



УКРАЇНА

(19) UA (11) 65312 (13) U
(51) МПК
C12N 1/16 (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ НАКОПИЧУВАЛЬНОЇ КУЛЬТУРИ МОРСЬКИХ ДРІЖДЖІВ

1

2

(21) а201004985

(22) 26.04.2010

(24) 12.12.2011

(46) 12.12.2011, Бюл.№ 23, 2011 р.

(72) МИРОНОВ ОЛЕГ ГЛЕБОВИЧ, ДОРОШЕНКО
ЮЛІЯ ВАЛЕРІЙВНА, ЄНІНА ЛЮДМИЛА ВОЛОДИ-
МИРІВНА(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ПІВДЕННИХ МОРИВ ІМ.
О.О. КОВАЛЕВСЬКОГО НАН УКРАЇНИ(57) Спосіб одержання накопичувальної культури
морських дріжджів, що включає культивування
досліджуваного матеріалу на поживному середо-
вищі, як таке застосовують солодово-дріжджовий

бульйон, приготовлений на морській воді в наступній пропорції: дріжджовий екстракт - 3 мл, солодове сусло - 3 мл, пептон - 5 г, глюкоза - 10 г на 1 л морської води, який відрізняється тим, що середовище культивування підкисляють до рН 3,7-4,0, а перед культивуванням здійснюють виділення морських дріжджів, для чого досліджуваний матеріал розводять методом граничних розведень, виконуючи чотири розведення, після чого отриману суспензію відповідного розведення культивують протягом 2-7 днів при температурі 22-23°C.

Корисна модель належить до галузі морської санітарної гідробіології, а точніше до вивчення процесів самоочищення морського середовища й може бути використаний для визначення участі морських дріжджів у трансформації органічних забруднень у морській воді та передачі накопиченої речовини й енергії наступним ланкам харчового ланцюга.

Відомо, що дріжджі мають високу біохімічну активність і можуть окислювати різні органічні речовини. Великий інтерес для вивчення процесів самоочищення в морі становить здатність дріжджів використовувати нафтові вуглеводні як єдине джерело вуглецю й енергії [1, 2]. За даними М. І. Новожилової [3], дріжджі, виділені з Каспійського моря, активно утилізували сиру нафту, солярове масло й гас.

Що стосується дріжджів Чорного моря, то наявна інформація про цю групу мікроорганізмів обмежена 50-70-ми роками 20 сторіччя. Для виділення дріжджових організмів із морської води використовували м'ясо-пептонні середовища, наприклад, м'ясо-пептонний желатин і м'ясо-пептонний агар з 3 % солі, а також відвари морських водоростей. Однак, розвиток хімічної промисловості і задача уніфікації різних досліджень обумовили застосування суслених середовищ (рідких або агаризованих) і органічних середовищ (наприклад, солодово-дріжджовий бульйон).

Відома робота (див. Дорошенко Ю. В. Исследование ростовых характеристик бактериальных и

дрожжевых культур перифитона систем гидробиологической очистки морских вод // Экология моря. - 2008. - Вып. 76. - С. 49-53), у якій для вивчення росту дріжджових культур використовували поживне середовище СДБ наступного складу: дріжджовий екстракт - 3 мл, солодове сусло - 3 мл, пептон - 5 г, глюкоза - 10 г на 1 л морської води [3]. Недоліком є те, що відомий спосіб не здатний забезпечити виділення морських дріжджів без додаткових прийомів очищення накопичувальної культури від супутніх бактерій. У деяких випадках виділення морських дріжджів взагалі не можливе. Ця обставина, головним чином, обумовлена присутністю в пробах із дріжджами вищих морських грибів. Вищі морські гриби не тільки пригнічують ріст дріжджів, але й можуть інфікувати культури бактерій і дріжджів, які наявні в лабораторному приміщенні.

В основу корисної моделі Спосіб одержання накопичувальної культури морських дріжджів поставлено задачу шляхом удосконалення технології забезпечити виділення й зберігання культур морських дріжджів.

Поставлена задача вирішується тим, що середовище культивування підкисляють до рН=3,7-4,0, перед культивуванням здійснюють виділення морських дріжджів, для чого досліджуваний матеріал попередньо розводять методом граничних розведень, потім культивують одержану суспензію відповідного розведення протягом 2-7 днів при температурі 22-23 °C.

(13) U
(11) 65312
(19) UA

Підкислення поживного середовища до pH 3,7-4,0 дозволяє пригнітити ріст морських бактерій.

Для виділення морських дріжджів автори застосовують метод граничних розведень. Розведення роблять у стерильному 0,5 %-ному водному розчині NaCl, розлитому в сухі пробірки. Потім додають досліджуваній матеріал і пробірку ретельно збовтують протягом 5 хв. для відділення бактерій від часточок ґрунту. Це розведення відповідає 1:10. Отриману суспензію активно перемішують, 1 мл отриманого розведення вносять у наступну пробірку з NaCl - це розведення 10^2 . З неї знову відбирають 1 мл суспензії й вносять у третю пробірку. Таким чином одержують відповідні розведення: 1,0; 0,1; 0,01 і т. д. Цю операцію повторюють 3 рази до розведення 1:10000 ($1:10^4$). Така кількість розведень було підібрано експериментально на стадії відпрацювання методики. Як правило, у п'ятому й більших розведеннях ріст дріжджів не відбувається. Таким чином, з огляду на таку властивість дріжджів, як мікрорезистентність, можна використовувати метод граничних розведень як селективний метод для виділення дріжджів.

Для одержання накопичувальної культури дріжджів відоме поживне середовище, підкислене до pH 3,7-4,0, засівають одержаною суспензією з різних розведень паралельно в трьох повторностях. Після інкубації відповідної суспензії при температурі 22-23 °C у деяких пробірках візуально спостерігають ознаки росту накопичувальної культури: помутніння, осад, дріжджову плівку на поверхні середовища. Експериментально авторами було встановлено, що висівання накопичувальної культури вже через 2 дні дозволяє частково уникнути росту мікроміцетів. Уже другої доби з накопичувальної культури висівали матеріал на дріжджове агаризоване середовище - СДА і залишали в термостаті при температурі 27-28 °C. Через 3-7 днів характерні для дріжджів колонії відсівали в пробірки зі скошеним агаром того ж складу. Після перевірки культури на чистоту, їх переносили на середовище СДБ, на якому і зберігали.

Приклад.

Для виявлення ролі морських дріжджів у процесах самоочищення як об'єкт були вибрані системи гідробіологічної очистки морських вод (штучні рифи), розташовані в Нафтогавані Севастопольської бухти. На системах сформувалося й функціонувало угруповання обростання, у складі якого переважали мідії. Детальне вивчення морських дріжджів перифітону цих систем не проводилося.

До відбору проб попередньо приготували поживне середовище (солодово-дріжджовий бульйон) наступного складу: дріжджовий екстракт - 3 мл, солодове сусло - 3 мл, пептон - 5 г, глюкоза - 10 г на 1 л морської води.

Середовище підкислили молочною кислотою до pH 3,7-4,0, потім розливали по пробірках і стерилізували в автоклаві 20 хв. при 121 °C.

Розведення робили в стерильному 0,5 %-ному водному розчині NaCl, який розливали піпеткою по 9 мл у сухі пробірки. В одну з них додавали 1 г перифітону й ретельно збовтували протягом 5 хв. з метою відділення дріжджів від часточок детриту й макроводоростей, одержавши, таким чином, розведення 1:10. Після цього із цієї пробірки відбирали 1 мл суспензії й переносили в наступну пробірку, одержавши розведення 1:100 ($1:10^2$). Цю операцію повторювали 3 рази до розведення 1:10000 ($1:10^4$). Після виконання описаної вище операції з кожної пробірки з відповідним розведенням засівали по 1 мл отриманої суспензії в пробірки з поживним середовищем (СДБ) у трьох повторностях. Одержали 12 пробірок з поживним середовищем, засіяним досліджуванім матеріалом. Вже другої доби спостерігали ознаки росту дріжджових культур: помутніння, плівку на поверхні середовища й на стінках пробірок, осад. Із пробірок з ознаками росту робили висів на агаризоване середовище (солодово-дріжджовий агар) на чашки Петрі. Чашки Петрі поміщали в термостат з температурою 22-23 °C і культивували дріжджові культури протягом 2-7 діб. Вирослі колонії виділяли в пробірки зі скошеним агаром і перевіряли на чистоту. Висів на агаризоване середовище проводили далі після виявлення ознак росту дріжджових культур, при цьому працювали лише з тими пробірками, де не було явних ознак росту вищих грибів. Перевірені на чистоту культури морських дріжджів використовували для одержання експериментальних даних щодо фізіолого-біохімічної активності, а також для ідентифікації виділених культур.

У результаті досліджень уперше були виділені 67 культур морських дріжджів з перифітону систем гідробіологічного очищення морської води. Переважали великі, темні, овальні, з однобічним брунькуванням клітини. Всі виділені культури дріжджів могли використовувати нафту або нафтопродукти як єдине джерело вуглецю й енергії.

Перевагами способу є те, що він дозволяє одержувати накопичувальні культури морських дріжджів, очищені від культур морських бактерій, а також цілком виключити можливість росту вищих грибів при висіві на агаризовані середовища і, таким чином, зменшити матеріальні витрати на проведені дослідження.

Джерела інформації:

1. Prabhakaran N. Hydrocarbon degrading yeasts from Cochin Backwater / N. Prabhakaran, P. Sivadas // J.-Mar.-Biol.-Assoc.-India.-1995-37, № 1-2. - P. 226-230.

2. Zinjarde S. S. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments / S. S. Zinjarde, A. A. Pant // Marine Pollution Bulletin.-2002. - V. 44, № 2. - P. 118-121.

3. Новожилова М. И. Аспорогенные дрожжи и их роль в водоемах / М. И. Новожилова. - Алмата: Наука, 1979.-200 с.