



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **107011** (13) **C2**
(51) МПК (2014.01)
A01G 33/00
G01N 33/18 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2012 12035	(72) Винахідник(и): Єрохін Владислав Євстафійович (UA), Гордієнко Алла Павлівна (UA), Солоніцина Ольга Ремівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 19.10.2012	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ПІВДЕННИХ МОРІВ ІМ. О.О. КОВАЛЕВСЬКОГО НАН УКРАЇНИ, пр. Нахімова, 2, м. Севастополь, 99011 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.11.2014	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: EP 2105050 A1, 30.09.2009 UA 87763 C2, 10.08.2009 UA 74819 C2, 15.02.2006 Л.В. Стельмах, В.И. Губанов, И.И. Бабич. Сезонные изменения скорости роста и лимитирование фитопланктона питательными веществами в прибрежных водах Черного моря в районе Севастополя. Морський екологічний журнал №4, Т. III, 2004 С.55-73 В.Н. Шихов, В.В. Величко, Т.В. Нестеренко, А.А. Тихомиров. Онтогенетический подход при оценке методом индукции флуоресценции хлорофилла реакции растений чувствительности на условия культивирования. Физиология растений. 2011, №2, Т.58 С.290-295 Даніель Адноф Мунір. Вплив умов вирощування на стабільність геному клітинних штамів <i>Rauwolfia serpentina</i> Benth. 03.00.22- молекулярна генетика. Автореф... к.б.н. Київ-2008 Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф. и др., Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике, К., "Наукова думка", 1975, С.5-18
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.04.2014, Бюл.№ 8	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.11.2014, Бюл.№ 21	

(54) СПОСІБ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КУЛЬТИВУВАННЯ ДИНОФІТОВИХ МІКРОВОДОРОСТЕЙ PROROCENTRUM CORDATUM ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ НА НИХ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК**(57) Реферат:**

Винахід належить до способу експериментального культивування динофітових мікроводоростей *Prorocentrum cordatum* для дослідження впливу на них фенольних сполук, що включає вирощування на поживних середовищах із додаванням мідійного гідролізату й фенолу, визначення рівня змін фізіолого-біохімічних параметрів мікроводоростей, де культури динофітових мікроводоростей попередньо адаптують у темряві до умов гетеротрофного живлення шляхом культивування на поживних середовищах до виходу культур на

UA 107011 C2

експоненційну фазу росту, після чого аліквоти культур використовують як інокулят для вирощування на поживних середовищах із фенолом.

Винахід належить до морської біології, переважно до санітарної гідробіології та фізіології мікроводоростей, і може бути використаним в токсикологічних експериментах і в роботах з вивчення механізмів пошкодження водоростей фенольними сполуками, а також при екологічному моніторингу.

Динофітові мікроводорості відіграють важливу роль у морських екосистемах, так, як беруть активну участь у круговороті речовин. З іншого боку, ці водорості чутливі до вмісту органічної речовини в водному середовищі, тому деякі види використовуються як біоіндикатори для санітарно-біологічної оцінки вод. Динофітові мікроводорості відносяться до масових чорноморських видів і для них характерні періоди масового розвитку, причому деякі види викликають "цвітіння" води. При відмиранні й розкладанні мікроводоростей утворюються значні кількості органічної речовини, у тому числі й фенольної природи, деградація якої викликає істотний вплив на морські екосистеми.

Для дослідження механізмів взаємодії мікроводоростей з токсикантами взагалі, і з фенолами зокрема використовуються різні способи експериментального культивування мікроводоростей [1]. Однак культивування морських динофітових мікроводоростей має ряд специфічних особливостей, які не враховуються в зазначених способах. Це пов'язане з особливостями їхнього метаболізму. Наприклад, при виникненні негативних факторів, що впливають на фотосинтез, і при наявності в середовищі органічних речовин, динофлагелати переходять на гетеротрофний механізм енергозабезпечення. Відомо, що речовини фенольної природи мають різні механізми взаємодії при автотрофному й гетеротрофному способах живлення, що ускладнює техніку постановки експерименту.

Найбільш близьким до заявленого способу, є технічне рішення, застосовуване для оцінки впливу фенольних сполук на морські водорості, у якому для культивування морських водоростей *Prorocentrum cordatum* використовується лужний мідійний гідролізат [2]. До недоліків цього й інших відомих способів варто віднести те, що не враховується різна тривалість латентного періоду (лаг-фази) при використанні несинхронізованих культур мікроводоростей у різних умовах, внаслідок неоднотимного переходу динофітових на гетеротрофний режим метаболізму.

В основу винаходу способу експериментального культивування динофітових мікроводоростей *Prorocentrum cordatum* для дослідження впливу на них фенольних сполук поставлена задача поліпшення техніки експериментального культивування динофітових мікроводоростей на поживних середовищах і підвищення вірогідності одержуваних фізіолого-біохімічних параметрів за рахунок вирівнювання фізіолого-біохімічних параметрів культур, їхньої синхронізації й підвищення толерантності до токсичних речовин.

Поставлена задача досягається тим, що для вирівнювання фізіолого-біохімічних параметрів культур, їхньої синхронізації й підвищення толерантності до токсичних речовин, введений технічний прийом по використанню аліквот адаптованих до гетеротрофного живлення культур, відібраних у період експонентної фази росту. Для цього культури динофітових мікроводоростей попередньо адаптують до умов гетеротрофного метаболізму шляхом вирощування на поживних середовищах із мідійним гідролізатом при концентраціях загального азоту в перерахуванні на білок від 0,05 до 0,5 мг на літр середовища, що близько до концентрації розчинених органічних речовин у морській воді. Введення в поживне лужне середовище гідролізату мідій при концентрації загального азоту в перерахуванні на білок від 0,05 до 0,5 мг на літр середовища використовується для зниження ефекту, ушкодження, при вивченні механізму дії токсичних речовин, а також для вивчення гетеротрофного метаболізму динофітових. З метою виключення в цей період автотрофного метаболізму, вирощування мікроводоростей проводять у темряві до виходу культур на експоненційну фазу росту (див. Фіг. 1). Зазначений прийом здійснюють також з метою скорочення періоду лаг-фази при постановці експериментів, тому що при переході водоростей на нове джерело живлення потрібен певний час для їхньої адаптації. В цей період мікроводорості мають стабільне співвідношення автотрофного й гетеротрофного метаболізму. Відібрані на цій фазі аліквоти поживного середовища культурою використовують для експериментального вирощування мікроводоростей як інокулят. При цьому в досліджуваних поживних середовищах можуть варіювати задані концентрації фенолу; наявність трофічно важливих розчинених у воді органічних речовин; рівні освітлення, наприклад, від темряви до $100 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$.

Винахід, що заявляється, пояснюється ілюстраціями. На Фіг. 1 - Динаміка росту культур *P. cordatum* у темряві, у гетеротрофних умовах при добавці лужного гідролізату мідій у концентраціях $0,05 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (2), $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (3) і в контролі на морській воді (1). По осі абсцис - Терміни культивування, години; по осі ординат - Оптична щільність культур, відн. од.; Фіг. 2 - Динаміка росту культур *P. cordatum* в темноті, в гетеротрофних умовах при добавлянні лужного

гідролізату мідій в концентраціях $0,05 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (3), $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (2) і в контролі на морській воді (1). По осі абсцис - Терміни культивування, години; по осі ординат - Оптична щільність культур, відн. од.. Вказані довірчі інтервали.; Фіг. 3 - Динаміка росту культур *P. cordatum* на морській воді (1), на морській воді з добавкою $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ лужного гідролізату мідій (2), а також при добавлянні фенолу в концентраціях $100 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (3) і $10 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (4) в культуральне середовище, що містить $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ лужного гідролізату мідій. По осі абсцис - Терміни культивування, години; по осі ординат - Кількість клітин в культурі, відн.од. Освітлення $100 \text{ мкЕ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$; Фіг. 4 - Динаміка росту культур *P. cordatum* на морській воді (1), на морській воді з добавкою $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ лужного гідролізату мідій (2), а також на морській воді з добавкою $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (3) і $0,25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (4) фенолу. По осі абсцис - Терміни культивування, доба; по осі ординат - Кількість клітин в культурі, відн.од. Освітлення $100 \text{ мкЕ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$; Фіг. 5 - Динаміка росту культур *P. cordatum* на морській воді з вмістом фенолу в концентраціях $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (1) і $0,25 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ (2), на фоні добавки в культуральне середовище $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ лужного гідролізату мідій. По осі абсцис - Терміни культивування, доба; по осі ординат - Кількість клітин в культурі, відн.од. Освітлення $100 \text{ мкЕ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$; Фіг. 6 - Динаміка росту культур *P. cordatum* на морській воді (1), на морській воді з добавкою $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ лужного гідролізату мідій (2), на морській воді з добавкою $0,75 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ фенолу (3), а також на морській воді з добавкою $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ лужного гідролізату мідій і $0,75 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ фенолу (4). По осі абсцис - Терміни культивування, доба; по осі ординат - Оптична щільність культур, відн. од. Освітлення $100 \text{ мкЕ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$.

Винахід, що заявляється, спосіб експериментального культивування динофітових мікроводоростей *Prorocentrum cordatum* для дослідження впливу на них фенольних сполук реалізується в такий спосіб.

Приклад.

Досліди проводили на альгологічно чистих культурах динофітових мікроводоростей *Prorocentrum cordatum* (Ostenfeld, 1901) Dodge, 1975 (Dinophyta), взятих з колекції відділу екологічної фізіології водоростей Інституту біології південних морів НАН України. Для адаптації до умов культивування із природним чергуванням фаз освітлення й темного періоду мікроводорості вирощували на ґратах з люмінесцентними лампами, при рівні освітленні культур від 1000 лк ($17 \text{ мкЕ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) до 6000 лк ($100 \text{ мкЕ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) протягом 6 год., а інший час при природному освітленні й тривалості світлового дня. Температура під час проведення дослідів становила від $+18^\circ\text{C}$ до $+26^\circ\text{C}$. Накопичувальну культуру вирощували в конічних колбах ємністю 200 мл, розводячи щільну культуру середовищем для дослідів до оптичної щільності 0,1 од. опт. шіл. (виміряну в 20 мм кюветі при 670 нм на КФК-2). Досліди проводили в трьох повторях. Визначення концентрації клітин у культурі мікроводоростей проводили стандартним способом прямого обліку в камері Горяєва й колориметричним методом. Культури в контролі вирощували або на середовищі Гольдберга в модифікації Ю.Г. Кабанової, або на пастеризованій морській воді, дослід - на тим же середовищі з додаванням мідійного гідролізату з кінцевою концентрацією білка до $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Дана концентрація білка не заважає фотокolorиметруванню культуральної рідини, є фізіологічно значимою для мікроводоростей і зустрічається в природних умовах. При цьому використовували наступну постановку експерименту. Після розведення культур до оптичної щільності 0,1 відн.од., у двох повторностях (контроль і дослід з концентрацією білка $0,5$ і $0,05 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) колби поміщали в бокс і накривали світлонепроникливою кришкою (див. Фіг. 1, 2). Вимір характеристик росту водоростей проводили один раз у добу до виходу культур на експонентну фазу росту, після чого аліквоти культур використовували як інокулят для експериментального вирощування на поживних середовищах із заданими концентраціями фенолу й гідролізату. На Фіг. 1 видно, що тривалість лаг-фази становить більше 70 годин, причому характер кривої росту різний для випробуваних концентрацій гідролізату й контролю на морській воді. На Фіг. 2 лаг-фаза практично відсутня. Слід зазначити, (див. Фіг. 3) що при концентрації фенолу $100 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ клітини водоростей втрачають рухливість з самого початку дослідів. Фіг. 4, 5 демонструють різні варіанти росту культур мікроводоростей при їх взаємодії з трофічно цінними і токсичними органічними речовинами розчиненими в морській воді.

Пропонований спосіб експериментального культивування динофітових мікроводоростей *P. cordatum* для дослідження впливу на них фенольних сполук дозволяє поліпшити техніку експериментального вирощування мікроводоростей на поживних середовищах із добавками токсичних і трофічно цінних речовин, а також підвищити достовірність отримуваних даних у порівнянні з контролем.

Зазначений ефект досягається в результаті вирівнювання фізіолого-біохімічних параметрів за рахунок адаптації культур динофітових водоростей до умов гетеротрофного метаболізму. Адаптацію здійснюють шляхом попереднього культивування мікроводоростей у темряві на

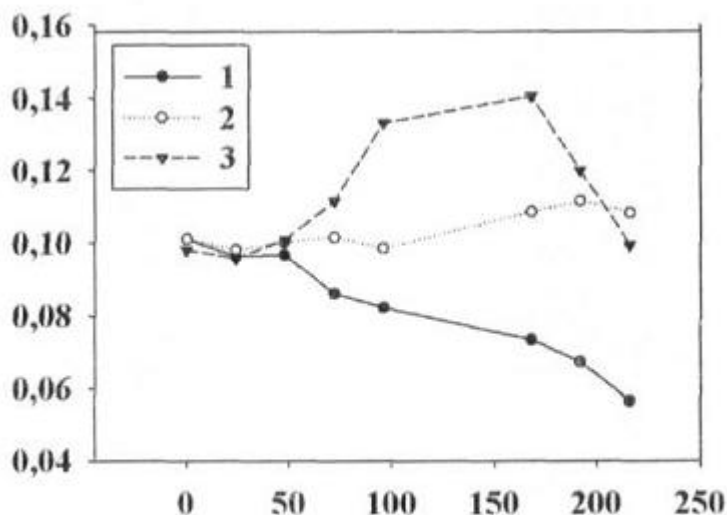
поживних середовищах із мідійним гідролізатом до виходу культур на експоненційну фазу росту.

Джерела інформації:

1. Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф. и др., Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике, К., "Наукова думка", 1975, 247 с.
2. Ерохин В.Е., Голубь Н.А., Гордиенко А.П. Влияние фенольных соединений на морские водоросли. // Збірник наукових статей до Міжнародної науково-практичної конференції "Екологічні проблеми Чорного моря" (27-28 жовтня, 2011, Одеса): 3-б. наук.ст./відп.ред. В.М. Небрат - Одеса: Інноваційно-інформаційний центр "ІНВАЦ", 2011, с. 257-260.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб експериментального культивування динофітових мікроводоростей *Prorocentrum cordatum* для дослідження впливу на них фенольних сполук, що включає вирощування на поживних середовищах із додаванням мідійного гідролізату й фенолу, визначення рівня змін фізіолого-біохімічних параметрів мікроводоростей, який **відрізняється** тим, що культури динофітових мікроводоростей попередньо адаптують у темряві до умов гетеротрофного живлення шляхом культивування на поживних середовищах до виходу культур на експоненційну фазу росту, після чого аліквоти культур використовують як інокулят для вирощування на поживних середовищах із фенолом.



Фиг. 1

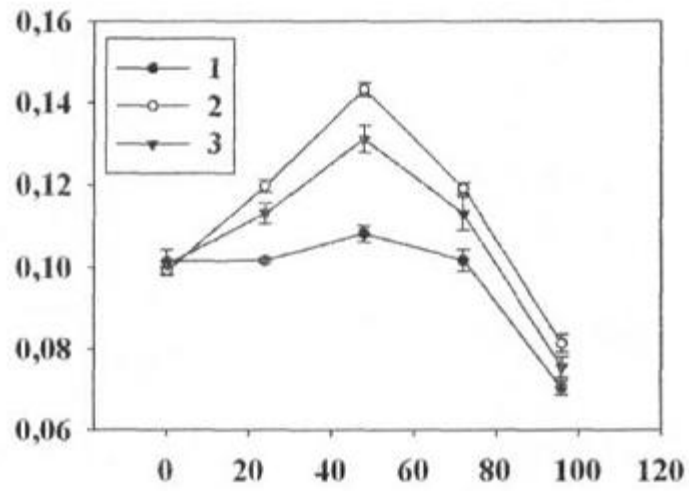


Fig. 2

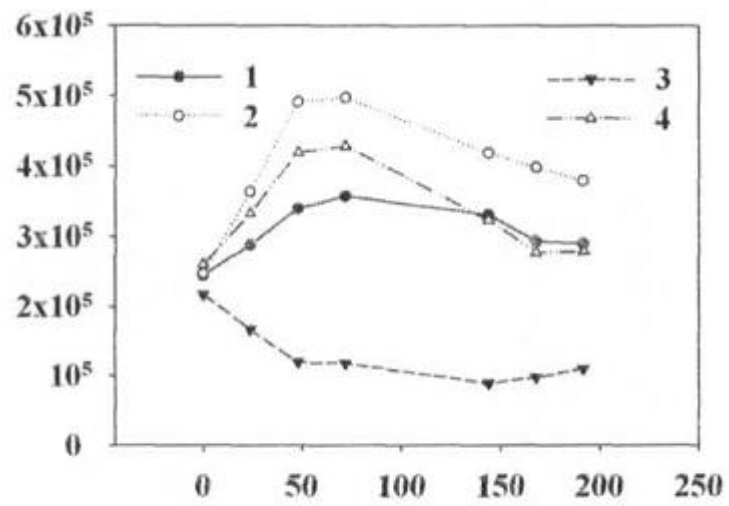


Fig. 3

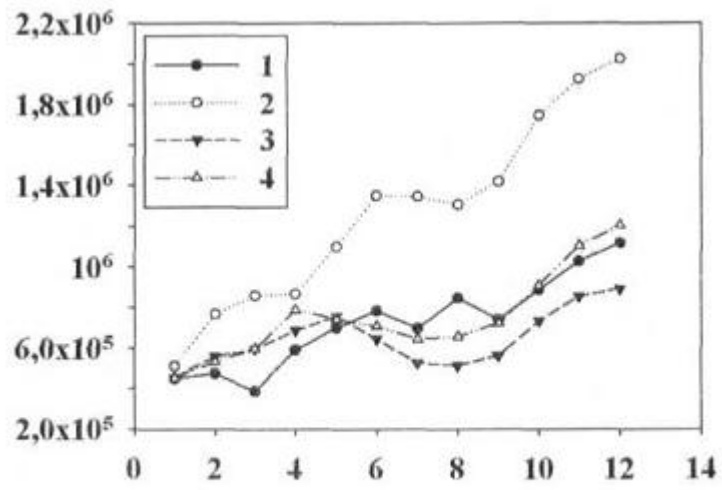


Fig. 4

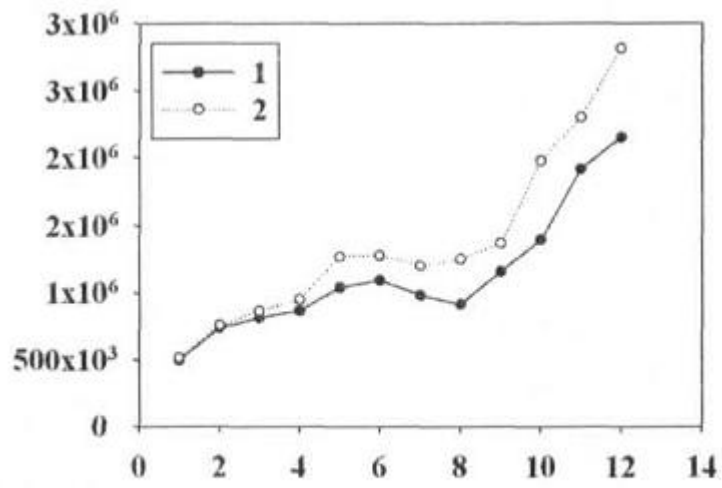


Fig. 5

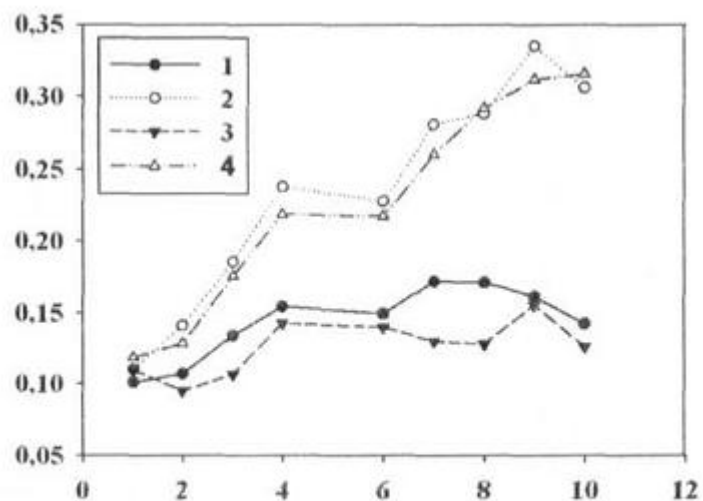


Fig. 6

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601