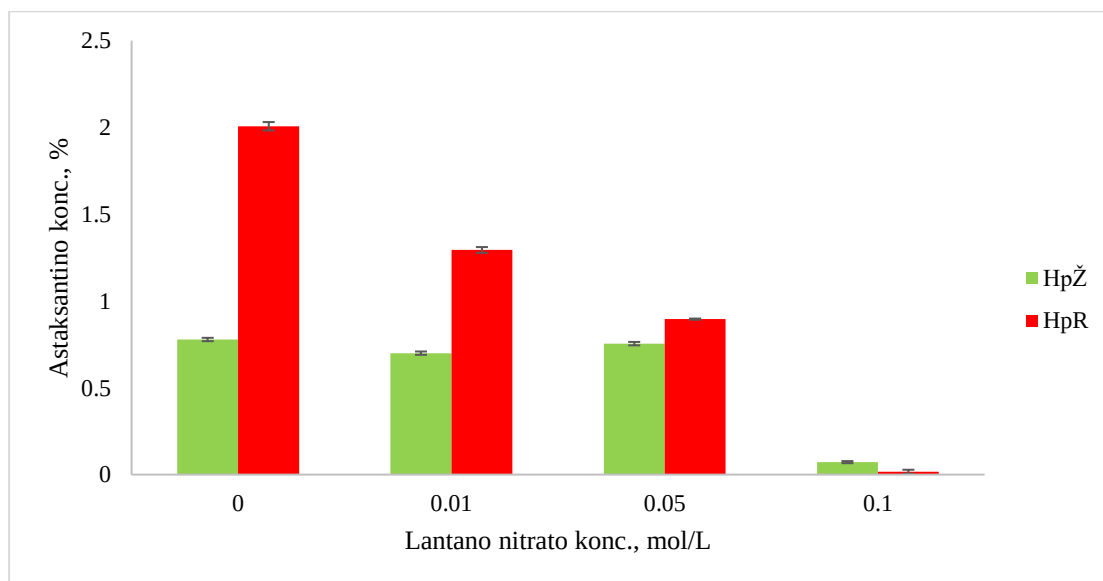
27 pav. HpŽ kultūros vidutinis ląstelių svoris priklausomai nuo $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ koncentracijos paskutinę eksperimento dieną. Paklaidų stulpeliai žymi standartinę nuokrypį.

3.4. Astaksantino koncentracija biomasėje

Atlikus kultūrų astaksantino kiekio skaičiavimus ekstrakto optinio tankio matavimais pastebėta, kad NaNO_3 koncentracijai kintant nuo 0 mol/L iki 0,1 mol/L, astaksantino koncentracija mažėjo nuo 0,72 % iki 0,063 % HpŽ kultūroje, HpR kultūroje astaksantino kiekis biomasėje mažėjo nuo 1,94 % iki 0,27 %, taip pat buvo pastebėtas palaipsnis kultūros perėjimas iš nejudrios raudonos fazės į judriąją žalią fazę.



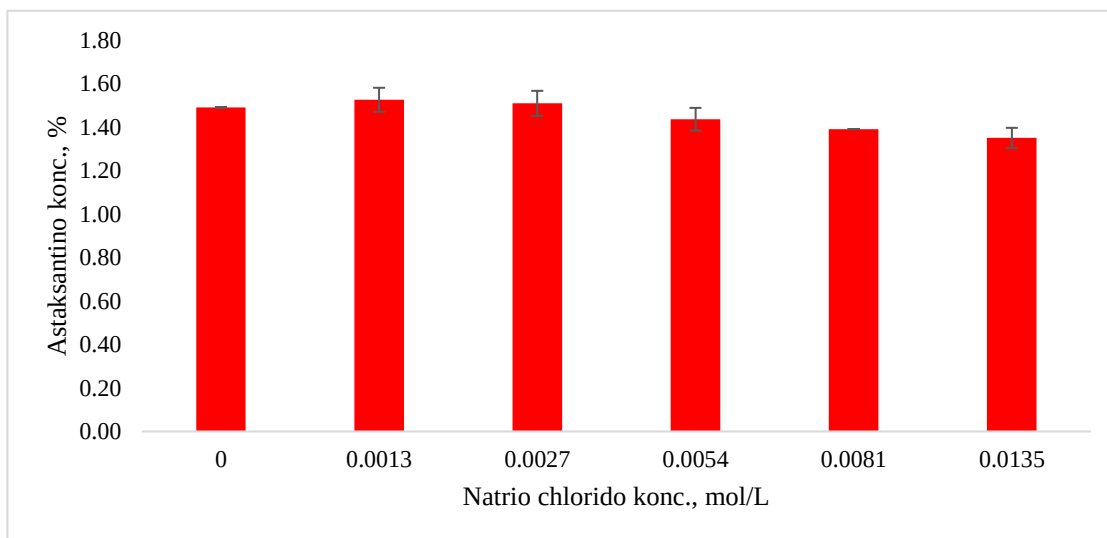
28 pav. Astaksantino koncentracija priklausant NaNO_3 koncentracijai terpėje paskutinę eksperimento dieną. Paklaidų stulpeliai žymi standartinę nuokrypį.



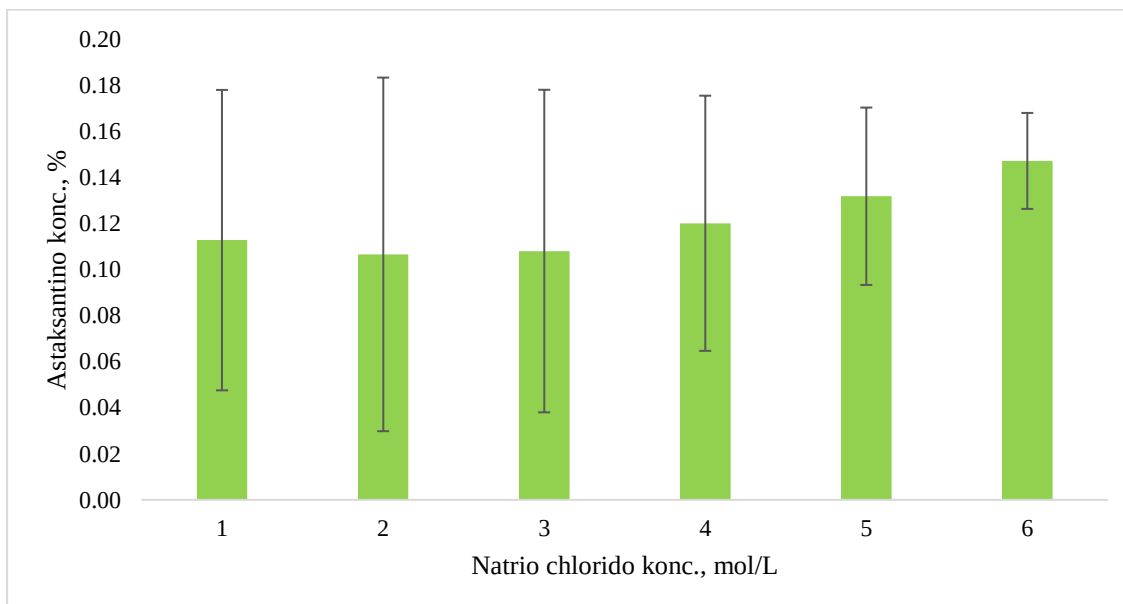
29 pav. Astaksantino koncentracija priklausant LaNO_3 koncentracijai terpėje paskutinę eksperimento dieną. Paklaidų stulpeliai žymi standartinę nuokrypį.

Vidutinės astaksantino koncentracijos mėginiuose su lantano nitratu kito nuo 0,78 % (kontrolėje) iki 0,7 % (0,1 mol/L lantano nitrato koncentracijoje) HpŽ kultūroje. HpR kultūroje astaksantino kiekis biomasėje mažėjo nuo 2 % (kontrolėje) iki 0,016 % (0,1 mol/L lantano nitrato koncentracijoje), taip pat, panašiai kaip ir mėginiuose su NaNO_3 buvo pastebėtas palaipsnis kultūros perėjimas iš nejudrios raudonos fazės į judriąją žalią fazę (29 pav.).

Mėginiuose su natrio chloridu buvo pastebėtas vidutinis astaksantino kiekis biomasėje nuo 1,35 % iki 1,53 % HpR kultūroje (30 pav.). HpŽ kultūroje astaksantino kiekis svyravo tarp 0,11 % ir 0,15 % (31 pav.).

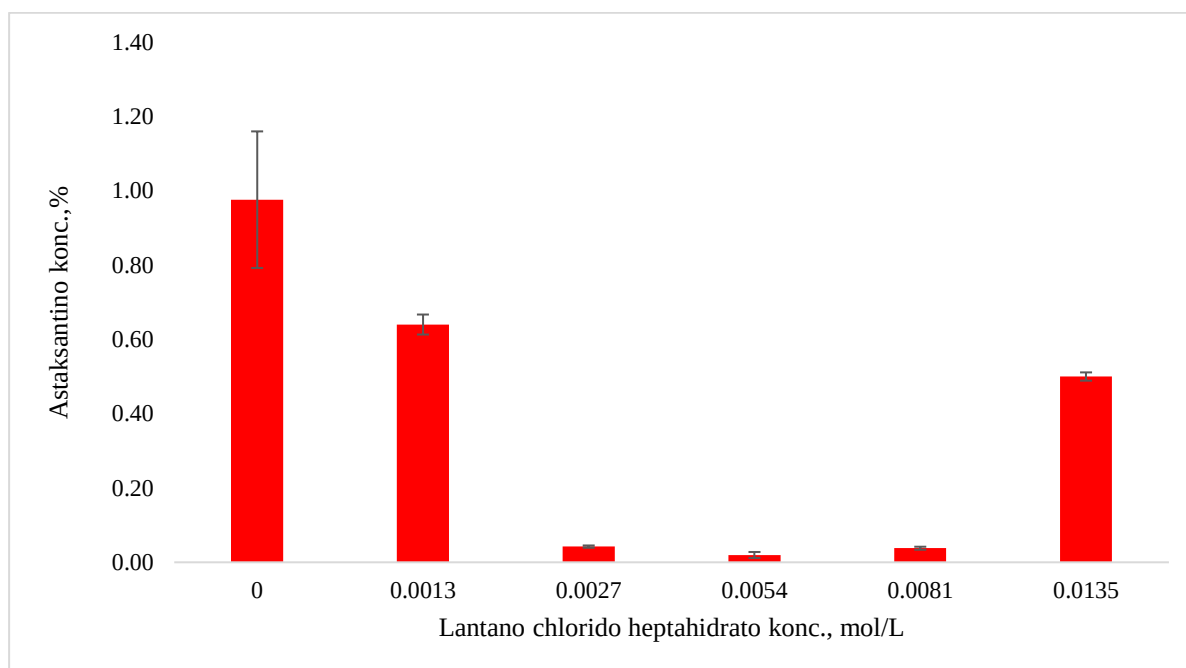


30 pav. HpR kultūros astaksantino koncentracija priklausant NaCl koncentracijai terpėje paskutinę eksperimento dieną. Paklaidų stulpeliai žymi standartinę nuokrypį.



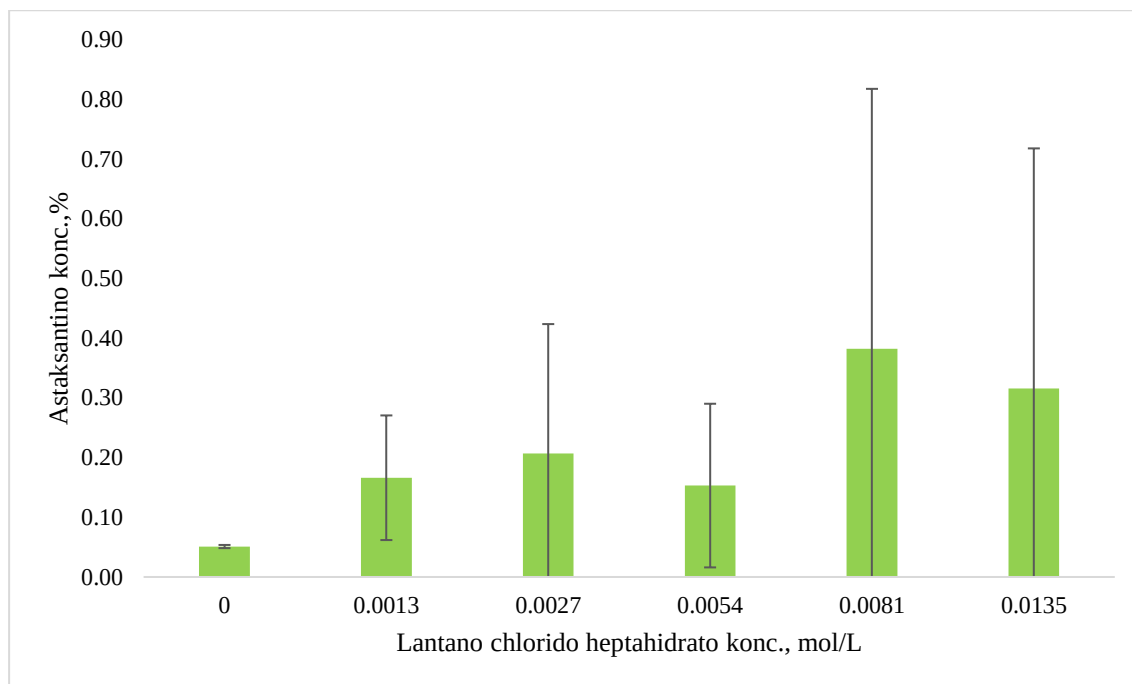
31 pav. HpŽ kultūros astaksantino koncentracija priklausant NaCl koncentracijai terpėje paskutinę eksperimento dieną. Paklaidų stulpeliai žymi standartinę nuokrypį.

Eksperimentinėje terpėje su lantano chlorido heptahidratu HpR kultūroje astaksantino kiekis biomasėje svyravo tarp 0,64 % (0.0013 mol/L $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ koncentracijoje) ir 0,02 % (0.0054 mol/L $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ koncentracijoje). Mėginiuose su 0,0027 mol/L, 0,0054 mol/L bei 0,0081 mol/L buvo pastebėtas staigus pigmento kiekio sumažėjimas, tuo tarpu 0,0013 mol/L bei 0,0135 mol/L koncentracijose astaksantinas išliko, nors ir jo buvo mažiau lyginant su kontrole (0,98 %) (32 pav.).



32 pav. HpR kultūros astaksantino koncentracija priklausant $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ koncentracijai terpėje paskutinę eksperimento dieną. Paklaidų stulpeliai žymi standartinį nuokrypį.

Eksperimentinėje terpėje su lantano chlorido heptahidratu HpŽ kultūroje astaksantino kiekis biomasėje svyravo tarp 0,15 % (0.0054 mol/L $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ koncentracijoje) ir 0,38 % (0.0081 mol/L $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ koncentracijoje). Mėginiuose su 0,0081 mol/L, 0,0135 mol/L buvo pastebėtas pigmento kiekio padidėjimas, lyginant su kontrole (0,05 %) (33 pav.). Taip pat mėginiuose su 0,0081 mol/L, 0,0135 mol/L lantano chlorido heptahidrato koncentracija, buvo pastebėtas ląstelių perėjimas iš judrios žalios fazės į nejudrią raudoną fazę.



33 pav. HpŽ kultūros astaksantino koncentracija priklausant $\text{LaCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ terpėje paskutinę eksperimento dieną. Paklaidų stulpeliai žymi standartinę nuokrypį.

4. Rezultatų aptarimas

Mokslininkų atliktuose tyrimuose buvo nustatyti keli aplinkos parametrai, tokie kaip šviesos intensyvumas, druskingumas ir maistinių medžiagų prieinamumas, kurie turi įtakos *Haematococcus pluvialis* augimui bei vystymuisi (Illman et al., 2000). Dėl vis didesnio lantano junginių kiekio patekimo į biosferą, retųjų žemė elementų poveikis sukelia vis didesnę rūpestį maistinių medžiagų prieinamumui dumbliams (Herrmann et al., 2016).

Šiame darbe buvo naudojami du lantano junginiai – lantano nitratas bei lantano chlorido heptahidratasir buvo stebimas šių junginių poveikis *Haematococcus pluvialis* žaliadumbliams.

Tai et al., 2010 metais pastebėjo, kad lantano nitratas žemose koncentracijose beveik neturi jokio poveikio *Skletonema costatum* titnagdumbliui, tikriausiai, dėl dumblių apvalkalo (Tai et al., 2010). Žaliadumbliai neturi tokio apvalkalo, kaip titnagdumbliai, dėl ko lantano nitratai yra lengviau patekti į ląstelės vidų. Pastebėta, kad tam tikros koncentracijos lantanidų druskos stimuliuoja kai kurių dumblių augimą; tačiau konkretūs tokių augimą skatinančių veiksnių veikimo mechanizmai vis dar nežinomi. Hu et al, 2004 metais pastebėjo, kad tam tikros lantano koncentracijos terpėje paskatina chlorofilo bei karotenoidinių pigmentų sintezę ląstelėje (Hu et al., 2004). Tuo tarpu kiti mokslininkai pastebėjo, kad žemos lantanidų koncentracijos teigiamai veikia astaksantino sintezę *Haematococcus pluvialis* žaliadumbliuose (Goecke, Zachleder, et al., 2015). Atlikus bandymus lantano nitrato poveikiui *H. pluvialis* biomasės augimui nustatyti, paaiškėjo, kad lantano nitratas darė reikšmingą įtaką biomasės prieaugio didėjimui 0,01 – 0,05 mol/L koncentracijoje tiek HpŽ, tiek HpR kultūrai. Tačiau padidinus lantano nitrato koncentraciją terpėje iki 0,1 mol/L buvo stebimas didelis biomasės mažėjimas, lyginant su kontrole, ką mini ir kiti mokslininkų atlikti tyrimai ((Joonas et al., 2017), (Sun et al., 2019)). Galima daryti prielaidą, kad šis slopinamasis poveikis atsiranda dėl maistinių medžiagų sekvestracijos iš dumblių augimo terpės bei daro įtaką ląstelės fotosintzei (Sun et al., 2019).

Šiai dienai yra labai mažai tyrimų susijusių su tikslesnę lantano chlorido heptahidrato poveikio analizę dumbliams, tačiau yra bendra nuomonė apie šito junginio toksiškumą organizmams. Pagal lantano chlorido heptahidrato LD50 (*LD50 vertės, pagrįstos IC50 vertėmis (koncentracijos, dėl kurių ląstelių augimas sumažėja 50 %)*) yra lygi 962.6 mg/kg, kas rodo ūmų toksiškumo lygį (Rucki et al., 2021). Atlikus bandymus su skirtingomis lantano chlorido heptahidrato koncentracijomis terpėje buvo stebimas biomasės mažėjimas žemesnėse junginio

koncnetracijose eksperimento viduryje HpŽ kultūroje. Tikimiausiai metalų jonai sutrikdo fotosintetinančių sistemų veikimą, dėl ko jos palaipsniui žūsta (Sun et al., 2019). Ne iki galo aišku kodėl 0,0081 bei 0,0135 mol/L koncentracijose ląstelės nežūvo ir pradėjo produkuoti astaksantiną, tačiau tai galimai atsitiko dėl dumblių biosorpcijos proceso (Goecke, Zachleder, et al., 2015), Hu et al. savo tyrime teigia, kad kad negyvi arba gyvi dumbliai gali veiksmingai kaupti lantanidus dėl savo gebėjimo sudaryti chelatininius metabolitus, pavyzdžiui, su baltymais, cukrumi, nukleino rūgštimis, aminorūgštimis, nukleotidais ir kt (Hu et al., 2004). Teoriškai šis procesas galėtų paaiškinti, kodėl nors ir biomasė sumažėjo HpR kultūroje, tačiau nebuvo pastebėta ląstelių žūtis nei vienam lantano chlorido heptahidrato mėginyje - ląstelės galėjo apsisaugoti nuo stresą keliančių veiksnių, įgauti atsparumo ir prisitaikyti prie skirtingų toksinių medžiagų koncentracijų terpėje (Chen et al., 2018).

Atlikus stebėjimus šviesiniu mikroskopu ir skaičiavimus hemocitometru mėginiuose su lantano chlorido heptahidratu HpR kultūroje vidutinis ląstelės svoris varijavo nuo 1,79 $\mu\text{g/vnt.}$ (kontrolė) iki 4,66 $\mu\text{g/vnt.}$ (0,0027 mol/L koncentracijoje). Tuo tarpu HpŽ kultūroje nuo 1,4 $\mu\text{g/vnt.}$ (kontrolė) iki 2,7 $\mu\text{g/vnt.}$ (0,0027 mol/L koncentracijoje). HpR kultūroje buvo pastebėtas ląstelių koncentracijos sumažėjimas beveik visų koncentracijų mėginiuose pradedant nuo 15 eksperimento dienos lyginant su kontrole.

HpŽ kultūroje buvo pastebėtas ląstelių koncnetracijos sumažėjimas žemesnių koncentracijų mėginiuose pradedant nuo 9 eksperimento dienos. Mėginiuose su 0,0081 mol/L bei 0,0135 mol/L lantano chlorido heptahidrato koncentracija terpėje buvo pastebėtas kultūros perėjimas iš žalios judrios fazės į nejudrią raudoną fazę (kas parodo dumblių adaptyvumą streso sąlygoms (Jannel et al., 2020)) bei stabilus ląstelių prieaugis nuo $1,5 \cdot 10^5$ iki $2,88 \cdot 10^5$ ląst./mL, kas buvo daugiau negu mažesnių lantano chlorido heptahidrato eksperimentinėse koncentracijose, nors ir buvo mažiau negu kontrolėje paskutinę eksperimento dieną ($3,33 \cdot 10^5$ ląst./mL). Pastebėta, kad pagrindinis neigiamo poveikio mechanizmas - maistinių medžiagų pašalinimas iš dumblių terpės (González et al., 2015), tačiau kolkas neaišku, kodėl *H. pluvialis* reaguoja neigiamai į lantano chlorido heptahidratą tik žemesnėse koncentracijose, dėl to ateityje reikėtų atlikti išsamius molekulinis tyrimus šitam aspektui ištirti.

Atlikus tyrimus lantano nitrato bei lantano chlorido heptahidrato poveikiui astaksantino sintezei nustatyti, rezultatai parodė, kad parinktos lantano nitrato koncentracijos turi neigiamą poveikį astaksantino sintezei tiek HpR, tiek HpŽ stadijų kultūroms. Yra tikimybė, kad lantano nitrato esantis NO_3^- jonai teigiamai paveikė *Haematococcus pluvialis* kultūras, padedant joms

pereiti iš nejudrios fazės HpR kultūros atvėjų ir prijauginti biomasę bei ląstelių kiekį abiejose kultūrose (Goksan et al., 2011).

Atlikus bandymus lantano chlorido heptahidrato poveikiui astaksantino sintezei nustatyti, rezultatai parodė, kad lantano chlorido heptahidrato terpėje buvimas turi neigiamą astaksantino koncentracijai biomasėje HpR kultūroje, o HpŽ kultūroje pastebėtas ląstelių perėjimas iš judrios žalios fazės į nejudrią raudoną fazę, taigi junginio buvimas terpėje sukelia ląstelėms stresą, tačiau tik nežymiai padidina karotenoido koncentraciją.

Iš gautų duomenų galima spręsti, kad mažos lantano nitrato koncentracijos terpėje turi teigiamą įtaką abiejų stadijų kultūrų biomasę bei ląstelių koncentracijai, tačiau ganetinai pastėbimai paveikia astaksantino koncentraciją ląstelėje. Tuo tarpu mažos lantano chlorido heptahidrato koncentracijos terpėje turi neigiamą poveikį HpŽ kultūros biomasės, ląstelių ir astaksantino koncentracijos prieaugiui, ląstelės lengviau žūsta, kai didesnėse koncentracijose jos pereina į nejudrią fazę. Nejudrios fazės HpR kultūrai, šitame tyrime naudotos lantano chlorido heptahidrato koncentracijos nėra letalios, nors ir paveikia biomasę bei astaksantino kiekį ląstelėje. Tam, kad geriau suprasti šiuos rezultatus, ateityje reikėtų atlikti labiau detalius molekulinis, morfologinius bei biocheminius tyrimus.

5. Išvados

Biomasės prieaugis:

1. Didesnės nei 0,1 mol/L lantano nitrato koncentracijos terpėje sukelia *H. pluvialis* ląstelių žūtį;
2. Mažesnėse nei 0,1 mol/L lantano nitrato koncentracijose buvo pastebėtas teigiamas poveikis biomasės prieaugiui ir HpŽ (4,62 g/L) ir HpR (5,48 g/L) mėginiuose lyginant su kontrole (HpŽ – 4,54 g/L, HpR – 4,14 g/L);
3. Skirtingose lantano chlorido heptahidrato koncentracijose buvo pastebėtas biomasės kiekio sumažėjimas, lyginant su koncentracijomis HpŽ kultūroje. Tuo tarpu HpR kultūroje buvo pastebėtas nemažas biomasės prieaugis iki 0,93 g/L 0,0081 mol/L koncentracijoje, lyginant su kontrole (0,3 g/L).

Ląstelių koncentracija bei svoris:

1. Skirtingos lantano chlorido heptahidrato koncentracijos turi teigiamą poveikį ląstelių svorio padidėjimui ir HpR (4,66 µg/vnt., kontrolė - 1,79 µg/vnt.) kultūroje ir HpŽ kultūroje (2,7 µg/vnt., kontrolė - 1,4 µg/vnt.).
2. Didesnės nei 0,0081 mol/L lantano chlorido heptahidrato koncentracijos HpŽ kultūros terpėje sukelia ląstelių perėjimą iš žalios judrios fazės į nejudrią raudoną fazę bei stabilų ląstelių prieaugį nuo $1,5 \cdot 10^5$ iki $2,88 \cdot 10^5$ ląst./mL, kas buvo mažiau negu kontrolėje paskutinę eksperimento dieną ($3,33 \cdot 10^5$ ląst./mL).

Astaksantino koncentracija biomasėje:

1. Mažesnės nei 0,1 mol/L lantano nitrato koncentracijos turi neigiamą poveikį astaksantino koncentracijai HpR kultūros mėginiuose (0,89 %) lyginant su kontrole (2 %).
2. Skirtingos lantano chlorido heptahidrato koncentracijos turi neigiamą poveikį astaksantino kiekiui biomasėje ir HpR (0,64 %) kultūroje lyginant su kontrole (HpR - 0,98 %). Didesnės junginio koncentracijos HpŽ kultūroje turi teigiamą poveikį pigmento kiekiui biomasėje (0,38%), lyginant su kontrole (0,05 %).

Autoriaus asmeninis indėlis

Tyrimo įdėja gauta iš dr. Eglės Lastauskienės, bei darbo vadovo lekt. Petro Venckaus.

Autorius savarankiškai atliko visus eksperimentus, išanalizavo ir parašė rašto darbą.

Prie darbo tikslo ir uždavinių formulavimo, rezultatų analizės prisidėjo darbo vadovas.

Padėka

Norėčiau padėkoti darbo vadovui lekt. Petrui Venckui, už suteiktą galimybę dirbti laboratorijos patalpose, naudotis jos reagentais ir aparatūra bei darbo konsultavimą.

Taip pat norėčiau padėkoti dr. Eglei Lastauskienei už darbo temos idėją bei už suteiktą galimybę dirbti laboratorijos patalpose, naudotis jos reagentais bei aparatūra.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Agnieška Voitechovič

Magistro baigiamasis darbas

Lantano junginių poveikis *Haematococcus pluvialis* žaliadumbliams

SANTRAUKA

Pastaraisiais metais didėja susidomėjimas retųjų žemių junginiais, tokiais kaip lantanidai. Lantanidai atlieka nemažai vaidmenų įvairiuose srityse – įskaitant chemiją, biologiją, mediciną bei pramonę. Lantano junginiai tapo būtini daugelyje šiuolaikinių technologijų dalimi, tačiau dėl padidėjusio šio junginių panaudojimo, taip pat padidėjo ir jų išmetimas į mus supančią biosferą. Lantanidai laikomi nepagrindiniais elementais, kurie gyvame organizme gali sukelti tiek teigiamas, tiek neigiamas fiziologines reakcijas. Skirtingai nuo sunkiųjų metalų, kurių toksiškumas plačiai ištirtas, lantanidų poveikiui, ypač jų poveikiui vandens aplinkai, susijusiam su lantanidų eksploatavimu, nebuvo iki šiol skiriama pakankamai dėmesio.

Haematococcus pluvialis – tai vienaląstis *Haematococcaceae* šeimos gėlavandenis žaliadumblis, kuris pasižymi aiškiu dvifaziu gyvybiniu ciklu, kurį sudaro vegetatyvinė fazė ir ramybės fazė. Ramybės fazės metu, stresinėmis sąlygomis šis žaliadumblis sintetina karotenoidą astaksantiną, kuris apsaugo ląstelę nuo ROS bei saulės spindulių. Astaksantinas yra vienu stipriausiu antioksidantu, dėl to yra plačiai naudojamas žemės ūkyje, medicinoje bei pramonėje. Astaksantino sintezę *H. pluvialis* ląstelėje skatina stresinės sąlygos, tokios kaip maistinių medžiagų stoka, pH, druskinguma bei sunkiųjų metalų buvimas terpėje.

Šiame darbe buvo tikrinamas retaus žemės elemento – lantano, derinių, lantano nitrato bei lantano chlorido heptahidrato poveikis HpR bei HpŽ stadijų kultūroms. Įvertinus skirtingų lantano junginių koncentracijų poveikį skirtingoms *H. pluvialis* kultūroms, buvo pastebėta, kad didesnės nei 0,1 mol/L lantano nitrato koncentracijos terpėje sukelia ląstelių žūtį, o mažesnės nei 0,05 mol/L koncentracijos paskatina biomasės prieaugį, tačiau sumažina astaksantino sintezę. Pastebėta, kad didesnės nei 0,0027 mol/L lantano chlorido heptahidrato koncentracijos neigiamai paveikia biomasės prieaugį bei astaksantino sintezę ir HpR ir HpŽ stadijų *H. pluvialis* kultūrose.

Agnieška Voitechovič

Master's thesis

Effects of Lanthanum (La) Compounds on the Green Algae *Haematococcus pluvialis*

ABSTRACT

In recent years, there has been growing interest in rare earth compounds such as lanthanides. Lanthanides play a number of roles in a wide range of fields - including chemistry, biology, medicine and industry. Lanthanide compounds have become an essential part of many modern technologies, but the increased use of these compounds has also led to an increase in their release into the biosphere around us. Lanthanides are considered to be non-essential elements that can cause both positive and negative physiological reactions in living organisms. Unlike heavy metals, whose toxicity has been extensively studied, the effects of lanthanides, and in particular their effects on the aquatic environment related to the exploitation of lanthanides, have not been given sufficient attention so far.

Haematococcus pluvialis is a unicellular freshwater green alga of the family *Haematococcaceae*, which has a distinct biphasic life cycle consisting of a vegetative phase and a dormant phase. During the dormant phase, under stressful conditions, this green alga synthesises the carotenoid astaxanthin, which protects the cell from ROS and sunlight. Astaxanthin is one of the strongest antioxidants and is therefore widely used in agriculture, medicine and biotechnological industry. The synthesis of astaxanthin in *H. pluvialis* cells is stimulated by stress conditions such as nutrient deficiency, pH, salinity and the presence of heavy metals in the medium.

In this work, the effect of combinations of the rare earth element lanthanum, lanthanum nitrate and lanthanum chloride heptahydrate on HpR and HpŽ stage cultures was tested. The effects of different concentrations of lanthanum compounds on different *H. pluvialis* cultures were evaluated and it was observed that concentrations of lanthanum nitrate higher than 0.1 mol/L induced cell death in the medium, while concentrations lower than 0.05 mol/L induced biomass growth, but reduced astaxanthin synthesis. Concentrations of lanthanum chloride heptahydrate above 0,0027 mol/L were found to negatively affect biomass growth and astaxanthin synthesis in both HpR and HpŽ stages of *H. pluvialis* cultures.

Literatūros sąrašas

- Abramczuk, J. W. (1985). The effects of lanthanum chloride on pregnancy in mice and on preimplantation mouse embryos in vitro. *Toxicology*, 34(4), 315–320.
[https://doi.org/10.1016/0300-483X\(85\)90142-8](https://doi.org/10.1016/0300-483X(85)90142-8)
- Aladaileh, S. H., Khafaga, A. F., Abd El-Hack, M. E., Al-Gabri, N. A., Abukhalil, M. H., Alfwuaires, M. A., Bin-Jumah, M., Alkahtani, S., Abdel-Daim, M. M., Aleya, L., & Abdelnour, S. (2020). Spirulina platensis ameliorates the sub chronic toxicities of lead in rabbits via anti-oxidative, anti-inflammatory, and immune stimulatory properties. *Science of The Total Environment*, 701, 134879. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134879>
- Ambati, R., Phang, S.-M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. (2014). Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Marine Drugs*, 12(1), 128–152. <https://doi.org/10.3390/md12010128>
- Anastopoulos, I., Bhatnagar, A., & Lima, E. C. (2016). Adsorption of rare earth metals: A review of recent literature. *Journal of Molecular Liquids*, 221, 954–962.
<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.06.076>
- Barmettler, F., Castelberg, C., Fabbri, C., Brandl, H., & Working Group of Environmental Microbiology, Department of Evolutionary Biology and Environmental Studies, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich, Switzerland. (2016). Microbial mobilization of rare earth elements (REE) from mineral solids—A mini review. *AIMS Microbiology*, 2(2), 190–204. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2016.2.190>
- Binnemans, K., Jones, P. T., Blanpain, B., Van Gerven, T., Yang, Y., Walton, A., & Buchert, M. (2013). Recycling of rare earths: A critical review. *Journal of Cleaner Production*, 51, 1–22.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.12.037>
- Boussiba, S. (2000). Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum*, 108(2), 111–117.
<https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x>

- Burchardt, L., Balcerkiewicz, S., Kokociński, M., Samardakiewicz, S., & Adamski, Z. (2006). Occurrence of *Haematococcus pluvialis* Flotow emend. Wille in a small artificial pool on the university campus of the Collegium Biologicum in Poznań (Poland). *Biodiversity: Research and Conservation*, 1–2, 163–166. <https://doi.org/10.14746/biorc.2006.1-2.34>
- Chekanov, K., Lobakova, E., Selyakh, I., Semenova, L., Sidorov, R., & Solovchenko, A. (2014). Accumulation of Astaxanthin by a New *Haematococcus pluvialis* Strain BM1 from the White Sea Coastal Rocks (Russia). *Marine Drugs*, 12(8), 4504–4520. <https://doi.org/10.3390/md12084504>
- Chen, X., Zhang, C., Tan, L., & Wang, J. (2018). Toxicity of Co nanoparticles on three species of marine microalgae. *Environmental Pollution*, 236, 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.081>
- Das, N., & Das, D. (2013). Recovery of rare earth metals through biosorption: An overview. *Journal of Rare Earths*, 31(10), 933–943. [https://doi.org/10.1016/S1002-0721\(13\)60009-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0721(13)60009-5)
- Debnath, T., Bandyopadhyay, T. K., Vanitha, K., Bobby, Md. N., Nath Tiwari, O., Bhunia, B., & Muthuraj, M. (2024). Astaxanthin from microalgae: A review on structure, biosynthesis, production strategies and application. *Food Research International*, 176, 113841. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113841>
- Domínguez-Bocanegra, A. R., Guerrero Legarreta, I., Martínez Jerónimo, F., & Tomasini Campocoso, A. (2004). Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 92(2), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.04.001>
- Evens, T. J., Niedz, R. P., & Kirkpatrick, G. J. (2008). Temperature and irradiance impacts on the growth, pigmentation and photosystem II quantum yields of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 20(4), 411–422. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9277-1>

- Fassett, R. G., & Coombes, J. S. (2011). Astaxanthin: A Potential Therapeutic Agent in Cardiovascular Disease. *Marine Drugs*, 9(3), 447–465. <https://doi.org/10.3390/md9030447>
- Gencer, Ö., & Turan, G. (2025). Enhancing biomass and lipid productivities of *Haematococcus pluvialis* for industrial raw materials products. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 18(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13068-025-02604-x>
- Goecke, F., Jerez, C. G., Zachleder, V., Figueroa, F. L., Biřkovř, K., řezanka, T., & Vřtovř, M. (2015). Use of lanthanides to alleviate the effects of metal ion-deficiency in *Desmodesmus quadricauda* (Sphaeropleales, Chlorophyta). *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00002>
- Goecke, F., Vřtovř, M., Lukavský, J., Nedbalovř, L., řezanka, T., & Zachleder, V. (2017). Effects of rare earth elements on growth rate, lipids, fatty acids and pigments in microalgae. *Phycological Research*, 65(3), 226–234. <https://doi.org/10.1111/pre.12180>
- Goecke, F., Zachleder, V., & Vřtovř, M. (2015). Rare Earth Elements and Algae: Physiological Effects, Biorefinery and Recycling. In A. Prokop, R. K. Bajpai, & M. E. Zappi (Eds.), *Algal Biorefineries* (pp. 339–363). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6_10
- Goksan, T., Ak, I., & Kilic, C. (2011). [No title found]. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11(3). https://doi.org/10.4194/1303-2712-v11_3_06
- González, V., Vignati, D. A. L., Pons, M.-N., Montarges-Pelletier, E., Bojic, C., & Giamberini, L. (2015). Lanthanide ecotoxicity: First attempt to measure environmental risk for aquatic organisms. *Environmental Pollution*, 199, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.020>
- Gudin, C. M., P., & Triki, A. (1997). Gametogenesis in *Haematococcus pluvialis* Flotow (Volvocales, Chlorophyta). *Phycologia*, 36, 190–194.

- Han, D., Li, Y., & Hu, Q. (2013). Biology and Commercial Aspects of *Haematococcus pluvialis*. In A. Richmond & Q. Hu (Eds.), *Handbook of Microalgal Culture* (1st ed., pp. 388–405). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch20>
- Harker, M., Hirschberg, J., & Oren, A. (1998). *Paracoccus marcusii* sp. Nov., an orange Gram-negative coccus. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(2), 543–548. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-2-543>
- He, M. L., & Rambeck, W. A. (2000). Rare earth elements-a new generation of growth promoters for pigs? *Archiv Für Tierernaehrung*, 53(4), 323–334. <https://doi.org/10.1080/17450390009381956>
- Herrmann, H., Nolde, J., Berger, S., & Heise, S. (2016). Aquatic ecotoxicity of lanthanum – A review and an attempt to derive water and sediment quality criteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 213–238. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.033>
- Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L., & Goycoolea, F. M. (2006). Astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 185–196. <https://doi.org/10.1080/10408690590957188>
- Hou, X., & Yan, X. (1998). Study on the concentration and seasonal variation of inorganic elements in 35 species of marine algae. *Science of The Total Environment*, 222(3), 141–156. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00299-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00299-X)
- Hu, Z., Richter, H., Sparovek, G., & Schnug, E. (2004). Physiological and Biochemical Effects of Rare Earth Elements on Plants and Their Agricultural Significance: A Review. *Journal of Plant Nutrition*, 27(1), 183–220. <https://doi.org/10.1081/PLN-120027555>
- Ieva Endriukaitytė. (2023). *Kobalto oksido ir geležies oksido nanodalelių įtaka žaliadumblių Haematococcus pluvialis kultūrų augimui, morfologijai ir astaksantino koncentracijai biomaseje*. Vilnius University.

- Illman, A. M., Scragg, A. H., & Shales, S. W. (2000). Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(8), 631–635. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00266-0](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00266-0)
- Jacinto, J., Henriques, B., Duarte, A. C., Vale, C., & Pereira, E. (2018). Removal and recovery of Critical Rare Elements from contaminated waters by living *Gracilaria gracilis*. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.054>
- Jannel, S., Caro, Y., Bermudes, M., & Petit, T. (2020). Novel Insights into the Biotechnological Production of *Haematococcus pluvialis*-Derived Astaxanthin: Advances and Key Challenges to Allow Its Industrial Use as Novel Food Ingredient. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(10), 789. <https://doi.org/10.3390/jmse8100789>
- Jayasekera, R., & Rossbach, M. (1996). Use of seaweeds for monitoring trace elements in coastal waters. *Environmental Geochemistry and Health*, 18(2), 63–68. <https://doi.org/10.1007/BF01771133>
- Jin, X., Chu, Z., Yan, F., & Zeng, Q. (2009). Effects of lanthanum(III) and EDTA on the growth and competition of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus quadricauda*. *Limnologia*, 39(1), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2008.03.002>
- Johnson, E. A., & An, G.-H. (1991). Astaxanthin from Microbial Sources. *Critical Reviews in Biotechnology*, 11(4), 297–326. <https://doi.org/10.3109/07388559109040622>
- Joonas, E., Aruoja, V., Olli, K., Syvertsen-Wiig, G., Vija, H., & Kahru, A. (2017). Potency of (doped) rare earth oxide particles and their constituent metals to inhibit algal growth and induce direct toxic effects. *Science of The Total Environment*, 593–594, 478–486. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.184>
- Kajjumba, G. W., & Marti, E. J. (2022). A review of the application of cerium and lanthanum in phosphorus removal during wastewater treatment: Characteristics, mechanism, and recovery. *Chemosphere*, 309, 136462. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136462>

- Kim, J. H., Affan, Md. A., Jang, J., Kang, M.-H., Ko, A.-R., Jeon, S.-M., Oh, C., Heo, S.-J., Lee, Y.-H., Ju, S.-J., & Kang, D.-H. (2015). Morphological, Molecular, and Biochemical Characterization of Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus* sp. KORDI03 (Haematococcaceae, Chlorophyta) Isolated from Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 238–246. <https://doi.org/10.4014/jmb.1410.10032>
- Klochkova, T. A., Kwak, M. S., Han, J. W., Motomura, T., Nagasato, C., & Kim, G. H. (2013). Cold-tolerant strain of *Haematococcus pluvialis* (Haematococcaceae, Chlorophyta) from Blomstrandhalvøya (Svalbard). *ALGAE*, 28(2), 185–192. <https://doi.org/10.4490/algae.2013.28.2.185>
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., Kurimura, Y., & Tsuji, Y. (1997). Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(3), 351–356. <https://doi.org/10.1007/s002530051061>
- Li, Y., Gong, F., Guo, S., Yu, W., & Liu, J. (2021). Adonis amurensis Is a Promising Alternative to *Haematococcus* as a Resource for Natural Esterified (3S,3'S)-Astaxanthin Production. *Plants*, 10(6), 1059. <https://doi.org/10.3390/plants10061059>
- Liang, T., Li, K., & Wang, L. (2014). State of rare earth elements in different environmental components in mining areas of China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(3), 1499–1513. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3469-8>
- Lorenz, R. T., & Cysewski, G. R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 18(4), 160–167. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01433-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01433-5)
- Lürling, M., & Van Oosterhout, F. (2013). Case study on the efficacy of a lanthanum-enriched clay (Phoslock®) in controlling eutrophication in Lake Het Groene Eiland (The Netherlands). *Hydrobiologia*, 710(1), 253–263. <https://doi.org/10.1007/s10750-012-1141-x>
- Minoda, A., Sawada, H., Suzuki, S., Miyashita, S., Inagaki, K., Yamamoto, T., & Tsuzuki, M. (2015). Recovery of rare earth elements from the sulfothermophilic red alga *Galdieria*

- sulphuraria using aqueous acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1513–1519. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6070-3>
- Mota, G. C. P., Moraes, L. B. S. D., Oliveira, C. Y. B., Oliveira, D. W. S., Abreu, J. L. D., Dantas, D. M. M., & Gálvez, A. O. (2022). Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: Processes, applications, and market. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 52(5), 598–609. <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1966802>
- Mularczyk, M., Michalak, I., & Marycz, K. (2020). Astaxanthin and other Nutrients from *Haematococcus pluvialis*—Multifunctional Applications. *Marine Drugs*, 18(9), 459. <https://doi.org/10.3390/md18090459>
- Nelis, H. J., & De Leenheer, A. P. (1991). Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(3), 181–191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02922.x>
- Oesterhelt, C., Schmälzlin, E., Schmitt, J. M., & Lokstein, H. (2007). Regulation of photosynthesis in the unicellular acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*[†]. *The Plant Journal*, 51(3), 500–511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03159.x>
- Oliveira, R. C., Guibal, E., & Garcia, O. (2012). Biosorption and desorption of lanthanum(III) and neodymium(III) in fixed-bed columns with *Sargassum* sp.: Perspectives for separation of rare earth metals. *Biotechnology Progress*, 28(3), 715–722. <https://doi.org/10.1002/btpr.1525>
- Otton, R., Marin, D. P., Bolin, A. P., Santos, R. D. C. M. D., Polotow, T. G., Sampaio, S. C., & De Barros, M. P. (2010). Astaxanthin ameliorates the redox imbalance in lymphocytes of experimental diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 186(3), 306–315. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.05.011>
- Pagano, G., Guida, M., Siciliano, A., Oral, R., Koçbaş, F., Palumbo, A., Castellano, I., Migliaccio, O., Thomas, P. J., & Trifuoggi, M. (2016). Comparative toxicities of selected rare earth elements: Sea urchin embryogenesis and fertilization damage with redox and cytogenetic

- effects. *Environmental Research*, 147, 453–460.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.02.031>
- Park, D. M., Reed, D. W., Yung, M. C., Eslamimanesh, A., Lencka, M. M., Anderko, A., Fujita, Y., Riman, R. E., Navrotsky, A., & Jiao, Y. (2016). Bioadsorption of Rare Earth Elements through Cell Surface Display of Lanthanide Binding Tags. *Environmental Science & Technology*, 50(5), 2735–2742. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b06129>
- Peng, S., Long, M., Zheng, L., Song, L., & Li, J. (2019). Physiological sensitivity of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) to environmental pollutants: A comparison with *Microcystis wesenbergii* (cyanobacteria) and *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 31(1), 365–374. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1557-4>
- Ponou, J., Wang, L. P., Doddiba, G., Okaya, K., Fujita, T., Mitsunashi, K., Atarashi, T., Satoh, G., & Noda, M. (2014). Recovery of rare earth elements from aqueous solution obtained from Vietnamese clay minerals using dried and carbonized parachlorella. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(2), 1070–1081.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.04.002>
- Rajendran, S., Sai Bharadwaj, A. V. S. L., Barmavatu, P., Palani, G., Trilaksanna, H., Kannan, K., & Meenakshisundaram, N. (2024). A Review on Lanthanum-Based Materials for Phosphate Removal. *ChemEngineering*, 8(1), 23. <https://doi.org/10.3390/chemengineering8010023>
- Revel, M., Van Drimmelen, C. K. E., Weltje, L., Hursthouse, A., & Heise, S. (2025). Effects of rare earth elements in the aquatic environment: Implications for ecotoxicological testing. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 55(5), 334–375.
<https://doi.org/10.1080/10643389.2024.2406992>
- Richards, R. G., & Mullins, B. J. (2013). Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. *Ecological Modelling*, 249, 59–67.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2012.07.004>

- Rucki, M., Kejlova, K., Vlkova, A., Jirova, D., Dvorakova, M., Svobodova, L., Kandarova, H., Letasiova, S., Kolarova, H., Mannerstrom, M., & Heinonen, T. (2021). Evaluation of toxicity profiles of rare earth elements salts (lanthanides). *Journal of Rare Earths*, 39(2), 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.jre.2020.02.011>
- Santos, J. G., Dutra, J. D. L., Alves Junior, S., Sá, G. F. D., Costa Junior, N. B. D., & Freire, R. O. (2013). Theoretical Spectroscopic Study of the Conjugate Microcystin-LR-Europium Cryptate. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(2), 236–240. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130030>
- Schacht, U., Wallmann, K., & Kutterolf, S. (2010). The influence of volcanic ash alteration on the REE composition of marine pore waters. *Journal of Geochemical Exploration*, 106(1–3), 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2010.02.006>
- Shen, F., Wang, L., Zhou, Q., & Huang, X. (2018). Effects of lanthanum on *Microcystis aeruginosa*: Attention to the changes in composition and content of cellular microcystins. *Aquatic Toxicology*, 196, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.007>
- Sun, D., He, N., Chen, Q., & Duan, S. (2019). Effects of Lanthanum on the Photosystem II Energy Fluxes and Antioxidant System of *Chlorella Vulgaris* and *Phaeodactylum Tricornutum*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(12), 2242. <https://doi.org/10.3390/ijerph16122242>
- Tai, P., Zhao, Q., Su, D., Li, P., & Stagnitti, F. (2010). Biological toxicity of lanthanide elements on algae. *Chemosphere*, 80(9), 1031–1035. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.030>
- Tsubokura, A., Yoneda, H., & Mizuta, H. (1999). *Paracoccus carotinifaciens* sp. Nov., a new aerobic Gram-negative astaxanthin-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 277–282. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-277>
- Uchiyama, K., Naito, Y., Hasegawa, G., Nakamura, N., Takahashi, J., & Yoshikawa, T. (2002). Astaxanthin protects β -cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. *Redox Report*, 7(5), 290–293. <https://doi.org/10.1179/135100002125000811>

- Usai, A., Pittman, J. K., & Theodoropoulos, C. (2022). A multiscale modelling approach for *Haematococcus pluvialis* cultivation under different environmental conditions. *Biotechnology Reports*, 36, e00771. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00771>
- Valcheva-Traykova, M., Saso, L., & Kostova, I. (2014). Involvement of Lanthanides in the Free Radicals Homeostasis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(22), 2508–2519. <https://doi.org/10.2174/1568026614666141203123620>
- Vershinin, A. (1999). Biological functions of carotenoids - diversity and evolution. *BioFactors*, 10(2–3), 99–104. <https://doi.org/10.1002/biof.5520100203>
- Wang, L., Li, J., Zhou, Q., Yang, G., Ding, X. L., Li, X., Cai, C. X., Zhang, Z., Wei, H. Y., Lu, T. H., Deng, X. W., & Huang, X. H. (2014). Rare earth elements activate endocytosis in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35), 12936–12941. <https://doi.org/10.1073/pnas.1413376111>
- Wang, X., Shan, X., Zhang, S., & Wen, B. (2003). Distribution of rare earth elements among chloroplast components of hyperaccumulator *Dicranopteris dichotoma*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(6), 913–917. <https://doi.org/10.1007/s00216-003-2014-y>
- Wang, Y., Li, J., Lü, Y., Jin, H., Deng, S., & Zeng, Y. (2012). Effects of cerium on growth and physiological characteristics of *Anabaena flosaquae*. *Journal of Rare Earths*, 30(12), 1287–1292. [https://doi.org/10.1016/S1002-0721\(12\)60222-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0721(12)60222-1)
- Xie, J., Wang, Z., Lu, S., Wu, D., Zhang, Z., & Kong, H. (2014). Removal and recovery of phosphate from water by lanthanum hydroxide materials. *Chemical Engineering Journal*, 254, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.05.113>
- Zhang, C., Liu, J., & Zhang, L. (2017). Cell cycles and proliferation patterns in *Haematococcus pluvialis*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 35(5), 1205–1211. <https://doi.org/10.1007/s00343-017-6103-8>