Аннотация

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

Қамшыбаева Гүлжанай Қолғанатқызы

«Выделение водород-продуцирующих цианобактерий из различных экосистем и повышение их продуктивности с помощью метаболических подходов»

Общая характеристика работы

Диссертационная работа посвящена выделению аксеничных культур цианобактерий и комплексному исследованию их водород-продуцирующей способности для отбора перспективных штаммов, ориентированных на применение в фотобиоэнергетических технологиях получения водорода. В рамках работы проведен сбор образцов из различных почвенных и водных ресурсов Южного Казахстана в весенний, летний и осенний периоды 2020 г., выделены и идентифицированы 6 штаммов цианобактерий. Изучены ключевые факторы, определяющие эффективность фотобиологического выделения водорода, включая режимы культивирования, условия газообмена и освещения. Исследовано действие ингибиторов фотосинтетического электронного транспорта (CCCP, DBMIB, DCMU, KCN) и определены их оптимальные концентрации, при которых достигается увеличение продукций водорода у цианобактерий. Установлено, что наибольшей эффективностью обладает KCN (500 мкМ) и DCMU (20 мкМ). Полученные новые результаты являются основой для разработки технологических рекомендаций по получению водорода и дальнейшего масштабирования процессов культивирования фототрофных микроорганизмов.

Актуальность исследования

Водород рассматривается как один из ключевых факторов будущих энергоресурсов, поскольку при его использовании отсутствуют прямые выбросы CO_2, а сам он может служить универсальным энергоносителем для электроэнергетики, транспорта и хранения энергии. В условиях глобальной декарбонизации и роста доли возобновляемых источников энергии возрастает потребность в технологиях получения «низкоуглеродного» водорода, которые не требуют ископаемого энегоносителя (природный газ, нефть, уголь) и минимизируют экологический ущерб.

Цианобактерии потенциально способны продуцировать водород при участии нитрогеназы и гидрогеназ, используя световую энергию, что делает их привлекательными объектами для биоэнергетических решений. При этом практическое развитие технологий биоводорода сдерживается тем, что природные штаммы нередко характеризуются ограниченной продуктивностью, а также чувствительностью процесса к условиям культивирования и присутствию кислорода. Поэтому актуальными остаются поиск и отбор штаммов

цианобактерий, обладающих высокой водородопродукцией, оптимизация параметров выращивания и запуска водородной продукции, изучение регуляторных и ферментативных механизмов образования и выделения водорода, а также разработка подходов повышения выхода водорода.

Цель работы

Поиск и идентификация перспективных штаммов цианобактерий из водных и почвенных источников, комплексное изучение и разработка подходов к повышению их активности.

Задачи исследования

1. Выделить аксеничные культуры цианобактерий из почвенных и водных ресурсов Туркестанской, Кызылординской и Алматинской областей, выполнить их молекулярно-генетическую идентификацию и филогенетический анализ по маркерным последовательностям (16S рРНК).
2. Определить базовый уровень выделения водорода и активность ключевых ферментов водородного метаболизма (гидрогеназы и нитрогеназы) у выделенных штаммов цианобактерий, а также установить взаимосвязь этих показателей с их способностью к продуцированию водорода.
3. Оценить влияние основных физико-химических факторов (температура, освещённость, содержание азота, буферные системы, pH) на выделение водорода активным штаммом цианобактерии *Synechocystis* sp. PSU 1262.
4. Оценить влияние различных концентраций ингибиторов фотосинтетического электронного транспорта (CCCP, DBMIB, DCMU, KCN) на выделение водорода и определить оптимальные режимы их применения
5. Изучить влияние иммобилизации клеток *Synechocystis* sp. PSU 1262 в кальций-альгинатном геле на показатели выделения водорода.
6. Сформулировать технологические рекомендации по повышению выхода H_2 у цианобактерий на основе оптимизации условий культивирования, подбора режимов освещения, а также применения ингибиторов фотосинтеза.

Место исследований в выполнении диссертации

Диссертационная работа выполнена на базе Казахского национального университета имени аль-Фараби. Часть исследований проводились на базе ведущих научно-исследовательских организаций соответствующего профиля: Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (Россия) и Тяньцзиньский институт промышленной биотехнологии (TIB, CAS, Китай).

Объекты исследования

Объектами исследования являлись природные и коллекционные штаммы фототрофных микроорганизмов. В качестве основных объектов использованы: *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.

Методы исследования

В работе применён комплекс микробиологических, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических методов. Отбор альгологических проб выполняли в весенний, летний и осенний периоды 2020 г. из почвенных и водных источников РК. Выделение и получение аксеничных культур осуществляли путём первичного культивирования проб на жидких средах (BG-11/BG0-11), с последующим многократным пересевом на агаризованные среды. Идентификацию штаммов выполняли по морфологическим признакам и по 16S рРНК: выделение ДНК (фенол-хлороформный метод), ПЦР-амплификация, проверка продуктов электрофорезом, Sanger-секвенирование; филогенетический анализ проводили в MEGA X с подбором ближайших последовательностей через BLAST и бутстрэп-оценкой. Продукцию H_2 определяли в герметичных виалах после анаэробизации клеточных суспензий аргоном с последующим измерением H_2 в газовой фазе методом газовой хроматографии. Для интенсификации путей образования водорода применяли ингибиторы фотосинтетического электронного транспорта (CCCP, DBMIB, DCMU, KCN) в разных концентрациях. Активность двунаправленной [NiFe]-гидрогеназы оценивали по скорости накопления H_2 (с использованием метилвиологена, восстановленного дитионитом), нитрогеназную активность — ацетилен-редуктазным тестом ($C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$) с последующим GC-контролем.

Научная новизна исследовательской работы

1. Впервые выделены 6 аксенических штаммов цианобактерий, принадлежащих к трём таксономическим порядкам — *Oscillatoriales, Chroococcales* и *Synechococcales*. Полученные штаммы расширяют современные представления о таксономическом разнообразии цианобактерий исследованных экосистем и служат основой для дальнейшего изучения их физиологических свойств и биотехнологического потенциала.
2. Впервые выполнена комплексная идентификация выделенных штаммов на основе морфологических признаков и молекулярно-генетического анализа (16S рРНК); филогенетический анализ подтвердил таксономическую принадлежность изолятов к *Desertifilum* sp. PSU 1129, *Synechocystis* sp. PSU 1262, *Phormidium* sp. PSU 1120, *Chroococcus* sp. PSU 1008, *Synechococcus* sp. SU 78 и *Oscillatoria* sp. S-001, последовательности которых депонированы в базе данных NCBI GenBank под регистрационными номерами: *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. Впервые экспериментально показана возможность целенаправленного повышения продукции H_2 за счёт применения ингибиторов фотосинтетического электронного транспорта; определены наиболее эффективные ингибиторы и оптимальные их концентрации: для DCMU - 20 мкМ (до 710 нмоль H_2/мг хл а/ч), для KCN – 500 мкМ (до 860 нмоль H_2/мг хл а/ч).

Научная и практическая значимость

Научная значимость работы состоит в расширении данных о таксономическом разнообразии и потенциале цианобактерий Казахстана, а также в уточнении факторов, регулирующих фотобиологическое выделение водорода.

Практическая значимость заключается в получении перспективного штамма-продуцента H_2 и апробации условий, обеспечивающих повышение водородпродукции, посредством оптимизации режимов культивирования и применения ингибиторов фотосинтеза, а также в подготовке технологических рекомендаций, которые могут быть использованы при дальнейшем масштабировании процессов и проектировании фотобиореакторных систем.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Выделены и идентифицированы 6 аксеничных штаммов цианобактерий. Таксономическая принадлежность и филогенетическое положение выделенных цианобактерий подтверждены молекулярной идентификацией по гену 16S рРНК и филогенетическим анализом; нуклеотидные последовательности депонированы в базе данных NCBI GenBank: *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. По результатам сравнительного скрининга выделенных цианобактерий штамм *Synechocystis* sp. PSU 1262 отобран как наиболее перспективный продуцент, сочетающий высокий уровень выделения водорода и устойчивый рост в условиях культивирования.

3. Водородпродуцирующая способность цианобактерий может быть целенаправленно повышена за счёт оптимизации условий культивирования и ингибирования фотосинтетического электронного транспорта. Для штамма *Synechocystis* sp. PSU 1262 базовый уровень выделения водорода составляет 80-97 нмоль H_2/мг хл *a*/ч. Ингибирование электронного транспорта обеспечивает многократное увеличение данного показателя: при добавлении DCMU (20 мкМ) – до 710 нмоль H_2/мг хл *a*/ч; KCN (500 мкМ) – до 860 нмоль H_2/мг хл *a*/ч.

4. Иммобилизация клеток в Са-альгинатном матриксе позволяет поддерживать водородопродукцию в условиях тёмного анаэробиоза до 168 ч при сохранении фотосинтетической активности, что увеличивает продолжительность процесса на 72 ч по сравнению с клеточной суспензией.

Основные результаты исследования и выводы:

Полученные в работе результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. По результатам многоэтапного выделения и очистки получены 6 аксеничных изолятов цианобактерий. Проведена их молекулярно-генетическая идентификация и филогенетический анализ по маркерным последовательностям (16S рРНК), по итогам которых подтверждена таксономическая принадлежность выделенных изолятов: *Desertifilum* sp. PSU 1129 (идентичность 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 (около 91% с ближайшими штаммами).

2. Определены базовые показатели выделения водорода и активность ключевых ферментов водородного метаболизма у выделенных штаммов. У негетероцистных изолятов нитрогеназная активность не выявлена, что указывает на преимущественную роль гидрогеназных систем в их водородпродукции. Максимальная продукция H_2 зарегистрирована у *Synechocystis* sp. PSU 1262 (до 49,6 нмоль H_2/мг хл *a*/ч) и *Synechococcus* sp. SU 78 (до 48,3 нмоль H_2/мг хл *a*/ч).

3. Для активного штамма *Synechocystis* sp. PSU 1262 установлены оптимумы физико-химических факторов водородпродукции: pH 8 (до 79,2 нмоль H_2/мг хл *a*/ч); среди буферов при pH 8 наиболее эффективен HEPES (до 81,9 нмоль H_2/мг хл *a*/ч, выше TES и TRIS). Температурный оптимум H_2-продукции составляет 27–30 °C (максимум около 27,5 °C – 81,3 нмоль H_2/мг хл *a*/ч). Добавление $NaNO_3$ оказывает выраженное ингибирующее действие (снижение с 75 до 3 нмоль H_2/мг хл *a*/ч при росте концентрации). Оптимальная освещённость для H_2-продукции – 120 мкмоль фотонов/м²/с (до 96,6 нмоль H_2/мг хл *a*/ч); более высокие уровни вызывают фотоингибицию и повреждение клеток.

4. Показано, что ингибирование фотосинтетического электронного транспорта при концентрационной оптимизации существенно усиливает H_2-продукцию *Synechocystis* sp. PSU 1262. Наиболее эффективны DCMU 20 мкМ (до 710 нмоль H_2/мг хл *a*/ч) и KCN 500 мкМ (до 860 нмоль H_2/мг хл *a*/ч); для сравнения: CCCP 1 мкМ – 158,3, DBMIB 20 мкМ – 96,8 нмоль H_2/мг хл *a*/ч. Повышение доз сопровождается токсичностью и угнетением электронного транспорта; при этом KCN 500 мкМ обеспечивает максимальное стимулирование при минимальном влиянии на рост ($ОП_{730}$ 0,45 против 0,52 в контроле). Эффект зависит от светотемнового режима: при KCN 500 мкМ и 12 ч свет / 6 ч темнота достигается 1552,2 нмоль H_2/мг хл *a*/ч, при DCMU 20 мкМ и 12/12 – до 1394 нмоль H_2/мг хл *a*/ч.

5. Обоснована иммобилизация *Synechocystis* sp. PSU 1262 в кальций-альгинатном геле как технологический приём, обеспечивающий сохранение физиологической активности клеток и пролонгированную водородпродукцию. Иммобилизованные клетки сохраняют фотосинтетическую активность (скорость накопления O_2 ~0,012 мкмоль·мл$^{-1}$·мин$^{-1}$) и обеспечивают пролонгированное накопление H_2 в условиях тёмного анаэробиоза — до 48,1 нмоль H_2/мг хл. а/ч к 168 ч, с максимумом в начальной фазе (до 19,3 нмоль H_2/мг хл. а/ч за первые 9 ч) и выходом на плато после 96 ч.

6. Сформулированы технологические рекомендации и описан оптимизированный лабораторный регламент повышения выхода H_2 у цианобактерий, включающий: стандартизованную подготовку биомассы и создание анаэробиоза; подбор буферной системы и pH (оптимум pH 8, предпочтительно HEPES); оптимизацию температуры (27-30 °C) и освещённости (-120 мкмоль фотонов/м²/с); исключение нитратного азота (ингибирующий

фактор); применение наиболее эффективных ингибиторов (KCN 500 мкМ, DCMU 20 мкМ) с учётом светотемновых режимов; при необходимости – иммобилизацию в кальций-альгинатной матрице для стабилизации и пролонгирования процесса.

Личный вклад автора

Автором выполнены анализ научной литературы по теме исследования, планирование экспериментов, сбор природного материала, выделение и поддержание чистых культур цианобактерий, проведение морфологических и молекулярных исследований, постановка экспериментов по выделению водорода клетками цианобактерий (включая тестирование ингибиторов фотосинтеза), обработка и интерпретация результатов, подготовка публикаций и написание диссертационной работы.

Связь с государственными программами и проектами

Диссертационная работа выполнена в рамках проектов: «AP13067574 Повышение активности продуцирования водорода штаммами цианобактерий методами генной инженерии» и «AP14869048 Конструирование hup-мутантов цианобактерий и разработка технологии культивирования для повышения эффективности получения водорода».

Апробация результатов

Основные результаты и положения диссертационной работы были представлены и обсуждены на следующих научных мероприятиях:

1. 11th International Conference on Photosynthesis and Hydrogen Energy: Research for Sustainability – 3-9 Июня 2023, Bahcesehir University Future Campus, Istanbul, Turkey (P. 65).
2. 12th International Conference on Photosynthesis and Hydrogen Energy: Research for Sustainability – 13-19 Июля 2024, Bahcesehir University South Campus, Istanbul, Turkey (P. 36).
3. International Scientific Forum “Modern Trends in Sustainable Development of Biological Sciences” (IFBioScFU 2024) – 27-28 Март 2024, Almaty, Kazakhstan.

Публикации

Основные результаты диссертации отражены в 11 опубликованных работах, включая 1 статью в республиканском научном журнале из перечня уполномоченного органа РК, 6 статей в журналах первого квартиля (Q1), а также 3 тезиса в материалах международных конференций. По результатам исследования получены патенты: «Фотобиореактор для культивирования фототрофных микроорганизмов», №8207 от 04.04.2023 и «Штамм цианобактерий *Nostoc* sp. J-1 в качестве продуцента биоводорода для производства биотоплива», №7880 от 20.12.2022.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа изложена на 116 страницах компьютерного текста и включает перечень обозначений и сокращений, введение, обзор литературы, раздел «Материалы и методы исследования», раздел «Результаты и их

обсуждение», заключение и список использованных источников (205 наименований). В работе представлено 4 таблиц, 33 рисунков и 1 приложение.