

Тұжырым

Chlorella sp. (штамм E24) и *Anabaenopsis sp.* (Марк6) мутуалистік ара-қатынастарымен сипатталатын микробалдырлардың қос дақылында клеткалардың антиоксиданттық қорғаныш жүйесі ферменттерінің активтілігі төмендегені анықталды. Қос дақылдардағы биотикалық ара-қатынастардың түрін бағалау үшін бұл көрсеткішті пайдалану үшін мүмкіндік туындау мүмкін.

Summary

Decrease in activity of enzymes antioxidant protection of cells of microalgae *Chlorella sp.* (strain E24) and *Anabaenopsis sp.* (Марк6), in biculture, characterized by mutualistic interference type is established. Possibility of use of this indicator for an estimation of types of biotic mutual relations in biculture is supposed.

УДК 57.082

Джокебаева С.А., Калбаева А.М., Оразова С.Б.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМОВ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕКОТОРЫХ КУЛЬТУР МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

Подобраны щадящие режимы криоконсервации микроводорослей Chlorella sp.(штамм MB-1) и Anabaenopsis sp. (штамм Марк 6) методом витрификации, обеспечивающие сохранность физиолого-биохимических свойств на уровне, близком к контролю.

Микроводоросли, будучи универсальным сырьем для многих биотехнологических производств, требуют особого внимания к сохранению их генетической и физиолого-биохимической стабильности. Поскольку для непрерывного производственного процесса нужен гарантированный источник сырья, необходима разработка методов длительного сохранения физиологически активных культур клеток [1,2].

Криоконсервация культур при температуре жидкого азота является наиболее отвечающим требованиям методом. Один из способов криоконсервации, витрификация, относительно легко выполнима даже в неоснащенных специальным оборудованием лабораториях [3].

В ранее проведенных исследованиях мы убедились, что метод витрификации может быть применен для криосохранения коллекционных штаммов микроводорослей. Подобраны протоколы криозамораживания для отдельных видов, обеспечивающие высокую жизнеспособность культур [4,5]. Однако остается невыясненной сохранность физиолого-биохимических свойств после криозамораживания и оттаивания культур.

Очень широкий спектр видового разнообразия микроводорослей не позволяет использовать один общий метод криозамораживания, который подошел бы для всех видов. Поэтому стоит вопрос о поиске индивидуальных протоколов, оптимальных для отдельно взятых или желательных для близкородственных микроводорослей.

В связи с этим, целью данной работы являлся подбор режимов криоконсервации, при которых физиолого-биохимические характеристики культур микроводорослей (рост, жизнеспособность, содержание пигментов, активность нитратредуктазы) были бы максимально приближены к характеристикам не подвергавшихся криозамораживанию микроводорослей.

Материалы и методы

В качестве объекта для экспериментов взяты два штамма микроводорослей, отличающиеся по морфологическим признакам: 1) – одноклеточная, зеленая водоросль *Chlorella sp.*, выделенная из воды Каспийского моря (штамм MB-1). 2) – нитчатая сине-зеленая микроводоросль *Anabaenopsis sp.*, полученная из образцов, отобранных из озера Маркаколь (штамм Марк 6). Колбы с суспензионными культурами микроводорослей выставляли в люминистат с фотопериодом 16 ч.-свет/8 ч.-темнота, при освещенности 4000 лк.

Для приготовления инокулятов из жидких суспензий зеленых одноклеточных водорослей проводили центрифугирование культур при 6000 об/мин в течение 15 минут. Процедуру повторяли, пока в осадке не набиралось приблизительно 0,5-1,0 г биомассы. Далее отобранную биомассу суспендировали в свежей питательной среде и рассевали в колбы на 100 мл для выращивания в течение 5-6 дней, что соответствует log фазе ростового цикла культур. После чего процедуру центрифугирования для отделения биомассы от культуральной жидкости повторяли. В случае нитчатой синезеленой водоросли для отделения биомассы от культуральной жидкости достаточно было профильтровать культуру через капрон.

При криозамораживании культур микроводорослей использовали протокол, составленный для высших растений. Этот протокол был адаптирован нами для микроводорослей. В экспериментах по криозамораживанию культур микроводорослей использованы следующие сочетания криопротекторов и осмотиков: 1) ДМСО (диметилсульфоксид) 5% (Д5), 2) ДМСО 8% (Д8), 3) Глицерин 5% (Г5), 4) Глицерин 15% (Г15) и 5) Глицерин 30% в сочетании 0,4 М сахарозой (Г30), и соответственно контрольный вариант (К), который ничем не обрабатывался. В первых четырех вариантах роль и осмотика, и криопротектора

выполняется одним соединением. Только в пятом варианте в дополнение к глицерину добавлена сахароза, которая усиливает осмотическую функцию глицерина.

После проведения опыта по криозамораживанию культуры микроводорослей высевали на свежую питательную среду Фитцджеральда в пластиковые контейнеры объемом 200 мл, которые выставляли в люминистат.

Определение динамики прироста концентрации клеток (в случае одноклеточных культур) или прироста биомассы проводили путем вычисления коэффициента размножения по формуле [6]:

$$KP = \frac{M_2}{M_1}, \quad (1)$$

где, M_1 – сухой вес посевного материала (начальная концентрация клеток), M_2 – сухой вес биомассы в конце опыта (конечная концентрация клеток).

Определение живых и мертвых клеток в культурах синезеленых водорослей проводили цитохимическим методом с помощью трифенилтетразолий хлорида [6] и по увеличению плотности суспензий при 750 нм.

Для экстракции пигментов из водорослей, отделенных от среды, центрифугированием при 6000 об/мин в течение 10 минут, биомассу суспендировали в небольшом количестве 80% ацетона. Полученную суспензию растирали в фарфоровой ступке с кварцевым песком. Порошковидное вещество брали в 10–15-кратном по объему количестве по отношению к объему суспензии. Водоросли растирали в течение 3–6 минут до полного испарения ацетона. Полученный порошок переносили на стеклянный фильтр Шотта (№ 3) и заливали небольшими порциями растворителя. Откачивали воздух с помощью водоструйного насоса. Затем измеряли общий объем экстракта и измеряли поглощение на спектрофотометре.

Последующие расчеты проводили по формулам [8]:

$$C_a \text{ (мг/л)} = 11,64 (E_{663}) - 2,16 (E_{645}) + 0,10 (E_{630}), \quad (2)$$

$$C_b \text{ (мг/л)} = - 3,94 (E_{663}) + 20,97 (E_{645}) - 3,66 (E_{630}), \quad (3)$$

Определение содержания каротиноидов проводили в той же вытяжке, измеряя на спектрофотометре поглощение экстракта при 425.5 нм.

Для расчетов использовали формулу:

$$C_{\text{кар}} = 4,75 \cdot C_{425,5} - 0,226 \cdot C_{\text{хл а}} + C_{\text{хл б}} \quad (4)$$

Активность нитратредуктазы (НР) определяли по количеству эндогенно образовавшегося нитрита, который накапливался в клетках в темноте, в анаэробных условиях [7].

Статистическую обработку полученных результатов проводили стандартными методами.

Результаты и их обсуждение

У штамма МВ-1 наиболее высокий уровень жизнеспособности после криозамораживания определен при концентрации глицерина 30%, что приблизительно на 30% ниже показаний, определенных в контроле (рисунок 1). Все остальные варианты показали значительно более низкие результаты. Самый низкий уровень жизнеспособности определен в варианте Г5. Можно предположить, что повышение концентрации глицерина до 30%, увеличивая вязкость криопротекторного раствора, оказывает защитное действие, поглощая внутриклеточную воду, что препятствует образованию кристаллов льда.

Anabaenopsis sp., относящийся к сине-зеленым микроводорослям, которые имеют плотную клеточную оболочку, окруженную дополнительно слизистым чехлом, выдержал сверхнизкую температуру лучше, чем *Chlorella sp.* (рисунок 2).

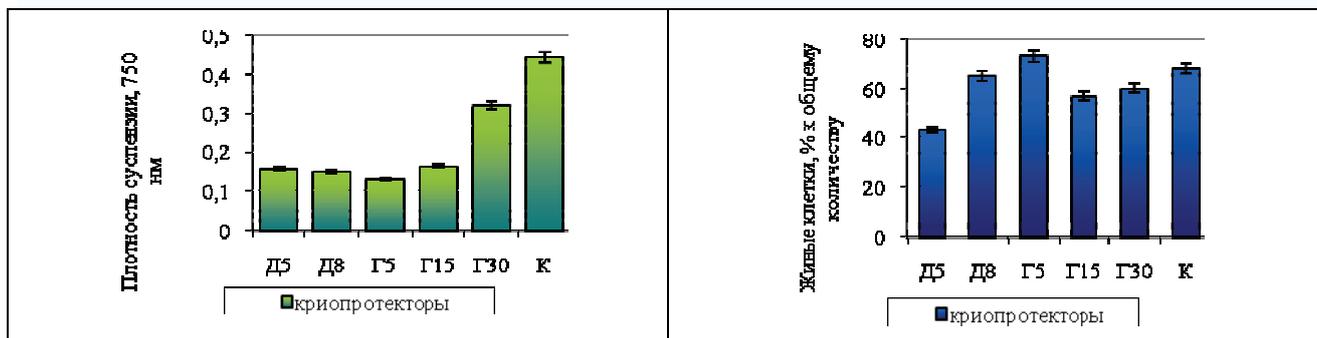


Рисунок 1 – Определение жизнеспособности *Chlorella sp.* (штамм МВ-1) по оптической плотности суспензии

Рисунок 2 – Определение жизнеспособности *Anabaenopsis sp.* (штамм Марк-6) цитохимическим методом

В соответствии с рисунком 3, в вариантах, обработанных криопротекторами и осмотиками наибольший коэффициент размножения за 7 дней культивирования получен для 30%-ного глицерина с добавлением сахарозы. Величина коэффициента размножения только на 20% ниже контрольного значения. В варианте Г5 возрастание сухой массы клеток минимально и составляет 72%. При концентрации глицерина 15% накопления

сухой массы фактически не происходит, хотя клетки живые. В остальных вариантах: Д5 и Д8 происходила гибель клеток.

В отличие от *Chlorella sp.* у *Anabaenopsis sp.* штамма Марк 6 высокие значения коэффициента размножения, наоборот, достигнуты не в вариантах, обработанных глицерином, а в вариантах, обработанных ДМСО 5 и 8% (рисунок 4).

При сравнении рисунков 5 и 6 видно, что *Anabaenopsis sp.* (штамм Марк-6) накапливает сухую массу гораздо интенсивнее, чем зеленая микроводоросль *Chlorella sp.* (штамм МВ-1).

Тем не менее, следует отметить, что у обоих штаммов после криоконсервации ростовые процессы осуществлялись довольно медленно, сразу после опыта клетки теряли пигментацию, суспензии были почти прозрачными. Культуры начали обретать цвет только по истечении 5-6 дней.

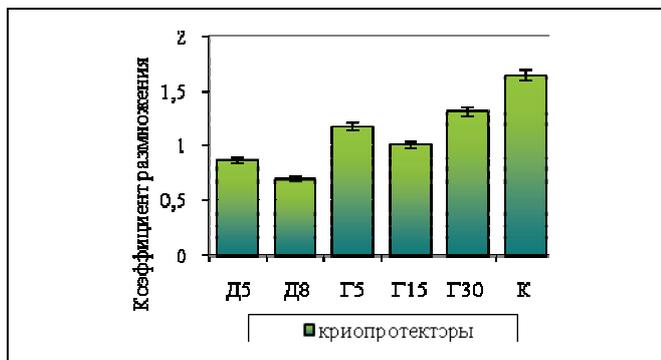


Рисунок 3 – Коэффициент размножения зеленой микроводоросли *Chlorella sp.*

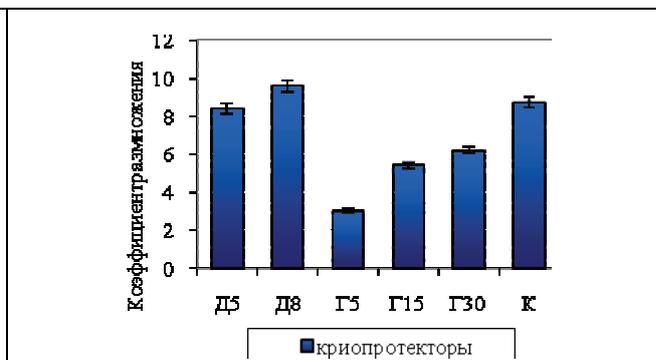


Рисунок 4 – Коэффициент размножения *Anabaenopsis sp.* (штамм Марк-6)

Определение содержания зеленых пигментов у зеленой микроводоросли *Chlorella sp.* показало, что варианты, обработанные 5 и 8% ДМСО показали высокое содержание хлорофилла А и каротиноидов, что составило 4,0 и 3,5 мг на 1 грамм сухой массы. Содержание пигментов в этих вариантах превышало содержание такового в контроле почти в три раза. Все концентрации глицерина показали более низкие результаты (рисунок 5). Хлорофилл Б, являющийся дополнительным пигментом фотосинтеза и входящий в светособирающий комплекс, во многих стрессовых ситуациях может превращаться в А форму хлорофилла и, наоборот, хлорофилл А может переходить в форму Б. Как показывает рисунок 5, содержание хлорофилла Б изначально у *Chlorella sp.* довольно высокое. В вариантах Д8 и Г30 его количество незначительно снижается. Только при обработке ДМСО 5% количество хлорофилла Б значительно ниже, чем в других вариантах. Содержание каротиноидов при обработке ДМСО во всех концентрациях выше, чем в контроле и других вариантах, обработанных глицерином. Каротиноиды, как известно, являются антиоксидантами, выполняют защитную функцию, предотвращая окисление хлорофилла. Поскольку ДМСО является токсическим соединением, возрастание содержания каротиноидов вполне понятно.

У синезеленых водорослей, как известно, не обнаружен хлорофилл Б, но имеются дополнительные пигменты, также осуществляющие функцию поглощения квантов в желтой и зеленой областях спектра – фикобилины. На рисунке 6 представлены данные по содержанию пигментов у синезеленой микроводоросли *Anabaenopsis sp.* после криозамораживания. Содержание хлорофилла А в контрольном варианте - 2,401 мг/г сухой массы. При обработке 5%-ным ДМСО содержание хлорофилла А увеличивается на 40% и составляет 4,002 мг/г. При повышении концентрации ДМСО до 8% содержание хлорофилла А уменьшается по сравнению с вариантом, обработанным 5%-ным раствором, но все же еще выше, чем в контроле на 12%. При использовании в качестве криопротектора 15%-ного глицерина содержание хлорофилла на 5% выше, чем в контроле. При использовании 5 и 30%-ных растворов глицерина содержание хлорофилла А значительно снижается по сравнению с контролем.

По содержанию каротиноидов хорошие результаты показали все концентрации глицерина с сахарозой. Из них самый высокий результат показал 5% глицерин. У вариантов с ДМСО содержание каротиноидов довольно низкое. Такая же тенденция была характерна и для фикобилинов, то есть их количество было незначительно выше, чем в контроле. В вариантах с использованием в качестве криопротектора ДМСО содержание фикобилинов существенно снижается.

Поскольку азот является одним из элементов, имеющих первостепенное значение для жизнедеятельности всех живых организмов, способность к усвоению нитрата содержащегося в питательной среде, имеет большое значение для его использования клетками в физиолого-биохимических процессах. Нитратредуктаза, будучи индуцибельным и лабильным ферментом, образуется только в присутствии нитрата в среде и индуцируется нитратом при синтезе белка de novo. Уровень ее активности немедленно реагирует на малейшие изменения в среде. Поэтому нитратредуктаза является как бы маркерным ферментом благосостояния живых организмов, что и послужило причиной того, что мы решили проверить активность именно этого энзима

в клетках микроводорослей, подвергшихся процедуре криозамораживания в присутствии различных криопротекторов.

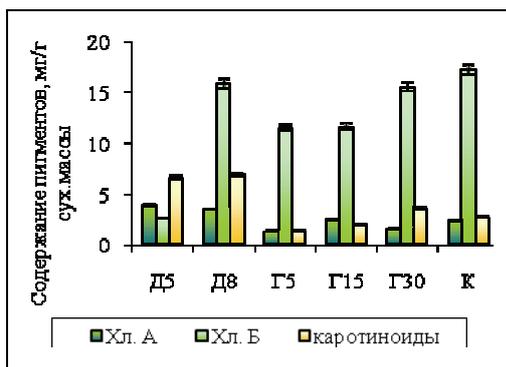


Рисунок 5 – Содержание зеленых пигментов в культуре *Chlorella sp.* после криозамораживания

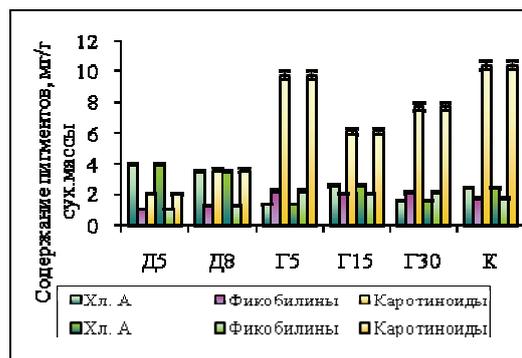


Рисунок 6 – Содержание хлорофилла А в культуре *Anabaenopsis sp.* после криозамораживания

Так как вариабельность активности нитратредуктазы у исследованных видов водорослей большая, можно судить о способности к индуктивной активации фермента в зависимости от концентрации субстрата, что позволяет им развиваться в водоемах с разным его содержанием [8]. Поскольку культуры клеток, использованные в экспериментах, взяты из искусственных сред, где содержание азота сравнительно низкое, соответственно, и активность нитратредуктазы показала низкие результаты. На рисунках 7 и 8 представлены данные по определению активности нитратредуктазы в клетках микроводорослей *Chlorella sp.* (штамм МВ-1) и *Anabaenopsis sp.* (штамм Марк-6). Активность нитратредуктазы у *Chlorella sp.* (рисунок 7) при обработке ДМСО в концентрации 5% возрастает по сравнению с контролем в 2,2 раза, что свидетельствует о том, что ДМСО в низких концентрациях не оказывает токсического действия на процесс усвоения нитратов. При возрастании же концентрации ДМСО в среде инкубации до 8% активность нитратредуктазы резко снижается от уровня контроля в 1,9 раз.

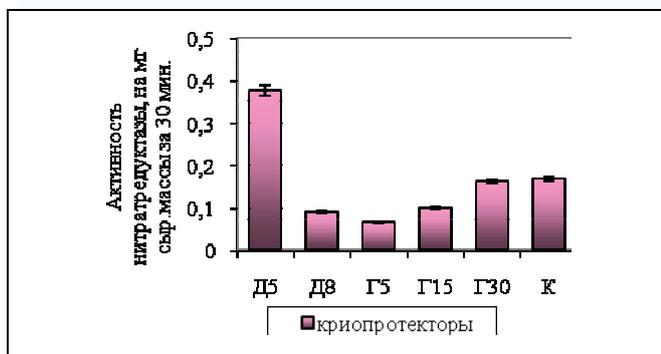


Рисунок 7 – Активность нитратредуктазы штамма МВ-1

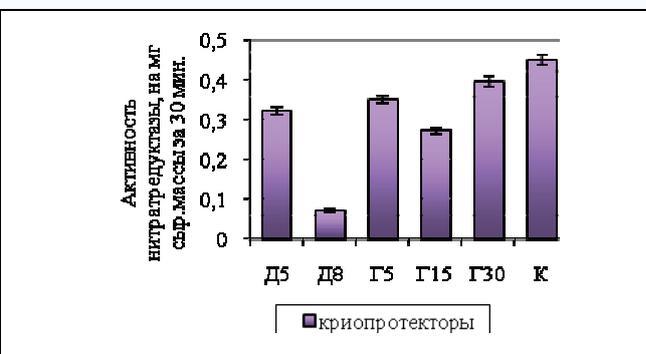


Рисунок 8 – Активность нитратредуктазы штамма Марк-6

По мере увеличения концентрации глицерина активность НР возрастает с 0,0677 до 0,1623. При концентрации 30% глицерина активность нитратредуктазы почти достигает контрольного значения.

У штамма Марк-6 так же, как у МВ-1 высокая активность НР наблюдалась в варианте Д5 с резким падением активности в варианте Д8 (рисунок 8). Но при обработке глицерином, а именно в вариантах Г5 и Г30 активность этого фермента значительно выше, чем у штамма МВ-1 в этом варианте. При сравнении активностей в ряду криопротекторов внутри штамма Маркб значение активности НР в этом варианте немного ниже, чем в контроле. Наблюдающееся снижение активности НР при концентрации глицерина 15% объяснить трудно. Возможно, особая чувствительность именно к этой концентрации глицерина, обусловленная видовой спецификой, вызывает торможение активности нитратредуктазы.

Таким образом, исследование физиолого-биохимических процессов культур микроводорослей, подвергшихся криозамораживанию, позволило выявить основные изменения, происходящие под влиянием инкубации в различных концентрациях криопротекторов ДМСО и глицерина. Выявлено, что для зеленой протококковой водоросли хлорелла штамма МВ-1 при замораживании наиболее щадящие условия создаются при инкубации в течение 5 минут с использованием 30%-ного глицерина в сочетании с 0,4 М сахарозой. Для синезеленой нитчатой микроводоросли анабенописис штамма Марк-6 достаточно хорошие условия

криозамораживания возникают при использовании сочетания 5% ДМСО с 0,4М сахарозой. В указанных вариантах уровень жизнеспособности, коэффициент размножения, содержание пигментов и активность нитратредуктазы сохраняются на уровне, близком к контролю.

Литература

1 Becker E.W. Limitations of heavy removal from waste water by means of algae// *Water Res.*, 1983. 17:458-466.

2 Becker E.W. *Microalgae: biotechnology and microbiology*// Cambridge studies in biotechnology, 1994.Vol.10.

3 Benson E.E., Johnston,J., Muthusami J., Harding K. Physical and engineering perspectives of in vitro plant cryopreservation// In: *Plant tissue culture engineering*. 2005. Ed. S. Gupta,Y. Ibaraki, Springer, Netherlands. pp:441-473.

4 Кушнаренко С.В., Калбаева А., Айдаралимова А. Криоконсервация культур микроводорослей методом витрификации// «Актуальные проблемы альгологии, микробиологии и гидробиологии» - Мат-лы междунаучной конференции 11-12 сент.2009.- Ташкент, 2009.- С.189-190.

5 Джосебаева С.А., Калбаева А.М., Кушнаренко С.В. Изучение влияния различных криопротекторов и осмотиков на криоустойчивость некоторых культур микроводорослей // Межд.конференция «Биотехнология, нанотехнология, физико-химическая биология», посв. 100-летию со дня акад. Т.Б. Дарқанбаева, Алматы, Вестник КазНУ, сер.биол., №3 (45), 2010, С.110-112.

6 Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. Киев: Наукова Думка, 1975 г. – 247 с.

7 Клоченко П.Д., Медведь В.А., Борисова Е.В.,Царенко П.М. Особенности накопления нитритного азота в культурах хлорококковых водорослей//Альгология. – 2000. –Т.10, №3. – С.257-264.

8 В.А. Медведь. Активность нитратредуктазы микроводорослей в условиях культуры. – Гидробиологический журнал, 2008. – том 44, № 5, С. 94-109.

Тұжырым

Chlorella sp.(штамм МВ-1) және *Anabaenopsis sp.* (штамм Марк 6) микробалдырлар дақылдарының физиологиялық және биохимиялық қасиеттерін бақылауға жақын деңгейде сақтап қалуын қамтамасыз ететін витрификация әдісі арқылы криосақтаудың тиімді режимдері табылды.

Summary

Sparing modes of a cryopreservation of microalgae *Chlorella sp.* (strain MB-1) and *Anabaenopsis sp.* (strain Mark 6) are picked up by the method of vitrification providing safety of physiological and biochemical properties at level, close to control.