

7 Заядан Б.К. Г. Өнерхан Микробалдырлардың таза дақылдарын бөліп алу және оларды белсенді өсіру тәсілдері Көкшетау 2008ж, 95б.

8 Pankratova, J.M. Designing of microbial binary cultures based on blue-green algae (Cyanobacteria) Nostoc paludosum Kütz // International Journal on Algae. - 2004. – Vol.6. - N 3. – P.290-304.

\*\*\*

Кызылорда облысы Шиелі ауданының күріш алқабынан 47 балдырдың түрлері мен түр аралықтары анықталды және олардың ішінен: эвгленалар -1, жасыл балдыралар -10, көкжасыл балдырлар -15, диатомдар -21. Микробалдырлар мен цианобактериялардың 5 бактериалды таза дақылдары бөлініп алынып, олардың морфологиялық, дақылдандыру қасиеттері зерттелді.

\*\*\*

In the rice fields Shiely district of Kyzylorda region was found 47 species and varieties of algae, including: euglenophytes - 1, green - 10 blue-green - 15, diatom - 21. Identified five bacteriological pure cultures of microalgae and cyanobacteria, and studied their morphological and cultural properties.

**Т.А. Карпенюк, А.В. Гончарова, С.Б. Оразова, С.А. Джокебаева, Р.У. Бейсембаева**  
**ПОИСК МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ, СИНТЕЗИРУЮЩИХ**  
**АРАХИДОНОВУЮ КИСЛОТУ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫЕ**  
(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

*С использованием теста на чувствительность к ацетилсалициловой кислоте проведен скрининг на способность микроводорослей и микроорганизмов, выделенных из почв и водоемов Казахстана, синтезировать арахидоновую кислоту. Отобраны 4 штамма, имеющие перспективу практического использования для разработки биотехнологии получения арахидоновой кислоты.*

Большое значение для человека и сельскохозяйственных животных имеют полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК). Они подвергаются биотрансформации окислительными ферментами, что приводит к образованию разнообразных низкомолекулярных регуляторов биологических процессов, протекающих в клетках, тканях и целостном организме [1,2]. Одной из наиболее важных ПНЖК является арахидоновая кислота (АК), которая выступает в роли непосредственного предшественника эйкозаноидов (простагландинов, лейкотриенов и тромбоксанов) – большого семейства высокоактивных соединений, обладающих необычайно широким спектром биологических эффектов. В 90-е годы были получены данные, позволяющие рассматривать арахидоновую кислоту и ее продукты в качестве системы вторичных посредников. Во многих случаях показано, что арахидоновая кислота и ее производные могут взаимодействовать с другими системами передачи информации в клетке, модулируя их сигналы. Арахидоновой кислоте приписывается важная роль в регуляции лиганд-рецепторных взаимодействий, активности ионных каналов и активности регуляторных ферментов (фосфолипазы С), аденилатциклазы, гуанилатциклазы, протеинкиназы С в качестве внутриклеточного мессенджера [3].

Арахидоновая кислота находит широкое применение в: фармакологии (предшественник различных лекарственных и профилактических препаратов, применяемых при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, печени и др); косметической промышленности (средства по уходу за кожей); пищевой промышленности (обогащение различных продуктов питания, в том числе искусственных детских молочных смесей и др); сельском хозяйстве (высокоэффективный стимулятор роста и защитных реакций растений) и др. [4-6].

В организме АК человека и животных не синтезируется, поэтому основными источниками арахидоновой кислоты являются продукты, которые содержат фосфолипиды и *ненасыщенные жирные кислоты*.

В настоящее время основным источником получения АК являются липидные экстракты из печени свиньи и других органов животных, что делает их крупномасштабное производство неэффективным (содержание АК составляет не более 0,2% в пересчете на сухую массу). В последние два десятилетия достигнуты определенные успехи в области биотехнологического получения АК с помощью низших грибов и морских водорослей. Однако, существующие на сегодняшний день

биотехнологии получения АК далеко несовершенны, поскольку ее выход в лабораторных условиях в лучших случаях составляет 13 г/л (Япония), а в среднем у различных исследователей около 6-10 г/л (Россия, США, Польша и др). В связи с этим актуальным является поиск и создание высокоэффективных продуцентов АК и разработка биотехнологических способов ее получения [7-9]. Целью настоящей работы является поиск высокоэффективных продуцентов АК среди микроорганизмов и микроводорослей.

#### Материалы и методы:

Объектами для отбора эффективных продуцентов арахидоновой кислоты (по биотесту на чувствительность к ацетилсалициловой кислоте (АСК) служили штаммы микроводорослей и микроорганизмов, выделенных из водоемов и почв Казахстана.

Штаммы микроводорослей (*Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella sp. (T<sub>4</sub>)*, *Chlorella sp. (Ч<sub>3</sub>)*, *Chlorella sp. (E<sub>24</sub>)*, *Oocystis rhomboideus*, *Spirulina platensis (532)*), выделенные из пресных водоемов Казахстана, культивировали на 1,4% агаре, среде Фитцджеральд, среде 16 при температуре 28<sup>0</sup>, 7-10 суток.

Культуры микроорганизмов, выделенные из почв Казахстана, проб воды из акватории Каспийского моря культивировали на питательной среде МПА (мясо-пептонный агар). Посев суспензии микроорганизмов производили методом Коха в трёх повторностях. Чашки после посева ставили в термостат при температуре 28<sup>0</sup>С, на 3 суток.

Определение АСК - чувствительности проводили по методу Ерошина В.К. и др [10]. Метод основан на корреляции между уровнем синтеза арахидоновой кислоты и чувствительностью роста микроорганизмов к низким концентрациям - АСК (около 0,84 г/л). Концентрация АСК в среде культивирования составила 0,42-0,5 г/л; 0,84 г/л; 1,68 г/л.

Для определения родовой принадлежности микроорганизмов, синтезирующих АК проводили изучение морфолого-культуральных (окраска по Граму, спорообразование, подвижность, форма клеток) и физиолого-биохимических признаков (тесты на каталазную, оксидазную, амилазную активности, кислото-образование и т.д.) по общепринятым методикам [11].

#### Результаты

Арахидоновая кислота широко распространена в животных тканях. Однако ее выделение осложнено высокой чувствительностью к окислению, низким содержанием в указанных объектах, а так же присутствием ее совместно с другими полиеновыми кислотами, близкими по физико-химическим свойствам.

Перспективность использования микроводорослей и микроорганизмов в качестве источника для получения арахидоновой кислоты (по сравнению с животными источниками) обусловлена быстрыми темпами роста культуры, возможностью совместного получения липидов и других классов биологически важных веществ (белков, углеводов, пигментов и др.). Однако, чтобы получение арахидоновой кислоты из микроводорослей и микроорганизмов было экономически целесообразным и более выгодным по сравнению с использованием традиционных источников, требуется поиск ее активных продуцентов, дальнейшее усовершенствование технологии извлечения арахидоновой кислоты из биомассы и т.д..

В работе представлены результаты скрининга коллекционных штаммов микроводорослей и микроорганизмов, выделенных из различных водоемов и почв Казахстана, проведенного с целью выявления среди них продуцентов арахидоновой кислоты, перспективных для разработки на их основе биотехнологического метода ее получения.

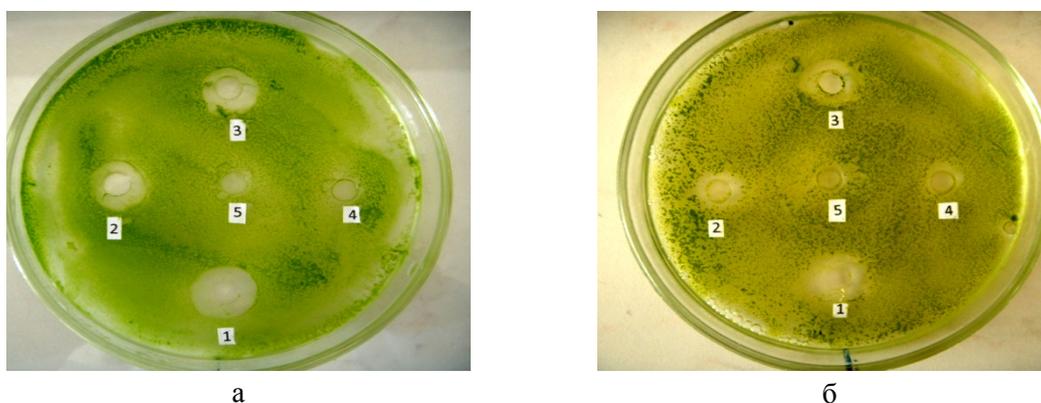
Известно, что микроводоросли представляют собой огромный биологический ресурс, они находят применение в разных областях науки и технологии (фармакология, косметология, пищевая промышленность, с/х, производство биотоплива и т.д.). Представители различных видов микроводорослей различаются по содержанию насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Некоторые из них могут стать источником ненасыщенных жирных кислот, которые можно использовать в качестве пищевых и кормовых добавок, компонентов косметических и лечебных препаратов. К сожалению, в настоящее время среди 50000 известных видов микроводорослей только некоторые имеются в различных коллекциях, несколько сот видов изучены с точки зрения химического состава, свойств и только десятки выращиваются в промышленных масштабах (*Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina Platensis* и др.). Не исключением в этом плане является и Казахстан. Нами собрана и поддерживается коллекция микроводорослей, численность которой составляет более 30 альгологически и бактериологически чистых культур, проводится работа по их идентификации, подбору условий культивирования. Некоторые идентифицированные штаммы, представленные в

коллекции, были использованы для скрининга на способность синтезировать арахидоновую кислоту. Для этого рост и развитие микроводорослей исследовали в присутствии в среде разных концентраций АСК.

АСК является необратимым ингибитором метаболизма арахидоновой кислоты, она ацетирует Ser-530 простагландин Н синтазы и тормозит синтез простагландинов [1,11]. В настоящее время неспособность бактерий, грибов и дрожжей расти в присутствии АСК применяют в качестве критерия для отбора штаммов, синтезирующих метаболиты арахидоновой кислоты [12].

В чашки Петри заливали среду, после застывания делали 5 лунок. В лунки заливали суспензию микроводорослей с разной концентрацией аспирина. В 1 лунку - суспензию микроводорослей с 1,4 мг аспирина, 2 лунку - с 1,0 мг аспирина, 3 лунку – с 0,84 мг аспирина, 4 лунку - с 0,5 мг аспирина, 5 лунку - суспензию микроводорослей без аспирина. Чашки Петри оставляли в световых шкафах при температуре 28<sup>0</sup> на 7-10 суток. Затем измеряли диаметры (см) зоны ингибирования. Полученные результаты показали, что штаммы микроводорослей различаются по своей чувствительности к АСК. Наибольшее ингибирование роста отмечалось для штамма *Scenedesmus quadricauda* и *Chlorella sp.* (Ч<sub>3</sub>). В то же время при всех концентрациях АСК не наблюдалось ингибирование роста штамма *Spirulina platensis* (532).

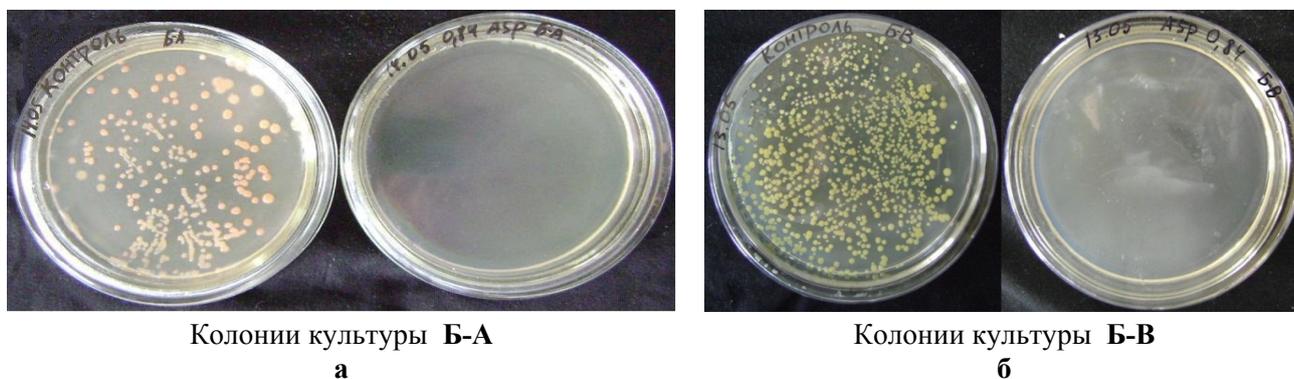
Штаммы *Scenedesmus quadricauda* и *Chlorella sp.*(E<sub>24</sub>) были отобраны нами в качестве перспективных для разработки технологии получения арахидоновой кислоты.



**Рисунок 1** - Влияние аспирина на рост (а) *Chlorella sp.* (Ч<sub>3</sub>) и (б) *Scenedesmus quadricauda*: 1 лунка – 1,4 мг аспирина, 2 лунка - 1,0 мг аспирина, 3 лунка – 0,84 мг аспирина, 4 лунка - 0,5 мг аспирина, 5 лунка - без аспирина.

Также был проведен поиск природного продуцента арахидоновой кислоты среди микроорганизмов, выделенных из почв Казахстана и проб воды из акватории Каспийского моря .

Сравнительный анализ способности культур микроорганизмов расти при трех концентрациях АСК (0,42 г/л; 0,84 г/л; 1,68 г/л) в среде позволил отобрать 10 штаммов, среди которых 2 (обозначенные как Б-А и Б-В) обладали максимально выраженным селективным влиянием на их рост АСК в концентрации 0, 42 и 0,84 г/л (Рис.2).



**Рисунок 2** - Влияние ацетилсалициловой кислоты на рост и развитие колоний Б-А и Б-В; Примечание: а – среда без АСК ( контроль ), б - среде с АСК в концентрации 0,84 г/л.

**Рисунок 2** - Влияние ацетилсалициловой кислоты на рост и развитие колоний Б-А и Б-В;

Ростовые процессы остальных культур микроорганизмов не изменялись при добавлении 0,84 г/л аспирина в среду культивирования.

Для идентификации аспиринчувствительных культур было проведено морфологическое описание колоний, а также исследован ряд физиолого – биохимических показателей (таблица 1,2).

Таблица 1-Морфологические признаки колоний культур продуцентов АК

Объект	Консистенция	Цвет	Диаметр колонии, мм	Форма колонии	Профиль	Блеск и прозрачность
Б - А	мягкая	оранжевый	5 - 10	круглая, края ровные	плоский	блестящая непрозрачная
Б - В	мягкая	желтый	5 - 8	круглая, края ровные	слегка выпуклый	блестящая непрозрачная

На основании результатов исследования морфологии и физиолого-биохимических признаков, культуры микроорганизмов – продуцентов АК идентифицированы как бактерии рода *Pseudomonas* (Б - А) и *Bacillus* (Б - В).

Таблица 2 - Морфолого-культуральные и физиолого-биохимические признаки микроорганизмов, синтезирующих АК

Признак	Б - А	Б - В
Окраска по Граму	Г-	Г+
Спорообразование	-	+
Подвижность	подвижные	подвижные
Форма клеток	палочки	палочки
Каталаза	+	+
Оксидаза	+	-
Амилаза	-	-
Окисление глюкозы (тест Хью-Лейвсона)	++	++
Лецитиназа	-	+
Разжижение желатины	+	+
Денитрификация	-	-

Учитывая чувствительность выбранных микроорганизмов к АСК и их способность к синтезу арахидоновой кислоты эти культуры могут быть рекомендованы для дальнейших исследований.

1. Давлетбаев И.М. Биосинтез полиненасыщенных жирных кислот и их производных: Автореф. дис. к. б.н. – УФА, 2002. – 24 с.
2. Казимирко В.К., Мальцев В.И. Функции ненасыщенных жирных кислот в организме // Здоровье Украины. – 2004. - №95 - С. 93-101.
3. Назаров П.Е., Мягкова Г. И., Гроза Н.В. Полиненасыщенные жирные кислоты как универсальные эндогенные биорегуляторы // Вестник МИТХТ. – 2009. - т.4. - №15. - С. 205-210.
4. Kuratko C., Arterburn L., Hoffman J.P , Nelson E.B Importance of arachidonic acid in long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented infant formula // American Journal of Clinical Nutrition, 2005, Vol. 82, No. 6, 1353-1354.
5. Ramwell P.W. Biologic Importance of Arachidonic Acid // Arch Intern Med. 1981;141(3):275-278.
6. Brash A.R. Arachidonic acid as a bioactive molecule // J Clin Invest. 2001;v.107 (issue 11): p. 1339–1345.
7. Сергеева М.Г., Варфоломеева А. Каскад арахидоновой кислоты // М. Народное образование, 2006.-256 с.
8. Zhu M., Yu L.J., Liu Z., Xu H.B. Isolating Mortierella alpine strains of high yield of arachidonic acid // Letters in Applied Microbiology. - 2004. - V.39. - P.332-335.
9. Утегенова Г. А., Бейсембаева Р. У., Оразова С. Б., Цуркан Я.С., Калбаева А. М., Карпенюк Т.А., Гончарова А.В. Поиск продуцентов арахидоновой кислоты – субстрата для разработки биотехнологии получения простагландинов // Материалы международной заочной научно-практической конференции «Инновации и современная наука». Часть I. (12 декабря 2011 г.). - Новосибирск: Изд. «Сибирская ассоциация консультантов», 2011. - С. 35-39.
10. Ерошин В.К., Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Желифонова В.П., Ботаст Р.Дж. Исследование синтеза арахидоновой кислоты грибами рода *Mortierella*: микробиологический метод селекции продуцентов арахидоновой кислоты // Микробиология. – 1996. - Т. 65. - №1. - С. 31-36.
11. Под ред. Егорова Н.С. Практикум по микробиологии - Москва: «Издательство Московского университета», 1976.
12. Vane J.R. Inhibition of action for aspirin-like drugs // Nature New Biology. - 1971- V.231- №23. - С. 232-235.