

АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание ученой степени доктора философии (PhD) по специальности 8D05105 – «Биотехнология»

Какимова Ардак Болатовна

Скрининг штаммов цианобактерий - продуцентов водорода и оптимизация условий их культивирования

Общая характеристика работы. Работа посвящена выделению и изучению активных штаммов цианобактерий, перспективных в биоэнергетике, из различных водных экосистем.

Актуальность темы исследования

В настоящее время нехватка ископаемого топлива и последствия изменения климата подталкивают человечество к поиску альтернативных источников энергии. Благодаря своим многочисленным преимуществам биотопливо становится основным источником энергии, способным заменить традиционное топливо. Расширяя переработку биологического сырья в биотопливо, человечество может снизить экологическую нагрузку на природу, уменьшить загрязнение территориальных и водных объектов, в том числе выбросы углекислого газа в атмосферу. Наиболее перспективным кандидатом для получения экологически чистого и возобновляемого источника энергии в будущем является водород. Этот факт усилил интерес изучения водорода в качестве биотоплива у ученых всего мира. Водород может стать самым важным источником энергии в ближайшем будущем и способствовать решению проблемы загрязнения воздуха, которая является мировой проблемой.

Одно из современных направлений биоэнергетики - поиск объектов, способных производить водород, при этом не загрязняющих окружающую среду, а также разработка технологий, обеспечивающих высокий выход водорода. Фотосинтезирующие микроорганизмы, в том числе цианобактерии с высоким метаболизмом, представляют особый интерес в использовании биологических методов получения водорода. Использование цианобактерий в качестве потенциальных производителей водорода важно и эффективно, поскольку они являются единственными бактериями, которые могут осуществлять кислородный фотосинтез, используя солнечную энергию и преобразовывать продукты фотосинтеза в химическую энергию, а именно углеводы.

Однако, не все штаммы цианобактерий одинаково эффективны в производстве водорода. Значительное влияние на их продуктивность оказывают условия культивирования. Следовательно, необходимо идентифицировать и отбирать потенциальные штаммы цианобактерий, которые являются эффективными производителями водорода, а также оптимизировать условия их выращивания.

Данное исследование направлено на расширение арсенала штаммов микроорганизмов, обладающих высоким потенциалом в биоэнергетике. Переход на различные возобновляемые экологически чистые источники энергии на основе микроорганизмов может помочь снижению негативных последствий изменения климата и способствовать переходу к устойчивой энергетической

системе. Тема исследования актуальна, так как решает важную научную и социальную проблему и способствует получению новых фундаментальных знаний, с последующим практически применением.

Цель исследования: Поиск, выделение, идентификация и изучение новых штаммов цианобактерий, полученных из различных экологических систем, оптимизация условий их культивирования и разработка лабораторного регламента получения на их основе биоводорода.

Задачи исследования:

1. Выделить и идентифицировать аксенические культуры цианобактерий из различных экосистем;
2. Определить нитрогеназную активность новых и коллекционных штаммов цианобактерий;
3. Определить потенциал новых выделенных и коллекционных штаммов цианобактерий в производстве биоводорода;
4. Оптимизировать условия культивирования активных штаммов цианобактерий для увеличения выхода водорода;
5. Разработать лабораторный регламент получения биоводорода на основе активных штаммов цианобактерий.

Объекты исследования – Объектами исследования явились коллекционный штамм *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 (CCMKazNU) и культуры цианобактерий *Anabaena variabilis* A-1, *Anabaena variabilis* A-2, *Synechocystis* sp S-1, *Oscillatoria* sp O-1, *Phormidium tenue* P-1, *Nostoc commune* N-1, *Nostoc calcicola* N-2, *Oscillatoria* sp O-2 выделенные из экосистем Кызылординской, Туркестанской и Алматинской областей Республики Казахстан.

Методы исследования

В работе использовались микробиологические, альгологические, биотехнологические, молекулярно-генетические, физические, химические и статистические методы исследования.

Научная новизна исследования

Впервые изучен альгологический состав озера Кызылколь, рек Арыс и Ок Туркестанской области Республики Казахстан.

Впервые из различных экосистем Кызылординской, Туркестанской, Алматинской областей получены и идентифицированы 8 аксенических штаммов цианобактерий и изучены их морфолого-культуральные свойства.

Была продемонстрирована высокая активность фермента нитрогеназы в гетероцистном штамме цианобактерии *Anabaena variabilis* A-1.

Впервые в темноте была зафиксирована высокая способность гетероцистного штамма *Anabaena variabilis* A-1 выделять водород, который, в свою очередь, был самым высоким по сравнению с другими штаммами цианобактерий.

Впервые было показано, что добавление 25 ммоль HEPES и 50 ммоль бикарбоната натрия в среду увеличивает высвобождение биоводорода (H₂) в гетероцистном штамме *Anabaena variabilis* A-1. Кроме того, обнаружено, что при выделении водорода оптимальным pH для этого штамма является нейтральная (pH 7).

Водородное фотопроизводство гетероцистного штамма цианобактерии *Anabaena variabilis* A-1 несколько увеличилось при использовании комбинации дефицита N и S. В питательной среде BG₀-11-S максимальная

производительность водорода и средний уровень производства водорода составляли 9,82 мкмоль H₂/мг хл/ч. При оптимизации выхода водорода наиболее подходящей по сравнению с другими модифицированными средами была выбрана среда BG₀-11-S.

Разработан лабораторный регламент получения водорода на основе отобранного гетероцистного штамма цианобактерии *Anabaena variabilis* A-1.

Научная и практическая значимость работы

Дана оценка активности нитрогеназных и гидрогеназных ферментов нескольких штаммов цианобактерий, выделенных из различных экосистем и отобранных из коллекции «ССМКазНУ» лаборатории фотобиотехнологий, определена их способность производить биоводород.

Получен гетероцистный штамм цианобактерии *Anabaena variabilis* A-1 - продуцент биоводорода, биомасса которого может быть использована в биоэнергетике.

Выделенные штаммы цианобактерий *Anabaena variabilis* A-2, *Oscillatoria* sp. O-1, *Synechocystis* sp. S-1 и *Phormidium tenue* P-1 введены в коллекцию фототрофных микроорганизмов для дальнейшего использования в биотехнологии.

Гетероцистный штамм цианобактерии *Anabaena variabilis* A-1 депонирован в РГКП «Республиканская коллекция микроорганизмов» (г. Астана) под номером РКМ0960 от 20.10.2021г.

Получен патент на полезную модель №8167 от 28.02.2023 «Гетероцистный штамм цианобактерии *Anabaena variabilis* A-1 в качестве сырья для получения биотоплива» с целью расширения арсенала штаммов микроорганизмов, используемых в качестве сырья для производства биотоплива.

Основные положения, выносимые на защиту:

Выделенные из различных экосистем Кызылординской, Туркестанской, Алматинской областей 5 аксенических цианобактерий идентифицированы как *Anabaena variabilis* A-1, *Anabaena variabilis* A-2, *Oscillatoria* sp. O-1, *Synechocystis* sp. S-1 и *Phormidium tenue* P-1.

Гетероцистный штамм цианобактерии *Anabaena variabilis* A-1 обладает высоким уровнем производства этилена, который составлял 15,2 мкмоль этилена/мг сухого веса/ч, что в свою очередь показал высокую активности фермента нитрогеназы в этой культуре.

Гетероцистный штамм цианобактерии *Anabaena variabilis* A-1 способен выделять в темноте в 3,7 раза больше водорода, чем на свету и в 43 раза больше водорода чем штамм *Phormidium tenue* P-1.

Штамм цианобактерии *Synechocystis* sp S-1 является самым активным производителем водорода на свету.

Добавление 50 ммоль NaHCO₃ + 25 ммоль HEPES в нейтральную среду (рН 7) приводит к увеличению выделения водорода штаммом *Anabaena variabilis* A-1.

Использование комбинации дефицита N и S увеличивает производство водорода клетками гетероцистного штамм цианобактерии *Anabaena variabilis* A-1. Производительность водорода в среде BG₀-11-S в 3 раза выше, чем в среде BG-11-S.

Основные результаты исследований и выводы:

1. Изучен состав альгофлоры водных источников Туркестанской и Алматинской областей, выявлено 15 видов цианобактерий из горячих источников Уйгурского района, 31 вид цианобактерий из озера Кызыкол и рек Ок и Арыс, 19 видов цианобактерий из рисовых полей Алматинской и Кызылординской областей.

2. 8 аксенических культур цианобактерий были выделены из 17 изолятов накопленных культур и идентифицированы по культурально-морфологическим и физиологическим признакам как *Nostoc* N-1, *Oscillatoria* O-2, *Synechococcus* S-1, *Phormidium* P-1, *Nostoc* N-2, *Anabaena* A-1, *Oscillatoria* O-1 и *Anabaena* A-2. С помощью молекулярно-генетического анализа генов 16S рРНК штаммы новых выделенных цианобактерий были идентифицированы и затем обозначены следующим образом: *Anabaena variabilis* A-2, *Anabaena variabilis* A-1, *Oscillatoria* sp. O-1, *Synechococcus* sp. S-1 и *Phormidium tenue* P-1.

3. Гетероцистный штамм *Anabaena variabilis* A-1 обладает высоким уровнем производства этилена, который составлял 15,2 мкмоль этилена/мг сухого веса/ч, что, в свою очередь, является показателем высокой активности фермента нитрогеназы в этой культуре.

4. Во время скрининга было обнаружено, что продуктивность выбранного гетероцистного штамма цианобактерии *Anabaena variabilis* A-1 в темноте равна 8,67 мкмоль H_2 /мг хл/ч, что, как было показано, в 17,2 раза выше, чем способность этого штамма выделять водород в условиях освещения. Установлено, что из выделенных новых штаммов цианобактерий, штамм *Anabaena variabilis* A-1 активно выделяет водород и может быть использован в качестве источника получения биотоплива, применяемых в биоэнергетике. Штамм *Anabaena variabilis* A-1 депонирован в РГКП «Республиканская коллекция микроорганизмов» (г. Астана) под номером РКМ0960 от 20.10.2021г.

5. Было обнаружено, что штамм *Synechococcus* S-1 является наиболее активным производителем водорода на свету, который составляет 2,35 мкмоль H_2 /мг хл а/ч, что в 3 раза ниже, чем результат *Anabaena variabilis* A-1 в темноте.

6. Фотопроизводство водорода гетероцистным штаммом цианобактерии *Anabaena variabilis* A-1 несколько увеличилось при использовании комбинации дефицита N и S. Было обнаружено, что максимальная производительность водорода и средний уровень производства водорода в питательной среде BG₀-11-S являются наиболее подходящей оптимизацией по сравнению с другими модифицированными средами. Производительность водорода была в 3 раза выше, чем в среде BG-11-S.

7. Разработан лабораторный регламент получения биоводорода на основе отобранного штамма цианобактерии. На основе полученных результатов получен патент на полезную модель №8167 от 28.02.2023 «Гетероцистный штамм цианобактерии *Anabaena variabilis* A-1 в качестве сырья для получения биотоплива» с целью расширения арсенала штаммов микроорганизмов, используемых в качестве сырья для производства биотоплива.

Личный вклад автора

Анализ литературных данных, посвященных исследуемой проблеме, постановка цели и задач исследования, проведение экспериментальных исследований, анализ полученных результатов и статистическая обработка, изложение диссертационной работы выполнены автором самостоятельно.

Связь работы с планом государственных программ

Диссертационная работа выполнена в рамках проектов AP08052481 "Разработка технологии производства биодизеля на основе активных штаммов микроводорослей" (2020-2022 гг.) и AP09260785 "Разработка технологии получения биоводорода на основе перспективных штаммов цианобактерий для производства биотоплива" (2021-2023 гг.).

Апробация научной работы:

Результаты исследования и основные положения диссертационной работы были изложены и обсуждены на следующих международных научных конференциях и симпозиумах:

1. Международная научная конференция студентов и молодых ученых «Мир Фараби», 6-9 апреля 2020 года, Алматы, Казахстан;
2. 11-й Европейский семинар по биологии цианобактерий (11th European Workshop on the Biology of Cyanobacteria) 7-9 сентября 2020 г., Порту, Португалия;
3. Международная научно-практическая конференция "Aspects and innovations of environmental biotechnology and bioenergy", 12-13 февраля 2021 года, Алматы, Казахстан;
4. " 5-й симпозиум по биоразнообразию Евразии (Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB-2021)) " 1-3 июля 2021 года, Алматы, Казахстан, Мугла, Турция;
5. 11-я Международная конференция "Исследования фотосинтеза и водородной энергетики для устойчивого развития " (ICPRS 2023), 3-9 июля 2023 г., Стамбул, Турция.

Публикации.

Основные результаты диссертации изложены в 13 опубликованных работах: из них 4 статьи в республиканских научных журналах из списка Комитета по контролю в сфере образования и науки РК, 2 научные статьи в 1-м квартале и 6 тезисов на международных конференциях. На основе полученных результатов получен патент на полезную модель №8167 от 28.02.2023 «Гетероцистный штамм цианобактерии *Anabaena variabilis* A-1 в качестве сырья для получения биотоплива» с целью расширения арсенала штаммов микроорганизмов, используемых в качестве сырья для производства биотоплива.

Структура диссертации.

Диссертационная работа состоит из 117 страниц компьютерного текста, знаков и аббревиатур, введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения и 241 источников использованной литературы. Работа включает 5 таблиц, 43 рисунков и 1 приложения.

Диссертация посвящена выделению из различных экосистем активных штаммов цианобактерий для применения в биоэнергетике. Для этого проведены работы по выделению активных штаммов цианобактерий, изучению их физиолого-биохимических свойств и их идентификации.

Из различных водных экосистем выделены бактериологически чистые культуры цианобактерий *Anabaena variabilis* A-1, *Anabaena variabilis* A-2, *Synechocystis sp* S-1, *Oscillatoria sp* O-1, *Phormidium tenue* P-1, *Nostoc commune* N-1, *Nostoc calcicola* N-2, *Oscillatoria sp* O-2.

Отобран гетероцистный штамм цианобактерии *Anabaena variabilis* A-1, как активный продуцент водорода, который может быть использован в качестве сырья для получения биотоплива, применяемых в биоэнергетике и проведена оптимизация для увеличения выхода водорода.