

АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности 6D070100 – «Биотехнология»

Косалбаева Бекжана Дуйсенбиулы

Получение и изучение активных штаммов цианобактерий и их применение в биотехнологии

Общая характеристика работы

В диссертационной работе рассмотрены результаты исследования потенциала выделенных из различных экосистем и коллекционных активных штаммов цианобактерии в агробиотехнологии и биотехнологии получения водорода.

Актуальность темы исследования

Цианобактерии – большая группа микроорганизмов, широко распространенных в природе. Они обитают в природе от пресной воды до океанов и являются одними из самых распространенных организмов с точки зрения биоразнообразия. Цианобактерии поглощают солнечный свет через специальные фотосинтетические пигменты и используют полученные электроны для выполнения клеточных функций. Цианобактерии участвуют в производстве кислорода, азотфиксации, высвобождении вторичных метаболитов и т. Д. является важным объектом в биотехнологии.

Исследования разнообразия и физиологических особенностей цианобактерий до настоящего времени свидетельствуют о том, что они являются важными объектами в области биотехнологии. В последние годы цианобактерии известны как богатые источники биологически активных соединений, и признаны основными продуцентами, обладающими способностями производить многие биологические метаболиты. Они используются в таких биотехнологических производствах, как производство продуктов питания, топлива, удобрений, красящих веществ и токсинов, витаминов, ферментов и фармацевтических препаратов, вторичных метаболитов.

В последние годы возрос интерес к альтернативным источникам энергии, в результате чего в науку вошли новые термины: биодизель, биоводород, биобутанол, биоэтанол, бионефть и биогаз. В том числе интерес ученых сводится к неисчерпаемым источникам сырья, используемым в производстве биотоплива, в том числе к процессу получения водорода на основе биофотолиза. Производство водорода среди всех отраслей биоэнергетики является технологически дорогостоящим, но самым экологически чистым благодаря которому он может играть важную роль в решении многих энергетических проблем, возникающих в будущем. 50% водородной энергии в настоящее время извлекается из реформации угля, а биологическим путем вырабатывается только 0,1%. Причина этого является то, что, несмотря на интенсивные исследования, до настоящего времени не было обнаружено активного продуцента, способного производить настоящий биоводород. До настоящего времени изучены способности различных биологических

объектов к производству водорода. В этом контексте цианобактерии приспособились к выделению молекулярного водорода, проводя процесс биофотолиза с использованием источников энергии, полученных на основе солнечного света. Запуск производства биоводорода, основанного на активности ферментов нитрогеназы и гидрогеназы, может быть решением многих проблем, возникающих в глобальном масштабе. В азотфиксации и производстве водорода участвуют 2 разных фермента – нитрогеназа и гидрогеназа. Нитрогеназа одновременно поглощает свободный азот из воздуха и выделяет энергию в виде водорода накопленных в резерве при стрессе. Соответственно, для работы этого фермента требуется много энергии. Фермент гидрогеназа находится в вегетативных клетках, активен в клетках в анаэробных условиях и катализирует молекулы водорода.

Кроме того, фермент нитрогеназа, помимо выделения водорода, фиксирует свободный азот в воздухе и переводит его в доступную форму для растений. Фермент нитрогеназа, содержащийся в клетке, одновременно выполняет процессы поглощения свободного азота в воздухе и превращения его в аммиак (NH_3), с выделением водорода во внешнюю среду в качестве конечного продукта и преобразования энергии АТФ в АДФ. Нитрогеназа – это мультидисциплинарный комплексный фермент с множеством субстратов, отвечающий за фиксацию азота и обнаруженный в основном в клетках прокариот, который катализирует все биохимическое фиксация азота, а также обеспечивает глобальный биогеохимический цикл азота. Нитрогеназа использует аденозинтрифосфат магния и электроны для регенерации многих субстратов.

Фермент гидрогеназа отвечает за выделение водорода в вегетативных клетках, а энергия, накопленная в клетке используется на основе активности фермента нитрогеназы. Гидрогеназа – это другая группа ферментов, участвующих в выделении биоводорода. Эта группа гетерогенных ферментов имеет широкий спектр структур, свойств и функций. Фермент катализирует простую химическую реакцию, то есть образование водорода из протонов и электронов.

В связи с этим исследования, направленные на выделение активных штаммов цианобактерий с высокой активностью нитрогеназы и гидрогеназы, получение в результате этого биоводорода и биоудобрений, являются одной из актуальных проблем биотехнологической отрасли 21 века.

Цель исследовательской работы

Исследование потенциала коллекционных и выделенных из различных экосистем активных штаммов цианобактерии в агробиотехнологии и биотехнологии получения водорода.

Задачи исследовательской работы

1. Выделение и идентификация аксеничных культур цианобактерий из различных экосистем;
2. Идентификация выделенных штаммов цианобактерий;
3. Определение активности нитрогеназы выделенных культур и коллекционных штаммов цианобактерий;

4. Изучение влияния биомассы выделенных штаммов цианобактерии на продуктивность рисовой культуры;

5. Определение нитрогеназной активности штаммов коллекционных культур цианобактерий;

6. Изучение влияния биомассы коллекционных штаммов цианобактерий на урожайность клубники *Sunrise T-4*;

7. Исследование путей выделения водорода культурами цианобактерий необразующими гетероцист;

8. Изучение процесса выделения водорода гетероцистными штаммами цианобактерий.

Объекты исследования

В качестве объекта исследовательской работы использовались выделенные культуры из различных экосистем и коллекционные штаммы цианобактерий. Коллекционные штаммы – *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220, *Synechococcus* sp. 112 и *Phormidiumcorium* 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. Выделенные культуры – *Anabaena* sp. Bl-4, *Nostoc* sp. J-14, *Cylindrospermum* sp. J-8, *Anabaena variabilis* K-31 и *Tolypothrix tenuis* J-1, *Oscillatoria* Sh-11. Сорт высокостебельной клубники *Sunrise T-4* и рис Акмаржан.

Методы исследования

В ходе работы были использованы микробиологические, альгологические, биотехнологические, молекулярно-генетические, агротехнические, физические и химические методы.

Научная новизна исследования

Впервые изучен состав альгофлоры и процентное соотношение различных фототрофных микроорганизмов рисовых полей Жанакорганского района Кызылординской области. В результате исследования были выделены 6 альгологически чистых и 5 аксеничных культур цианобактерий.

Проведена идентификация и филогенетический анализ выделенных штаммов цианобактерий *Anabaena* sp. Bl-4, *Nostoc* sp. J-14 и *Tolypothrix tenuis* J-1.

Впервые исследована нитрогеназная и гидрогеназная активность исследованных штаммов цианобактерий, определена высокая способность к выделению водорода у штамма *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220.

Определен ростстимулирующий эффект штаммов азотфиксирующих цианобактерий *Anabaena variabilis* R-I-5 и в отношении клубники (сорт *Sunrise T-4*) и рисовой культуры (сорт Акмаржан).

Научная и практическая значимость работы

Выделенные новые штаммы цианобактерий *Anabaena* sp. Bl-4, *Nostoc* sp. J-14, *Cylindrospermum* sp. J-8, *Anabaena variabilis* K-31, *Oscillatoria* Sh-11, *Tolypothrix tenuis* J-1 включены в состав коллекции микроводорослей «ССМКазНУ» лаборатории фотобиотехнологии КазНУ им. Аль-Фараби для дальнейшего изучения и использования в различных научных исследованиях.

Разработана и запатентована технологическая схема пятисекционного фотобиореактора для культивирования фототрофных микроорганизмов (Патент на полезную модель «Фотобиореактор для культивирования и селекции фототрофных микроорганизмов» №38863, 05.06.2019). Изготовленный согласно данной технологической схеме фотобиореактор рекомендуется для массового культивирования штаммов цианобактерий и микроводорослей и проведения селекционных работ с культурами.

Отобранные в ходе исследовательской работы активные штаммы азотфиксирующих штаммов *Anabaena variabilis* R-I-5 и *Anabaena* sp. B1-4, используются в настоящее время в теплице КазНУ им. Аль-Фараби в качестве биоудобрения для повышения урожайности сельскохозяйственных культур растений.

Основные положения, вынесенные на защиту

Выделенные из рисового поля 6 аксенических культур цианобактерий, 3 из которых идентифицированы, как виды *Anabaena* sp. B1-4, *Nostoc* sp. J-14 и *Tolypothrix tenuis* J-1;

Положительное влияние молибдена (Mo^{+6}) в концентрации 1 мкмоль на активность нитрогеназы у штамма *Anabaena* sp. B1-4;

Ростстимулирующий эффект штаммов азотфиксирующих цианобактерий *Anabaena variabilis* R-I-5 и *Anabaena* sp. B1-4 в отношении клубники (сорт *Sunrise* T-4) и рисовой культуры (сорт Акмаржан);

Способность штамма *Synechocystis* sp. PCC 6803 к выделению водорода в темных условиях и штамма *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 в условиях освещения;

Добавление 10 мкмоль диурона к суспензии штамма *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 увеличивает выделение водорода в 1,5 раза.

При определении соотношения реакционных центров пигмент-белковых комплексов ФС1 и ФС2 у исследуемых штаммов цианобактерий в соответствии с 77 К полученного спектра флуоресцентного излучения, *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 имели высокие отношения ФС1/ФС2, близкие друг к другу.

Влияние условий освещения на выделение водорода гетероцистными штаммами цианобактерий, заключающееся в интенсивном выделении водорода штаммом *Anabaena variabilis* R-I-5 на свету, и штаммом *Nostoc caldicola* RI-3 в темноте.

Личный вклад автора

Анализ литературных данных, относящихся к исследуемой проблеме, определение целей и задач работы, проведение экспериментальных исследований, статистическая обработка результатов и анализ, написание диссертации, оформление выполнено при личном участии автора. Кроме того, автор способствовал публикации всех научных работ (статьи ККСОН, статьи импакт-факторами, патент, тезисы): подготовка рукописи, построение графиков, анализ результатов, корреспонденция и ответы рецензентам.

Связь работы с планом государственных программ

Диссертационная работа выполнена в рамках проектов: АР05131743 «Разработка научно-методических основ технологии биомониторинга и прогнозирования состояния загрязненных водных экосистем с использованием фототрофных микроорганизмов» (2018-2020 гг.), АР05131218 «Разработка безотходной технологии биологической очистки сточных вод и использования углекислого газа на основе цианобактерий для потенциального производства биодизеля» (2018-2020 гг.), АР08052481 «Разработка технологии производства биодизеля на основе активных штаммов микроводорослей» (2020-2022 гг.) и АР08052402 «Разработка технологии производства удобрений на основе азотфиксирующих цианобактерий» (2020-2022 гг.).

Апробация работы

Результаты исследования и основные положения диссертационной работы докладывались и обсуждались на следующих международных научных конференциях и симпозиумах:

1. Международная научная конференция студентов и молодых ученых "Фараби адеми", 10-11 апреля 2018 года, Алматы, Казахстан;
2. Международная Пушинская школа – конференция молодых ученых – «Биология - наука XXI века», 23-27 апреля 2018 года, Пушкино, РФ;
3. 4-я Международная конференция по бионауке и биотехнологии (BioTech 2019), 2-22 февраля 2019 года, Куала-Лумпур, Малайзия;
4. 10-я Международная конференция по изучению фотосинтеза и энергии водорода посвященной устойчивости, 23-28 июня 2019 года, Санкт-Петербург, РФ;
5. Международная конференция по искусственному фотосинтезу, 2-5 марта 2019 г., Киото, Япония;
6. Международный учебный курс по промышленной синтетической биотехнологии, 14 октября - 2 ноября 2019 г., Тяньцзинь, Китай;
7. Международная конференция по метаболической инженерии (MES 2019), 20-22 октября 2019 г., Тяньцзинь, Китай.
8. 11-й Европейский семинар по биологии цианобактерий, 7-9 сентября 2020 года, Руа Альфредо Аллен, Португалия.

Публикации

Основной состав диссертации представлен в 12 печатных работах, из них 4 статьи, в республиканских научных журналах из списка Комитета по контролю в сфере образования и науки РК, 3 научные статьи в 1-м квартале и 5 тезисов на международных конференциях. По результатам исследования получен патент на полезную модель «Фотобиореактор для культивирования и сортировки фототрофных микроорганизмов», №38863, 27.09.2019.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертационная исследовательская работа состоит из 117 компьютерных текстов и из сокращенных слов, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения и 243 использованной литературы. Объем работы включает 8 таблиц, 52 рисунка и 1 приложения.