

УДК 582.261/.279, 579.6  
DOI 10.17724/1728\_2748.2020.83.29-32

В. Петльована, канд. біол. наук,  
Чен МінЛей, асп.  
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

## ОЧИЩЕННЯ КУЛЬТУР МІКРОВОДОРОСТЕЙ КОЛЕКЦІЇ АСКУ ВІД ГРИБНИХ КОНТАМІНАНТІВ

Роботу присвячено підбору оптимальних методів очищення штамів мікроводоростей із колекції АСКУ (Algae Culture Collection of Kyiv University) від контамінації мікроскопічними грибами.

Проведено скринінг колекції культур мікроводоростей АСКУ. Виявлено контамінацію деяких штамів мікроводоростей грибами родів *Cladosporium* Link, *Alternaria* Nees та *Monilia* Bonord. Для експерименту відібрано штами АСКУ 139-02 (*Klebsormidium flaccidum* (Kütz.) P.C. Silva, Mattox et Blackwell), АСКУ 293-04 (*Acutodesmus obliquus* (Turpin) P. Tsarenko), АСКУ 364-04 (cf. *Chlorosarcinopsis dissociata* Herndon), АСКУ 599-06 (*Klebsormidium nitens* Menegh. in Kütz. 1849), АСКУ 600-06 (*Klebsormidium flaccidum* (Kütz.) P.C. Silva, Mattox et Blackwell) та АСКУ 1056 (*Desmodesmus abundans* (Kirchn.) E. Hegew.). Досліджено вплив карбендазиму (Methylbenzimidazol-2-ylcarbamate), Antibiotic Antimycotic Solution (пеніцилін – 10 000 МО, стрептомицин – 10 мг, амфотерицин В – 25 мкг) та Nuosept ВМС 422 на гриби-контаміанти штамів культур зелених водоростей із різним типом морфологічної структури талому (кокоїдні та нитчасті). Експериментальні концентрації речовин: карбендазим – 0,005 %, Antibiotic Antimycotic Solution – 1 %, Nuosept ВМС 422 – 0,05 % та 0,2 %. Показано, що Antibiotic Antimycotic Solution та Nuosept ВМС-422 у заявлених концентраціях виявилися не ефективними для очищення штамів зелених водоростей від значного забруднення мікроскопічними грибами. Установлено, що розчин карбендазиму є ефективним при очищенні штамів кокоїдних зелених водоростей від контамінації мікроскопічними грибами *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries). У результаті для штаму АСКУ № 293-04 (*A. obliquus*) було отримано аксентичну культуру.

**Ключові слова:** штам, АСКУ, культивування, мікроскопічні зелені водорості, Chlorophyta, контамінація, карбендазим, Antibiotic Antimycotic Solution, Nuosept ВМС 422.

**Вступ.** Поширення мікроскопічних водоростей у природі та їхнє значення для людства важко переоцінити. Культивування мікроводоростей – сучасна та перспективна галузь біотехнології. Попит на промислове культивування водоростей наразі збільшується із різних причин. Зокрема, мікроскопічні водорості використовують для виробництва біопалива, кормів для тварин, продуктів харчування, а також у косметологічній і фармацевтичній галузях. У біотехнологічних процесах приділяється увага функціональній активності фотосинтетичного апарату, дослідженням фізіолого-біохімічних і генетичних характеристик культур, пошуку нових перспективних штамів тощо [2], [5], [3]. У зв'язку із цим важливого значення набуває збереження існуючих і створення нових колекцій живих культур мікроводоростей як генетичних банків потенційно перспективних штамів. Важливим завданням при роботі з колекціями водоростей є постійне вдосконалення методів підтримання в культурі та збереження генофонду мікроводоростей, оцінка їх життєздатності, забезпечення сталості морфологічних параметрів і стабільності біохімічних компонентів [4].

Основою для проведення оригінальних досліджень є колекція культур мікроводоростей Київського національного університету імені Тараса Шевченка (офіційний акронім: АСКУ, від Algae Culture Collection of Kyiv University), що призначена для збереження представлених у ній мікроскопічних водоростей як матеріалу для забезпечення науково-дослідної роботи та навчального процесу. Основу АСКУ становлять штами, що були

ізолювані з наземних і прісноводних біотопів. На сьогодні колекція АСКУ об'єднує більше 1000 штамів (включаючи близько 300 автентичних), що належать переважно до відділів Chlorophyta та Xanthophyta [1].

Великою проблемою вирощування та підтримання в культурі мікроскопічних водоростей є контамінація штамів водоростей бактеріями та грибами. Серед прийнятих методів очищення культур від контамінантів різної природи наразі використовують: 1) серійне пересівання, 2) послідовну зміну фази поживного середовища (рідке/агаризоване), 3) центрифугування, 4) додавання в середовище бактерицидних або фунгіцидних речовин.

Особливою проблемою при культивуванні та зберіганні штамів мікроводоростей є забруднення грибами, що пов'язано з їх біологічними особливостями. Дослідження, що представлені у нашій роботі, присвячені саме очищенню штамів водоростей від мікроскопічних грибів-контамінантів за допомогою фунгіцидів.

**Мета роботи:** оптимізація методів очищення штамів мікроводоростей від контамінування грибами за рахунок використання фунгіцидних і бактерицидних речовин.

**Матеріали та методи.** Для дослідження з колекції АСКУ було обрано шість штамів мікроводоростей, що належать до відділу Chlorophyta (табл. 1). Відбір здійснювали після візуального обстеження колекції на наявність грибних контамінантів. Обрані екземпляри штамів зазнали значного впливу забруднення грибами з родів *Cladosporium* Link, *Alternaria* Nees, *Monilia* Bonord. та ін.

Таблиця 1. Перелік штамів, використаних для дослідження

| Штам        | Вид                                                                                                                       | Тип будови талому | Контамінант                                                      |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------|
| АСКУ 139-02 | <i>Klebsormidium flaccidum</i> (Kütz.) P.C. Silva, Mattox et Blackwell 1972                                               | нитчастий         | <i>Cladosporium</i> sp.                                          |
| АСКУ 293-04 | <i>Scenedesmus obliquus</i> (Turpin) Kütz. 1833<br>(= <i>Acutodesmus obliquus</i> (Turpin) P. Tsarenko et Petlovany 2001) | кокоїдний         | <i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries 1952 |
| АСКУ 364-04 | cf. <i>Chlorosarcinopsis dissociata</i> Herndon 1958                                                                      | кокоїдний         | <i>Alternaria</i> sp.                                            |
| АСКУ 599-06 | <i>Klebsormidium nitens</i> Menegh. in Kütz. 1849                                                                         | нитчастий         | не ідентифікований                                               |
| АСКУ 600-06 | <i>Klebsormidium flaccidum</i> (Kütz.) P.C. Silva, Mattox et Blackwell 1972                                               | нитчастий         | не ідентифікований                                               |
| АСКУ 1056   | <i>Scenedesmus quadricornis</i> Chodat 1913<br>(= <i>Desmodesmus abundans</i> (Kirchn.) E. Hegew. 2000)                   | кокоїдний         | <i>Moniliacandida</i> Pers. 1801                                 |

**Примітка:** *Acutodesmus obliquus* та *Desmodesmus abundans* у природних умовах представлені ценобіями, що зазвичай складаються із чотирьох клітин (рідко двох або восьми), проте в умовах культури часто представлені одноклітинними формами (особливо на агаризованому середовищі).

Для проведення досліджень були використані такі препарати:

- Карбендазим [Methylbenzimidazol-2-ylcarbamate] / (C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) – системний фунгіцид із класу бензімідазолів, один із перших системних фунгіцидів, що широко використовуються в аграрній промисловості. Ефективність цієї речовини для видалення грибів раніше була вивчена на прикладі культури зеленої водорості *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dang. [4]. Препарат використовували у концентрації 0,005 %.

- Antibiotic Antimycotic Solution (x100) – AAS (склад на 1 мл: пеніциліну – 10 000 МО, стрептоміцину – 10 мг, амфотерицину В – 25 мкг) – комплексний антибіотичний та антимікотичний розчин, що використовується як добавка в різних типах клітинних культуральних середовищ. Використовували препарат у концентрації 1 %.

- Nuosept ВМс 422 – біцид широкого спектра дії, що використовується як консервант при виготовленні лакофарбової продукції. Використовували у двох концентраціях – 0,05 % та 0,2%.

Дослідження проводили з використанням агаризованого стандартного середовища Болда (Bold Basal Medium, 1N BBM) для контрольного варіанта та із додаванням одного із зазначених препаратів у відповідній концентрації для експериментальних варіантів (усього чотири модифікації + контроль). Метод посіву – штриховий, повторність – трикратна. Культивування здійснювали у чашках Петрі, у люміностаці з люмінесцентними лампами ЛБ-40 із 12-годинними періодами освітлення та затемнення за температури 18–22 °С. Дослідження проводили впродовж 12 діб. Після першого пересіву щодня проводили візуальний контроль розвитку водоростей та контамінантів і кожні чотири доби з кожного штриха відбирали візуально більш-менш чисті від контамінантів ділянки розростання водоростевих клітин і переносили їх на свіже поживне середовище відповідного складу. Усього було проведено три пасажі. Загальна схема експерименту представлена на рис. 1.

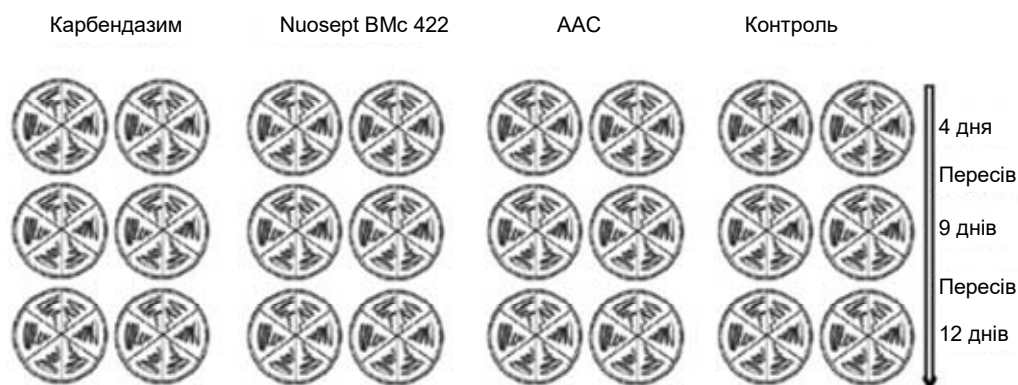


Рис. 1. Схема експерименту

**Результати та їх обговорення.** За чотири дні після першого пасажу на середовищі з додаванням карбендазиму у досліджуваних штамів візуально не спостерігалось значних змін за кількістю грибних контамінантів порівняно із контролем (рис. 2: 1-6). Виняток становив лише штам АСКУ 293-04. Скоріш за все, такий результат зумовлений методом посіву та типом морфологічної структури талому мікроводорості *Acutodesmus obliquus*. Зазвичай за умов тривалого культивування ценобіальні кокоїдні індивіди переходять до одноклітинної форми, що краще проявляється на твердому (агаризованому) середовищі. Такі форми легше розсіваються та приживаються на новому середовищі, формуючи окремі ізолювані пляшки. Вони майже не пошкоджуються механічно під час пересіву, а також мають меншу ймовірність зберегти супутні забруднювачі під час пересіву, ніж нитчасті форми.

Видимі зміни дії карбендазиму для решти штамів (АСКУ 139-02, АСКУ 364-04, АСКУ 599-06, АСКУ 600-06, АСКУ 1056) спостерігалися на восьму добу експерименту (четверта доба після другого пасажу): ріст водоростей і грибів сповільнився, кількість контамінантів зменшилася. Для АСКУ 293-04 (*Acutodesmus obliquus*) зазначено збільшення біомаси водоростей без видимих ознак контамінації.

На дванадцяту добу експерименту (четверта доба після третього пасажу) на середовищі з додаванням

карбендазиму ріст п'яти з досліджуваних штамів водоростей припинився, хоча рівень контамінації майже не зменшився порівняно з другим пасажем (рис. 2: 7). Штам АСКУ 293-04 очистився від забруднення грибами без втрати здатності до росту (рис. 2: 8).

Використання ААС та Nuosept ВМс-422 не принесло очікуваних результатів. Після першого пасажу на середовищі з додаванням ААС контамінація не зменшилась, а ріст водоростей був значно меншим порівняно з контролем. У наступних пассажах ця тенденція зберігалась. На 12 день ріст водоростей припинився, що, вірогідно, пов'язано із бактерицидною дією окремих компонентів препарату, які пригнічують розвиток супутніх бактерій, що притаманні для певних видів водоростей і стимулюють їхній ріст. Саме тому більшість штамів культур мікроводоростей у різних світових колекціях не є аксеничними, що спрощує їх культивування.

Ріст водоростей і грибів на середовищі з додаванням Nuosept ВМс-422 не спостерігався вже після першого пасажу. Дія цього препарату була не вибірковою: на рівні із фунгіцидною та бактерицидною дією спостерігався й негативний вплив на самі водорості, що унеможливило його використання для деконтамінації штамів мікроводоростей у межах зазначених виробничих концентрацій.

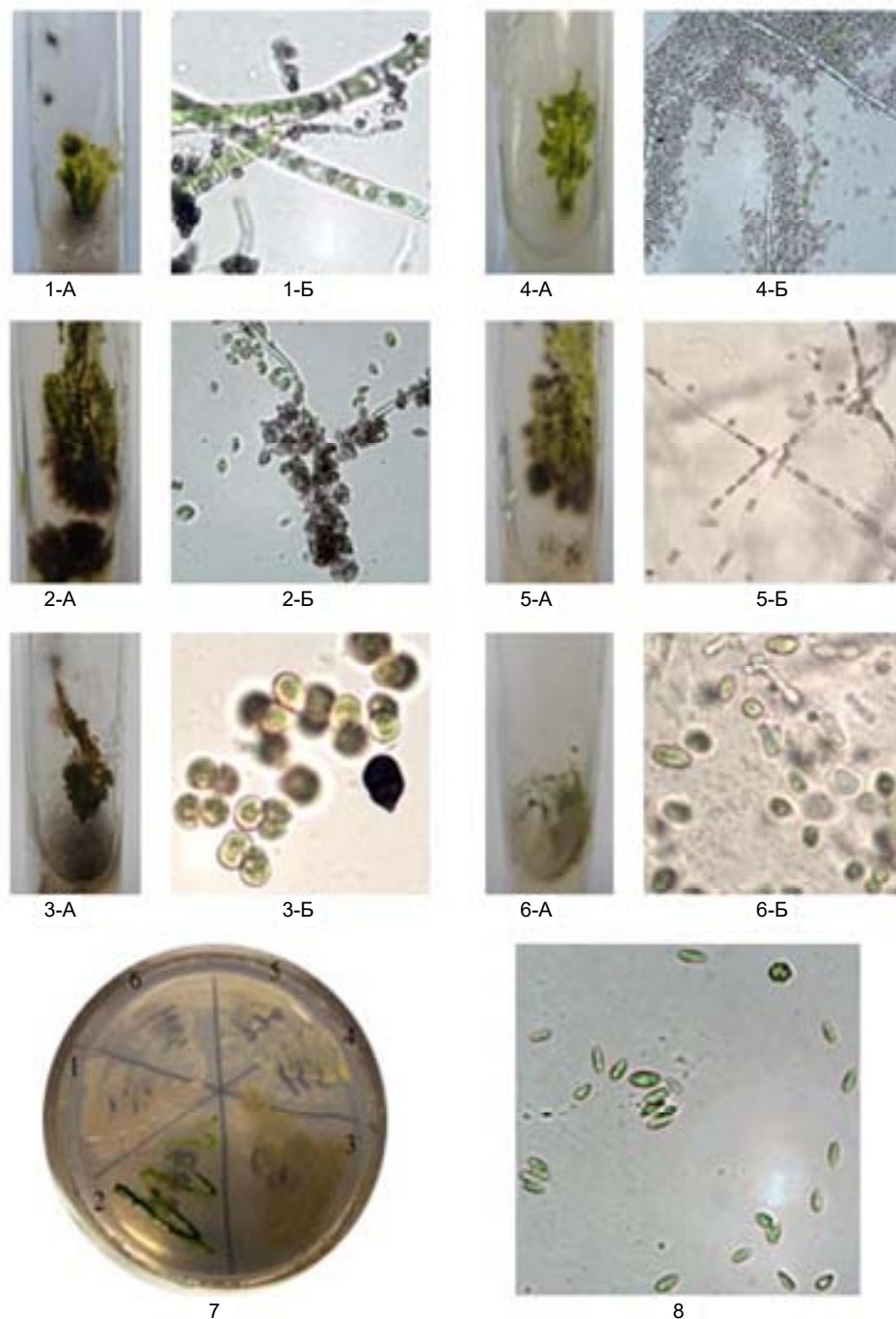


Рис. 2. Штами колекції мікроводоростей АСКУ. 1 – АСКУ 139-02, 2 – АСКУ 293-04, 3 – АСКУ 364-04, 4 – АСКУ 599-06, 5 – АСКУ 600-06, 6 – АСКУ 1056, 7 – дія карбендазиму на 12 добу культивування (чашка Петрі, агаризоване середовище), 8 – штам АСКУ 293-04 після очищення карбендазимом (*Acutodesmus obliquus*). А – колекційний штам (одиниця зберігання), Б – зовнішній вигляд водоростевих клітин із супутніми контамінантами

Зазначимо, що найбільш поширеними контамінантами колекційних культур мікроводоростей є гриби. Для дослідження нами були обрані саме контаміновані грибами зразки штамів мікроводоростей із колекції культур мікроводоростей Київського національного університету імені Тараса Шевченка, а препарати, дія яких вивчалася, мали практично доведену фунгіцидну дію. Проте ефективність рекомендованих виробниками доз для деконтамінації грибів при вирощуванні штамів мікроводоростей виявилася неоднозначною, оскільки не завжди відповідала поставленим завданням, а отже, потребує подальшого уточнення.

**Висновки.** Серед досліджених препаратів найефективнішим виявився карбендазим. Завдяки застосуван-

ню препарату карбендазиму в концентрації 0,005 % була отримана чиста культура штаму АСКУ № 293-04 (*Acutodesmus obliquus*), яка була очищена від контамінанту *Cladosporium cladosporioides*. Установлено, що препарат Nuosept ВМс-422 у рекомендованих виробником концентраціях (0,05–0,2 %) є неефективним для боротьби з контамінацією грибами культур водоростей, оскільки спричинював негативний вплив на самі водорості. Препарат Antibiotic Antimycotic Solution (x100) виявився малоефективним для деконтамінації альгологічних культур, імовірно, через високий ступінь контамінації досліджуваних штамів грибами.

## Список використаних джерел

1. Костіков І. Ю. Колекція культур водоростей Київського національного університету імені Тараса Григоровича Шевченка : каталог штамів (2008) / І. Ю. Костіков, Е. М. Демченко, М. А. Березовська // Чорноморськ. бот. журн. – 2009. – № 5(1). – С. 37–79.
2. Borowitzka M. A. Microalgae as source of pharmaceuticals and other biologically active compounds / M. A. Borowitzka // J. Appl. Phycol. – 1995. – № 7. – P. 3–15.
3. Selection, breeding and engineering of micro algae for bioenergy and biofuel production / A. W. Larkum, I. L. Ross, O. Kruse, B. Hankamer // Trends Biotechnol. – 2012. – № 30. – P. 198–205.
4. Mahan K. M. Controlling fungal contamination in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures / K. M. Mahan, O. W. Odom, D. L. Herrin // Biotechniques. – 2005. – № 39. – P. 457–458.
5. Wasanasathian A. Algal photobioreactor for production of lutein and zeaxanthin / A. Wasanasathian, C. A. Peng // Shang-Tian Yang editor. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. Elsevier. – 2007. – P. 491–505.

## Reference

1. Kostikov I.Yu., Demchenko E.M., Berzovska M.A. Kolektsiia kultur vodorostei Kyivskoho natsionalnogo universytetu imeni Tarasa Hryhorovy-

cha Shevchenka. Kataloh shtamiv (2008 r). //Chornomorsk. bot. zhurn. 2009; 5 (1): 37-79.

2. Borowitzka M.A. Micro algae as source of pharmaceuticals and other biologically active compounds // J. Appl. Phycol. 1995; 7: 3-15.
3. Larkum A.W., Ross I.L., Kruse O., Hankamer B. Selection, breeding and engineering of micro algae for bioenergy and biofuel production. Trends Biotechnol. 2012; 30: 198-205.
4. Mahan, K.M., Odom O.W., Herrin D.L. Controlling fungal contamination in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. Biotechniques. 2005; 39:457-458.
5. Wasanasathian A., Peng C.A. Algal photobioreactor for production of lutein and zeaxanthin. In: Shang-Tian Yang editor. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources. Elsevier. – 2007. p. 491-505.

Надійшла до редколегії 2.10.2020

Отримано виправлений варіант 2.11.2020

Підписано до друку 2.11.2020

Received in the editorial 2.10.2020

Received a revised version on 2.11.2020

Signed in the press on 2.11.2020

В. Петлевана, канд. биол. наук,  
Чен Минлей, асп.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

### ОЧИСТКА КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ КОЛЛЕКЦИИ АСКУ ОТ ГРИБНЫХ КОНТАМИНАНТОВ

Работа посвящена подбору оптимальных методов очистки штаммов микроводорослей из коллекции АСКУ (Algae Culture Collection of Kyiv University) от загрязнения микроскопическими грибами. Проведен скрининг коллекции культур микроводорослей АСКУ. Выявлена контаминация некоторых штаммов микроводорослей грибами родов *Cladosporium* Link, *Alternaria* Nees и *Monilia* Bonord. Для эксперимента были отобраны штаммы АСКУ 139-02 (*Klebsormidium flaccidum* (Kütz.) PC Silva, Mattox et Blackwell), АСКУ 293-04 (*Acutodesmus obliquus* (Turpin) P. Tsarenko), АСКУ 364-04 (cf. *Chlorosarcinopsis dissociata* Herndon), АСКУ 599-06 (*Klebsormidium nitens* Menegh. in Kützing), АСКУ 600-06 (*Klebsormidium flaccidum* (Kütz.) PC Silva, Mattox et Blackwell) и АСКУ 1056 (*Desmodesmus abundans* (Kirchn.) E. Hegew.). Исследовано влияние карбендазима (Methylbenzimidazol-2-ylcarbamate), Antibiotic Antimycotic Solution (пенициллин – 10000 МЕ, стрептомицин – 10 мг, амфотерицин В – 25 мкг) и Nuosept ВМС 422 на грибы-контаминанты штаммов культур зеленых водорослей с разным типом морфологической структуры таллома (коккоидные и нитчатые). Экспериментальные концентрации веществ: карбендазим – 0,005 %, Antibiotic Antimycotic Solution – 1 %, Nuosept ВМС 422 – 0,05 и 0,2 %. Показано, что Antibiotic Antimycotic Solution и Nuosept ВМС-422 в заявленных концентрациях оказались неэффективными для очистки штаммов зеленых водорослей от значительного загрязнения микроскопическими грибами. Установлено, что раствор карбендазима эффективен при очистке штаммов коккоидных зеленых водорослей от загрязнения микроскопическими грибами *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries). В результате для штамма АСКУ № 293-04 (*A. obliquus*) была получена аксеническая культура.

Ключевые слова: штамм, АСКУ, культивирование, микроскопические зеленые водоросли, Chlorophyta, контаминация, карбендазим, Antibiotic Antimycotic Solution, Nuosept ВМС 422.

V. Petlyovana, PhD,  
Chen Minglei, PhD stud.  
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

### PURIFICATION OF MICROALGAE CROPS OF ACKU COLLECTION FROM MUSHROOM CONTAMINANTS

The work is focused to the selection of the best purification methods of microalgae strains from ACKU collection (Algae Culture Collection of Kyiv University) from contamination by microscopic fungi.

The screening of microalgae culture collection ACKU (Algae Culture Collection of Kyiv University) is deal. Contamination of some microalgae strains by fungi of *Cladosporium* Link, *Alternaria* Nees, and *Monilia* Bonord genera was detected. The following strains were selected for the experiment: ACKU 139-02 (*Klebsormidium flaccidum* (Kütz.) PC Silva, Mattox et Blackwell), ACKU 293-04 (*Acutodesmus obliquus* (Turpin) P. Tsarenko), ACKU 364-04 (cf. *Chlorosarcinopsis dissociata* Herndon), ACKU 599-06 (*Klebsormidium nitens* Menegh. in Kützing), ACKU 600-06 (*Klebsormidium flaccidum* (Kütz.) PC Silva, Mattox et Blackwell) and ACKU 1056 (*Desmodesmus abundans* (Kirchn.) E. Hegew.). The effect of carbendazim (Methylbenzimidazol-2-ylcarbamate), Antibiotic Antimycotic Solution (penicillin – 10,000 IU, streptomycin – 10 mg, amphotericin B – 25 µg) and Nuosept ВМС 422 on fungi-contaminants of green algal culture strains with different morphological structure (coccoid and filamentous) was studied. Experimental concentrations of substances: carbendazim – 0.005%, Antibiotic Antimycotic Solution – 1%, Nuosept ВМС 422 – 0.05% and 0.2%. Was shown that Antibiotic-Antimycotic Solution and Nuosept ВМС-422 at the selected concentrations were not effective for purifying of green algae strains from significant contamination by microscopic fungi. It was found that the carbendazim solution is effective in the purification of coccoid green algae strains from contamination by microscopic fungi *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries). As a result, an axenic culture was obtained for the ACKU strain No.293-04 (*A. obliquus*).

Keywords: strain, ACKU, cultivation, microscopic green algae, Chlorophyta, contamination, Carbendazim, Antibiotic Antimycotic Solution, Nuosept ВМС 422.