

Болатхан К.¹, Копески Ж.²,
Жамбакин К.Ж.³, Лось Д.А.⁴,
Синетова М.А.⁴,
Акмуханова Н.Р.¹,
Садвакасова А.К.¹, Заядан Б.К.¹

¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

²Микробиология Институты, Чехия, Требон қ.

³Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Қазақстан, Алматы қ.

⁴К.А. Тимирязев атындағы Өсімдіктер физиологиясы институты, Ресей, Мәскеу қ.

Шар нуур көлінен токсин түзуші цианобактериялардың жаңа дақылдарын бөліп алу және идентификациялау

Bolatkhhan K.¹, Kopecky J.², Zhabakin K.Zh.³, Los D.A.⁴, Sinetova M.A.⁴, Akmukhanova N.R.¹, Sadvakasova A.K.¹, Zayadan B.K.¹

¹Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

²Institute of Microbiology, laboratory of microalgae photobiotechnology, Czech, Trebon

³Institute of biology and biotechnology of plants, Kazakhstan, Almaty

⁴Timiryazov Institute of plant physiology, Russia, Moscow

Isolation and identification of new cultures of toxin-forming cyanobacteria from the Shar Nuur Lake

Болатхан К.^{1*}, Копески Ж.²,
Жамбакин К.Ж.³, Лось Д.А.⁴,
Синетова М.А.⁴, Акмуханова Н.Р.¹, Садвакасова А.К.¹, Заядан Б.К.¹

¹Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

²Институт Микробиологии, Чехия, г. Требон

³Институт биологии и биотехнологии растений, Казахстан, г. Алматы

⁴Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева, Россия г. Москва

Выделение и идентификация новых культур токсинобразующих цианобактерий из озера Шар Нуур

Мақалада Моңғолияның Баян Өлгей аймағында орналасқан Шар Нуур (Сары көл) көлінің альгофлора құрамы зерттелді. Зерттелген су үлгілерінен Oscillatoriaceae және Nostocaceae тұқымдасының 3 бактериологиялық таза дақыл бөлініп алынды. Н.С. Строганов жүйесі бойынша бөлініп алынған дақылдардың токсинділігі анықталды. Тест-объект дафнияға қатынасы бойынша дақыл SP-O1 өте улы болды. Токсин түзуші дақылдың ісік жасуша HeLa тест-объектісіне қатынасын бағалау бойынша цитотоксинді белсенділік көрсетті. SP-O1 штамының экстрактісін зерттеу нәтижесі бойынша қауіпті токсиндер анықталған жоқ. Идентификацияланған токсиндер негізінен микроцистиндерге қарайды. Шар Нуур көлінен бөлініп алынған цианобактерия SP-O1 дақылы ботаникалық белгілері бойынша Oscillatoria туысына жатқызылғанмен, генетикалық сараптама бойынша олар Oscillatoriaceae тұқымдасының Desertifilum туысына жоғары гомологияны көрсетті. Осы мәліметтерге негізделе отырып SP-O1 дақылы идентификацияланып Desertifilum sp.1. деген атау берілді.

Түйін сөздер: цианобактерия, бактериологиялық таза дақыл, морфология, токсиндер, идентификация, штамм *Desertifilum sp.1*

Studied the species composition of algal flora of Shar Nuur Lake, located in the mountainous regions of Bayan Ulgiisk region of Mongolia. From selected water samples and algal-bacterial mats received 3 bacteriologically pure cultures of cyanobacteria from family Oscillatoriaceae and Nostocaceae. Determined the toxicity of cyanobacteria' selected strains according to the system of N.S. Stroganov. It was found that from cyanobacteria' isolated strains the culture SP-O1 is defined as highly-toxic to the test-object – Daphnia. Evaluation of biological activity of toxic cyanobacteria cultures studied in relation to the test-object cell lines HeLa cancer cells showed different cytotoxic effect. In studied extracts of Desertifilum SP-O1 biomass strain the dangerous toxins were not detected. Mostly identified toxins are microcystins. Despite on the fact that according to botanical characteristics the obtained cyanobacteria SP-O1 from Shar Nuur Lake is related to the Oscillatoria genus, molecular-genetic analysis revealed its high homology to the Desertifilum genus belonging to Oscillatoriaceae family. Based on these data, SP-O1 culture was identified and designated as Desertifilum sp.1.

Key words: cyanobacteria, bacteriologically pure culture, morphology, toxins, identification, Desertifilum sp.1 strain.

Изучен видовой состав альгофлоры озера Шар Нуур, расположенного в горных районах Баян Улгейского аймака Монголии. Из отобранных проб воды и альгобактериальных матов получены бактериологически чистыми 3 культуры цианобактерий семейства Oscillatoriaceae и Nostocaceae. Определена токсичность выделенных штаммов цианобактерий по системе Н.С. Строганова. Установлено, что из выделенных штаммов SP-O1 сильно токсичен в отношении тест-объекта дафний. Оценка биологической активности токсичных культур исследованных цианобактерий по отношению к клеточной линии раковых клеток HeLa показала различный цитотоксический эффект. В экстрактах биомассы штаммов Desertifilum SP-O1 опасные токсины не обнаружены, идентифицированные токсины в основном относятся к микроцистинам. Выделенная из озера Шар Нуур цианобактерия SP-O1 по ботаническим признакам отнесена к роду Oscillatoria, однако молекулярно-генетический анализ выявил ее высокую гомологию к роду Desertifilum, относящийся к семейству Oscillatoriaceae. На основе этих данных культура SP-O1 была идентифицирована и обозначена как Desertifilum sp.1.

Ключевые слова: цианобактерия, бактериологически чистая культура, морфология, токсины, идентификация, штамм *Desertifilum sp.1*.

**Болатхан К.^{1*}, Копески Ж.², Жамбакин К.Ж.³,
Лось Д.А.⁴, Синетова М.А.⁴, Акмуханова Н.Р.¹,
Садвакасова А.К.¹, Заядан Б.К.¹**

¹Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

²Микробиология Институты, Чехия, Требон қ.

³Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты,
Қазақстан, Алматы қ.

⁴К.А. Тимирязев атындағы Өсімдіктер физиологиясы институты,
Ресей, Мәскеу қ., *e-mail: bkenzhegul23@gmail.com

ШАР НУУР КӨЛІНЕН ТОКСИН ТҮЗУШІ ЦИАНОБАКТЕРИЯ- ЛАРДЫҢ ЖАҢА ДАҚЫЛДАРЫН БӨЛІП АЛУ ЖӘНЕ ИДЕНТИ- ФИКАЦИЯЛАУ

Кіріспе

Замануи ғылым мәліметтері бойынша микроорганизмдердің маңызды топтардың қатарына цианобактериялар жатады. Цианобактериялар табиғи биологиялық белсенді өнімдердің бір қатарының тиімді көзі болып табылады. Олардың биотехнологиялық маңызды өнімдерді синтездейтін қасиеті таңқалдырады. Цианобактериялардың биологиялық белсенді метаболиттеріне каротиноидтар, пигменттер, аминқышқылдары, фитогормондар, полисахаридтер, май қышқылдары, витаминдер, стеролдар, аллелохимиялық қосылыстар және т.б. жатады. Сонымен қоса, олар энергетикалық қатынаста тиімді, себебі, энергия көзі ретінде күн сәулесін қолданады [1].

Цианобактерияларды биотехнологияда, оның ішінде медицинада және ауыл шаруашылығында пайдалану үшін өнімді штамдардың сұрыптау қажет және биомассаның жоғары өнімділігін алу үшін оларды массалық дақылдау технологиясын өңдеу керек. Осындай жұмыстар өткен ғасырдың 80-ші жылдарынан бастап белсенді түрде жүргізіле бастады. Цианобактерияларды массалық дақылдайтын оңтайлы өндірістік орындар және өңдеуден бөлек, олардың жоғары өнімді түрлері мен штамдарын осы мақсатта пайдалану өте маңызды болып келеді. Цианобактериялардың жоғары белсенді формаларын селекциялық әдістермен табиғаттан бөліп алу жұмыстары үлкен маңызға ие [2].

Цианобактериялар токсиндердің кең спектрін синтездейді, олардың белсенділігінің скринингін есепке ала отырып екі топқа бөлуге болады: биотоксиндер және цитотоксиндер. Биотоксиндерді тестілеу кезінде әдетте су омыртқасыздарын немесе кішкентай омыртқалыларды, мысалы, тышқандар сияқты жануарларды қолданады. Химиялық құрылымы мен әсерінің бағыттына қарай биотоксиндер екі топқа бөлінеді – гепатотоксиндік циклдік пептидтер және нейротоксиндік алкалоидтар. Олардың біріншісін «тез өлім факторлары» деп те атайды, олар лабораториялық жануарлардың (тышқандардың) өлімін 1-4 сағ. ішінде шақырады; екіншілері – «өте тез өлім факторлары» (2-30 мин. ішінде өледі) [3, 4].

Цитотоксиндер жасушалардың жеке қызметтеріне әсер етеді, көбіне ферменттерді тежейді, бірақ көпжасушалы ағзаларды өлтірмейді. Цитотоксиндердің белсенділігін сүтқоректілердің жасушалар дақылында, жиі ісік жасушаларында зерттейді. Кейбір цитотоксиндер балдырлар мен бактерияларды жояды. Ісік жасушалары мен иммунотапшылық вирусын шабуылдайтын түрлері фармакологиялық тұрғыда қолданылуы мүмкін. Цианобактериялардың синтездейтін өнімдерінің алуан түрлігі мен қолдану аясы, оларды биотехнологияның маңызды объектісі ретінде санауға мүмкіндік береді. Сондықтан әртүрлі табиғи экожүйелерден цианобактериялардың жаңа биотехнологиялық болашағы бар дақылдарын бөліп алу өзекті мәселелердің қатарына жатады.

Жұмыстың мақсаты – Шар нуур көлінен токсин түзуші цианобактериялардың жаңа дақылдарын бөліп алу және идентификациялау.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Зерттеу жұмысының объектісі Баян Өлге аймағында орналасқан Шар Нуур көлінен бөлініп алынған цианобактерия дақылдары. Барлығы 6 альгологиялық үлгілер алынды. Таксономиялық құрамын анықтауы әл-Фараби атындағы ҚазҰУ биотехнология кафедрасының фототрофты микроорганизмдер зертханасында жүргізілді. Микробалдырларды анықтауда «Определители синезеленых водорослей СССР» анықтаушылары қолданылды [5].

Зерттеу үшін су үлгілері жаз айларында Шар Нуур көлінен алынды, су температурасы +18-20,5⁰ С, рН – 6,0 болды. Су үлгілері 2014 жылдың шілде айында, беткі 1-1,5 м тереңдіктен альгологиялық сүзгілер көмегімен алынды. Жиналған су үлгілері 4% формальдегид ерітіндісінде фиксацияланды. Цианобактериялардың жинақы дақылдарын алу үшін дәстүрлі альгологиялық әдістер қолданылды [6]. Бактериологиялық таза цианобактерия дақылдарын бөліп алуда микробиологиялық әдістер қолданылды. Цианобактерияларды бактериялар мен саңырауқұлақтардан тазарту үшін грам оң және грам теріс бактерияларға, кең спектрлі әсер беретін антибиотиктер қоспасы алынды [7,8]. Цианобактерияларды залалсызданған жағдайда 500 мл колбаларда дақылдау жүргізілді. Қоректік орта ретінде Громова №6 қолданылды. Цианобактерияларды бөлме температурасында, 2000 люкс жарықта дақылдау жүргізілді.

Цианобактерия биомассасының токсиндерін

анықтау үшін LyoQuest (Telstar, Террасса, Испания) лиофилизаторында лиофильді кептірілді. Цианобактериялардың биотоксинділігі шаянтәрізді *Daphnia magna* Straus бұтақмұртша тест-объектісіне қысқа уақытты тәжірибе қоюмен зерттелді. Биотестілеу үшін 24 сағ. дейінгі жастағы дафнияларды қолданылады [9]. Цианобактериялардың лиофилизденген биомассасын (10.0; 1.0 және 0.1 мг/мл) концентрацияда 100 мл ауыз суы бар шыны ыдыстарға құяды. Бақылау ретінде ауыз суы қолданылады.

Цитотоксинділікті зерттеу Микробиология Институтының (Чехия) фотобиотехнология және микробалдырлар лабораториясында жүргізілді. Цианобактериялардың лиофилизденген биомассасының өлшемінің (200 мг) цитотоксикалық белсенділігін бағалау үшін 6 мл 70 % метанолды біртіндеп қоса отырып, 2-3 минут бойы үгіткіште ұнтақтайды. Алынған қоспаны 1 сағат бөлме температурасында ұстайды және 10 минут бойы 4-5 мың айн/мин центрифугалайды. Супернатантты колбаға салып, тәжірибе басталғанша тоңазытқышта сақтайды [10].

Цитотоксинділікті зерттеу үшін M HeLa жасушалары пайдаланылды. Ісік жасушаларын дақылдау көпшілікке мәлім әдіске сәйкес жүргізіледі [11]. Тәжірибе жасау үшін дақыл тығыздығы 5×10^4 кл/мл әр ойыққа 100 мкл-ден 96-ойықты планшеттерге егеді. Егілгеннен кейін 24 сағаттан соң дақылдық ортаны жояды және цианобактериялардың әр түрлі концентрациядағы экстракттері бар MEM (Игла-MEM, Германия) ортасымен алмастырады. Экстрактсі бар клеткаларды инкубациялау 72 сағатқа ішінде жүргізілді.

Молекулалық талдау үшін геномды ДНҚ-ны цианобактерия клеткаларынан ыстық фенол экстракциясы әдісімен бөліп алады. 16S рНҚ генин амплификациялау үшін эубактериалды праймерлерді 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 5'- AAGGAGGTGATCCAGCC -3' қолданады. Алынған сапалық және сандық ПТР-өнім Mini Horizontal Electrophoresis system (VWR International, АҚШ) камерасын пайдалана отырып, трис-ацетат буфер негізінде 1% агарозалы электрофорезде талданады. Нуклеотидтік бірізділікті дерекқорсыз бірізділікпен (GenBank), BLAST жоғары гомологиялық бірізділікті іздеу бағдарламасының көмегімен салыстырады [12].

Токсиндерді HPLC-талдау HP 1100 Mass Spectrometer MSD SL-Ion Trap (Bruker, АҚШ) жоғары тиімді сұйық хроматографияда жүргізілді [13]. Циклдық пептидтерді Zorbax

XDBC8 (4,6×150 мм) аналитикалық бағаналарда бөледі. Мобильді фазаны 30 °C-та 1 минут 0,6 мл ағым жылдамдықпен метанол-суда қалдырады (сызықты градиент 30-дан 100% метанолда, 30 мин бойы). Талданатын экстракт көлемі 20 мкл құрады. Бағаналардан пиктердің шығуы кезінде екі тетіктің көмегімен тіркеледі: «ion-trap» түрінің масс-спектрометрі және ультрафиолетті полихроматикалық детекторы (PDA). Циклдық пептидтер 230 нм хроматографияда анықталады (ұстау уақыты 10-25 мин). Тандемді масс-спектрометриямен ионизирленген молекулалардың масс-заряды анықталды (MSI). Әдеби мәліметтерді пайдалана отырып, циклдық пептидтерге сәйкес хроматограммада шығу уақыты бойынша, токсиндердің идентификациясы қосындылардың молекулалық массасын салыстыру арқылы орындалды (масс-заряд).

Зерттеу нәтижелері мен оларды талдау

Соңғы жылдары биотехнологияда қолдану мүмкіншіліктеріне байланысты цианобактериялар үлкен қызығушылық тудырады. Олар көптеген биологиялық белсенді заттар, оның ішінде әртүрлі дәрумендер мен токсиндерді синтездейді.

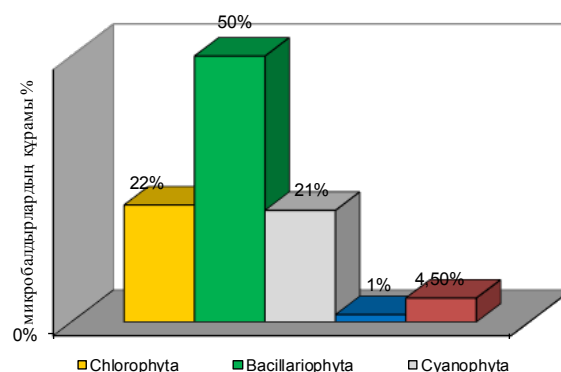
Шар-Нуур көлі Монғолияның Баян Өлгей аймағының Буянт ауданында орналасқан көл. Көл суы ащы тұзды, сұр жасыл түсті, тұнық. Су температурасы зерттелетін уақытта 18-20,5°C, pH ортасы 6.

Альгофлора құрамын зерттеу нәтижесі бойынша Шар-Нуур көлінде микробалдырлардың 67 түр анықталды. Олар 5 бөлім (Cyanophyta – 14, Dinophyta – 3, Bacillariophyta – 34, Euglenophyta – 1, Chlorophyta – 15), 7 класс, 21 тұқымдас және 34 туыс (сурет 1).

Түрлік құрамы бойынша диатомды балдырлар (Bacillariophyta) жалпы санның 50% алады. Негізгі түрлері екі класс Centrophyceae және Pennatophyceae өкілдері. Centrophyceae туысынан көлде 11 түр 4 туыс анықталды. Олардың көпшілігі тұзды суық суларда кездесетін ағзалар. *Melosira Ag.* туысының үш түрі үш түрі анықталды. Олардың арасында тек *M. moniliformis var. subglobosa* доминантты болды. Қалған екі түрі сирек кездеседі және сандық жағынан айтарлықтай дамуы байқалмады. *Cyclotella Kütz.* және *Stephanodiscus Ehr.* туысының түрлері жалғыз жарым кездесті. Диатомды балдырдан негізгі түрлік байлық *Pennatophyceae* класына тиесілі, 16 туыстың 34 түрі анықталды. Пеннатты балдырлар негізінен

бентосты балдырлар болғанымен, планктонда әрдайым кездеседі.

Бұл құбылыс жұмсақ тұнбалы және жоғары сатадағы өсімдіктерден қопасы бар таяз тоғандарға тән. Көлден бұл кластың әр үш туысының *Navicula Bory*, *Amphora Ehr.* и *Nitzschia Hass.* төрт түрі анықтылды.



1-сурет – Шар – Нуур көлінің альгофлора құрамы

Түрлік алуантүрлік бойынша екінші орында цианобактериялар *Cyanophyta* алады. Бұл бөлімнен Шар Нуур көлінен екі класқа қарайтын, 6 туыс 14 түр анықталды. *Chroococcophyceae* класынан *Merismopedia (Meyen) Elenk.* және *Gomphosphaeria Kütz.* туыстарынан екі түрден анықталды. Бұл туыстан фитопланктонда *Gomphosphaeria aponina* белсенді дамитыны белгілі болды. Біршама жиі *Merismopedia tenuissima* кездесті. Таксономиялық алуантүрлілік *Hormogoniophyceae* класының *Oscillatoria* туысына тән болды. Бұл туыстың өкілдерінен *Oscillatoria* және *Nodularia* кеңінен таралған.

Динофитті, эвглена және жасыл балдырлар туысының барлығы 5 түр (7,5 %) анықталды. Балдырлардың кең таралуына кері әсер беретін фактор көлдің тұздылығы мен температурасы болып табылады. Тұздылық бойынша мезогалобтар басымдылық көрсетті (61,2% барлық анықталған балдырлар құрамынан). Олигогалобтардың 30 түрі мен түр ішілік таксондары анықталды (38,4 %). Бұл топ екі топ астына жіктеледі: индифференттер (19,2 %) и галофилдер (19,2 %). Мезогалобтар мен галофилдердің есебінен көлдің өзіндік бір ерекше альгофлорасы қалыптасқан.

Зерттеу нәтижесі бойынша Шар Нуур көлінде диатомды балдырлар мен цианобактериялардың басқа балдырлармен салыс-

тырғанда басымдылығы анықталды. Зерттелген көлдің альгофлора құрамы алуан түрлілігімен ерекшеленіп, барлығы 5 бөлім, 67 түр анықталды. Оларды проценттік қатнасы бойынша ең көп кездесетін диатомоды балдырлар (*Bacillariophyta*) 50%, жасыл балдырлар (*Chlorophyta*) 22%, көкжасыл балдырлар немесе цианобактериялар (*Cyanophyta*) 21%, динофиттер (*Dinophyta*) 4,5%, евгленді балдырлар (*Euglenophyta*) құрайтыны анықталды.

Цианобактериялардың альгологиялық және бактериологиялық таза дақылдарын бөліп алу

Шар Нуур көлінен цианобактериялардың 4 жинақы дақылы бөлініп алынды. Бөлініп алынған жинақы дақылдан сәйкес қоректік ортаға көп ретті жүйелі егу әдісінің көмегімен альгологиялық таза дақылдар бөлініп алынды. Цианобактериялардың монодақылдарын штрих әдісімен егу және микропипетка көмегімен алынды. Дақылдардың альгологиялық тазалығын микроскоптау арқылы бақылау жүргізілді. Көп ретті егу нәтижесінде цианобактериялардың 3 альгологиялық таза дақылдары бөлініп алынды (кесте 1). Морфологиялық белгілері бойынша бөлініп алынған цианобактериялардың басым көпшілігі жіпшелі.

1-кесте – Шар Нуур көлінен бөлініп алынған альгологиялық таза цианобактериялардың тізімі

№	Атауы	Бөлініп алынған жер
	Дақыл SP-35	Шар Нуур
	Дақыл SP-O	Шар Нуур
	Дақыл SP-O1	Шар Нуур

Зерттеу жұмысымыздың келесі сатысында альгологиялық таза дақылдардың бактериологиялық тазалығы тексерілді. Бактериология-

лық талдау бойынша барлық дақылдардан ілеспелі микрофлора анықталды. Цианобактериялардан бөлініп алынған ілеспелі микрофлора негізінен грамм теріс және грамм оң бактериялармен, зең саңырауқұлақтары және ашытқылардан тұрады. Бөлініп алынған цианобактерияларды бактериялардан тазалау өте күрделі үдеріс, себебі, цианобактериялар мен бактериялар арасында тығыз биоценодикалық байланыс қалыптасқан. Цианобактериялар жасушаларының шырышты қабаттары микроорганизмдер үшін қоректік орта мен қорғаныш болып табылады. Бұндай қауымдастықтарды жеке дақылдарға бөлуде осындай байланыстар қиыншылықтар туындатады.

Цианобактерияларды бактериологиялық тазалау үшін әртүрлі антибиотиктер қолданылды. Төмен концентрацияда антибиотиктерді қолдану барысында ілеспелі микроорганизмдердің, зең саңырауқұлақтарының, ашытқылардың өсуі жалғасатыны анықталды. Антибиотикке сезімтал ілеспелі микрофлораны талдау барысында бір бактериялардың бір антибиотикке, ал екінші бактериялардың екінші антибиотикке сезімталдығы анықталды. Сондықтан зерттеуіміздің келесі сатысында грамм оң және грамм теріс бактерияларға, кең спектрлі әсер беретін антибиотиктер мен саңырауқұлақтарға қарсы антибиотиктер кешені қолданылды. Саңырауқұлақтарға қарсы антибиотик ретінде барлық үлгілерді әсер ету спектрі кең нистатин қолданылды (кесте 2). Антибиотиктер кешенімен цианобактерияларды ілеспелі микрофлорадан тазалау нәтижесі бойынша бөлініп алынған цианобактериялардың 3 дақылдары үшін сәтті болды. 2 кестеде бөлініп алынған цианобактерияларды ілеспелі микрофлорадан тазалауда антибиотиктер кешенінің оптималды үйлесімі көрсетілген.

2-кесте – Цианобактериялары дақылдарын кешенді антибиотиктерге өсіріп ілеспелі микрофлорадан тазалау

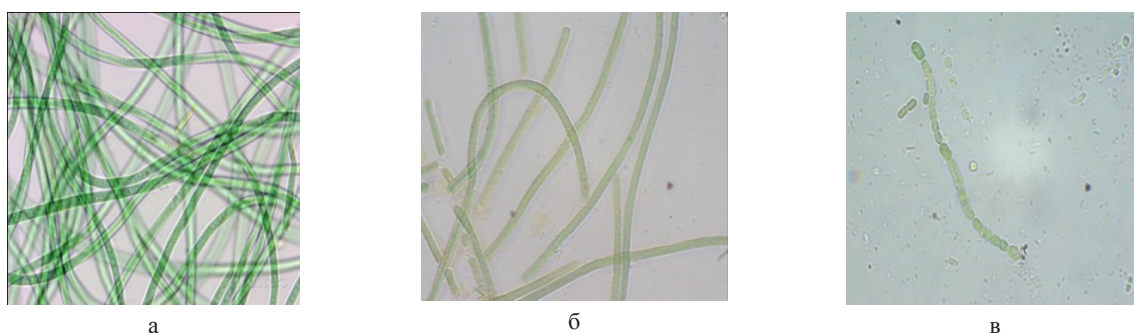
Антибиотиктер кешені 0,1:0,1:0,1:0,1 мг/мл	Цианобактерия дақылдары					
	SP-35		SP-O		SP-O1	
	ІМ	Ц	ІМ	Ц	ІМ	Ц
Гентамицин + пенициллин + тетрациклин + нистатин	-	+	-	+	-	+
Неомицин + ампициллин + хлорамфеникол + нистатин	-	+	-	+	-	+
Канамицин + пенициллин + ванкомицин + нистатин	+	+	-	+	+	+
Пенициллин + гентамицин + канамицин + нистатин	+	+	+	+	-	+

Ескерту: ІМ– ілеспелі микрофлора, Ц-цианобактерия, – өсім жоқ, + дақыл өсімі.

Цианобактериялардың тіршілікке қабілеттілігі – микроскопиялық және дақылды әдістермен бақыланды. Бөлініп алынған 3 цианобактерия дақылы толық бактериологиялық таза деп анықталды, себебі, дақылдарды 7 тәулік бойынша бөлме температурасында ұстау барысында ілеспелі микрофлораның өсуі байқалған жоқ.

Бактериологиялық таза дақылдардың морфологиясын зерттеу нәтижесі бойынша дақыл SP-O – айқын шырышты қабы бар жіпшелі цианобактерия, трихомалары жалғыз, бір қатарлы, түсі қара көк жасыл, жасуша өлшемі 2,2- 2,4-

х4,2-5,9 мкм. Трихомалары салыстырмалы параллельді орналасқан тәж түзеді. Шеткі жасушалары аздап шар тәрізді, кейде қалың қабатты. Көбею бір жазықтықта жүреді. Жасушалары тұнбаланбайды, тек шыны бетіне бекініп жоғары өседі. Қатты ортада нашар өседі, өсуі тек дақылдаудың 8-10 тәулігінде бақыланады. Штамм автотрофты. Сұйық Громов қоректік ортасында 22-30 °С температурда жақсы өседі (сурет 2а). Морфологиялық сипаттамасы бойынша – Класс: *Oscillatoriophyycideae* Қатар: *Oscillatoriales*, Тұқымдас: *Oscillatoriaceae*, туыс *Oscillatoria*.



2-сурет – Шар Нуур көлінен бөлініп алынған цианобактерия дақылдарының морфологиялық көрінісі, а -SP-35, б – SP-O, в -SP-O1 (үлкейту х90)

Бөлініп алынған цианобактерия дақылдарының токсинділігін тест-объекттер көмегімен анықтау.

Daphnia magna қолдану арқылы биотестілеу табиғи сулардың сапасын анықтауда кең қолданылады [12]. Зерттелетін судың бақылаумен салыстырғанда 24 немесе 48 сағат аралығында 50% және одан жоғары дафниялардың өлуі өткір токсинділіктің көрсеткіші болып саналады. Бөлініп алынған цианобактериялардың тест – объектіде биотоксинділігін бағалау тәжірибесі бойынша алғашқы сағат аралығында дақыл SP-O1 дақылдарынан басқа цианобактериялардың лиофилизацияланған биомассасының барлық зерттелген концентрациясында *D. magna* өлімі төмен болды. Биомассаның 1-10 мг/мл концентрациясында *D. magna* жылжу белсенділігі айтарлықтай төмендеді. Ол ықтимал токсиндердің әсеріне мінез құлықты жауап болуы мүмкін деп түсіндіріледі.

Дақыл SP – O1 дақылын зерттеу кезінде 1 мг/мл биомасса концентрациясында дафниялардың өлімі 24 сағатта 82-83% болды. Ал биомасса концентрациясын 10 мг/мл жоғарлату тест-

объектілердің 24 сағатта 100% өліміне әкелді (кесте 3).

Н.С. Строгановтың 4 баллдық токсинділік шкаласы бойынша цианобактерия дақылдары келесідей бағаланды [14]:

4 балл. Өте қатты токсинді штамдар дақыл SP -O1, ол тест-объектілерді 48 сағатта толық өлтірді.

3 балл. Орташа токсинді штамдар дақыл SP -35, оның қатысуымен 48 сағатта дафниялардың өлімі 80-84% құрды.

1 балл. Әлсіз токсинді штамдар: дақыл SP-O. 48 сағатта дафниялардың өлімі 15 %.

Сонымен бөлініп алынған цианобактерия дақылдарының *D. magna* тест-объектісіне қатынасы бойынша SP -O1 дақылдарының токсинділігі бар деп анықталды.

Бөлініп алынған цианобактерия штамдарының M HeLa ісік жасушаларының негізіндегі тест-жүйені пайдаланып токсинділігін анықтау

Өте және орташа токсинді деп анықталған цианобактерия дақылдарының езінділері M HeLa ісік жасушаларына әртүрлі цитотоксинді әсер көрсетті (кесте 4).

3-кесте – Цианобактериялардың лиофилизденген биомассасының әртүрлі концентрациясында (мг/мл) тест-объектінің (*Daphnia magna*) өлімі, %

Дақылдар	Тестілеу уақыты, сағат												
	1 сағ			6 сағ			24 сағ			48 сағ			
	Цианобактериялардың лиофилизденген биомассасының концентрациясы (мг/мл)												
	Б	0.1	1	10	0.1	1	10	0.1	1	10	0.1	1	10
SP-35	0	9	15	27	10	21	45	14	47	65	14	54	80
SP-O1	0	14	30	39	17	36	67	32	83	97	45	98	100
SP-O	0	0	0	0	0	0	3	0	1	10	0	3	15

4-кесте – M HeLa ісік жасушаларының жасуша сызығына қатынасы бойынша цианобактерия экстрактілерінің цитотоксінділігі (%)

Дақылдар	Леофилизденген цианобактерия жасушаларының метанольды экстрактісінің концентрациясы, мкг/мл						
	0,05	0,1	0,2	0,5	1	2	5
SP-35	35	37	38	39	42	42	45
SP -O1	82	83	89	89	89	90	97

Дақыл *SP – 35* жасушаларының езінділері барлық зерттелген концентрацияда цитотоксінділігі 50% асқан жоқ (кесте 4). Айтарлықтай әсер жасушалардың жоғарғы концентрациясында 5мМ бақыланды (43-45% өлген жасушалар).

Ал *SP-O1* жасушаларының экстрактілерінің концентрациясын жоғарлатқан сайын өздерінің цитотоксінділігінің белсенділігін арттыра түсті. Экстрактілердің концентрациясы 5 мМ – де ісік жасушаларының 92-97% өлді. Сонымен зерттеу нәтижесі бойынша бөлініп алынған цианобактерия дақылдары *M HeLa* ісік жасушаларына қатынасы бойынша әртүрлі цитотоксінділікке ие болды. Ісік жасушаларын жоғары тежеуіш қабілетті *SP -O1* дақылы 48 сағатта көрсетті.

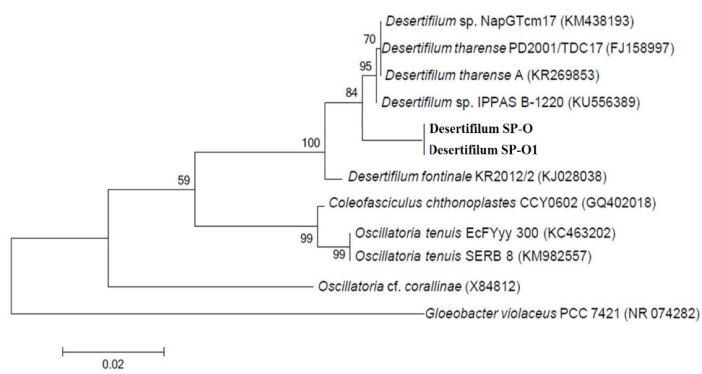
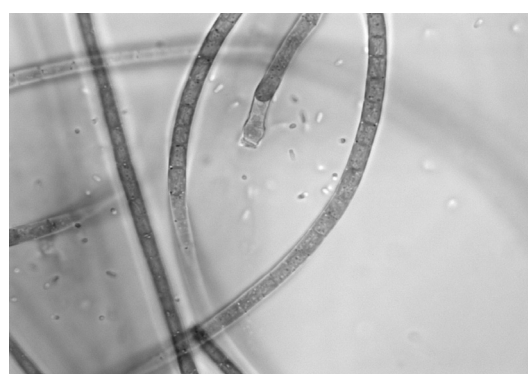
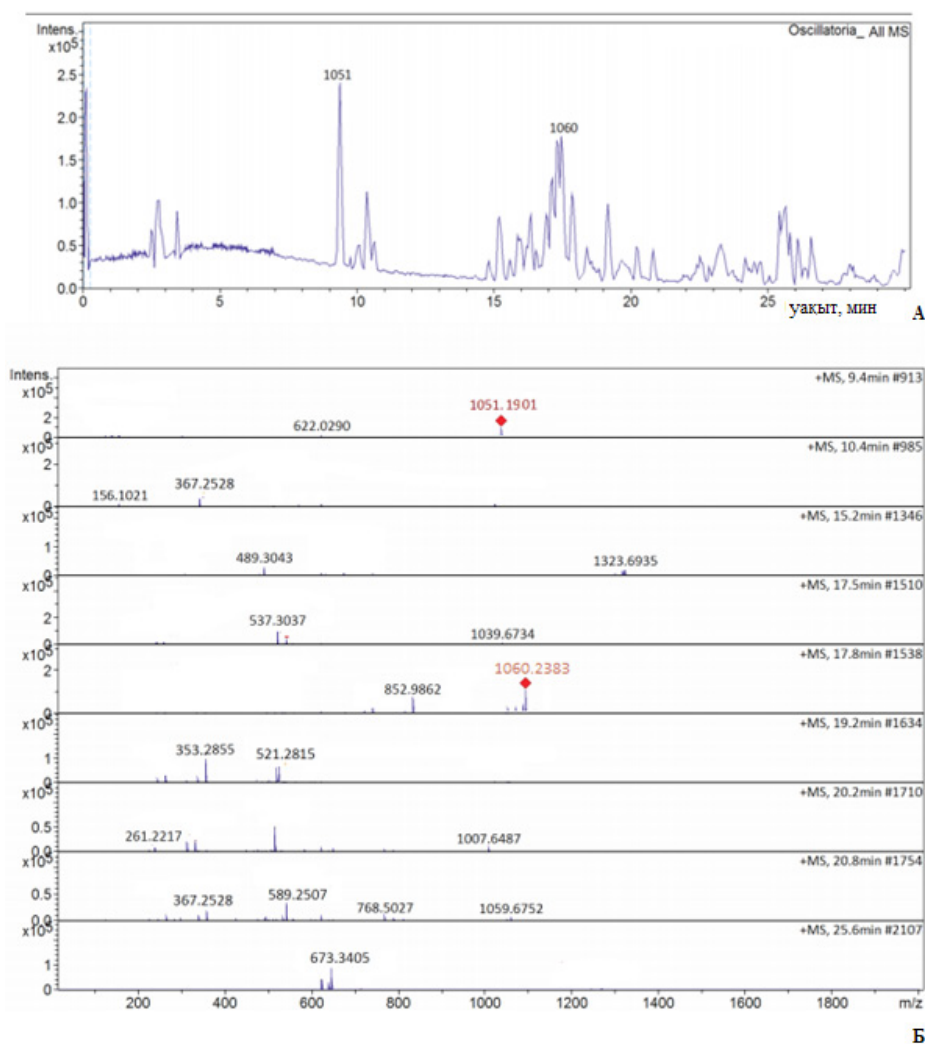
SP – O1 дақылы өндіретін токсиндерді анықтау

Ұзақ эволюцияның дамуы барысында цианобактериялар әртүрлі экстремальды жағдайларға бейімделу барысында әртүрлі екінші метаболиттерді, оның ішінде биотоксиндер мен цитотоксиндерді өндеруга қабілетті болды [15]. Цианобактериялар жасушаларының лиофилизденген экстрактілерінде болатын қосылыстарды идентификациялау *SP – O1* дақылының экстрактісінде екі циклды депсипептидтің – микропептин Т және осциллапептина С болатынын

көрсетті (сурет 4). Осциллапептина С мен салыстырғанда микропептин Т мөлшері жоғары болды. Бұл молекулалардың биологиялық рөлі әлі анықталмаған, бірақ бұл топтың пептидтерінің протеолитикалық белсенділігі жайлы мәліметтер бар [16]. Микропептиндер *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Microcystis*, *Nostoc* және *Oscillatoria* туысына қарайтын цианобактериялардан анықталған [17]. Осциллапептин С массалық заряды 1060 m/z циклды депсипептидтерге қарайды.

SP – O1 штамм биомассаларының экстрактілерінде анықталған токсиндер циклды депсипептидтерге жатады. Оларға анабенонептидтер, микропептиндер, микроцистилиндтер, осциллопептиндер, цианопептолиндер, эругинопептиндер және т.б. қарайды [18]. Циклды депсипептидтер немесе криптофициндер *Nostocaceae* тұқымдасынан алғаш бөліп алған күшті ісікке және саңырауқұлаққа қарсы депсипептидтер болып саналады. Топырақ цианобактериясы *Nostoc* sp. бөлініп алынған криптофицин өз атауын патогенді *Cryptococcus* spp. Бактериясын тежейтін белсенділігіне байланысты алған. Олар қатерлі ісік препараттарының рөліне көп үміт күтіретін кандидаттар болып саналады [19,20].

Токсин түзуші цианобактерияны молекулалық генетика әдісімен идентификациялау



a

b

4-сурет – Дақыл Desertifilum SP –1 филогенетикалық жағдайы (а) және жасуша микрофотографиясы (в), (үлкейту x 150)

Цианобактериялардың жаңа кешенді таксономиялық классификациясын құрастыруда молекула – биологиялық мәліметтер негізгі алынады. Бөлініп алынған альгологиялық және бактериологиялық таза цианобактериялардың филогенетикалық жағдайын анықтау және классификациялау 16S рРНҚ нуклеотидті бірізділігін талдау негізінде жүргізілді.

Цианобактерия штамдарынан бөлініп алынған ДНҚ геномын *Hot Start Taq*-полимераза мен бактериальды праймерлер 106F және 781R қолданып, ПЦР әдісінің көмегімен 16S рРНҚ генінің амплификациясы үшін матрица ретінде қолданылды. Бұл әдіс геннің толық бірізділігін алуға мүмкіндік береді.

Халықаралық мәліметтер базасы мен арнайы компьютерлік бағдарламаларды қолдана отырып алынған сиквенстер негізінде бөлініп алынған цианобактериялар штамда-

рын идентификациялауға мүмкіндік беретін генетикалық үйлесімдер анықталды. Сонымен SP – O1 зерттеу нәтижесінде *Desertifilum sp.* SP – O1 идентификацияланды (сурет 4).

Зерттеу жұмысымыздың нәтижесі бойынша Шар Нуур көлінен цианобактериялардың бактериологиялық таза 3 дақылдары бөлініп алынды. *SP-O1* штамының экстрактісін зерттеу нәтижесі бойынша қауіпті токсиндер анықталған жоқ. Идентификацияланған токсиндер негізінен микроцистиндерге қарайды. Шар Нуур көлінен бөлініп алынған цианобактерия SP-O1 дақылы ботаникалық белгілері бойынша *Oscillatoria* туысына жатқызылғанмен, генетикалық сараптама бойынша олар *Oscillatoriaceae* тұқымдасының жақында сипатталған *Desertifilum* штамының туысына жоғары гомологияны көрсетті. Осы мәліметтерге негізделе отырып SP-O1 дақылына *Desertifilum sp. l.* деген атау берілді.

Әдебиеттер

- 1 Carmichael W.W. The toxins of Cyanobacteria // Sci. Amer. – 1994. – №1. – P. 78–86.
- 2 Ballot A, Fastner J, and Wiedner C. Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in northeast Germany // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – V. 76. – P. 1173–1180.
- 3 Namikoshi M., Rinehart K.L. Bioactive compounds produced by cyanobacteria // J. Industr. Microbiol. Biotechn. – 1996. – V. 17. – P. 373–384.
- 4 Harada K.I. Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria // Chem. Pharm. Bull. – 2004. – V. 5. – P. 889–899.
- 5 Определитель сине-зеленых водорослей СССР // Отв. ред. Голлербах М.М. – Л.: Наука. – 1951. – С. 1–14.
- 6 Andersen R.A. Algal Culturing Techniques // New York, NY, U.S.A. Elsevier Academic Press. – 2005. – P. 578.
- 7 Темралеева А.Д., Минчева Е.В., Букин Ю.С., Андреева А.М. Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (Chlorophyta) // Кострома: Костромской печатный дом. – 2014. – 215 с.
- 8 Jones A.K., Muriel E., Rhodes M.E., Evans S.C. The use of antibiotics to obtain axenic cultures of algae // Brit. Phycol. J. – 1973. – V. 8. – №1. – P. 185–196.
- 9 Day Chronic toxicity test using *Daphnia magna* or *Daphnia pulex* // – 1994. SOP №2028: <https://clu-in.org/download/ert/2028-R00.pdf>.
- 10 Волошко Л.Н., Плющ А.В., Титова Н.Н. Токсины Цианобактерий (Cyanobacteria, Cyanophyta) // Альгология. – 2008. – Т.18. – №1. – С. 3–21.
- 11 Brittain S., Mohamed Z.A., Wang J., Lehmann V.K.B. Isolation and characterization of microcystins from a river Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont // Toxicon. – 2000. – V. 38, № 12. – P. 1759–1771.
- 12 Freshney R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, Sixth Edition ISBN: 978-0-470-52812-9. – 2001. – 796 p.
- 13 Dittman E., Fewer D.P., Neilan B.A. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary routes // FEMS Microbiol. Rev. – 2013. – V. 37. – P. 23–43.
- 14 Bell S.G., Codd G.A. Cyanobacterial toxins and human health // Rev. Med. Microbiol. – 1994. – № 4. – P. 256–264.
- 15 Kardinal W.E.A., Visser P.M. Dynamics of cyanobacteria toxins. Sources of variability in microcystin concentrations // Harmful cyanobacteria. Netherlands: Spinger, – 2005. – P. 41–63.
- 16 Al-Sultan E.Y.A. The Isolation, the purification and the identification of hepatotoxin Microcystin-LR from two cyanobacterial species and studying biological activity on some aquatic organisms // J. Basrah Res. (Sci.). – 2011. – V. 37. – P. 39–57.
- 17 Codd G.A. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance // Wat. Sci. Tech. – 1995. – V. 32. – P. 149–156.
- 18 Chaganty S., Golakoti T., Heltzel C., Moore R.E., Yoshida W.Y. Isolation and structure determination of cryptophycins 38, 326, and 327 from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc sp.* GSV 224 // J. Nat. Prod. – 2004. – V. 67. – P. 1403–1406.
- 19 Trimurtulu G., Ogino J., Hessel C.E., Husebo, Jensen C.M., Larsen L.K., Patterson G.M.L., Moore R.E., Mooberry S.I., Corbett T.H., Valeriote F.A. Structure determination, conformational analysis, chemical stability studies, and antitumor evaluation of the cryptophycins. Isolation of 18 new analogs from *Nostoc sp.* strain GSV 224 // J. Amer. Chem. Soc. – 1995. – V. 117. – P. 12030–12049.

20 Okino T., Murakami M., Haraguchi R., Munekata H., Matsuda H., Yamaguchi K. Micropeptins A and B, plasmin and trypsin inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* // *Tetrahedron Lett.* – 1993. – V. 34, № 50. – P. 8131–8134.

References

- 1 Carmichael W.W. (1994) The toxins of Cyanobacteria, *Sci. Amer.* 1: 78–86.
- 2 Ballot A, Fastner J, and Wiedner C. (2010) Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in northeast Germany, *Appl. Environ. Microbiol.* 76:1173–1180.
- 3 Namikoshi M., Rinehart K.L. (1996) Bioactive compounds produced by cyanobacteria, *J. Industr. Microbiol. Biotechn.* 17: 373–384.
- 4 Harada K.I. (2004) Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria, *Chem. Pharm. Bull.* 5:889–899.
- 5 Gollerbah M.M.. (1951) The determinant of blue-green algae of the USSR, L: Nauka, pp. 1-14.
- 6 Andersen R.A. (2005) *Algal Culturing Techniques*, New York, NY, U.S.A. Elsevier Academic Press. pp. 578.
- 7 Tamraleeva A.D., Mincheva E.V., Bukin U.S., Andreeva A.M. (2014) Modern methods of isolation, cultivation and identification of green algae (Chlorophyta). *Kostroma. [Sovremennyye metody vydeleniya, kultivirovaniya i identifikatsiya zelenykh vodoroslei (Chlorophyta). – Kostroma] :215.* (In Russian).
- 8 Jones A.K., Muriel E., Rhodes M.E., Evans S.C. (1973) The use of antibiotics to obtain axenic cultures of algae, *Brit. Phycol. J.* 8(1-2):185–196.
- 9 Day (1994) Chronic toxicity test using *Daphnia magna* or *Daphnia pulex*, SOP, 2028:<https://clu-in.org/download/ert/2028-R00.pdf>.
- 10 Voloshko L.N, Plush A.V., Titova N.N. (2008) Toxins Cyanobacteria. *Algology (Cyanobacteria, Cyanophyta) [Toksiny Cyanobakterii (Cyanobacteria, Cyanophyta). Algologia]* 18 (1):3-21. (In Russian)
- 11 Brittain S., Mohamed Z.A., Wang J., Lehmann V.K.B (2000) Isolation and characterization of microcystins from a river Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont, *Toxicon.* 38 (12): 1759–1771.
- 12 Freshney R.I. (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, Sixth Edition ISBN: 978-0-470-52812-9. P. 796.
- 13 Dittman E., Fewer D.P. (2013) Neilan B.A. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary routes, *FEMS Microbiol. Rev.*37: 23–43.
- 14 Bell S.G., Codd G.A. (1994) Cyanobacterial toxins and human health, *Rev. Med. Microbiol.* 4: 256-264.
- 15 Kardinal W.E.A., Visser P.M. (2005) Dynamics of cyanobacteria toxins. Sources of variability in microcystin concentrations, *Harmful cyanobacteria*. Netherlands: Springer, 41 -63.
- 16 Al-Sultan E.Y.A. (2011) The Isolation, the purification and the identification of hepatotoxin Microcystin-LR from two cyanobacterial species and studying biological activity on some aquatic organisms, *J. Basrah Res. (Sci.)*. 37:39–57.
- 17 Codd G.A. (1995) Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance, *Wat. Sci. Tech.* 32:149–156.
- 18 Chaganty S., Golakoti T., Heltzel C., Moore R.E., Yoshida W.Y. (2004) Isolation and structure determination of cryptophycins 38, 326, and 327 from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. GSV 224, *J. Nat. Prod.* 67:1403–1406.
- 19 Trimurtulu G., Ogino J., Helsel C.E., Husebo, Jensen C.M., Larsen L.K., Patterson G.M.L., Moore R.E., Mooberry S.I., Corbett T.H., Valeriote F.A. (1995) Structure determination, conformational analysis, chemical stability studies, and antitumor evaluation of the cryptophycins. Isolation of 18 new analogs from *Nostoc* sp. strain GSV 224, *J. Amer. Chem. Soc.* 117:12030–12049.
- 20 Okino T., Murakami M., Haraguchi R., Munekata H., Matsuda H., Yamaguchi K. (1993) Micropeptins A and B, plasmin and trypsin inhibitors from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Lett.* 34(50):8131–8134.