



УКРАЇНА

(19) UA (11) 16270 (13) U
(51) МПК (2006)
C12N 1/12
G01N 21/76
C12R 1/89 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ ОДНОКЛІТИННИХ ВОДОРОСТЕЙ

1

(21) 20040403008
(22) 22.04.2004
(24) 15.08.2006
(46) 15.08.2006, Бюл. № 8, 2006 р.
(72) Єрохін Владислав Євстафійович, Гордієнко Алла Павлівна, Мінюк Галина Семенівна
(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ПІВДЕННИХ МОРИВ ІМ.О.О.КОВАЛЕВСЬКОГО НАН УКРАЇНИ
(57) Спосіб культивування одноклітинних водоростей, що включає вирощування водоростей і контроль за розвитком культур, який відрізняється

2

тим, що контроль здійснюють шляхом люмінесцентного спектрального аналізу, який включає попередній відбір по спектру люмінесценції культур водоростей довжин хвиль збудження, регулярну реєстрацію спектрів люмінесценції культивованих водоростей у період їхнього вирощування і визначення співвідношень інтенсивностей смуг випромінювання пігментів, а за результатами аналізу спектрів коректують технологічний режим культивування водоростей.

Передбачувана корисна модель відноситься до біотехнології і може бути використана при культивуванні одноклітинних водоростей в інженерних системах з регульованими параметрами середовища.

Відомий спосіб промислового вирощування одноклітинних водоростей-цианобактерії *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* у культиваторах відкритого типу методом непропорційно проточної культури [див. Мінюк Г.С., Дробецкая И.В., Тренкеншу Р.П., Вялова О.Ю. Ростовые и биохимические характеристики *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Nordst.) Geitler при различных условиях азотного питания // Экология моря - 2002. - Вып. 62. - С.61-66]. Спіруліну вирощують у скляних чи плівкових теплицях при природному освітленні на мінеральному середовищі Заррука в культиваторах, що представляють собою прямокутні басейни площею 10м² і об'ємом 1-1,5м³. Інокулят маткової культури вносять у поживне середовище таким чином, щоб початкова величина біомаси в басейнах складала 0,3-0,4г абсолютно сухої речовини (АСР) у літрі культури. Через 1-2 дня після досягнення культурою щільності 0,5-0,6г АСР/л роблять періодичну (через 24-48 годин) заміну 10-30% суспензії ціанобактерій на рівноцінний обсяг живильного свіжови-

готовленого середовища. Для підтримки щільності культури на заданому рівні додатково проводять поверхневий збір біомаси. Розрахунок об'єму суспензії ціанобактерій, замінений на поживне середовище проводиться з розрахунками динаміки величин фізіолого-біохімічних показників стану культури. Темпи росту культури оцінюють по величинах середньодобової продуктивності (Р) і питомої швидкості росту (μ). Про зміни інтенсивності клітинного метаболізму судять по вмісту в біомасі білка (як основного компонента сухої речовини кліток), вмісту пігментів фотосинтетичного комплексу (хлорофілу α, С-фікоціанину і сумарних каротиноїдов), значенням рН і солоності культурального середовища.

На підставі аналізу результатів лабораторного контролю проводять коректування технологічного режиму вирощування спіруліни з метою підтримки продуктивності культури на рівні 9-10м АСВ/м² доба⁻¹ і одержання біомаси, що характеризується високим вмістом біологічно активних речовин.

Недоліком описаного методу культивування є низька оперативність одержання інформації про фізіологічний стан культури через трудомісткість методів визначення використовуваних фізіолого-

(19) UA (11) 16270 (13) U

біохімічних показників. Результати аналізів надходять на виробничу ділянку через 1,5-2 доби після збору зразків, коректування технологічного процесу проводиться з запізненням, що у визначеній мірі знижують і врожайність спіруліни і її біологічну цінність. Крім того, суттєву погіршеність у результаті визначення вмісту пігментів у сухій біомасі можуть вносити зміни технології сушіння, викликані несприятливими кліматичними умовами (затяжні дощі, зниження температури повітря та ін.), а також технічні збої різного характеру (відключення електроенергії, вихід з ладу вентиляторів, теплогенераторів і т.п.).

В основу корисної моделі "Спосіб культивування одноклітинних водоростей" поставлена задача шляхом контролю і регулювання параметрів культивування забезпечити підвищення ефективності процесу культивування.

Поставлена задача досягається тим, що в "Способі культивування одноклітинних водоростей", що включає вирощування водоростей і контроль за фізіологічним станом культури, останній здійснюється шляхом люмінесцентного спектрального аналізу, що включає попередній відбір по спектру люмінесценції водоростей довжин хвиль збудження, регулярну реєстрацію спектрів люмінесценції при культивуванні водоростей у період їхнього вирощування і визначення співвідношення інтенсивностей смуг випромінювання пігментів, а за результатами аналізу спектрів коректується технологічний режим їх культивування.

Перелік фігур креслення.

Фіг.1 - крива росту *S. Platensis* в накопичувальній культурі при різній забезпеченості азотом (1-60мг N⁺⁵/л; 2-206мг N⁺⁵/л; 3-412мг N⁺⁵/л;

Фіг.2 - Характерний спектр люмінесценції культури синьозелених водоростей-цианобактерій *Spirulina platensis*;

Фіг.3 - Динаміка зміни інтенсивності (в відн. Один.) флуоресценції водоростей *S. Platensis* при різних довжинах хвиль і різному вмісті азоту в культуральному середовищі;

Фіг.4 - Динаміка зміни співвідношення інтенсивності флуоресценції;

Фіг.5 - Інтенсивність флуоресценції мерез 24 години після зміни режиму культивування.

Відомо [див. Карнаухов В.Н., Керженцев А.С., Лисовский А.Е., Яшин В.А. Люминесцентный микроспектральный анализ в биомониторинге загрязнения воздушной среды: Препр. / АН СРСР. Научный центр биологических исследований; - Пущино: 1983. - 31с.] застосування люмінесцентного мікроспектрального аналізу для контролю за станом систем енергетичного обміну кліток рослин з метою біомоніторингу. При цьому було показано, що, як характеристичний параметр, відображаючий співвідношення фотоавтотрофного і гетеротрофного компонентів системи енергозабезпечення фотосинтезуючих клітин вищих рослин і деяких водоростей, може бути використане відношення інтенсивності люмінесценції хлорофілу в довжині хвилі $\lambda = 680$ нм (I_{680}) до інтенсивності люмінесценції окислених флаво-протеїнів мітохондріальної (гетеротрофної) системи енергозабезпечення в довжині хвилі $\lambda = 530$ нм (I_{530}):

$$\chi = I_{680} / I_{530} \quad (1)$$

Крім того, для опису фізіологічного стану клітин водоростей ці ж автори використовували співвідношення:

$$\varphi = I_{680} / I_{643} \quad (2)$$

$$\psi = I_{680} / I_{572} \quad (3)$$

де:

I_{680} - інтенсивність смуги випромінювання хлорофілу в $\lambda = 680$ нм;

I_{643} - інтенсивність смуги випромінювання фікоціаніну в $\lambda = 643$ нм;

I_{572} - інтенсивність смуги випромінювання фікоеритрину в $\lambda = 572$ нм. встановлено

Відомо що відновлені піридиннуклеотиди (НАД Н і НАДФ Н) мають власну люмінесценцію в області 465-480нм. При переході в окислений стан, здатність до люмінесценції втрачається. Окислені форми флавінмононуклеотиду (ФМН) і флавінадениндинуклеотиду (ФАД) мають люмінесценцію в області 520-530нм. Таким чином, вимірювання спектрів люмінесценції і визначення по них характеристичних параметрів може бути використане для оцінки фізіологічного стану одноклітинних водоростей у процесі культивування.

Нами цей підхід був використаний для оцінки фізіологічного стану одноклітинних водоростей у процесі культивування з наступною корекцією складу поживного середовища. На Фіг. 2 представлений спектр люмінесценції ціанобактерій *Spirulina (Arthrospira) platensis*. По спектру люмінесценції вибирають довжини хвиль збудження, характерні для даних водоростей. Для інших груп одноклітинних водоростей спектри будуть мати іншу форму.

Спосіб реалізується таким чином.

У басейни, заповнені живильним мінеральним середовищем, оптимальним для вирощуваного виду одноклітинних водоростей, одночасно вносять рівну кількість альгологічно чистого інокуляту одноклітинних водоростей, таким чином, щоб початкова щільність культури складала не менш 0,3-0,4г АСР/л. Щодня протягом 3-5-ти днів після заселення басейнів в умовах накопичувальної культури контролюють приріст біомаси фотоколориметричним способом. Після досягнення рівня 0,5-0,6г АСР/л переходять до регулярної, щоденної реєстрації спектрів люмінесценції культивуємих одноклітинних водоростей. Відбирають аліквоту суспензії одноклітинних водоростей об'ємом 10мл. У кювету спектрофлуорофотометра "Shimadzu RF 5000" вносять після темної адаптації протягом 15 хвилин 3мл культури і реєструють спектр люмінесценції культури водоростей *in vivo*.

На основі даних по вимірюванню спектрів люмінесценції, використовуючи (1), (2) і (3) розраховують характеристичні параметри (співвідношення інтенсивностей смуг випромінювання пігментів), що відбивають співвідношення фотоавтотрофного і гетеротрофного компонентів системи енергозабезпечення фотосинтезуючих кліток, після чого коректують хімічний склад поживного середовища.

Приклад реалізації способу.

Культиватори заповнювали поживним мінеральним середовищем Заррука утримуючим 412мг

N^+ /л, вносили альгологічно чистий інокулят маткової культури ціанобактерій *Spirulina platensis*, таким чином, щоб початкова щільність культури складала не менш 0,3-0,4г АСП/л. У момент внесення інокулята температура поживного розчину була не нижче 25°C. Щодня протягом 15-ти днів контролювали приріст біомаси фотоколориметричним способом. Після досягнення рівня 0,5-0,6г АСП/л реєстрували спектри люмінесценції культивуємих водоростей, визначали співвідношення інтенсивностей смуг випромінювання пігментів і коректували хімічний склад поживного середовища. У кювету спектрофлуорофотометра "Shimadzu RF 5000" після темнотної адаптації протягом 15 хвилин вносили 3мл культури і реєстрували спектр люмінесценції культури водоростей *in vivo*. Збудження здійснювали випромінюванням ксенонової лампи в довжині хвилі 365нм (щілина 5-10нм). Вимірювання проводили в спеціальній не флуоресцюючій кюветі товщиною 10мм, розташованій з можливістю реєстрації спектрів люмінесценції під кутом 90°. У ряді випадків використовували інші довжини хвиль збудження (436, 515, 546нм), чи здійснювали синхронне сканування зразків з попереднім збудженням на 20-30нм.

Динаміка зміни інтенсивності (в відн. од.) люмінесценції водоростей *S. platensis* в різних довжинах хвиль представлена на Фіг.3. На 5-й день культивування були зареєстровані явні зміни фізіологічного стану водоростей не тільки у варіантах зі зниженим змістом азоту в середовищі (60мг N^+ /л і 206мг N^+ /л), але й у контролі (412мг N^+ /л). У відомому способі (див. Фіг.1) варіанти зі зниженим змі-

стом азоту практично не відрізнялися один від одного.

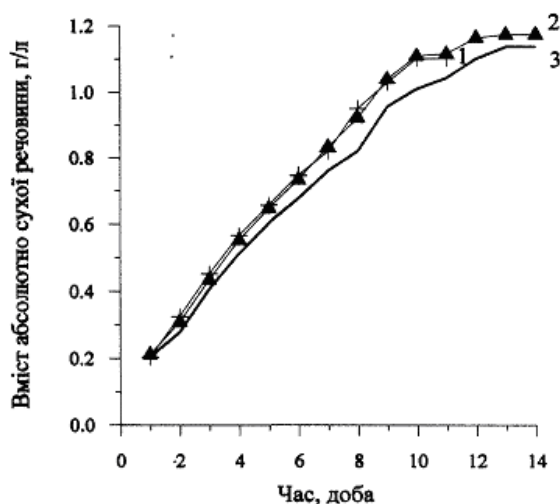
На Фіг.4 представлена динаміка зміни (% до контролю) співвідношень інтенсивності люмінесценції. Зміни фізіологічного стану водоростей у варіантах зі зниженим вмістом азоту були відзначені вже через добу після початку культивування. При початковому вмісті азоту 50% від контролю зміна стану водоростей виявлялося в більш пізні терміни (5-6 доба від початку культивування). Зміни фізіологічного стану водоростей підтверджуються співвідношеннями інтенсивності флуоресценції (див. Фіг.4). Одержав дані, які свідчать про порушення енерговиробляючого апарату культивуємих водоростей, у живильне середовище додавали поживні елементи, що були присутніми у початковому середовищі і через 6 годин проводили люмінесцентний аналіз. Було відзначено збільшення інтенсивності люмінесценції, яке стало явним через добу експозиції (див. Фіг.5).

Таким чином, реєстрація спектрів люмінесценції культурального середовища та мікрowodоростей і визначення співвідношення інтенсивностей смуг випромінювання пігментів дозволяють одержати оперативну інформацію про стан водоростей, коректувати режим, їх культивування.

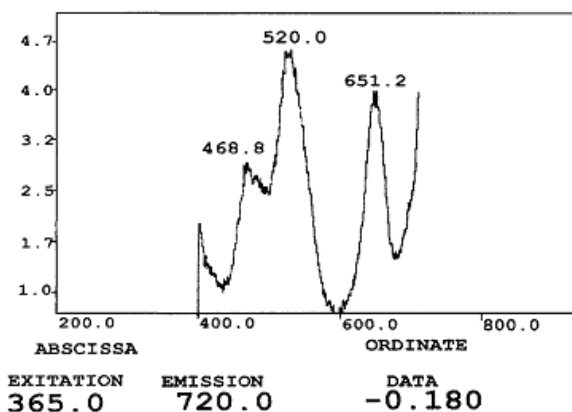
Пропонований спосіб має ряд переваг:

- висока оперативність одержання інформації про фізіологічний стан культури в процесі культивування;

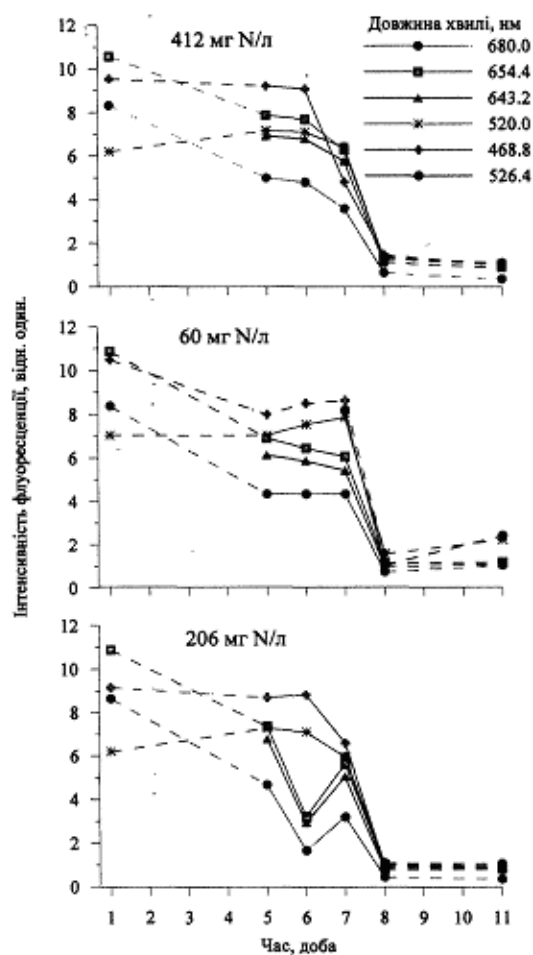
- своєчасне коректування технологічного процесу, що дозволяє підвищити врожайність культивуємих водоростей і їхню біологічну цінність.



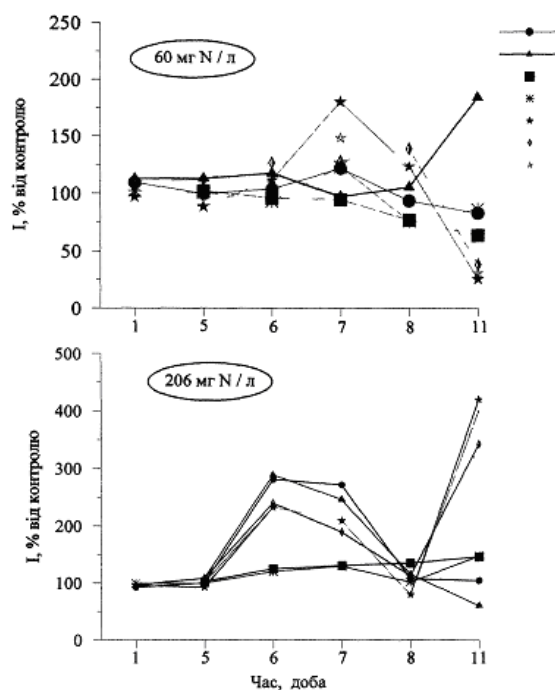
Фіг. 1



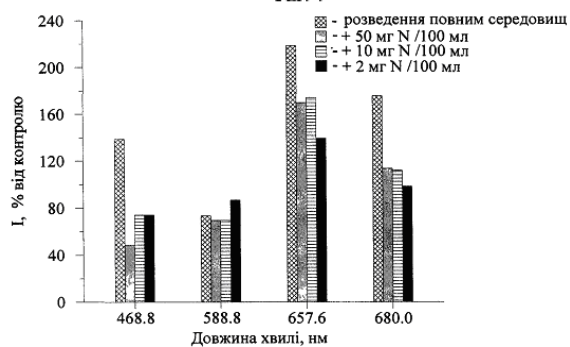
Фіг. 2



Фіг.3



Фіг. 4



Фіг. 5