

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРИГНІЧУЮЧОЇ ДІЇ АЛЬГОТОКСИНІВ

Коваленко Я.А.

Кременчуцький національний університет імені Михайла Остроградського

Науковий керівник – Сакун О.А., кандидат технічних наук,
доцент кафедри біотехнології та біоінженерії Кременчуцького національного університету
імені Михайла Остроградського

Мікроцистини (надалі МС) – широкопоширені токсини ціанобактерій. Такі ціанеї є фотосинтезуючими прокаріотами. В основному вони присутні у прісноводних екосистемах. Утворення ціанотоксинів відбувається як наслідок цвітіння синьо-зелених водоростей. Останнє викликається зміною клімату та антропогенною діяльністю. Продуценти мікроцистинів – це прісноводні ціанобактерії таких родів: *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Dolichospermum*, *Limnothrix*, *Nostoc*, *Phormidium*, *Planktothrix*. В останній час ціанеї-продуценти МС локалізуються на все більшій території водних масивів усього світу. Це обумовлює токсичний вплив на природу та людей безпосередньо. За хімічною структурою мікроцистини – це моноциклічні гептапептиди, що характеризуються деякими інваріантними амінокислотами у своєму складі. Різноманітність структури відображається різною експресією токсичності.

Для проведення дослідження використано: поживний агар; інфіковані частини рослини *Solanum lycopersicum*; автоклав; термостат; ламінар-бокс; мікроскоп; ваги; спиртівка; лабораторний посуд (термостійкі колби, пробірки, чашки Петрі, мірний циліндр, скляна воронка); дрібний інструментарій (бактеріальна петля, шпатель, марля, ватні корки, склогограф). Вирішено виділяти ізоляти з поверхневих тканин плодів томата. Виділення ізолятів із зараженого патогеном листя і стебел було безрезультатним – у середовищі розвивалася лише стороння мікрофлора.

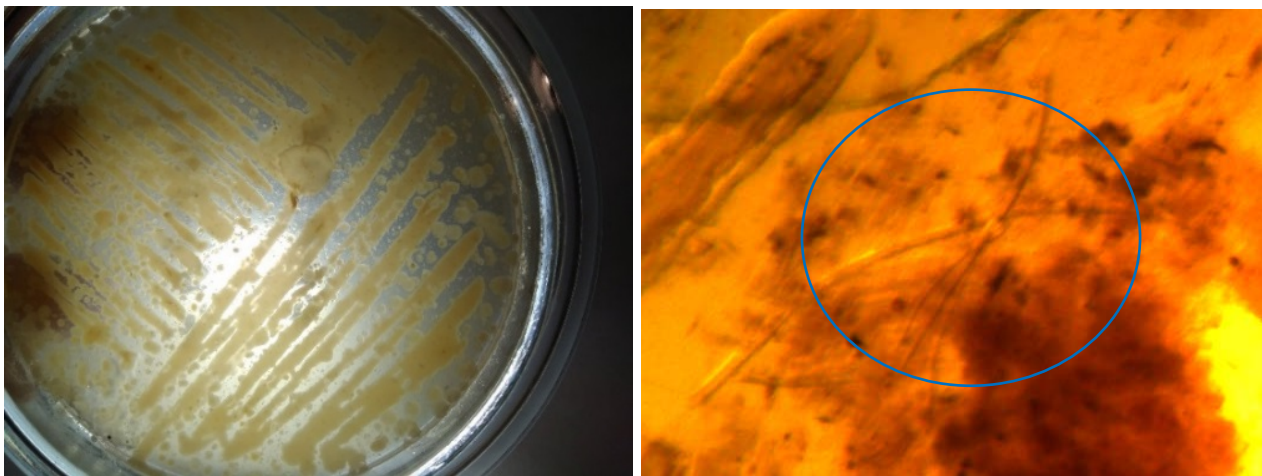
Як середовище для виділення ізолятів було обрано поживний агар від ТОВ «Фармактив» ТУ У 24.4–37219230–001:2011 такого умісту: пептон ферментативний 10 г/дм³; агар мікробіологічний 10 г/дм³; натрію хлорид 5 г/дм³; дріжджовий екстракт 3 г/дм³. Для приготування 1 дм³ поживного середовища використовують 28 г сухої речовини. Суміш кип'ятять 3 хвилини, стерилізують, охолоджують до 45°C, розливають у стерильні чашки Петрі, залишають для застигання. Приготоване поживне середовище є щільним, показник рН 7,3±0,2.

З переліку доступних дезінфікуючих речовин було обрано перманганат калію та етиловий спирт (*рис. 1*). Дезінфікований вихідний матеріал використовувався для отримання чистої культури *Phytophthora infestans*, на якій і базуються подальші дослідження. Здійснено три послідовні пересіви культури через кожні три доби. За 6 годин до перенесення ізолятів на свіже поживне

середовище, посіви оброблялися 1 молярним розчином ампіциліну для знищення сторонньої мікрофлори. З огляду на швидкість росту культури маємо, що ізоляти переносилися на свіже поживне середовище у експоненціальній фазі (рис. 2).



Рис. 1. Дезінфекція вихідного матеріалу



А

Б

Рис. 2. Чиста культура *Phytophthora infestans*: А – колонії, Б – ізолят

Проводились мікроскопічні дослідження за допомогою тринокулярного цифрового мікроскопа «Мікромед», збільшення x800.

Установлено неоднорідність морфологічних ознак. Це проявляється у різниці структури колоній, топографії, швидкості росту. Також спостерігалась різна здатність до утворення поверхневого міцелію. Діаметр колоній варіювався від 2 до 5 мм. Деякі колонії характеризувались слабким розвитком повітряного міцелію, інші навпаки – досить сильним. Поверхня міцелію була ватоподібною або павутинною.

Усього проведено чотири різновиди дослідження, які охарактеризовано у таблиці 1. Була взята чиста культура, вихідний матеріал якої оброблявся перманганатом калію – речовина дала кращі результати порівняно з етиловим спиртом. Ефективність оцінювалася візуально за кількістю колоній, що сформувались на поживному середовищі протягом 5 днів зростання. Після етилового спирту колонії мали послаблений ріст.

Таблиця 1 – Характеристика експериментів дослідження

Номер експерименту	Вихідний матеріал	Середовище	Дезинфікуюча речовина
1	Чиста культура <i>Phytophthora infestans</i> , що отримана з поверхневих тканин плодів томата	Поживний агар	Перманганат калію
2		Поживний агар з подальшою обробкою антибіотиком	
3		Поживний агар з подальшою обробкою фунгіцидом	
4		Поживний агар з подальшою обробкою суспензією синьо-зелених водоростей з мікроцистинами	

Експеримент № 1 є контролем – колонії не оброблялись сторонніми речовинами. При виконанні експерименту № 2 колонії *Ph. infestans* оброблені розчином антибіотику «Ампіцилін» у кількості 0,001 дм³ на одну чашку Петрі. «Ампіцилін» у кількості 2 г/дм³ попередньо розведено у фосфатному буфері. В експерименті № 3 колонії *Phytophthora infestans* оброблені розчином фунгіциду «Квадріс» 0,001 дм³ на одну чашку Петрі. Попередньо фунгіцид у кількості 2 г/дм³ розведено у дистильованій воді. Експеримент № 4 заключався в обробці колоній *Phytophthora infestans* 0,001 дм³ суспензії синьо-зелених водоростей. Проба відібрана у липні 2018 року з р. Дніпро у м. Кременчук з епіцентру «цвітіння» синьо-зелених водоростей за температури води 25°C. Концентрація мікроцистинів у воді з р. Дніпро у м. Кременчук була визначена австрійськими колегами з Віденського університету (рис. 3). Концентрація мікроцистинів становить приблизно 3,5 мг/дм³. Представлений графік поданий без авторських змін.

Експеримент № 4 представляє найбільший інтерес. Він заключається у вирощуванні популяції *Phytophthora infestans* на поживному агарі з додаванням суспензії синьо-зелених водоростей. За результатами експерименту побудовано криву фаз росту (рис. 4).



Рис. 3. Результати фотоспектрометричного дослідження

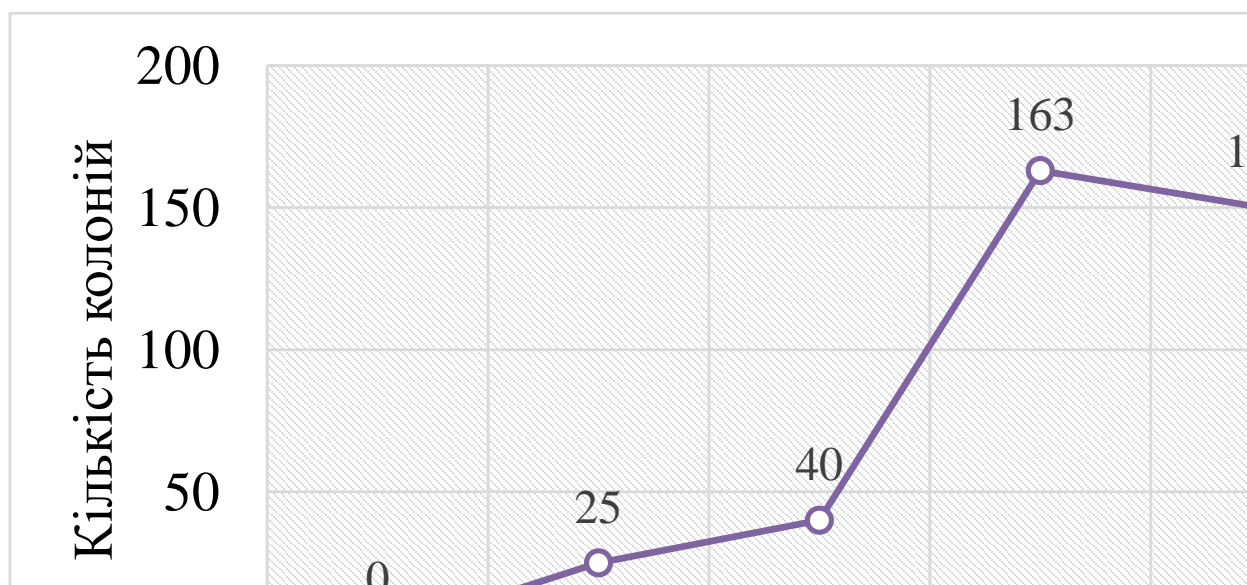


Рис. 4. Експеримент № 4 – фази росту популяції *Phytophthora infestans* на поживному агарі з додаванням суспензії синьо-зелених водоростей

На початок експоненціальної фази (четверта доба) нараховувалась 40 колоній. Через дві доби чисельність збільшилась до 163 колоній. На шостій добі культура оброблена 0,001 дм³ суспензії. Подальше спостереження за ростом культури відбувалось аналогічно до 2 і 3 експерименту. На сьому добу налічувалось 150 колоній, на восьму – 134, на дев'яту – 119.

A Б

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100