

**Хума Балучтің**  
**6D070100-«Биотехнология» мамандығы бойынша**  
**фиолософия докторы дәрежесін (PhD) алуы диссертациясына**  
**АНДАТПА**

**«Алматы облысындағы микробалдырлардың биоәртүрлілігін зерттеу және биотехнологиядағы маңызды штамдарды іздеу»**

**Жұмыстың жалпы сипаттамасы:** Берілген докторлық диссертацияның негізгі мақсаты Алматы облысының әр түрлі тұрғы су аймақтарындағы микробалдырлардың алуантүрлілігін бағалау, биоотындық шикізат көзі ретінде, антибактериялық қабілетке ие және биоиндикаторлар ретінде пайдалану үшін жоғары потенциалға ие микробалдырлардың перспективті штамдарын іріктеу, бөліп алу және идентификациялау болып табылады.

**Зерттеу тақырыбының өзектілігі:** Күнделікті өсіп келе жатқан энергия қажеттіліктерін қанағаттандыру үшін дамушы елдердің қазба отындарға және импортталатын отынға айтарлықтай тәуелділігі олардың әлеуметтік-экономикалық дамуына айтарлықтай кедергі болады. Қазбалы отынды жағу бүгінгі таңда атмосфераның ластануының ең үлкен көзі және климаттың өзгеруіне және денсаулық сақтаудың жаһандық проблемаларына жауап беретін негізгі фактор болып табылады. Көміртегі-бейтарап энергия көзін алудың альтернативті әдісі ретінде биоэнергетиканы мойындаудан бастап, қазбалы отыннан ауысу қажеттілігі туралы дамушы елдердің ұлттық приоритетті күн тәртібінде болды. Бұл сонымен қатар биомассаны да, биоотынды да қамтитын биоэнергетика биоотынының дақылдарын өсіру үшін ауылшаруашылық жерлерін пайдалану арқылы жүзеге асырылатындығын мойындауға байланысты дағдарыс ретінде қарастырылады. Зерттеулер азық-түлік қауіпсіздігіне теріс әсер етпей балама, жергілікті немесе жергілікті биомасса және биоотын көздерін зерттеуге және пайдалануға бағытталған. Ресурстарды сақтау мен тұрақты басқарудың қазіргі тенденциясына байланысты биоотын, биоремедиация, өнеркәсіптік және биологиялық ыдырайтын қосымша құнды өнімдер өндірісі үшін микробалдырларды зерттеуге деген қызығушылық тағы да артты.

Антимикробтық тұрақтылық (АМТ) халықтың денсаулығы мен қоршаған орта үшін елеулі, тұрақты және жаһандық қауіп тудырады. Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымының (ДДСҰ) соңғы бағалауы бойынша, бүкіл әлемде жарты миллионнан астам өлім есірткіге төзімді бактериялық инфекциялармен байланысты болған. Белгілі антибактериялық мотивтердің шеңберіне кіретін жаңа және ерекше антибиотикалды қосылыстарды іздеуге белсенді күш салынууда. Ерекше физиологиялық, экологиялық, молекулалық

және реттеуші механизмдерінің арқасында микробалдырларды әртүрлі ортадан табуға болады және олар экстремалды жағдайларда өмір сүруге қабілетті. Осылайша, әртүрлі биологиялық белсенділігі бар, атап айтқанда антибактериялдық қасиетке ие жаңа табиғи өнімдерді, экстремалды жағдайда өсетін микробалдырлардан алуға болады деп күтілуде.

Экологиялық мониторинг жоғарыда аталған адамның араласуы, әсіресе тұрақты ластану немесе металдармен ластануы негізгі түрлер мен экожүйелік функцияларға қалай әсер ететінін түсіну үшін өте маңызды. Биоаккумуляция және ауыр металдармен ластанудың токсинділігімен әсер еткеннен кейінгі тұщы су биотасындағы нақты өзгерістерді түсіну, экожүйенің функционалды жағдайын бағалау үшін өмірлік маңызы бар. Жоғары сезімталдылыққа ие түрлердегі нақты молекулалық, биохимиялық, физиологиялық және мінез-құлық өзгерістерін анықтау деградациялық экожүйенің тұрақтылығын арттыру құралы ретінде қолданыла алады. Соңғы онжылдықтарда экожүйелердің жұмысындағы микробалдырлардың әртүрлілігінің рөлі және олардың су сапасының биоиндикаторларының көзі ретіндегі маңызы туралы көбірек түсінік пайда болды. Алайда, осы уақытқа дейін шектеулі индикаторлар жиынтығымен шектеулі жетістікке қол жеткізілді.

Жоғарыда аталған экологиялық рөлдерді жан-жақты түсіну және іргелі, қолданбалы және өнеркәсіптік зерттеулер саласындағы микробалдырлардың биотехнологиялық потенциалын тереңірек зерттеу түрлердің толық идентификациясын талап етеді. Ерекше немесе экстремалды мекендеу орындарынан микробалдырлардың түрлеріне бірнеше жүйелі зерттеулер жүргізілді, бұл олардың биоалуантүрлілігі, функциялары және биотехнологиялық маңызды биоактивті қосылыстардың көзі ретіндегі потенциалы туралы білімімізді шектейді. Әр түрлі таксономиялық деңгейлерде микробалдырлар түрлерінің әртүрлілігі туралы негізгі ақпараттың болмауы экожүйе мониторингінің, табиғатты қорғау биологиясының және эволюциялық биологияның көптеген аспектілеріне айтарлықтай әсер етеді. Молекулалық биология, биомолекулалық инженерия, информатика және басқа да байланысты ғылымдар саласындағы соңғы жетістіктер ғалымдарға дәрі-дәрмектерді, ауылшаруашылықты, өнеркәсіпті дамытудан бастап биоэнергетика мен тұрақты қоршаған ортаға дейін микробалдырлардың максималды потенциалын пайдалануды едәуір жеңілдетті.

**Зерттеу жұмысының мақсаты:** Алматы облысының тұщы су қоймаларынан биоэнергетикада биотехнологиялық потенциалға ие, антимикробатық белсенділігі және биоиндикациялық қабілеті бар микробалдырлардың жаңа штамдарын іздестіру, бөліп алу, зерттеу және идентификациялау.

### **Қойылған мақсатқа жету үшін зерттеудің негізгі міндеттері:**

1. Алматы облысындағы микробалдырлардың биологиялық алуантүрлілігіндегі өзгерістерді бағалау үшін қажетті бастапқы ақпаратты ұсыну мақсатында осы өңірдегі микробалдырлар түрлерінің алуантүрлілігін зерттеу;
2. Табиғи көздерден микробалдыр штамдарының жаңа таза культураларын бөліп алу;
3. Жарық және сканерлеу микроскопиясы, ITS ампликон және rbcL генінің праймері негізінде бөлініп алынған монокультуралық микробалдыр штамдарына нақты идентификация жүргізу;
4. Биоотын өндіруге жарамды, өнімділігі жоғары, липидтердің мөлшері және май қышқылдарының құрамы жоғары микробалдырлардың штамдарын іріктеу;
5. Бөлініп алынған микробалдыр изоляттарының антимикробтық потенциалын зерттеу және әр түрлі патогенді бактерияларға қарсы метанольді экстарктілердің тежелу аймағын анықтау;
6. *Ankistrodesmus falcatus* ZBD-03 штамының өсуіне, фотосинтетикалық белсенділігіне және клетка ультрақұрылымына кадмийдің төмен концентрациясының әсерін зерттеу.

**Зерттеу объектілері мен материалдары:** *Monoraphidium griffithii* ZBD-01, *Nephrochlamys subsolitaria* ZBD-02, *Ankistrodesmus falcatus* ZBD-03, *Parachlorella kessleri* ZBD-04 және *Desmodesmus pannonicus* ZBD-05, *Monoraphidium sp.* ZBD-06 микробалдырлар изоляттары.

**Зерттеу әдістері:** өсіру әдістері, липидті экстракция, перээтерификация, газ хроматографиясы масс-спектрометрия-май қышқылдарының метил эфирлерін талдау (FAMES), агар дискілерінің диффузиясын талдау, минималды ингибиторлық концентрация (МИК), ДНҚ экстракциясы, полимеразды тізбекті реакция, ДНҚ клондау, Сэнгер секвенирациясы, флуоресцентті талдау.

**Зерттеудің ғылыми жаңалығы:** Зерттеу нәтижесінде микробалдырлардың жаңа 6 изоляты бөлініп алынды және идентификацияланды: *Monoraphidium griffithii* ZBD-01, *Nephrochlamys subsolitaria* ZBD-02, *Ankistrodesmus falcatus* ZBD-03, *Parachlorella kessleri* ZBD-04, *Desmodesmus pannonicus* ZBD-05 и *Monoraphidium sp.* ZBD-06.

Алғаш рет биодизель отынына арналған май қышқылдарының метил эфирлерінің құнды көзі ретінде жасыл микробалдырлардың таңдалған штамдарының потенциалы зерттелді. Биомасса мен липидтердің жоғары өнімділігі бар түрлер ретінде *P. kessleri* және *A. falcatus* штамдары таңдалды, май қышқылының құрамын зерттеу пальмит, стеарин және олеин қышқылдарының басым екендігін көрсетті, олар биодизель отынының басым

компоненттері болып табылады. Қаныққан май қышқылдарының көп мөлшерінің болуы (C16 - C18) және биомассаның жоғары өнімділігі оларды биоэнергетикалық секторда шикізат ретінде пайдалану перспективасын растайды.

Микробалдырлардың бөлініп алынған изоляттарының тазартылмаған сығындысының бактерияға қарсы агент ретінде потенциалдық тиімділігі алғаш рет тестілеуден өткізілді. Олардың кейбір патогендік Грам-оң және Грам-теріс бактериялардың өсуін тежеу қабілеті анықталды. Әдеби дереккөздерде Грам-теріс бактерияларға қарсы жасыл микробалдырлардың антимикробтық белсенділігінің тиімділігі туралы біршама зерттеулер бар.

Ауыр металл иондарымен ластанған су экожүйелерінің экологиялық жағдайын бағалауда тест-объект ретінде пайдалануға болатын, кадмий иондарына жоғары токсинділікпен сипатталатын *Ankistrodesmus* sp. В-11 штамы таңдалынып алынды. Алғаш рет кадмийдің тилакоидтардың мембраналарында электронды тасымалдау жылдамдығын төмендететіні, электрондардың ФЖ II-ден ФЖ I-ге ауысуы кезінде электрондар мен протондардың пластохинон деңгейінде тасымалдануын тежейтіні анықталды. Кадмийдің 0,01 мг/л концентрациясы ең алдымен фотосинтетикалық аппаратқа әсер ете отырып, ультрақұрылымның өзгеруіне әкелетіні анықталды, атап айтқанда, модификацияларstromадағы тилакоидтардың орналасуына қатысты болды: интертилакоидты кеңістіктердің ұлғаюы айқындалып, нәтижесінде фотосинтетикалық белсенділіктің төмендеуі байқалады. Кадмий ионының әсерінен цитоплазмалық мембрананың құрылымдық өзгерісі негізінде клеткалардың вакуолизациясының айтарлықтай өсуі анықталды.

#### **Зерттеудің теориялық және практикалық маңыздылығы:**

Жұмыстың негізгі тұжырымдары мен ережелері осы зерттеу бағытының теориялық негізін кеңейтеді, ауыр металдардың фотосинтетикалық белсенділікке және микробалдырлар жасушаларының ультрақұрылымына әсер ету негіздерімен байланысты білімді тереңдетеді. Сондай-ақ, осы зерттеудің теориялық маңыздылығы, Қазақстан Республикасының су экожүйелері, атап айтқанда Алматы облысының 5 көлінің альгофлорасының түрлік биоалуантүрлілігі туралы қазіргі кездегі тапшы деректерді айтарлықтай толықтыратындығында. Алынған нәтижелер биотехнологияның әртүрлі салаларында, соның ішінде биоэнергияда қолдануға перспективалы микробалдырлардың жаңа штамдарының қасиеттері туралы деректерді кеңейтеді. Микробалдырлардың липид продуцентті штамдарының метаболикалық ерекшеліктерін зерттеу фундаменталды сипаттамаға тән болып табылады, бұл микробалдырлардың жасушаларында липидтердің жинақталу процестерінің жеке ерекшеліктерін анықтайды. Алынған

мәліметтер болашақта генетикалық инженерия әдістерімен микробалдырлардың штамдары арқылы липидтердің жиналуын жақсарту үшін негіз болады. Микробалдырлардың бөлініп алынған изоляттарының бактерияға қарсы әсері және олардың майқышқылдық құрамы бойынша алынған деректер патогенді бактерияларға қатысты микробалдырлардың антагонистік әсер ету механизмдері туралы түсініктерді айтарлықтай кеңейтеді. Бұл зерттеудің практикалық маңыздылығы биотехнологиялық потенциалы жоғары және тиісінше биоэнергетикада, фармацевтикада және медицинада шикізат ретінде пайдаланылуы мүмкін микробалдырлардың таза культураларын алу болып табылады. Одан басқа, кадмийдің әсерінен кейін микробалдыр клеткаларының алғашқы жылдам тіркелген параметрлерінің бірі бола отырып, жылдам және баяуланған флуоресценцияның индукциялық қисықтарының өзгеруінің анықталуы, зерттелетін объектілердің жағдайының диагностикасында пайдаланылуы мүмкін. Хлорофиллдің флуоресценциясының бұл параметрлерін нақты және жасанды су қоймаларындағы судың сапасын биотестілеуде қолдануға болады.

#### **Қорғауға шығарылған негізгі қағидалар:**

- ITS аймағы және *rbcL* гені бойынша бөлініп алынған микробалдырлардың 6 изоляты *Monoraphidium griffithii* ZBD-01 (қосылу нөмірі MW258948), *Nephrochlamys subsolitaria* ZBD-02 (MZ079019), *Ankistrodesmus falcatus* ZBD-03 (қосылу нөмірі MZ079017), *Parachlorella kessleri* ZBD-04 (қосылу нөмірі MZ079022), and *Desmodesmus pannonicus* ZBD-05 (қосылу нөмірі MZ079014), and *Monoraphidium* sp. ZBD-06 (қосылу нөмірі MT178772) деп идентификацияланды.

- *Parachlorella kessleri* ZBD-04 және *Ankistrodesmus falcatus* ZBD-03 штамдары биодизельді алу үшін шикізат көзі ретінде жоғары потенциалға ие (цетан саны 50 және 48, йод саны 103,6 және 83,4), EN14214 биодизель стандарттарына сәйкес талап етілетін шектен (CN >47,0) асады.

- *Parachlorella kessleri* биомассасының *Bacillus subtilis* (максималды ингибирлеу аймағы 0,8 мм), *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Nephrochlamys subsolitaria*-ға қарсы және *Ankistrodesmus falcatus*-тің *Klebsiella pneumoniae* және *E. Coli* қатысты метанольді экстрактісінің маңызды антибактериялдық белсенділігі бар.

- Бөлініп алынған *Ankistrodesmus* sp. штамы 0,005-0,02 мг/л кадмийдің төмен концентрациясына жоғары сезімтал.

#### **Зерттеудің негізгі қорытындылары:**

Осы зерттеудің нәтижелері Алматы облысының тұщы су қоймаларынан өнеркәсіптік маңызды микробалдырларды іздеу мүмкіндіктерін кеңейтті, бөлініп алынған жаңа штамдар биоактивті қосылыстар алу үшін құнды шикізат бола алады. Бөлінген штамдар фототрофты микроорганизмдер

биотехнологиясы зертханасының коллекциясында сақталған. Зерттеу нәтижелері таңдалған штамдардың егжей-тегжейлі морфологиялық сипаттамалары мен биохимиялық табиғаты туралы түсінік берді, бұл болашақта микробалдырлардың жаңа штамдарын анықтауда және сипаттауда пайдалы болуы мүмкін.

ITS аймағы мен *rbcL* гені алты түрде зерттелген, оның ішінде: *Monoraphidium griffithii* ZBD-01, *Nephrochlamys subsolitaria* ZBD-02, *Ankistrodesmus falcatus* ZBD-03, *Parachlorella kessleri* ZBD-04, және *Desmodesmus pannonicus* ZBD-05, *Monoraphidium* sp. ZBD-06, ол Genbank-тің деректер базасында дәйектілік туралы қосымша мәліметтерді сәтті ұсынды және олардың таксономиялық мәртебесін талқылауды жақсартты.

Төрт изоляттың май қышқылдарының құрамы зерттелді, ал негізгі май қышқылдары пальмит қышқылы, олеин қышқылы және стеарин қышқылы болды, олар жалпы май қышқылдарының 10-45%, 5-34% және 5-30% құрайды. Бұл май қышқылдары *Parachlorella kessleri* ZBD-04 және *Ankistrodesmus falcatus* ZBD-03 штамдарындағы май қышқылдарының жалпы санының 30-70% - ын құрады, цетан саны 47-ден асады, бұл идеалды компонент және биодизель отыны үшін оңтайлы сан, сондықтан бұл зерттеу зерттелген изоляттар микробалдырларға негізделген болашақ биоотын зерттеулері үшін құнды ресурстар болып табылады.

Осы зерттеу Грамм-оң және Грамм-теріс бактерияларға қатысты төрт штамның метанол сығындыларының перспективті антимикробтық белсенділігін көрсетті. Алдын ала (агар дискідегі диффузия) және қайталама (ең төменгі ингибиторлық концентрация) антимикробтық талдаулар *Parachlorella kessleri*-дің *Bacillus subtilis* (ең жоғарғы ингибирлеу аймағы 0,8 мм), *Staphylococcus aureus* және *Klebsiella pneumoniae* қарсы, *Nephrochlamys subsolitaria*-ның *Bacillus subtilis* (ең жоғарғы ингибирлеу аймағы 0,6мм), *Pseudomonas aeruginosa* және *E. Coli* қарсы, *Monoraphidium griffithii*-дің *Klebsiella pneumoniae* және *E. Coli* және *Ankistrodesmus falcatus*-тің *Klebsiella pneumoniae* және *E. Coli*-ге қарсы екендігін көрсетті.

Кадмий иондарының төмен концентрациясының *Ankistrodesmus* sp. B11 микробалдыры жасушаларының өсуіне, фотосинтез белсенділігіне және ультрақұрылымына әсерін зерттеу, штамның қоректік ортадағы 0,005-0,02 мг/л кадмий концентрациясына жоғары сезімталдығын анықтады.

**Зерттеулерді ұйымдастыру деңгейлері:** Осы диссертацияда сипатталған зерттеу генетикалық, биомолекулалық, жасушалық және организм деңгейінде жүргізілді.

**Жұмыстың мемлекеттік бағдарламалар жоспарымен байланыстылығы:** Диссертациялық зерттеу жұмысы үш жоба шеңберінде орындалды, оның ішінде: AP08052402 «Азотфиксациялаушы

цианобактериялар негізінде биотыңайтқыштар алу технологиясын өңдеу»; АР08052481 «Микробалдырлардың белсенді штамдары негізінде биодизель отынын алу технологиясын әзірлеу»; АР05131743 «Фототрофты микроорганизмдерді пайдалана отырып, биомониторинг технологиясының ғылыми-әдістемелік негізін өңдеу және ластанған су экожүйесінің жағдайын болжау».

**Диссертацияда сипатталған нәтижелерге автордың қосқан үлесі:** Мұнда сипатталған барлық негізгі нәтижелер автормен орындалды және жинақталды. Сонымен қатар, зерттеудің негізгі нәтижелері, талдаулар, деректер мен сандар автормен жасалынды және барлық жаңа бақылаулар мен тұжырымдар PhD жұмысы мен зерттеулерінен алынған нәтижелер негізінде жасалады.

**Зерттеулерді апробациялау:** Негізгі нәтижелер мен бақылаулар халықаралық конференциялар мен симпозиумдарда ұсынылды және талқыланды:

- VI Халықаралық Фараби оқулары, Алматы, Қазақстан, 2019 жылғы 2-12 сәуір, Алматы студенттері мен жас ғалымдарының Халықаралық ғылыми конференциясы аясында, Қазақстан, 2019 жыл, 9-10 сәуір, ауызша презентация.

- Еуропалық биотехнологиялық конгресс – 2020, 24-26 қыркүйек, 2020, Прага.

- «Экологиялық биотехнология мен биоэнергетика аспектілері мен инновациялары» атты Халықаралық ғылыми-практикалық конференция, әл-Фараби, Алматы, Қазақстан, 12-13 ақпан, 2021 жыл.

- Еуразия биоалуантүрлілігі бойынша 5-ші симпозиум (SEAB-2021) – онлайн - әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті (Қазақстан) және Мугла Сытқи Кочман университетімен (Түркия) бірлесіп, 01-03 шілде 2021 жыл.

**Жарияланымдар:** Бұл диссертацияның көп бөлігі 6 ғылыми жұмыста жарияланды, оның ішінде Web of Science (WoS) және Scopus индекстелетін импакт-факторы бар 1 ғылыми мақала, Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігінің Білім және ғылым комитеті (ҚР БҒМ) ұсынған ғылыми журналдарда 4 мақала, халықаралық конференциялар материалдарында 4 тезис жарияланған. Екі мақала беделді халықаралық рецензияланатын ғылыми журналдарда жариялану үстінде.

**Диссертация құрылымы:** Диссертациялық жұмыс 104 компьютерлік мәтіннен және белгілер мен қысқартылған сөздерден, кіріспе, әдебиетке шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, зерттеу нәтижелері және оларды талқылау, қорытынды және 287 пайдаланылған әдебиеттерден тұрады. Жұмыстың көлеміне 11 кесте және 18 сурет кіреді.