

АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (Ph.D.)
по специальности «8D05105 – Биотехнология»

Мәлік Ажар Мәлікқызы

на тему: «Разработка технологии использование деструктор -
микроорганизмов для биоремедиации почв, загрязненных стойкими органическими
загрязнителями»

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена микробному разнообразию образцов почвы, загрязненных стойкими органическими загрязнителями, и скринингу микроорганизмов-деструкторов населенных пунктов Алматинской области, Талгарского района, а также созданию консорциума на основе штаммов-деструкторов, эффективных для биоремедиации загрязненных почв.

Актуальность темы исследования. В настоящее время масштабное загрязнение объектов окружающей среды стойкими органическими соединениями является одной из важнейших экологических проблем. За последние 30 лет в Казахстане и странах СНГ, было использовано более 700 пестицидов, относящихся к различным классам химических соединений. В течение 2013–2022 годов зарегистрировано около 1021 вида пестицидов, разрешенных к применению на территории Республики Казахстан, причем список пестицидов ежегодно пополняется 15–20 новыми препаратами. Хлорорганические пестициды часто используются в качестве инсектицидов, фунгицидов и гербицидов в сельском хозяйстве.

В рамках проекта Программы развития ООН (United Nations Development Programme) / Глобального экологического фонда (ГЭФ) «Оказание первоначальной помощи Республике Казахстан для выполнения обязательств по Стокгольмской конвенции о стойких органических загрязнителях», по результатам предварительной инвентаризации стойких органических загрязнителей в Казахстане установлено 727 наличие складов и 15 мест захоронений пестицидов.

Стойкие органические загрязнителей – ксенобиотики, которые длительное время сохраняются в окружающей среде и за счет механизма полуразложения оказывают негативное влияние на здоровье человека через пищевую цепь. В настоящее время более 20 хлорорганических пестицидов включены в список стойких органических соединений. По результатам изучения воздействия пестицидов на организм человека и животных показано, что развиваются репродуктивные нарушения, врожденные аномалии и патологические изменения, дисфункция иммунной системы, неврологические заболевания и злокачественные опухоли. В последние годы международное внимание было обращено на широкое распространение и стойкость стойких органических загрязнителей в окружающей среде, высокий потенциал биоаккумуляции и биологически вредные последствия.

Большое значение при очистке объектов окружающей среды от стойких органических загрязнителей имеет метод биоремедиации, основанный на деструктивных свойствах микроорганизмов. При биоремедиации загрязненных почв микробиологическая деструкция, основанная на разнообразии микроорганизмов, является одним из экологически чистых и экономически эффективных методов. Метаболические механизмы деструктивных микроорганизмов способны превращать устойчивые органические соединения в соединения с относительно

низкой токсичностью благодаря высокой чувствительности к факторам внешней среды, устойчивости к неблагоприятным условиям и ферментативной активности.

Актуальность темы заключается в изучении микробиоценоза почв, загрязненных пестицидами, физиологические, биохимические, генетические особенности деструктивных микроорганизмов и механизмов биотрансформации стабильных органических соединений.

Цель работы: Изучение микробного разнообразия почв, загрязненных стойкими загрязнителями, скрининг перспективных микроорганизмов-деструкторов и разработка технологической схемы использования консорциума микроорганизмов-деструкторов в биоремедиации загрязненных почв.

Задачи исследования:

1. Химический анализ почв, загрязненных стойкими органическими соединениями Талгарского района Алматинской области;
2. Метагеномный анализ на системе MiSeq NGS компании Illumina и микробиологическое изучение почвенного микробиоценоза, выделение чистых культур аборигенных микроорганизмов;
3. Изучение морфолого-культуральных, физиолого-биохимических свойств выделенных штаммов и молекулярно-генетическая идентификация;
4. Изучение механизмов деструктивной активности перспективных штаммов и проведение скрининга деструктивных штаммов;
5. Создание консорциума на основе биосовместимости штаммов-деструкторов и определения степени деградации хлорорганических пестицидов;
6. Изучение активности штаммов-деструкторов при расщеплении хлорорганических пестицидов в модельных экспериментах. Разработка технологической схемы биоремедиации почвы, загрязненной стойкими органическими соединениями, на основе консорциума штамм-деструкторов.

Объект исследования. В качестве объектов исследования были использованы образцы почв поселков Кызылкайрат, Бескайнар, Амангельди №1, Амангельди №2, Бельбулак, Басши Алматинской области, Талгарского района и чистые культуры микроорганизмов, выделенные из этих образцов.

Методы исследования. В ходе диссертационной работы эксперименты проводились в лабораторных условиях с использованием газохроматографического метода химического анализа Agilent Technologies 6890N, современной системы метагеномного анализа MiSeq NGS компании Illumina, традиционной микробиологической, молекулярно-генетической, сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), флуоресцентной спектроскопии, ИК-спектроскопии, методы Фурье-спектрометра ALPNA II.

Научная новизна исследования.

Впервые проведен современный метагеномный анализ MiSeq NGS Illumina образцов почв, загрязненных стойкими органическими соединениями в поселках Кызылкайрат, Бескайнар, Амангельди №1, Амангельди №2, Бельбулак, Басши в Республике Казахстан, Алматинской области, Талгарского района, в микробной разнообразий преобладали следующие бактериальные филы: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadates*, *Saccharibacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, и было обнаружено 68-80% представители семейства *Bacillus*, *Pseudomonas*.

В ходе научно-исследовательской работы из образцов почвы, загрязненных стойкими органическими соединениями, выделено 40 штаммов, изучены их

морфолого-культуральные, физиолого-биохимические и деструктивные свойства, были отобраны 10 активных штаммов.

Проведен филогенетический анализ перспективных деструктивных штаммов и идентифицированы до вида: *Pseudomonas plecoglossicida* K2, *Bacillus aryabhatai* K3, *Solibacillus isronensis* KS1, *Pseudomonas* sp. KS2, *Bacillus pumilus* B1, *Bacillus amyloliquefaciens* B2, *Bacillus subtilis* AK5, *Pseudomonas koreensis* AK1, *Bacillus megaterium* AS1, *Bacillus paramycoides* SA1.

Механизмы деструктивной активности перспективных штаммов основаны на их ферментативной активности: установлено, что деструктивные штаммы продуцируют ферменты протеазу, лакказу, каталазу, целлюлазу, дегидрогеназу, способные расщеплять хлорорганические пестициды.

С целью повышения эффективности расщепления устойчивых органических соединений были сконструированы консорциумы на основе перспективных штаммов. Было обнаружено, что консорциум *Pseudomonas plecoglossicida* K2 + *Bacillus aryabhatai* K3 разлагает хлорорганические пестициды на 55%, а *Bacillus pumilus* B1 + *Bacillus amyloliquefaciens* B2 – на 64%. По результатам исследований установлено, что перспективные штаммы способны расщеплять устойчивые органические соединения на алициклические соединения циклоалканы ($-\text{CH}_2$), ароматические гетероциклические соединения ($\text{C}=\text{C}$, $\text{COO}-$) и часть алифатических соединений на алкильные группы ($-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}_2$).

На основании результатов, полученных в научно-исследовательской работе, предложена технологическая схема использования консорциумов на основе штаммов-деструкторов в биоремедиации почв, загрязненных стойкими органическими загрязнителями.

Научно-практическая значимость научной работы.

Деструктор – штаммы *Pseudomonas plecoglossicida* K2 (OK217230), *Bacillus aryabhatai* K3 (MW866565), *Solibacillus isronensis* KS1 (OK236011), *Pseudomonas* sp. KS2 (OL348382), *Bacillus pumilus* B1 (OL348383), *Bacillus amyloliquefaciens* B2 (OL348394), *Bacillus subtilis* AK5 (MW866566), *Pseudomonas koreensis* AK1 (OL348403), *Bacillus megaterium* AS1 (OL348404), *Bacillus paramycoides* SA1 (OL348439) были идентифицированы до вида и зарегистрированы в Genbank базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI). Новые штаммы были включены в коллекцию лаборатории прикладной микробиологии КазНУ им. аль-Фараби для использования в научно-исследовательских работах.

В модельных экспериментах изучена деструктивная активность консорциумов на основе штаммов-деструкторов, полученных в работе, и установлено, что штаммы консорциума *Pseudomonas plecoglossicida* K2 + *Bacillus aryabhatai* K3 83%, *Bacillus pumilus* B1 + *Bacillus amyloliquefaciens* B2 разлагают 86% хлорорганических пестицидов. Всхожесть семян пшеницы в почвах, загрязненных пестицидами, у моно штамма *Bacillus aryabhatai* K3 составляет 67–83%, в вариантах с консорциумом штаммов *Pseudomonas plecoglossicida* K2 + *Bacillus aryabhatai* K3 82–88%, *Bacillus pumilus* + B1 *Bacillus amyloliquefaciens* B2 87–94%.

Из образцов почвы, загрязненных стойкими органическими соединениями, были отобраны перспективные деструктивные микроорганизмы, изучены их деструктивные свойства и получены патенты: «Способ микробиологической деструкции пестицидов» (№ 34115, 09.01.2020 г.), «Органохлорлы пестицидтерді микробиологиялық жою тәсілі» (№7731, 13.01.2023). Для биоремедиации почв,

загрязненных стойкими органическими соединениями, предложены консорциумы на основе штаммов-деструкторов.

Результаты научно-исследовательской работы могут быть использованы в качестве материала для теоретических и практических курсов для студентов и магистров, докторантов высших учебных заведений.

Положения, выносимые на защиту:

1. В почвах загрязненные стойкими органическими загрязнителями Талгарского района Алматинской области обнаружено высокое количество хлорорганических пестицидов 4,4-ДДЕ, 4,4-ДДТ, α -ГХЦГ, β -ГХЦГ и γ -ГХЦГ. В пробах почвы концентрация хлорорганических пестицидов составила Қызылқайрат – 121 054, Бескайнар - 47 334, Амангельди №1–5382, Амангельди №2–1032, Белбулак - 1025, Басши - 146 мкг/кг⁻¹ соответственно.

2. В пробах почвы, загрязненных хлорорганическими пестицидами, преобладают бактериальные филумы (типы) *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadates*, *Saccharibacteria*, *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, в том числе представители рода *Bacillus*, *Pseudomonas* составили 68–80%.

3 Активные штамм-деструкторы *Pseudomonas plecoglossicida* K2 (OK217230), *Bacillus aryabhattai* K3 (MW866565), *Solibacillus isronensis* KS1 (OK236011), *Pseudomonas* sp. KS2 (OL348382), *Bacillus pumilus* B1 (OL348383), *Bacillus amyloliquefaciens* B2 (OL348394), *Bacillus subtilis* AK5 (MW866566), *Pseudomonas koreensis* AK1 (OL348403), *Bacillus megaterium* AS1 (OL348404), *Bacillus paramycoides* SA1 (OL348439) идентифицированы до вида и зарегистрировано в базе данных NCBI.

4. Деструктивную активность перспективных штаммов в отношении хлорорганических пестицидов обеспечивают ферменты протеаза, лакказа, каталаза, целлюлаза, дегидрогеназа.

5. На основе биосовместимости штамм-деструкторов были конструированы 2 консорциума. Консорциум на основе штаммов *Pseudomonas plecoglossicida* K2 + *Bacillus aryabhattai* K3 биodeградируют хлорорганические пестициды на 84%, а консорциум *Bacillus pumilus* B1 + *Bacillus amyloliquefaciens* B2 на 86%. Предложены консорциумы на основе перспективных штаммов для биоремедиации почв, загрязненных стойкими органическими соединениями.

Связь диссертационной работы с научными исследованиями.

Диссертационная работа выполнена в рамках программы Института общей генетики и цитологии, проекта ИРН BR05236379 «Комплексная оценка влияния неутилизованных и запрещенных к использованию пестицидов на генетический статус и здоровье населения Алматинской области: Определение микробного разнообразия территории, прилегающей к местам захоронения пестицидов, скрининг, выделение деструктора - микроорганизмов».

Личный вклад диссертанта в создание результатов научной работы, предлагаемой к защите

Результаты научно-исследовательской работы, обзор литературных данных, определение целей и задач работы, проведение экспериментальных исследований, статистическая обработка и анализ полученных результатов проводились при личном участии автора.

Апробация, одобрение результатов работы и личный вклад автора. Основные результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на следующих международных научных конференциях и симпозиумах:

1. 2-я Международная конференция по возобновляемым источникам энергии и экологической инженерии (30 октября 2019 г.);

2. Международная научная конференция молодых ученых «Фундаментальные исследования и инновации в молекулярной биологии, биотехнологии, биохимии», посвященная 80-летию академика Мурата Айтхожина (28–29 ноября 2019 г.);

3. VII МАТЕРИАЛЫ международной научной конференции студентов и молодых ученых «ФАРАБИ ӘЛЕМІ» (Алматы, 6–9 апреля 2020 г.);

4. Итальянский научный журнал *Annali d'Italia*, 2020;

5. II Международное книжное издание Содружества Независимых Государств «Лучшие молодые учёные – 2020» (Астана, Казахстан, 28 сентября 2020 г.);

6. VIII МАТЕРИАЛЫ международной научной конференции студентов и молодых ученых «ФАРАБИ ӘЛЕМІ» (Алматы, 6–8 апреля 2021 г.);

7. Международная научно-практическая конференция «Современные проблемы биотехнологии: от лабораторных исследований к производству», (4–5 июня 2021 г., Алматы, Казахстан);

8. IX МАТЕРИАЛЫ международной научной конференции студентов и молодых ученых «ФАРАБИ ӘЛЕМІ» (Алматы, 6–8 апреля 2022 г.);

9. X МАТЕРИАЛЫ международной научной конференции студентов и молодых ученых «ФАРАБИ ӘЛЕМІ» (Алматы, 6–8 апреля 2023 г.);

Публикаций. Материалы, полученные в диссертации, опубликованы в 27 опубликованных научных работах, в том числе в рецензируемых зарубежных научных изданиях - 2 статьи; 1 статья в международных рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных *Web of Science* и *Scopus*, включенная в квартиль Q2 с ненулевым импакт-фактором; 1 статья на международной научной конференции с процентом CiteScore не менее 25, проиндексированная в базах данных *Web of Science* и *Scopus*; 4 статьи в республиканских научных изданиях, рекомендованных Комитетом контроля в сфере образования и науки Республики Казахстан; 13 тезисов опубликованы в материалах международных конференций. По результатам диссертационной работы изобретение прошло официальную экспертизу и получено 2 патента и 2 авторских свидетельства Республики Казахстан.

Структура диссертации. Диссертация состоит из 173 страницы, введения, обзора литературы, объектов исследования, материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключительных разделов, 265 библиографии, 9 таблиц, 55 рисунков.