

## **АННОТАЦИЯ**

диссертационной работы на соискание степени доктора философии (Ph.D) по специальности 6D010700 – «Биотехнология»

**Машжан Ақжігіт Сембайұлы**

### **Метагеномный анализ термофильных бактерий Казахстана для получения перспективных гидролитических ферментов**

**Общая характеристика работы.** Диссертационная работа посвящена исследованию таксономического разнообразия и биотехнологического потенциала сообщества гидролитических микроорганизмов в геотермальных источниках, расположенных на территории Казахстана. В данном исследовании мы комбинировали высокопроизводительные методы секвенирования метагеномики с традиционными микробиологическими методами.

**Актуальность темы исследования.** В настоящее время изучение генетического разнообразия микробных сообществ геотермальных мест обитания, а также исследование термофильных бактерий, заселяющих эти среды, и их аминокислот представляет интерес с точки зрения экологии, так и биотехнологии. Ферменты и термозимы, производимые термофильными и гипертермофильными микроорганизмами, населяющими такие экстремальные ниши, обладают рядом биотехнологических преимуществ по сравнению со своими мезофильными аналогами. Одним из таких преимуществ является высокая термостабильность ферментов. Кроме того, термостабильность обычно сопровождается устойчивостью к высокому уровню pH, различным химическим денатурантам, органическим растворителям и избыточному давлению.

Термофильные ферменты приспособлены к функционированию при температуре, соответствующей условиям роста их организмов-хозяев. Таким образом, крайний диапазон температур, характерный для их окружения, определяет условия, при которых проявляется ферментная активность. Изоляция и характеристика термофилов проводились в геотермальных источниках, расположенных в различных регионах мира, включая США, Италию, Турцию, Болгарию, Новую Зеландию и Индию. Территория Казахстана богата разнообразными источниками геотермальных вод, однако микробные сообщества, населяющие эти воды, до сих пор не полностью исследованы. Это указывает на потенциальную возможность обнаружения новых экстремофильных микроорганизмов в этих геотермальных водах, что открывает перспективы для их биотехнологического применения.

Исследования филогенетического разнообразия микроорганизмов в экстремальных средах показывают, что значительная часть термофильных микроорганизмов до сих пор не была успешно культивирована в лаборатории. Одной из основных причин этого является тот факт, что почти 99% микроорганизмов на Земле не способны развиваться в стандартных лабораторных условиях, что затрудняет их идентификацию с использованием

традиционных методов микробиологии и биохимии. В последние годы современные методы молекулярной биологии предоставили новые инструменты для решения этой проблемы, включая метагеномику.

Метагеномный анализ предоставляет возможность идентификации микроорганизмов и потенциально новых полезных ферментов из источников термальной воды. Высокопроизводительные методы секвенирования метагеномов могут дополнять традиционные методы, основанные на культивации, и обеспечивать всестороннее понимание сложных микробных сообществ.

Таким образом, использование метагеномного анализа для выявления перспективных гидролитических микроорганизмов из геотермальных источников на территории Казахстана является актуальной задачей как с научной, так и с прикладной точек зрения. Это исследование может привести к обнаружению новых видов микроорганизмов с уникальными гидролитическими свойствами, что имеет важное значение для развития биотехнологий, включая производство ферментов с повышенной активностью в условиях высоких температур.

Кроме того, такое исследование способствует расширению диапазона имеющегося информации о биоразнообразии и экологии микроорганизмов в экстремальных условиях, что важно для общего научного прогресса и возможного применения в промышленности и других областях.

**Цель исследования:** Определение таксономического разнообразия сообщества термофильных гидролитических микроорганизмов, обитающих в геотермальных источниках Казахстана.

Для достижения **цели** были поставлены следующие задачи:

1. Изучить таксономическое разнообразие микробных сообществ Жаркентских геотермальных источников с использованием методов метагеномики;
2. Выделить и идентифицировать новые штаммы/виды термофильных бактерий из изучаемых микробных сообществ;
3. Определить гидролитическую активность выделенных штаммов термофильных бактерий;
4. Оптимизировать питательную среду для культивирования термофильных бактерий;
5. Провести полногеномное секвенирование и аннотацию геномов перспективных штаммов термофильных бактерий.

**Объекты исследования.** Сообщества и изоляты микроорганизмов в пробах, взятых из Жаркентских геотермальных источников, расположенных в Алматинской области. Типовой штамм *Polycladomyces subterraneus* KSR 13<sup>T</sup> (коллекционный номер ВСС 50740) из Международной коллекции микроорганизмов Таиланда.

**Предмет исследования.** Идентификация микроорганизмов из геотермальных источников.

**Методы исследования.** В работе применялись метагеномные, геномные, микробиологические и биохимические методы. Секвенирование

NGS проводилось на платформах Illumina (HiSeq 4000). Биоинформационная обработка первичных данных NGS, сборка de novo и специализированная аннотация были выполнены с использованием программных пакетов CLC Genomic Workbench v. 20.0.01, KBase и RAST v. 1.073. Кроме того, полная сборка генома из метагенома было реализована с использованием программ MaxBin2 v. 2.2.4, CONCOCT v. 1.1, MetaBAT2 v. 1.7.

#### **Научная новизна исследования:**

Результаты метагеномного секвенирования показывают, что бактериальное сообщество состоит из трех типов: *Firmicutes*, *Deinococcus - Thermus*, и *Actinobacteria*, при этом высокое доминирование наблюдается у бактерий типа *Firmicutes* и *Deinococcus - Thermus*.

Из метагеномов было извлечено 11 MAG (Геном собранный из метагенома), отнесенных к 10 различным видам следующих родов: *Pseudomonas*, *Fervidobacterium*, *Caloramator*, *Calditerricola*, *Sutcliffeiella*, *Geobacillus*, *Cerasibacillus*, *Paenibacillus*, *Parageobacillus* и *Thermus*.

Впервые в чистой культуре были выделены и секвенированы термофильные бактерии семи родов (*Geobacillus*, *Anoxybacillus*, *Polycladomyces*, *Thermus*, *Caldicellulosiruptor*, *Caldanaerobacter* и *Thermoanaerobacter*) из образцов микробного сообщества Жаркентских гидротермальных источников. Секвенирование проводилось по генам 16S рРНК. Кроме того, полностью секвенированы геномы трех термофильных штаммов бактерий, принадлежащих к родам *Polycladomyces* spp. и *Caldanaerobacter* sp.

Из геотермальных источников Жаркента впервые был выделен новый вид целлюлозолитической термофильной бактерии, получившие название *Polycladomyces zharkentensis* ZKZ2<sup>T</sup> sp. nov (=КСТС 43421, =СЕСТ 30708). Также был выделен и охарактеризован первый подвид (subspecies) кератинолитической термофильной бактерии *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *keratonaliticus* КАк. Эта кератолитическая бактерия является первым идентифицированным видом рода *Caldanaerobacter*, способным расти на необработанном кератине (куриных перьях).

Впервые выделены и описаны новые штаммы аэробных бактерий с оптимальной температурой роста 75°C, идентифицированные как *Geobacillus* 3WAK3 и *Geobacillus* 3SAK4. Они проявили наивысшую температуроустойчивость среди известных на данный момент видов рода *Geobacillus*.

**Научная и практическая значимость работы.** Анализ филогенетического разнообразия микробных сообществ Жаркентского геотермального источника (Алматинская область) способствует лучшему пониманию межвидовых взаимодействий экстремофильных микробных сообществ. Результаты метагеномных и микробиологических исследований расширяют и уточняют наши знания о микробиологии экстремальных сред. В рамках исследования был выделен новый тип термофильной бактерии, *Polycladomyces zharkentensis* ZKZ2<sup>T</sup>, который был соответствующим образом охарактеризован и депонирован в международных коллекциях культур КСТС

(Korean Collection for Type Cultures) и СЕСТ (Spanish Type Culture Collection) (=КСТС 43421, =СЕСТ 30708).

Впервые были выделены 54 изолята термофильных и гипертермофильных бактерий, обладающие протеазной, целлюлазной, амилазной, и липазной активностью. Эти штаммы представляют ценность для биотехнологии и могут быть использованы в качестве источника ферментов в различных областях промышленности: производство моющих средств, химическая промышленность, переработка кератиновых и целлюлозных отходов.

Показано, что кератиназы анаэробного штамма *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *keratolyticus* КАк, выделенного из геотермального источника Жаркент, эффективно разрушают трудногидролизуемый белок  $\beta$ -кератин (куриные перья). Также была оптимизирована культуральная среда для этой бактерии.

В мировую базу данных GenBank были депонированы последовательности 16S рРНК для 16 бактериальных штаммов с высокой гидролитической активностью, а также четыре метагенома и три полных генома.

Был получен Патент Республики Казахстан №5803 от 29.01.2021 на полезную модель «Питательная среда для культивирования анаэробных термофильных микроорганизмов с кератинолитической активностью».

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. В прокариотической микробиоте горячих геотермальных источников преобладали флотипы бактерий *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Deinococcus - Thermus*. Более того, сходство (<97%) между флотипами и культивируемыми бактериями из базы данных GenBank свидетельствует о заселении исследованных геотермальных источников новыми и уникальными видами.

2. Представители рода бактерий *Paenibacillus* sp., *Thermus* sp. и *Geobacillus* sp. проявляют высокую адаптивность в разложении полисахаридов.

3. Выделенные 16 перспективных штаммов, принадлежат к родам *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Caldanaerobacter*, *Polycladomyces* и *Calideclulosiraptor*. Чистые культуры этих термофильных микроорганизмов являются основой для создания ценной коллекции культур.

4. Изолированные термофильные штаммы являются активными продуцентами термостабильных гидролаз, таких как целлюлаза, амилаза, протеаза и липаза.

5. Оптимизированная питательная среда для культивирования нового продуцента кератиназы *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *keratolyticus* Как способствует эффективному накоплению биомассы и усилению кератинолитической активности.

6. Штамм *Polycladomyces* ZKZ2 (тип *Bacillota*), выделенный из проб Жаркентских геотермальных источников, является представителем нового вида *Polycladomyces zharkentensis* ZKZ2<sup>T</sup> sp.nov (=КСТС 43421, СЕСТ 30708).

7. Среди родов *Caldanaerobacter* была выделена первая новая гипертермофильная бактерия, способная расщеплять белок  $\beta$ -кератин. Этот штамм получил название *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *keratonaliticus* КАК.

**Личный вклад автора.** Автор лично осуществил написание диссертации и рукописи, разработал план экспериментов, провел исследования, а также лично участвовал в биоинформационной обработке и анализе полученных результатов.

**Связь исследования с научным проектом.** Диссертационная работа выполнена при поддержке проекта СРЕА-LT-2017/10061 в рамках Евразийской программы Норвежского агентства по международному сотрудничеству и повышению качества высшего образования (Diku) (2017 – 2022 гг.), а также финансируется в рамках проекта AP14871683 «Биотехнология переработки кератиновых побочных продуктов с использованием иммобилизованных термофильных бактерий» (2022 - 2024 гг)

**Апробации исследования.** Результаты диссертации были представлены и обсуждены на следующих международных научных конференциях:

- «International Research and Practive Conference» 30 января – 7 февраля 2019 г., Шеффилд, Англия;;

- 23-я международная научная конференция «Биология – наука XXI века», 15 – 19 апреля 2019 г., Пушкино, Россия;

- «Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии» халықаралық ғылыми конференциясы, 18 – 21 ноября 2020 г., Екатеринбург, Россия;

- Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби әлемі», 6-9 апреля 2020 г., Алматы, Казахстан;

- Международная научная конференция «Аспекты и инновации экологической биотехнологии и биоэнергетики», 12-13 февраля 2021 г., Алматы, Казахстан;

- «Biology and Biotechnology of Microorganisms International Conference» 16-17 сентября 2021 г., Ташкент, Узбекистан;

**Публикации.** Основные результаты проведенных исследований по теме диссертации опубликованы в 11 научных работах, из них 3 статьи в отечественных периодических изданиях, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования МНВО РК; 2 статья в научных журналах включенных в базы данных Web of Science и Scopus; 1 глава в коллективной монографии в Springer. Кроме того, 1 патент на полезную модель Республики Казахстана.

**Структура диссертации.** Диссертация изложена на 143 страницах и состоит из нормативных ссылок, определений, обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения и списка литературы из 222 наименований. Объем диссертации включает 48 рисунков, 29 таблиц и 5 приложений.