Аңдатпа

8D05105 – «Биотехнология» мамандығы бойынша философия докторы (PhD) ғылыми дәрежесін алу үшін ұсынылған диссертацияға

Қамшыбаева Гүлжанай Қолғанатқызы

«Сутегі бөлуші цианобактерияларды әр түрлі экожүйелерден оқшаулау және метаболикалық тәсілдер арқылы олардың өнімділігін арттыру»

Жұмыстың жалпы сипаттамасы

Диссертациялық жұмыс цианобактериялардың аксениялық (таза) дақылдарын бөліп алуға және фотобиоэнергетикалық технологияларда сутек (H_2) алуға қолдануға бағдарланған перспективалы штамдарды іріктеу мақсатында олардың сутек өндіру қабілетін кешенді зерттеуге арналған. Жұмыс аясында 2020 жылдың көктем, жаз және күз мезгілдерінде Оңтүстік және Оңтүстік-Шығыс Қазақстанның әртүрлі топырақ және су ресурстарынан үлгілер жиналып, цианобактериялардың 6 штаммы бөлініп алынды және идентификацияланды.

Фотобиологиялық жолмен сутек бөлудің тиімділігін айқындайтын негізгі факторлар, соның ішінде дақылдау режимдері, газ алмасу және жарықтандыру жағдайлары зерттелді. Фотосинтетикалық электрон тасымалдау тізбегінің ингибиторларының (CCCP, DBMIB, DCMU, KCN) әсері бағаланып, цианобактерияларда сутек өнімділігін арттыруға мүмкіндік беретін олардың оңтайлы концентрациялары анықталды. Ең жоғары тиімділік KCN (500 мкМ) және DCMU (20 мкМ) қолданылған жағдайда байқалды.

Алынған жаңа нәтижелер сутек алу бойынша технологиялық ұсынымдарды әзірлеуге және фототрофты микроорганизмдерді культивирлеу үдерістерін одан әрі масштабтауға негіз болады.

Зерттеудің өзектілігі

Сутек болашақ энергетикалық ресурстардың негізгі факторларының бірі ретінде қарастырылады, өйткені оны қолдану кезінде CO_2-ның тікелей шығарындылары болмайды және ол электр энергетикасы, көлік және энергияны сақтау салалары үшін әмбебап энергия тасымалдаушы бола алады. Жаһандық декарбонизация және жаңартылатын энергия көздерінің үлесінің артуы жағдайында қазба шикізатын қажет етпейтін әрі экологиялық зиянды барынша азайтатын «төмен көміртекті» сутек өндіру технологияларына сұраныс күшейіп келеді. Цианобактериялар жарық энергиясын пайдалана отырып, нитрогеназа және гидрогеназа ферменттерінің қатысуымен сутек түзуге әлеуетті, бұл оларды биоэнергетикалық шешімдер үшін перспективті объект етеді.

Алайда, биосутек технологияларының практикалық дамуын табиғи штаммдардың өнімділігінің шектеулілігі, сондай-ақ өсіру шарттарына және оттегінің болуына үдерістің жоғары сезімталдығы тежейді. Сондықтан, сутек бөлу қабілеті бар цианобактерия штаммдарын іздеу және іріктеу, өсіру параметрлерін және сутек өндіру режимдерін оңтайландыру, сутек түзілуі мен

бөлінуінің реттеуші және ферментативтік механизмдерін зерттеу, сондай-ақ, сутек шығымын арттыру тәсілдерін әзірлеу өзекті болып табылады.

Жұмыстың мақсаты

Су және топырақ көздерінен перспективті цианобактерия штаммдарын іздеу және идентификациялау, олардың сутек бөлу қабілетін кешенді түрде зерттеу және белсенділігін арттыру тәсілдерін әзірлеу.

Зерттеу міндеттері

1. Түркістан, Қызылорда және Алматы облыстарының топырақ және су ресурстарынан цианобактериялардың аксениялық (таза) дақылдарын бөліп алу, оларды маркерлік тізбектер (16S рРНҚ) бойынша молекулалық-генетикалық идентификациялау және филогенетикалық талдау жүргізу.

2. Бөлініп алынған цианобактерия штамдарында сутектің бөлінуінің базалық деңгейін және сутек метаболизмінің негізгі ферменттерінің (гидрогеназа және нитрогеназа) белсенділігін анықтау, сондай-ақ, осы көрсеткіштердің олардың сутек өндіру қабілетімен өзара байланысын зерттеу.

3. Белсенді цианобактерия *Synechocystis* sp. PSU 1262 штаммының сутек бөлінуіне негізгі физика-химиялық факторлардың (температура, жарықтану деңгейі, азот мөлшері, буферлік жүйелер, pH) әсерін бағалау.

4. Фотосинтетикалық электрон тасымалдау тізбегінің ингибиторларының (CCCP, DBMIB, DCMU, KCN) әртүрлі концентрацияларының сутек бөлінуіне әсерін бағалау және оларды қолданудың оңтайлы режимдерін анықтау.

5. *Synechocystis* sp. PSU 1262 жасушаларын кальций-альгинатты гельде иммобилизациялау және сутек бөліну көрсеткіштеріне әсерін зерттеу.

6. Өсіру шарттарын оңтайландыру, жарық режимдерін іріктеу және фотосинтез ингибиторларын қолдану негізінде цианобактерияларда сутек шығымын арттыру бойынша технологиялық ұсынымдар әзірлеу.

Диссертацияны орындауда зерттеулердің жүргізілу орны

Диссертациялық жұмыс әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің базасында орындалды. Зерттеулердің бір бөлігі тиісті бейіндегі жетекші ғылыми-зерттеу ұйымдарында жүргізілді: К.А. Тимирязев атындағы Өсімдіктер физиологиясы институты РҒА (Ресей) және Тяньцзинь өнеркәсіптік биотехнология институты (TIB, CAS, Қытай).

Зерттеу объектілері

Зерттеу объектілері ретінде фототрофты микроорганизмдердің табиғи және коллекциялық штаммдары қолданылды. Негізгі объектілер: *Desertifilum* sp. PSU 1129, *Oscillatoria* sp. S-001, *Phormidium* sp. PSU 1120, *Chroococcus* sp. PSU 1008, *Synechococcus* sp. SU 78, *Synechocystis* sp. PSU 1262, *Tolypothrix tenuis* J-1, *Nostoc* sp. J-1, *Anabaena* A-9.

Зерттеу әдістері

Жұмыста микробиологиялық, физиологиялық-биохимиялық және молекулалық-генетикалық әдістердің кешені қолданылды. Альгологиялық сынамалар 2020 жылдың көктем, жаз және күз мезгілдерінде Қазақстан

Республикасының топырақ және су көздерінен алынды. Аксениялық (таза) дақылдарды бөліп алу бастапқыда үлгілерді сұйық қоректік орталарда (BG-11 және BG_0-11) өсіру арқылы жүргізіліп, кейін қатты қоректік орталарға бірнеше мәрте қайта егу жүргізілді.

Цианобактериялық штамдарды идентификациялау морфологиялық белгілер бойынша және 16S рРНҚ маркері арқылы жүзеге асырылды: ДНҚ бөліп алу (фенол-хлороформ әдісі), ПТР-амплификация, өнімдерді электрофорезбен тексеру, Сэнгер әдісімен секвенирлеу; филогенетикалық талдау MEGA X бағдарламасында BLAST арқылы ең жақын тізбектерді таңдап, бутстрэп-бағалау қолдану арқылы орындалды.

Сутек өнімділігі жасуша суспензияларын аргонмен анаэробтандырғаннан кейін герметикалық құтыларда анықталды, ал газ фазасындағы H_2 мөлшері газ хроматографиясы әдісімен өлшенді. Сутек түзілу жолдарын күшейту мақсатында фотосинтездік электрон тасымалдау тізбегінің ингибиторлары (CCCP, DBMIB, DCMU, KCN) әртүрлі концентрацияларда қолданылды.

Екі бағытты [NiFe]-гидрогеназаның белсенділігі дитионитпен қалпына келтірілген метилвиологенді пайдалана отырып H_2 жиналу жылдамдығы бойынша бағаланды, ал нитрогеназа белсенділігі ацетилен-редуктазалық тестпен ($C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$) анықталып, кейін газ хроматография әдісімен бақыланды.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы

1. Алғаш рет зерттелген экожүйелерден *Oscillatoriales, Chroococcales* және *Synechococcales* таксономиялық қатарларына жататын цианобактериялардың 6 аксеникалық штаммы бөлініп алынды. Аталған штаммдар зерттелген экожүйелердегі цианобактериялардың таксономиялық алуантүрлілігі туралы қазіргі ғылыми түсініктерді кеңейтеді және олардың физиологиялық ерекшеліктері мен биотехнологиялық әлеуетін одан әрі зерделеуге негіз қалайды.
2. Алғаш рет бөлініп алынған штаммдарға морфологиялық сипаттамалары мен молекулалық-генетикалық талдау (16S рРНҚ) негізінде кешенді идентификация жүргізілді. Филогенетикалық талдау нәтижелері изоляттардың *Desertifilum* sp. PSU 1129, *Synechocystis* sp. PSU 1262, *Phormidium* sp. PSU 1120, *Chroococcus* sp. PSU 1008, *Synechococcus* sp. SU 78 және *Oscillatoria* sp. S-001 таксондарына жататынын растады. Аталған штаммдардың нуклеотидтік реттіліктері NCBI GenBank деректер базасында келесі тіркеу нөмірлерімен депоненттелген: *Desertifilum* sp. PSU 1129 (№ PZ058579), *Synechocystis* sp. PSU 1262 (№ PZ058575), *Phormidium* sp. PSU 1120 (№ PZ058576), *Chroococcus* sp. PSU 1008 (№ PZ058578), *Synechococcus* sp. SU 78 (№ PZ058580), Oscillatoria sp. S-001 (№ PZ058577).
3. Алғаш рет фотосинтетикалық электрон тасымалдау тізбегінің тежегіштерін қолдану арқылы H_2 түзілуін мақсатты түрде арттыру мүмкіндігі тәжірибелік тұрғыдан дәлелденді. Ең тиімді тежегіштер мен олардың оңтайлы концентрациялары анықталды: DCMU үшін - 20 мкМ (710 нмоль H_2/мг хл а/сағ дейін), KCN үшін - 500 мкМ (860 нмоль H_2/мг хл а/сағ дейін).

Ғылыми және практикалық маңыздылығы

Жұмыстың ғылыми маңыздылығы Қазақстан Республикасының цианобактерияларының таксономиялық алуандығы мен әлеуеті туралы деректерді кеңейтумен, сондай-ақ, фотобиологиялық сутек бөлінуін реттейтін факторларды нақтылаумен анықталады.

Практикалық маңыздылығы – перспективті H_2-продуцент штаммын алу және өсіру режимдерін оңтайландыру мен фотосинтез ингибиторларын қолдану арқылы сутек продукциясын арттыруға мүмкіндік беретін шарттарды апробациялау, сондай-ақ, үдерістерді масштабтау және фотобиореакторлық жүйелерді жобалау кезінде қолдануға болатын технологиялық ұсынымдарды дайындау.

Қорғауға ұсынылатын негізгі қағидалар

1. Цианобактериялардың 6 аксеникалық штаммы бөлініп алынып, идентификацияланды. Бөлініп алынған цианобактериялардың таксономиялық тиесілігі мен филогенетикалық орны 16S рРНҚ гені бойынша молекулалық идентификация және филогенетикалық талдау арқылы расталды; нуклеотидтік реттіліктері NCBI GenBank деректер базасына келесі нөмірлермен депоненттелді: *Desertifilum* sp. PSU 1129 (№ PZ058579), *Synechocystis* sp. PSU 1262 (№ PZ058575), *Phormidium* sp. PSU 1120 (№ PZ058576), *Chroococcus* sp. PSU 1008 (№ PZ058578), *Synechococcus* sp. SU 78 (№ PZ058580), *Oscillatoria* sp. S-001 (№ PZ058577).

2. Бөлініп алынған цианобактерияларға жүргізілген салыстырмалы скрининг нәтижелері бойынша *Synechocystis* sp. PSU 1262 штаммы сутек бөлудің жоғары деңгейі мен өсіру жағдайларында тұрақты өсу қабілетін үйлестіретін ең перспективалы продуцент ретінде таңдап алынды.

3. Цианобактериялардың сутек түзу қабілетін өсіру жағдайларын оңтайландыру және фотосинтетикалық электрон тасымалын тежеу арқылы мақсатты түрде арттыруға болады. *Synechocystis* sp. PSU 1262 штаммы үшін сутек бөлудің базалық деңгейі 80–97 нмоль H_2/мг хл а/сағ құрайды. Электрон тасымалын тежеу бұл көрсеткіштің бірнеше есе артуын қамтамасыз етеді: DCMU (20 мкМ) қосқанда — 710 нмоль H_2/мг хл а/сағ дейін, KCN (500 мкМ) қосқанда — 860 нмоль H_2/мг хл а/сағ дейін.

4. Жасушаларды Ca-альгинат матриксінде иммобилизациялау фотосинтетикалық белсенділік сақталған жағдайда қараңғы анаэробты ортада сутек түзілуін 168 сағатқа дейін ұстап тұруға мүмкіндік береді, бұл жасушалық суспензиямен салыстырғанда үдерістің ұзақтығын 72 сағатқа арттырады.

Зерттеудің негізгі нәтижелері мен қорытындылары:

1. Түркістан, Қызылорда және Алматы облыстарының топырақ және су ресурстарынан сынамалар алынды (барлығы 56 үлгі). Көпсатылы бөліп алу және тазарту нәтижесінде цианобактериялардың 6 аксениялық (таза) изоляты алынды. Маркерлік тізбектер (16S рРНҚ) бойынша олардың молекулалық-генетикалық идентификациясы және филогенетикалық талдауы жүргізілді. Нәтижесінде

бөлінген изоляттардың таксономиялық тиесілігі расталды: *Desertifilum* sp. PSU 1129 (идентичтілік 99,78%), *Synechocystis* sp. PSU 1262 (98,52%), *Phormidium* sp. PSU 1120 (99,14%), *Chroococcus* sp. PSU 1008 (95,87%), *Synechococcus* sp. SU 78 (94,44%), *Oscillatoria* sp. S-001 (ең жақын штамдармен шамамен 91%).

2. Бөлінген штаммдар үшін H_2 бөлінуінің базалық көрсеткіштері және сутек метаболизмінің негізгі ферменттерінің белсенділігі анықталды. Гетероцист түзбейтін изоляттарда нитрогеназа белсенділігі анықталмады, бұл олардың сутек өндіруінде гидрогеназалық жүйелердің басым рөл атқаратынын көрсетеді. H_2-нің ең жоғары өнімділігі *Synechocystis* sp. PSU 1262 штаммында (49,6 нмоль H_2/мг хл *a*/сағ дейін) және *Synechococcus* sp. SU 78 штаммында (48,3 нмоль H_2/мг хл *a*/сағ дейін) тіркелді.

3. Белсенді *Synechocystis* sp. PSU 1262 штаммы үшін сутек өндірудің физика-химиялық факторларының оптимумдары белгіленді: pH 8 (79,2 нмоль H_2/мг хл *a*/сағ дейін); pH 8 жағдайында буферлердің ішінде HEPES ең тиімді болды (81,9 нмоль H_2/мг хл *a*/сағ дейін, TES және TRIS-тен жоғары). H_2 өндірудің температуралық оптимумы 27–30 °C (ең жоғары мәні шамамен 27,5 °C — 81,3 нмоль H_2/мг хл *a*/сағ). $NaNO_3$ қосу айқын тежегіш әсер көрсетті (концентрация өскен сайын 75-тен 3 нмоль H_2/мг хл *a*/сағ-қа дейін төмендеу). H_2 өндіру үшін оңтайлы жарықтану – 120 мкмоль фотон/м²/с (96,6 нмоль H_2/мг хл *a*/сағ дейін); бұдан жоғары деңгейлер фотоингибицияны және жасушалардың зақымдануын туындатады.

4. Фотосинтетикалық электрон тасымалдау тізбегін ингибирлеу (концентрациялық оңтайландырумен) *Synechocystis* sp. PSU 1262 штаммының H_2 өндіруін едәуір күшейтетіні көрсетілді. Ең тиімді ингибиторлар: DCMU 20 мкМ (710 нмоль H_2/мг хл *a*/сағ дейін) және KCN 500 мкМ (860 нмоль H_2/мг хл *a*/сағ дейін); салыстыру үшін: CCCP 1 мкМ – 58,3, DBMIB 20 мкМ – 96,8 нмоль H_2/мг хл *a*/сағ. Дозаны арттыру уыттылықпен және электрон тасымалдаудың тежелуімен қатар жүреді, бұл ретте KCN 500 мкМ өсімге ең аз әсер ете отырып, максималды стимулдауды қамтамасыз етеді (OT_{730} 0.45, ал бақылауда 0,52 болды). Әсері жарық/қараңғылық режиміне тәуелді: KCN 500 мкМ және 12 сағ. жарық/ 6 сағ. қараңғылық кезінде 1552,2 нмоль H_2/мг хл *a*/сағ, ал DCMU 20 мкМ және 12/12 режимінде 1394 нмоль H_2/мг хл a/сағ дейін жетеді.

5. *Synechocystis* sp. PSU 1262 штаммын кальций-альгинат гелінде иммобилизациялау жасушалардың физиологиялық белсенділігін сақтауды және сутек өндіру үдерісін ұзартуды қамтамасыз ететін технологиялық тәсіл ретінде негізделді. Иммобилизацияланған жасушалар фотосинтетикалық белсенділікті сақтайды (O_2 жиналу жылдамдығы шамамен 0,012 мкмоль·мл$^{-1}$·мин$^{-1}$) және қараңғы анаэробиоз жағдайында H_2-нің ұзақ уақыт жиналуын қамтамасыз етеді – 168 сағ.-та – 48.1 нмоль H_2/мг хл *a*/сағ дейін, бастапқы фазада максимуммен (алғашқы 9 сағ.-та – 19.3 нмоль H_2/мг хл a/сағ дейін) және 96 сағ-тан кейін платоға шығумен сипатталады.

6. Цианобактерияларда сутек шығымын арттыруға арналған технологиялық ұсынымдар тұжырымдалып, сутек шығымын көтерудің оңтайландырылған зертханалық регламенті сипатталды. Ол мыналарды қамтиды: биомассаны стандартталған дайындау және анаэробиоз қалыптастыру; буферлік жүйе мен pH таңдау (pH 8 оптимумы, HEPES артықшылықты); температураны (27–30 °C) және жарықтануды (~120 мкмоль фотон/м²/с) оңтайландыру; нитратты азотты алып тастау (тежегіш фактор); ең тиімді ингибиторларды қолдану (KCN 500 мкМ, DCMU 20 мкМ) және жарық/қараңғылық режимдерін ескеру; қажет болған жағдайда үдерісті тұрақтандыру және ұзарту үшін кальций-альгинатты матрицада иммобилизациялау.

Автордың жеке үлесі

Автор зерттеу тақырыбы бойынша ғылыми әдебиеттерді талдауды, эксперименттерді жоспарлауды, табиғи материал жинауды, цианобактериялардың таза дақылдарын бөліп алуды және сақтауды, морфологиялық және молекулалық зерттеулерді жүргізуді, цианобактерия жасушаларының сутек бөлуіне қатысты эксперименттерді (фотосинтез ингибиторларын сынауды қоса) қоюды, нәтижелерді өңдеу мен интерпретациялауды, жарияланымдарды дайындауды және диссертациялық жұмысты жазуды орындады.

Мемлекеттік бағдарламалар және жобалармен байланысы

Диссертациялық жұмыс келесі жобалар аясында орындалды: «AP13067574 Цианобактерия штаммдарының сутек өндіру белсенділігін гендік инженерия әдістерімен арттыру» және «AP14869048 Цианобактериялардың *hup*-мутанттарын құрастыру және сутек алудың тиімділігін арттыру үшін өсіру технологиясын әзірлеу».

Нәтижелерді апробациялау

Диссертациялық жұмыстың негізгі нәтижелері мен қағидалары төмендегі ғылыми іс-шараларда баяндалып, талқыланды:

1. 11th International Conference on Photosynthesis and Hydrogen Energy: Research for Sustainability – 2023 ж. 3–9 маусым, Bahcesehir University Future Campus, Ыстанбұл, Түркия (65-б.).
2. 12th International Conference on Photosynthesis and Hydrogen Energy: Research for Sustainability – 2024 ж. 13–19 шілде, Bahcesehir University South Campus, Ыстанбұл, Түркия (36-б.).
3. International Scientific Forum “Modern Trends in Sustainable Development of Biological Sciences” (IFBioScFU 2024) – 2024 ж. 27–28 наурыз, Алматы, Қазақстан.

Жарияланымдар

Диссертация нәтижелері 11 жарияланған жұмыста көрініс тапқан, оның ішінде ҚР ҒЖББСҚК ұсынған республикалық ғылыми журналда 1 мақала, Scopus және Web of Science халықаралық дерекқорларында индекстелетін журналдарда 5 мақала, сондай-ақ халықаралық конференциялар материалдарында 2 тезис бар.

Зерттеу нәтижелері бойынша патенттер алынды: «Фототрофты микроорганизмдерді дақылдауға арналған фотобиореактор», №8207 (04.04.2023) және « Биоотын өндірісінде биосутек продуценті ретінде пайдаланылатын *Nostoc* sp. J-1 цианобактериялар штаммы», №7880 (20.12.2022)

Диссертацияның құрылымы мен көлемі

Диссертациялық жұмыс 116 бет компьютерлік мәтінде баяндалған және белгілеулер мен қысқартулар тізімін, кіріспені, әдебиеттерге шолуды, «Зерттеу материалдары мен әдістері» бөлімін, «Нәтижелер және оларды талқылау» бөлімін, қорытындыны және пайдаланылған әдебиеттер тізімін (205 атау) қамтиды. Жұмыста 4 кесте, 33 сурет және 1 қосымша берілген.