

АННОТАЦИЯ

На диссертацию для соискания ученой степени доктора философии
(PhD)

по специальности “6D070100 – Биотехнология” Хумы Балуч
на тему “Изучение биоразнообразия микроводорослей в Алматинской
области и поиск биотехнологических ценных штаммов”.

Общее описание исследования: Основной целью данной докторской диссертации является оценка разнообразия микроводорослей из различных пресноводных водоемов Алматинской области, отбор, выделение и идентификация наиболее перспективных штаммов микроводорослей, которые имеют хороший потенциал в качестве источника биотопливного сырья, антибактериального соединения и биоиндикаторов.

Актуальность исследования: Сильная зависимость развивающихся стран от ископаемого и импортируемого топлива для удовлетворения растущих потребностей в энергии стала серьезным препятствием на пути их социально-экономического развития. Сжигание ископаемого топлива на сегодняшний день является крупнейшим источником загрязнения атмосферы и основным фактором, влияющим на изменение климата и общественное здравоохранение. Необходимость отказа от ископаемого топлива на сегодняшний день в приоритете дня развивающихся стран, при этом биоэнергетика рассматривается в качестве альтернативного метода производства углеродно-нейтрального источника энергии. В настоящее время исследования направлены на изучение путей и использование альтернативных источников биомассы для получения биотоплива. В связи с текущей тенденцией к сохранению и устойчивому управлению ресурсами возобновился интерес к изучению микроводорослей для производства биотоплива, биоремедиации, промышленных и биоразлагаемых продуктов с добавленной стоимостью.

Устойчивость к противомикробным препаратам (УПП) представляет собой серьезную и глобальную проблему, риск для здоровья населения и окружающей среды. По недавним оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), более полумиллиона смертей во всем мире связаны с лекарственно-устойчивыми бактериальными инфекциями. Предпринимаются активные усилия по поиску новых и необычных антибактериальных соединений, которые выходят за рамки известных антибактериальных средств. Благодаря своим необычным физиологическим, экологическим, молекулярным и регуляторным механизмам микроводоросли способны выживать в экстремальных условиях. Предполагается что из

микроводорослей, выделенных из экстремальных условий можно получить новые натуральные продукты с разнообразной биологической активностью, в частности с антибактериальной активностью.

Экологический мониторинг имеет фундаментальное значение для нашего понимания того, как вышеупомянутое вмешательство человека, особенно стойкое загрязнение солями тяжелых металлов, влияет на основные виды и функции экосистемы. Понимание конкретных изменений пресноводной биоты после воздействия, биоаккумуляции и токсичности загрязнителей тяжелых металлов имеет важное значение для оценки функционального состояния экосистемы. Выявление конкретных молекулярных, биохимических, физиологических и поведенческих изменений у высокочувствительных видов может быть использовано в качестве инструмента для тестирования загрязненной экосистемы. В последние десятилетия мы стали свидетелями возросшего понимания роли разнообразия микроводорослей в функционировании экосистемы и их возросшей ценности как источника биоиндикаторов качества воды. Однако до сих пор многое остается недостаточно изученным в этой области.

Для всестороннего понимания вышеупомянутой экологической роли и более глубокого изучения биотехнологического потенциала микроводорослей в областях фундаментальных, прикладных и промышленных исследований требуется поиск и выделение перспективных штаммов и идентификация их видов. Было проведено мало систематических исследований видов микроводорослей из необычных или экстремальных местообитаний, что ограничивает наши знания об их биоразнообразии, функциях и их потенциале как источника получения биотехнологически важных биологически активных соединений. Отсутствие базовой информации о разнообразии видов микроводорослей на различных таксономических уровнях имеет серьезные последствия для многих аспектов мониторинга экосистем и эволюционной биологии. Последние достижения в области молекулярной биологии, биомолекулярной инженерии, информатики и других смежных наук в значительной степени помогли ученым использовать максимальный потенциал микроводорослей с различными приложениями, от разработки лекарств, сельского хозяйства, промышленности до биоэнергетики и защиты окружающей среды.

Цель исследования: Поиск, выделение, изучение и идентификация новых штаммов микроводорослей из пресноводных водоемов Алматинской области, обладающих биотехнологическим потенциалом в биоэнергетике, антимикробной активностью и биоиндикационной способностью.

Основные задачи исследования:

1. Изучить разнообразие видов микроводорослей в Алматинской области с целью предоставления исходной информации, необходимой для оценки изменений биологического разнообразия микроводорослей в данном регионе.

2. Выделить чистые культуры новых штаммов микроводорослей из природных источников.

3. Провести точную идентификацию выделенных монокультурных штаммов микроводорослей на основе световой и сканирующей микроскопии, секвенирования ITS-ампликона и праймера для гена *rbcL*.

4. Отобрать штаммы микроводорослей, обладающие высокой продуктивностью, высоким содержанием липидов и составом жирных кислот, подходящим для производства биотоплива.

5. Изучить антимикробный потенциал выделенных изолятов микроводорослей и определить зону ингибирования метанольных экстрактов против различных патогенных бактерий.

6. Изучить влияние низких концентраций кадмия на рост, фотосинтетическую активность и ультраструктуру клеток штамма *Ankistrodesmus falcatus* ZBD-03.

Объекты и материалы исследования: изоляты микроводорослей *Monoraphidium griffithii* ZBD-01, *Nephrochlamys subsolitaria* ZBD-02, *Ankistrodesmus falcatus* ZBD-03, *Ankistrodesmus* sp. B-11, *Parachlorella kessleri* ZBD-04, *Desmodesmus pannonicus* ZBD-05 и *Monoraphidium* sp. ZBD-06.

Методы исследования: методы культивирования, метод экстракции липидов, трансэтерификация, газовая хроматография, масс-спектрометрия - анализ метиловых эфиров жирных кислот (FAME), диско-диффузионный анализ в агаре, метод определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК), экстракция ДНК, полимеразная цепная реакция, клонирование ДНК, секвенирование по Сэнгеру, флуоресцентные анализы.

Научная новизна исследования: В результате исследования были выделены и идентифицированы новые 7 изолятов микроводорослей: *Monoraphidium griffithii* ZBD-01, *Nephrochlamys subsolitaria* ZBD-02, *Ankistrodesmus falcatus* ZBD-03, *Ankistrodesmus* sp. B-11, *Parachlorella kessleri* ZBD-04, *Desmodesmus pannonicus* ZBD-05 и *Monoraphidium* sp. ZBD-06.

Впервые изучен потенциал выделенных штаммов зеленых микроводорослей, как ценных источников метиловых эфиров жирных кислот для биодизельного топлива. Штаммы *P. kessleri* и *A. falcatus* были отобраны как виды с высокой продуктивностью биомассы и липидов, при этом изучение жирнокислотного состава продемонстрировало доминирование пальмитиновой, стеариновой и олеиновой кислот, которые, как известно, являются наиболее преобладающими компонентами биодизельного топлива.

Наличие большего количества насыщенных жирных кислот (C16 - C18) и высокая продуктивность биомассы подтверждает перспективность их применения в биоэнергетическом секторе в качестве сырья.

Впервые протестирована потенциальная эффективность неочищенного экстракта выделенных изолятов микроводорослей в качестве антибактериального агента. Установлена их способность к подавлению роста некоторых патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий. В литературных источниках наблюдается небольшое количество исследований об эффективности антимикробной активности зеленых микроводорослей против грамотрицательных бактерий.

Отобран штамм *Ankistrodesmus* sp. В-11, характеризующийся высокой чувствительностью к ионам кадмия, который может быть использован как тест-объект в оценке экологического состояния водных экосистем загрязненных ионами тяжелых металлов. Впервые установлено, что кадмий снижает скорость электронного транспорта на мембране тилакоидов, ингибирует транспорт электронов и протонов на уровне пластохинона при переходе электронов от ФС II к ФС I. Установлено, что концентрация кадмия 0,01 мг/л вызывает изменения ультраструктуры, которые затрагивают, в первую очередь, фотосинтетический аппарат, в частности, модификации касались расположения тилакоидов в строме: наблюдается увеличение межтилакоидных пространств, результатом чего является снижение фотосинтетической активности. Определено существенное повышение вакуолизации клеток за счет структурных изменений цитоплазматической мембраны под воздействием ионов кадмия.

Теоретическая и практическая значимость исследования:

Основные выводы и положения работы расширяют теоретическую базу данного направления исследования, углубляют знания, связанные с основами влияния тяжелых металлов на фотосинтетическую активность и ультраструктуру клеток микроводорослей. Также, теоретическая значимость данного исследования состоит в том, что его результаты существенно дополняют имеющиеся скудные на сегодняшний день данные о видовом биоразнообразии альгофлоры водных экосистем республики Казахстан, в частности 5 озер Алматинской области. Полученные результаты расширяют данные о свойствах новых штаммов микроводорослей, перспективных для применения в разных сферах биотехнологии, в том числе и в биоэнергетике. Исследование метаболических особенностей липидпродуцирующих штаммов микроводорослей носит фундаментальный характер, выявившее отдельные особенности процессов накопления липидов в клетках микроводорослей. Полученные данные будут являться основой для работ по улучшению накопления липидов штаммами микроводорослей методами генетической

инженерии в будущем. Полученные данные по антибактериальному эффекту выделенных изолятов микроводорослей и их жирнокислотному составу существенно расширяют представления о механизмах антагонистического действия микроводорослей в отношении патогенных бактерий.

Практическая значимость данного исследования заключается в получении чистых культур микроводорослей, обладающих большим биотехнологическим потенциалом и которые соответственно могут быть использованы в качестве сырья в биоэнергетике, в фармацевтике и медицине. Кроме того, выявленные изменения индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции являясь одним из первых быстро регистрируемых параметров клеток микроводоросли после действия кадмия, могут быть применены для диагностики состояния исследуемых объектов. Данные параметры флуоресценции хлорофилла микроводорослей могут быть использованы при биотестировании качества воды в естественных и искусственных водоемах.

Основные положения защиты:

- Выделенные новые изоляты микроводорослей по области ITS и ген *rbcL* идентифицированы как *Monoraphidium griffithii* ZBD-01 (номер для присоединения MW258948), *Nephrochlamys subsolitaria* ZBD-02 (MZ079019), *Ankistrodesmus falcatus* ZBD-03 (номер для присоединения MZ079017), *Parachlorella kessleri* ZBD-04 (номер для присоединения MZ079022), and *Desmodesmus pannonicus* ZBD-05 (номер для присоединения MZ079014), и *Monoraphidium sp.* ZBD-06 (номер для присоединения MT178772).

- Штаммы *Parachlorella kessleri* ZBD-04 и *Ankistrodesmus falcatus* ZBD-03 обладают высоким потенциалом в качестве источника сырья для получения биодизеля (цетановое число 50 и 48, йодное число 103,6 и 83,4), превышающие требуемый предел (CN>47,0) в соответствии со стандартами биодизеля EN14214.

- Значительная антибактериальная активность метанольного экстракта биомассы *Parachlorella kessleri* в отношении *Bacillus subtilis* (максимальная зона ингибирования 0,8 мм), *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae*, *Nephrochlamys subsolitaria* и *Ankistrodesmus falcatus* против *Klebsiella pneumoniae* и *E. coli*.

- Высокая чувствительность выделенного штамма *Ankistrodesmus sp.* к низким концентрациям кадмия 0,005–0,02 мг /л.

Основные результаты исследования и заключение:

Выделены и идентифицированы новые 7 изолятов микроводорослей: *Monoraphidium griffithii* ZBD-01, *Nephrochlamys subsolitaria* ZBD-02, *Ankistrodesmus falcatus* ZBD-03, *Ankistrodesmus sp.* B-11, *Parachlorella kessleri* ZBD-04, *Desmodesmus pannonicus* ZBD-05 и *Monoraphidium sp.* ZBD-06.

Результаты данного исследования расширили возможности поиска промышленно важных микроводорослей из пресноводных водоемов Алматинской области, выделенные новые штаммы могут стать ценным сырьем для получения биоактивных соединений. Выделенные штаммы сохранены в коллекции лаборатории биотехнологии фототрофных микроорганизмов. Результаты исследования дали представление о детальных морфологических характеристиках и биохимической природе выделенных штаммов, что может быть также полезно при идентификации и характеристике выделенных новых штаммов микроводорослей в будущем.

Область ITS и ген *rbcL* были исследованы у шести видов, а именно *Monoraphidium griffithii* ZBD-01, *Nephrochlamys subsolitaria* ZBD-02, *Ankistrodesmus falcatus* ZBD-03, *Parachlorella kessleri* ZBD-04 и *Desmodesmus pannonicus* ZBD-05, *Monoraphidium sp.* ZBD-06, благодаря этому успешно предоставлены дополнительные данные о последовательностях в базах данных Genbank, что позволит лучше разрешить споры об их таксономическом статусе.

Были изучены составы жирных кислот четырех изолятов, и основными жирными кислотами были пальмитиновая кислота, олеиновая кислота и стеариновая кислота, составляющие 10-45%, 5-34% и 5-30% всех жирных кислот. В совокупности эти жирные кислоты составляли до 30-70% от общего количества жирных кислот в двух штаммах *Parachlorella kessleri* ZBD-04 и *Ankistrodesmus falcatus* ZBD-03 с цетановым числом более 47, что является идеальным компонентом и числом для получения биодизеля. Полученные результаты свидетельствуют, что изученные штаммы микроводорослей представляют собой ценный ресурс для будущих исследований с целью получения биотоплива на основе микроводорослей.

Настоящее исследование показало многообещающую антимикробную активность метанольных экстрактов четырех штаммов против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Предварительный (агар диск-диффузия) и вторичный (минимальная ингибирующая концентрация (МИК)) антимикробные анализы показали значительную антибактериальную активность метанольного экстракта *Parachlorella kessleri* в отношении *Bacillus subtilis* (максимальная зона ингибирования 0,8 мм), *Staphylococcus aureus* и *Klebsiella pneumoniae*, *Nephrochlamys subsolitaria* (максимальная зона ингибирования 0,6 мм), и *Ankistrodesmus falcatus* против *Klebsiella pneumoniae* и *E. coli*.

Изучение влияния низких концентраций ионов кадмия на рост, активность фотосинтеза и ультраструктуру клеток микроводоросли *Ankistrodesmus sp.* В-11 выявило высокую чувствительность штамма к концентрациям кадмия 0,005-0,02 мг/л в питательной среде.

Уровни организации исследования: Исследование, описанное в этой диссертации, проводилось на генетическом, молекулярном, клеточном и организменном уровнях.

Связь исследования с научным проектом. Диссертационная исследовательская работа проводилась в рамках трех проектов, включая «AP08052402 Разработка технологии получения биоудобрений на основе азотфиксирующих цианобактерий»; AP08052481 Разработка технологии производства биодизеля на основе активных штаммов микроводорослей»; AP05131743 Разработка научно-методических основ технологии биомониторинга и прогнозирования состояния загрязненных водных экосистем с использованием фототрофных микроорганизмов.

Вклад автора в результаты, описанные в диссертации: Все основные результаты описаны здесь выполнены и собраны автором. Кроме того, основные результаты исследований, анализы, данные и цифры подготовлены автором, а все новые наблюдения и выводы сделаны на основе результатов, полученных в ходе работы и исследований для соискания ученой степени доктора философии.

Апробация исследований: Основные результаты и наблюдения представлены на международных конференциях и симпозиумах:

- VI International Farabi Readings, Almaty, Kazakhstan, 2-12 April 2019, on the sideline -International Scientific Conference of Students and Young Scientists Almaty, Kazakhstan, April 9-10, 2019.

- European Biotechnology Congress -2020 September 24-26, 2020, Prague.

- International scientific and practical conference on ‘Aspects and Innovations of Environmental Biotechnology and Bioenergy’ Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan, 12-13 February, 2021.

5th Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2021) – Online –jointly by Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, and Muğla Sıtkı Koçman University, Turkey, on July 01-03, 2021.

Публикации: Большая часть диссертации опубликована в 6 научных работах, в том числе 1 исследовательская статья с импакт-фактором, проиндексированная в Web of Science (WoS) и SCOPUS, 4 статьи в научных журналах, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (ККСОН РК), 4 тезиса в материалах международных конференций. Две статьи находятся в процессе публикации в авторитетных международных рецензируемых научных журналах.

Структура диссертации: Диссертация изложена на 104 страницах, содержит обозначения и сокращения, подробно описывает введение, обзор

литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, подкреплена 287 ссылками на литературу, содержит 11 таблиц и 18 рисунков.