

Қосалбаев Бекжан Дүйсенбіұлының

6D070100 – Биотехнология мамандығы бойынша философия докторы (PhD) дәрежесін алу үшін дайындалған диссертациясына

АНДАТПА

Биотехнологияда қолданылатын цианобактериялардың активті штаммдарын бөліп алу және зерттеу

Жұмыстың жалпы сипаттамасы

Диссертациялық жұмыста әр түрлі экожүйелерден бөлініп алынған және коллекциялық белсенді цианобактерия штамдарының агробиотехнологиядағы және сутегін алу биотехнологиясындағы потенциалын зерттеу нәтижелері қарастырылған.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі

Цианобактериялар табиғатта кең таралған микроорганизмдердің үлкен бір тобы болып табылады. Олар табиғатта тұщы сулардан мұхитқа дейін тіршілік етіп, биоалуынтүрлілігі бойынша ең кең таралған организмдерге жатады. Цианобактериялар Күн сәулесін арнайы фотосинтетикалық пигменттер арқылы сіңіріп алып, нәтижесінде пайда болған электрондарды клеткалық тұрғыдағы функцияларды жүзеге асыру үшін пайдаланады. Цианобактериялар оттегі продукциясын, азот фиксациясын, екіншілік метаболиттерді бөлу үдерістерін т.б. әрекеттерді жүзеге асырғандықтан биотехнологиядағы маңызды объекті болып табылады.

Цианобактериялардың алуантүрлілігі мен физиологиялық ерекшеліктерін осы уақытқа дейінгі зерттелген жұмыстар олардың биотехнология саласында маңызды нысана екендігін дәлелдейді. Соңғы жылдардағы цианобактериялар биоактивті қосылыстардың бай көзі ретінде назарға ие болды және олар биологиялық көптеген метаболиттерді өндіре алатын негізгі продуценттер ретінде танылды. Цианобактерия тағы басқа да көптеген биотехнологиялық өндірістерде қолданылады: тағам, отын, тыңайтқыштар, бояғыш заттар мен токсиндер, дәрумендер, ферменттер және фармацевтикалық препараттар, екінші реттік метаболиттер өндіру.

Соңғы жылдары баламалы энергия көздеріне деген қызығушылықтар артып, нәтижесінде биодизель, биосутек, биобутанол, биоэтанол, биомұнай және биогаз деген жаңа терминдер ғылымға енді. Қазіргі уақытта ғалымдардың қызығушылықтары биоотын өндірісінде қолданылатын сарқылмайтын шикізат көздеріне, оның ішінде биофотоллизге негізделген сутегі алу үдерісіне түсіп отыр. Биоэнергетика салаларының ішіндегі сутегі өндірісі – ең таза, әрі технологиялық тұрғыдан қымбаты болып келеді, дегенмен, сутек болашақта туындаған көптеген мәселелерді шешуде маңызды рөлге ие болуы мүмкін. Сутегі энергиясының 50%-ы қазірде көмірдің реформациясынан алынады, ал биологиялық жолмен 0,1%-ы ғана өндіріледі. Себебі, қарқынды жүргізілген зерттеулерге қарамастан осы уақытқа дейін нақты биосутек өндіруге қабілетті активті продуцент табылмады. Қазірге дейін алуан түрлі биологиялық объектілердің сутек өндіру қабілеттері зерттелінді. Осы тұрғыда цианобактериялар күн сәулесі негізінде алынған

энергия көздерін пайдалана отырып биофотоллиз үдерісін жүргізіп, молекулалық сутегін бөлуге бейімделген. Клеткалық ферменттерінің белсенділігіне негізделген биосутек өндірісін қолға алу ғаламдық тұрғыда туындаған көптеген мәселелердің шешімі болуы мүмкін. Азот фиксациясына және сутек өндірісіне қатысатын 2 түрлі фермент бар – N_2 аза және H_2 аза. Нитрогеназа бір уақытта ауадағы бос азотты бойына сіңіре отырып, стрессті жағдайда қорға жинақталған АТФ молекулалары түріндегі энергияны сыртқа сутек түрінде бөледі. Сәйкесінше, бұл ферменттің жұмысы өте көп энергияны қажет етеді. Ал, H_2 аза ферменті вегетативті клеткаларда орналасып, клеткаларда анаэробты жағдайда қарқындылық танытып, сутек молекулаларын катализдейді.

Сонымен қатар, нитрогеназа ферменті сутек бөлумен қатар, ауадағы бос азотты фиксациялап, топырақ құрамына сіңіреді. Клетка құрамындағы нитрогеназа ферменті бір уақытта ауадағы бос азотты сіңіріп, аммиакқа (NH_3) айналдыру, сутекті соңғы өнім ретінде сыртқы ортаға шығару және АУФ энергиясын АДФ-ке айналдыру үдерістерін қатар атқарады. Нитрогеназа – азот фиксациясына жауап беретін, көп салалы, мультисубстратты күрделі фермент және негізінен азоттың барлық биохимиялық түзілуін катализдейтін прокариоттардың клеткаларында кездеседі, сонымен қатар, азоттың глобалді биогеохимиялық азот циклін жүргізуді қамтамасыз етеді. Нитрогеназа көптеген субстраттарды қалпына келтіру үшін магний аденозин үшфосфатын және электрондарды қолданады.

Гидрогеназа ферменті вегетативті клеткалардағы сутек бөлінуіне жауап береді, ал нитрогеназа ферментінің белсенділігі негізінде клеткада қорға жинақталған энергия пайдаланылады. Сутегі бөлуге қатысатын тағы бір ферменттердің тобы – гидрогеназалар болып табылады. Бұл гетерогенді ферменттердің тобы құрылымы, қасиеттері мен функциялары алуан түрлі болып келеді. Фермент қарапайым химиялық реакцияны, яғни, протондар мен электрондардан сутек түзілуін катализдейді.

Осы жағдайға байланысты нитрогеназа мен гидрогеназа белсенділігі жоғары цианобактериялардың активті штамдарын бөліп алу, олардан биосутегін және биотыңайтқыштар алуға пайдалануға бағытталған зерттеулер 21-ғасыр биотехнология саласының өзекті мәселерінің бір болып табылады.

Зерттеу жұмысының мақсаты

Әр түрлі экожүйелерден бөлініп алынған және коллекциялық белсенді цианобактерия штамдарының агробиотехнологиядағы және сутегін алу биотехнологиясындағы потенциалын зерттеу.

Зерттеу жұмысының міндеттері

1. Әр түрлі экожүйелерден цианобактериялардың аксеникалық таза дақылдарын бөліп алу;
2. Бөлініп алынған цианобактериялардың штамдарын идентификациялау жұмыстарын жүргізу;
3. Бөлініп алынған цианобактериялар дақылдары штамдарының нитрогеназа белсенділігін анықтау;

4. Бөлініп алынған цианобактерия штамдарының биомассасының күріштің өнімділігіне әсерін зерттеу;

5. Коллекциялық цианобактериялар дақылдары штамдарының нитрогеназа белсенділігін анықтау;

6. Цианобактерияның коллекциялық штамдары биомассасының құлпынайдың өнімділігіне әсерін зерттеу;

7. Гетероцистасыз цианобактериялар дақылдарынан сутегін бөліп алу жолдарын зерттеу;

8. Гетероцисталы цианобактерия штамдарының сутегін бөлу үдерісін зерттеу.

Зерттеу объектілері

Зерттеу жұмысының объектісі ретінде коллекциялық және әр түрлі экожүйелерден бөлініп алынған цианобактериялардың штамдары қолданылды. Коллекциялық штамдар – *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220, *Synechococcus* sp. I12 және *Phormidium corium* B-26, *Anabaena* sp. 7912, *Anabaena* sp. Z-1, *Anabaena variabilis* R-I-5, *Nostoc caldicola* RI-3, *Nostoc* sp. S-2, *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Бөлініп алынған цианобактериялық түрлер – *Anabaena* sp. B1-4, *Nostoc* sp. J-14, *Cylindrospermum* sp. J-8, *Anabaena variabilis* K-31 және *Tolypothrix tenuis* J-1, *Oscillatoria* Sh-11 дақылдары және жоғары сатылы өсімдік құлпынайдың *Sunrise* T-4 және Ақмаржан күрішінің сорттары қолданылды.

Зерттеу әдістері

Жұмыс барысында микробиологиялық, альгологиялық, биотехнологиялық, молекулалық генетикалық, агротехникалық және физикалық, химиялық әдістер қолданылды.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы

Алғаш рет Қызылорда облысы, Жаңақорған ауданның күріш алқабының альгофлора құрамы зерттелді және фототрофты микроорганизмдердің пайыздық үлесіне баға берілді. Зерттеу нәтижесінде цианобактериялардың 6 альгологиялық және 5 аксеникалық таза дақылдары бөлініп алынды.

Цианобактериялардың *Anabaena* sp. B1-4, *Nostoc* sp. J-14 және *Tolypothrix tenuis* J-1 штамдары идентификацияланып, филогенетикалық талдауы жасалынды.

Алғаш болып цианобактериялардың нитрогеназа және гидрогеназа белсенділігі зерттелініп, *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамның жарықта биосутек бөлуге жоғарғы қабілеттілігі анықталды.

Құлпынай өсімдігінің (*Sunrise* T-4 сорты) өнімділігіне азотфиксациялаушы цианобактерия *Anabaena* sp. B1-4 штамның оң әсері анықталып, оны топырақ құрамын құнарландыруға пайдалануға ұсынылады.

Жұмыстың ғылыми және практикалық маңызы

Бөлініп алынған *Anabaena* sp. B1-4, *Nostoc* sp. J-14, *Cylindrospermum* sp. J-8, *Anabaena variabilis* K-31, *Oscillatoria* Sh-11, *Tolypothrix tenuis* J-1 цианобактериялардың штамдары ары қарай зерттеу жұмыстарына қолдану үшін әл-Фараби атындағы ҚазҰУ-нің фотобиотехнология зертханасының «ССМКазНУ» микробалдырлар коллекциясына енгізілді.

Фототрофты микроорганизмдерді өсіруге арналған бес секциялы фотобиореактордың технологиялық сызбасы әзірленді және патенттелді («Фототрофты микроорганизмдерді дақылдауға және сұрыптауға арналған фотобиореактор» пайдалы моделіне арналған патент», №38863, 05.06.2019). Осы технологиялық сызба бойынша жасалған фотобиореактор цианобактериялар мен микробалдырлардың штамдарын жаппай өсіру үшін және дақылдармен селекциялық жұмыстар жүргізу үшін ұсынылады.

Зерттеу жұмыстарының нәтижесі бойынша таңдалып алынған *Anabaena variabilis* R-I-5 және *Anabaena* sp. B1-4 штамдарының биомассасы негізінде алынған суспензияның ауылшаруашылық өсімдіктерінің өнімділігіне оң әсері анықталынып, әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық университетінің жылыжайында қолданылуда.

Ғылыми-зерттеу жұмысы барысында таңдалған азот фиксациялаушы *Anabaena variabilis* R-I-5 және *Anabaena* sp. B1-4 штамдары негізінде алынған биомасса қазіргі уақытта ауылшаруашылық өсімдіктеріне биотыңайтқыш ретінде әл-Фараби атындағы ҚазҰУ-нің жылыжайында қолданылуда.

Қорғауға шығарылған негізгі қағидалар

Күріш алқабынан цианобактериялардың аксеникалық 6 дақылдың бөлініп алынуы, олардың 3 дақылының *Anabaena* sp. B1-4, *Nostoc* sp. J-14 және *Tolypothrix tenuis* J-1 түрлері ретінде идентификациясы;

Anabaena sp. B1-4 штамының өсіру қоректік ортасына молибдені (Mo^{+6}) бар 1 мкмоль мөлшерде тұзды қосу нәтижесі нитрогеназа ферментінің белсенділігінің артуы және оның күріштің өнімділігіне оң әсері;

Азотфиксациялау қабілеті жоғары *Anabaena variabilis* R-I-5 және *Anabaena* sp. B1-4 штамдарының биомассасын құлпынай (*Sunrise* T-4) және күріш (Ақмаржан) сорттарының өнімділігіне әсері;

Жарық және қараңғы жағдайда зерттеу кезінде, қараңғы ортада *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамы, ал жарықта *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамының белсенділік көрсетуі;

Desertifilum sp. IPPAS B-1220 штамының суспензиясына 10 мкмоль диурон қосу сутегі бөлінуін 1,5 есеге ұлғайтады.

Алынған флуоресценттік сәулелену спектрінің 77 К-ге сәйкес зерттелетін цианобактериялар штамдарында ФЖ1 және ФЖ2 пигментті-ақуызды кешендерінің реакциялық орталықтарының ара-қатынасын анықтау жұмыстарында *Synechocystis* sp. PCC 6803 және *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 жоғары ФЖ1/ФЖ2 коэффициенттері бір-біріне жақын көрсеткіштерге ие болды;

Гетероцисталы цианобактериялардың сутек бөлу қарқындылығы жарық және қараңғы жағдайда зерттеу кезінде *Anabaena variabilis* R-I-5 штамы нитрогеназа белсенділігі бойынша ерекшеленіп, жарықта жоғары мөлшерде сутегін бөлсе, қараңғыда *Nostoc caldicola* RI-3 штамы белсенділік танытуы.

Автордың жеке үлесі

Зерттелетін мәселеге қатысты әдеби деректерге талдау, жұмыстың мақсат-міндеттерін анықтау, тәжірибелік зерттеулерді жүргізу, нәтижелерді статистикалық өңдеу және талдау, диссертацияны жазу мен қол жазбаны

рәсімдеу автордың жеке қатысуымен орындалды. Сонымен қатар, автор барлық ғылыми жұмыстардың (ККСОН мақалалары, импакт-факторлы мақалалар, патент, тезистер) жариялануына өз үлесін қосты: қолжазбаны дайындау, графиктерді сызу, нәтижелерді талдау, корреспонденттік жұмыстар және рецензенттерге жауап жазу.

Жұмыстың мемлекеттік бағдарламалар жоспарымен байланыстылығы

Диссертациялық жұмыс АР05131743 «Биомониторинг технологиясының ғылыми-әдістемелік негізін өңдеу және фототрофты микроорганизмдерді пайдалана отырып, ластанған су экожүйесінің жағдайын болжау», (2018-2020 жж.), АР05131218 «Ағынды суларды биологиялық тазартудың және биодизельді потенциалды өндіру үшін цианобактериялар негізінде көмірқышқыл газын пайдаланудың қалдықсыз технологиясын жасау» (2018-2020 жж.), АР08052481 «Микробалдырлардың белсенді штамдары негізінде биодизель өндірісінің технологиясын жасау» (2020-2022 жж.) және АР08052402 «Азотты фиксациялаушы цианобактерияларға негізделген тыңайтқыштар өндірісінің технологиясын жасау» (2020-2022 жж.) жобаларының шеңберінде орындалды.

Жұмыстың сыннан өтуі

Зерттеу нәтижелері және диссертациялық жұмыстың негізгі қағидалары төмендегідей халықаралық ғылыми конференциялар мен симпозиумдарда баяндалды және талқыланды:

1. Студенттер мен жас ғалымдардың «Фараби әлемі» атты халықаралық ғылыми конференциясы, 10-11 сәуір 2018 жыл, Алматы, Қазақстан;

2. «Биология – ХХІ ғасыр ғылымы» атты Халықаралық жас ғалымдардың Пуцино мектебі-конференциясы, 23-27 сәуір 2018 жыл, Пуцино, РФ;

3. Биоғылым және биотехнология бойынша 4-ші халықаралық конференция (BioTech 2019), 2-22 ақпан 2019 жыл, Куала-Лумпур, Малайзия;

4. Тұрақтылыққа арналған фотосинтез және сутегі энергиясын зерттеу жөніндегі 10-шы халықаралық конференция, 23-28 маусым 2019 жыл, Санкт-Петербург, РФ;

5. Жасанды фотосинтез жөніндегі халықаралық конференция, 2-5 наурыз 2019, Киото, Жапония;

6. Өндірістік синтетикалық биотехнология бойынша халықаралық оқыту курсы, 14-қазан - 2-қараша, 2019, Тяньцзин, Қытай.

7. Метаболизмдік инженерия халықаралық конференциясы (MES 2019), 20-22 қазан, 2019, Тяньцзин, Қытай.

8. Цианобактериялар биологиясы бойынша 11-ші Еуропалық семинар, 7-9 қыркүйек 2020 жыл, Руа Альфредо Аллен, Португалия.

Басылымдар

Диссертацияның негізгі құрамы 13 басылып шығарылған жұмыстарда көрсетілген, олардың 4 мақала ҚР білім және ғылым саласын бақылау бойынша Комитет тізіміндегі республикалық ғылыми журналдарда, 1-ші кварталда 3 ғылыми мақалалар және халықаралық конференцияларда 5 тезис

жарияланды. Зерттеу нәтижелері бойынша «Фототрофты микроорганизмдерді дақылдауға және сұрыптауға арналған фотобиореактор», №38863, 27.09.2019 пайдалы модельге патент алынды.

Диссертациялық жұмыстың құрылымы мен көлемі

Диссертациялық зерттеу жұмысы 117 компьютерлік мәтіннен және белгілер мен қысқартылған сөздерден, кіріспе, әдебиетке шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, зерттеу нәтижелері және оларды талқылау, қорытынды және 243 пайдаланылған әдебиеттерден тұрады. Диссертациялық жұмыста көлеміне 8 кесте, 52 сурет және 1 қосымша кіреді.