

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті

ӘОЖ 60:579.8 (043)

Қолжазба құқығында

ҚАМШЫБАЕВА ГҮЛЖАНАЙ ҚОЛҒАНАТҚЫЗЫ

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

8D05105 – Биотехнология

Философия докторы (PhD) дәрежесін алу
үшін дайындалған диссертация

Отандық ғылыми кеңесші:
Садвакасова А.К.
б.ғ.к., профессор

Шетелдік ғылыми кеңесші:
Аллахвердиев С. И.
Доктор PhD, профессор

Қазақстан Республикасы
Алматы, 2026

МАЗМҰНЫ

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР	4
ТЕРМИНДЕР МЕН АНЫҚТАМАЛАР	5
КІРІСПЕ	6
НЕГІЗГІ БӨЛІМ	13
1 Әдебиетке шолу	13
1.1 Цианобактериялардың сутегі өндіру үдерісінің негізгі қатысушылары ретіндегі рөлі.....	13
1.2 Сутегіні биологиялық жолмен өндірудің фотосинтетикалық механизмдері	14
1.3. Цианобактерияларда сутегі өнімділігін арттырудың генетикалық стратегиялары.....	17
1.4 Фотосинтез ингибиторларының сутегі өндіруге әсерін зерттеу.....	21
1.5 Сутегіні фотобиологиялық жолмен өндіру тиімділігін анықтайтын факторлар	22
2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ	30
2.1 Зерттеу объектілері мен материалдары.....	30
2.2 Зерттеу әдістері	30
2.2.1 Балдырлар флорасының үлгілерін жинау және талдау	30
2.2.2 Цианобактерия штамдарын идентификациялау әдістері	32
2.2.3 Цианобактерия штамдары арқылы сутегі алу әдістері.....	33
2.2.4 Биохимиялық зерттеу әдістері	34
2.2.4.1 Газ фазасындағы сутегі концентрациясын газдық хроматография әдісімен анықтау	35
2.2.5 Цианобактерия штамдарын иммобилизациялау әдістері.....	36
3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ТАЛҚЫЛАУЛАР.....	37
3.1 Қазақстан Республикасының әртүрлі экожүйелерінен сутегі өндіруге қабілетті жаңа белсенді цианобактерияларды бөліп алу	37
3.2 Цианобактериялардың бөлініп алынған штамдарын биотехнологиялық сынақтарға дайындау үшін өсірудің оңтайлы параметрлерін анықтау	47
3.3 Бөлініп алынған цианобактерия изоляттарын идентификациялау және филогенетикалық ағаш құрастыру	52
3.4 Бөлініп алынған цианобактерия штамдарындағы сутегі метаболизміне қатысатын негізгі ферменттерінің белсенділігін талдау.....	55
3.4.1 Бөлініп алынған цианобактерия штамдарының нитрогеназа белсенділігін бағалау	55
3.4.2 Қараңғы және жарық ортада цианобактериялардың сутегінің базалық бөлуін зерттеу.....	57
3.4.3 Бөлініп алынған цианобактерия штамдарындағы екі бағытты гидрогеназа белсенділігін анықтау	60
3.5 <i>Synechocystis sp.</i> PSU 1262 цианобактерия штамының сутегі бөлінуіне физика-химиялық факторлардың әсерін бағалау	62
3.5.1 рН-тың дақыл өсуінің кинетикасына әсері	62

3.5.2 рН-тың сутегі шығымына әсерін зерттеу	64
3.5.3 Буферлік ерітінділердің сутегі шығымына әсері	65
3.5.4 Әр түрлі температура мәндерінің сутегі шығымына әсері	66
3.5.5 Әр түрлі азот концентрацияларының сутегі өнімділігіне әсерін зерттеу..	68
3.5.6 Жарық қарқындылығы мен жарықтандыру ұзақтығының сутегі шығымына әсері.....	69
3.6 Фотосинтез ингибиторлары мен әр түрлі жарық-қараңғы режимдерінің цианобактериялардың физиологиялық күйі және сутегі түзілу белсенділігіне кешенді әсерін бағалау.....	70
3.6.1 Фотосинтез ингибиторларының әртүрлі концентрацияларын және олардың сутегі өндіруге әсерін зерттеу	70
3.6.2 Фотосинтез ингибиторларының жасушаның өсуіне және хлорофилл <i>a</i> концентрациясына әсерін зерттеу	74
3.6.3 Фотосинтетикалық электрондық тасымалдау тізбегін тежеу жағдайында цианобактериялардың сутегі өндіруіне жарық-қараңғы режимінің әсері	77
3.7 Сутегі өндірісінің тиімділігін арттыру үшін альгинат гельдеріндегі <i>Synechocystis</i> sp. PSU 1262 цианобактериялық жасушаларын иммобилизациялау	80
3.8 Зертханалық жағдайда цианобактериялар арқылы сутегі өнімділігін арттыру үшін зертханалық регламент әзірлеу	83
ҚОРЫТЫНДЫ	89
ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ.....	92
ҚОСЫМША А – ЗЕРТТЕУ ОБЪЕКТІЛЕРІ МЕН МАТЕРИАЛДАРЫ	110

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР

Осы диссертациялық жұмыста төмендегі қысқартулар мен белгілеулер қолданылады:

BG₀-11 – азотсыз BG-11 қоректік ортасы

C – көміртек

C₂H₂ – ацетилен

C₂H₄ – этилен

CCCP – carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (протонфор/uncoupler)

CO₂ – көмірқышқыл газы

DBMIB – 2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone

DCMU – 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (Diuron)

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфон қышқылы
(органикалық буферлік агент)

KCN – калий цианиді

N – азот

N₂аза – нитрогеназа

O₂ – оттегі

pH – сутектік көрсеткіш

TES – N-[трис(гидроксиметил)метил]-2-аминоэтансульфон қышқылы

TRIS – трис(гидроксиметил)аминометан

АҮФ – аденозинүшфосфат

H₂ – сутегі

H₂аза – гидрогеназа

ПТР – полимеразды тізбекті реакция

ФБ – фотобиореактор

ФЖ 1 – Фотожүйе 1

ФЖ 2 – Фотожүйе 2

CO₂ – көмірқышқыл газы

MV – метилвиологен

ГХ – газ хроматограф

PCP – пенталхлорофенол ингибиторы

НАДФН (NADPH) – никотинамидадениндинуклеотидфосфаттың тотықсызданған түрі

Fd – ферредоксин электрон тасмалдаушы

ТЕРМИНДЕР МЕН АНЫҚТАМАЛАР

Осы диссертациялық жұмыста төмендегі терминдер тиісті анықтамаларымен қолданылады:

Анаэробты жағдайлар – молекулалық оттегі жоқ ортамен сипатталатын жағдай және мұнда сутек өндіру сияқты арнайы биохимиялық үдерістер жүреді.

Ацетилендік тест – нитрогеназа белсенділігін биохимиялық реакция барысында ацетиленнің этиленге айналуын өлшеу арқылы анықтау әдісі.

Биофотоллиз – фотосинтездейтін организмдер суды электрон көзі ретінде пайдаланып, күн энергиясын сутекке түрлендіретін үдеріс.

Буферлік ерітінділер – қышқылдар немесе негіздер қосылғанда рН мәнін тұрақты ұстайтын ерітінділер; өсіру жағдайларын тұрақтандыру үшін қолданылады.

Генетикалық инженерия – жаңа штамдар алу немесе қолданыстағы штамдардың қасиеттерін өзгерту үшін тірі организмдер геномын модификациялауға арналған әдістер мен технологиялар жиынтығы.

Гидрогеназа – сутек метаболизміне қатысатын, оның түзілуі немесе пайдаланылуы реакцияларын катализдейтін фермент.

Жасушаларды иммобилизациялау – цианобактериялардың жасушаларын арнайы гелдерді пайдалану арқылы бір-біріне бекіту әдісі, бұл әдіс клеткалардың ұзақ уақыт бойына сақталуына оң әсер етуі ықтимал.

Арнайы гендерді интеграциялау – жекелеген организмдердің бір функциясын өзгерту мақсатында жүзеге асатын бөгде гендерді енгізу немесе нақты генді кесу әдісі.

Жарық қарқындылығы – белгілі бір уақытта беттік аймаққа түсетін жарық мөлшері, ол цианобактериялардың тіршілігі үшін ең маңызды факторлардың бірі болып табылады – фотосинтез үдерісін жүзеге асырады.

Нитрогеназа ферменті – ауадағы бос молекулалық азотты сіңіріп алып, оларды топырақ ішіне аммиак түрінде береді, бұл азот айналымының негізгі бір ажырамас бөлігі болып саналады.

Полимераздық тізбектік реакциялар – цианобактериялардың белсенді штамдарының белгілі бір аймақтағы генін анықтау үшін қолданылатын әдіс түрі. Ол қажетті генді аймақты көбейтуге көмектеседі.

Фотобиореакторлар – микробалдарлар немесе цианобактерия клеткаларын тез арада немесе тиімді көбейтуге арналған арнайы құрылғы. Бұл жерде температура, қоректік орта және жарық қажетті мөлшерді тез қамтамасыз етіледі.

Цианобактериялар – су қоймаларында және топырақта тіршілік ететін фотосинтездейтін прокариоттар, азотты фиксациялауға және анаэробты жағдайларда сутек өндіруге қабілетті.

КІРІСПЕ

Жұмыстың жалпы сипаттамасы

Диссертациялық жұмыс цианобактериялардың аксениялық (таза) дақылдарын бөліп алуға және фотобиоэнергетикалық технологияларда сутегі (H_2) алуға қолдануға бағдарланған перспективті штамдарды іріктеу мақсатында олардың сутегі 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 штамы бөлініп алынды және идентификацияланды.

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

Алынған жаңа нәтижелер сутегі алу бойынша технологиялық регламентін әзірлеуге және фототрофты микроорганизмдерді дақылдау үдерістерін одан әрі дамыту негіз болады.

Зерттеудің өзектілігі

Қазірге таңда сутегі болашақта қолданылатын негізгі энергия ресурстары ретінде қарастырылады, себебі олар қазірдің өзінде тиімділігін айқындады және нәтижесінде көмір қышқыл газдары сыртқы ортаға бөлініп шықпайды. Сонымен қатар, сутек ғарыш, көлік және жылыту салаларында кеңінен қолданылып келеді. Сенімді, әрі, қуаты мол энергия тасымалдаушысы болып табылады. Қазіргі таңда Париж декларациясына негізделген ауадағы көміртекті қосылыстарды азайту мақсатында көптеген зерттеу жұмыстары жүзеге асырылуда. Негізгі көзделген мақсат ол – экологияға барынша төмен зиян келтіретін немесе мүлдем кесірін тигізбейтін экологиялық таза энергия көздерін табу болып табылады. Соның нәтижесінде қазірде туындаған Жер шарының жылынуын тоқтату және экожүйелерді қалпына келтіру 21-ғасырдың басты міндеті болып отыр. Осыған байланысты төмен көміртекті энергияларға деген сұраныс күннен күнге артып келеді.

Биологиялық жолмен алынатын сутегі энергиясы соңғы 30 жылда қарқынды зерттелгенімен, қазіргі таңда тығырыққа тірелді. Себебі, генетикалық әдістердің өзімен жоғары мөлшерде сутек бөлетін штамдарды жасап шығару әлі де қиындық туғызып тұр. Басты кедергілерге сутегі бөлуші ферменттердің оттекке қатты сезімталдығы, сыртқы ортадан қорғалмауы, штамдар температураға және азот көздеріне қарсы механизмдері қалыптаспауы болып табылады. Сонымен қатар, сутегіні оттектен бөліп алатын фотоиобреактордың құрылысы жасалмады және практикалық маңыздылы өте жоғары технологиялар жасалынбады. Сондықтан, қоршаған ортадан сутегі бөлу қабілеті өте жоғары жабайы түрлерді

табу, идентификациялау және оңтайландыру арқылы сутегі өнімділігін арттыру жұмыстары әлі де болса маңызды болып табылады.

Сутегі өнімділігін арттырудың кең қолданылған әдістерінің бірі – оттегін мөлшерін азайтатын, сол арқылы сутегі өнімділігін арттыруға көмектесетін фотосинтез ингибиторларын қолдану болып табылады. Олар фотожүйе 2-ден (ФЖ 2) шыққан электрондарды басқа аймаққа бағыттайды, соның нәтижесінде ортадағы сутегі мөлшері азайып, гидрогеназа немесе нитрогеназа белсенділігі арттады.

Жұмыстың мақсаты

Қазақстан Республикасының су-топырақ аймақтарынан цианобактериялардың жаңа түрлерін табу, идентификациялау, олардың сутегі бөлу мүмкіндіктерін анықтау және сутегіні жоғарылату әдісін әзірлеу болып табылады.

Зерттеу міндеттері

1. Алматы, Қызылорда, Түркістан облыстарының су-топырақ экожүйелерінен цианобактериялардың жаңа түрлерін бөліп алу, ПТР көмегімен олардың генетикалық орналасу аймақтарын анықтау және филогенетикалық көршілес туыстарын жасау;

2. Бөлініп алынған түрлердің сутегі бөлу қабілеттерін анықтау арқылы базалық деңгейлерін бағалау және негізгі нитрогеназа және гидрогеназа ферменттерінің белсенділігін анықтау. Сонымен қатар, осы екі ферменттің сутек өндіруге нақты байланыстарын бағалау.

3. Жарық белсенділігі, сыртқы орта температурасы, азоттың ортадағы мөлшері, әрі түрлі буферлік қосындылардың және орта рН көрсеткіштерінің әсерін белсенді *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамның сутегі бөлуіне зерттеу;

4. Фотосинтездің активті түрде қолданылатын ингибиторларының (СССР, DBMIB, DCMU, KCN) әр түрлі концентрацияларының әсерін сутегі өнімділігіне артуына зерттеу және олардың қауіпсіз түрде қолдану әдіс-тәсілдерін анықтау;

5. Сутек өнімділігін ұзарту және жоғарылату мақсатында *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамының клеткалараны химиялық қосылыс алгинат гелдерінің әсерін зерттеу;

6. Цианобактерия штамының биомасса алу жағдайларын оңтайландыру, сыртқы орта факторларын тиімді ету және фотосинтез ингибиторларын қолдану арқылы сутегі өнімділігін зертханалық жағдайда арттыру регламентін жасап шығару.

Диссертацияны орындауда зерттеулердің жүргізілу орны

Диссертациялық зерттеу жұмыстары 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 PFA (Ресей) және Тяньцзинь өнеркәсіптік биотехнология институты (TIB, CAS, Қытай).

Зерттеу объектілері

Зерттеу объектілері ретінде фототрофты микроорганизмдердің табиғи және коллекциялық штамдары 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 әдістер 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 BG₀-11) 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.

Сутегі өнімділігі жасуша суспензияларын аргонмен анаэробтандырғаннан кейін герметикалық құтыларда анықталды, ал газ фазасындағы сутегі мөлшері газ хроматографиясы әдісімен өлшенді. Сутегі 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 сутегі 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 штамы бөлініп алынды. Аталған штамдар 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 штамдарға 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 штамдардың 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 ингибиторларын қолдану арқылы сутегі түзілуін мақсатты түрде арттыру мүмкіндігі тәжірибелік тұрғыдан дәлелденді. Ең тиімді ингибитор мен олардың оңтайлы концентрациялары анықталды: Диурон ингибиторының ең оңтайлы мөлшері үшін 20 мкМ құрады, ал калий цианидінде бұл мөлшер 500 мкМ құрады.

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 сутегі өнімділігін арттыруға мүмкіндік беретін шарттарды апробациялау, сондай-ақ, үдерістерді масштабтау және фотобиореакторлық жүйелерді жобалау кезінде қолдануға болатын технологиялық регламентін дайындау.

Қорғауға ұсынылатын негізгі қағидалар

1. Цианобактериялардың 6 аксеникалық штамы 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 штамы сутегі бөлудің жоғары деңгейі мен өсіру жағдайларында тұрақты өсу қабілетін үйлестіретін ең перспективті продуцент ретінде тандап алынды.

3. Цианобактериялардың сутегі түзу қабілетін өсіру жағдайларын оңтайландыру және фотосинтетикалық электрон тасымалын тежеу арқылы мақсатты түрде арттыруға болады. *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамы үшін сутегі өнімділігінің базалық деңгейі анықталынды. Ингибиторлардың көмегімен оттегі бұғаттау арқылы бұл мөлшер 2 есеге жоғарылады.

4. Жасушаларды Са-альгинат матриксінде иммобилизациялау фотосинтетикалық белсенділік сақталған жағдайда, қараңғы анаэробты ортада сутегі 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 (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 штамдар үшін сутегі 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 штамында (49,6 нмоль H_2 /мг хл a /сағ дейін) және *Synechococcus* sp. SU 78 штамында (48,3 нмоль H_2 /мг хл a /сағ дейін) тіркелді.

3. Белсенді *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамы үшін сутек өндірудің физика-химиялық факторларының оптимумдары белгіленді: рН 8 (79,2 нмоль H_2 /мг хл a /сағ дейін); рН 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 °С (ең жоғары мәні шамамен 27,5 °С – 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 штамының 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: СССР 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 штамын кальций-альгинат гелінде иммобилизациялау жасушалардың физиологиялық белсенділігін сақтауды және сутек өндіру үдерісін ұзартуды қамтамасыз ететін технологиялық тәсіл ретінде негізделді. Иммобилизацияланған цианобактерия жасушалары фотосинтетикалық ұзақ уақыт бойына белсенділікті сақтайды және O_2 жиналу

жылдамдығын азайтады. Сонымен қатар, қараңғы жерде оттегі жоқ кезде биологиялық сутектің ұзақ уақыт жиналуын қамтамасыз етеді. Мысалы, сутек өнімділігі бастапқы 9-сағатта 19.3 нмоль H_2 /мг хл а/сағ дейін жетсе, 168 сағатта сутек өнімділігі 48.1 нмоль H_2 /мг хл а/сағ, әрі қарай зерттеу жұмыстары клеткалардың түсінің өзгеруіне байланысты жүргізілмеді. Цианобактериялардың сутек өнімділігін арттыру жұмыстарында 168 сағат бойына олардың белсенді түрде сутек өндіруі жоғары жетістік болып табылады.

6. Зерттеу жұмыстары кезінде алынған тәжірибелер негізінде цианобактерия түрлерінің биологиялық сутек алу әдістеме әзірленді. Ол өз кезегінде, жан-жақты сипатталып жазылған, түсінуге оңай әдіс болып табылады. Жалпы бұл әдістеменің негізгі этаптары осылай: клеткаларды активті түрде өсіру, центрифуга көмегімен бөліп алу, азоты бар қоректік тұздарды алып тастау, жарықтандыру, рН температура сияқты сыртқы орта факторларын дұрыс және орынды пайдалану, ингибиторлардың қолайлы концентрацияларын пайдалану. Сонымен қатар, сутек өнімділігін арттыруға жарық/қараңғы алмасуы және иммобилизациялау жұмыстары оң әсер ететіні анықталды.

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, диссертант осы екі жобада кіші ғылыми қызметке болып жұмыс жасады: «AP13067574 Цианобактерия штамдарының 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-шарада баяндалып, талқыланды: Фотосинтез және сутегі энергиясы бойынша 11-ші халықаралық конференция: Тұрақтылық үшін зерттеулер – 2023 ж. 3–9 маусым, Bahcesehir University Future Campus, Ыстанбұл, Түркия (65-б.).

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 6 мақала, сондай-ақ, халықаралық конференциялар материалдарында 2 тезис бар. Зерттеу нәтижелері бойынша 2 патент алынды:

«Фототрофты микроорганизмдерді дақылдауға арналған фотобиореактор», №8207 (04.04.2023) және «Биоотын өндірісінде биосутек продуценті ретінде пайдаланылатын *Nostoc* sp. J-1 цианобактериялар штамы», №7880 (20.12.2022).

Диссертацияның құрылымы мен көлемі

Диссертациялық жұмыс 116 бет компьютерлік беттен тұрады: олардың ішінде қысқартулар, белгілеулер, кіріспе, жұмыс бойынша басқа да әдебиеттерге шолу, зерттеу материалдары және әдістері, нәтижелер мен оларды талқылаулар, қорытынды және пайдаланылған әдебиеттер тізімі бар. Диссертациялық жұмыста 207 пайдаланылған әдебиеттер, 6 кесте, 33 сурет және 1 қосымша бар.

НЕГІЗГІ БӨЛІМ

1 ӘДЕБИЕТКЕ ШОЛУ

1.1 Цианобактериялардың сутегі өндіру үдерісінің негізгі қатысушылары ретіндегі рөлі

Соңғы жарты ғасырда көміртегі қосылыстары жоғары энергия көздерін шамадан тыс қолдану планетамыздың экожүйелерінің, соның ішінде флора және фаунаның орны толмас өзгерісіне алып келді [1]. Соңғы жарияланған деректерде кең айтыла бастағандай, Жердің орта температурасы соңғы тіркеле бастаған кезден бері 1,5°C жоғарылап, тұщы су қорларын өзінде ұстайтын мұздардың тез еруіне алып келді [2]. Әлемдік экологиялық мәселелердің шектен тыс көбейіп кетуінің негізгі басты себебі – ол дәстүрлі технологияларға негізделген арзан энергия ресурстарын қолдану болып табылады. Осы жайттарды ескере отырып, тығырықтан шығатын жол ретінде биологиялық энергия көздері ерекше назарға түсіп отыр. Себебі, бұл технологиялар қауіпсіз және тұрақты болып табылады.

Ғаламдық жылынуды төмендету мақсатында биологиялық энергия көздерін тиімді пайдалану тек адамзат үшін пайдасын тигізіп ғана қоймай, планетамызда құрғақ және сулы аймақтарында тіршілік етіп жүрген барлық тіршілік иелеріне оң әсерін тигізеді. Себебі, барлық тірі ағзалар биосфераның ажырамас бөлігі болып келеді. Антропогендік жұмыстардың салдарынан қоршаған ортаға парниктік газдар тым жоғары мөлшерде бөлініп, қалалық аймақтар тіршілік ететін барлық тірі ағзаларға теріс әсер етуде. Ауаның құрамына ауыр металдар шектен тыс бөлінуі және судағы тірі ағзалардың мұнай қалдықтарымен улануы жиі тіркелуде [3]. Биофототиз процесіне негізделген энергия алу жұмыстары кеңінен жүзеге асырылуда. Судан сутегі алу оңай, бірақ өте көп электр энергиясын қажет етеді және ол сутек бағасын арттырады. Сондықтан, тірі организмдерден алынатын энергия көздеріне негізделген зерттеу соңғы жылдары ғалымдардың назарына ілікті. Осыған байланысты, биологиялық сутегі энергиясын алу, тазалау, байыту сияқты жұмыстарына химиялық және физикалық әдістер де тартылды [4, 5]. Фотосинтез нәтижесінде күннен алынған энергияны электрондарға айналдыру арқылы сутегі бөліп шығару жұмыстары Жер бетінде тек микроорганизмдерге тән құбылыс болып келеді. Сондықтан, зерттеу жұмыстары қызықты әрі қиын, дегенмен болашағы зор әдіс болып табылады [6-8].

Қазіргі таңда Күн энергиясына негізделген зерттеу жұмыстары өте қарқынды түрде жүзеге асуда, солардың бірі – тилакоид мембраналарының толқындарды сіңіру қабілетіне негізделген. Жалпы цианобактериялар Күннен шыққан жарық толқындарын пигменттердің көмегімен сіңіруге эволюция барысында бейімделген [9]. Цианобактерияларға негізделген сутегі өндіру жұмыстары қазба байлықтарды қолдануды азайтуға арналған жұмыстардың бірі және тұрақты экологиялық дамуды қамтамасыз етеді және әлемдік энергия қауіпсіздігін арттырады. Бұл цианобактерия штамдары жабайы түрде өте аз

сутегі бөлгенімен, оларды модификациялау арқылы өнімділігін жоғарылату мүмкіндіктері бар. Цианобактерия түрлері қазіргі таңда тек энергия саласында ғана белсенді түрде зерттелмейді, сонымен қатар тағам, косметика бойынша қарқынды қолданылады [8].

Цианобактерияларды биоэнергия өндірісі үшін қолдануда болашағы зор ететін олардың бірегей физиологиялық ерекшеліктері бар. Цианобактериялар АҰФ (аденозинүшфосфат) түрінде сақталған артық энергияны стресс жағдайында $2H^+$ күйіндегі протондарды пайдаланып молекулалық сутегіне айналдыру үшін екі негізгі клеткалық ферментті пайдаланады: вегетативті жасушаларда белсенді гидрогеназа (H_2 аза) және гетероцисталарда белсенді нитрогеназа (N_2 аза) [10]. Дегенмен, екі фермент белсенділігі оттекке сезімтал болғандықтан, O_2 қатысқанда H_2 түзілу қарқындылығы төмендейді немесе тежеледі [11].

Цианобактерияларда фотобиологиялық H_2 өндірісі процесін екі жолмен жүзеге асыруға болады:

1. Көміртек тотығына (CO) және O_2 -ге өте сезімтал H_2 аза ферменті арқылы сутегінің фотоэволюциясы арқылы жүзеге асуы ықтимал, немесе [12, 13];

2. Гетероцисталарда қосымша өнім ретінде N_2 аза-ның түзілуі арқылы [14-16] орындалуы мүмкін. Бірінші әдіспен салыстырғанда, екінші әдістің көміртек тотығына реакция жасамайды, бірақ, H_2 синтездеу үшін бірнеше есе көп [17] АҰФ молекулаларын қажет етеді [18-20].

1.2 Сутегіні биологиялық жолмен өндірудің фотосинтетикалық механизмдері

Биологиялық әдіс арқылы сутегі өндірудің болашағы мол бағыттардың бірі ретінде фототрофты микроорганизмдер күн энергиясын тікелей түрлендіру арқылы айтарлықтай жоғары тиімділікті қамтамасыз етеді [21-24]. Сонымен қатар, гетероциста түзетін цианобактериялар азот фиксациясымен байланысты ерекше метаболикалық қасиеттерінің арқасында, молекулалық O_2 қатысуымен H_2 бөліп шығара алады [25]. Фототрофты микроорганизмдердің сутегі бөлу жылдамдығы үш факторға тәуелді: генетикалық әлеуетіне, метаболикалық ерекшеліктеріне [26] және қоршаған орта жағдайларына [27]. Осылайша, фототрофты микроорганизмдер күн энергиясы арқылы биологиялық сутегі өндірісін әрі қарай дамыту және пайдалану болашағы зор бағыттардың бірі болып табылады. Сондай-ақ, генетикалық инженерия арқылы және метаболикалық тәсілдерін қолдану арқылы сутегі түзілу үдерісін арттыруға мүмкіндік береді [28].

Биологиялық сутегі бөлу үдерісінде негізгі шектеулерінің бірі – фотосинтез кезінде пайда болатын электрондардың әр түрлі метаболикалық жолдарға таралуы. Сутегі өндірісіне кететін электрондардан басқа, CO_2 бекітуге (Кельвин циклі), көмірсулар және биомасса синтезіне, сондай-ақ тыныс алу үшін пайдаланылады. Сонымен қатар, микроанаэробты ортада, қоректік заттар жетіспеушілігі кезінде немесе жарықтан қараңғыға ауысу кезінде оттегіге

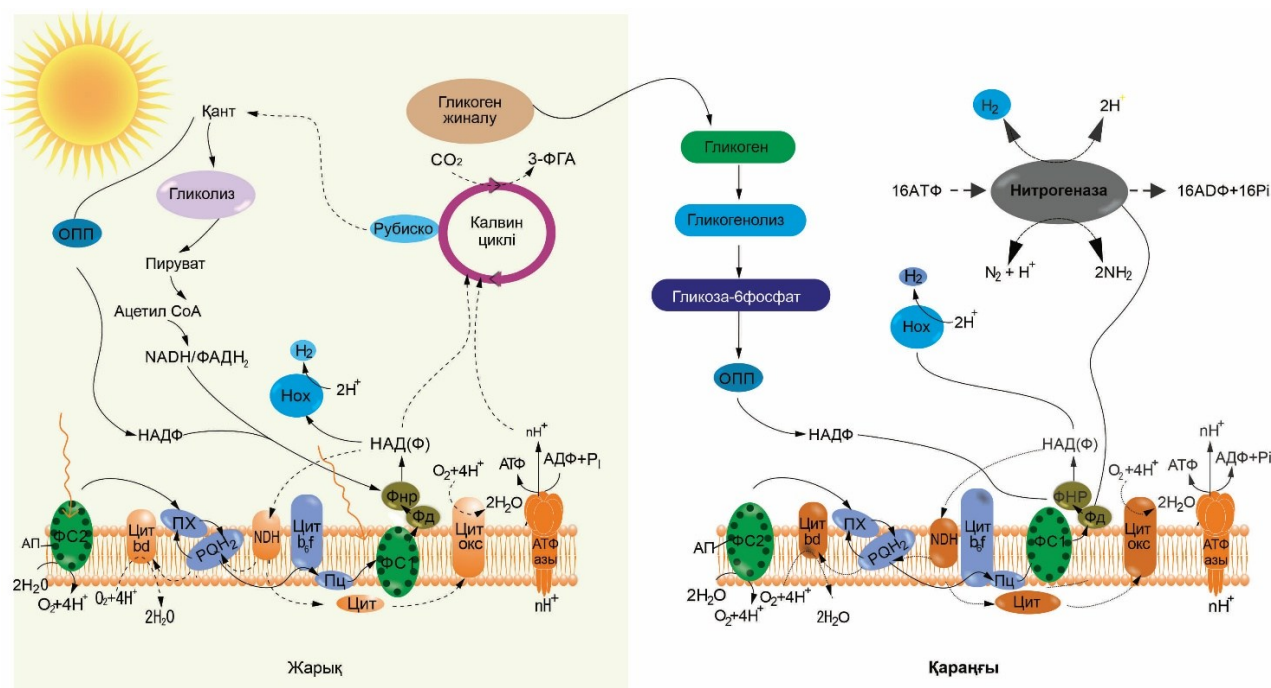
сезімтал гидрогеназа ферменттері сутегі бөліну жылдамдығын арттыруы мүмкін [28]. Бұл әдіс экологиялық таза болып саналады, себебі көмертексіз энергия көзі бола тұра парниктік газдарын тудырмайды және шикізат ретінде өсімдіктер мен жануарлардың қалдықтарын пайдалана алады [29]. Осыған байланысты, биологиялық сутегі өндірісі дәстүрлі сутегі өндірісіне балама ретінде қарастырылып, әрі қарай биоэнергетика саласында маңызды рөл атқара алады [30].

Биофототрофизге негізделген сутегі түзілу үдерісі фотосинтетикалық жүйелер арқылы молекулалық H_2 бөлу үшін жарық энергиясын пайдаланады [30-33]. Цианобактериялар бұл үдерісте метаболикалық реакциялар арқылы жарық энергиясын сутегі газ түрінде химиялық энергияға айналдырады [34]. Алынған H_2 басқа отын элементтеріне және энергиямен байланысты технологиялар сияқты әр түрлі қолданбалы жаңартылған энергия көзі ретінде пайдаланылуы мүмкін [35]. Сондықтан, сутегі өндірісінің биофототрофизге негізделген әдісі көбіне дәстүрлі сутегі өндіру әдістеріне тұрақты балама болып табылады [36].

Сутегі өндірісі үшін қолданылатын биофототрофиз үдерісі екі түрге бөлінеді: тікелей және жанама биофототрофиз.

1. Тікелей биофототрофиз – фототрофты микроорганизмдер фотосинтез арқылы тікелей H_2 газын өндіру үшін қолданылатын әдіс. Бұл әдіс бойынша микроорганизмдер тікелей сутегі өндіруге қолданылады. Бұл әдісте жасушалар сутегі бөлуіне басқа да белсенді заттар қолданылмайды. Мысалы, жанама биофототрофизде қант, ацетат сынды көміртегі көздері көп заттар қолданылса, бұл әдісте жасушалардың қорға жинақталған энергиялары тікелей қолданылады [37]. Бұл үдерісте күннен алынған энергия көздері тікелей нитрогеназа және гидрогеназа ферменттерінің көмегімен сутегі алынуға жұмсалады. Бұл әдістің көптеген артықшылықтары бар. Себебі, олар Күн энергиясын жанама заттарды қолданбай-ақ, тікелей артық шығынсыз қолдануға мүмкіндік береді. Тағы бір ерекшелігі – бұл процесті жүзеге асыру барысында жасушалар нақты летальді жағдайда ұшырамайды, олар тек өсуін баяулатады және қоректік заттарды қайтадан жаңарту арқылы сутек өнімділігін жалғастыра беруге болады. Басқа сутек өндіру тәсілдеріне қарағанда биофототрофиз экономикалық тұрғыдан өте тиімді, жасушаларды дақылдауға тек арзан тұздар мен су болса жеткілікті. Сонымен қатар, жасушалардың өсуі үшін тек өндірістік аймақта орналасқан зауыттардан шығатын көмірқышқыл газы болса жеткілікті [38]. Осы артықшылықтардан бөлек, бұл әдістің кемшіліктері де жетерлік [39, 40]. Мысалы, жасушалардың сутегі өнімділігі сыртқы факторларға тікелей тәуелді және өнімділік өндірістік міндеттемелерді қанағаттандыра алмайды [38]. Жоғарыдағы кемшіліктерге қарамастан ғалымдар тынымсыз еңбек етуде. Олар болашағынан үлкен үміт күттіретін бұл әдісті жетілдіруге бар күшін салуда. Себебі, бұл жұмыстарды сарқылмайтын энергия көздері тұрақты сутегі түзуімен қызықтырады. Бұл технология егер жолға қойылса, биологиялық сутегі энергиясының маңыздылығын арттырып, әлемдік экономикаға өз оң үлесін қосары сөзсіз [41]. Қазіргі таңда жоғарыда айтылған кемшіліктерді қалай жоюға

болатыны туралы көптеген талқылаулар мен қарқынды зерттеу жұмыстары әлемнің көптеген елдерінде жүргізілуде.



Сурет 1 – Цианобактериялардың сутек өндіру механизмі [42, 43]

1. Жанама биофототрофия үдерісі – бұл аты айтып тұрғандай, жасушалар сутегі өндірісі үшін негізгі энергияны донорлардан алады. Дегенмен, күн энергиясынан алынған электрондар да маңыздылық танытады. Көбіне сыртқы электрон донорлары ретінде ацетат пен глюкоза қолданылады. Сутегі өндіруге белсенділігі бар штамдардың көмегімен органикалық заттар ыдыратылады және нәтижесінде алынған энергия газ тәрізді сутегі өндіруге жанама түрде қолданылады [44, 45]. Бұл әдіс көбіне фототрофты емес бактериялардың көмегімен жүзеге асады немесе олардың өздерімен тікелей қолданылады. Бұл әдістің тікелей биофототрофиядан айырмашылығы – сутегі өнімділігін бірнеше есе жоғарылатуға оң ықпал етеді [44]. Сонымен қатар, сутегі өнімділігінің уақытын созуға да болады. Дегенмен, басты кемшілігі – шығыны жоғары. Сутегі өндіруге кеткен сыртқы электрон донорларының бағасы сутегі бағасына тікелей әсер етеді. Шығынды ескермесек, бұл әдіс өте тиімді болып саналады. Күннен алынған электрондар бірнеше кезеңнен өтеді және әр кезеңде олар жаңа электрондармен толығып отырады, соның нәтижесінде сутегі өндірісі артады. Бұл әдіс болашақта сутегі өндірісінің негізгі әдістерінің бірі болуы ықтимал және тұрақты қамтамасыз етуге оң әсер етеді [46].

1.3. Цианобактерияларда сутегі өнімділігін арттырудың генетикалық стратегиялары

ПТР технологиясы дамыған тұста генетикалық әдістерді қолдана отырып сутегі өнімділігін арттыруға арналған зерттеу жұмыстары кеңінен орындалуда. Осы тұрғыда жүргізілген зерттеу жұмыстары АҚШ-та, Жапонияда, Еуропа елдерінде қарқынды жүргізілуде [47]. Мұндағы жұмыстардың басым көпшілігі – сутегі ферменттерінің оттегіге сезімталдығын төмендету және сіңіру гидрогеназасының белсенділігін басу болып табылады [47]. Дегенмен, зерттеу жұмыстарында нақты жоғары нәтижелерге әлі де болса серпін беретін нәтижелер алынбады. Соңғы жылдары ферменттердің белсенділігін арттыруға жұмыстар, оттегіге сезімталдықты басуға арналған жұмыстар және электрондардың ағынын реттеуге жұмыстар қарқын алып келе жатыр. Сол арқылы пайда болған АУФ молекулалары әрі қарай сутегі өндіру үдерісіне пайдаланылады [48].

Гидрогеназа ферментінің белсенділігін анықтау жұмыстарын бағалау. Қоршаған ортада табиғи гидрогеназа ферменті (H_2 аза) кездейсоқ ген енгізу арқылы белсендірілетін жұмыстар да жүргізілді. Мұнда туыстас цианобактериялар немесе басқа прокариоттық микроорганизмдер донор ретінде қолданылуы ықтимал. Зертханалық жұмыстарда осы уақытқа дейін көлденең ген тасымалдауды қолдана отырып, жасуша цитоплазмасына плазмидтерді енгізу бойынша зерттеулер қызу түрде жүргізілді. Бір зерттеуде *C. acetobutylicum* және *C. saccharobutylicum* жасушаларынан алынған [FeFe]-гидрогеназалар жабайы штаммен салыстырғанда сутегінің бөлінуін 67%-ға арттырғаны туралы деректер бар [49]. Сонымен қатар, тағы да басқа жұмыстар аминқышқылдық тізбектерді талдау арқылы жаңа аминқышқылдарының пайда болуын және катализдейтін ақуыздардың белсенділігінің артуын анықтады. Сонымен қатар, гидрогеназа ферментінің белсенділігі 1,3 есеге артқаны да байқалды. Бұл стратегиялар оттегіге сезімтал емес мутантты түрлердің пайда болуына мүмкіндік береді, ал сутегі өнімділігін арттыруға бағытталған барлық генетикалық зерттеулер цианобактериялық [NiFe]-гидрогеназа және N_2 аза-ны қолдану арқылы жүргізіледі [50].

Сутегі өндірісі үшін қажетті бірегей функциялары бар және гидрогеназа ферменті белсенді микроорганизмдерді экстремалды қоршаған орта жағдайларынан табуға болады. Микробтық биоматтардағы H_2 аза-ның әртүрлілігін зерттеу аноксидті жағдайларда тіршілік етуге бейімделген [FeFe]-гидрогеназалардың көптеген түрлерін көрсетеді. Осындай табиғи орталардан алынған түрлерде тотығу-тотықсыздану қасиеттерін және O_2 -сезімтал белсенді орталықтарды реттеуге қатысатын аминқышқылдарының әр түрлілігі анықталды [50].

Оттегіге сезімтал емес [NiFe]-гидрогеназаларды жасау үшін әртүрлі әдістерді қолдануға болады [50]. Генетикалық модификациялық жұмыстар оттегіге төзімді [NiFe]-гидрогеназалардың экспрессиясы мен жасушаға енгізілуіне бағытталған. Мысалы, *Thiocapsa roseopersicina* жасушаларынан алынған *HydSL*-гидрогеназа генін *Synechococcus* PCC 7942 жасушаларымен

біріктіруге болады. Дегенмен, енгізілген [NiFe]-гидрогеназа H_2 өндірісі үшін қосымша жетілу жүйесін және электрондардың тұрақты жеткізілімін қажет етеді. Бұған мысал ретінде, *Alteromonas macleodii*-ден алынған H_2ase -NiFe-HynSL алуға болады, ол *S. elongatus*-тың басқа 11 жанама генімен бірге 1-хромосомаға енгізілді [51]. Бұл жағдайларда гендік инженерияның табысы енгізілген гендердің экспрессиясының артуымен, оттегіге төзімділікпен және H_2ase -ның фотосинтетикалық электрон тасымалдау тізбегіне тиімді енгізілуімен бағаланды [52].

Цианобактериялардағы био- H_2 өндірісі табиғи N_2 аза-ның немесе табиғи екі бағытты фермент [NiFe]-гидрогеназаның белсендірілуімен тікелей байланысты. Дегенмен, табиғи ферменттерді қолдану H_2 өндірісінің тиімділігін азайтады және экономикалық тұрғыдан тиімсіз етеді. Сондықтан, бұл жағдайда көбіне интенсивті гендік инженериялық жұмыстар қажет, бұл үшін белсенді сутегі өндіретін жасушалары бар қожайындар мен активті биомасса жинайтын цианобактерия түрлері қажет болады.

Барлық N_2 аза түрлері салыстырмалы түрде төмен жылдамдыққа ие және тотықсыздану үшін пайдаланылатын әрбір электрон үшін гидрогеназамен салыстырған екі есе көп АҮФ молекуласын қажет етеді. Сонымен қатар, олар сіңірілген әрбір N_2 молі үшін кем дегенде бір моль H_2 бөледі [53]. Цианобактериялық жасушалардағы сіңіргіш немесе екі бағытты фермент [NiFe]-гидрогеназа салыстырмалы түрде аз мөлшерде H_2 молекулаларын бөледі [54]. Дегенмен, [NiFe]-гидрогеназаға негізделген H_2 өндіріс үдерісі АҮФ молекуласына онша тәуелді емес және жоғары жылдамдыққа ие. Ал, басқа екі бағытты фермент [FeFe]-гидрогеназа гендік жұмыс үшін өте тиімді болып табылады. Сондықтан, [FeFe]-гидрогеназа синтетикалық жүйелердегі рекомбинантты экспрессияны зерттеуде модельдік фермент ретінде қарастырылады [54]. Дегенмен, табиғи [FeFe]-гидрогеназа цианобактерияларда әлі анықталған жоқ [55]. Сондықтан, [FeFe]-гидрогеназаны цианобактериялық жасушаларға алу және енгізу маңызды стратегиялардың біріне айналды. Бұл фермент көбінесе *Clostridium* туысының анаэробты бактерияларында кездеседі [56].

Сонымен қатар, *Chlamydomonas reinhardtii* микробалдырынан экспрессияланған [FeFe]-гидрогеназасын (HydA1) тағы бір модельдік жүйе ретінде қарастыруға болады. Ол тек FeS кластерінсіз F-доменнен тұрады [56]. Микробалдырлардан бөлініп алынған метаболикалық [FeFe]-гидрогеназаларының бірегейлігі олардың ФЖ2 және фотосинтетикалық электрон тасымалдау тізбегі арқылы судың тотығуымен тікелей әрекеттесу қабілетінде болып табылады. Дегенмен, цианобактерияларда [FeFe]-гидрогеназасының табиғи түрінде экспрессиясы көптеген қиындықтарды тудырады, себебі, цианобактериялар табиғи жағдайда тек [NiFe]-гидрогеназасының жетілуіне бағытталған ген сигналдарын шығара алады. Соңғы 10 жылда бұл бағытта шағын серпіліс жасалды және [FeFe]-гидрогеназа *Clostridium*-нан алынып, *Synechococcus* тұқымдасының бір жасушалы

цианобактерияларына сәтті енгізілді [57]. Дегенмен, уақыт өте келе жіпшелі гетероцисталық цианобактерия *Nostoc* PCC 7120-ге енгізілген [FeFe]-гидрогеназасы жойылғаны байқалды. Бұл мәселені шешу үшін гетероцисталық цианобактерияларға тән *hetR* гені промотор ретінде пайдаланылды [58-60].

In vivo белсенділігі жарыққа тәуелді және электрон тасымалдау тізбегімен байланысты екені анықталды. Әрі қарай жүргізілген зерттеулер белсенді *hup* генінің болмауы жабайы түрімен салыстырғанда H_2 өндірісінің артуына әкелетінін көрсетті [58-60]. [FeFe]-гидрогеназа *HydE*, *HydG* гендері енгізілген және сутегі өнімділігі айтарлықтай артқан *E. coli* бактериясында да экспрессияланған [61]. Сондай-ақ, бұдан басқа бұл гендер эукариоттарда да кездесетіні туралы деректер бар.

Аталған бактерияға *HydE* және *HydG* гендері енгізілген кезде сутек өндіру деңгейінің айтарлықтай артқаны байқалған [61]. Сонымен қатар, [FeFe]-гидрогеназалар эукариотты организмдерде де кездеседі. Мысалы, жүйелік жетілуге жауапты гендер енгізілмеген жағдайда да *Clostridium*-нан алынған [FeFe]-гидрогеназа *Synechococcus* PCC 7942 цианобактериясында *in vivo* және *in vitro* жағдайларда сәтті экспрессияланғаны көрсетілген. Ұқсас нәтижелер *Chlamydomonas* *HydA* генін *Synechocystis* PCC 6803 штамына тасымалдау тәжірибелерінде де байқалған. Бөгде жасушаға енгізілген ферменттің белсенуімен қатар енгізілген гендер жүйесі арқылы немесе әлі толық зерттелмеген басқа механизмдер арқылы жүзеге асуы мүмкін. Зерттеулер көрсеткендей, қосымша жетілу гендері болмаған жағдайда да әртүрлі организмдерде [FeFe]-гидрогеназаның белсену деңгейі әрқалай болуы мүмкін: кейбір организмдерде ол жетілу оперондарының қатысуынсыз-ақ белсенеді, ал кейбірінде олардың экспрессиясы мүлде қажет болмайды. Осыған байланысты бұл бағыт әлі де терең зерттеуді талап етеді.

[NiFe]-гидрогеназаны зерттеу барысында барлық үш FeS-кластердің фермент ішіндегі электрон тасымалдау үдерісіне шын мәнінде қатыса ма және дистальдық кластер электрондардың табиғи кіріс немесе шығыс нүктесі қызметін атқара ма деген ғылыми сұрақтар туындайды. Осыған байланысты [NiFe]-гидрогеназалардың кіші субъбірлігіндегі FeS-кластерлер арасындағы өзара байланыстарды, сондай-ақ, сутегі сіңіруге жауапты (*uptake*) гидрогеназаның қызметі өзгертілген ферменттік нұсқаларын зерттеуге бағытталған жұмыстар жүргізілді. Yonemoto және әріптестері цианобактерия штамдарына 2% оттегіге төзімді [NiFe]-гидрогеназаны енгізіп, сутегі өндіруді көрсеткен [62]. Dementin және әріптестері *Desulfovibrio fructosovorans* гидрогеназасының белсенді орталығындағы лигандтарды модификациялауды жүзеге асырып, сутегі сіңіруге қатысты екі бөлек мутагенездік зерттеу жүргізген [63]. Yonemoto және әріптестері *Alteromonas macleodii* гидрогеназасымен жұмысты жалғастырып, алдыңғы есептермен салыстырғанда ферменттің жоғары белсенділігіне қол жеткізді. Зерттеушілер *A. macleodii* құрамындағы *HupSL* гидрогеназа ферментіне кең ауқымды орынбасу (мутациялық) талдау жүргізіп, кіші субъбірліктегі үш FeS-кластерді байланыстыратын 12 аминқышқылдың

әрқайсысын аспарагин қышқылына, гистидинге, аспарагинге немесе глутаминге алмастырған [64].

1-кестеде цианобактериялардың әртүрлі штамдарының жасушаларында сутегі өндіру тиімділігін арттыру мақсатында [FeFe]-гидрогеназа ферментін жетілдіру үшін қолданылған негізгі стратегиялар көрсетілген.

Кесте 1 – Әртүрлі стратегияларды қолдану арқылы цианобактерия штамдарында инженерлік және синтетикалық ферменттік жүйелер негізінде сутек өндіру

Штамм	Инженерлік гендер	Сутегі өндірісі	Сутегі өндірісінің шарттары	Дерек көз
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> – <i>hydA</i>	130 нмоль H ₂ /мкг хл а/сағ	Анаэробты жағдай; 50 мкЭ/м ² /с; 5 мкМ DCMU	[65]
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 S03922 және S03924 – <i>hydA</i> , <i>hydB</i> , <i>hydE</i> , <i>hydF</i> , <i>hydG</i>	3,4 нмоль H ₂ /мкг хл а/сағ	Жарық тапшылығы және нитрат тапшылығы	[66]
<i>Synechococcus elongatus</i>	<i>Clostridium acetobutylicum</i> – <i>hydA</i> және <i>hydEFG</i> оперондары	2,8 мкмоль H ₂ /мкг хл а/сағ	Жарық; 5 мкМ DCMU; 2,5% CO ₂ және 97,5% N ₂	[67]
<i>Synechococcus elongatus</i>	<i>Thiocapsa roseopersicina</i> – [NiFe]-гидрогеназа	~0,07 нмоль H ₂ /мг ақуыз/сағ	Анаэробты жағдай; 40 мкЭ/м ² /с	[67]
<i>Synechococcus elongatus</i>	<i>Alteromonas macleodii</i> – <i>hynSL</i> және 11 ақуыз	~4,2 нмоль H ₂ /мг ақуыз/сағ	Анаэробты жағдай; 40 мкЭ/м ² /с	[67]
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	<i>C. acetobutylicum</i> - <i>hydA</i>	~6,8 мкмоль H ₂ /мкг Хл а/сағ	Қараңғыға бейімдеу	[68]

Жалпы алғанда, барлық гидрогеназалар электрондарды ферредоксин (Fd) сияқты донорға тікелей немесе жанама механизмдер арқылы тасымалдайды. Осы тұрғыда, функционалдық тұрғыдан бөгде [FeFe]-гидрогеназаны негізгі метаболизмге тиімді енгізу мәселесі, яғни, жасушаның тотығу-тотықсыздану жүйесінде электрондарды беру немесе қабылдау мәселесі әлі де толық шешілмеген. Бөгде [FeFe]-гидрогеназаның бүкіл тотығу-тотықсыздану жүйесіне енгізілуі және оның иесі-жасушаға толық интеграциялануы өте күмәнді процесс

болып табылады. Мұны растау үшін *Synechococcus elongatus* штамна жүргізілген зерттеулер енгізілген [FeFe]-гидрогеназаға электрондардың берілуі және Fd-де энергия тасымалдаушының жинақталуы әртүрлі жолдар арқылы жүретінін көрсетті. Бөгде гидрогеназаны жасушаға енгізу үшін оның белсенділігін модуляциялай алатын Fd молекулаларын құрастыру қажет, бұл енгізілген гидрогеназаға электрондардың тұрақты ағынын қамтамасыз етеді. Осылайша, цианобактериялардың H_2 өндірісі оттегіге және жоғары температураға төзімді ферменттерді қолдану арқылы тиімдірек болуы мүмкін.

Дегенмен, бөгде гидрогеназаны қожайын жасушаның тотығу-тотықсыздану жүйесіне толық кіріктіру, оны тұрақты электрон ағынымен қамтамасыз ету және ферменттің жетілуіне жауапты жүйелерді үйлестіру күрделі міндет болып қала береді. Осыған байланысты тұрақты әрі жоғары өнімді цианобактерия штамдарын алу мәселесі әлі де өзекті.

1.4 Фотосинтез ингибиторларының сутегі өндіруге әсерін зерттеу

Биосутегі өндірісін арттырудың метаболикалық тәсілдері цианобактериялардың H_2 өндірісінің жылдамдығы мен ұзақтығын арттыруға бағытталған физиологиялық және биохимиялық әдістерді әзірлеуді қамтиды [22].

Цианобактериялық жасушалардың H_2 өндірісінің тиімділігі көптеген факторларға байланысты, бұл әсіресе ірі көлемді өндіріс үшін өте маңызды [41]. Жарық қарқындылығы, температура және рН-тан басқа, ең маңызды факторларға молекулалық оттегі, тұздылық, қоршаған ортаның қоректік заттары мен газ құрамы және басқалары жатады. Әр түрлі параметрлер әртүрлі цианобактериялық штамдарда H_2 өндірісіне әртүрлі әсер етеді [42].

Биосутек өндірісінде цианобактериялық жасушалардың өнімділігін арттырудың тағы бір тиімді әдісі – ФЖ2 электрон тасымалдау ингибиторларын қолдану. Қазіргі уақытта 15-тен астам әртүрлі фотожүйелік ингибиторлар қолданылады, соның ішінде белгілі диурон (DCMU), карбонил цианид-м-хлорфенилгидразон (CCCP), метилвиологен (MV), калий цианиді (KCN), хлорамфеникол, 2,5-дибromo-3-метил-6-изопропил-п-бензокинон (DBMIB), пентахлорфенол (PCP) және малонат [42].

DCMU электрон тасымалдау жүйесінің ең көп қолданылатын ингибиторы болып табылады; оның молекулалық құрылымы біртіндеп тотықсыздандыратын пластохинонға ұқсайды, себебі бұл молекулалар ФЖ2 реакция аймағындағы хинонмен байланысу орнына байланысады. Диурон анаэробты жағдай қалпына келтіру және молекулалық сутегі түзілуіне мүмкіндік беру үшін қолданылады. DCMU хинон аналогы ретінде фотожүйе 2 құрамындағы QB аймағымен байланысып, QA-ден QB-ға электрон тасымалын тежейді [10]. DCMU көбіне O_2 түзілуін шектеу арқылы анаэробты жағдайға жақын режим қалыптастыруға және соның нәтижесінде сутегі түзілуіне қолайлы жағдай жасауға қолданылады. Бірқатар зерттеулер DCMU цианобактерия жасушалары өндіретін сутегі шығымын арттыра алатынын көрсеткен [69]. Kossalbayev және әріптестері

Synechocystis sp. PCC 6803 цианобактерия жасушалары анаэробты жағдайда жарықтандыру кезінде ортаға 10 мкМ DCMU қосылғаннан кейін көбірек сутегі өндіре алатынын хабарлаған. Алайда, DCMU концентрациясын 30 немесе 45 мкМ-ге дейін жоғарылату сутегінің фотопродукциясына оң әсер етпегенін көрсеткен [70].

Цианобактериялардағы тағы бір танымал фотожүйе ингибиторы – СССР. DCMU-ға ұқсас, СССР фотожүйенің фотохимиялық белсенділігін тежейді және өсіру кезінде O_2 өндірісін азайтады. ФЖ2-нің фотохимиялық белсенділігі *Nostoc* sp. және *Lyngbya* sp. штамдарында басылатыны айтылған [71], ал *Oscillatoria chalybea* және *Synechocystis* sp. PCC 6803 түрлерімен жүргізілген жұмыстарда СССР қосқан кезде H_2 өндірісінің артатыны туралы хабарланған. Көптеген зерттеушілер СССР арқылы АТФ синтезінің тежелуі қараңғыда *A. variabilis* және *Anacystis nidulans* тыныс алу жиілігінің артуына әкелетінін атап өтті [72].

KCN және РСР сияқты ингибиторлар хинол оксидазасын блоктаыды, бұл пластохинон (PQ) пулының тотықсыздану деңгейіне әсер етеді. Калий цианиді терминалды оксидазаларды тежеу арқылы электрондардың оттекке берілуін шектейді, нәтижесінде жасушада тотықсызданған электрон тасымалдаушылардың үлесі артып, белгілі бір жағдайларда электрондардың гидрогеназа бағытына қайта бағытталуына ықпал етуі мүмкін [73]. Сонымен қатар DBMIB нитрат ассимиляциясына қатысатын гендердің экспрессиясына әсер етуі мүмкін, бұл жасушадағы электрон ағынының қайта бағытталуына және кей жағдайларда H_2 түзілуінің өзгеруіне әкеледі [74].

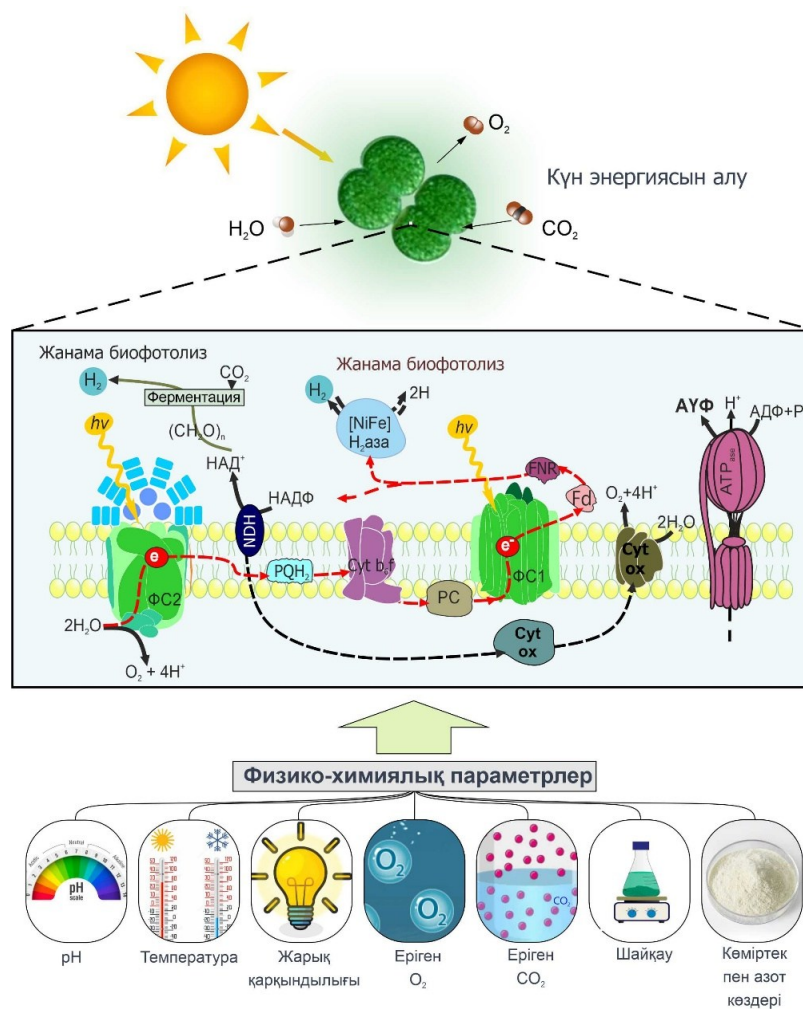
Тағы бір метаболикалық тәсіл – ортаға әртүрлі экзогенді электрон донорларын қосу. Қарапайым органикалық қосылыстардың ортада болуы нитрогеназа арқылы бөлінетін сутектің өнімділігін арттырады. Сондықтан, маннозаны қоса алғанда, әртүрлі қанттардың үйлесімі де H_2 өндірісін салыстырмалы түрде жоғары жылдамдықпен ынталандырады [75]. Дегенмен, метаболикалық тәсілдің табысты болуына тек техникалық және генетикалық тәсілдермен біріктірілген жағдайда ғана қол жеткізуге болады.

1.5 Сутегіні фотобиологиялық жолмен өндіру тиімділігін анықтайтын факторлар

Соңғы 30 жылдықта фототрофты микроорганизмдерді пайдалана отырып сутегіні ауқымды өндіру үшін фотобиореакторларды әзірлеу тұрғысындағы зерттеулер жүргізілуде [33]. Фотобиореакторлар (ФБ) жұмыс істеу принципіне байланысты екі түрге бөлінеді: 1) қараңғы ортада бактериялық су-газ алмасу немесе ашыту арқылы сутегі өндіретін биореакторлар және 2) жарық ортада цианобактериялар немесе жасыл балдырларды пайдалана отырып фотосинтез жүйесі арқылы сутегі өндіретін фотобиореакторлар [76]. Жасыл балдырлар мен цианобактериялар сияқты фототрофты микроорганизмдерді қолдана отырып сутегі өндірісі тікелей тиімдірек болуы мүмкін. Дегенмен, сутегі өнімділік жоғары болу үшін фототрофты микроорганизмдердің физикалық және физика-химиялық параметрлері қатаң бақылауды қажет етеді [77].

ФБР-дың жүйелі жұмыс жасауына әсер ететін физикалық параметрлер: беткі ауданның көлемге қатынасы, температураны бақылау, реактор материалының беріктігі мен бақылауға оңтайлы мөлдірлігі, газ алмасу жүйесі және біркелкі араластыру жатады. Алайда, ФБР-дың сутегі өндірісінде тек жоғарыда айтылғандай физикалық параметрлермен шектелмейді. Сондай-ақ, сіңірілетін жарық мөлшерінен бөлек биохимиялық механизмдерге әсер ететін физика-химиялық параметрлерге де байланысты. Физика-химиялық параметрге рН мәні мен температура әсері, оттегі мен күкірт диоксиді сияқты әр түрлі газдардың мөлшері, көміртегі мен азот көздері де жасушаішілік биохимиялық үдерістерге әсер етеді. Сонымен қатар, фототрофты микроорганизмдердің сутегі өндірісін арттыру үшін оңтайлы жағдайларды таңдауға мүмкіндік береді [78] (Кесте 2).

Сурет 2-де цианобактериялардан сутегі бөлу жолдары және сутегі өнімділігін арттыру үшін қолданылатын сыртқы орта факторлары келтірілген.



Сурет 2 – Фотосинтез үдерісіне негізделген цианобактерия штамдарының сутегі өндіру сызба нұсқасы және әсер ететін әр түрлі сыртқы орта факторларының әсері

Кесте 2 – Фотобиологиялық сутегі өндірісіне әсер ететін негізгі факторлар

Фактор	Штамм	Концентрация/ мәні	Сутегі өндірісі	Дерек көз
1	2	3	4	5
Температура	<i>Desertifilum</i> sp.	23°C	350,0 нмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[70]
	<i>Chlorella vulgaris</i> MSU-AGM 14	32°C	0,0016 нмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[79]
	<i>Anabaena variabilis</i>	23°C	14,9 мл/грамм/сағ	[80]
	<i>Anabaena</i> sp. UTEX 1448	24°C	100 пмоль/клетка	[81]
pH	<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	7,2	1182 нмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[82]
	<i>Nodularia</i> sp. AV33	7,5	10,2 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[82]
	<i>Anabaena</i> sp. 7120	7,5	15,5 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[82]
Аэрация	<i>Clostridium butyricum</i> + микробалдыр субстраты	150 rpm	113,0 мл H ₂ /г	[12]
	<i>Anabaena variabilis</i> A-1	150 rpm	8,67 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[83]
	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	120 rpm	0,037 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[81]
Жарық қарқындылығы	<i>Anabaena variabilis</i>	70 мкмоль фотон/м ² /с	44 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[84]
	<i>Calothrix</i> sp. BECID 33	70 мкмоль фотон/м ² /с	0,1 ммоль H ₂ /мг хл а/сағ	[85]
	<i>Anabaena variabilis</i>	60 мкмоль фотон/м ² /с	4,2 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[86]
Оттегі концентрациясы	<i>Tolypothrix</i> sp. B379	1% (v/v)	55 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[87]
	<i>Chlorella vulgaris</i> YSL01	5% (v/v)	1,9 мл/г	[79]
	<i>Anabaena variabilis</i> BTA-1047	2% (v/v)	10 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[88]

2-кестенің жалғасы

1	2	3	4	5
CO ₂	<i>Fischerella muscicola</i> PCC 7414	3% (v/v)	41,2 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[87]
	<i>Anabaena variabilis</i> PK84	2% (v/v)	167,6 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[89]
	<i>Calothrix scopulorum</i> 1410/5	3% (v/v)	0,128 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[90]
Азот көзі	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	3 г/л NaNO ₂	226,9 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[91]
	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	25% N ₂ (v/v)	45,16 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[89]
	<i>Anabaena variabilis</i> PK84	5% N ₂ (v/v)	167,6 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[89]
Глюкоза	<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	10 ммоль	11,7 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[84]
	<i>Tolypothrix</i> sp. B379	10 ммоль	35 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[84]
	<i>Anabaena cylindrica</i> B629	10 ммоль	49 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[84]
Жасуша тығыздығы	<i>Nodularia</i> sp. TRO31	40 мг хл/мл	~8 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[85]
	<i>Calothrix</i> 336/3	40 мг хл/мл	~4 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[92]
	<i>Anabaena</i> PCC 7120	5 мг хл/мл	17 мкмоль H ₂ /мг	[92]
Иммобилизация	<i>Tetraspora</i> sp. CU2551	4% альгинат	1182 нмоль H ₂ /мг	[82]
	<i>Lyngbya perelegans</i>	4% альгинат	21 нмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[93]
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2% каррагинан	1 мл/сағ	[94]
Фотосинтез ингибиторлары	<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 794	10 мкМ KCN	~20 мкмоль/сағ	[95]
	<i>Synechocystis</i> sp. PSU 1262	500 мкМ KCN	1552 нмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[37]
	<i>Aphanothece halophytica</i>	50 мкМ DCMU	3,63 мкмоль H ₂ /мг хл а/сағ	[64]

Фототрофты микроорганизмдер негізінен рН-тің 7 мәнінде сутегіні жақсы бөлетіні туралы деректер көп. Дегенмен, түрлердің қоршаған ортаға

бейімделуіне байланысты олардың сутегі өндіру мүмкіндіктері әрқалай болуы ықтимал. Көптеген цианобактерия түрлерінде өсу көрсеткіштері басқа рН мәндерінде жақсы болса, ал сутегі өндіруге қолайлы рН мәні басқа көрсеткіште жүреді. Мысалы, мутантты штамм *R. capsulatus* және оның жабайы түрінің сутегі қолайлы бөлу деңгейі бір-бірінен алшақ болды. Дегенмен, олардың ацетатты қолдана отырып сутегі өндірісінің қолайлы мәні 7 болды [96]. Ал, тағы бір басқа зерттеу жұмысында осы штамның қолайлы сутегі өнімділігі рН 7,5 мәнінде өте жоғары болғанын көруге болады [97].

Осылайша, қоректік ортадағы рН өзгерісі молекуланың биодеградациясы немесе бактериялардың өсуі мен метаболизміне айтарлықтай әсер етуі мүмкін, мұның салдарынан сутегі бөлуге қатысатын ферменттердің белсенділігі өзгеріп, денатурацияға ұшырайды [98].

Температура бақылауына келетін болсақ, цианобактериялар ФБР-да өсірілуінің оңтайлы диапазоны 25–35°C аралығын құрады [99]. Дақылдау барысында қоректік орта да маңызды рөл атқарады, сонымен қатар биомасса өсуіне және биосутегі шығымына әсер етеді. Сонымен қатар, Burrows және әріптестері жасушадағы гликоген мөлшері артқанымен *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамында сутегі өндіру деңгейі 150 есеге дейін артатынын көрсеткен [100].

Jin және әріптестері [101, 102] өз зерттеулерінде цианобактериялық түрлерді өсіруге арналған қоректік орталарға шамалы мөлшерде аммонийді қосу дақылдардың өсу деңгейін бірнеше есе арттыратынын тіркеді.

Алайда, температура өзгерісі кей жағдайда жоғары болуы ферменттердің сутегі түзілу үдерісіне және микроағзаның өсуіне теріс әсер етуі мүмкін. Сондай-ақ, жасушаішілік құрылымдардың зақымдануына немесе өміршеңдігінің тоқтауына алып келуі мүмкін [33].

2-кестеде сутек түзуші микроорганизмдердің белгілі бір штамдарын өсіруге әсер ететін негізгі факторлар көрсетілген [103, 104].

Зерттеулерге келсек, сутек өндіру үшін *Rudovulum sulfidophilum* және *Rhodobacter capsulatus* бактерияларында оңтайлы температура 30°C болды [105]. Не және әріптестерінің нәтижелері [106] бойынша температура жоғарылаған сайын 34°C дейін сутегі бөлуге қатысатын фермент белсенділігі және субстраттың түрленуі 33% -ға дейін төмендейтіні көрсеткен. Ал, *Rhodobacter capsulatus* үшін 30°C температурасы субстраттардың түрленуіне ең қолайлы болып, тиісінше 52,7% және 68,2% деңгейінде жоғары өнімділік қамтамасыз етеді. Өз зерттеулерінде Wang және әріптестері [107] *Rhodopseudomonas palustris* штамын 27,5–32,5°C көрсеткіштерінде дақылдағанда биомасса жақсы жинақталғанын байқады.

Дегенмен, ортада температура жоғарылаған сайын сутегінің бөлінуі төмендеуі ытимал, себебі, жасушаішілік ақуыздардың жылдамдығына теріс әсер етеді. Сондықтан, сутегі өндірісі үшін қолданылатын фотобиореакторлардың температурасы жасуша үшін қолайлы және тұрақты болуы шарт. Бұл сутегі өндірісінің ең маңызды факторларының біріне жатады [108-111].

Жалпы, барлық микроорганизмдердегі жасушалардың бөлінуі және биологиялық сутегі өндірісі тікелей жарықтың қарқындылығына тәуелді болып келеді [112]. Фотобиореактордың ішінде екі түрлі аймақ бар – жарық және көлеңкелі аймақ. Көлеңкелі аймақтарда жарық жетіспеуі орын алады, ал жарық аймақтарда жарықтың қарқындылығы жоғары болып келеді. Сонымен қатар, ортаның нақты қасиеттері, араласу жылдамдығы және газдардың берілуі сияқты факторлар фотобиореактордың ішіндегі дақылдың өсуін жақсартады. Кейбір цианобактерия түрлері қызыл жарықта да жоғары өсімді көрсетеді, сондықтан, бірінші кезекте әр түрдің қарқынды жарықты сіңіру спектрлерін зерттеу ерекше маңызға ие. Сол себептен, фотобиореакторды құру кезінде жарықтың барынша барлық аймаққа тең берілуі ескерілуі қажет. Жарық-қараңғы алмасу режимдері және сұйықтық пен газ берілу каналдары сияқты бөліктері де дақылдардың өсуіне өз әсерін тигізеді [113].

Фототрофты микроорганизмдерде барлық энергия алмасу үдерістері тікелей АҰФ-пен байланысты, сондықтан АҰФ синтезін жүзеге асыру үшін фотосинтез үдерісі тоқтаусыз жүріп отыру қажет. Себебі, сутегі өндірісінің негізгі энергия көзі АҰФ болып табылады [114]. Көптеген зерттеу жұмыстарында фотосинтез процесінің оңтайлы жарық қарқындылығы 30-100 мкмоль фотон/м²/с құрайды, дегенмен бұл нақты көрсеткіш емес, түрлердің ерекшеліктеріне байланысты өзгеріп отырады. Жоғары жарық қарқындылығы жасушалардың метаболизміне теріс әсер ете отырып, биомассаның жинақталуын азайтады. Сондықтан, зерттеу жұмыстарында берілетін жарық-қараңғы режимдерін қалыптастыру және оңтайлы мөлшерді анықтау маңызды болып табылады [115].

Жарық қарқындылығы жоғары болса, жасуша бетіне түсетін энергия мөлшері жоғарылап, пигменттердің қалыпты жұмысын бұзады, соның нәтижесінде фотоингибирлену үдерісі қалыптасады [116]. Сондықтан, фотожүйе 1 және фотожүйе 2 қызметтерінің тұрақты жұмыстарын жүзеге асыру үшін міндетті түрде жарықтың түрі мен оңтайлы мөлшерін белгілеу маңызды [117]. Фотосинтез нәтижесінде пайда болған энергияны биоэнергияға айналдыру үшін тұрақты әрі сенімді технологияларды қалыптастыру керек [118]. Ол өз кезегінде үздіксіз және көп еңбекті қажет етеді.

Цианобактериялар өздерінің бойындағы пигменттердің ерекшеліктеріне байланысты әр түрлі жарық толқындарын бойына сіңіруге бейімделген. Сондықтан, бұларды дақылдау үшін міндетті түрде кең спектрлі жарықдиодты шамдар (LED) қолданылады [119]. Ол өз кезегінде штамдардың фотоферментативті сутегі өндіруін жүзеге асыруға көмектеседі. Сондықтан, фотобиореакторларға қойылған жарық шамдарын оңтайландыру жұмыстары жүргізіледі.

Фотобиореактор ішінде еріген оттегінің мөлшерінің артуы сутегі өндірісіне теріс әсер етеді, сондықтан фотосинтез мөлшерінің қарқынды жүзеге асуы өз кезегінде өнімділікті азайтады. Оттегі қоректік ортада диффузия процесінің нәтижесінде көбейіп, фотосинтездің қосалқы өнімі ретінде артып кетуі ықтимал [120]. Сондықтан, қазіргі таңда зерттеліп отырған жұмыстар көбіне «Қалай

сутегі өнімділігін төмендетпей, оттегі мөлшерін азайтуға болады?» деген сұрақтың айналасында жүріп жатыр. Суда еріген оттегіні азайту және микроаэробты орта қалыптастыру үшін көптеген оңтайландыру жұмыстары жүзеге асырылуы қажет [59].

Фототрофты микроорганизмдер көмірқышқыл газымен тыныс алып, оттегіні қосалқы өнім ретінде сыртқы ортаға бөліп шығарады. Сондықтан, олардың тыныс алуында CO_2 өте маңызды рөлге ие. Дегенмен, ортадағы CO_2 мөлшерінің тым артуы оттегі мөлшерінің азаюына алып келіп, жасушалардың өсуін шектеуші фактор болуы мүмкін. Ортаның рН мәні төмендеп, фотосинтез үдерісі тоқтайды. Оттек пен көмірқышқыл газының ара-қатынасы өте күрделі болғандықтан, зерттеу жұмыстарын қажет етеді [121].

Өсіп тұрған дақылдарды тиімді араластыруды ойластыру ФБР-ді құрастырудың маңызды бөлігі болып табылады. Цианобактерия штамдарының орташа араластыру жылдамдығы 100-200 г/м³ құрайтыны туралы көптеген зерттеу жұмыстарында айтылған. Дегенмен, бұл сутегі өндірісі үшін тиімді ме, әлде жасушалардың өсу жылдамдығына басқа жылдамдықтағы араластыру, ал сутегі өндіруге басқа жылдамдықтағы араластыру жылдамдығы қажет пе? Тиімді араластыруды қалыптастыру қоректік ортаның бірқалыпты таралуын жүзеге асырып ғана қоймай, сонымен қатар ортаның рН көрсеткішіне де оң әсер етеді. Сонымен қатар, ФБР ішіндегі өлі аймақтардың болмауын қамтамасыз етеді [122-124].

Жасушаларды шамадан тыс араластыру жасушалардың арасындағы механикалық кернеуді арттырып, жасушалардың өлуіне алып келеді [125]. Көптеген фотобиореакторларда араластыру жылдамдықтары өте жоғары болады және оларды қолымен реттеуге болады. Сондықтан, жасушалардың көптік биомассасын алу үшін дақылдамастан бұрын алдын ала зерттеу жұмыстарын жүзеге асыру маңызды. Дегенмен, кейбір механикалық араластыруға CO_2 немесе стерильді ауа ағындарын да жіберу жатады. Төменнен жоғары қарай көтерілген көпіршіктер жасушалардың қалыпты өсуін қамтамасыз етеді және механикалық зақымдануды болдырмайды [126].

Ортадағы көміртек пен азот көздерінің қалыпты болуы және олардың тиімді түрде араласуы жасушалардың активті түрде өсуіне оң жағынан әсер етеді. Құрамында көміртегі көздері тұздар штамдардың белсенді өсуіне әсер ете отырып, фотосинтезден алынған электрондардың тиімді түрде қажетті орталықтарға жетуіне көмектеседі. Сондықтан, ортадағы жеткілікті көміртек көздері тұрақты фотосинтез үдерісін қалыптастырады [127].

Азоттың қоректік ортада жеткілікті болуы жасушалардың жылдам өсуіне оң әсер етеді, бірақ жасушалардың сутегі өндірісіне теріс әсер етеді. Сонымен қатар, цианобактериялардың көптеген түрлері ортада азот көзі болмағанда ауадан сіңіріп алуға бейімделген. Азоттың белсенділігі жасушалардағы көптеген ферменттердің жұмысына тікелей әсер етеді: кейбір ферменттер ингибируются, кейбірінің активтілігі артады [128].

Тағы да, аммоний тұздары да жасушалардың өсуіне және сутегі өнімділігіне тікелей әсер етеді. Фототрофты микроорганизмдердің қалыпты өсуі үшін аммоний көзінің болуы маңызды рөл атқарады. Мысалы, Fascetti және әріптестері өздерінің жұмыстарында *R. sphaeroides* RV штамының фотосинтез активтілігі және оттегі өндірісі ортада аммоний тұздары болған жағдайда аз болатынын тіркеген [129]. Осыған байланысты оттегі мөлшері азайса, онда сутегі өнімділігі артуы ықтимал деген жорамалдар бар.

Айта кету керек, глутамат, альбумин сияқты химиялық қосылыстар да фототрофты организмдердегі фотосинтез процесіне тікелей қатысады. Олар цианобактериялардың азотты фиксациялау белсенділігін өзгертуі ықтимал [130]. Сонымен қатар, нитрогеназа ферментінің белсенділігіне тікелей әсер етіп, ортадағы электрондық балансты өзгертіп, нәтижесінде сутегі шығымына тікелей өз әсерін тигізеді.

Соңғы жылдары цианобактерия түрлерін қатты альгинат гелдерінде иммобилизациялау жұмыстары оң нәтижелерге қол жеткізді. Гельдер жасушалар арасындағы тұздардың бірқалыпты таралуын қамтамасыз етіп, жасушалардың зақымдануын азайтады. Жасушалардың өлу көрсеткіштері азайып тұрақты биоэнергия шығару ұзақтығы артты. Мысалы, *Anabaena* sp. PCC 7120 штамымен жүргізілген зерттеу жұмыстарында сутегінің белсенділігі бірнеше пайызға жоғары болды, авторлар осы әдісті терең зерттеу сутегі өндірісіне оң әсер ететінін ескертті [131].

Тағы бір жүргізілген зерттеу жұмысында *Synechocystis* sp. PCC 6803 жасушалар алдымен өсіріліп, кейін жинақталған биомасса кальций альгинат гелінде иммобилизацияланды [132]. Нәтижесінде, сутегі өнімділігі бірнеше күн бойына бірқалыпты жүріп отырды. Ал, *Anabaena* sp. N-7363 штамымен жүргізілген жұмыста бақылаумен салыстырғанда сутегі өнімділігі 2–3 есе артқаны айтылады [133].

2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ

2.1 Зерттеу объектілері мен материалдары

Зерттеу жұмыстарының объектісі ретінде фототрофты микроорганизмдердің келесідей табиғи және коллекциялық штамдары пайдаланылды: цианобактериялар *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 және *Anabaena* A-9.

2.2 Зерттеу әдістері

2.2.1 Балдырлар флорасының үлгілерін жинау және талдау

Зерттеу аймақтарының микробалдырлар және цианобактериялар үлгілері 2020 жылдардағы көктемде, жазда және күзде зерттелді. Үлгілер келесі жерлерден алынды:

1. Қызылорда облысы, Жаңақорған ауданындағы Сырдария өзенінің маңындағы Келінтөбе күріш алқаптары мен тоғандары;

1. Алматы облысы, Еңбекшіқазақ ауданы, Түрген ауылының егістік алқаптары мен су айдындары;

2. Түркістан облысы, Сайрам ауданы, Бадам өзенінің сулары.

Су үлгілерін алу үшін алдын ала стерильденген шыны бөтелкелер және бұрандалы қақпағы бар флакондар қолданылды. Үлгілер цианобактериялар мен микробалдырлардың өсуі айқын байқалатын таяз аймақтарынан алынды. Альгологиялық үлгілерді жинау кезінде су температурасы 23–35°C, рН 6–8, тереңдігі 0,1–2 м болды. Сондай-ақ, топырақ үлгілері алынып тазартылып, колбаларға өсірілді. Алынған барлық үлгілер таңбаланды: жапсырмаларда үлгі нөмірі, жинау уақыты мен орны, сондай-ақ, жинаушының тегі көрсетілді.

Дақылдау және таза дақылдарды бөліп алу әдістері

Өртүрлі су экожүйелерінен алынған үлгілердегі микробалдырлар мен цианобактериялардың түрлік құрамы Сиренко әдісі бойынша анықталды [134]. Фототрофты микроорганизмдердің таза дақылдарын алу мақсатында үлгілер (су, жасыл масса, шырыш) стерильді колбалар мен пробиркалардағы сұйық қоректік ортаға себіліп өсірілді. Қоректік орта көлемі колбаның шамамен 1/3–1/4 бөлігін құрайтындай етіп құйылды. Цианобактерия жасушаларын өсіру үшін негізінен BG-11 ортасы, ал микробалдырлар үшін Тамия қоректік орталары қолданылды. Сонымен қатар, BG₀-11 және модификацияланған Заррук қоректік орталары пайдаланылды [135].

Микробиологиялық әдістерді қолдана отырып, 1 мл жасуша суспензиясы қатты қоректік агары бар Петри ыдыстарына егілді. Суспензия стерильді шпательмен жағылып, колониялар қалыптастыру үшін жарыққа қойылды. Өскен колониялар кейін сұйық қоректік ортаға немесе қиғаш агарға қайта егілді. Таза дақылдар жолақтап егу және микропипеткамен экстракциялау әдістері арқылы алынды [136].

Жолақтап егу әдісі аралас дақылдардан биомассаны микробиологиялық ілмекпен жаңа қоректік ағары бар Петри ыдыстарына ауыстыруды қамтыды. Дақылдар жеке колониялар пайда болғанша инкубацияланды, содан кейін олардың тазалығын қамтамасыз ету үшін бірнеше қайта егілді.

Микропипеткамен бөліп алу әдісі жеке жасушаларды шыны микропипетка арқылы оқшаулауға негізделген [137]. Жасушалар дистилденген суы бар заттық шыныға ауыстырылып, микроскоппен тексерілді. Жасушаларды стандартты жағдайларда сұйық ортада өсірмес бұрын ластануды жою үшін үдеріс қайталанды.

Бактериологиялық таза дақыл алу үшін цианобактерия изоляттары алдымен бірнеше рет қайта егілді. Одан кейін ілеспе бактериялық микрофлораны азайту мақсатында әр изолятқа сәйкес таңдалған антибиотик концентрациялары қолданылды. Өңдеуден соң дақылдар жаңа қоректік ортаға көшіріліп, олардың тазалығы жарық микроскопы арқылы тексерілді. Аксеникалық күйін нақтылау үшін дақылдар гетеротрофты бактерияларға арналған қоректік ортаға қосымша егілді. Егер бұл ортада бактериялық өсу байқалмаса және микроскопиялық бақылауда бөгде микроорганизмдер анықталмаса, дақыл аксеникалық деп бағаланды.

Бөлінген цианобактерия дақылдары зертханалық жағдайда 23-27°C температурада термостатта өсірілді. Жарық қарқындылығы цианобактерия түріне байланысты 40-60 мкмоль фотон/м²/с деңгейінде болды. Бөлінген түрлер үшін оңтайлы қоректік орталар Аллен және BG-11 (pH 7,1) орталары болды. Араластыру компрессор арқылы флакондарға берілетін стерильді ауамен жүзеге асырылды. Ауаны стерильдеу үшін диаметрі 0,2 мкм сүзгілер және пробиркаға салынған мақта қолданылды [138, 139]. Жарық қарқындылығы бес жерден (төрт бұрышынан және ортасы) LI -180 жарық өлшегішпен өлшенді (Spectrometer LI-COR Environmental, USA).

Дақылдау жағдайларын оңтайландыру

Тәжірибелер үшін цианобактерия дақылдары көлемі 100 мл, 500 мл және 1 л виалдарда 60 мкмоль фотон/м²/с жарық қарқындылығында, орташа 25°C температурада және 0,1% CO₂ қоспасында өсірілді.

Дақылдардың өсуі логарифмдік фазаға жеткенде жасушалар суспензиядан центрифугалау арқылы бөлінді (5424R, Eppendorf, Германия) (6000 айн/мин). Супернатант төгіліп, тұнба азотсыз BG₀-11 қоректік ортасымен екі рет жуылды. Содан кейін жасушалар 100 мл BG₀-11 ортасында қайта суспензияланып, 10 минут ұсталды. Барлық зерттелген цианобактерия жасушаларының оптикалық тығыздығы спектрофотометрия әдісімен (UV-VIS Spectrophotometer UV-2600i, Shimadzu, Токио, Жапония) 720 нм толқын ұзындығында OT₇₂₀ = 0,5 мәніне дейін теңестірілді. Одан соң жасушалар көлемі 200 мл флакондарға ауыстырылып, 24 сағат бойы 30 мкмоль фотон/м²/с жарықта инкубацияланды. Кейін жасушалар қайтадан центрифугаланып, 20-50 мл BG₀-11 ортасы қосылды. Соңғы өңдеуден кейін жасушалар 10 мл BG₀-11 ортасына ауыстырылып, 720 нм толқын ұзындығында оптикалық тығыздық OT₇₂₀ = 1,5 мәніне дейін теңестірілді.

Суспензия 50 мМ HEPES-KOH (pH 7,1) және 100 мМ NaHCO₃ қосу арқылы модификацияланды. Қараңғы жағдайдағы тәжірибелерде виалдың сыртқы жағы фольгамен қапталып, 150 айн/мин жылдамдықтағы термошейкерге орналастырылды. Барлық процедуралар үш қайталамада орындалды [70].

2.2.2 Цианобактерия штамдарын идентификациялау әдістері

Цианобактерия жасушаларынан ДНҚ бөліп алу үшін фенол-хлороформ әдісі қолданылды. Цианобактерия дақылдары логарифмдік өсу фазасына дейін өсіріліп, кейін центрифугаланды (5424r, Eppendorf, Германия), 10000 айн/мин жылдамдықта. Биомассаға 0,5 мл лизис буфері қосылды (құрамында 100 мМ ЭДТА, 50 мМ Tris және 25% сахароза).

Жасушалар бөлме температурасында 1 сағат қараңғыда инкубацияланды, содан кейін лизоцим, 1% натрий лаурилсульфаты және 100 мкг/мл протеиназа қосылды. Термошейкерде қосымша 1 сағат инкубациядан кейін материал ДНҚ экстракциясы үшін фенол/хлороформ/изоамил спирті қоспасымен (25:24:1) өңделді. Кейін материалға 70% этанол қосылып, үстіне TRIS буфері құйылды да, -20°C-та сақталды. Алынған ДНҚ қажет болған жағдайда ерітіліп, ПЦР жүргізу үшін қолданылды [140].

Полимеразды тізбекті реакция (ПЦР) үшін қоспаға 2 мкл Pfu (10X) қоспасы, 1 мкл тазартылған ДНҚ, 1 мкл dNTP қоспасы, 1 мкл тура праймер және 1 мкл кері праймер қосылды (қосымшада көрсетілген). ПЦР-дан кейінгі алынған ДНҚ фрагменттері 0,5×TBE қосылған агарозды гельге жүктеліп, 0,5 мкг/мл этидий бромидімен боялып, ультракүлгін сәуле астында гель жолақтары тіркелді [141, 142].

Секвенирлеу

16S рРНҚ генінің күшейтілген фрагменттерін секвенирлеу Қытай Ғылым академиясының (CAS) Тяньцзинь өнеркәсіптік биотехнология институтында тікелей (Sanger) секвенирлеу әдісін қолдану арқылы жүргізілді. Тазартылған ПТР өнімдері секвенирлеуге ұсынылды және алынған деректердің сенімділігін арттыру үшін оқу екі бағытта (тура және кері праймерлерді пайдалану арқылы) жүргізілді. Провайдер түпнұсқа хроматограммаларды (электроферограммаларды) және жиналған нуклеотидтік тізбектерді ұсынды. Секвенирлеу сапасы хроматограммаларды қарау арқылы бақыланды. Әр үлгідегі негізгі шыңдар тексеріліп, оқылымдардың соңындағы сапасы төмен аймақтар алынып тасталды. Қос шыңдар немесе фондық сигнал байқалған күмәнді позициялар тура және кері оқылымдармен салыстырылып нақтыланды. Өңдеуден кейін алынған тізбектер консенсусқа біріктіріліп, соңғы нұсқасы хроматограммаларды қайта тексеру арқылы расталды.

Филогенетикалық анализ

Бұл талдау әдісі MEGAX бағдарламасын пайдаланып филогенетикалық ағаш құрудың биоинформатикалық тәсіліне негізделген. Биоинформатикалық зерттеу барысында нуклеотидтік тізбектер визуалды тексеріліп, бастапқы тізбектердің шеткі бөліктерінен сапасы төмен нуклеотидтер алынып тасталды.

Нуклеотидтік тізбектер NCBI BLAST дерекқорынан алынып, жақын түрлердің дақылдарымен генетикалық ұқсастығы бойынша салыстырылды. Бағдарламада 1000 рет қайталау (bootstrap) арқылы филогенетикалық ағаш тұрғызылды [143].

2.2.3 Цианобактерия штамдары арқылы сутегі алу әдістері

Бөлінген цианобактерия штамдарының сутек бөлетін негізгі ферменттерінің белсенділігін анықтау. 1 л-лік құтылардан 40 мл суспензия пробиркаға ауыстырылып, 10 000 айн/мин жылдамдықта 5 минут центрифугаланды. Супернатант алынып тасталып, жасушалар азотсыз 100 мл BG₀-11 ортасында қайта суспензияланды және 3 минут араластырылды. Алдын ала өсірілген жасушалардың оптикалық тығыздығы V-630 спектрофотометрі (Jasco, Жапония) көмегімен 730 нм толқын ұзындығында $OD_{730} = 0,4$ мәніне дейін реттелді. Дақылдар жарықта біржақты режимде бір тәулік бойы (жарық қарқындылығы 30 мкмоль фотон/м²/с, температура 23–27°C) инкубацияланды, содан кейін Himac CR 22G (Hitachi, Жапония) центрифугасын пайдаланып 10 000 айн/мин жылдамдықта 5 минут центрифугалау арқылы жиналды. Супернатантты алып тастағаннан кейін 30 мл жаңа BG₀-11 ортасы қосылып, жасушалар қайтадан 10 000 айн/мин жылдамдықта 5 минут центрифугаланды. Жуу қадамы екі рет қайталанды [12, 70].

Келесі кезеңде жуылған жасушалар газдық хроматографияға арналған (GC) герметикалық виалға көшірілді. 7,5 мл-лік BG₀-11 қоректік ортасы 50 mM HEPES-KOH (pH 7,4) және 100 mM NaHCO₃ қоспаларымен модификацияланды. Сонымен қатар, 730 нм толқын ұзындығында оптикалық тығыздық 1,5 мәніне дейін теңестірілді. Бөлінген сутек газы жиналу үшін 10 мл бос кеңістік қалдырылды. Еріген O₂ мөлшерін азайту үшін GC-виалға 40 минут бойы шприц арқылы аргон газы берілді (аргонмен үрлеу). Атмосфералық ауаның кері енуін болдырмау мақсатында газды шығару екінші инемен (шығару инесі) жүзеге асырылды; анаэробты жағдайды қалыптастыру Masukawa әдісі [144] бойынша орындалды. Содан кейін құты бөлме температурасында жарық және қараңғы жағдайларда инкубацияланды. Жарық жағдайында құты бір жақтан үздіксіз жарыққа (қарқындылығы 30 мкмоль фотон/м²/с) ұшыратылып, VIAL STIRRER HS-10VA (AS ONE, Жапония) құрылғысында магнитті микроараластырғыш (micro stirring bars) көмегімен 150 айн/мин жылдамдықта араластырылды. Қараңғы жағдайда құты фольгамен оралып, 25°C температураға орнатылған BioShaker BR-22FP (TAITEC, Жапония) құрылғысына орналастырылды [94, 145, 146].

Бөлінген цианобактерия штамдарының екі бағытты гидрогеназа белсенділігін анықтау. Екі бағытты [NiFe]-гидрогеназаның белсенділігі *in vivo* анаэробтандырылған жасушалық суспензиясы бар герметикалық виалдарда молекулалық сутегі жиналу жылдамдығы арқылы анықталды. Жасанды электрон тасымалдаушы ретінде натрий дитионитімен тотықсыздандырылған метилвиологен қолданылды (MV – 2 mM, Na₂S₂O₄ – 10 mM, соңғы концентрациялар); реагенттер қосылғаннан кейін үлгілер берілген 60 сағат бойы

бақыланып 25-26°C температурада инкубацияланды. Газ фазасындағы сутегі концентрациясы газдық хроматография әдісі арқылы анықталды. Сутегі түзілу белсенділігі уақыт бірлігінде түзілген сутегі мөлшері ретінде есептеліп, нәтижелер биомассаға немесе дақылдың оптикалық тығыздығына қатысты көрсетілді [147, 148].

Бөлінген цианобактерия штамдарының нитрогеназа белсенділігін анықтау. Цианобактериялық жасушалардағы нитрогеназа ферментінің (N₂аза) белсенділігі ацетиленді (C₂H₂) этиленге (C₂H₄) тотықсыздандыру анализін қолдана отырып *in vivo*-да зерттелді. Реакция 30 мл газды хроматографиялық құтыларда жүргізілді, газды бөлу үшін 10 мл орын қалдырылды. Анаэробты ортаны жасау үшін 10% ацетилен мен 90% аргон газының қоспасы қолданылды. Газ қоспасы құтыларға 20 минут бойы енгізілді. 24 сағаттан кейін жинақталған газ қоспасы газ хроматографын (GC-15A, Shimadzu, Жапония) пайдаланып талданды. Ферменттің белсенділігі сағатына мкмоль этилен мг хлорофиллге а (мкмоль этилен/мг хлорофилл а/сағ) ретінде көрсетілді [149].

2.2.4 Биохимиялық зерттеу әдістері

Фермент белсенділігін талдау үшін фотосинтез ингибиторларын қолдану әдістемесі. Фотосинтез ингибиторлары (СССР, DBMIB, DCMU, KCN) алдын ала диметилсульфоксидте (ДМСО) немесе дистилденген суда ерітіліп, суспензияларға әртүрлі концентрацияда қосылды (СССР, мкМ: 0,0; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; DBMIB, мкМ: 0; 5; 10; 20; 40; 80; DCMU, мкМ: 0; 5; 10; 20; 40; 80; KCN, мкМ: 0; 100; 250; 500; 1000). Анаэробты жағдайды қалыптастыру үшін ингибитор қосылған виалға 100% аргонмен 40 минут бойы үрленіп, содан кейін газдық хроматография виалдарының қақпақтары мықтап жабылды. Қараңғы жағдайда жүргізілген тәжірибелерде жарықтың түсуін болдырмау үшін виалдар қосымша фольгамен оралды [12, 42, 70, 150, 151].

Хлорофилл а мөлшерін анықтау. Әр тәжірибенің соңында хлорофилл а мөлшерін анықтау үшін виалдан 200 мкл жасушалық суспензия алынып, көлемі 1,5 мл болатын микропробиркаға құйылды. Үлгіге 800 мкл 100% метанол қосылып, қараңғыда 4°C температурада 40 минут инкубацияланды. Метанолмен экстракциялау кезінде пробирка фольгамен оралып, жарықпен тікелей жанасуының алдын алу қамтамасыз етілді. Одан кейін пробирка 1000 айн/мин жылдамдықта 10 минут шейкерде шайқалып, 15 000 айн/мин жылдамдықта 10 минут центрифугаланды. Супернатанттың оптикалық тығыздығы спектрофотометрмен 730 нм, 646,6 нм және 663,6 нм толқын ұзындықтарында өлшенді. Алынған мәндер негізінде хлорофилл а концентрациясы (хлорофилл а, мг/л) төмендегі (1) формула бойынша есептелді [70, 152, 153]:

$$\text{хл } a \text{ (мг/л)} = 11,85 \times (A_{663.6} - A_{730}) - 1,54 \times (A_{646.6} - A_{730}) \quad (1)$$

мұнда А663.6 – 663,6 нм толқын ұзындығындағы оптикалық тығыздық (абсорбция), А646.6 – 646,6 нм толқын ұзындығындағы оптикалық тығыздық А730 – 730 нм толқын ұзындығындағы оптикалық тығыздық.

2.2.4.1 Газ фазасындағы сутегі концентрациясын газдық хроматография әдісімен анықтау

Жуылған жасушалар 20 мл GC-виалға 7,5 мл көлемінде құйылып, газ алмасу үшін 10 мл газ фазасына қалдырады. Аргонмен анаэробты орта қалыптасқаннан кейін, газ фазасы Ar-мен алмастырылды. Үлгілер жарық немесе қарғы жағдайда инкубацияланды. Инкубациядан кейін 24 сағат сайын газ-тығыз шприцпен 500 мкл (0,5 мл) газ алынып, газ хроматографқа енгізіледі (GC Agilent 8890). Сутек концентрациясы молекулалық елек 5А (molecular sieve 5А) колонкасы және TCD детекторы бар GC көмегімен анықталды; тасымалдаушы газ ретінде аргон қолданылды. Колонка және инжектор температурасы 80°C, детектор температурасы 120°C деңгейінде ұсталды. Есептеу сутегі стандарты бойынша алынған калибрлеу қисығы (peak area→моль сутегі) негізделді. Сутегі концентрациясын төмендегі формула (2) бойынша есептедік [154]:

Калибрлеу қисығын алу үшін least-squares әдісімен есептелді:

$$Area = k \times n + b) \quad (2)$$

Мұнда *Area* – пик ауданы, *n* – енгізілген сутек мөлшері (мкмоль/нмоль), *k* және *b* – регрессия коэффициенттері. Үлгідегі енгізілген газдың сутегі мөлшері:

$$n_{inj} = (Area_{\text{үлгі}} - b) / k) \quad (3)$$

Үлгідегі газ фазасынан алынған 500 мкл газ-тығыз шприцпен алынғандықтан, виалдағы газ фазасындағы сутегі мөлшері біркелкі араласқан деп қабылданып, көлемдік қатынас арқылы есептеледі:

$$n_{HS} = n_{inj} \times \frac{V_{HS}}{V_{inj}}) \quad (4)$$

V_{HS} = 10 мл – газ фазасы көлемі, V_{inj} – 500 мкл (0,5 мл) – GC-ға енгізілген газ көлемі.

Сутегі түзілу жылдамдығы уақыт бойынша келесі формула арқылы есептелді:

$$P = \frac{T_2 - T_1}{\Delta T}) \quad (5)$$

Хлорофилл *a* концентрациясы келесі формуламен есептелді:

$$P_{\text{норм}} = \frac{P}{m \text{ chl } a}) \quad (6)$$

2.2.5 Цианобактерия штамдарын иммобилизациялау әдістері

Synechocystis sp. PSU 1262 штамын иммобилизациялау үшін құрғақ салмағы 1,6 г/л болатын 50 мл BG-11 қоректік ортасы дәл сондай көлемдегі стерильді натрий альгинаты ерітіндісімен араластырылды (су негізіндегі 20 мМ ерітінді немесе рН 7,0 деңгейінде ұсталған BG-11-TRIS негізіндегі ерітінді). Қоспа 5 минут бойы жайлап араластырылып, кейін агрегацияны болдырмау үшін, CaCl_2 ерітіндісіне тамшылатып баяу қосылды және бөлме температурасында 30 минут ұсталды. Содан соң жасушалар BG-11 ортасымен екі рет жуылып, жиналып, 50 мкмоль фотон/м²/с қарқындылықтағы жасанды жарық астындағы виалдарға орналастырылды. Сутек өндіру үшін BG₀-11 қоректік ортасы қолданылды [94, 155].

3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ТАЛҚЫЛАУЛАР

3.1 Қазақстан Республикасының әртүрлі экожүйелерінен сутегі өндіруге қабілетті жаңа белсенді цианобактерияларды бөліп алу

Бөліп алу жұмыстары 2020 жылдың маусым айында басталды. Экспедициялық зерттеулер Қазақстанның үш өңірінде жүргізілді. Зерттеу барысында изоляттар коллекциясы қалыптастырылып, цианобактериялардың жаңа штамдарына бастапқы сұрыптау (скрининг) жұмыстары жүргізілді.

Үлгілер үш түрлі экожүйеден алынды:

1. Қызылорда облысы, Жаңақорған ауданының күріш алқаптары;
2. Алматы облысы, Еңбекшіқазақ ауданы, Түрген ауылының алқаптары мен су айдындары;
3. Түркістан облысы, Сайрам ауданы, Бадам өзенінің сулары.

Қызылорда облысының Жаңақорған ауданының су және топырақ экожүйелерінен және егістік аймақтардағы күріш тамырларынан көптеген үлгілер алынды. Үлгілер алынған негізгі аймақтар Авангард және Ақжол ауылының Сырдария өзеніне жақын аймақтары болды. Бас-аяғы 6 түрлі нүктеден 18-ге жуық фототрофты микроорганизмдердің үлгілері жиналды. Көбіне үлгілер сулардың бетінде көгершіктеніп тұрған алқаптар, өсімдік жапырақтарындағы көк дақтар және топырақтардан алынды. Көбіне үлгілер басқа да микроорганизмдермен бірге қауымдастық құрып бірлесе тіршілік етеді. Осы аймақтардағы өсетін өсімдіктердің бетінде жиі кездесетін цианобактерия түрлеріне *Anabaena variabilis*, *Calothrix braunii*, *Phormidium* жатты. Ал, қалдық лайлы аймақтарда тіршілік ететін түрлерге *Scytonema*, *Tolypothrix distorta* түрлеріне ұқсас микроорганизмдер тіршілік ететіні байқалды. Барлық анықталған фототрофты микроорганизмдер таксондарына келесілер жатты: 5 *Cyanobacteria* (41,67%), 5 *Bacillariophyta* (16,67%), 1 *Euglenophyta* (18,33%) және 4 *Chlorophyta* (33,33%) болды. Арнайы морфологиялық қасиеттері көрсетілген кітаптар көмегімен анықталмаған түрлер ары қарайғы зерттеу жұмыстарына алынбады.

Алматы облысы (Түрген ауылы). Бұл аумақта фототрофты микроорганизмдерді зерттеу үшін топырақтан және судан 20 үлгі алынды. Аталған аймақта цианобактериялардың 3 таксоны және микробалдырлардың 11 таксоны идентификацияланды. Цианобактерия түрлері негізінен судан шығып тұрған өсімдік сабақтарының бетінде кездесті, ал микробалдыр түрлері ағынсыз суларда және өсімдік қалдықтарында анықталды. Түрген ауылының жыртылған алқаптары мен су-батпақты жерлерінен алынған үлгілерде біржасушалы цианобактериялар басым болды, ал бұған дейін зерттелген күріш алқаптарында микробалдырлар доминант болды. Талдау таксондардың келесі үлестірімін көрсетті: *Cyanobacteria* 3 (37,5%), *Bacillariophyta* 2 (25,0%), *Chlorophyta* 3 (37,5%); *Euglenophyta* өкілдері анықталған жоқ.

Түркістан облысы (Бадам өзені). Су үлгілері Сайрам ауданында таулы аңғардан бастау алып, қалалық және ауылдық аумақтар арқылы ағатын өзен

аумағынан алынды. Бір-біріне жақын орналасқан нүктелерден 18 үлгі жиналды. Өзен арнасынан алшақ жатқан бір аумағында шалшықтардың беті биопленкамен жабылған. Фототрофты микроорганизмдердің фотосинтетикалық белсенділігін судың бетіндегі ұсақ көпіршіктерден көруге болады. Зерттелген үлгілерде фототрофты микроорганизмдердің 9 таксоны анықталды, оның ішінде цианобактериялардың 4 таксоны: *Synechocystis*, *Oscillatoria*, *Phormidium* және *Nostoc*. Цианобактериялардан бөлек диатомды және жасыл микробалдырлар табылды. Соңғыларының ішінде *Chlorella* туысының өкілдері айтарлықтай үлеске ие болды, олар үшін (барлық жасыл балдырлар сияқты) хлорофилл *a* және *b* болуы тән. Таксономиялық құрамы: *Cyanobacteria* 4 (44,4%), *Bacillariophyta* 1 (11,1%), *Euglenophyta* 2 (22,2%), *Chlorophyta* 2 (22,2%). Үлгі алу кезінде су температурасы 20–25°C аралығында ауытқыды, ал су pH мәні 6,5–7,1 болды.

Алынған нәтижелер бойынша жиынтық көрсеткіштер 3-кестеде берілген. Көрсетілген мәліметтер зерттелген аумақтар шегінде доминантты таксондардың түрлік әртүрлілігі мен таралу ерекшеліктерін сипаттайды.

Кесте 3 – Цианобактериялық дақылдар бөлініп алынған экожүйелер

Зертте лген аумақ	Коорди наттар	Үлгі алын ған нүкт елер	Жина лған үлгіле р	Фототр офтар таксонд ары	Цианоба ктерия таксонда ры	Жиі кездесетін цианобакт ериялар	Таксонд ық құрам, n (%)
1	2	3	4	5	6	7	8
Жаңақ орған ауданы ның күріш алқапт ары (Қызы лорда обл.)	43.8774 11, 67.2061 02	6	18	12	5	<i>Anabaena variabilis</i> , <i>Calothrix braunii</i> , <i>Desertifilu m</i> sp., <i>Oscillatori a</i> sp., <i>Tolypothrix distorta</i>	Cyanoba acteria: 5 (41,67%) , Bacillario phyta: 2 (16,67%) , Euglenop hyta: 1 (8,33%), Chloroph yta: 4 (33,33%) .

3-кестенің жалғасы

1	2	3	4	5	6	7	8
Түрген ауылының егістік алқаптары және су айдындары (Еңбекшіқазақ ауд., Алматы обл.)	43.396875, 77.586164	9	20	8	3	<i>Synechococcus</i> sp., <i>Desertifilum</i> sp., <i>Chroococcus</i> sp.	Cyanobacteria: 3 (37,5%), Bacillariophyta: 2 (25,0%), Chlorophyta: 3 (37,5%).
Бадам өзенінің сулары (Сайрам ауд., Түркістан обл.)	42.265652, 69.687269	6	18	9	4	<i>Synechocystis</i> sp., <i>Oscillatoria</i> sp., <i>Phormidium</i> sp.	Cyanobacteria: 4 (44,4%), Bacillariophyta: 1 (11,1%), Euglenophyta: 2 (22,2%), Chlorophyta: 2 (22,2%).
Барлығы	—	21	56	29	12	<i>Anabaena variabilis</i> , <i>Calothrix braunii</i> , <i>Desertifilum</i> sp., <i>Oscillatoria</i> sp., <i>Tolypothrix distorta</i> , <i>Synechococcus</i> sp., <i>Chroococcus</i> sp. және т.б.	Cyanobacteria: 12 (41,3%), Bacillariophyta: 2 (6,8%). Euglenophyta: 3 (10,3%). Chlorophyta: 9 (31,0%).

Қазақстан Республикасының үш өңірінен алынған үлгілерді зерттеу барысында 56 альгологиялық сынама жиналды. Талдау нәтижесінде фототрофты микроорганизмдердің 29 таксоны анықталды. Бұл организмдер морфологиялық тұрғыдан бір-бірінен ерекшеленеді және 3 бөлімге, 4 класқа және 8 отрядқа жатады. Үлгілер алынған орындарда су бетінде микроорганизмдердің жасылдау-қоңыр түсті шоғырлары байқалды.

Микроскопиялық талдау, цианобактерия жасушаларында көптеген газдық везикулалардың бар екенін көрсетті. Бұл морфологиялық белгі организмдердің

жүзгіштігін қамтамасыз ететін жоғары фотосинтетикалық белсенділікпен байланыстырылады. Үлгі алынған аймақтарда су температурасы 19–25°C болды, ал, pH мәні 6,9–7,2 аралығында өзгерді.

Таксономиялық құрылымы бойынша фототрофты микроорганизмдер флорасы келесідей болды: *Cyanobacteria* (41,3%), *Bacillariophyta* (6,8%), *Euglenophyta* (10,3%), *Chlorophyta* (31%).

Табиғи экожүйелерден фототрофтардың таза дақылдарын бөліп алу үлгілерде күрделі бактериалдық қауымдастықтардың болуына байланысты айтарлықтай қиындық туғызады. Цианобактериялармен байланысқан симбиоттық бактериялар стандартты қоректік орталарда жоғары бәсекеге қабілетті болып, альгологиялық дақылдардың контаминациясына әкелуі мүмкін.

Микробалдырлар мен цианобактерияларды ілеспе микрофлорадан тазарту еңбекті көп қажет ететін үдеріс болғанымен, тазарту хаттамасын, соның ішінде қоректік ортаға штрихтау және қайта егу әдістерін жүйелі түрде қолдану аксенді (бактериологиялық таза) штамдарды алуға мүмкіндік береді. Таза дақылдарды бөліп алу, белсенді өсетін жаңа цианобактерия изоляттарын алу және олардың биотехнологиялық әлеуетін (соның ішінде биоэнергетика тұрғысынан) бағалау мақсатында жүргізілді. Ерекше назар биомасса жинақтай алатын формаларға аударылды.

Таза альгологиялық дақылдарды бөліп алу үшін микробиологиялық әдістер қолданылып, нәтижесінде 6 таза изолят алынды. Дақылдарды бөліп алу үдерісі фототрофты микроорганизмдерді өсіруге арналған BG-11, BG₀-11, Заррука және Аллен қоректік орталарында тізбекті инокуляциялар (қайта сұйылту және қатты ортаға егу) арқылы жүргізілді.

Таза дақылдардан алынған үлгілер алдымен сұйық қоректік ортаға, кейін қатты агарлы ортаға көшірілді. Барлық тәжірибелерде жарықтың орташа қарқындылығы (30–60 мкмоль фотон/м²/с) қамтамасыз етілді. Тәжірибелердің бір бөлігінде сұйық ортадағы дақылдар ауамен аэрацияланды.

Өсіп шыққан дақылдардың тазалығы әр кезеңде микроскопиялық бақылау арқылы тексерілді. Сұйық ортада таза дақыл материалы алынғаннан кейін дақылдарды агарлы және сұйық орталарға қайта егу бірнеше рет қайталанып отырды. Бұл кезде агарланған қоректік ортада «штрихтау» егу әдісі қолданылды. Стерильді бактериологиялық ілмекпен сұйық жинақтаушы дақылдан аз мөлшерде инокулум алынып, Петри табақшасындағы агар бетіне үзбей параллель штрихтар сериясымен жағылды. Әдіс ілмектің қозғалу траекториясы бойымен жасушалық суспензия тығыздығының градиентті төмендеуіне негізделген, бұл оқшауланған колониялардың қалыптасуын қамтамасыз етеді. Егулер 40–60 мкмоль фотон/м²/с жағдайында жарық камерасында, 23–27°C температурасында 1–2 ай инкубацияланып, кейін өскен колониялардың тазалығы микроскоппен бақыланды.

Таза дақылдарды бөліп алудың кезеңдері (Сурет 3) [156]:

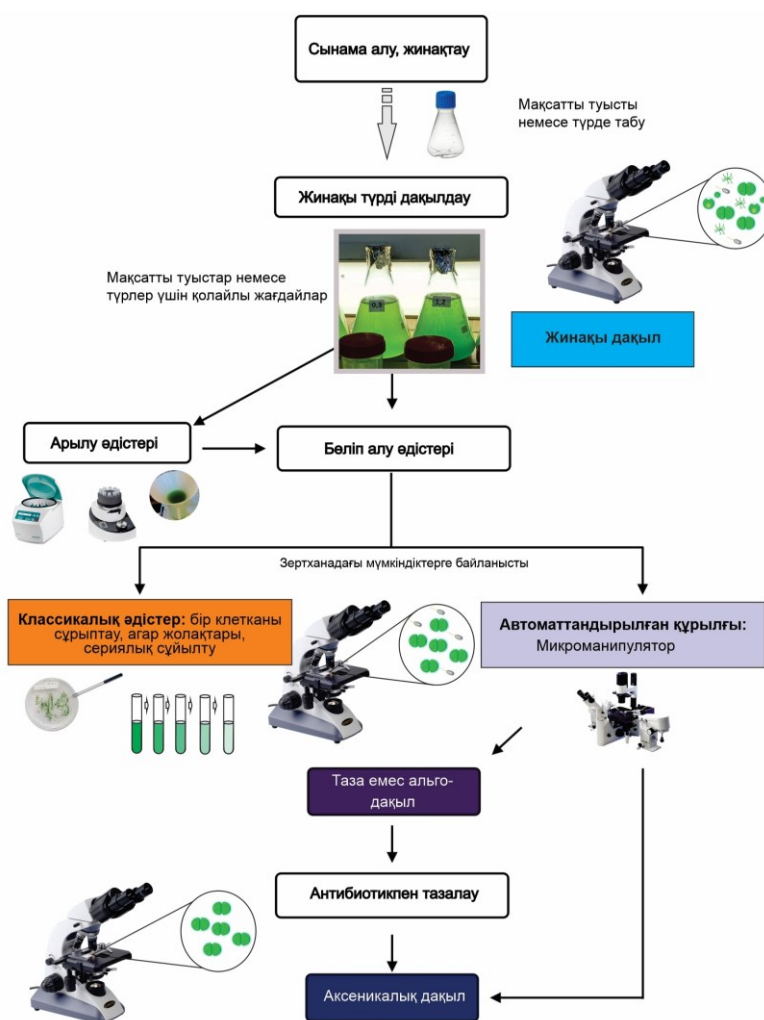
1. Бастапқы инокуляция. Колонияларды оқшаулау микроскоп астында Пастер пипеткалары көмегімен жүргізілді. Бастапқы кезеңде дақылдардың

көпшілігінде бактериялар, саңырауқұлақ споралары және микробалдырлар болды.

2. Қайта егулер және микроманипуляциялар. Морфологиялық тұрғыдан таза колонияларды таңдап алып, жаңа ортаға қайта егу арқылы сериялық көшірмелер жасалды.

3. Қайта егу циклынан кейін дақылдардың тазалығы микроскопиялық бақылау арқылы бағаланды. Бақылау $\times 1000$ үлкейту кезінде жүргізіліп, бактериалдық немесе саңырауқұлақтық контаминацияның болуы анықталды.

4. Ілеспе микрофлораны селективті тежеу. Бөгде микрофлораның өсуін шектеу үшін қоректік ортаға 50–100 мг/л концентрациядағы антибиотиктер енгізілді. Бұл концентрациялар цианобактериялардың өміршеңдігін сақтай отырып, ілеспе микроорганизмдердің өсуін тиімді тежеді. Оңтайлы концентрациялар әр изолят үшін тәжірибе жүзінде анықталды. Антибиотиктерді қолдану аксеникалық дақылдарды алуға мүмкіндік берді.



Сурет 3 – Цианобактериялардың таза дақылдарын бөліп алу схемасы

Экспедициялық зерттеулер нәтижесінде Қазақстанның үш өңірін қамтыған және әртүрлі экожүйе типтерін зерттеуге бағытталған жұмыстар барысында фототрофты микроорганизмдердің 12 альгологиялық таза изоляты бөлініп алынды. Изоляттардың ең көп саны Түркістан облысындағы Бадам өзенінің су үлгілерінен анықталды. Сонымен қатар Жаңақорған ауданының күріш агроценоздарынан 3 изолят, ал Түрген ауылының егістік алқаптары мен су айдындарынан 3 изолят бөлініп алынды. Алынған дақылдар биотехнологиялық тұрғыдан құнды штамдарды әрі қарай скринингтеу және кешенді зерттеу үшін бастапқы материал ретінде қызмет етеді. Бөлініп алынған 12 дақылдардың ішінде 6 изолят ілеспе бактериялық микрофлорадан толық тазартылып, аксеникалық күйге жеткізілді. Төменде бактериологиялық тұрғыдан таза дақылдарды алу шарттары келтірілген.

Цианобактериялардың таза дақылдарын алу үшін әртүрлі антибиотиктер әртүрлі концентрацияларда қолданылды. Тәжірибелер микробалдыр жасушаларының антибиотиктердің жоғары концентрацияларына төзімдірек екенін, ал цианобактерия дақылдары үшін 50–100 мг/л сияқты төмен концентрациялар қолданылғанын көрсетті. Дегенмен антибиотик концентрациясы жеткіліксіз болған жағдайда ілеспе бактериялардың өсуі байқалып, бұл өңдеу режимдері мен антибиотик комбинацияларын іріктеуді талап етті.

Осы тұрғыда, жарияланған әдебиет көздеріне зерттеу жасау барысында антибиотиктердің қолайлы мөлшерлері микробалдырлар, саңырауқұлақтар және цианобактерия үшін әрқалай болатыны байқалды. Нақты бір таза дақыл алу үшін тек антибиотиктермен жұмыс жасау жеткіліксіз, себебе ядросы бар ағзалар көбіне антибиотиктерге төзімді келсе, прокариоттар тез летальды жағдайға ұшырайды. *Chlorella* және *Monoraphidium* түрлері көбіне лизоцим ферментінің 20 мкг/мл концентрациясында қалыпты өсетіні байқалды, ал қалған ілеспелі ағзалар тазалау барысында антибиотик әсерінен өліп қалды [146, 157]. Айта кету керек, *Scenedesmus quadricauda* (300 мг/л) және *Tetraselmis suecica* (55 мг/л) микробалдырлары тетрациклин антибиотигінің белгілі бір мөлшеріне төзімділік танытты [157]. Сонымен қатар, *Haematococcus pluvialis* штамының өсуі және фотосинтез активтілігі триметоприм антибиотигінің 20 мг/л мөлшерінде өзгермегенін көруге болады [158]. Ал, *Chlorella vulgaris* микробалдырының өсуі азитромицинмен қосылған ластанған суда өскенде оны тазарту тиімділігі 30 % болды [159].

Фототрофты дақылдарды бактериялардан тазарту үшін антибиотиктердің әртүрлі комбинациялары да қолданылған. *Chlorella* sp. және *Desmodesmus* sp. үшін BG-11 ортасына ампициллинді 50 мг/л концентрацияда қосу тиімді болған, ал *Chlorella sorokiniana* және *Desmodesmus* sp. үшін 100 мг/л қолданылған [160, 161].

Nannochloropsis sp. және *Cylindrotheca* sp. ампициллин, гентамицин, канамицин, неомицин және стрептомицин қоспасымен (әрқайсысы 600 мг/л) 3 күн өңделгеннен кейін өсуін қалпына келтіретіні көрсетілген. *Tetraselmis* sp.

және *Amphikrikos* sp. да антибиотиктердің жоғары концентрацияларымен өңделіп, антибиотиксіз ортаға көшірілгеннен кейін өсуін қайта қалпына келтірген [162].

Бөлініп алынған цианобактерия изоляттарын тазарту үшін төмендегі антибиотиктер мен концентрациялар қолданылды:

1. PSU 1120 изоляты: тетрациклин 80 мг/л қосылғанда ілеспе бактериялар жойылды, ал цианобактериялар жарыққа қолжетімділік арқасында тіршілік қабілетін сақтады;

2. SU 78 изоляты: пенициллин 50 мг/л концентрациясында цианобактерия жасушаларының қалыпты өсу байқалды, ал басқа антибиотиктер оң нәтиже бермеді;

3. PSU 1129 және PSU 1262 изоляттары: тетрациклин 100 мг/л концентрациясында таза дақылдар алынды;

4. S-001 изоляты: амоксициллин және тетрациклин қолданылып, жұмыс концентрация диапазоны 50–100 мг/л болды (концентрациялар жеке іріктелді; тазалық микроскопия/егулер арқылы бақыланды);

5. PSU 1008 изоляты: цианобактерия жасушалары неомициннің 80 мг/л концентрациясында өсе алды.

Дегенмен, антибиотик концентрациясының жоғарылауы тек сателлитті бактерияларға ғана емес, цианобактерия дақылдарының өзіне де бактерицидті әсер етуі мүмкін екенін атап өткен жөн. Осыған қарамастан, циклдік іріктеу серияларын (градиентті сұйылтулар, экспозиция уақытын өзгерту және антибиотиктерді алмастырып қолдану) жүргізу нәтижесінде цианобактериялардың өміршеңдігін сақтай отырып, ілеспе микробиотаның өсуін селективті түрде тежеуге мүмкіндік беретін өңдеу режимдері онтайландырылды.

Өртүрлі антибиотик түрлерінің бактериялар мен цианобактериялардың өсуіне әсерін зерттеу нәтижелері 4,5,6-кестелерде келтірілген.

Кесте 4 – Цианобактериялардың (ЦБ) аксендік дақылдарын алу кезінде антибиотиктердің бактериялардан (Б) тазарту тиімділігіне әсері. Түрген ауылының (Алматы обл.) егістік алқаптары және су айдындары

Изолят	Амоксициллин (Б/ЦБ) 50 мг/л	Тетрациклин (Б/ЦБ)80 мг/л	Пенициллин (Б/ЦБ)50 мг/л	Неомицин (Б/ЦБ)80мг/л
PSU 1008	өспеді/өсті	өспеді/өсті	өспеді/өспеді	өспеді/өспеді
SU 78	өспеді/өспеді	өсті/өсті	өспеді/өсті	өсті/өсті
SU 79	өспеді/өспеді	өспеді/өспеді	өсті/өсті	өспеді/өсті
PSU 1007	өспеді/өсті	өспеді/өспеді	өспеді/өспеді	өспеді/өсті
PSU 1012	өсті/өсті	өсті/өсті	өспеді/өсті	өспеді/өсті

Ескерту: ЦБ – цианобактерия, Б – бактерия

Кесте 5 – Цианобактериялардың аксендік дақылдарын алу кезінде антибиотиктердің бактериялардан тазарту тиімділігіне әсері. Келінтөбе (Қызылорда обл.) күріш алқаптары

Изолят	Амоксициллин (Б/ЦБ) 50 мг/л	Тетрациклин (Б/ЦБ)80 мг/л	Пенициллин (Б/ЦБ)50 мг/л	Неомицин (Б/ЦБ)80мг/л
S-001	өспеді/өсті	өспеді/өсті	өспеді/өспеді	өспеді/өспеді
PSU 1129	өсті/өсті	өспеді/өсті	өсті/өсті	өсті/өсті
S-005	өспеді/өсті	өсті/өспеді	өсті/өспеді	өсті/өспеді
PSU 1132	өспеді/өспеді	өсті/өсті	өспеді/өсті	өсті/өсті
SU-002	өспеді/өспеді	өсті/өспеді	өсті/өспеді	өспеді/өсті

Ескерту: ЦБ – цианобактерия, Б – бактерия

Кесте 6 – Цианобактериялардың аксендік дақылдарын алу кезінде антибиотиктердің бактериялардан тазарту тиімділігіне әсері. Бадам өзенінің (Түркістан обл.) өзен сулары.

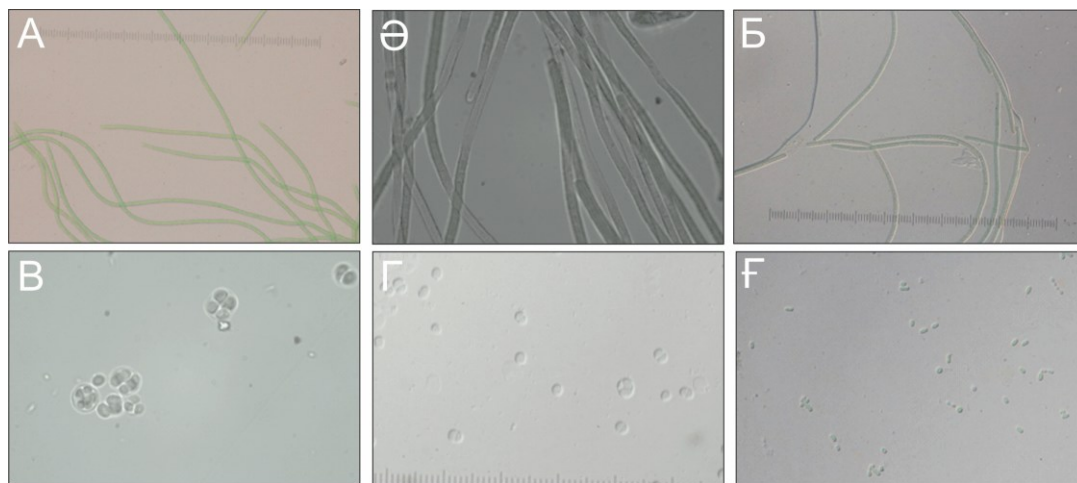
Изоляттар	Амоксициллин, (Б/ЦБ) 50 мг/л	Тетрациклин, (Б/ЦБ), 80 мг/л	Пенициллин, (Б/ЦБ), 50 мг/л	Неомицин, (Б/ЦБ), 80мг/л
PSU 1120	өсті/өсті	өсті/ өспеді	өсті/өсті	өспеді/ өсті
PSU 1262	өсті/өсті	өспеді/ өсті	өспеді/ өсті	өспеді/ өсті
SU 1207	өспеді/өспеді	өспеді/өспеді	өсті/өсті	өспеді/ өсті
SU 1209	өсті/өсті	өспеді/ өсті	өспеді/өспеді	өспеді/өспеді
SU S-006	өспеді/өспеді	өсті/өсті	өспеді/ өсті	өспеді/ өсті

Ескерту: ЦБ – цианобактерия, Б – бактерия

Зерттеу жұмыстарының нәтижесінде, біз әр түрге арналған арнайы әдіс-тәсілдер тізбегі пайда болды. Сол арқылы әрі қарай зерттеу жұмыстарында сол көрсетілген нұсқаулықтарды пайдаландық. Бактериялардың бар-жоғын бағалау үшін, цианобактерия штамдары өсіп тұрған агардан шамалы үлгі алынып, олар МПА қоректік орталарына егілді, егер ол жерден ешқандай бактерия өсіп шықпаса, онда цианобактерия түрлері биологиялық тұрғыдан таза деп бағаланды. Бактериялардан таза бөлініп алынған цианобактерия түрлері зертханалық жағдайда әр түрлі қоректік орталарда өсірілді.

Нақты жүргізілген зерттеу жұмыстарында ілеспе дақылдардың өсуін басатын, нақты қажетті цианобактерия өміршеңдігіне әсер етпейтін антибиотиктерді және олардың концентрациялары анықталды. Бұл кезең дақылдардың аксеникалық сипатын растау және ластаушы заттардың болуын жою үшін маңызды болды.

Зерттелген цианобактериялардың морфологиялық ерекшеліктері 4-суретте көрсетілген. Төменде бөлініп алынған изоляттардың морфологиялық сипаттамалары және олардың алдын ала таксономиялық орны келтірілген.



А – PSU 1129 изоляты, Ә – S-001 изоляты, Б – PSU 1120 изоляты, В – PSU 1008 изоляты, Г – PSU 1262 изоляты, F – SU 78 изоляты

Сурет 4 – Бөлініп алынған цианобактерия штамдарының микроскопиялық фотосуреттері (үлкейту 200 х)

Зерттелетін цианобактериялардың морфологиялық және физиологиялық ерекшеліктері:

1. PSU 1129 изоляты. Трихомалары дара, тармақталмайды, түзу немесе аздап иілген. Олар көк-жасыл түсті изодиметриялық, шар тәрізді немесе цилиндрлі пішінді жасушалардан тұрады. Соңғы жасушалары домалақ, кейде аздап жіңішке түседі; жасушааралық қалқалар аймағында шектеулер айқын байқалады. Қабықшасы жұқа, кейде әлсіз байқалатын шырышпен қапталған; жалған тармақталу байқалмайды. Гетероцисталар мен акинеттер түзілмейді. Қозғалысы – сырғу типті (агар бетімен трихомалардың баяу ілгерілемелі орын ауыстыруы байқалды). BG-11 ортасында тұрақты өседі (сондай-ақ, Заррука типтес сілтілі орталардың нұсқаларында да өсуі мүмкін). Өсу үшін оңтайлы жағдайлар: 25–27°C температура, рН 7,5 және орташа жарық қарқындылығы 30 мкмоль фотон/м²/с. Морфологиялық және физиологиялық белгілерінің жиынтығына сүйене отырып, бұл изолят алдын ала *Desertifilaceae* тұқымдасына жатқызылып, *Desertifilum* туысына жақын деп бағаланды.

2. S-001 изоляты тұщы су ортасынан бөлініп алынған жіпшелі цианобактерияларға жатады. Трихомалары жіп тәрізді және шырышты қабықпен қапталған. Белсенді қозғалыс байқалмайды, алайда трихома ұштарының аздап тербелуі мүмкін. Вегетативті жасушалардың ені 3,1–9 мкм аралығында өзгереді. Көбеюі жасушалардың бір жазықтықта бинарлы бөлінуі арқылы жүзеге асады. Сұйық ортада көк-жасыл түсті, аздап шырышты масса түзіп, суспензияда оңай

қалқып тұрады. Изолят тұрақты өсу қабілетін көрсетіп, сақтау кезінде аксеникалық күйін сақтайды. Ол Аллен және BG-11 қоректік орталарында жақсы өседі. Громовтың ағарланған қоректік ортасында көк-жасыл трихомалардан тұратын түйіршіктер (шар тәрізді) түзеді. BG-11 ортасында изоляттың оңтайлы өсуі 25–28°C температура және рН 7,5–8 жағдайында байқалады. Морфологиялық белгілерінің жиынтығына сәйкес бұл изолят *Oscillatoriaceae* тұқымдасына жатқызылды.

3. PSU 1120 изоляты субстратқа жабыса алатын немесе масса күйінде қалқып жүретін тығыз шырышты шоғырлар түзеді. Таллом құрылымы жұқадан тығызға дейін, нәзіктен тері тәріздіге дейін өзгеруі мүмкін. Жіпшелер кейде шоқ түрінде топтасады, ал дара орналасуы сирек байқалады. Тармақталу түзбейді; трихомалар бос орналасқан, сәл иілген, кейде дұрыс емес бұралып немесе ширатылып кетуі мүмкін. Трихомалар цилиндр пішінді, кейде ұштарына қарай жіңішкере түседі; әдетте ұзын, ені 5–15 мкм аралығында болады. Изолят BG-11 қоректік ортасында жақсы өседі. Соңғы жасушалары домалақ немесе үшкір болуы мүмкін, кейбір жағдайларда каллиптраның болуы байқалады. Морфологиялық белгілерінің жиынтығына сәйкес бұл изолят алдын ала *Phormidiaceae* тұқымдасына жақын деп бағаланды.

4. PSU 1008 изоляты екі, төрт немесе сегіз жасушадан тұратын, қорғаныш шырышты қабықпен қапталған колониялар түзеді. Жасушалары домалақ пішінді, диаметрі 0,4–40 мкм аралығында (шырышты қабықпен бірге есептегенде). Жасушалар фототрофты, автотрофты болып табылады және оттегі мөлшері төмен ортада да тіршілік ете алады. Шырышты қабық қорғаныш қызмет атқарып, жасушалардың агрегациясына және биопленка түзілуіне ықпал етеді. Изолят энергияның негізгі көзі ретінде фотосинтез үдерісін пайдаланады және көзге көрінетін биопленкаларға бірігетін колониялар түзеді. Морфологиялық белгілерінің жиынтығына сәйкес бұл изолят *Chroococcaceae* тұқымдасына жатқызылды.

5. PSU 1262 изоляты диаметрі 7–8 мкм аралығындағы шар тәрізді жасушаларымен сипатталады; жасушалар көбіне жұптасып орналасады. Капсулалар әдетте болмайды немесе өте жұқа әрі әлсіз байқалады, сондықтан оларды жарық микроскопиясында анықтау қиын. Жасушаның профилінде көрінетін айқын цитоплазмалық мембранасы құрылымдық тірек пен механикалық беріктік қамтамасыз етеді, ал пептидогликан қабаты жасуша тұрақтылығын сақтауға ықпал етеді. Жасуша өлшемінің шағын болуына байланысты ішкі құрылымдардың, соның ішінде цитоплазмалық мембрананың кейбір элементтері жарық микроскопында айқын байқалмайды. Соған қарамастан, тилакоидты мембраналар реттелген түрде ұйымдасып, фотосинтез үдерісінің тиімді жүргізуі мүмкін. Шырышты қабық әдетте болмайды немесе өте жұқа болғандықтан жарық микроскопиясында анық байқалмайды. Бұл изолят Заррука және BG-11 қоректік орталарында жақсы өседі. Морфологиялық белгілерінің жиынтығына сәйкес ол алдын ала *Microcystaceae* тұқымдасына жақын деп бағаланды.

6. SU 78 изоляты қалыңдығы 0,7-ден 1,2 мкм-ге дейін және ұзындығы 2-ден 10 мкм-ге дейін болатын қысқа таяқша тәрізді жасушалардан тұрады. Теріс бояу жасуша бетінде ругулоза рельефін көрсетеді. Изолят Заррука және BG-11 орталарында қарқынды өседі. Морфологиялық сипаттамаларына сүйене отырып, изолят *Synechococcales* қатарының ұсақ бір жасушалы цианобактериялар кешеніне алдын ала жатқызылды.

Осылайша, Қазақстанның әртүрлі табиғи экожүйелерінен біржасушалы және жіпшелі формалармен ұсынылған, тек вегетативті жасушалардан тұратын 6 цианобактерия изоляты бөлініп алынып, таза дақыл түрінде алынды. Бөлінген изоляттар зертханалық жағдайда тұрақты өсуімен және абиотикалық факторлардың (жарықтану, рН) өзгерістеріне жоғары төзімділігімен ерекшеленді. Бұл олардың фотобиотехнология саласындағы әрі қарайғы зерттеулер үшін перспективті нысандар екенін көрсетеді.

Бөлініп алынған цианобактерия штамдары үшін дақылдаудың оңтайлы жағдайлары анықталды: температура 25–27°C, орта реакциясы рН 7,0–7,5, жарық қарқындылығы 30–40 мкмоль фотон/м²/с.

3.2 Цианобактериялардың бөлініп алынған штамдарын биотехнологиялық сынақтарға дайындау үшін өсірудің оңтайлы параметрлерін анықтау

Зертханалық тәжірибелерде цианобактериялардың өсуіне көмірқышқыл газы мен оттегі концентрациясы және жарық деңгейі сияқты әртүрлі факторлардың әсері зерттелді. Зерттеудің мақсаты – бөлінген 6 цианобактерия дақылының өнімділігін арттыру үшін өсіру жағдайларын оңтайландыру болды.

Фотосинтез үрдісі барысында СО₂ пайдалануға эволюциялық тұрғыдан бейімделген цианобактериялар оның концентрациясы артқан кезде өнімділіктің жоғарылайтынын көрсетеді. Бұл фотосинтез үдерісінің қарқындауы барысында биомассаның көбірек жинақталу мүмкіндігімен түсіндіріледі. СО₂-нің төмен деңгейі әртүрлі экожүйелердегі цианобактериялардың өсуіне теріс әсер етеді [163, 164].

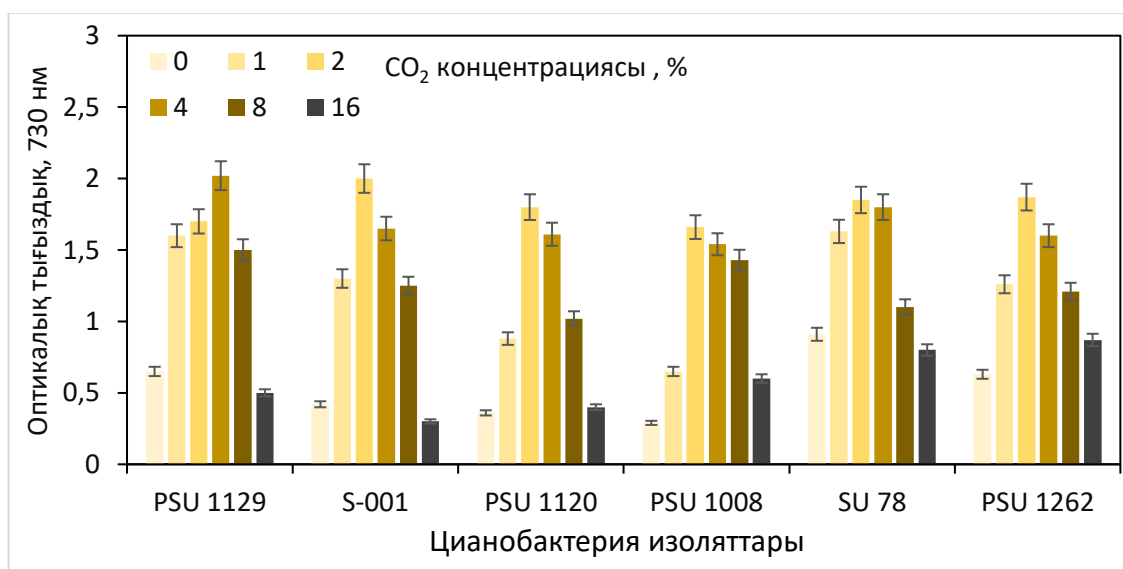
Цианобактериялардың тилакоидты мембраналарында жүзеге асатын фотосинтез үдерісі оттегіні қосымша өнім ретінде бөліп шығарады. Қоректік ортада оттегінің жетіспеушілігі цианобактериялардың өсуіне кері әсер етеді және олардың тыныс алуын тежейді. Қалыпты оттегі жағдайында цианобактериялар үздіксіз метаболизм жүреді, ал гетероцисталық түрлер азотты бекітуді жалғастырады. Оттегінің жоғары концентрациясы цианобактериялардың өсуіне кері әсер етеді. Кейбір түрлер оттегінің төмен жағдайында тіршілік ете алса да, олардың тіршілік етуі оттегінің жоғары концентрациясында айтарлықтай төмендеуі мүмкін.

Жарық цианобактериялардың табиғи ортадағы өсу үдерістеріне тікелей әсер етеді. Цианобактериялар фотосинтез және энергия алу үшін жарыққа тәуелді болғандықтан, олар жарықсүйгіш ағзалар қатарына жатады. Фотосинтез барысында көмірқышқыл газы органикалық заттарға айналып, жасушалардың

бөлінуін ынталандырады. Цианобактериялардың тилакоидты мембраналарында фотосинтезге қажетті арнайы пигменттер, соның ішінде хлорофилл, фикоцианин және кейбір түрлерінде каротиноидтар кездеседі. Бұл пигменттер әртүрлі толқын ұзындықтағы жарықты сіңіре алады, ал жарықтың оңтайлы деңгейі цианобактериялардың өсуі мен өнімділігіне қолайлы әсер етеді. Жарық жеткіліксіз болғанда энергия тапшылығына байланысты жасушалардың бөлінуі баяулайды, ал шамадан тыс жарық фотосинтез механизмін бұзып, жасушалардың жойылуына әкелуі мүмкін. Сондықтан жарықтың оңтайлы деңгейін сақтау цианобактериялардың тиімді өсуі мен дамуы үшін шешуші мәнге ие [165, 166].

Жарықтың, CO_2 және O_2 цианобактерия жасушаларының өсуіне әсері қоршаған орта жағдайларына жасушалардың бейімделуіне байланысты едәуір ауытқиды. Цианобактериялардың әртүрлі түрлерінде CO_2 , O_2 және жарықтың белгілі бір концентрацияларын тұрақты ұстауға немесе тиімді пайдалануға мүмкіндік беретін ерекше механизмдер болуы мүмкін. Қоректік заттардың қолжетімділігі, температура және рН сияқты факторлар да цианобактериялардың өсуін реттеуде маңызды рөл атқарады. Осы айнымалылардың өзара әсері әртүрлі жағдайларда цианобактериялардың өсу динамикасы мен дамуына айтарлықтай ықпал етеді. Цианобактериялардың қоршаған орта өзгерістеріне бейімделу механизмдерін және әртүрлі факторлардың өзара ықпалын түсіну микробиологиялық үдерістер туралы білімді кеңейтумен қатар, цианобактерия дақылдарының биотехнологиясы және экологиялық инженерия қоса алғанда, әртүрлі қолданбаларда оңтайландыру үшін де аса маңызды.

Цианобактерия штамдарын дақылдау жағдайларын оңтайландыру үшін 6 зерттелген изолятының өсуіне CO_2 -ның 6 түрлі концентрациясының әсері зерттелді (0, 1, 2, 4, 8 және 16%) (5-сурет).



Сурет 5 – Цианобактериялардың өсуіне әртүрлі CO_2 концентрацияларының әсерін зерттеу

Зерттеу нәтижелері барлық зерттелген цианобактерия изоляттары CO_2 концентрациясы 2–4% диапазонында жоғары өнімділік көрсететінін айқындады. Әсіресе, PSU 1129 изоляты 2–4% CO_2 жағдайында айқын өсу көрсетіп, оптикалық тығыздығы 2,02 мәніне дейін жетті. Сонымен қатар PSU 1120 және SU 78 изоляттары басқа концентрациялармен салыстырғанда 2% CO_2 жағдайында ең қолайлы өсу көрсететіні анықталды.

Дегенмен CO_2 концентрациясының жоғарылауы цианобактерия жасушаларының өнімділігінің төмендеуіне әкелуі мүмкін екені байқалды. Бұл әсер бірнеше фактормен түсіндірілуі ықтимал:

1. Цианобактериялар рН деңгейінің өзгерісіне сезімтал, ал CO_2 концентрациясының артуы ортаның рН мәнін төмендетіп, өсу мен метаболизмдік үдерістерге теріс әсер етуі мүмкін.

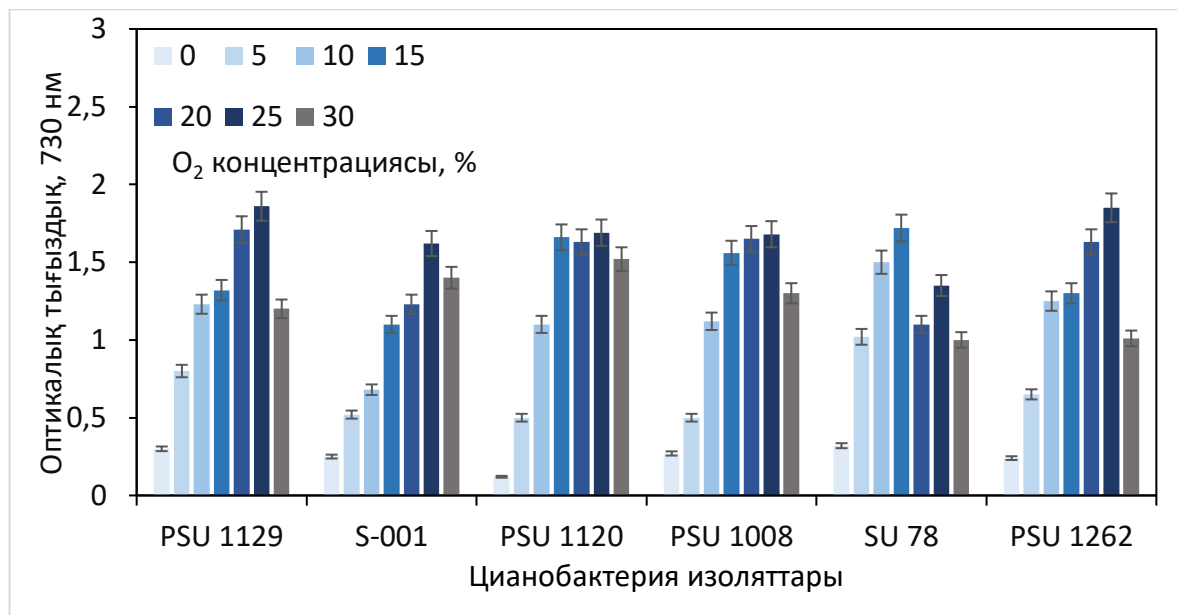
2. CO_2 мөлшерінің артуы азот пен фосфор сияқты қоректік элементтердің қолжетімділігі мен теңгеріміне ықпал етіп, цианобактериялардың қоректік заттарды сіңіруін шектеуі мүмкін.

3. Артық CO_2 жағдайында фотосинтез және басқа метаболизмдік үдерістер арасындағы тепе-теңдік бұзылып, энергияны пайдалану тиімділігі төмендеуі және көміртекті бөліну немесе алмасу үдерістері өзгеруі мүмкін. Бұл өз кезегінде метаболизмдік бұзылыстарға және жалпы бейімделгіштіктің төмендеуіне әкеледі.

Сондықтан цианобактериялардың оңтайлы өсуін қамтамасыз ету үшін CO_2 концентрациясымен қатар рН және қоректік заттардың қолжетімділігі сияқты қоршаған орта факторларын да ескеру қажет.

Келесі тәжірибеде оттегінің әртүрлі концентрациялары (0, 5, 10, 15, 20, 25 және 30%) цианобактериялардың өсуіне әсерін бағалау үшін қолданылды (6-сурет). Жасушалардың өсуі үшін оңтайлы жағдайды сақтау мақсатында атмосфераға қосымша 2% CO_2 енгізілді. Зерттеу барысында O_2 цианобактериялардың тыныс алуы үшін міндетті болмаса да, O_2 мөлшерінің қоршаған ортада болуы цианобактерия жасушаларының белсенділігіне әсер ететіні байқалды.

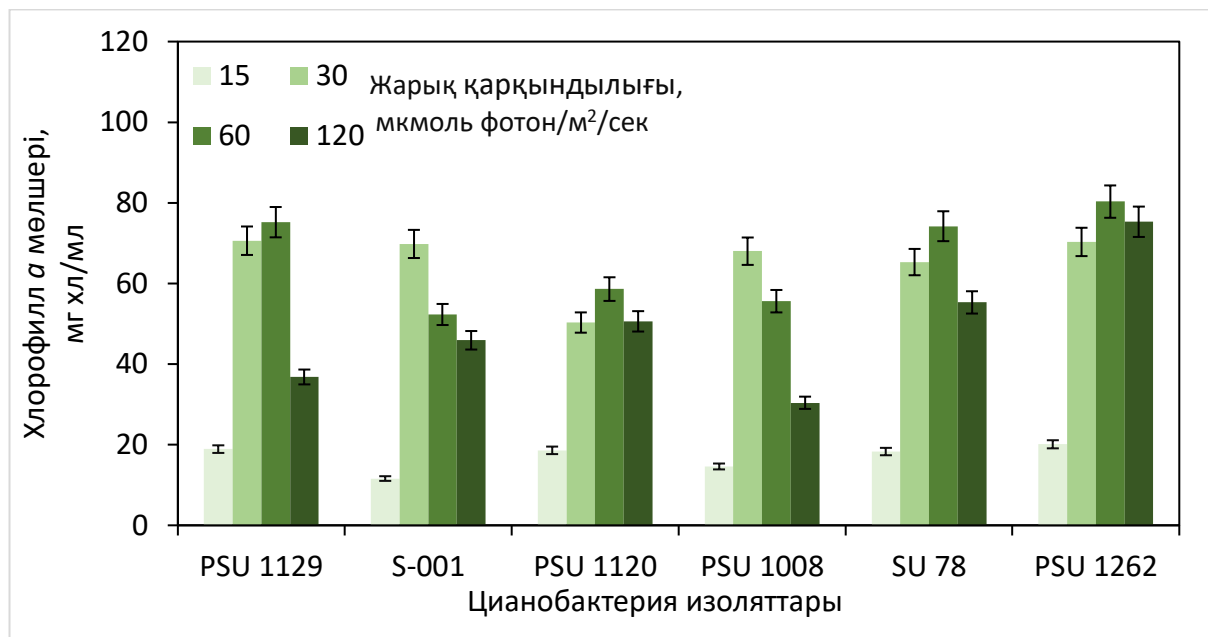
6-суреттегі нәтижелер ең жоғары өсу деңгейі PSU 1129 изолятында O_2 мөлшері 25% болғанда тіркелгенін көрсетеді, бұл жағдайда көрсеткіш 1,86 бірлікке жетті. Осы түр үшін O_2 20–25% диапазонында өсу деңгейінде айтарлықтай айырмашылық анықталған жоқ.



Сурет 6 – Цианобактериялардың өсуіне әртүрлі O₂ концентрацияларының әсерін зерттеу

Төмен және жоғары O₂ концентрацияларының екеуі де цианобактерия жасушаларының өсуіне кері әсер ететіні байқалды. Оттегі деңгейінің жоғары болуы фотосинтез тиімділігін төмендетіп, цианобактериялардың өсуі мен өнімділігін азайтуы мүмкін, сондай-ақ, маңызды қоректік заттардың тотығуын күшейтіп, жасушадағы биологиялық үдерістер үшін қажет компоненттердің қолжетімділігін шектеуі ықтимал. Ал, O₂-нің төмен концентрациялары да өнімділікке теріс әсер етеді: тыныс алу қарқындылығын басып, жасушалардың бөлінуін төмендетеді және зат алмасуды шектейді. Жалпы алғанда, O₂ цианобактериялардың көптеген метаболизмдік үдерістерінде маңызды рөл атқарады, сондықтан оның жетіспеуі немесе артық болуы фотосинтез, тыныс алу және азот фиксациясы сияқты үдерістердің бұзылуына әкеліп, нәтижесінде өсу тиімділігі мен жасушалардың жалпы бейімделгіштігіне әсер етеді.

Келесі кезеңде жарық қарқындылығының әртүрлі деңгейлерінің (15, 30, 60, 120 мкмоль фотон/м²/с) цианобактериялардың өсуіне және хлорофилл *a* пигментінің түзілуіне әсері зерттелді (7-сурет). Жоғарыда сипатталғандай көмірқышқыл газы мен оттегінің бірдей концентрациялары және ортаның pH мәні 7 деңгейінде сақталып, цианобактерия дақылдары 2 апта бойы инкубацияланды. Осыдан кейін алдын ала метанолмен өңделген 1 мл суспензияда спектрофотометрия әдісі арқылы хлорофилл *a* концентрациясы анықталды.



Сурет 7 – Әр түрлі жарық қарқындылығының цианобактериялардың өсуіне әсерін зерттеу

Зерттеу цианобактериялық тилакоидты мембраналардағы хлорофилл *a* концентрациясына әртүрлі жарық қарқындылығы әсер ететінін көрсетті. S-001 изоляты және PSU 1008 изоляты 30 мкмоль фотон/м²/сек-тан асатын жарық қарқындылығында қарқынды өсуді көрсетті, ал басқа дақылдар 60 мкмоль фотон/м²/сек жарық қарқындылығында жоғары өнімділікке қол жеткізді. Дегенмен, 120 мкмоль фотон/м²/сек жарық қарқындылығы жалпы дақылдың өсуіне кері әсерін тигізді.

Жоғары жарық қарқындылығында цианобактериялық өнімділіктің төмендеуі бірнеше факторларға байланысты болуы мүмкін, соның ішінде фотосинтетикалық процестің басылуы, оның тиімсіздігіне және жасушалардың зақымдалуына әкеледі; жарықтың жұтылуы мен электрондардың берілуі арасындағы теңгерімсіздік, бұл энергия өндірісі мен пайдаланылуының төмендеуіне әкеледі; және фотосинтетикалық пигменттердің жойылуы немесе ағаруы, бұл жарық энергиясын ұстап тұруға және пайдалануға кедергі келтіреді. Осылайша, оқшауланған цианобактериялардың өсуін оңтайландыру үшін әртүрлі газ концентрацияларының, олардың фототрофты өсуіне әсері зерттелді. Көмірқышқыл газы (1-4%) және оттегі (20-25%) бұл түрлерде биомассаның көп мөлшерде жиналуына оң әсер ететіні анықталды. Физиологиялық зерттеулер жарық қарқындылығының (30-60 мкмоль фотон/м²/сек) хлорофилл *a* деңгейіне және флуоресценция қарқындылығына оң әсер ететінін көрсетті.

3.3 Бөлініп алынған цианобактерия изоляттарын идентификациялау және филогенетикалық ағаш құрастыру

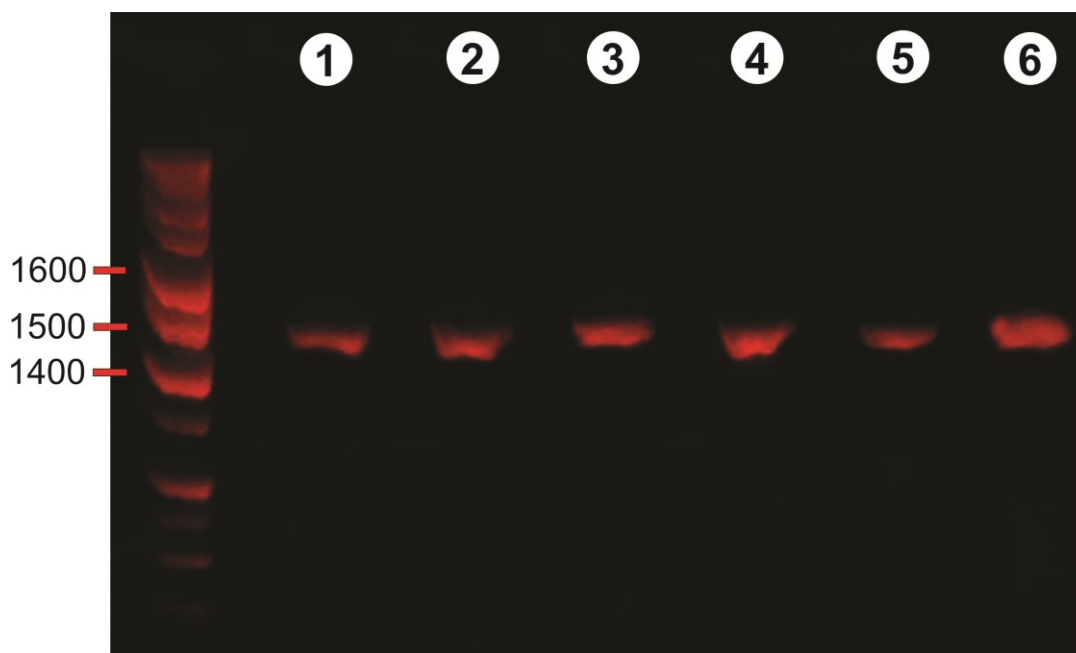
Штамдарды идентификациялау 16S rRNA генінің тізбегі бойынша жүргізілді. Ең жақын аналогтар BLASTn көмегімен сәйкестік пайызы (identity), туралау ұзындығы, bit score және E-value көрсеткіштерін ескере отырып таңдалды. Топологияның сенімділігін арттыру мақсатында 16S rRNA гені тізбектерінің туралануына негізделген филогенетикалық талдау жүргізілді. Сыртқы топ (outgroup) ретінде GenBank дерекқорындағы HM038000.1 нөмірлі *Vampirovibrio chlorellavorus* бактериясының 16S rRNA тізбегі пайдаланылды. Outgroup ретінде ingroup-тен (цианобактериялардан) филогенетикалық тұрғыдан тыс орналасатын, бірақ 16S rRNA бойынша салыстыруға жарамды жақын прокариотты таксон таңдалды. Филогенетикалық талдау туралау ұзындығы жеткілікті болғанда және референстік тізбектер дұрыс таңдалғанда әдістемелік тұрғыдан негізді болып саналады, өйткені бұл талданатын топ ішіндегі топологияның сенімділігін арттырады. Нәтижелерді интерпретациялау зерттелетін штамдардың ағаштағы орны, морфологиялық белгілері және BLAST-талдау деректерімен салыстыруға сүйенді. Филогенетикалық ағаш MEGA X бағдарламасында 1000 bootstrap қайталауымен тұрғызылды.

Зерттелген цианобактерия штамдары үшін 16S rRNA гені ПЦР-ампликондарының электрофорездік талдау нәтижелері 8-суретте берілген.

16S rRNA гені фрагменттерін амплификациялау үшін полимеразды тізбекті реакция (ПТР) жүргізілді. Алынған нуклеотидтік тізбектер филогенетикалық талдау жасауға және ағаш құруға пайдаланылды. Амплификация 16S rRNA геніне арналған универсалды праймерлерді қолдана отырып орындалды (праймер тізбектері «Қосымшалар» бөлімінде берілген). Ең жақын таксондар BLAST дерекқорынан ұқсас тізбектерді іздеу арқылы іріктелді.

Филогенетикалық ағаш құру үшін PSU 1129, S-001, PSU 1120, PSU 1008, SU 78 және PSU 1262 изоляттарының 16S rRNA геніне сәйкес нуклеотидтік тізбектері пайдаланылды, ал сыртқы топ (outgroup) ретінде GenBank дерекқорындағы HM038000.1 нөмірлі *Vampirovibrio chlorellavorus* 16S rRNA тізбегі алынды.

9-суретте зерттелген изоляттар мен дерекқордағы жақын туыстас тізбектер арасындағы филогенетикалық өзара байланыстар көрсетілген. Генетикалық ұқсастықты визуализациялау мақсатында таксондар арасындағы болжамды эволюциялық байланыстарды бейнелейтін филогенетикалық ағаш құрастырылды. Изоляттарды морфологиялық белгілері бойынша салыстыру олардың ортақ сипаттарын да, айырмашылықтарын да анықтауға мүмкіндік берді. Филогенетикалық талдаудың сенімділігін арттыру үшін талдауға ұқсастық деңгейі барынша жоғары және туралау ұзындығы жеткілікті референстік тізбектер енгізілді. Identity <97% болған кейбір штамдар үшін таксономиялық орны алдын ала (preliminary) деп қарастырылды.



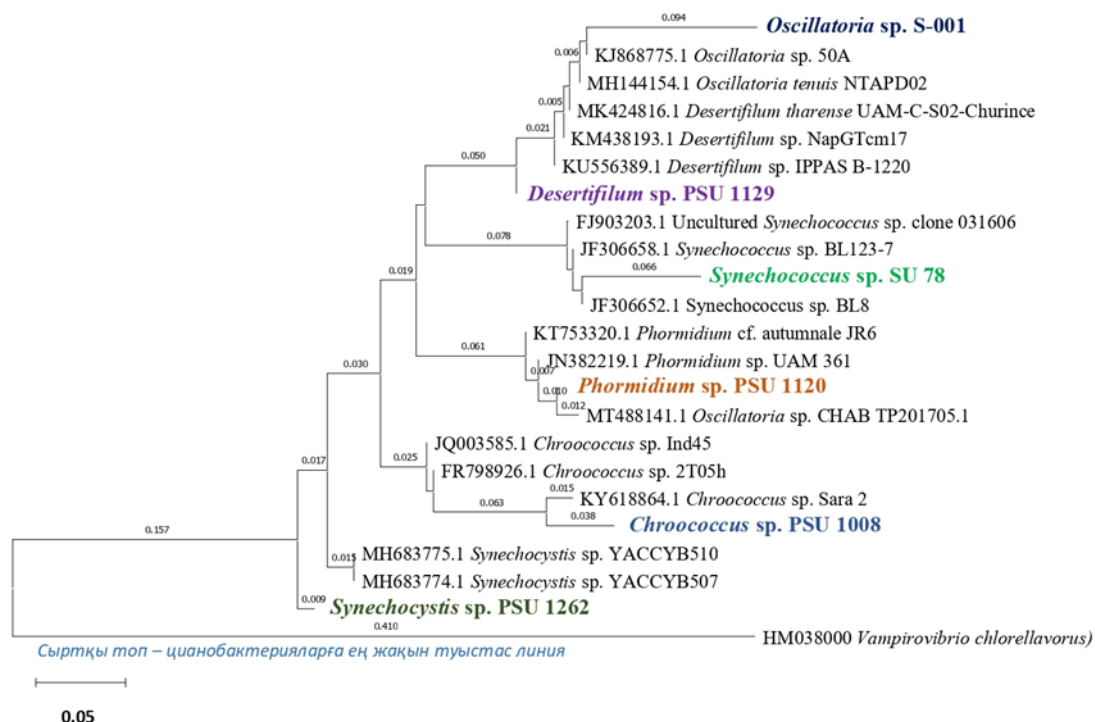
1 – PSU 1129 изоляты, 2 – S-001 изоляты, 3 – PSU 1120 изоляты, 4 – PSU 1008 изоляты, 5 – SU 78 изоляты, 6 – PSU 1262 изоляты (базалық жұптар саны (bp) – 1600, 1500, 1400)

Сурет 8 – Зерттелген цианобактерия штамдардың *16S rRNA* генінің ПТР ампликондарының электрофоретикалық талдау нәтижелері

Филогенетикалық ағаш алты негізгі кластерді қамтиды, олар көбіне *Desertifilum*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Chroococcus*, *Synechococcus*, *Synechocystis* туыстарына сәйкес келеді.

PSU 1129 изолятының филогенетикалық талдауы үшін ұзындығы 890 нуклеотидтен (н.) тұратын 16S rRNA тізбектерінің туралануы қолданылды. Филограмма PSU 1129 изолятының (bit score = 1631; identity = 99,78%) *Desertifilum tharense* (bit score = 1631; identity = 99,78%) және *Desertifilum* sp. NapGTcm17 (bit score = 1631; identity = 99,78%) тізбектерімен жоғары деңгейде ұқсас екенін көрсетеді. PSU 1129 изоляты бірнеше басқа штамдармен филогенетикалық туыстас болғанымен, морфологиялық талдау да оның *Desertifilum* туысына жататынын растайды (GenBank: PZ058579).

S-001 изолятына талдау жүргізу үшін амплификацияның спецификалығын арттыру мақсатында ұзындығы 19–20 нуклеотид болатын қосымша праймерлер қолданылды. Балқу температурасы (Tm) 56–64°C аралығында өзгерді. 16S rRNA бойынша ұқсастық деңгейі 91,19% болды, бұл таксономиялық орнын сақтықпен түсіндіру қажеттігін және *Oscillatoria tenuis* NTAPD02 (identity 90,98%) мен *Geitlerinema calcuttense* NRMC-F 0142 (identity 91%) сияқты жақын туыстас топтарға жақындығын көрсетеді. Алынған көрсеткіштер бір ғана 16S rRNA маркері бойынша таксономиялық орынды анықтауда сақтық қажет екенін және *Oscillatoria* мен *Geitlerinema* туыстары кешеніне жақын болуы мүмкіндігін дәлелдейді (GenBank: PZ058577).



Сурет 9 – Зерттелген цианобактерия изолятының және олармен тығыз байланысты таксондардың филогенетикалық ағашы (16S rRNA негізінде)

PSU 1120 изоляты *Phormidium* sp. UAM 361 (identity 99,14%) және *Oscillatoria* sp. CHABTP201705.1 (identity 99,14%) штамдарымен ең жоғары ұқсастық көрсетті. Морфологиялық талдау штамның *Phormidium* туысына жақындығын растады (GenBank: PZ058576).

Филогенетикалық талдау PSU 1008 изолятының *Chroococcus* sp. Sara 2 (identity 95,87%), *Chroococcus* sp. Ind45 (identity 89,17%) және *Alborzia kermanshahica* S2 (identity 95,87%) тізбектерімен ұқсастығын көрсетті. Морфологиялық талдау штамның *Chroococcus* туысына жақындығын растады (GenBank: PZ058578).

SU 78 изоляты *Synechococcus* sp. clone 031606 (identity 94,44%), *Synechococcus* sp. BL8 (identity 94,31%) және *Synechococcus* sp. BL123-7 (identity 94,31%) штамдарымен ұқсастық көрсетті, бұл оның *Synechococcus* кешеніне жатқызылуына сәйкес келеді (GenBank: PZ058580).

PSU 1262 изоляты бойынша филогенетикалық талдау ең жақын тізбек ретінде *Synechocystis* sp. CACIAM 05 (identity 98,52%) штамын көрсетті, бұл изоляттың *Synechocystis* туысына жататынын растайды (GenBank: PZ058575).

BLAST-салыстыру және 16S rRNA бойынша филогенетикалық талдау нәтижелері зерттелген гетероцист түзбейтін изоляттардың таксономиялық тұрғыдан *Desertifilum*, *Phormidium*, *Synechocystis* туыстарына жақын топтарға, сондай-ақ, *Synechococcus* кешеніне жататынын көрсетті. S-001 және PSU 1008 изоляттары үшін 16S rRNA негізіндегі идентификация туыс деңгейінде

орындалды; таксономиялық орнын нақтылау қосымша молекулалық маркерлерді қолданғанда мүмкін болады. Жалпы алғанда, молекулалық деректер бөлінген штамдардың дақылдық-морфологиялық сипаттамаларымен сәйкес келеді.

16S рРНҚ генін талдау және филогенетикалық талдау жұмыстары негізінде молекулалық-генетикалық идентификация бөлінген изоляттардың таксономиялық орнын нақтылауға және оларды цианобактериялардың бірқатар туыстарына жатқызуға мүмкіндік берді. Референстік деректермен тізбектерді салыстыру және филогенетикалық ағаштарды құру нәтижесінде изоляттарға төмендегі штамдық белгілеулер берілді: *Desertifilum* sp. PSU 1129, *Oscillatoria* sp. S-001, *Phormidium* sp. PSU 1120, *Chroococcus* sp. PSU 1008, *Synechococcus* sp. SU 78, *Synechocystis* sp. PSU 1262. Бұл штамдардың нуклеотидтік тізбектері (16S rRNA) NCBI дерекқорында (GenBank) тіркелді, бұл олардың кейінгі салыстырмалы зерттеулер үшін қолжетімділігін қамтамасыз етеді және таксономиялық атрибуцияның дұрыстығын растайды. Зерттеуде HM038000.1 бактериясы (*Vampirovibrio chlorellavorus* нөмірі) фототрофты организм (сыртқы топ ретінде) ретінде пайдаланылды.

Таңдалған штамдар өсіру жағдайларын оңтайландырып, ары қарай олардың сутегі өндіру белсенділігін бағалауға бағытталып, зерттеудің келесі кезеңдеріне енгізілді.

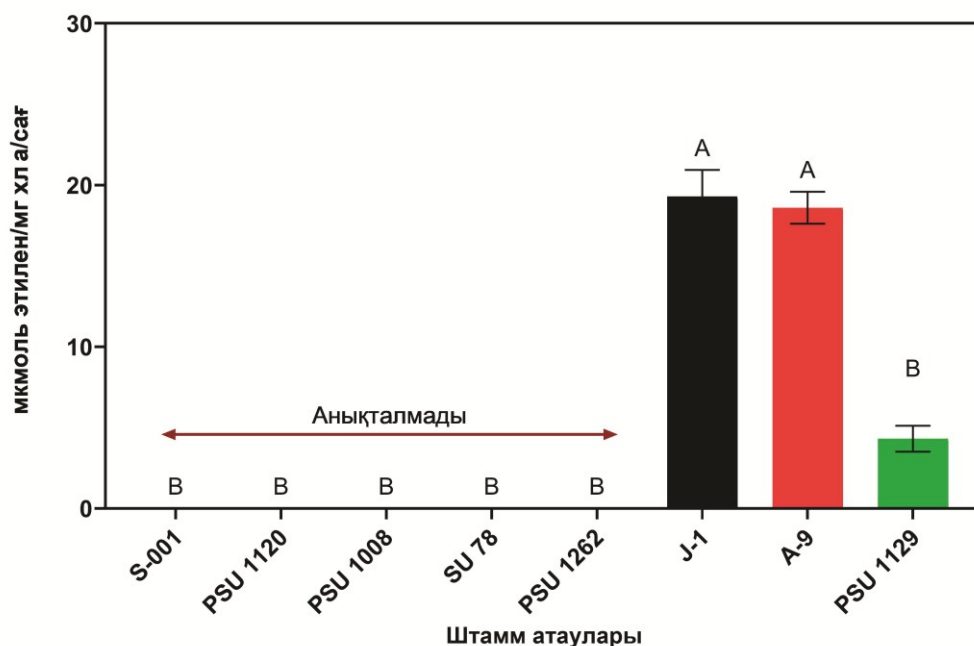
3.4 Бөлініп алынған цианобактерия штамдарындағы сутегі метаболизміне қатысатын негізгі ферменттерінің белсенділігін талдау

3.4.1 Бөлініп алынған цианобактерия штамдарының нитрогеназа белсенділігін бағалау

Цианобактерияларда молекулалық сутегі түзілуі негізінен екі ферменттік жүйемен жүзеге асады: нитрогеназа және гидрогеназа. Бұл жүйелер сәйкесінше N_2 аза-тәуелді және H_2 аза-тәуелді жолдар арқылы H_2 түзілуін қамтамасыз етеді. Гетероциста түзетін формалардан айырмашылығы, гетероциста түзбейтін цианобактерияларда азот фиксациясына арналған арнайы жасушалар қалыптаспайды. Бұл олардың сутегі түзуші белсенділігінің механизмдерін түбегейлі айқындайды және әдетте белгілі бір дақылдау жағдайларында гидрогеназаға тәуелді үдерістердің басым іске асуына әкеледі. Осыған байланысты зерттеудің мақсаты гетероциста түзбейтін штамдардың H_2 өндіруге базалық қабілетін анықтау және негізгі ферменттік жүйелердің үлесін бағалау болды.

Нитрогеназаның ықтимал қатысуын бағалау үшін нитрогеназа белсенділігі ацетиленді тотықсыздандыру әдісімен (ацетиленнің этиленге дейін тотықсыздануы) анықталды. Зерттеуге цианобактериялардың сегіз дақылы енгізілді: алты гетероцист түзбейтін штамм (*Desertifilum* sp. PSU 1129, *Oscillatoria* sp. S-001, *Phormidium* sp. PSU 1120, *Chroococcus* sp. PSU 1008, *Synechocystis* sp. PSU 1262, *Synechococcus* sp. SU 78), сондай-ақ оң бақылау

ретінде екі гетероцист түзетін штамм – *Anabaena* sp. A-9 және *Nostoc* sp. J-1 (10-сурет).



Ordinary one-way ANOVA ($P < 0.0001$, $R = 0.9267$, $F = 28.91$, $n = 3$)

Сурет 10 – Цианобактериялық жасушалардың нитрогеназа белсенділігін зерттеу

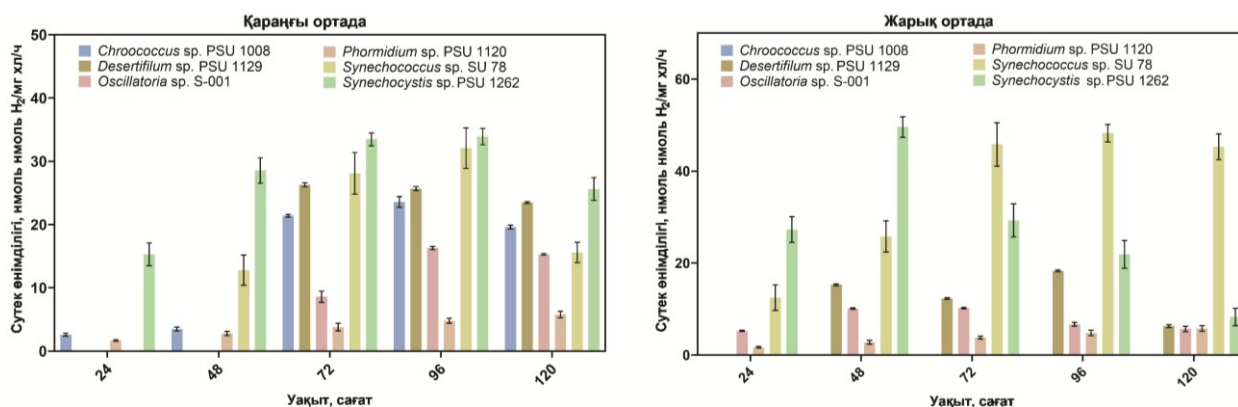
Ацетиленредуктазалық әдіс гетероциста түзбейтін штамдардың ішінде ацетиленнің этиленге айналуы тек *Desertifilum* sp. PSU 1129 изолятында анықталатынын көрсетті және бұл көрсеткіш төмен болғанымен, нөлден айқын ерекшеленді (4 мкмоль этилен/мг хлорофилл *a*/сағ). Қалған бес гетероциста түзбейтін штамда этилен түзілуі тіркелмеді, бұл тәжірибе жүргізілген жағдайларда нитрогеназа белсенділігінің детекцияланбайтынын көрсетеді.

Сонымен қатар гетероциста түзетін бақылау дақылдарында нитрогеназа белсенділігі айқын байқалды: *Nostoc* sp. J-1 үшін ол 19,3 мкмоль этилен/мг хлорофилл *a*/сағ мәніне жетті, ал *Anabaena* sp. A-9 үшін 18,6 мкмоль этилен/мг хлорофилл *a*/сағ болды.

Осылайша, алынған нәтижелер анаэробты қаранғы ортада 24 сағатта, 25⁰С температурасында инкубацияланып, нитрогеназа жолын іске асыру мүмкіндігі бойынша гетероциста түзетін және гетероциста түзбейтін формалардың айырмашылықтарын растайды және осы жұмыс аясында гетероциста түзбейтін штамдарда Н₂ өндірудің негізгі ферменттік механизмі ретінде гидрогеназа ферментін қарастыруға мүмкіндік береді.

3.4.2 Қараңғы және жарық ортада цианобактериялардың сутегінің базалық бөлуін зерттеу

Келесі кезеңде бөлінген гетероциста түзбейтін штамдардың қараңғыда, анаэробты жағдайда молекулалық сутегі түзу қабілеті бағаланды, өйткені мұндай жағдайда фотосинтетикалық электрон тасымалының үлесі ең төмен болады. Бұл жағдайда H_2 түзілуі жасушаішілік қорлардың (ең алдымен гликогеннің) қараңғылық ферментациясымен және гидрогеназа белсенділігімен байланысты болуы мүмкін [162-164]. H_2 түзілуінің сандық көрсеткіштері тәжірибелік жағдайларда инкубацияланған үлгілер үшін 11-суретте берілген.



2 way ANOVA ($P < 0.0001$, $F = \sim 27$, $n = 3$, $\text{Alpha} = 0.05$)

Сурет 11 – Қараңғы және жарық жағдайларда цианобактериялардың сутегі бөліну қарқындылығын зерттеу нәтижелері

Synechocystis sp. PSU 1262 штамында сутегі түзілуінің ең жоғары деңгейі тіркелді. Бұл штамм қараңғыда анаэробты жағдайда 24 сағат бойы сутекті тұрақты түрде бөлді. Алдымен, газ фазасы аргонға ауыстырылып, әрі қарай инкубацияланғаннан кейін сутегінің жиналуы артқаны байқалды: алғашқы 24 сағатта шығым 15,3 нмоль H_2 /мг хлорофилл *a*/сағ болды, ал 96 сағатта ең жоғары мәніне жетіп, 33,9 нмоль H_2 /мг хлорофилл *a*/сағ құрады, содан кейін орташа төмендеу байқалды. Бұл төмендеудің ең ықтимал себептері – эндогенді субстраттар пулының (гликогеннің) біртіндеп сарқылуы және оттегінің жиналуына байланысты гидрогеназаның тежелуі, өйткені оттегіге сезімтал ферменттердің белсенділігін шектеуі мүмкін [167].

Басқа дақылдармен қатар, *Synechococcus* sp. SU 78 және *Desertifilum* sp. PSU 1129 дақылдарында сутегінің салыстырмалы түрде жоғары өнімділігі байқалды. *Synechococcus* sp. SU 78 дақылында H_2 өнімділігі 48 сағаттан кейін 12,8 нмоль H_2 /мг хлорофилл *a*/сағ құрады, ал 96 сағатқа қарай ол 32,1 нмоль H_2 /мг хлорофилл *a*/сағ дейін өсті. *Desertifilum* sp. PSU 1129 үшін 72 сағаттық инкубациядан кейін H_2 өндірісінің артуы тіркелді (26,3 нмоль H_2 /мг хлорофилл *a*/сағ). Қараңғы ортадағы ең төменгі белсенділік *Phormidium* sp. PSU 1120-да

байқалды: ең жоғары мән 5,8 нмоль H_2 /мг хлорофилл *a*/сағ құрады (120 сағаттан кейін), содан кейін сутегінің бөліну жылдамдығы төмендеді. Сонымен қатар, тәжірибе барысында ортадағы оттегі концентрациясы артты, бұл гидрогеназа белсенділігін шектеуі ықтимал.

Одан кейін сутегі тұзу белсенділігі 40-60 мкмоль фотон/ m^2/s жарықта бағаланды; дақылдар термостатта 23-25°C температурада жағдайында инкубацияланды, анаэробты орта аргонмен үрлеу арқылы қамтамасыз етілді. Жарық фотосинтетикалық электрон тасымалдау тізбегінде электрон ағынының қалыптасуын қамтамасыз етеді және гидрогеназа үшін тотықсыздандырылған эквиваленттердің қолжетімділігін арттыруы мүмкін, бұл молекулалық сутегінің шығымын көбейтеді [168, 169]. Алайда, жарықтандыру фотожүйе 2 жүйесінде оттегінің түзілуімен қатар жүреді, оттегі гидрогеназаны тежеп, сутегі тұзу үдерісінің жиынтық тиімділігін төмендетуі мүмкін [170, 171].

Алынған нәтижелер *Synechocystis* sp. PSU 1262 және *Synechococcus* sp. SU 78 жарық жағдайында H_2 өндірудің жоғары қабілетін сақтайтынын көрсетті. *Synechocystis* sp. PSU 1262-де сутегі өндірісі тәжірибенің басынан бастап тіркеліп, 24 сағатқа дейін сақталды, 48 сағаттан кейін ең жоғары көрсеткішке жетті (49,6 нмоль H_2 /мг хлорофилл *a*/сағ), содан кейін біртіндеп төмендеу байқалды. *Synechococcus* sp. SU 78 үшін сутегінің максималды өндірісі 96 сағаттан кейін байқалды және 48,3 нмоль H_2 /мг хлорофилл *a*/сағ құрады. Жалпы, *Synechocystis* sp. PSU 1262-де жарықтағы H_2 өнімділігі қараңғыдағыға қарағанда шамамен 1,4 есе жоғары болды. Сонымен қатар, салыстырмалы түрде жоғары қараңғы белсенділікке қарамастан, *Oscillatoria* sp. штамдарының S-001 және *Desertifilum* sp. PSU 1129 жарық режимінде төмен өнімділік көрсетті, бұл гидрогеназаның оттегімен тежелуінің айқынырақ болуына немесе электрон тасымалының шектеулеріне байланысты болуы мүмкін [172].

Сутегі маңызды энергия тасымалдағыш әрі жоғары сапалы электр энергиясының көзі ретінде қарастырылады. Цианобактериялар сутегінің потенциалды биологиялық көзі бола алады, өйткені олар күн энергиясын пайдаланып суды протондарға және оттегіге түрлендіре алады [16, 173]. Фотожүйе 2 жұмысы нәтижесінде түзілетін протондар сутегі бөлетін ферменттердің белсенділігімен байланысты үдерістерге қатысады. Құны жоғары болғанымен, цианобактерияларды пайдалана отырып сутегі өндіруді метаболизмдік және гендік-инженерлік зерттеулер арқылы жетілдіруге болады. Сутегіні тиімді бөле алатын белсенді штамдарды әзірлеу осы саладағы негізгі міндеттердің бірі болып қала береді [87, 174-176].

Сутегі фотопродукциясы кезінде жарық энергиясы екі негізгі функция атқарады:

1. Фотосинтетикалық электрон тасымалдау тізбегі арқылы электрондарды H_2 - немесе N_2 -тотықсыздандыру жүйелеріне (H_2 аза/ N_2 аза) жеткізуді қамтамасыз етеді;

2. Бір мезгілде фотожүйе 2 жүйесінде O_2 түзілуіне ықпал етеді, бұл гидрогеназа белсенділігіне әсер етіп, үдерістің жиынтық тиімділігін шектеуі мүмкін;

Мұхиттан бөлініп алынған *Oscillatoria thiebauti* штамы тікелей биофотолиз арқылы молекулалық сутегін белсенді түрде өндіретіні бұрын көрсетілген [177]. Сонымен қатар, *Phormidium valderianum* BDU 20041 бірнеше сағат ішінде тікелей және жанама биофотолиз арқылы айтарлықтай мөлшерде H_2 синтездейді [178]. Атмосфералық азотты бекітпейтін *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамы жанама биофотолиз арқылы 40,6 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ деңгейінде сутегін бөліп шығарды [94].

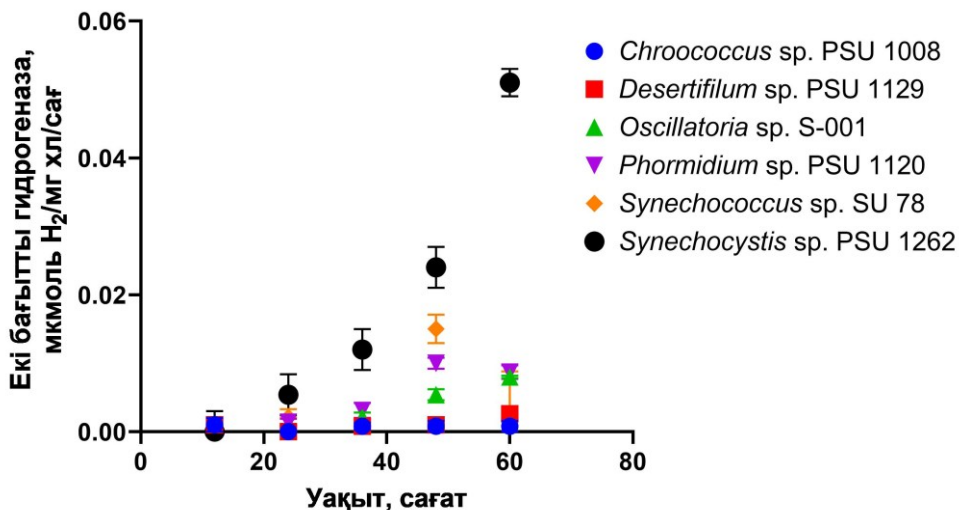
Біздің деректерімізге сәйкес, зерттелген барлық цианобактериялық штамдар анаэробты қараңғы жағдайда әртүрлі дәрежеде H_2 түзді, ең жоғары белсенділік *Synechocystis* sp. PSU 1262 және *Synechococcus* sp. SU 78-де байқалды. N_2 аза ферменті жоқ цианобактерияларда H_2 түзілуі, негізінен N_2 аза жұмысына негізделген, фотосинтез кезінде жинақталған гликогеннің ашытуымен қамтамасыз етіледі [179].

Сондай-ақ, 48 сағаттық инкубациядан кейін барлық зерттелген штамдар орта есеппен қараңғы жағдайларға қарағанда анаэробты жарық жағдайында көбірек сутегі бөлетіні анықталды. Бұл N_2 аза белсенділігі үшін электрондардың қолжетімділігінің артуына және фотосинтез кезінде гликогеннің жиналуына байланысты болуы мүмкін [180]. Нох-гидрогеназа жасушадағы гликоген қорларын бастапқы субстрат ретінде пайдалана алатыны белгілі. Цианобактериялар жарық энергиясын биомасса түзуге және заттарды қор ретінде жинақтауға пайдаланатындықтан, жиналған гликоген қоректік ортада азот тапшылығы болғанда метаболизмді қолдау үшін жұмсалуды мүмкін [181]. Жарық жағдайында N_2 аза белсенділігі оттегі концентрациясы артқанша сақталады, бұл көбінесе алғашқы 120 сағатта байқалады. Басқа зерттеушілер де осындай нәтижелер туралы хабарлады [182-185]. Мысалы, *Gloeocapsa alpicola* CALU 743-те нитрат жетіспеушілігі кезінде гликоген мөлшері жарықтандыру кезінде құрғақ биомассаның 40–50%-ына дейін артуы мүмкін, ал нитрат концентрациясы жинақталған гликогеннің 10%-ынан аз [184]. Біздің зерттеуімізде анаэробты жарықтандыру кезінде сутегінің ең белсенді бөлінуі *Synechocystis* sp. PSU 1262 және *Synechococcus* sp. SU 78 штамдарымен қамтамасыз етілді; қараңғы жағдайлармен салыстырғанда олардың H_2 шығысы сәйкесінше шамамен 1,4 және 1,5 есе жоғары болды [184, 185].

Осылайша, нәтижелер цианобактериялардың биологиялық сутегі өндірісі үшін, әсіресе гидрогеназалар мен нитрогеназалар үшін тотықсыздандырғыш эквиваленттерді қамтамасыз ететін жарық энергиясын пайдаланған кезде айтарлықтай әлеуетін көрсетеді. Болашағынан мол *Synechocystis* sp. PSU 1262 және *Synechococcus* sp. SU 78 штамдары жоғары мөлшерде сутегі өндіру көрсеткіштерін байқатты және осы объектілерді биотехнологиялық зерттеу жұмыстарына болашақта қолдануға болады.

3.4.3 Бөлініп алынған цианобактерия штамдарындағы екі бағытты гидрогеназа белсенділігін анықтау

Екі бағытты [NiFe]-гидрогеназаның қатысуын растау және зерттелген штамдардың ферменттік потенциалын салыстыру үшін тотықсыздандырғыш анаэробты қаранғы жағдайда, температура 25-27⁰С-да, 60 сағат бойы, жасанды электрон донорларын (метилвиологен мен натрий дитиониті) пайдалана отырып Н₂ түзілу жылдамдығы қосымша анықталды (12-сурет).



2 way ANOVA (P < 0.0001, F = ~54.31, n = 3, Alpha = 0.05)

Сурет 12 – Цианобактерия штамдарындағы екі бағытты гидрогеназа белсенділігін анықтауға инкубациялау уақытының әсерін зерттеу

Алынған нәтижелер дақылдар арасында сутегі түзілу жылдамдығында елеулі айырмашылық бар екенін көрсетті. *Chroococcus* sp. PSU 1008 штамы тәжірибе бойы сутегі түзу қабілеті ең төмен мәнде 0,001 мкмоль Н₂/мг хлорофилл *a*/сағ болды, бұл берілген жағдайларда ферменттің белсенділігі ең төмен немесе инактивтенуін меңзейді. *Desertifilum* sp. PSU 1129 штамының сутегі ферменттерінің баяу активтенуі байқалды және 60-шы сағатқа қарай Н₂ өндірісінің 0,0027 мкмоль Н₂/мг хлорофилл *a*/сағ дейін артуымен сипатталды. *Oscillatoria* sp. S-001-де сутегі өнімділігі тәжірибенің соңында 0,0070 мкмоль Н₂/мг хлорофилл *a*/сағ дейін жетті. *Phormidium* sp. PSU 1120 үшін ең жоғары белсенділік 40-шы сағатқа қарай байқалды (0,0100 мкмоль Н₂/мг хлорофилл *a*/сағ), содан кейін 60 сағатқа дейін инкубациялау кезінде индикатордың аздап төмендеуі байқалды (0,0096 мкмоль Н₂/мг хлорофилл *a*/сағ). *Synechococcus* sp. SU 78 сутегі өндіру белсенділігінің жоғары болғанын көруге болады (0,0240 мкмоль Н₂/мг хл *a*/сағ дейін), бұл штамның әрі қарай зерттеу үшін жоғары әлеуетін бар екенін көрсетеді. Анаэробты жағдайларда *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамында ең жоғары Н₂ өндірісі бар екені байқалды және ең жоғары екі бағытты гидрогеназа белсенділігі тіркелді.

Метилвиологен мен натрий дитионитін қолдану гидрогеназа белсенділігін анықтау үшін тиімді болғанымен, жасушалық эндогендік электрон тасымалдау жүйесінің жұмысын бұзуы және осылайша H_2 түзілуі үшін электрондардың қолжетімділігін шектеуі мүмкін екенін атап өткен жөн. Сондықтан алынған мәндерді жасушалық сутегі өндірісінің максималды әлеуетін тікелей бағалау емес, нақты тәжірибелік жағдайларда фермент белсенділігінің сипаттамасы ретінде қарастыру керек.

Осылайша, ацетиленредуктазалық тест зерттелген гетероциста түзбейтін штамдарда нитрогеназа белсенділігін анықтамады, бұл осы зерттеу жағдайларында H_2 түзілуінің нитрогеназаға тәуелді жолы іске аспайтынын көрсетеді. Сонымен қатар барлық дақылдар анаэробты жағдайда сутегі түзе алатынын көрсетті, бұл қараңғылық ферментациясымен және фотосинтетикалық электрон тасымалымен байланысқан гидрогеназаға тәуелді механизмге сәйкес келеді. H_2 өндіру әлеуеті ең жоғары штамдар ретінде *Synechocystis* sp. PSU 1262 және *Synechococcus* sp. SU 78 анықталды; бұл жасушалық тәжірибелермен де, екі бағытты гидрогеназа белсенділігі тестімен де расталды. Екі штамм да жоғары нәтиже көрсеткенімен, әрі қарай зерттеу нысаны ретінде сутегі түзу көрсеткіші жоғары болғандықтан *Synechocystis* sp. PSU 1262 негізгі зерттеу нысаны ретінде таңдап алынды. Сонымен қатар, бөлініп алынғын 5 штамм алдағы зерттеулер үшін коллекция қорына сақталды.

Synechocystis sp. PSU 1262 *штамын таңдау негізі*. Гетероциста түзбейтін изоляттарды молекулалық сутегі түзу қабілеті бойынша салыстырмалы скринингтен кейін сутегі метаболизмін реттейтін факторларды әрі қарай талдау үшін модельдік штамды таңдау қажет болды. Іріктеудің негізгі талаптары: 1) жылдам өсу және биомассаны жинақтау, 2) сутегі өндірісінің жоғары деңгейі, 3) уақыт бойынша H_2 бөліну динамикасының тұрақтылығы, 4) сондай-ақ, әртүрлі инкубация режимдерінде сутегі түзілуін қамтамасыз ете алатын белсенді гидрогеназа жүйесінің бар екенін растау болды.

11-суретте берілген деректерге сәйкес *Synechocystis* sp. PSU 1262 басқа зерттелген дақылдармен салыстырғанда қараңғыда анаэробты жағдайда ең айқын H_2 өнімділігін көрсетті. Штамм алғашқы 24 сағат ішінде сутегіні тұрақты бөліп отырды, ал газ фазасын инертті газға ауыстырғаннан кейін инкубацияны жалғастырғанда H_2 жиналуы байқалып, 96 сағатта ең жоғары мәндерге жетті. Мұндай профиль штамның сутегі түзуші белсенділігін тек тәжірибенің бастапқы кезеңінде ғана емес, ұзақ уақыт бойы сақтай алатынын көрсетеді. Бұл ұзақмерзімді тұрақты H_2 өндірісін талдайтын кейінгі зерттеулер үшін маңызды.

Анаэробты инкубация жарық жағдайында жүргізілгенде де (11-сурет) *Synechocystis* sp. PSU 1262 жоғары H_2 өнімділігін сақтады. Бұл штамда жарықтағы сутегі шығымы қараңғыға қарағанда жоғары болды, бұл фотосинтетикалық электрон тасымалының гидрогеназаға тотықсыздандырғыш эквиваленттерді жеткізудегі ықтимал үлесімен сәйкес келеді. Кейінгі инкубация мерзімдеріндегі H_2 өнімділігінің біртіндеп төмендеуі ферменттердің оттегіге сезімталдығымен және жасушаішілік тотықсыздандырғыш эквиваленттердің

(мысалы, НАД(Ф)Н, Fd) және субстрат қорларының сарқылуымен түсіндірілуі мүмкін. Дегенмен, осындай төмендеу жағдайының өзінде *Synechocystis* sp. PSU 1262 жалпы Н₂ өнімділігі зерттелген изоляттар ішінде ең жоғары деңгейлердің бірі болып қалды, бұл оны оңтайландыратын да, тежейтін де факторларды бағалау үшін қолайлы нысан етеді.

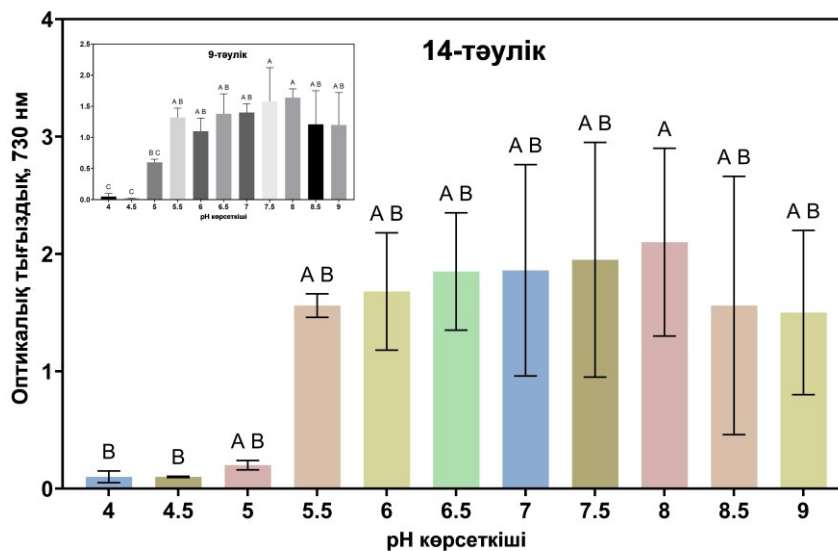
Штамның ферменттік әлеуетінің жоғары екенін қосымша растау екі бағытты гидрогеназа белсенділігін тотықсыздандырғыш анаэробты жағдайда жасанды электрон донорларын (метилвиологен мен натрий дитиониті) пайдалану арқылы анықтау тестінде алынды (12-сурет). Бұл жағдайда *Synechocystis* sp. PSU 1262 басқа дақылдармен салыстырғанда Н₂ түзілуінің ең жоғары жылдамдығын көрсетті, бұл функционалды белсенді гидрогеназа жүйесінің бар екенін дәлелдейді. Метилвиологен мен натрий дитионитін қолдану жасушадағы электрон тасымалының табиғи ұйымдасуын өзгертуі мүмкін екенін ескеру қажет. Сондықтан алынған көрсеткіштер ферменттің табиғи жағдайдағы емес, тесттің арнайы шарттарындағы белсенділігін сипаттайды. Алайда бұл нәтижелер 11-суретте берілген жасушалық тәжірибелермен бірге қарастырылғанда, *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамындағы жоғары Н₂ өнімділігінің ферменттік негізі бар екенін және әртүрлі инкубация режимдерінде қайталанып байқалатынын растайды.

Осылайша, деректер жиынтығы (11-сурет, 12-сурет) *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамын модельдік нысан ретінде таңдауды негіздейді: ол қараңғыда және жарықта анаэробты жағдайда Н₂-нің жоғары әрі тұрақты шығымымен сипатталады және екі бағытты гидрогеназаның айқын белсенділігін көрсетеді. Кейінгі тәжірибелерде бұл штамның сутегі өнімдіру жағдайларын оңтайландыру және Н₂-продукциясының жылдамдығы мен ұзақтығын айқындайтын факторларды талдау үшін қолданылды.

3.5 *Synechocystis* sp. PSU 1262 цианобактерия штамының сутегі бөлінуіне физика-химиялық факторлардың әсерін бағалау

3.5.1 рН-тың дақыл өсуінің кинетикасына әсері

рН мәні жасушаның өсуімен және физиологиялық күйін анықтайтын негізгі физикалық-химиялық факторлардың бірі болып табылады. Негізгі фактор өзгеріске ұшыраса қоректік заттардың сіңірілуіне, ферменттік жүйелердің белсенділігіне және жасушаішілік тотығу-тотықсыздану тепе-теңдігіне әсер етіп, биомасса жиналуын өзгертеді. Зерттеуде *Synechocystis* sp. PSU 1262 үшін BG-11 ортасындағы дақылдың рН 4-тен 10-ға дейінгі диапазонда әмбебап буферлік жүйелер арқылы реттелген әртүрлі рН деңгейлерінде сәтті дамидынын көрсетті. Алдын ала бақылаулар төмен рН мәндерінде жасушалардың өсуін байқатпайтынын көрсеткен. Біздің тәжірибелер жасушалардың рН-тың кең диапазонына бейімделетінін, әсіресе қышқыл және сілтілі жағдайларға төзімділігін растады (13-сурет).



Ordinary one-way ANOVA ($P = 0.0021$, $R = 0.6618$, $F = 4.3$, $n = 3$)

Сурет 13 – BG-11 қоректік ортасындағы pH мәні өзгерген жағдайда *Synechocystis* sp. PSU 1262 штаммының өсу динамикасы (14-тәулік)

13-суретте BG-11 қоректік ортасында әртүрлі pH деңгейлерінде әмбебап буферлік жүйелермен реттелген *Synechocystis* sp. дақылының оптикалық тығыздық көрсеткіштері берілген. Жасушалық дақылдардың оптикалық тығыздығы (OT) 730 нм толқын ұзындығында өлшеніп, өсу динамикасын бақылау үшін әр үш күн сайын тіркелді.

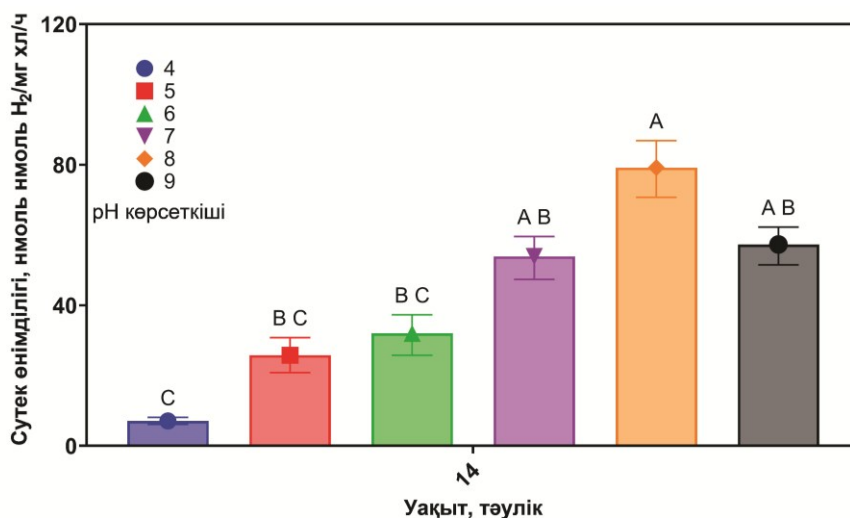
Synechocystis sp. PSU 1262 нәтижелері штаммының сілтілі ортаға бейімделе алатынын көрсетеді: оңтайлы өсу бейтарапқа жақын және әлсіз сілтілі жағдайларда байқалады, ал қышқыл орта жасушалардың өсуін айқын тежейді. Жасушалардың бастапқы концентрациясы $OT_{730} = 0,1$ деңгейінде стандартталып, бұл барлық сыналған pH деңгейлерін бақылаулы түрде салыстыруды жеңілдетті.

Бізбен алынған нәтижелер көрсеткендей, *Synechocystis* sp. PSU 1262 өсу көрсеткіштері ортаның pH мөлшеріне тікелей тәуелді болды. pH-тің төмен көрсеткішінде, негізінде 4-4,5 арасында жасушалардың өсуі төмендеп, түстері ағарып кетті және оптикалық тығыздықтары, сәйкесінше, $OT_{730} = 0,018$ және $OT_{730} = 0,016$ құрады. Бұл өз кезегінде жасушалардың өсуіне бұл pH бірліктері теріс әсер еткенін және жасушалардың пролиферациясы дұрыс жүзеге аспағанын байқатады. pH көрсеткіші өскен сайын жасушалардың өсімі артқанын байқауға болады. pH мәнінің 8 бірлігінде ($OT_{730} = 2,1$) жасушалардың өсімі артып, биомассаның ең жоғары өнімділігі тіркелді. Бұл осыған дейін бізбен алынған нәтижелерге ұштасады, 7-8 pH арасында бейтарап орта жасушалардың өсуіне қолайлы жағдай жасайды. Жасушалардың пролиферациясы қалыпты жүзеге асып, жасуша органеллаларының біртекті қызмет атқарып тұрғанын көруге болады.

Бұл бақылаулар *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамының экологиялық артықшылықтарын және әлеуетті биотехнологиялық қолданбаларын түсіну үшін маңызды. Өсуге қолайлы рН диапазонын анықтау зерттеушілерге осы цианобактерияларды зерттеу немесе олардың мүмкіндіктерін биожанармай өндіру, көміртектегі ұстау және биоремедиация сияқты қолданбаларда пайдалану үшін дақыл өсіру жағдайларын тиімдірек жобалауға мүмкіндік береді.

3.5.2 рН-тың сутегі шығымына әсерін зерттеу

Сутегі өндірісіне рН көрсеткіштерін зерттеу негізгі маңызды зерттеу жұмыстарының бірі болып табылады. *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамының сутегі өндірісін оңтайландыру мақсатында сутегі өндірісін арттыруға бағытталған зертханалық жұмыстар жүзеге асты (Сурет 14).



Ordinary one-way ANOVA (P = 0.0011, R = 0.7822, F = 8.621, n = 3)

Сурет 14 – H₂ өнімділігіне әртүрлі рН мәндерінің әсерін анықтау

Тәжірибелік деректер сутегі өндіру жылдамдығы ортаның рН деңгейіне айқын тәуелді екенін көрсетті: ең жоғары мән рН 8 кезінде тіркеліп, 79,2 нмоль H₂/мг хл а/сағ құрады. Осы рН деңгейі сутегі генерациясы үшін оңтайлы болды, ал рН 9 сияқты жоғары мәндерде өндіріс тиімділігі төмендеді, бұл рН-тың шамадан тыс жоғарылауының жағымсыз әсерлерімен байланысты болуы мүмкін.

Synechocystis sp. PSU 1262 штамында сутегі өндірудің рН-қа тәуелділігі оның белгілі бір қоршаған орта жағдайларына физиологиялық және метаболизмдік бейімділігін көрсетеді. Әлсіз сілтілі жағдайда ең жоғары өнімділік сутегі түзу жолына қатысатын ферменттердің, соның ішінде гидрогеназаның белсенділігімен байланысты болуы ықтимал. Ал рН деңгейі одан әрі артқанда өндірістің төмендеуі осы ферменттердің тежелуімен немесе

биосутегі түзілуіне қолайсыз өзге метаболизмдік өзгерістермен түсіндірілуі мүмкін.

Бұл нәтижелер сутегі шығымын барынша арттыру үшін ортаның рН-ын дәл бақылаудың маңызын көрсетеді. рН-ты әлсіз сілтілі мәндерге дейін оңтайландыру цианобактерияларды пайдалана отырып жаңартылатын энергия өндіруге бағытталған үдерістердің тиімділігін едәуір арттыруы мүмкін. рН-қа тәуелділіктің молекулалық механизмдерін тереңірек зерттеу тұрақты әрі өнімді биотехнологиялық үдерістерді әзірлеуге ықпал етеді.

3.5.3 Буферлік ерітінділердің сутегі шығымына әсері

Synechocystis sp. PSU 1262 штамы арқылы сутегі бөліну кинетикасын зерттеу жұмыстары бірнеше кезеңнен тұрды. Алдымен биомасса арнайы жағдайда өсірілді: жарық қарқындылығы 60 мкмоль фотон/м²/с деңгейінде сақталып, суспензия 150 айн/мин жылдамдықпен үнемі араластырылып тұрды. Жасушалар белсенді түрде көбейіп, логарифмдік өсу фазасына жеткен кезде центрифугалау әдісімен бөлініп алынды да, жаңадан дайындалған BG₀-11 қоректік ортасында үш рет тазартыла жуылды.

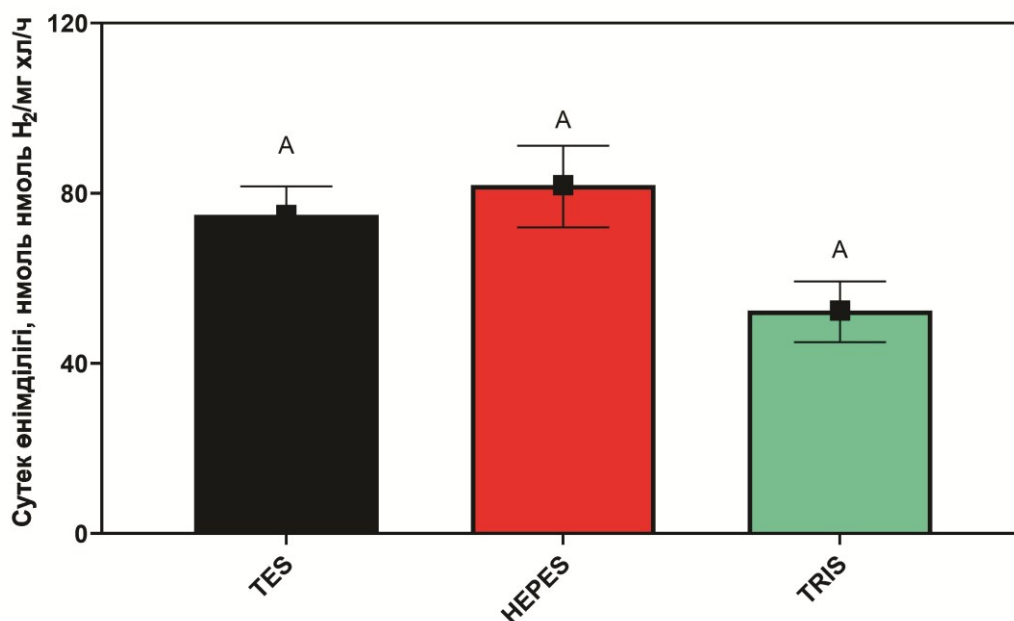
Келесі кезекте жасушалар рН көрсеткіші 4 пен 12 аралығында болатын әртүрлі ортада 72 сағат бойы жарықта инкубацияланды.

Қажетті рН деңгейін ұстап тұру үшін әмбебап буферлер қолданылды. Алайда, негізгі буферлік жүйелерді тікелей салыстыруға көшпес бұрын, цианобактерияларға алдын ала сұрыптау жұмыстары жүргізілді. Ол жерде тиімді рН мәні ұзақ уақыт бойына сақталатын және оңтайлы дақылдау жүзеге асатын режимдерді анықтау басты назарға алынды. HEPES, TES және TRIS сынды химиялық қоспалардың белгілі бір 50 мМ концентрациясы сутегі өнімділігіне қалай әсер ететіні анықталды.

Зерттеу жұмысы барысында сутегінің өнімділігі 72 сағат бойына зерттелді. Зерттеу нәтижелері әр 24 сағатта алынып отырылды.

Зерттеу барысында байқағанымыздай, ортаның қышқылдығы рН 8-ге тең болғанда штамның сутегі бөлу белсенділігі күрт артады (мұны 15-суретке қарап та көруге болады). Ал көрсеткіш рН 4-ке немесе 9-ға ауытқығанда, керісінше, сутек өндіру процесі айтарлықтай тежеледі.

Осы заңдылықты ескере отырып, біз оңтайлы саналатын рН 8 жағдайында 50 мМ концентрациялы үш түрлі буферлік жүйенің (TES, HEPES және TRIS) әсерін қосымша тексеріп көрдік. Нәтижесінде HEPES буфері сутегі шығымын барынша арттырып, ең жақсы көрсеткішке қол жеткізді: сағатына 1 мг хлорофилл *a*-ға шаққанда 81,9 нмоль Н₂ бөлінді. Салыстыру үшін айтсақ, бұл TES (74,9 нмоль Н₂/мг Хл *a*/сағ) және әсіресе TRIS (бар-жоғы 52,4 нмоль Н₂/мг Хл *a*/сағ) буферлерімен салыстырғанда әлдеқайда жоғары нәтиже. Мұндай айырмашылық биосутек өндіру үдерісінде буфер құрамының маңызды рөл атқаратынын айқындайды, бұл ықтимал түрде ферменттік белсенділік пен метаболизмдік жағдайлар үшін қолайлы рН деңгейін тұрақтандырумен байланысты (15-суретті қараңыз).



Ordinary one-way ANOVA (P = 0.0766, R = 0.5754, F = 4.065, n = 3)

Сурет 15 – Әртүрлі буферлердің сутегі өнімділігіне әсері

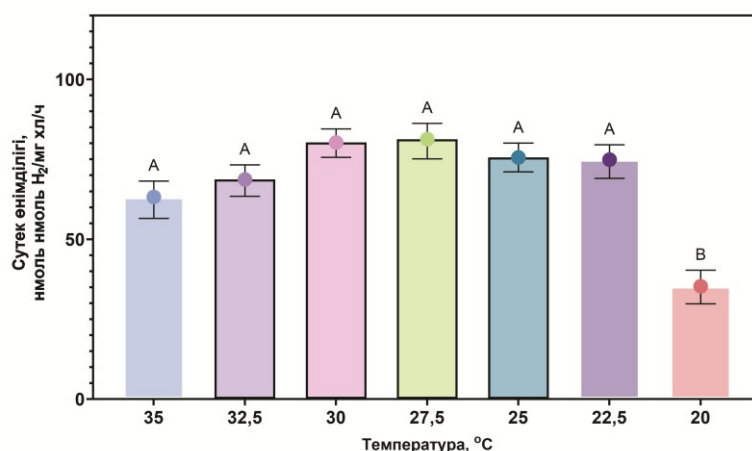
HEPES буферінің жоғары тиімділігі оның химиялық тұрақтылығымен және жасушалық үдерістерге минималды әсер етуімен түсіндіріледі, яғни ол сутегі өндірісін күшейтуге қолайлы орта қалыптастырады. TRIS қолданылған жағдайда өнімділіктің төмендеуі, ал TES кезінде орташа нәтижелердің байқалуы барлық буферлердің сутегі генерациясына қатысатын биохимиялық жолдарды бірдей дәрежеде қолдамайтынын көрсетеді.

Жалпы алғанда, зерттеу нәтижелері рН параметрі *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамында сутегі өндіру үшін шешуші фактор екенін көрсетті. Сутегі шығымының ең жоғары деңгейі рН 8 кезінде тіркелді, бұл үдерістің қоршаған ортаның рН мәніне айқын тәуелділігін дәлелдейді. Буферлік жүйелердің ішінде HEPES сутегі өндірудің жоғары өнімділігін қамтамасыз етуде ең тиімді болды. Бұл нәтиже фотобиологиялық сутегі өндірісін және соған байланысты метаболизмдік жолдарды оңтайландыруға буфер жүйесін дұрыс таңдаудың маңызын көрсетеді.

3.5.4 Әр түрлі температура мәндерінің сутегі шығымына әсері

Биосутегі өндірісі процестерін оңтайландырудың маңызды аспектісі - H₂ өндіретін организмдердің тиімділігіне әсер ететін температура сияқты қоршаған орта факторларын түсіну. *Synechocystis* sp. PSU 1262 көмегімен температураның сутегі өндірісіне әсерін зерттеу цианобактериялардағы H₂ өндірісі биопроцестерінің тиімділігін анықтайтын факторларды түсінуде жаңа мүмкіндіктер ашады. 20°C-тан 35°C-қа дейінгі температура диапазонында

жүргізілген тәжірибелер бізге сутегінің максималды шығымының оңтайлы жағдайларын анықтауға мүмкіндік берді. Бұл диапазон штамның термиялық тұрақтылығын және H_2 өндірісі үшін артықшылықтарын мұқият зерттеу үшін таңдалды (16-сурет).



Ordinary one-way ANOVA ($P = 0,0002$, $R = 0,8112$, $F = 10,02$, $n = 3$)

Сурет 16 – Әртүрлі температура мәндерінің сутегі өнімділігіне әсері

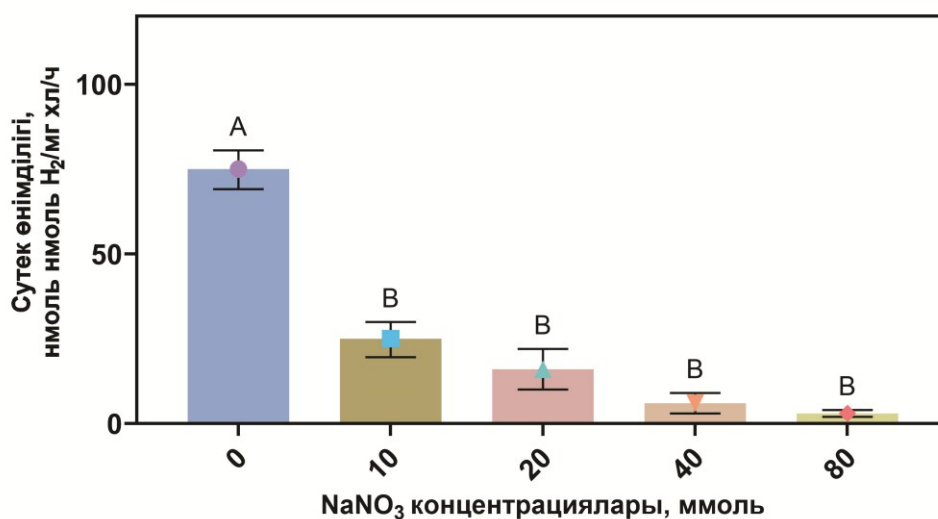
Біздің нәтижелеріміз сутегі өндірісінде температураға тәуелді айқын заңдылықты анықтады. Штамның өсуі 25°C температурада оңтайлы болғанымен, H_2 өндірісі 27°C және 30°C аралығында ең жоғары деңгейге жетті, ең жоғары тиімділік $27,5^{\circ}\text{C}$ температурада ($81,3 \text{ нмоль } H_2/\text{мг хл а/сағ}$) болды. Бұл температура H_2 өндірісі үшін ең қолайлы деп анықталды, бұл оңтайлы өсу температурасынан аздап ауытқып кететін белгілі бір термиялық артықшылықты көрсетті. Осы оңтайлы диапазоннан төмен және жоғары температура H_2 өнімділігінің төмендеуіне әкелді, бұл *Synechocystis* sp. 1262 термиялық өзгерістерге сезімталдық танытатынын көрсетеді. Атап айтқанда, 20°C температурада H_2 өндірісі $35,3 \text{ нмоль } H_2/\text{мг хл а/сағ}$ дейін айтарлықтай төмендеді, ал температураны 35°C -қа дейін көтеру өндіріс жылдамдығын $63,2 \text{ нмоль } H_2/\text{мг хл а/сағ}$ дейін төмендетті. Бұл термиялық жауап қисығы сутегі өндірісінің тиімділігін арттыру үшін тиісті температуралық жағдайларды сақтаудың маңыздылығын көрсетеді. Мұндай температура тәуелділігі сутегі өндіру тиімділігін арттыру үшін тиісті температуралық режимді сақтау аса маңызды екенін көрсетеді. Сонымен бірге, штамның температура ауытқуларына сезімталдығын да дәлелдейді: оңтайлы аралықтан ауытқығанда сутегі түзілуі айтарлықтай төмендейді, демек үдерісті оңтайландыру үшін тұрақты температуралық жағдайларды ұстап тұру қажет.

Бұл нәтижелер *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамын өсіру стратегияларын жетілдіру және биосутегі өндіру биопроцестерінің тиімділігін арттыру үшін маңызды. Температураның осы үдеріске әсерін түсіну жаңартылатын энергия

көздері негізінде биосутегі өндіруге бағытталған неғұрлым тұрақты және тиімді биотехнологиялық жүйелерді құруға мүмкіндік береді.

3.5.5 Әр түрлі азот концентрацияларының сутегі өнімділігіне әсерін зерттеу

Цианобактерия штамдарын өсіру жағдайларын оңтайландыру қоректік ортаның құрамын қоса алғанда, бірқатар факторларға тәуелді. Бұл бөлімде азот көздері, нақтырақ айтқанда, қоректік ортаға натрий нитратын (NaNO_3) әртүрлі концентрацияда қосу және оның *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамының сутегі өндіруіне ықпалы зерттеледі. Тәжірибелер әртүрлі қоспалармен толықтырылған BG-11 қоректік ортасын пайдаланып жүргізілді. NaNO_3 концентрациясы бақылау ретінде 0 ммольден бастап, жоғары деңгейлерге дейін өзгерді. Дақылдар 72 сағат бойы жарық пен температураның оңтайлы жағдайларында ұсталып, сутегі өндіру тәулігіне бір рет газдық хроматография әдісімен өлшенді (17-сурет).



Ordinary one-way ANOVA ($P < 0.0001$, $R = 0.9117$, $F = 25.80$, $n = 3$)

Сурет 17 – Әртүрлі азот концентрацияларының сутегі өнімділігіне әсері

Натрия нитратының қоспасының әсерін зерттеу биологиялық өндіріс процесіне айтарлықтай теріс әсер ететінін анықтады. Натрия нитратының концентрациясы әртүрлі BG-11 ортасында жүргізілген тәжірибелер қоспа концентрациясының артуымен H_2 өндірісінің төмендегенін көрсетті. NaNO_3 жоқ бақылау ортасында H_2 өндірісі 75 ммоль H_2 /мг хл $a/\text{сағ}$ құрады. Дегенмен, NaNO_3 -тың аз мөлшерін қосудың өзі H_2 өндірісінің айтарлықтай төмендеуіне әкелді. Соның ішінде, 10 мМ натрий нитраты концентрациясында H_2 өндірісі 25 ммоль H_2 /мг хл $a/\text{сағ}$ дейін төмендеді. Натрий нитраты концентрациясының одан әрі артуымен тежеу әсері күшейіп, 80 мМ NaNO_3 кезінде 3 ммоль H_2 /мг хл $a/\text{сағ}$ ең төменгі өндіріс жылдамдығына жетті.

Бұл нәтижелер натрий нитратының сутегі өндірісі үшін қажетті метаболикалық үдерістерге тежеу әсерін көрсетеді. Нитрат иондарының болуы гидрогеназа ферменттерінен электрон ағынын бұру немесе сутегі түзілуіне жауапты үдерістерді бұзу арқылы фотосинтез механизміне кедергі келтіреді.

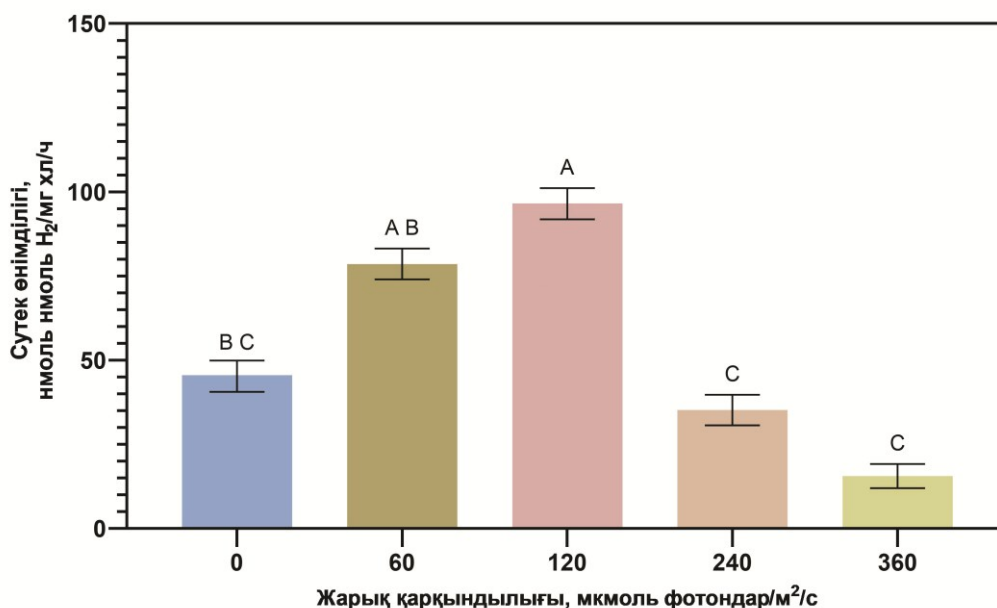
3.5.6 Жарық қарқындылығы мен жарықтандыру ұзақтығының сутегі шығымына әсері

Жарық қарқындылығының *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамының сутегі өндіруіне әсерін зерттеу биосутегі өндіру және биопроцестерінің тиімділігін арттыру үшін жарық режимін оңтайландыру жолдарын түсіндіретін маңызды деректер береді. Зерттеу барысында дақылдар BG-11 ортасына бейімделіп, әртүрлі жарық қарқындылығы жағдайында өсірілді. Логарифмдік өсу фазасындағы *Synechocystis* sp. PSU 1262 дақылы жаңа BG-11 ортасына көшіріліп, 24 сағаттан астам уақыт бойы жарық қарқындылығының әртүрлі деңгейлеріне (0, 60, 120, 240 және 360 мкмоль фотон/м²/с) ұшыратылды. Одан кейін жасушалар анаэробты жағдайда тұрақты жарықта 62 сағат инкубацияланды, ал сутегі өндіру әр 24 сағат сайын газдық хроматография әдісімен өлшенді (18-сурет).

Тәжірибелік деректер жарық қарқындылығының сутегі өндіруге айқын әсер ететінін көрсетті. Жарық болмаған жағдайда сутегі өндіру жылдамдығы салыстырмалы түрде төмен болып, 45,6 нмоль Н₂/мг хл а/сағ деңгейінде тіркелді. Жарық қарқындылығы төмен болғанда сутегі өндіру мардымсыз күйде сақталды, бұл үдерістің фотосинтездейтін организмдер үшін негізгі энергия көзі ретінде жарыққа тәуелді екенін көрсетеді. Жарық енгізілгенде көрсеткіш айқын артты және ең жоғары мән 120 мкмоль фотон/м²/с жағдайында байқалды: сутегі шығымы 96,6 нмоль Н₂/мг хл а/сағ болды. Жарықтың осы оңтайлы деңгейі фотосинтез үшін қажетті энергияны қамтамасыз ету мен жасушалардың фотодеструкциясын болдырмау арасындағы тепе-теңдікті көрсетеді. Алайда, жарық қарқындылығы одан әрі артқанда (240 және 360 мкмоль фотон/м²/с) сутегі өндіру төмендеді және бұл жасушалық деструкция мен фотоингибиция белгілерімен қатар жүрді.

Synechocystis sp. PSU 1262 штамының тәжірибелік нәтижелері биосутегі өндірісін реттеудегі жарық қарқындылығының маңыздылығын көрсетеді. Жоғары жарық қарқындылығы биосинтетикалық үдерістер тиімділігін арттыруға ықпал етеді, сонымен қатар, сутегі өнімділігін арттырудың кілті болуы мүмкін. Дегенмен, жарық қарқындылығы мен фотоингибирлеудің ықтимал қаупі арасында тепе-теңдікті ескеру қажет, бұл дақылдың тіршілік ету қабілеті мен өнімділігіне кері әсер етуі мүмкін. Орташа жарық қарқындылығы гидрогеназа ферменттеріне фотосинтетикалық электрон ағынын арттыру арқылы сутегі өндірісін ынталандырады. 120 мкмоль фотон/м²/сек жарық қарқындылығында сутегі өндірісінің байқалған шыңы биосутегі өндірісін барынша арттыру және жасушаның тіршілік ету қабілетін сақтау үшін оңтайлы

жарықтандыру жағдайларының маңызды көрсеткіші болып табылады (18-сурет).



Ordinary one-way ANOVA ($P = 0,0002$, $R = 0,8733$, $F = 17,23$, $n = 3$)

Сурет 18 – Жарық қарқындылығының сутегі өнімділігіне әсері

3.6 Фотосинтез ингибиторлары мен әр түрлі жарық-қараңғы режимдерінің цианобактериялардың физиологиялық күйі және сутегі түзілу белсенділігіне кешенді әсерін бағалау

3.6.1 Фотосинтез ингибиторларының әртүрлі концентрацияларын және олардың сутегі өндіруге әсерін зерттеу

Сутегі өндіруші белсенді штамдарды таңдаумен қатар, бұл саладағы маңызды бағыттардың бірі – белгілі объектілерде, яғни осы жағдайда цианобактерияларда сутегі өндірісінің белсенділігін арттыруға арналған зерттеулер. Құрамында көміртегі қосылыстары бар субстраттардың сутегіге тиімді түрде айналу үшін цианобактериялардың өсу жағдайларын оңтайландыру өте маңызды үдерістердің бірі болып табылады. Сутегінің бөлінуін арттыратын әртүрлі жасушалардың сыртқы орта факторларын анықтау маңызды болып табылатыны сөзсіз [37, 83, 186].

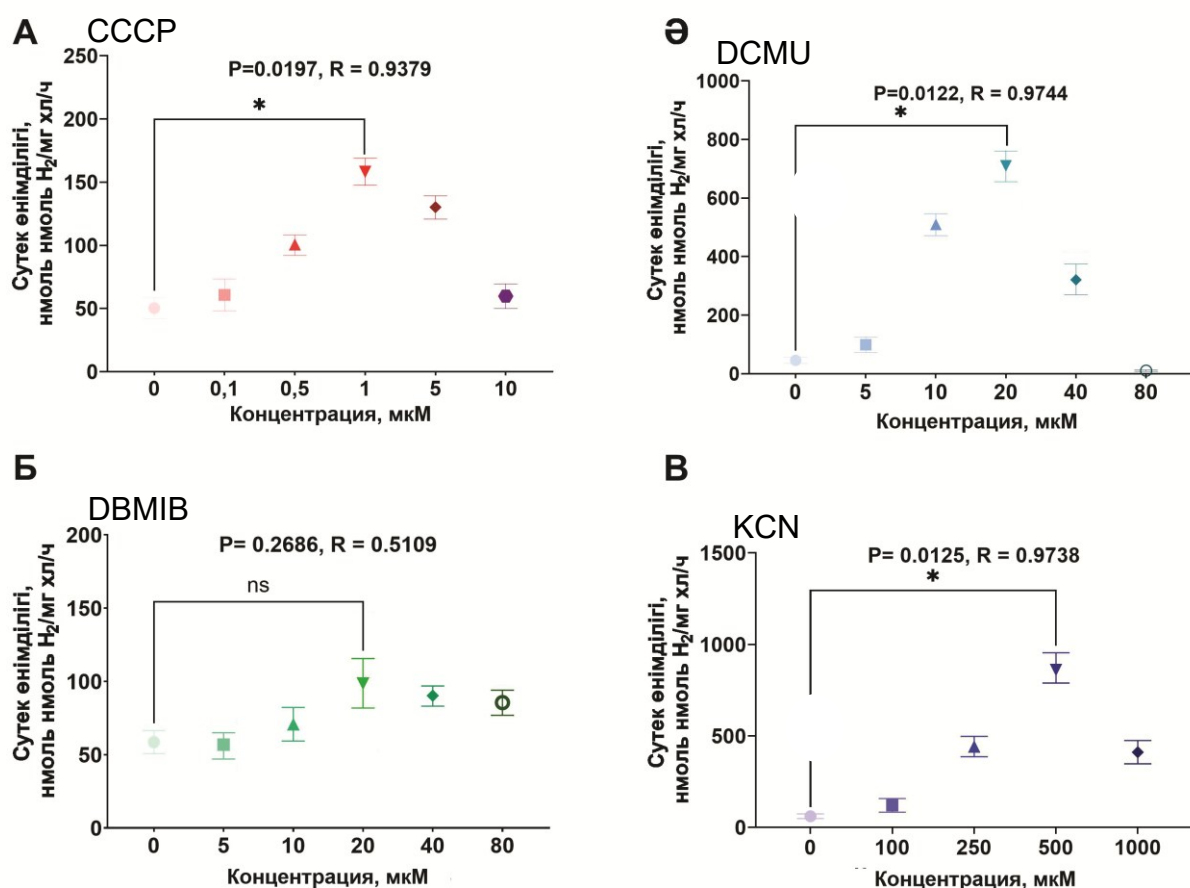
Гетероцистасыз цианобактерия штамдарында сутегі түзілуі екі бағытты гидрогеназа арқылы катализденеді және азотсыз ортада, анаэробты жарық немесе қараңғы жағдайларда іске асады [37, 168, 187]. Гидрогеназа – организмде молекулалық сутегіні әрі сіңіруді, әрі түзілуін катализдейтін жалғыз фермент [188, 189]. Гидрогеназаның оттегіге өте сезімтал болуына байланысты жарықта жасушалардың сутегі өндіруі төмендейді [190-192]. Сондықтан, гетероцист түзбейтін цианобактерия штамдарында сутегі өндірісін арттыру үшін оттегінің

мөлшерін азайту немесе жою қажет. Оттегі түзілуін төмендетудің бір тәсілі – фотосинтез ингибиторларын қолдану. Фотосинтез ингибиторлары фотожүйе 2 (көбінесе DCMU жағдайында) кешенінің белсенділігін басып, молекулалық сутегі түзілуіне қолайлы анаэробты жағдай қалыптастыруға бағытталған. Ингибиторлар ФЖ 2 кешенімен байланысып акцептор жағын QA ден QB ге электрон тасымалын бөгейді және H₂O молекуласының ыдырауын, сонымен бірге, оттегінің түзілуін төмендетеді. Осылайша электрон ағыны толық шектелмейді, электрон көзі ретінде аэнаробты жағдайда жасушаішілік қорларынан, әсіресе гликоген қорының ыдырауынан, тыныс алу үдерістерінен және жарық ФЖ1 арқылы жүретін электрон тасмалынан түсуі мүмкін. Бқл электрондардың Fd немесе басақа тасымалдаушылар арқылы гидрогеназаға бағытталып сутегі түзілуіне қатысады. Алайда, фотосинтез ингибиторларының тиімділігі цианобактериялардың әртүрлі штамдарында өзгеше болуы мүмкін, сондықтан, оңтайлы концентрацияны таңдау сутегі өндірісі бойынша зерттеулердің негізгі аспектілерінің бірі болып саналады.

Фотобиологиялық сутегі өндіруге *Synechocystis* sp. PSU 1262 цианобактерия штамдары рН 7,5 деңгейін тұрақтандыру үшін 20 мМ HEPES буферлік агентімен байытылған стандартты BG-11 қоректік ортасында, 25°C температурада және 60 мкмоль фотон/м²/с жарық қарқындылығында алдын ала өсірілді. Жасушалар логарифмдік өсу фазасына жеткеннен кейін биомасса центрифугалау арқылы жиналды. Осы зерттеуде іріктеп алынған штамының сутек түзілу үдерісін оңтайландыру мақсатында зерттелген негізгі факторлармен (рН 8, HEPES, 27-30°C, 120 мкмоль фотон/м²/с, азотсыз орта) инкубацияланды. Фотосинтез ингибиторларының әртүрлі концентрацияларының (DBMIB, DCMU, CCCP, KCN) жарық жағдайындағы әсері зерттелді, өйткені жарық сутегі бөлінуіне ықпал ететін фактор ретінде қарастырылды.

Бұл жұмыста сутегі шығымы ең жоғары болған *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамында 4 ингибитордың әрқайсысы үшін жеке концентрациялар бойынша олардың сутегі бөлінуіне әсері зерттелді. Ингибиторлар ФЖ 2 мен ФЖ 1 арасындағы электрон тасымалдау тізбегінің әр түрлі буынын тежейді, бұл гидрогеназа ферментінің белсенділігін арттыруға қажетті электрондардың бөлінуіне ықпал етуі мүмкін.

Бұл зерттеуде CCCP, DCMU, DBMIB және KCN ингибиторларының әсері зерттелді (Сурет 19).



А – CCCP ингибиторлары, Ә – DCMU ингибиторлары, Б – DBMIB ингибиторлары, В – KCN ингибиторлары. Welch's t-test

Сурет 19 – *Synechocystis* sp. PSU 1262 цианобактерия штамының сутегі өндірісіндегі фотосинтез ингибиторларының әсерін зерттеу

CCCP ингибиторымен жүргізілген тәжірибелер көрсеткендей, H_2 өндірісінің максималды мөлшері 1 мкМ соңғы концентрацияда тіркеліп, 158,3 нмоль H_2 /мг хлорофилл *a*/сағ мәніне жетті. CCCP-тің салыстырмалы жоғары концентрациялары (5–10 мкМ) жасушаларға уытты әсер көрсетті, алайда, CCCP қосылған барлық нұсқаларда сутегі мөлшері бақылау тобымен салыстырғанда жоғары болды (19-сурет).

DBMIB ингибиторы басқа ингибиторлармен салыстырғанда сутегі шығымы бойынша ең төмен көрсеткіштерді көрсетті. 20 мкМ концентрацияда сутегі мөлшері 96,8 нмоль H_2 /мг хлорофилл *a*/сағ болды, бірақ концентрация 1000 мкМ-ға дейін артқанда оның мөлшері азайды. Сутегінің ең төмен фотобиологиялық өндірісі 5 мкМ концентрацияда және бақылау тобында тіркелді, бұл жағдайда сутегі мөлшері 56,9 нмоль H_2 /мг хлорофилл *a*/сағ болды (19-сурет).

DCMU ингибиторымен жүргізілген тәжірибелер сутегі өндірудің салыстырмалы түрде жоғары деңгейін көрсетті, әсіресе 20 мкМ концентрацияда – 710 нмоль H_2 /мг хл *a*/сағ мәніне дейін жетті. Алайда, концентрацияны одан әрі

арттыру жасушаларға уытты әсер етіп, электрон тасымалын толық тежеді. Диуронның 100 мкМ концентрациясында сутегі мөлшері бақылау тобымен салыстырғанда шамамен 4 есе төмен болды.

Сутегі өндіру үшін ең тиімді ингибитор ретінде KCN анықталды. KCN-нің 100–1000 мкМ концентрациялары сутегі өнімділігін едәуір арттырды, бірақ әсері біркелкі болмады. 250–1000 мкМ диапазонында ұқсас мәндер тіркелді: сәйкесінше 441,5 және 410,5 нмоль H_2 /мг хл a /сағ. Ең жоғары сутегі мөлшері 500 мкМ KCN кезінде байқалып, 860 нмоль H_2 /мг хл a /сағ мәніне жетті. Бұл көрсеткіш СССР-пен салыстырғанда 5,4 есе, DBMIB-пен салыстырғанда 8,7 есе және DCMU-пен салыстырғанда 1,2 есе жоғары болды.

Біздің нәтижелер бойынша KCN және DCMU ингибиторлары *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамында сутегі бөлінуін айтарлықтай арттырды. Бұл олардың электрон тасымалдау тізбегіне әсер етуімен және гидрогеназа ферментіне қолайлырақ жағдай қалыптастыруымен байланысты болуы мүмкін.

DCMU негізінен ФЖ 2-ге деңгейінде әсер етеді. Ол электрондардың QA-дан QB-ға өтуін тежейді (1-ші және 2-ші хинон акцепторлары), соның нәтижесінде су фотолизінен кейінгі электрон ағыны және O_2 түзілуі төмендейді. Оттек азайған жағдайда гидрогеназа ферментінің тежелуі әлсіреп, H_2 түзілуі күшейеді. KCN әсері көбіне тыныс алу тізбегіндегі ең соңғы терминалдық оксидазалардың тежелуімен түсіндіріледі. Бұл кезде электрондардың оттекке берілуі шектеліп, жасушада тотықсызданған электрон тасымалдаушылардың үлесі артады. KCN ингибиторы жасушадағы редокс күйді өзгертетін фактор ретінде әсер етеді. Электрондардың беруі шектелуі салдарынан жасушада тотықсызданған эквиваленттердің жиналуына қарай қалыптасады. Редокс тепе-теңдікті сақтау үшін артық электрондарды гидрогеназа жүйесі арқылы шығарып сутегі өнімділігін артуы ықтимал. Сондықтан KCN ингибиторы сутек өнімділігін артқаны редокс балансы өзгеруімен және электрондардың гидрогеназаға қайта бағытталуымен байланысты болуы мүмкін. Ал DBMIB цитохром b_6f кешені деңгейінде электрон тасымалын тежейді. Сондықтан ол электрондардың ФЖ I бағытына өтуін шектеп, сутегі түзілуін KCN және DCMU-мен салыстырғанда төмен деңгейде ғана арттырды [193].

DCMU қатысында цианобактерия жасушаларының сутегі бөлуінің күшеюі бірқатар зерттеулерде де көрсетілген [58, 194]. Айталық, *Anabaena siamensis* TISTR 8012 цианобактериясында фотосинтетикалық электрон тасымалын ингибитор арқылы блоктау сутегі өнімділігін арттырған. Азот фиксациялайтын *Anabaena siamensis* TISTR 8012 штамында жарық жағдайында DCMU қосқаннан кейін сутегі деңгейі ең жоғары мәнге жеткен, ал қолданылған концентрация айтарлықтай жоғары – 50 мкМ болған (бұл түрдің ерекшеліктерімен түсіндіріледі). Тиісінше сутегі өндіру мөлшері 21,25 мкмоль болып, бақылаумен салыстырғанда шамамен 3,95 есе жоғары болғаны ғалымдармен тіркелді [63]. *Synechocystis* sp. дақылын қараңғы анаэробты жағдайда 75 мкМ DCMU концентрациясында өсіргенде сутегі өнімділігінің жоғарылауы тіркелген [45]. DCMU-дың 0,1 мкМ концентрациясы *Eudorina elegans* [195] және

Nannochloropsis [196] микробалдырларының колонияларының өсуін баяулататыны көрсетілген. DCMU және СССР сияқты фотосинтез ингибиторлары фотожүйе 2 фотохимиялық белсенділігін және аденозинүшфосфаттың синтезін тежеп, оттегі түзілуін азайтады әрі *Anabaena variabilis* штамында қараңғыдағы тыныс алудың қарқындылығын арттырады [197]. Жарықта СССР ингибиторының *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942 [198], *Lyngbya* sp., *Oscillatoria* sp. және *Nostoc* sp. [199] штамдарында ФЖ 2 фотохимиялық белсенділігін тежейтіні көрсетілген. Дегенмен, DCMU мен СССР-тің жоғары концентрациялары және ұзақ инкубация уытты болып, жасушалардың өлуіне әкелуі мүмкін.

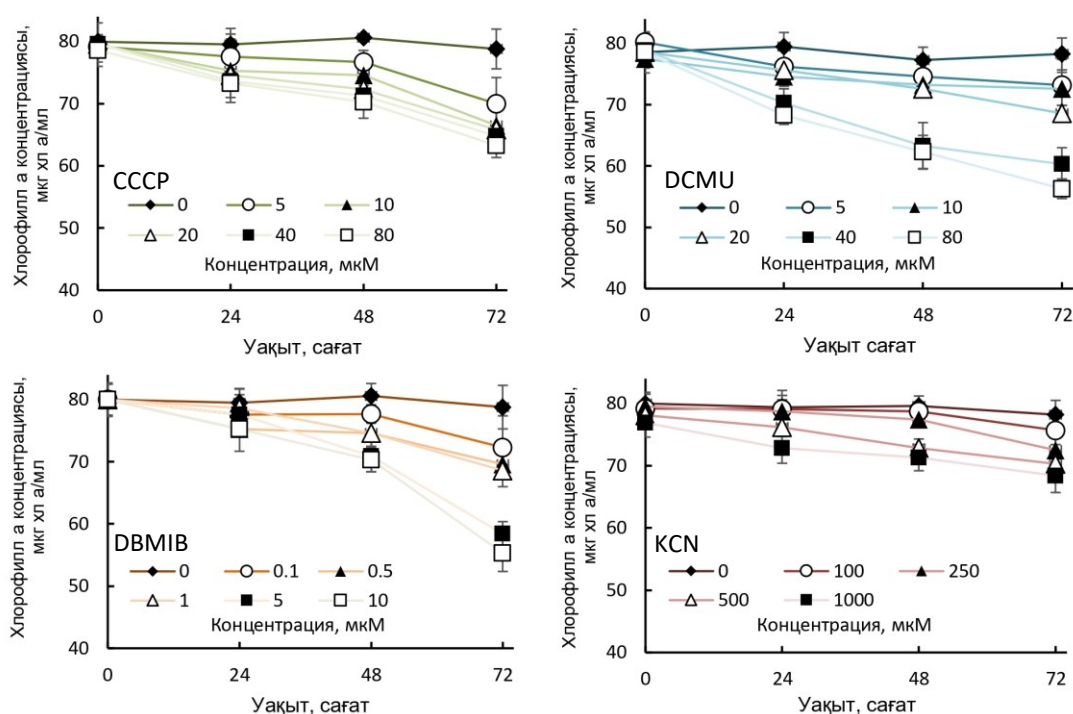
Гидрогеназа арқылы сутегі түзілуі үшін электрон тасымалын фотосинтез арқылы күшейтуге болады. Алайда ФЖ 2-де судың ыдырауы нәтижесінде молекулалық O_2 түзіліп, ол гидрогеназа белсенділігін тежейді және сутегі бөлінуін шектейді. Сондықтан, ФЖ 2 функциясын DCMU арқылы тежеу кеңінен зерттелген. Әдетте фотосинтетикалық электрон тасымалдау тізбегі электрон донорынан электрон акцепторына ($QA \rightarrow QB$) электрон тасымалын мембрана арқылы протондар тасымалымен байланыстырады. Электрон ағынын төмендету сутегі түзу үшін қолжетімді электрондар үлесін арттыруы мүмкін [82]. Әсіресе, теңіздік *Cyanothece* sp. цианобактериясында НАД(Ф)Н-дегидрогеназа кешенінің бір суббірлігі НАД(Ф)Н-ды тотықтыра алады. Сонымен қатар, гетероциста түзетін *Anabaena siamensis* цианобактериясында тыныс алудың барлық терминалды оксидазаларын, хинолоксидазаны және цитохромоксидазаны KCN сияқты спецификалық ингибитормен тежеу фотосинтез кезінде электрон ағынын екі бағытты Нох-гидрогеназаға қайта бағыттауы мүмкін. Хинолоксидазаны (Cyd) тежеу арқылы сутегі бөлінуін ынталандыру цитохромоксидазаны тежеуге қарағанда тиімдірек болды, өйткені тек цитохром белсенділігін блоктау сутек бөлінуінің артуына әкелмеген. Бұл KCN-нің 3 күн бойы жарық-қараңғы циклінде сутегінің жиналуын туындататыны көрсетілген зерттеумен де расталады [200]. DCMU және дибромотимохинон DBMIB (ФЖ 1 арқылы электрон ағынын тежеуші ингибитор) *Synechococcus elongatus* организмінде сутегі бөлінуіне әсері тұрғысынан да зерттелген [201].

3.6.2 Фотосинтез ингибиторларының жасушаның өсуіне және хлорофилл *a* концентрациясына әсерін зерттеу

Сутегінің биологиялық өндірілуі барысында негізгі пигменттердің бірі – хлорофилл *a*. Осы рөлді бағалау үшін *Synechocystis* sp. PSU 1262 жасушалары азот көздері қосылмаған анаэробты ортада, жарықтың берілуімен 1, 2 және 3 тәулік бойы өсіріліп, әртүрлі концентрациядағы ингибиторлар қосылды. Тилакоидты мембраналардағы хлорофилл *a* концентрациясы өлшенді.

Фотосинтетикалық ингибиторлары бар BG₀-11 ортасында *Synechocystis* sp. PSU 1262 жасушаларын өсіргеннен кейін, төрт нұсқаның барлығында хлорофилл *a* концентрациясының төмендеуі байқалды. Инкубацияның алғашқы 24 сағатында хлорофилл *a* концентрациясы аздап төмендеп, кейін 72 сағатқа дейін

сызықты түрде азая түсті. Барлық нұсқада бастапқы хлорофилл *a* концентрациясы 80 мкг/мл болды, алайда, DBMIB, DCMU, СССР және KCN ингибиторларының жоғары концентрациялары және инкубация уақытын ұзарту *Synechocystis* sp. PSU 1262 жасушаларында хлорофилл *a* мөлшерінің айқын төмендеуіне әкелді. Соның ішінде, СССР қолданылған нұсқада хлорофилл *a* 55 мкг/мл деңгейіне дейін төмендеді; DBMIB өңделген жасушаларда $63,3 \pm 1,96$ мкг/мл, ал KCN өңделген нұсқада $68,4 \pm 2,7$ мкг/мл болды. Сондай-ақ, DCMU-де хлорофилл *a* 63 мкг/мл құрады. Бұл нәтижелер ингибиторлардың жоғары концентрациялары және ұзақ инкубация хлорофилл *a* мөлшерін айтарлықтай азайтатынын, ал бұл өз кезегінде сутегінің биологиялық өндірілу тиімділігіне әсер етуі мүмкін екенін көрсетеді (20-сурет).



Ordinary one-way ANOVA ($P = 0,0002$, $R = 0,899$, $n = 3$)

Сурет 20 – Ингибиторлардың хлорофилл *a* концентрациясына әсері

Фотосинтез ингибиторларының анаэробты ортадағы хлорофилл *a* концентрациясына әсері де зерттелді. СССР ингибиторын қоспағандағы бақылау жағдайында хлорофилл *a* концентрациясы өзгерген жоқ. Дегенмен, *Synechocystis* sp. PSU 1262 жасушаларын СССР ингибиторымен өндеген кезде, әсіресе, жоғары концентрацияларда және ұзақ инкубацияларда хлорофилл *a* концентрациясының төмендеуі байқалды. Басқа тәжірибелік жағдайларда хлорофилл *a* концентрациясы жасушаларды азот көзі жоқ BG₀₋₁₁ қоректік ортасында инкубациялауға байланысты жоғарылаған жоқ. СССР ингибиторы тилакоидты мембранадағы фотосинтетикалық электрон тасымалдау тізбегіндегі электрон тасымалдау жылдамдығын басады протондық градиентті бұзуда нәтижесінде

АҮФ түзілуі азаяды, бұл хлорофилл *a* концентрациясының төмендеуіне әкелді. Бұл нәтижелер басқа фототрофты микроорганизмдерде оптикалық тығыздық пен хлорофилл *a* концентрациясының төмендеуін көрсететін бұрынғы зерттеулермен сәйкес келеді [202].

DBMIB ингибиторымен өңделген *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамында 24 сағат ішінде хлорофилл *a* концентрациясы төмендеді. DBMIB - пластохинонның тотықсыздану деңгейінде фотосинтетикалық электрон тасымалын тежейтін күшті пластогидрохинон антагонисі [12, 203]. *A. nidulans* және *Synechocystis* PCC 6714 штамдарымен жүргізілген тәжірибелерде DBMIB-тің 50 мкМ концентрациясы электрон тасымалдау белсенділігін және хлорофилл *a* концентрациясын төмендететіні көрсетілген [204].

DCMU ингибиторы *Synechocystis* sp. PSU 1262 жасушаларында хлорофилл *a* концентрациясының төмендеуіне де себеп болды. DCMU фотосинтетикалық белсенділікті тежейді яғни ФЖ 2, бұл жасуша өсуінің басылуына және хлорофилл *a* концентрациясының төмендеуіне әкеледі. Бұл *Synechocystis* PCC 6803 және *Anabaena variabilis* штамдарында DCMU-мен өңдеу кезінде хлорофилл *a* концентрациясының төмендегенін көрсететін басқа авторлардың зерттеулерімен сәйкес келеді. KCN хлорофилл *a* концентрациясына да теріс әсер етті, бірақ бұл ингибитордың уытты әсері СССР және DCMU-мен салыстырғанда онша байқалмады. KCN концентрациясы артқан сайын хлорофилл *a* концентрациясы төмендей берді [151]. KCN төмен концентрациясы хлорофилл *a* концентрациясын өзгертпеді және анаэробты жағдайларда H_2 өндірісіне оң әсер етті [205].

DBMIB, DCMU, СССР және KCN сияқты фотосинтез ингибиторлары хлорофилл *a* деңгейіне теріс әсер етеді және оларды қолдану H_2 өндірісінің жоғарылауына әкелді. Бұл тилакоидты мембраналардағы ФЖ 2 белсенділігінің төмендеуіне байланысты. Осылайша, жоғары ингибитор концентрациясын қолданған кезде H_2 мөлшерінің төмендеуі бір неше факторға байланысты болуы мүмкін:

1. Жоғары ингибитор концентрациясының тилакоидты мембраналардың құрылымына және фотосинтетикалық аппараттын тұрақтылығын теріс әсер етіп, хлорофилл *a* концентрациясының төмендеуіне әкелуі мүмкін.

2. ФЖ 2-ден келетін судың ыдырауы үшін қажетті протонның бөлінуі мен электрон тасымалының шектелуі, протондар түзілуі мен электрон алмасуына теріс әсер етуі мүмкін.

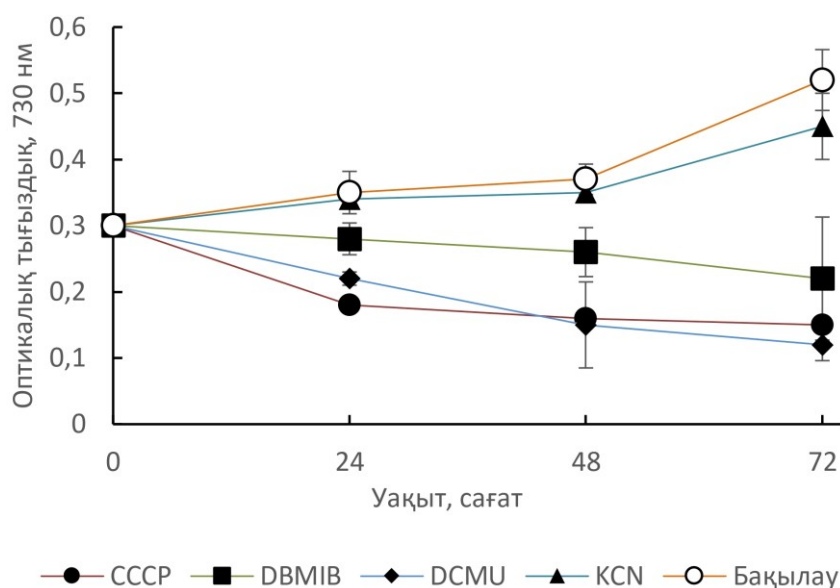
Осылайша, бұл зерттеу әртүрлі фотосинтетикалық ингибиторларды қолдану цианобактериялардағы сутегі өндірісінің өнімділігіне айтарлықтай әсер етуі мүмкін екенін растады. H_2 өндірісінде ең жоғары белсенділікті көрсеткен KCN ингибиторы әрі қарай зерттеулер үшін ең перспективті болып табылады, бұл сутегі биоөндірісін оңтайландыру үшін жаңа мүмкіндіктер ашады.

Фотосинтетикалық ингибиторлардың жасуша концентрациясына әсері.

Бұл зерттеуде сутегі өндірісінде тиімділікті көрсеткен цианобактериялық жасушалардың өсуіне әртүрлі ингибитор концентрацияларының әсері бағаланды

(21-сурет). Бастапқы жасушалардың оптикалық тығыздығы (OT_{730}) 0,3 болды және олар *in vitro* жарық астында 72 сағат бойы өсірілді.

Нәтижелер 500 мкМ KCN ингибиторымен өңделген жасушаларда уақыт өте келе жасуша санының артуын көрсетіп, 72 сағатқа OT_{730} 0,45-ке жеткенін көрсетті, бұл OT_{730} 0,52 болған бақылау тобынан сәл ғана төмен болды. Барлық басқа ингибиторлар үшін жасуша оптикалық тығыздығы уақыт өте келе төмендеді. Мысалы, 20 мкМ DBMIB ингибиторымен өңделген жасушалар үшін оптикалық тығыздық 3 күннен кейін 0,22 болды. Оптикалық тығыздықтың ең төменгі мәндері 1 мкМ CCCP және 20 мкМ DCMU кезінде тіркелді, мұнда OT_{730} сәйкесінше 0,12 және 0,15 болды. Дегенмен, оптикалық тығыздықтың төмендеуі сутегі өндірісіне әсер ететін тікелей фактор емес. Осылайша, бұл зерттеу 500 мкМ концентрациясындағы KCN ингибиторының басқа ингибиторлармен салыстырғанда цианобактериялық жасушалардың өсуіне аз әсер ететінін көрсетеді, бұл жасуша оптикалық тығыздығын айтарлықтай төмендетті. Бұл KCN сутегі өндірісін арттыру үшін қолайлы ингибитор болуы мүмкін екенін көрсетеді, себебі ол жасуша өсуіне минималды әсер етеді және сутегі өнімділігін айтарлықтай арттырады.



Ингибитор концентрациясы: CCCP (1 мкМ), DBMIB (20 мкМ), DCMU (20 мкМ) және KCN (500 мкМ). Ordinary one-way ANOVA ($P = 0,001$, $R = 0,9201$, $n = 3$)

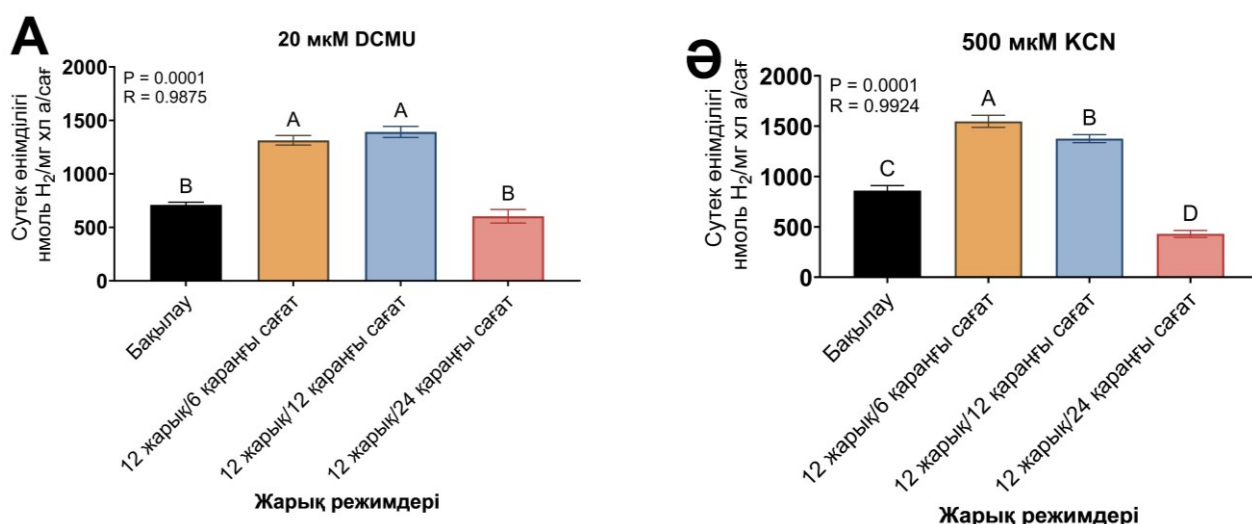
Сурет 21 – Жарық ортада ингибиторлармен өңделген жасушалардың өсу қарқындылығы

3.6.3 Фотосинтетикалық электрондық тасымалдау тізбегін тежеу жағдайында цианобактериялардың сутегі өндіруіне жарық-қараңғы режимінің әсері

DCMU және KCN ингибиторларының екі деңгейдегі концентрациясымен жүргізілген тәжірибелер жарық пен қараңғы режимінің сутегі өндіруге елеулі әсер ететінін көрсетті. 500 мкМ KCN және 20 мкМ DCMU концентрацияларында ингибиторлармен өңделген дақылдар үш түрлі жарық–қараңғы циклі кезінде бақылау дақылдарымен салыстырғанда сутегінің жоғары мөлшерін көрсетті: 12 сағат жарық және 6 сағат қараңғы, 12 сағат жарық және 12 сағат қараңғы, 12 сағат жарық және 24 сағат қараңғы (22-сурет).

KCN және DCMU ингибиторларының екі түрлі концентрациясы және жарық–қараңғының әртүрлі циклдері қолданылған тәжірибелер сутегі өндірісінің айқын артқанын көрсетті. 500 мкМ KCN және 20 мкМ DCMU концентрацияларымен өңделген дақылдар үш режимде (12 сағат жарық және 6 сағат қараңғы, 12 сағат жарық және 12 сағат қараңғы, 12 сағат жарық және 24 сағат қараңғы) бағаланды.

Synechocystis sp. PSU 1262 жасушаларын 12 сағат жарық және 6 сағат қараңғылық кезінде 500 мкМ KCN ингибиторымен өңдеу сутегі өндірісін 80,3%-ға дейін арттырды (1552,2 нмоль H_2 /мг хл а/сағ). 12 сағат жарық/12 сағат қараңғылық режимінде сутегі өндірісі 60,6% артты, ал 12 сағат жарық және 24 сағат қараңғылық режимінде 49,4% жоғары болды.



А – 20 мкМ DCMU ингибиторлары, Б – 500 мкМ KCN ингибиторлары

Сурет 22 – Әртүрлі жарық және қараңғы режимдерінің сутегі түзілуіне әсерін зерттеу

20 мкМ DCMU ингибиторымен жасушаларды тежеу сутегі өндірісін де арттырды. 12 сағат жарық/12 сағат қараңғылық режимінде сутегі өндірісі 96,4%-ға дейін артты (1394 нмоль H_2 /мг хл а/сағ). 12 сағаттық жарық/6 сағаттық қараңғы циклде H_2 бөлінуі бақылаудағыға қарағанда сәл жоғары (85,3%) болды, ал 12

сағаттық жарық/24 сағаттық қараңғы циклде H_2 өндірісі бақылауға қарағанда 14,4%-ға төмен болды.

Кейбір зерттеулерде гликогеннің жиналу талдаулары 12 сағаттық жарық/12 сағаттық қараңғы цикл гликогеннің жиналуын арттырмайтынын көрсетті, ал 12 сағаттық жарық және 6 сағат қараңғы немесе 12 сағаттық қараңғылық 24 сағаттық қараңғылықпен салыстырғанда гликогеннің көбірек сақталуына ықпал етті. Жасушаларды қараңғыда 6 сағат ұстау H_2 түзілуі үшін қажетті гликоген қорларын азайтпады. Кейбір зерттеуде, Burrows және т.б. 21 сағаттық жарық және 3 сағаттық қараңғылық, сондай-ақ 12 сағаттық жарық және 12 сағаттық қараңғылық гликогеннің көбірек жиналуына ықпал ететінін көрсетті. Қараңғыда 12 сағаттан кейінгі гликоген деңгейі қараңғы циклге дейін BG-11 ортасында жинақталған деңгеймен бірдей болды. Бұл жасушалардың қорда жинақталған гликоген қорларын тек қараңғы жағдайда ғана пайдаланатындығына байланысты. 12 сағат жарық және 6 сағат қараңғылық кезіндегі H_2 мөлшерінің жоғары болуы ортадағы O_2 мөлшерінің үздіксіз жарықпен салыстырғанда төмен болуымен түсіндіріледі [79]. Antal мен Lindblad 12 сағат жарық гликогеннің жоғары қорын жинау үшін жеткілікті екенін көрсетті. Дегенмен, 12 және 24 сағат аралығында үлгілерді қараңғы жағдайға көшіру ортадағы O_2 деңгейінің төмендеуіне әкеліп, бұл өз кезегінде гликоген қорының азаюына және электрон ағынының өзгеруіне байланысты сутегі катализациясының күшеюіне ықпал етуі мүмкін [206]. Біздің нәтижелеріміз электрон ағыны мен гликогеннің жиналуы H_2 өнімділігін арттыруда маңызды рөл атқаратынын растайды. Газ хроматографы құтыларындағы O_2 мөлшері фотосинтетикалық ингибиторлардың екі концентрациясында да 24 сағат қараңғылық кезінде тым төмен болды, бұл H_2 аза белсенділігі үшін жеткіліксіз болды [207].

Осылайша, *Synechocystis* sp. PSU 1262 зерттеулері 20 мкМ DCMU-мен өңделген жасушаларда сутегінің ең жоғары мөлшері 12 сағаттық жарық және 12 сағаттық қараңғылық циклі кезінде тіркелгенін көрсетті. Тәжірибелік нәтижелер электрондардың берілуі мен гликогеннің жиналуы әртүрлі жарықтандыру жағдайларында молекулалық H_2 өндірісін барынша арттыруға арналған жүйелерде маңызды рөл атқаратынын көрсетті. Бұл нәтижелер сутегі өндірісін оңтайландыру үшін дұрыс ингибитор концентрацияларын және жарықтандыру жағдайларын таңдаудың маңыздылығын көрсетеді. Коммерциялық тұрғыдан тиімді фотобиологиялық H_2 өндірісі жүйелерін әзірлеу үшін жарық циклдері мен гликогеннің жиналуының сутегі өндірісіне әсерін одан әрі зерттеу қажет етеді. Цианобактериялар мен фотосинтетикалық ингибиторларды қолдана отырып, H_2 өндірісін арттыру әдістерін әзірлеу, сондай-ақ жарық режимдерін оңтайландыру процесі 23-суретте көрсетілген. Зерттеу жұмысының жаңалығы көрсеткендей, болашақта цианобактериялық сутегі өндірісінде әртүрлі жарық режимдері мен қолайлы фотосинтетикалық ингибиторларды пайдалану H_2 өнімділігін арттырудың жалғыз оңтайлы шешімі болып табылады (23-сурет).

Фототрофты микроорганизмдерден сутегі алу әдісі биотехнологияның болашағы мол бағыты болып табылады. Сутегі бөлуге белсенді түрлерді іріктеу

және штамдарды фотобиологиялық сутегі өндіруге генетикалық модификациялау стратегияларын әзірлеу маңызды болып отыр. Осындай жайттарды ескере отырып, қолданылған цианобактерия түрлерінің болашағы зор және сутегі өндірушілерін қызықтыру ықтимал болып табылады.

Әртүрлі табиғи көздерден алынған цианобактерия штамдарын, соның ішінде *Chroococcus* sp. PSU 1008, *Synechococcus* sp. SU 78, *Oscillatoria* sp. S-001, *Desertifilum* sp. PSU 1129, *Phormidium* sp. PSU 1120 және *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамдарын зерттеу нәтижесінде *Synechocystis* sp. PSU 1262 қараңғы және жарық жағдайларда сутегі өндіру бойынша ең жоғары әлеует көрсететіні анықталды. *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамында фотобиологиялық сутегі өндірісіне, ең тиімді ингибиторлар: DCMU 20 мкМ (710 нмоль H_2 /мг хлорофилл *a*/сағ дейін) және KCN 500 мкМ (860 нмоль H_2 /мг хлорофилл *a*/сағ дейін). 12 сағат жарық және 6 сағат қараңғы циклі фотопродукцияны 80,3%-ға арттырып, ең жоғары көрсеткішке – 1552,2 нмоль H_2 /мг хлорофилл *a*/сағ мәніне жеткізді, ал ал DCMU 20 мкМ және 12/12 режимінде 1394 нмоль H_2 /мг хлорофилл *a*/сағ дейін артты.



Сурет 23 – Әртүрлі жарық режимдерінің сутегі сипаттамаларына әсерін зерттеу

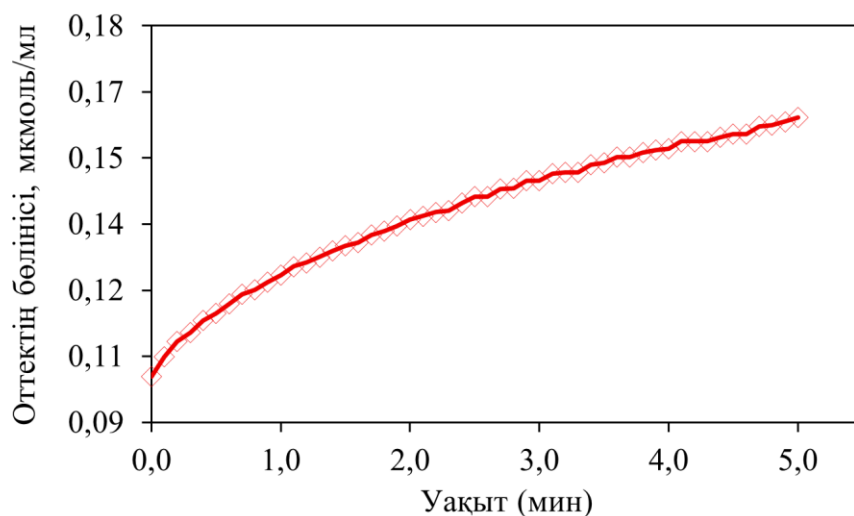
Synechocystis sp. PSU 1262 жоғары өсу қабілетін көрсетеді, сутегі алмасуы үшін жақсы дамыған ферментативті жүйеге ие және белсенді сутегі өндірісін қамтамасыз ететін жасушаішілік жағдайларды сақтай алады. Бұл цианобактериялық штамм жарық көзін пайдаланып сыртқы ортада H_2 өндірісінің перспективті кандидаты ретінде үлкен қызығушылық тудырады.

3.7 Сутегі өндірісінің тиімділігін арттыру үшін альгинат гельдеріндегі *Synechocystis* sp. PSU 1262 цианобактериялық жасушаларын иммобилизациялау

Иммобилизацияланған жасушалардың фотосинтетикалық белсенділігін талдау. *Synechocystis* sp. PSU 1262 жасушалары BG-11 ортасында 1,2 г/л (кұрғақ

салмақ) биомасса концентрациясына дейін фотоавтотрофты түрде алдын ала өсірілді. Екі иммобилизация хаттамасы салыстырылды. Бірінші жағдайда, дақыл натрий альгинатының сулы ерітіндісімен араластырылды. Екінші жағдайда, натрий альгинаты BG-11 ортасында тікелей ерітілді, содан кейін алынған альгинат қоспасы жасушаларды иммобилизациялау үшін пайдаланылды. Екі жағдайда да жасуша-альгинат суспензиясы CaCl_2 ерітіндісіне тамшылатып қосылды, онда тамшылар альгинат молекулаларының иондық көлденең байланысы арқасында бірден кальций-альгинат гель пленкасына айналды, нәтижесінде *Synechocystis* жасушалары полимер матрицасына енгізілді (Сурет 24). Жасуша айналасында микрорта тұрақталып нәтижесінде аноксикалық және микроанаэробта орта қалыптасты, мұндай жағдай сутегі шығымын артыруы мүмкін.

Жасушалар кальций альгинат гелінде иммобилизацияланған кезде, фотосинтетикалық белсенділікті бағалау маңызды болды. Зерттеуде фотосинтетикалық белсенділік стандартты Кларк катоды әдісі арқылы, қанықтырылған қызыл жарықтандыру жағдайында еріген оттегінің бөлінуіне қарай бағаланды (24-сурет). 5 минут ішінде O_2 бөліну көрсеткіші 0,10-нан 0,16 мкмоль/мл-ге дейін өсті. Еріген O_2 -нің орташа жиналу жылдамдығы 0,012 мкмоль/мл дейін болды.



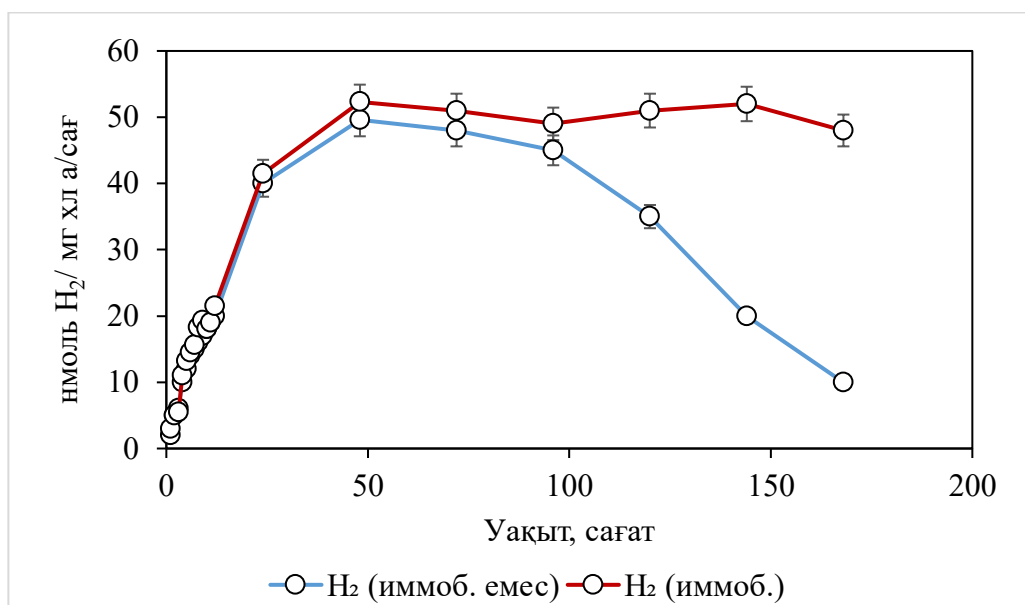
Сурет 24 – *Synechocystis* sp. PSU 1262 иммобилизацияланған жасушаларының оттегі түзуін талдау

Иммобилизацияланған жасушаларда сутегі өндіру. Иммобилизацияланған *Synechocystis* sp. PSU 1262 жасушалары үшін сутегі өндірісі қараңғы анаэробты жағдайда бағаланды (25-сурет). Анаэробты жағдай орнатылғаннан кейін иммобилизацияланған жасушалар сутегі түзуді бірден бастады. Тәжірибенің уақыт бойынша өзгерісінде газ фазасындағы сутегі мөлшері 24 сағатта 2,66 мл-ге дейін артты, кейін 48 сағатта 3,87 мл-ге, ал 72 сағатта 4,57 мл-ге дейін өсе түсті. Одан кейінгі тәуліктерде сутегі жиналуы платоға жақындады: 96 сағатта

5,02 мл, 120 сағатта 4,95 мл, 144 сағатта 5,11 мл болды, ал ең жоғары мәні 168 сағатта 5,36 мл-ге жетті. 168 сағаттан кейін графикте келтірілген нүктелер деректер толықтығы үшін берілгенімен, осы жұмыстағы негізгі талдау тәжірибенің 168 сағатқа дейінгі бастапқы фазасымен шектелді.

Иммобилизацияланбаған еркін суспензия жасушалары сутегі шығымы ең жоғары мәнінде 96 сағатқа жетіп әрі қарай төмендеу байқалды.

Бұл жұмыста анаэробты жағдайда биологиялық сутегі алу үшін *Synechocystis* sp. PSU 1262 өміршең жасушаларын кальций-альгинат геліне иммобилизациялаудың тиімділігі дәлелденді. Альгинаттағы иммобилизация биомассаны қоректік ортадан оңай бөлуге және дақылды аноксиялық ортаға жылдам ауыстыруға мүмкіндік береді, бұл оттегіге сезімтал [NiFe]-гидрогеназаның жұмыс істеуі үшін маңызды шарт. Жалпы алғанда, нәтижелер иммобилизацияланған жасушалардың бірнеше тәулік бойы сутегі жинақтай алатынын, 168 сағатта шамамен 5,36 мл ең жоғары мәнге жететінін, сондай-ақ, үдерістің бастапқы фазасында жоғары белсенділікпен сипатталатынын көрсетті (50 нмоль H_2 /мкг хл а/сағ).



Сурет 25 – Қараңғыда анаэробты жағдайда *Synechocystis* sp. PSU 1262 штаммының иммобилизацияланған және еркін жасушаларында сутек бөліну динамикасы

Осы алынған нәтижелер иммобилизация әдісі еркін суспензиямен салыстырғанда сутегі бөлінуін ұзақ және тұрақты сақталуын көрсетті. Еркін суспензиядағы жасушалар тек бастапқы кезеңінде сутегі түзілуі жоғары болып, 96 сағаттан кейін айқын төмендеу байқалды. Ал иммобилизацияланған жасушаларда өнімділік 168 сағатқа дейін салыстырмалы жоғары деңгейде болды. Сонымен қатар сутегі өнімділігін тұрақтылығын арттыру мақсатында *Synechocystis* sp. PSU 1262 жасушаларын кальций-альгинат гелінде

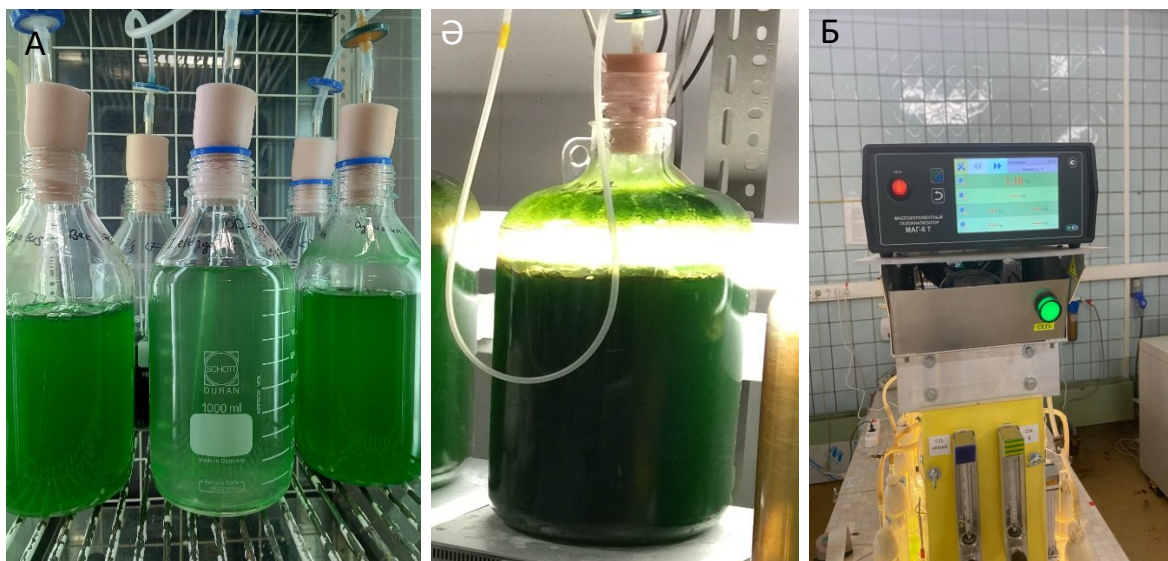
иммобилизациялауға негізделген тиімді физико-технологиялық тәсіл ретінде қарастырылуы мүмкін.

3.8 Зертханалық жағдайда цианобактериялар арқылы сутегі өнімділігін арттыру үшін зертханалық регламент әзірлеу

Цианобактериялардан биологиялық сутегі алу зертханалық жағдайда өсіру арқылы жүзеге асырылады, мұнда үдеріс 6 кезең арқылы оңтайландырылады:

Кезең 1: Өсіруді бақылау

Chroococcus sp. PSU 1008, *Synechocystis* sp. PSU 1262, *Synechococcus* sp. SU 78, *Desertifilum* sp. PSU 1129, *Phormidium* sp. PSU 1120, *Oscillatoria* sp. S-001, *Anabaena* sp. A-9, *Nostoc* sp. J-1 сияқты цианобактериялық штамдар BG-11, BG₀-11 қоректік орталарында дақылданды. Қоректік орталар 50 mM HEPES-NaOH (pH – 7,1) қоспаларымен модификацияланды. Қажет болған жағдайда 17,6 mM NaNO₃ қосу арқылы модификацияланған Аллен сияқты әртүрлі қоректік орталарда да өсірілді. Өсу жылдамдығы 730 нм толқын ұзындығында спектрофотометр көмегімен анықталды. Жасушалар дақылдың оңтайлы оптикалық тығыздығына жеткенше 6000 айн/мин жылдамдықпен центрифугалау арқылы бөлінді. Жарық қарқындылығы 30-50 мкмоль фотон/м²/сек деңгейінде сақталды, ал биореакторлар бөлме температурасында ұсталды. Ауа ағынының төмен болуын және араластыруды қамтамасыз ету үшін өсіру аэраторлары бар 50 л колбаларды пайдаланып жүргізілді (26-сурет).

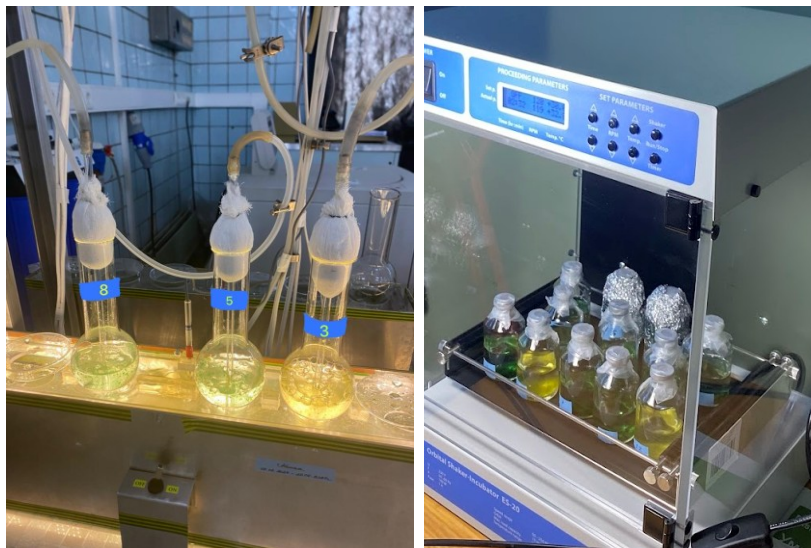


А – 1 л колбада өсіру, Б – 8 л колбада өсіру, Б- өсуін бақылау

Сурет 26 – Цианобактериялық жасушаларды өсіру

Кезең 2. Биомассаны тасымалдау және дайындау. Биомасса 100 мл көлемдегі азотсыз BG₀-11 қоректік ортасына қайта егілді және 30°C температурада жарық жағдайында 150 айн/мин жылдамдықпен үздіксіз

араластырылды (27-сурет). 3-5 тәулік дақылданғаннан кейін биомасса BG₀-11 ортасымен үш рет жуылып, қайтадан 50 мл көлемдегі BG₀-11 ортасына егілді. Дақылдау жарықта 24 сағат бойы, аэрациясыз жүргізілді және OT₇₃₀ = 0,5 деңгейінде ұсталды. Келесі күні биомасса BG₀-11 ортасымен үш рет жуылып, OT₇₃₀ мәні 1,5-ке дейін теңестірілді. Анаэробты жағдайды қалыптастырмас бұрын, қоректік орта зерттеу мақсатына байланысты әртүрлі қоспалармен модификацияланды.



Сурет 27 – Цианобактерияларды азотсыз қоректік ортада өсіру

1) *pH әсерін зерттеу.* Цианобактерия жасушаларынан алынған биомассаның сутегі бөлуіне pH-тың әсерін зерттеу жұмыстарында pH көрсеткіші 4-тен 9-ға дейінгі аралықта эмбебап буферлер арқылы реттелді. Бұл өте жоғары pH немесе қышқылдық деңгейі тым төмен болғанда цианобактерия штамдарының сутегі бөле алмайтынымен байланысты. pH реттеу үшін TES, HEPES және TRIS тұздары негізіндегі буферлер қолданылды. Әр буфердің ең жоғары концентрациясы 50 мкМ-ден аспады.

2) *Температура әсерін зерттеу.* Цианобактериялардың көпшілігі мезофилдер болғандықтан, сутегі өндіруге қатысатын олардың ақуыздары қалыпты температурада жұмыс істеуге бейімделген. Бұл зерттеуде сутегі бөлінуі 20–35°C температура диапазонында зерттелді. Сутегі өнімділігін арттыру үшін pH пен жарық қарқындылығының белгілі мәндері де қолданылды.

3) *Азот әсері.* Өсу фазасында жиналған жасушалар азот көздерінен босатылды. Азоттың әртүрлі концентрацияларының сутегі өндіруге әсерін зерттеу үшін NaNO₃ тұзы 10–100 мкМ мөлшерінде қолданылды. Барлық зерттеу нұсқаларында виалдардан газ тәрізді азоттың толық шығарылғанына көз жеткізу маңызды.

4) *Көмірсу әсері.* Көміртекті жинақтайтын биомассаға әртүрлі көмірсуларды қосу цианобактериялардың сутегі бөлуі үшін маңызды болып, сутегі өнімділігін

арттырды. Ол үшін сахароза, лактоза, глюкоза және фруктозаның әртүрлі концентрациялары 100 мкМ-ге дейін қолданылды.

5) *Жарық әсері.* Жиналған жаңа жасушалар азот көздерінен босатылғаннан кейін, оларды әртүрлі жарық қарқындылығының әсерін зерттеу үшін пайдалануға болады. Бұл зерттеу үшін жарық қарқындылығы 30-дан 300 мкмоль фотон/м²/сек дейінгі орталар дайындалды. Бұл мәннен жоғары жарық қарқындылығы ортадағы О₂ мөлшерінің артуына байланысты Н₂ бөлінуін баяулатады. Бұл зерттеуде жасушалар флакондардың ішіндегі кішкентай магниттерді пайдаланып араластырылды.

6) *Микроанаэробты ортаның әсері.* Жиналған биомасса газ хроматографы флакондарына ауыстырылды, онда модификацияланған анаэробты орта жасалды. Осы мақсатта флакондар алғашқы 20 минутта 100% аргон газымен, ал соңғы 5 минутта 80% аргон және 1-5% оттегі қоспасымен толтырылды. Бұл әдіс азотты бекітетін цианобактерияларға қолданылды. Ортадағы О₂ мөлшерінің төмен болуы жасушалардың қатты күйзеліске ұшырамай қалыпты жұмыс істеуіне көмектесті.

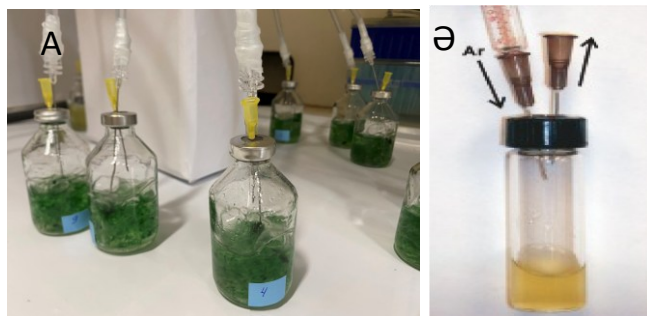
7) *Күкірт әсері.* Алдын ала жинақталған жасушалар газ хроматографы құтыларындағы модификацияланған қоректік орталарға ауыстырылды. Қоректік ортаны өзгерту үшін MgCl₂×6H₂O, ZnSO₄×7H₂O, FeSO₄×7H₂O және CuSO₄×5H₂O сияқты күкірт құрамды тұздар алынып тасталды немесе ауыстырылды.

8) *Микроэлементтер әсері.* Қоректік ортадан микроэлементтерді алып тастау немесе қосу цианобактерияларға стресс әсерін туғызып, сутегі өнімділігін арттырды. Қоректік орта құрамын зерттеу кезінде Co(NO₃)₂×6H₂O құрамынан кобальт (Co), Na₂MoO₄×2H₂O құрамынан молибден (Mo), NH₄VO₃ құрамынан ванадий (V), NiCl₂×6H₂O құрамынан никель (Ni), FeSO₄ құрамынан темір (Fe) алынып тасталатын тәжірибелер жүргізілді. Керісінше, осы микроэлементтерді ортаға жоғары концентрацияда қосу да сутегі шығымына оң әсер етті.

9) *Тұздардың әсері.* Азот көзінен тазартылған қоректік ортаға әртүрлі тұздарды қосу немесе алып тастау арқылы сутегі мөлшерін арттыруға қол жеткізілді. KH₂PO₄, MgSO₄×7H₂O, CaCl₂×2H₂O және FeSO₄×7H₂O тұздарын қоректік ортадан алып тастау сутегі өнімділігін арттырды. Сонымен қатар, NaHCO₃, NaCl, KCl, CaCl₂ тұздарын, сондай-ақ, HEPES, TRIS және TES буферлік жүйелерін ортаға қосу да сутегі өндіру өнімділігін жоғарылатты. Барлық тұздар анаэробты орта жасалмас бұрын суспензияға енгізілді.

Кезең 3. Газды шығару және аргонмен үрлеу

Әр тәжірибеде модификацияланған цианобактерия жасушаларынан сутегі алу үшін виалдардың ішіндегі барлық газдар шығарылды. Ол үшін 100% газ тәрізді аргон газдық хроматограф инесі арқылы 30–40 минут бойы виалдарға енгізілді. Екінші ине қысқа, жасырын күйде болып, суспензия бетінің үстінде орналастырылды, осылайша аргон сыртқа шыға алды. Бұл инені енгізген сыртқы ортадағы ауаның ығыстырылып шыққанын және виалдардың барлығы аргонмен толғанын көзбен бақылауға мүмкіндік берді (28-сурет).

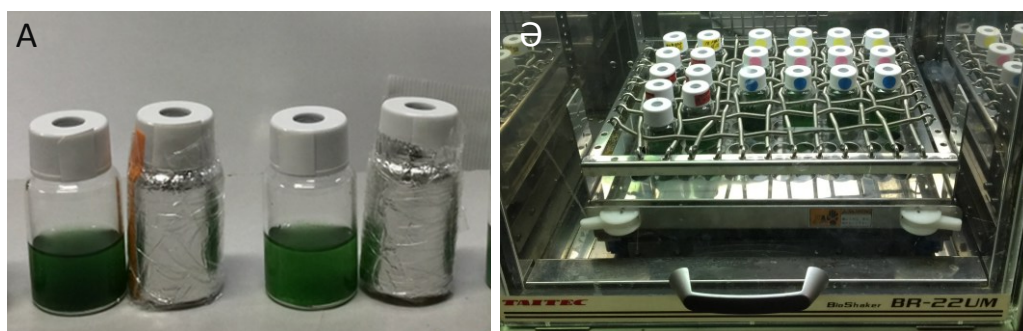


А – сутек алу үшін 100% аргонмен үрлеу, Ә – Масукай әдісі [144]

Сурет 28 – Цианобактерия жасушалары үшін анаэробты жағдайды қамтамасыз ету әдісі

Кезең 4. Инкубацияны және сутек өндіруді бағалау

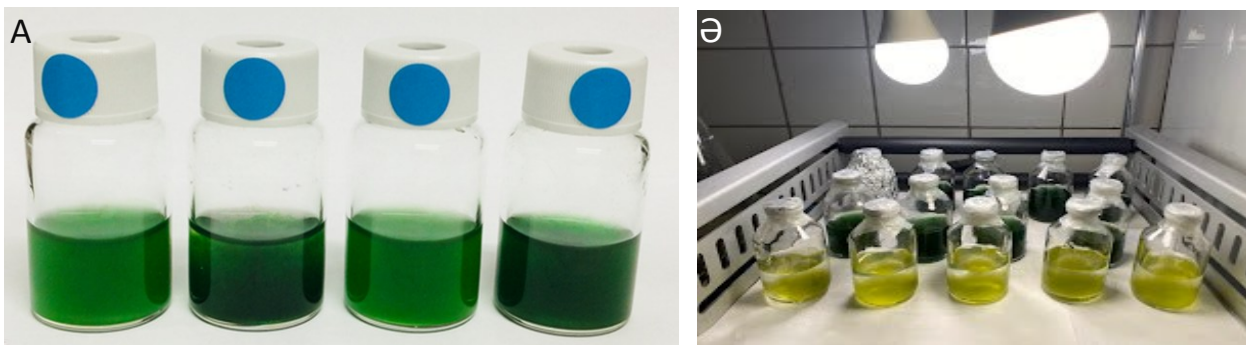
Анаэробты жағдай жасалғаннан кейін суспензия газдық хроматограф виалдарының ішіне егілді. Сутегі түзілуін бағалау тәжірибелерінде инкубацияның ең ұзақ ұзақтығы 120 сағатты құрады.



А – фольгаға оралған қараңғы ортада, Ә – жарық өткізбейтін дақыл шайқағышы

Сурет 29 – Қараңғыда цианобактериялық жасушалардың сутегі өндірісін зерттеу

Зерттеу жұмысының мақсатына байланысты 24 сағаттық немесе 48 сағаттық тәжірибелер де жүргізілуі мүмкін. Жарықта және қараңғы ортада нүктелік тәжірибелер орындалды. Қараңғы жағдайда виалдар фольгамен оралды. Жарық жағдайында виалдар тікелей жарық көзіне қойылды (30-32-суреттер).

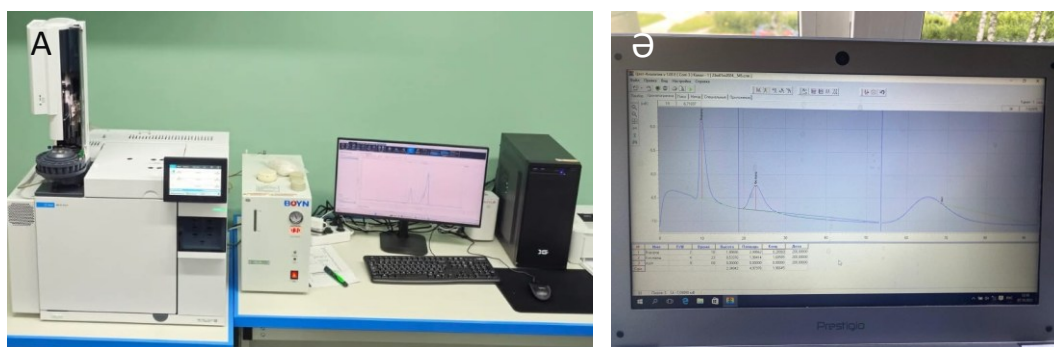


А – фольгасыз газ хроматографының құтылары, Б – жасанды жарықта өсіру

Сурет 30 – Жарықта цианобактериялық жасушалардың сутегі өндірісін зерттеу

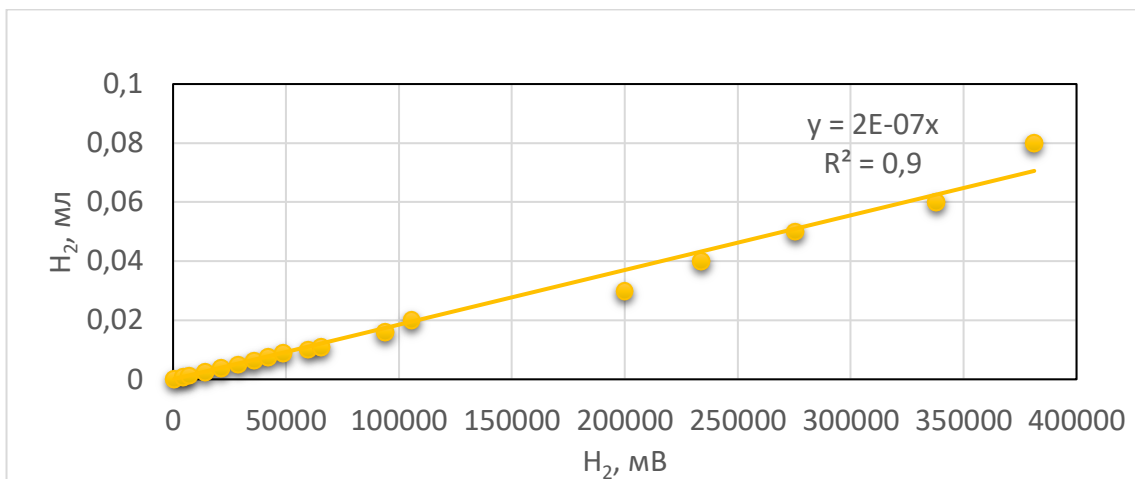
Кезең 5. Газдық хроматография талдауы

Сутегі алу және дақылдау үшін виалдар жарық немесе қараңғы ортада ұсталды, содан кейін газдық хроматографтың шприці арқылы 500 мкл аликвоталар алынып, газдық хроматограф құрылғысына енгізілді. Құрылғыға қосылған монитор арқылы 0,5–0,8 минут аралығындағы пик ауданы есептелді. Тәжірибе аяқталғаннан кейін сутегі көлемін миллилитрмен анықтау үшін калибрлеу жүргізілді. Ол үшін 100% сутегінен тұратын стандартты газ қолданылды. Газдық хроматографқа 1 мкл, 10 мкл, 50 мкл, 100 мкл, 200 мкл, 500 мкл немесе 1000 мкл көлемдерінде сутегі енгізілді. Одан әрі Excel бағдарламасында газдық хроматография нәтижелері бойынша ортаға бөлінген сутек көлеміне арналған сызықтық график құрылды (32,33-суреттер).



А – газ хроматографы құрылғысы, Б – газ хроматографиясының нәтижелері

Сурет 31 – Цианобактериялардан сутегі өндіру үшін қолданылатын газ хроматографы



Сурет 32 – Сутегі өндірісінің стандартты сызықтық қисығы

Кезең 6. Хлорофилл а концентрациясын өлшеу. Әрбір зерттеу жұмысы басталар алдында және аяқталғаннан кейін виалдардан хлорофилл а концентрациясын анықтау үшін 200 мкл суспензия алынады. Ол үшін 800 мкл таза метанол қолданылады. Центрифугалаудан кейін спектрофотометр арқылы 730 нм, 664 нм және 646 нм толқын ұзындықтарындағы пиктер өлшенеді, содан соң хлорофилл а концентрациясы есептеледі. Супернатант көлемі 1,5 мл пробиркалардың жоғарғы бөлігінен спектрофотометрге енгізіліп өлшенеді (33-сурет).



А – центрифуга, Ә – центрифугаланған метанолдағы жасуша биомассасы

Сурет 33 – Цианобактериялық жасушалардағы хлорофилл а концентрациясын анықтау

Зерттеу нәтижелері цианобактерия жасушаларынан биологиялық сутегі алу үдерісін алты негізгі кезеңге бөлінген әртүрлі әдістер арқылы тиімді оңтайландыруға болатынын көрсетті. Осылайша, цианобактерияларды өсіру және өңдеуге арналған көпсатылы тәсіл биологиялық сутегіні тиімді өндіру үшін жоғары әлеуетке ие екенін дәлелдеді.

ҚОРЫТЫНДЫ

Зерттеу нәтижелері бойынша қысқаша қорытындылар:

1. Қазақстан Республикасының үш экожүйесінде (Келінтөбе күріш алқаптары мен тоғандары, Түрген ауылының егістіктері мен су айдындары, Бадам өзенінің сулары) маусымдық сынама алу жүргізілді – барлығы 56 үлгі (20+18+18). Альгологиялық зерттеу фототрофты микроорганизмдердің жоғары түрлік әртүрлілігін көрсетті: 29 таксон анықталды (3 бөлім, 4 класс, 8 отряд), басым топтар ретінде *Cyanobacteria* (41,3%) және *Chlorophyta* (31%) тіркелді. Көпсатылы бөліп алу және тазарту нәтижесінде әрі қарайғы зерттеулерге 6 цианобактерия изоляты алынды.

2. Зерттелген изоляттардың биомассасын жинақтау үшін дақылдаудың оңтайлы параметрлері анықталды: ең жоғары өсу өнімділігі 2–4% CO₂ кезінде байқалды, ал O₂ мөлшері 20–25% болғанда да жоғары көрсеткіш тіркелді (PSU 1129 үшін 1,86-ға дейін). Өсу және пигмент түзілу үшін жарықтың оңтайлы қарқындылығы 30–60 мкмоль фотон/м²/с құрады, ал 120 мкмоль фотон/м²/с өсуді тежейтін әсер көрсетті.

3. Бөлініп алынған изоляттар 16S rRNA маркері бойынша молекулалық-генетикалық идентификация жүргізіліп, филогенетикалық ағаш құрылды; таксономиялық тиістілігі төмендегідей расталды: *Desertifilum* sp. PSU 1129 (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%).

4. Бөлінген гетероциста түзбейтін түрлерді нитрогеназа белсенділігі байқалмады, ал оң бақылау ретінде қолданылған гетероциста түзетін коллекциялық түрлерді айқын көрінді. Бұл зерттелген гетероцистасыз цианобактерияларда сутегі түзілуі негізінен гидрогеназа жүйелерімен байланысты екенін көрсетеді: жарық және қараңғы ортада сутегінің ең жоғары өнімділігі *Synechocystis* sp. PSU 1262 үшін тіркелді (қараңғыда 33,9 нмоль H₂/мг хл *a*/сағ дейін; жарықта 49,6 нмоль H₂/мг хл *a*/сағ дейін) және *Synechococcus* sp. SU 78 үшін (жарықта 48,3 нмоль H₂/мг хл *a*/сағ дейін). Екі бағытты гидрогеназа тестінде де ең жоғары әлеует *Synechocystis* sp. PSU 1262-де тіркелді (0,055 мкмоль H₂/мг хл *a*/сағ).

5. Модельдік *Synechocystis* sp. PSU 1262 штамы үшін сутегі өндірудің экологиялық және технологиялық оптимумдары анықталды. Максимум рН 8 кезінде байқалды (79,2 нмоль H₂/мг хл *a*/сағ дейін); рН 8-де буферлер арасында ең тиімдісі HEPES болды (81,9 нмоль H₂/мг хл *a*/сағ дейін, TES және TRIS-тен жоғары). Температуралық оптимум өсу оптимумына қатысты ығысқан және 27–30°C аралығын құрады (ең жоғарысы шамамен 27,5°C – 81,3 нмоль H₂/мг хл *a*/сағ). NaNO₃ қосу айқын тежегіш әсер көрсетті (концентрация артқан сайын 75-тен 3 нмоль H₂/мг хл/сағ-қа дейін төмендеу). Сутегі өндіру үшін оңтайлы жарық қарқындылығы 120 мкмоль фотон/м²/с болды (96,6 нмоль H₂/мг хл *a*/сағ дейін);

одан жоғары деңгейлер фотоингибицияға және жасушалардың зақымдануына әкелді.

6. Фотосинтетикалық электрон тасымалын тежеу концентрациялық оңтайландыру жағдайында *Synechocystis* sp. PSU 1262-де сутегі өндіруді 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: СССР 1 мкМ – 158,3, DBMIB 20 мкМ – 96,8 нмоль H_2 /мг хл *a*/сағ. Концентрациясы артқан сайын уыттылық және электрон тасымалының тежелуі күшейді. Ингибиторлар хлорофилл *a* мөлшерін азайтып және өсуге әсер етуі мүмкін, алайда, KCN 500 мкМ ең жоғары ынталандыруды өсуге ең аз теріс әсерін қамтамасыз етті (ОТ₇₃₀ 0,45, бақылауда 0,52). Әсер жарық–қараңғы режиміне тәуелді: KCN 500 мкМ және 12 сағ жарық/6 сағ қараңғы режимінде 1552,2 нмоль H_2 /мг хл *a*/сағ (+80,3%) мәніне жетті, ал DCMU 20 мкМ және 12/12 режимінде 1394 нмоль H_2 /мг хл *a*/сағ дейін артты.

7. *Synechocystis* sp. PSU 1262 жасушаларын кальций-альгинатты гельдерде иммобилизациялау үдерістің тұрақтылығын және ұзақтығын арттыратын технологиялық тәсіл ретінде негізделді. Иммобилизацияланған жасушалар фотосинтетикалық белсенділігін сақтады (O_2 жинақталу жылдамдығы шамамен ~0,012 мкмоль·мл/мин) және қараңғы анаэробты жағдайда иммобилизацияланған жасушалар еркін жасушаларға (96 сағатта 49,6 нмоль H_2 /мг хл *a*/сағ) қарағанда салыстырмалы түрде сутектің ұзақ уақыт бойы жиналуын қамтамасыз етті – 168 сағатта ~5,36 мл дейін, бастапқы фазада жоғары белсенділікпен (алғашқы 9 сағатта ~0,75 мл дейін) және 96 сағаттан кейін платоға шығумен сипатталды.

8. Цианобактериялар негізінде H_2 өндірудің зертханалық деңгейдегі оңтайландырылған регламенті әзірленіп, сипатталды, бұл сутегі өнімділігінің артуын қамтамасыз етеді. Регламентке мыналар кіреді: өсуді бақылау және биомасса дайындау, анаэробизмды қалыптасытру, қоректік орта мен буферлік жүйені таңдау, рН/температура/жарық қарқындылығын оңтайландыру, тиімді ингибиторларды (KCN, DCMU) пайдалану және қажет болған жағдайда жасуша иммобилизациялау. Бұл тәсіл фотобиореакторлық жүйелерді кейіннен масштабтау және жобалау үшін негіз ретінде пайдаланылуы мүмкін.

Жүргізілген зерттеулер кешені жұмыстың бастапқы кезеңінде тұжырымдалған барлық тапсырмалардың орындалуын қамтамасыз етті. Болашағы мол цианобактерия штамдары бөліп алынып, сипатталды, өсу мен сутегі өндіруге әсер ететін дақылдау және инкубация шарттары анықталды, сондай-ақ, режимдерді оңтайландыру және тәжірибелік тәсілдерді қолдану арқылы сутегі шығымын мақсатты түрде арттыру мүмкіндігі көрсетілді. Алынған нәтижелер жиынтығы зерттеудің негізгі мақсатына қол жеткізілгенін растайды.

Жұмыс қорытындысы бойынша цианобактерияларды бөліп алу, тазарту және дақылдауға арналған әдістемелік тәсілдер, сондай-ақ сутек өнімділігін зертханалық бағалау және оның қарқындылығына әсер ететін факторларды

анықтау регламенттері қалыптастырылды. Алынған бастапқы деректер (рН, температура, жарықтандыру, газдық режим және т.б. бойынша оптималды параметрлер) фототрофты микроорганизмдерді зертханалық және тәжірибелік-өндірістік жағдайда өсіру технологиялық сұлбаларын әзірлеуде қолданылуы мүмкін. Нәтижелерді биоэнергетикалық шешімдерді (био-Н₂ алу) құруда, сондай-ақ іргелес бағыттарда – мысалы, фотобиореакторларды және фототрофты дақылдар қатысатын су тазарту технологияларын жобалауда пайдалану орынды.

Алдын ала талдау цианобактерияларға негізделген фотобиологиялық сутегі өндіру технологиялары жаңартылатын ресурс – күн энергиясын пайдалану арқылы қазба отынға тәуелділікті төмендетуге және көміртек ізін азайтуға әлеуетті түрде қабілетті екенін көрсетеді. Мұндай шешімдерді енгізудің ең болашағы мол бағыты – оқшаулануы жоғары әрі су ресурстары қолжетімді өңірлер, мұнда үдерісті қолдауға кететін энергетикалық шығындар салыстырмалы түрде төмен бола отырып, дақылдауы масштабтауға мүмкіндігі бар. Экономикалық тиімділік технологияны кешенді сұлбаларға интеграциялаған жағдайда артады (атап айытқанда, био-Н₂ өндіруді су тазартумен және биомассаны қосалқы өнім ретінде алумен ұштастыру).

Орындалған жұмыстың ғылыми-техникалық деңгейі биоэнергетика және фотобиологиялық сутегі өндіру салаларындағы әлемдік өзекті зерттеу бағыттарына сәйкес келеді. Алынған нәтижелер фототрофты микроорганизмдердің сутегі белсенділігін дақылдау шарттарын басқарылатын түрде өзгерту және метаболизмге тәжірибелік әсер ету арқылы арттыруға бағытталған заманауи тәсілдермен өзара салыстырымды. Зерттеудің кешенділігі (штамдарды скринингтеу, физиологиялық-биохимиялық бағалау, параметрлерді оңтайландыру және регламент әзірлеу) жұмысты әрі қарай дамыту және халықаралық үздік тәжірибелер деңгейінде практикалық іске асыру үшін негіз ретінде қарастыруға мүмкіндік береді.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ДЕРЕК КӨЗДЕРІНІҢ ТІЗІМІ

1. Wang J., Yang J., Xu X. Does political inequality undermine the environmental benefit of renewable energy? // *Journal of Cleaner Production*. – 2024. – Vol. 434. – P. 140315.
2. Ou-douaou A., Niya B., Benhida R., Danouche M. Waste-to-biohydrogen production technologies: Microbial pathways, omics insights, and techno-economic assessment for a circular hydrogen economy // *Results in Engineering*. – 2026. – Vol. 30. – P. 110217.
3. M'Arimi M. M., Mecha C. A., Kiprop A. K., Ramkat R. Recent trends in applications of advanced oxidation processes (AOPs) in bioenergy production: Review // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2020. – Vol. 121. – P. 109669.
4. Anu, Kumar A., Rapoport A., Kunze G., Kumar S., Singh D., Singh B. Multifarious pretreatment strategies for the lignocellulosic substrates for the generation of renewable and sustainable biofuels: A review // *Renewable Energy*. – 2020. – Vol. 160. – P. 1228-1252.
5. Demirbas A. H., Demirbas I. Importance of rural bioenergy for developing countries // *Energy Conversion and Management*. – 2007. – Vol. 48, № 8. – P. 2386-2398.
6. Pavithra S., Shanthakumar S., Greeshma O. Chapter 15 - Biohydrogen production with microbial coculture and monoculture // *Microbial Biotechnology: Integrated Microbial Engineering for B3 – Bioenergy, Bioremediation, and Bioproducts* / Shah M. P., Bala K. Elsevier, 2025. – C. 393-414.
7. Wang Z., Wang S., Hu B., Wang J., Qiu L., Shi C., Zhang T. Efficient low-carbon hydrogen production driven by solar energy: Properties, challenges and future perspectives // *Fuel*. – 2026. – Vol. 407. – P. 137500.
8. Bahadori M., Hafshejani M. T., Nasrollahzadeh M., Mirkhani V. Chapter Ten - Photobiological water splitting // *Solar Water Splitting* / Mirkhani V. и др. Elsevier, 2025. – C. 303-338.
9. Kamshybayeva G. K., Sadvakasova A. K., Belkozhaev A. M., Kossalbayev B. D., Bauenova M. O., Zharmukhamedov S. K., Hou H. J. M., Allakhverdiev S. I. Progress and innovation in key technologies for converting biomass to hydrogen // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2025. – Vol. 113. – P. 90-106.
10. Iqbal K., Saxena A., Pande P., Tiwari A., Chandra Joshi N., Varma A., Mishra A. Microalgae-bacterial granular consortium: Striding towards sustainable production of biohydrogen coupled with wastewater treatment // *Bioresource Technology*. – 2022. – Vol. 354. – P. 127203.
11. Kamshybayeva G. K., Kossalbayev B. D., Sadvakasova A. K., Zayadan B. K. Outlooks and challenges of hydrogen production by cyanobacterial anabaena species // *Experimental biology*. – 2022. – Vol. 92, № 3. – P. 55-74.
12. Kamshybayeva G. K., Kossalbayev B. D., Sadvakasova A. K., Bauenova M. O., Zayadan B. K., Krapivina A. A., Sainova G. A., Alharby H. F., Allakhverdiev S. I. Effect of the photosynthesis inhibitors on hydrogen production by non-heterocyst

cyanobacterial strains // International Journal of Hydrogen Energy. – 2024. – Vol. 52. – P. 167-182.

13. Wang P., Paul F., Boehm M., Appel J., Gutekunst K., Schuhmann W., Conzuelo F. Electrochemical Protection of Cyanobacterial Cells from Molecular Oxygen Enables Sustained PhotoH₂ Production // Angewandte Chemie International Edition. – 2026. – Vol. 65, № 7. – P. e19077.

14. Esper B., Badura A., Rögner M. Photosynthesis as a power supply for (bio-)hydrogen production // Trends in Plant Science. – 2006. – Vol. 11, № 11. – P. 543-549.

15. Hallenbeck P. C., Lazaro C. Z., Sagır E. 3.10 - Biohydrogen☆ // Comprehensive Biotechnology (Third Edition) / Moo-Young M. – Oxford: Pergamon, 2019. – C. 128-139.

16. Dutta D., De D., Chaudhuri S., Bhattacharya S. K. Hydrogen production by Cyanobacteria // Microb Cell Fact. – 2005. – Vol. 4. – P. 36.

17. Kondratieva E. N. Phototrophic micro-organisms as source of hydrogen and hydrogenase formation // Microbial Energy Conversion / Schlegel H. G., Barnea J. Pergamon, 1977. – C. 205-216.

18. Oncel S. S., Kose A., Faraloni C. Chapter 25 - Genetic Optimization of Microalgae for Biohydrogen Production // Handbook of Marine Microalgae / Kim S.-K. – Boston: Academic Press, 2015. – C. 383-404.

19. Basak N., Jana A. K., Das D., Saikia D. Photofermentative molecular biohydrogen production by purple-non-sulfur (PNS) bacteria in various modes: The present progress and future perspective // International Journal of Hydrogen Energy. – 2014. – Vol. 39, № 13. – P. 6853-6871.

20. Wang Q., Han L. Hydrogen Production // Handbook of Climate Change Mitigation and Adaptation / Lackner M. и др. – Cham: Springer Nature Switzerland, 2025. – C. 2317-2363.

21. Bibra M. Chapter Eleven - Technoeconomic analysis of hydrogen production // Renewable Hydrogen / Bibra M. и др. Elsevier, 2024. – C. 253-279.

22. Bora J., Ghosh S., Mitra A. Chapter 12 - Photobiological hydrogen production by microorganisms // Solar-Driven Green Hydrogen Generation and Storage / Srivastava R. и др. Elsevier, 2023. – C. 237-257.

23. Dinakarkumar Y., Chakravarthi Kannan D., Theivendren P. Marine microalgae as a renewable energy resource: Advances, technoeconomic insights, and commercialization pathways // Biomass and Bioenergy. – 2026. – Vol. 210. – P. 109081.

24. Le T. T., Sharma P., Bora B. J., Tran V. D., Truong T. H., Le H. C., Nguyen P. Q. P. Fueling the future: A comprehensive review of hydrogen energy systems and their challenges // International Journal of Hydrogen Energy. – 2024. – Vol. 54. – P. 791-816.

25. Akhlaghi N., Najafpour-Darzi G. A comprehensive review on biological hydrogen production // International Journal of Hydrogen Energy. – 2020. – Vol. 45, № 43. – P. 22492-22512.

26. Lazaro C. Z., Varesche M. B. A., Silva E. L. Effect of inoculum concentration, pH, light intensity and lighting regime on hydrogen production by phototrophic microbial consortium // *Renewable Energy*. – 2015. – Vol. 75. – P. 1-7.
27. Faraloni C., Torzillo G., Balestra F., Moia I. C., Zampieri R. M., Jiménez-Conejo N., Touloupakis E. Advances and Challenges in Biohydrogen Production by Photosynthetic Microorganisms // *Energies*. – 2025. – Vol. 18, № 9. – P. 2319.
28. Ghirardi M. L. Implementation of photobiological H₂ production: the O₂ sensitivity of hydrogenases // *Photosynthesis Research*. – 2015. – Vol. 125, № 3. – P. 383-393.
29. Mohan S. V., Mohanakrishna G., Srikanth S. Chapter 22 - Biohydrogen Production from Industrial Effluents // *Biofuels* / Pandey A. и др. – Amsterdam: Academic Press, 2011. – С. 499-524.
30. Ummunawuike C., Mahat S. Q. A., Nwaichi P. I., Money B., Agi A. Biohydrogen production for sustainable energy transition: A bibliometric and systematic review of the reaction mechanisms, challenges, knowledge gaps and emerging trends // *Biomass and Bioenergy*. – 2024. – Vol. 188. – P. 107345.
31. Dhavaleswarapu R. K., Khuntia H. K. 15 - Biorefinery and circular economy approach for organic solid waste management // *Waste-to-Energy* / Sharma P. и др. Elsevier, 2025. – С. 361-382.
32. Jung S., Kim H., Tsang Y. F., Lin K.-Y. A., Park Y.-K., Kwon E. E. A new biorefinery platform for producing (C2-5) bioalcohols through the biological/chemical hybridization process // *Bioresource Technology*. – 2020. – Vol. 311. – P. 123568.
33. Kossalbayev B. D., Yilmaz G., Sadvakasova A. K., Zayadan B. K., Belkozhashev A. M., Kamshybayeva G. K., Sainova G. A., Bozieva A. M., Alharby H. F., Tomo T., Allakhverdiev S. I. Biotechnological production of hydrogen: Design features of photobioreactors and improvement of conditions for cultivating cyanobacteria // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2024. – Vol. 49. – P. 413-432.
34. Li S., Li F., Zhu X., Liao Q., Chang J.-S., Ho S.-H. Biohydrogen production from microalgae for environmental sustainability // *Chemosphere*. – 2022. – Vol. 291. – P. 132717.
35. Reda B., Elzamar A. A., AlFazzani S., Ezzat S. M. Green hydrogen as a source of renewable energy: a step towards sustainability, an overview // *Environment, Development and Sustainability*. – 2025. – Vol. 27, № 12. – P. 29213-29233.
36. Ansari S. A., Alam M. W., Dhanda N., Abbasi M. S., Ahmed M. E., Alrashidi A. B., Al-Farhan A. M., Abebe B. Sustainable Hydrogen Production, a Review of Methods, Types, Applications, Challenges, and Future Perspectives // *Glob Chall*. – 2025. – Vol. 9, № 6. – P. 2500086.
37. Sadvakasova A. K., Kossalbayev B. D., Zayadan B. K., Bolatkhan K., Alwasel S., Najafpour M. M., Tomo T., Allakhverdiev S. I. Bioprocesses of hydrogen production by cyanobacteria cells and possible ways to increase their productivity // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2020. – Vol. 133. – P. 110054.

38. M. Elsapagh R., S. Sultan N., A. Mohamed F., M. Fahmy H. The role of nanocatalysts in green hydrogen production and water splitting // International Journal of Hydrogen Energy. – 2024. – Vol. 67. – P. 62-82.
39. Jaramillo A., Satta A., Pinto F., Faraloni C., Zittelli G. C., Silva Benavides A. M., Torzillo G., Schumann C., Méndez J. F., Berggren G., Lindblad P., Parente M., Esposito S., Diano M. Outlook on Synthetic Biology-Driven Hydrogen Production: Lessons from Algal Photosynthesis Applied to Cyanobacteria // Energy Fuels. – 2025. – Vol. 39, № 11. – P. 4987-5006.
40. Younus H. A., Al Hajri R., Ahmad N., Al-Jammal N., Verpoort F., Al Abri M. Green hydrogen production and deployment: opportunities and challenges // Discover Electrochemistry. – 2025. – Vol. 2, № 1. – P. 32.
41. Bora A., Thondi Rajan A. S., Ponnuchamy K., Muthusamy G., Alagarsamy A. Microalgae to bioenergy production: Recent advances, influencing parameters, utilization of wastewater – A critical review // Science of The Total Environment. – 2024. – Vol. 946. – P. 174230.
42. Bozieva A. M., Khasimov M. K., Rao M. S., Sinetova M. A., Voloshin R. A., Dunikov D. O., Tsygankov A. A., Leong Y. K., Chang J.-S., Allakhverdiev S. I., Bruce B. D. Optimizing cyanobacterial hydrogen production: metabolic and genetic strategies with glycerol supplementation // Frontiers in Energy Research. – 2025. – Vol. Volume 13 - 2025.
43. Singh R. P., Yadav P., Kumar I., Kumar A., Gupta R. K. Bioprospecting and Mechanisms of Cyanobacterial Hydrogen Production and Recent Development for Its Enhancement as a Clean Energy // Cyanobacterial Biotechnology in the 21st Century / Neilan B. и др. – Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. – С. 107-131.
44. Cha M., Park M.-S., Kim S.-J. Biological Routes for Biohydrogen Production: A Clean and Carbon-Free Fuel // Biotechnology Journal. – 2025. – Vol. 20, № 7. – P. e70074.
45. Kamshybayeva G., Kossalbayev B., Huang Z., Bauenova M. O., Allakhverdiev S. I. Hydrogen production with a newly discovered cyanobacteria strain // BIO Web Conf. – 2024. – Vol. 100. – P. 02022.
46. Limongi A. R., Viviano E., De Luca M., Radice R. P., Bianco G., Martelli G. Biohydrogen from Microalgae: Production and Applications // Applied Sciences. – 2021. – Vol. 11, № 4. – P. 1616.
47. Xiong D., Happe T., Hankamer B., Ross I. L. Inducible high level expression of a variant $\Delta D19A, D58A$ -ferredoxin-hydrogenase fusion increases photohydrogen production efficiency in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Algal Research. – 2021. – Vol. 55. – P. 102275.
48. Kamshybayeva G. K., Kossalbayev B. D., Sadvakasova A. K., Kakimova A. B., Bauenova M. O., Zayadan B. K., Lan C.-W., Alwasel S., Tomo T., Chang J.-S., Allakhverdiev S. I. Genetic engineering contribution to developing cyanobacteria-based hydrogen energy to reduce carbon emissions and establish a hydrogen economy // International Journal of Hydrogen Energy. – 2024. – Vol. 54. – P. 491-511.

49. Subudhi S., Lal B. Fermentative hydrogen production in recombinant *Escherichia coli* harboring a [FeFe]-hydrogenase gene isolated from *Clostridium butyricum* // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2011. – Vol. 36, № 21. – P. 14024-14030.
50. Markley A. L., Begemann M. B., Clarke R. E., Gordon G. C., Pfleger B. F. Synthetic Biology Toolbox for Controlling Gene Expression in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 // *ACS Synthetic Biology*. – 2015. – Vol. 4, № 5. – P. 595-603.
51. Weyman P. D., Vargas W. A., Tong Y., Yu J., Maness P.-C., Smith H. O., Xu Q. Heterologous Expression of *Alteromonas macleodii* and *Thiocapsa roseopersicina* [NiFe] Hydrogenases in *Synechococcus elongatus* // *PLOS ONE*. – 2011. – Vol. 6, № 5. – P. e20126.
52. Kanygin A., Milrad Y., Thummala C., Reifschneider K., Baker P., Marco P., Yacoby I., Redding K. E. Rewiring photosynthesis: a photosystem I-hydrogenase chimera that makes H₂ in vivo // *Energy & Environmental Science*. – 2020. – Vol. 13, № 9. – P. 2903-2914.
53. Yang Z.-Y., Badalyan A., Hoffman B. M., Dean D. R., Seefeldt L. C. The Fe Protein Cycle Associated with Nitrogenase Catalysis Requires the Hydrolysis of Two ATP for Each Single Electron Transfer Event // *Journal of the American Chemical Society*. – 2023. – Vol. 145, № 10. – P. 5637-5644.
54. Das U., Das A., Das A. K. Exploring the nature's discriminating factors behind the selection of molybdoenzymes and tungstoenzymes depending on the biological environment // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2025. – Vol. 523. – P. 216290.
55. Wegelius A., Khanna N., Esmieu C., Barone G. D., Pinto F., Tamagnini P., Berggren G., Lindblad P. Generation of a functional, semisynthetic [FeFe]-hydrogenase in a photosynthetic microorganism // *Energy Environ Sci*. – 2018. – Vol. 11, № 11. – P. 3163-3167.
56. Ahmed M. E., Nayek A., Križan A., Coutard N., Morozan A., Ghosh Dey S., Lomoth R., Hammarström L., Artero V., Dey A. A Bidirectional Bioinspired [FeFe]-Hydrogenase Model // *Journal of the American Chemical Society*. – 2022. – Vol. 144, № 8. – P. 3614-3625.
57. Morra S., Mongili B., Maurelli S., Gilardi G., Valetti F. Isolation and characterization of a new [FeFe]-hydrogenase from *Clostridium perfringens* // *Biotechnology and Applied Biochemistry*. – 2016. – Vol. 63, № 3. – P. 305-311.
58. Sawyer A., Bai Y., Lu Y., Hemschemeier A., Happe T. Compartmentalisation of [FeFe]-hydrogenase maturation in *Chlamydomonas reinhardtii* // *The Plant Journal*. – 2017. – Vol. 90, № 6. – P. 1134-1143.
59. Khetkorn W., Rastogi R. P., Incharoensakdi A., Lindblad P., Madamwar D., Pandey A., Larroche C. Microalgal hydrogen production – A review // *Bioresource Technology*. – 2017. – Vol. 243. – P. 1194-1206.
60. Barahona E., Jiménez-Vicente E., Rubio L. M. Hydrogen overproducing nitrogenases obtained by random mutagenesis and high-throughput screening // *Sci Rep*. – 2016. – Vol. 6. – P. 38291.

61. Posewitz M. C., King P. W., Smolinski S. L., Zhang L., Seibert M., Ghirardi M. L. Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, № 24. – P. 25711-25720.
62. Yonemoto I. T., Matteri C. W., Nguyen T. A., Smith H. O., Weyman P. D. Dual organism design cycle reveals small subunit substitutions that improve [NiFe] hydrogenase hydrogen evolution // *Journal of Biological Engineering*. – 2013. – Vol. 7, № 1. – P. 17.
63. Dementin S., Belle V., Bertrand P., Guigliarelli B., Adryanczyk-Perrier G., De Lacey A. L., Fernandez V. M., Rousset M., Léger C. Changing the Ligation of the Distal [4Fe4S] Cluster in NiFe Hydrogenase Impairs Inter- and Intramolecular Electron Transfers // *Journal of the American Chemical Society*. – 2006. – Vol. 128, № 15. – P. 5209-5218.
64. Yonemoto I. T., Clarkson B. R., Smith H. O., Weyman P. D. A broad survey reveals substitution tolerance of residues ligating FeS clusters in [NiFe] hydrogenase // *BMC Biochemistry*. – 2014. – Vol. 15, № 1. – P. 10.
65. Berto P., D'Adamo S., Bergantino E., Vallese F., Giacometti G. M., Costantini P. The cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 is able to express an active [FeFe]-hydrogenase without additional maturation proteins // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2011. – Vol. 405, № 4. – P. 678-683.
66. Gärtner K., Lechno-Yossef S., Cornish A. J., Wolk C. P., Hegg E. L. Expression of *Shewanella oneidensis* MR-1 [FeFe]-Hydrogenase Genes in *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – Vol. 78, № 24. – P. 8579-8586.
67. Ducat D. C., Sachdeva G., Silver P. A. Rewiring hydrogenase-dependent redox circuits in cyanobacteria // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 108, № 10. – P. 3941-3946.
68. Asada Y., Koike Y., Schnackenberg J., Miyake M., Uemura I., Miyake J. Heterologous expression of clostridial hydrogenase in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942 // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. – 2000. – Vol. 1490, № 3. – P. 269-278.
69. Batyrova K., Gavrisheva A., Ivanova E., Liu J., Tsygankov A. Sustainable Hydrogen Photoproduction by Phosphorus-Deprived Marine Green Microalgae *Chlorella* sp // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16, № 2. – P. 2705-2716.
70. Kossalbayev B. D., Tomo T., Zayadan B. K., Sadvakasova A. K., Bolatkhan K., Alwasel S., Allakhverdiev S. I. Determination of the potential of cyanobacterial strains for hydrogen production // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2020. – Vol. 45, № 4. – P. 2627-2639.
71. Seabra R., Santos A., Pereira S., Moradas-Ferreira P., Tamagnini P. Immunolocalization of the uptake hydrogenase in the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula* CCAP1446/4 and two Nostoc strains // *FEMS Microbiology Letters*. – 2009. – Vol. 292, № 1. – P. 57-62.

72. Pansook S., Incharoensakdi A., Phunpruch S. Simazine Enhances Dark Fermentative H₂ Production by Unicellular Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2022. – Vol. Volume 10 - 2022.
73. Cooley J. W., Vermaas W. F. J. Succinate Dehydrogenase and Other Respiratory Pathways in Thylakoid Membranes of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803: Capacity Comparisons and Physiological Function // *Journal of Bacteriology*. – 2001. – Vol. 183, № 14. – P. 4251-4258.
74. Vilyanen D., Pavlov I., Naydov I., Ivanov B., Kozuleva M. Peculiarities of DNP-INT and DBMIB as inhibitors of the photosynthetic electron transport // *Photosynthesis Research*. – 2024. – Vol. 161, № 1. – P. 79-92.
75. Ren Y., Wang J., Liu Z., Ren Y., Li G. Hydrogen production from the monomeric sugars hydrolyzed from hemicellulose by *Enterobacter aerogenes* // *Renewable Energy*. – 2009. – Vol. 34, № 12. – P. 2774-2779.
76. Bolatkhan K., Kossalbayev B. D., Zayadan B. K., Tomo T., Veziroglu T. N., Allakhverdiev S. I. Hydrogen production from phototrophic microorganisms: Reality and perspectives // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2019. – Vol. 44, № 12. – P. 5799-5811.
77. Amaro H. M., Macedo Â. C., Malcata F. X. Microalgae: An alternative as sustainable source of biofuels? // *Energy*. – 2012. – Vol. 44, № 1. – P. 158-166.
78. Carrieri D., Wawrousek K., Eckert C., Yu J., Maness P.-C. The role of the bidirectional hydrogenase in cyanobacteria // *Bioresource Technology*. – 2011. – Vol. 102, № 18. – P. 8368-8377.
79. Lakshmikandan M., Murugesan A. G. Enhancement of growth and biohydrogen production potential of *Chlorella vulgaris* MSU-AGM 14 by utilizing seaweed aqueous extract of *Valoniopsis pachynema* // *Renewable Energy*. – 2016. – Vol. 96. – P. 390-399.
80. Markov S. A., Protasov E. S., Bybin V. A., Eivazova E. R., Stom D. I. Using immobilized cyanobacteria and culture medium contaminated with ammonium for H₂ production in a hollow-fiber photobioreactor // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2015. – Vol. 40, № 14. – P. 4752-4757.
81. Vargas S. R., Santos P. V. d., Zaiat M., Calijuri M. d. C. Optimization of biomass and hydrogen production by *Anabaena* sp. (UTEX 1448) in nitrogen-deprived cultures // *Biomass and Bioenergy*. – 2018. – Vol. 111. – P. 70-76.
82. Maswanna T., Phunpruch S., Lindblad P., Maneeruttanarungroj C. Enhanced hydrogen production by optimization of immobilized cells of the green alga *Tetraspora* sp. CU2551 grown under anaerobic condition // *Biomass and Bioenergy*. – 2018. – Vol. 111. – P. 88-95.
83. Kossalbayev B. D., Kakimova A. B., Bolatkhan K., Zayadan B. K., Sandybayeva S. K., Bozieva A. M., Sadvakasova A. K., Alwasel S., Allakhverdiev S. I. Biohydrogen production by novel cyanobacterial strains isolated from rice paddies in Kazakhstan // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2022. – Vol. 47, № 37. – P. 16440-16453.

84. Salleh S. F., Kamaruddin A., Uzir M. H., Mohamed A. R. Effects of cell density, carbon dioxide and molybdenum concentration on biohydrogen production by *Anabaena variabilis* ATCC 29413 // *Energy Conversion and Management*. – 2014. – Vol. 87. – P. 599-605.
85. Allahverdiyeva Y., Leino H., Saari L., Fewer D. P., Shunmugam S., Sivonen K., Aro E.-M. Screening for biohydrogen production by cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2010. – Vol. 35, № 3. – P. 1117-1127.
86. Bandyopadhyay A., Stöckel J., Min H., Sherman L. A., Pakrasi H. B. High rates of photobiological H₂ production by a cyanobacterium under aerobic conditions // *Nature Communications*. – 2010. – Vol. 1, № 1. – P. 139.
87. Yeager C. M., Milliken C. E., Bagwell C. E., Staples L., Berseth P. A., Sessions H. T. Evaluation of experimental conditions that influence hydrogen production among heterocystous Cyanobacteria // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2011. – Vol. 36, № 13. – P. 7487-7499.
88. Kamshybayeva G. K., Kossalbayev B. D., Sadvakasova A. K., Bauenova M. O., Zayadan B. K., Bozieva A. M., Alharby H. F., Tomo T., Allakhverdiev S. I. Screening and optimisation of hydrogen production by newly isolated nitrogen-fixing cyanobacterial strains // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2023. – Vol. 48, № 44. – P. 16649-16662.
89. Sveshnikov D. A., Sveshnikova N. V., Rao K. K., Hall D. O. Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and under nutritional stress // *FEMS Microbiology Letters*. – 1997. – Vol. 147, № 2. – P. 297-301.
90. Lambert G. R., Smith G. D. Hydrogen formation by marine blue—green algae // *FEBS Letters*. – 1977. – Vol. 83, № 1. – P. 159-162.
91. Yu Q., He J., Zhao Q., Wang X., Zhi Y., Li X., Li X., Li L., Ge B. Regulation of nitrogen source for enhanced photobiological H₂ production by co-culture of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Mesorhizobium sngaii* // *Algal Research*. – 2021. – Vol. 58. – P. 102422.
92. Leino H., Shunmugam S., Isojärvi J., Oliveira P., Mulo P., Saari L., Battchikova N., Sivonen K., Lindblad P., Aro E.-M., Allahverdiyeva Y. Characterization of ten H₂ producing cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2014. – Vol. 39, № 17. – P. 8983-8991.
93. Anjana K., Kaushik A. Enhanced hydrogen production by immobilized cyanobacterium *Lyngbya perelegans* under varying anaerobic conditions // *Biomass and Bioenergy*. – 2014. – Vol. 63. – P. 54-57.
94. Touloupakis E., Rontogiannis G., Silva Benavides A. M., Cicchi B., Ghanotakis D. F., Torzillo G. Hydrogen production by immobilized *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2016. – Vol. 41, № 34. – P. 15181-15186.

95. Salem K., van Waasbergen L. G. Photosynthetic Electron Transport Controls Expression of the High Light Inducible Gene in the Cyanobacterium *Synechococcus elongatus* Strain PCC 7942 // Plant and Cell Physiology. – 2004. – Vol. 45, № 5. – P. 651-658.
96. Zhang Y., Yang H., Guo L. Enhancing photo-fermentative hydrogen production performance of *Rhodobacter capsulatus* by disrupting methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase gene // International Journal of Hydrogen Energy. – 2016. – Vol. 41, № 1. – P. 190-197.
97. Zagrodnik R., Łaniecki M. Hydrogen production from starch by co-culture of *Clostridium acetobutylicum* and *Rhodobacter sphaeroides* in one step hybrid dark- and photofermentation in repeated fed-batch reactor // Bioresour Technol. – 2017. – Vol. 224. – P. 298-306.
98. Wong J. Y., Ngieng N. S., Husaini A., Saat R., Hussain H. Influence of pH on the biodegradation efficiency of fats, oils, and grease by biosurfactant-producing bacterial consortia // Biodegradation. – 2025. – Vol. 36, № 4. – P. 50.
99. Lin J.-Y., Tan S.-I., Yi Y.-C., Hsiang C.-C., Chang C.-H., Chen C.-Y., Chang J.-S., Ng I. S. High-level production and extraction of C-phycocyanin from cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC7002 for antioxidation, antibacterial and lead adsorption // Environmental Research. – 2022. – Vol. 206. – P. 112283.
100. Burrows E. H., Wong W. K., Fern X., Chaplen F. W., Ely R. L. Optimization of pH and nitrogen for enhanced hydrogen production by *Synechocystis* sp. PCC 6803 via statistical and machine learning methods // Biotechnol Prog. – 2009. – Vol. 25, № 4. – P. 1009-17.
101. Jin H. F., Lim B. R., Lee K. Influence of nitrate feeding on carbon dioxide fixation by microalgae // J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. – 2006. – Vol. 41, № 12. – P. 2813-24.
102. Jin H.-F., Lim B.-R., Lee K. Influence of Nitrate Feeding on Carbon Dioxide Fixation by Microalgae // Journal of Environmental Science and Health, Part A. – 2006. – Vol. 41, № 12. – P. 2813-2824.
103. Sakurai H., Masukawa H., Kitashima M., Inoue K. Photobiological hydrogen production: Bioenergetics and challenges for its practical application // Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews. – 2013. – Vol. 17. – P. 1-25.
104. Ali M., Elreedy A., Ibrahim M. G., Fujii M., Nakatani K., Tawfik A. Regulating acidogenesis and methanogenesis for the separated bio-generation of hydrogen and methane from saline-to-hypersaline industrial wastewater // Journal of Environmental Management. – 2019. – Vol. 250. – P. 109546.
105. Aoyama K., Uemura I., Miyake J., Asada Y. Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis* // Journal of Fermentation and Bioengineering. – 1997. – Vol. 83, № 1. – P. 17-20.
106. He D., Bultel Y., Magnin J.-P., Willison J. C. Kinetic analysis of photosynthetic growth and photohydrogen production of two strains of *Rhodobacter*

Capsulatus // Enzyme and Microbial Technology. – 2006. – Vol. 38, № 1. – P. 253-259.

107. Wang Y.-Z., Liao Q., Zhu X., Tian X., Zhang C. Characteristics of hydrogen production and substrate consumption of *Rhodospseudomonas palustris* CQK 01 in an immobilized-cell photobioreactor // Bioresource Technology. – 2010. – Vol. 101, № 11. – P. 4034-4041.

108. Zhang Q., Zhang Z., Zhang H., Li Y. Chapter 12 - Production of biohydrogen in photobioreactors // Current Developments in Biotechnology and Bioengineering / Sirohi R. и др. Elsevier, 2023. – С. 269-300.

109. Velázquez J. J., Fernández-González R., Díaz L., Pulido Melián E., Rodríguez V. D., Núñez P. Effect of reaction temperature and sacrificial agent on the photocatalytic H₂-production of Pt-TiO₂ // Journal of Alloys and Compounds. – 2017. – Vol. 721. – P. 405-410.

110. Wang L., Guo X., Liu J., Wang C., Wang Y., Qiu Y., Ling Z., Zeng X., Yuan D. Plasma-Assisted Hydrogen Production: Technologies, Challenges, and Future Prospects // Processes. – 2025. – Vol. 13, № 4. – P. 1157.

111. Ali I., Imanova G., Agayev T., Aliyev A., Agustiono Kurniawan T., Bin Jumah A. Economic hydrogen production by water splitting with different catalysts and temperatures under thermal and gamma radiation-thermal processes // Nuclear Engineering and Technology. – 2026. – Vol. 58, № 3. – P. 103982.

112. Suresh G., Kumari P., Venkata Mohan S. Light-dependent biohydrogen production: Progress and perspectives // Bioresource Technology. – 2023. – Vol. 380. – P. 129007.

113. Chanquia S. N., Vernet G., Kara S. Photobioreactors for cultivation and synthesis: Specifications, challenges, and perspectives // Eng Life Sci. – 2022. – Vol. 22, № 12. – P. 712-724.

114. Katayama M. Chapter 2 - Fundamental physiological processes: Photosynthesis, light-harvesting complex, and carbon-concentrating mechanisms // Cyanobacterial Physiology / Kageyama H., Waditee-Sirisattha R. Academic Press, 2022. – С. 17-28.

115. Akkerman I., Janssen M., Rocha J., Wijffels R. H. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design // International Journal of Hydrogen Energy. – 2002. – Vol. 27, № 11. – P. 1195-1208.

116. Dziurawicz P., Fałowska P., Waszkiewicz K., Wietrzyk-Pełka P., Węgrzyn M. H. Changes in Photosynthetic Activity of the Lichen *Cladonia mitis* and the Moss *Pleurozium schreberi* under Artificial High-Energy Lighting in Laboratory Conditions // Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica. – 2022. – Vol. Vol. 64, № No 2. – P. 23-33.

117. Glover H. E., Keller M. D., Spinrad R. W. The effects of light quality and intensity on photosynthesis and growth of marine eukaryotic and prokaryotic phytoplankton clones // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. – 1987. – Vol. 105, № 2. – P. 137-159.

118. Varfolomeev S. Efficiency of solar energy conversion as a function of light intensity // Pure and Applied Chemistry. – 2008. – Vol. 80, № 10. – P. 2069-2077.
119. Wan Mahari W. A., Wan Razali W. A., Waiho K., Wong K. Y., Foo S. S., Kamaruzzan A. S., Derek C. J. C., Ma N. L., Chang J.-S., Dong C.-D., Chisti Y., Lam S. S. Light-emitting diodes (LEDs) for culturing microalgae and cyanobacteria // Chemical Engineering Journal. – 2024. – Vol. 485. – P. 149619.
120. Berberoglu H., Pilon L., Melis A. Radiation characteristics of *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 and its truncated chlorophyll antenna transformants tla1, tlaX and tla1-CW+ // International Journal of Hydrogen Energy. – 2008. – Vol. 33, № 22. – P. 6467-6483.
121. Ghosh G., Atta A., Chakraborty S. Multiscale effects of radial mixing on mixotrophic microalgal growth and macromolecular synthesis in tubular bubble-column photobioreactors // Algal Research. – 2024. – Vol. 80. – P. 103518.
122. Nedaei L., Shokrkar H. Influence of process factors and photobioreactor design on microalgae cultivation // Biofuels, Bioproducts and Biorefining. – 2025. – Vol. 19, № 6. – P. 2433-2456.
123. Kubar A. A., Kumar S., Liu W., Cui Y., Zhu F., Xu X., Shao C., Hu X., Prempeh N. Y. A., Huo S. Numerical simulation of vortex flow field generated in a novel nested-bottled photobioreactor to improve *Arthrospira platensis* growth // Bioresource Technology. – 2023. – Vol. 373. – P. 128710.
124. Skjånes K., Andersen U., Heidorn T., Borgvang S. A. Design and construction of a photobioreactor for hydrogen production, including status in the field // J Appl Phycol. – 2016. – Vol. 28. – P. 2205-2223.
125. Nguyen N.-K.-Q., Bui X.-T., Dao T.-S., Pham M.-D.-T., Ngo H. H., Lin C., Lin K.-Y. A., Nguyen P.-D., Huynh K.-P.-H., Vo T.-K.-Q., Tra V.-T., Le T.-S. Influence of hydrodynamic shear stress on activated algae granulation process for wastewater treatment // Environmental Technology & Innovation. – 2024. – Vol. 33. – P. 103494.
126. Benner P., Meier L., Pfeffer A., Krüger K., Oropeza Vargas J. E., Weuster-Botz D. Lab-scale photobioreactor systems: principles, applications, and scalability // Bioprocess Biosyst Eng. – 2022. – Vol. 45, № 5. – P. 791-813.
127. Yamaoka Y., Petroutsos D., Je S., Yamano T., Li-Beisson Y. Light, CO₂, and carbon storage in microalgae // Current Opinion in Plant Biology. – 2025. – Vol. 84. – P. 102696.
128. Estrada-Graf A. A., Sigala J.-C., Sánchez-Pérez M., Morales-Ibarría M. Induction of lipid production through controlled acidification: A transcriptional insight into the metabolism of *Scenedesmus obtusiusculus* AT-UAM // Process Biochemistry. – 2024. – Vol. 147. – P. 175-185.
129. Fascetti E., Todini O. Rhodobacter sphaeroides RV cultivation and hydrogen production in a one- and two-stage chemostat // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1995. – Vol. 44, № 3. – P. 300-305.

130. Oh Y.-K., Seol E.-H., Kim M.-S., Park S. Photoproduction of hydrogen from acetate by a chemoheterotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* P4 // International Journal of Hydrogen Energy. – 2004. – Vol. 29, № 11. – P. 1115-1121.
131. Kosourov S., Murukesan G., Seibert M., Allahverdiyeva Y. Evaluation of light energy to H₂ energy conversion efficiency in thin films of cyanobacteria and green alga under photoautotrophic conditions // Algal Research. – 2017. – Vol. 28. – P. 253-263.
132. Kayano H., Karube I., Matsunaga T., Suzuki S., Nakayama O. A photochemical fuel cell system using *Anabaena* N-7363 // European journal of applied microbiology and biotechnology. – 1981. – Vol. 12, № 1. – P. 1-5.
133. Gienau T., Ehrmanntraut A., Kraume M., Rosenberger S. Influence of Ozone Treatment on Ultrafiltration Performance and Nutrient Flow in a Membrane Based Nutrient Recovery Process from Anaerobic Digestate // Membranes. – 2020. – Vol. 10, № 4. – P. 64.
134. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. / Сиренко Л. А., Сакевич А. И., Осипов Л. Ф., Лукина Л. Ф. – Киев: Наукова думка, 1975.
135. Chandra S., Bhattacharya S., Pandit S., Banerjee S., Roy A., Rai A. K. Cyanobacteria as an eco-friendly bioresource for EPS production with crack healing capacity in concrete // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2023. – Vol. 54. – P. 102909.
136. Salwan R., Rana A., Sharma V. Chapter 3 - Basic concepts of microbiology // Laboratory Methods in Microbiology and Molecular Biology / Salwan R., Sharma V. Academic Press, 2023. – C. 21-29.
137. Lee L. M., Liu A. P. The Application of Micropipette Aspiration in Molecular Mechanics of Single Cells // J Nanotechnol Eng Med. – 2014. – Vol. 5, № 4. – P. 0408011-408016.
138. Fiset C., Irwin A. J., Finkel Z. V. The macromolecular composition of noncalcified marine macroalgae // Journal of Phycology. – 2019. – Vol. 55, № 6. – P. 1361-1369.
139. Chunzhuk E. A., Grigorenko A. V., Kiseleva S. V., Chernova N. I., Volkov D. A., Nurgaliev R. G., Leng L., Kumar V., Vlaskin M. S. Features of the Microalgae and Cyanobacteria Growth in the Flue Gas Atmosphere with Different CO₂ Concentrations // Sustainability. – 2024. – Vol. 16, № 16. – P. 7075.
140. Shen C.-H. Chapter 6 - Extraction and purification of nucleic acids // Diagnostic Molecular Biology (Second Edition) / Shen C.-H. Academic Press, 2023. – C. 157-180.
141. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. / Lorenz T. C.: 1940-087X, 2012. – Vol. 63– e3998 c.
142. Lorenz T. C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies // J Vis Exp. – 2012.10.3791/3998 № 63. – P. e3998.

143. Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences // *Brief Bioinform.* – 2008. – Vol. 9, № 4. – P. 299-306.
144. Masukawa H. Measurement of photobiological hydrogen production // *Low Temperature Science.* – 2009. – Vol. 67. – P. 561-565.
145. Eheneden I., Wang R., Zhao J. Antibiotic removal by microalgae-bacteria consortium: Metabolic pathways and microbial responses // *Science of The Total Environment.* – 2023. – Vol. 891. – P. 164489.
146. Sobolewska E., Borowski S., Nowicka-Krawczyk P., Jurczak T. Growth of microalgae and cyanobacteria consortium in a photobioreactor treating liquid anaerobic digestate from vegetable waste // *Scientific Reports.* – 2023. – Vol. 13, № 1. – P. 22651.
147. Gutekunst K., Chen X., Schreiber K., Kaspar U., Makam S., Appel J. The bidirectional NiFe-hydrogenase in *Synechocystis* sp. PCC 6803 is reduced by flavodoxin and ferredoxin and is essential under mixotrophic, nitrate-limiting conditions // *J Biol Chem.* – 2014. – Vol. 289, № 4. – P. 1930-7.
148. Aguirre R., Hatchikian E. C., Monsan P. Bidirectional measurement of hydrogenase activity by the pH-stat method // *Anal Biochem.* – 1983. – Vol. 131, № 2. – P. 525-9.
149. Montes-Luz B., Conrado A. C., Ellingsen J. K., Monteiro R. A., de Souza E. M., Stacey G. Acetylene Reduction Assay: A Measure of Nitrogenase Activity in Plants and Bacteria // *Curr Protoc.* – 2023. – Vol. 3, № 5. – P. e766.
150. Roberts A. G., Bowman M. K., Kramer D. M. The inhibitor DBMIB provides insight into the functional architecture of the Q_o site in the cytochrome b₆f complex // *Biochemistry.* – 2004. – Vol. 43, № 24. – P. 7707-16.
151. Pansook S., Incharoensakdi A., Phunpruch S. Effects of the Photosystem II Inhibitors CCCP and DCMU on Hydrogen Production by the Unicellular Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* // *ScientificWorldJournal.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 1030236.
152. Nardelli S. C., Twardowski M. S. Assessing the link between chlorophyll concentration and absorption line height at 676 nm over a broad range of water types // *Opt Express.* – 2016. – Vol. 24, № 22. – P. A1374-a1389.
153. Lelandais G., Scheiber I., Paz-Yepes J., Lozano J.-C., Botebol H., Pilátová J., Žárský V., Léger T., Blaiseau P.-L., Bowler C., Bouget F.-Y., Camadro J.-M., Sutak R., Lesuisse E. *Ostreococcus tauri* is a new model green alga for studying iron metabolism in eukaryotic phytoplankton // *BMC Genomics.* – 2016. – Vol. 17, № 1. – P. 319.
154. Kitashima M., Masukawa H., Sakurai H., Inoue K. Flexible plastic bioreactors for photobiological hydrogen production by hydrogenase-deficient cyanobacteria // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2012. – Vol. 76, № 4. – P. 831-3.
155. Cole J. K., Hutchison J. R., Renslow R. S., Kim Y.-M., Chrisler W. B., Engelmann H. E., Dohnalkova A. C., Hu D., Metz T. O., Fredrickson J. K., Lindemann S. R. Phototrophic biofilm assembly in microbial-mat-derived unicyanobacterial

consortia: model systems for the study of autotroph-heterotroph interactions // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – Vol. Volume 5 - 2014.

156. Shaima A. F., Mohd Yasin N. H., Ibrahim N., Takriff M. S., Gunasekaran D., Ismaeel M. Y. Y. Unveiling antimicrobial activity of microalgae *Chlorella sorokiniana* (UKM2), *Chlorella* sp. (UKM8) and *Scenedesmus* sp. (UKM9) // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2022. – Vol. 29, № 2. – P. 1043-1052.

157. Daneshvar E., Zarrinmehr M. J., Hashtjin A. M., Farhadian O., Bhatnagar A. Versatile applications of freshwater and marine water microalgae in dairy wastewater treatment, lipid extraction and tetracycline biosorption // *Bioresour Technol*. – 2018. – Vol. 268. – P. 523-530.

158. Kiki C., Rashid A., Wang Y., Li Y., Zeng Q., Yu C.-P., Sun Q. Dissipation of antibiotics by microalgae: Kinetics, identification of transformation products and pathways // *Journal of Hazardous Materials*. – 2020. – Vol. 387. – P. 121985.

159. Gojkovic Z., Lindberg R. H., Tysklind M., Funk C. Northern green algae have the capacity to remove active pharmaceutical ingredients // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2019. – Vol. 170. – P. 644-656.

160. Huang J., Wang Z., Zhao C., Yang H., Niu L. Performance of four different microalgae-based technologies in antibiotics removal under multiple concentrations of antibiotics and strigolactone analogue GR24 administration // *Scientific Reports*. – 2024. – Vol. 14, № 1. – P. 16004.

161. Abril Bonett J. E., de Sousa Geraldino P., Cardoso P. G., de Freitas Coelho F., Duarte W. F. Isolation of freshwater microalgae and outdoor cultivation using cheese whey as substrate // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. – 2020. – Vol. 29. – P. 101799.

162. Han J., Wang S., Zhang L., Yang G., Zhao L., Pan K. A method of batch-purifying microalgae with multiple antibiotics at extremely high concentrations // *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. – 2016. – Vol. 34, № 1. – P. 79-85.

163. Khan M. N., Ullah B., Assad N., Gul H., Roheen T., Mustaqeem M., Bibi M., Latef A. A. H. A., Kaplan A., Razzaq A., Malik T., Fahad S. The Evolutionary History of Cyanobacteria and Their Role in Earth's Biogeochemistry // *Cyanobacterial Blooms: Ecology, Evolution and Biogeochemical Impacts: Microbial Dynamics and Global Implications* / Fahad S. и др. – Cham: Springer Nature Switzerland, 2026. – С. 25-45.

164. Hennacy J. H., Jonikas M. C. Prospects for Engineering Biophysical CO₂ Concentrating Mechanisms into Land Plants to Enhance Yields // *Annu Rev Plant Biol*. – 2020. – Vol. 71. – P. 461-485.

165. Kossalbayev B B. A. L. D. Z. B. U. A. B. K. A. N. Zayadan B., Usserbayeva A., Bolatkhan K., Akmukhanova N., Kossalbayev B., Baizhigitova A., Los D. Screening of isolated and collection strains of cyanobacteria on productivity for determining their biotechnological potential: al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty // *Eurasian Journal of Ecology*. – 2018. – Vol. 55, № 2. – P. 121-130.

166. Mandal M. K., Chanu N. K., Chaurasia N. Chapter 5 - Cyanobacterial pigments and their fluorescence characteristics: applications in research and industry // *Advances in Cyanobacterial Biology* / Singh P. K. и др. Academic Press, 2020. – С. 55-72.
167. Jiao H., Tsigkou K., Elsamahy T., Pispas K., Sun J., Manthos G., Schagerl M., Sventzouri E., Al-Tohamy R., Kornaros M., Ali S. S. Recent advances in sustainable hydrogen production from microalgae: Mechanisms, challenges, and future perspectives // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2024. – Vol. 270. – P. 115908.
168. Khanna N., Lindblad P. Cyanobacterial Hydrogenases and Hydrogen Metabolism Revisited: Recent Progress and Future Prospects // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – Vol. 16, № 5. – P. 10537-10561.
169. Eroglu E., Melis A. Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art // *Bioresource Technology*. – 2011. – Vol. 102, № 18. – P. 8403-8413.
170. Fu H.-Y., Picot D., Choquet Y., Longatte G., Sayegh A., Delacotte J., Guille-Collignon M., Lemaître F., Rappaport F., Wollman F.-A. Redesigning the QA binding site of Photosystem II allows reduction of exogenous quinones // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 15274.
171. Grechanik V. I., Tsygankov A. A. The relationship between photosystem II regulation and light-dependent hydrogen production by microalgae // *Biophys Rev.* – 2022. – Vol. 14, № 4. – P. 893-904.
172. Valvassore M. S., de Freitas H. F. S., Andrade C. M. G., Costa C. B. B. Improving feeding profile strategy for hydrogen production by *Cyanothece* sp. ATCC 51142 using meta-heuristic methods // *Chemical Engineering Communications*. – 2023. – Vol. 210, № 1. – P. 1-15.
173. Zhang J., Xue D., Wang C., Fang D., Cao L., Gong C. Genetic engineering for biohydrogen production from microalgae // *iScience*. – 2023. – Vol. 26, № 8. – P. 107255.
174. Hallenbeck P. C. Chapter 7 - Photofermentative Biohydrogen Production // *Biohydrogen* / Pandey A. и др. – Amsterdam: Elsevier, 2013. – С. 145-159.
175. Sadeq A. M., Homod R. Z., Hussein A. K., Togun H., Mahmoodi A., Isleem H. F., Patil A. R., Moghaddam A. H. Hydrogen energy systems: Technologies, trends, and future prospects // *Science of The Total Environment*. – 2024. – Vol. 939. – P. 173622.
176. Jaramillo A., Satta A., Pinto F., Faraloni C., Zittelli G. C., Silva Benavides A. M., Torzillo G., Schumann C., Méndez J. F., Berggren G., Lindblad P., Parente M., Esposito S., Diano M. Outlook on Synthetic Biology-Driven Hydrogen Production: Lessons from Algal Photosynthesis Applied to Cyanobacteria // *Energy & Fuels*. – 2025. – Vol. 39, № 11. – P. 4987-5006.
177. Scranton M. I., Novelli P. C., Michaels A., Horrigan S. G., Carpenter E. J. Hydrogen production and nitrogen fixation by *Oscillatoria thiebautii* during in situ incubations // *Limnology and Oceanography*. – 1987. – Vol. 32, № 4. – P. 998-1006.

178. Patel S., Madamwar D. Photohydrogen production from a coupled system of *Halobacterium Halobium* and *Phormidium Valderianum* // International Journal of Hydrogen Energy. – 1994. – Vol. 19, № 9. – P. 733-738.
179. Min H., Sherman L. A. Hydrogen Production by the Unicellular, Diazotrophic Cyanobacterium *Cyanothece* sp. Strain ATCC 51142 under Conditions of Continuous Light // Applied and Environmental Microbiology. – 2010. – Vol. 76, № 13. – P. 4293-4301.
180. Skizim N. J., Ananyev G. M., Krishnan A., Dismukes G. C. Metabolic Pathways for Photobiological Hydrogen Production by Nitrogenase- and Hydrogenase-containing Unicellular Cyanobacteria *Cyanothece* // Journal of Biological Chemistry. – 2012. – Vol. 287, № 4. – P. 2777-2786.
181. Majhi B. K. Carbon capture, storage, and utilization in cyanobacteria // Carbon Resources Conversion. – 2026. – Vol. 9, № 3. – P. 100388.
182. Jiyenbekov A., Barinova S., Bigaliev A., Nurashov S., Sametova E., Fahima T. Bioindication using diversity and ecology of algae of the Alakol Lake, Kazakhstan // Applied Ecology and Environmental Research. – 2018. – Vol. 16, № 6. – P. 7799-7831.
183. Patterson G. M. L., Larsen L. K., Moore R. E. Bioactive natural products from blue-green algae // Journal of Applied Phycology. – 1994. – Vol. 6, № 2. – P. 151-157.
184. Serebryakova L. T., Tsygankov A. A. Two-stage system for hydrogen production by immobilized cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 // Biotechnol Prog. – 2007. – Vol. 23, № 5. – P. 1106-10.
185. Nagy V., Dabosi Z., Kuntam S., Csankó K., Kovács L., Tóth S. Z. Photoautotrophic and sustained H₂ production by the pgr5 mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* in simulated daily light conditions // International Journal of Hydrogen Energy. – 2024. – Vol. 53. – P. 760-769.
186. Singh R. P., Yadav P., Gupta R. K. Chapter 11 - Modern strategy of cyanobacterial biohydrogen production and current approaches toward its enhancement // Expanding Horizon of Cyanobacterial Biology / Singh P. K. и др. Academic Press, 2022. – C. 219-238.
187. Tamagnini P., Axelsson R., Lindberg P., Oxelfelt F., Wünschiers R., Lindblad P. Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria // Microbiol Mol Biol Rev. – 2002. – Vol. 66, № 1. – P. 1-20, table of contents.
188. Yagi T., Higuchi Y. Studies on hydrogenase // Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. – 2013. – Vol. 89, № 1. – P. 16-33.
189. Sargent F. Chapter Eight - The Model [NiFe]-Hydrogenases of *Escherichia coli* // Advances in Microbial Physiology / Poole R. K. Academic Press, 2016. – C. 433-507.
190. Márquez-Reyes L. A., Sánchez-Saavedra M. d. P., Valdez-Vazquez I. Improvement of hydrogen production by reduction of the photosynthetic oxygen in microalgae cultures of *Chlamydomonas gloeopara* and *Scenedesmus obliquus* // International Journal of Hydrogen Energy. – 2015. – Vol. 40, № 23. – P. 7291-7300.

191. Tsygankov A. A., Kosourov S. N., Tolstygina I. V., Ghirardi M. L., Seibert M. Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions // International Journal of Hydrogen Energy. – 2006. – Vol. 31, № 11. – P. 1574-1584.
192. Faraloni C., Torzillo G. Genetic Optimization for Increasing Hydrogen Production in Microalgae // Fuel Cells and Hydrogen Production: A Volume in the Encyclopedia of Sustainability Science and Technology, Second Edition / Lipman T. E., Weber A. Z. – New York, NY: Springer New York, 2019. – C. 919-934.
193. Appel J., Hueren V., Boehm M., Gutekunst K. Cyanobacterial in vivo solar hydrogen production using a photosystem I–hydrogenase (PsaD-HoxYH) fusion complex // Nature Energy. – 2020. – Vol. 5, № 6. – P. 458-467.
194. Schütz K., Happe T., Troshina O., Lindblad P., Leitão E., Oliveira P., Tamagnini P. Cyanobacterial H₂ production — a comparative analysis // Planta. – 2004. – Vol. 218, № 3. – P. 350-359.
195. Gonen-Zurgil Y., Carmeli-Schwartz Y., Sukenik A. Selective effect of the herbicide DCMU on unicellular algae - a potential tool to maintain monoalgal mass culture of Nannochloropsis // Journal of Applied Phycology. – 1996. – Vol. 8, № 4. – P. 415-419.
196. Gadkari D. Effect of some photosynthesis-inhibiting herbicides on growth and nitrogenase activity of a new isolate of cyanobacteria, *Nostoc* G3 // Journal of Basic Microbiology. – 1988. – Vol. 28, № 7. – P. 419-426.
197. Singh S., Datta P., Tirkey A. Response of multiple herbicide resistant strain of diazotrophic cyanobacterium, *Anabaena variabilis*, exposed to atrazine and DCMU // Indian J Exp Biol. – 2011. – Vol. 49, № 4. – P. 298-303.
198. Meunier P. C., Burnap R. L., Sherman L. A. Interaction of the photosynthetic and respiratory electron transport chains producing slow O₂ signals under flashing light in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Photosynthesis Research. – 1995. – Vol. 45, № 1. – P. 31-40.
199. Pisciotta J. M., Zou Y., Baskakov I. V. Light-Dependent Electrogenic Activity of Cyanobacteria // PLOS ONE. – 2010. – Vol. 5, № 5. – P. e10821.
200. Roni M. S., Sakil M. A., Aktar M. M., Takatsuka C., Mukae K., Inoue-Aono Y., Moriyasu Y. Hydrogen Peroxide Mediates *Premature Senescence* Caused by Darkness and Inorganic Nitrogen Starvation in *Physcomitrium patens* // Plants. – 2022. – Vol. 11, № 17. – P. 2280.
201. Shaku K., Shimakawa G., Hashiguchi M., Miyake C. Reduction-Induced Suppression of Electron Flow (RISE) in the Photosynthetic Electron Transport System of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 // Plant and Cell Physiology. – 2016. – Vol. 57, № 7. – P. 1443-1453.
202. Savla N., Shinde A., Sonawane K., Mekuto L., Chowdhary P., Pandit S. 17 - Microbial hydrogen production: fundamentals to application // Microorganisms for Sustainable Environment and Health / Chowdhary P. и др.Elsevier, 2020. – C. 343-365.

203. Vyas D., Kumar H. D. Nitrogen fixation and hydrogen uptake in four cyanobacteria // International Journal of Hydrogen Energy. – 1995. – Vol. 20, № 2. – P. 163-168.
204. Ono T.-A., Murata N. Photosynthetic electron transport and phosphorylation reactions in thylakoid membranes from the blue-green alga *Anacystis nidulans* // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics. – 1978. – Vol. 502, № 3. – P. 477-485.
205. Baebprasert W., Jantaro S., Khetkorn W., Lindblad P., Incharoensakdi A. Increased H₂ production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by redirecting the electron supply via genetic engineering of the nitrate assimilation pathway // Metabolic Engineering. – 2011. – Vol. 13, № 5. – P. 610-616.
206. Antal T. K., Lindblad P. Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH // Journal of Applied Microbiology. – 2005. – Vol. 98, № 1. – P. 114-120.
207. Sadvakasova A. K., Kossalbayev B. D., Token A. I., Bauenova M. O., Wang J., Zayadan B. K., Balouch H., Alwasel S., Leong Y. K., Chang J.-S., Allakhverdiev S. I. Influence of Mo and Fe on Photosynthetic and Nitrogenase Activities of Nitrogen-Fixing Cyanobacteria under Nitrogen Starvation // Cells. – 2022. – Vol. 11, № 5. – P. 904.

ҚОСЫМША А

Зерттеу нысандары мен материалдары:

Таблица А.1 – Зерттеу жұмысында қолданылған микроорганизм штамдары

№	Микроорганизм штамдары	Бөлініп алынған орны / сипаттамасы	Әдебиет
1	<i>Desertifilum</i> sp. PSU 1129	Сырдария өзені, Қызылорда облысы (GPS: 43.877411 N, 67.206102 E)	Осы зерттеу жұмысында бөлініп алынды, тазартылды және зерттелді
2	<i>Oscillatoria</i> sp. S- 001	Сырдария өзені, Қызылорда облысы (GPS: 43.877411 N, 67.206102 E)	Осы зерттеу жұмысында бөлініп алынды, тазартылды және зерттелді
3	<i>Phormidium</i> sp. PSU 1120	Бадам өзені, Түркістан облысы (GPS: 43.877411 N, 67.206102 E)	Осы зерттеу жұмысында бөлініп алынды, тазартылды және зерттелді
4	<i>Chroococcus</i> sp. PSU 1008	Түрген шатқалы, Алматы облысы (GPS: 43.396875 N, 77.586164 E)	Осы зерттеу жұмысында бөлініп алынды, тазартылды және зерттелді
5	<i>Synechococcus</i> sp. SU 78	Түрген шатқалы, Алматы облысы (GPS: 43.396875 N, 77.586164 E)	Осы зерттеу жұмысында бөлініп алынды, тазартылды және зерттелді
6	<i>Synechocystis</i> sp. PSU 1262	Бадам өзені, Түркістан облысы (GPS: 43.877411 N, 67.206102 E)	Осы зерттеу жұмысында бөлініп алынды, тазартылды және зерттелді
7	<i>Tolypothrix tenuis</i> J-1	Цианобактериялардың коллекциялық штамы	[204]
8	<i>Nostoc</i> sp. J-1	Цианобактериялардың коллекциялық штамы	[130]

Кесте А.2 – Сутегі өндірісінде цианобактерияларды өсіру үшін қолданылатын қоректік орталар

Қоректік компоненттер	Тұздың атауы	BG-11	BG ₀ -11	Allen	Allen ₀
KH ₂ PO ₄	Калийдің дигидрофосфаты	0,29 мМ	0,29 мМ	19,43 мМ	19,43 мМ
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Магний сульфаты гептагидраты	0,30 мМ	0,30 мМ	10 мМ	10 мМ
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Кальций хлориді дигидраты	0,24 мМ	0,24 мМ	5,08 мМ	5,08 мМ
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	ЭДТА динатрий тұзы дигидраты	2,70 мМ	2,70 мМ	0,80 мМ	0,80 мМ
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Темір(II) сульфаты гептагидраты	21 мМ	21 мМ	0,69 мМ	0,69 мМ
Na ₂ CO ₃	Натрий карбонаты	0,19 мМ	0,19 мМ	1,90 мМ	1,90 мМ
Citric acid	Лимон қышқылы	31 мМ	31 мМ	—	—
H ₃ BO ₃	Бор қышқылы	27 мкМ	27 мкМ	27 мкМ	27 мкМ
MnCl ₂ ·4H ₂ O	Марганец(II) хлориді тетрагидраты	9,10 мкМ	9,10 мкМ	9,10 мкМ	9,10 мкМ
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Мырыш сульфаты гептагидраты	0,76 мкМ	0,76 мкМ	0,76 мкМ	0,76 мкМ
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	Кобальт(II) нитраты гексагидраты	0,17 мкМ	0,17 мкМ	0,17 мкМ	0,17 мкМ
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	Натрий молибдаты дигидраты	1,60 мкМ	1,60 мкМ	1,60 мкМ	1,60 мкМ
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Мыс(II) сульфаты пентагидраты	0,30 мкМ	0,30 мкМ	0,30 мкМ	0,30 мкМ
NaNO ₃	Натрий нитраты	17,6 мкМ	—	—	—

Кесте А.3 – BG-11 қоректік ортасын дайындау

№	Құрамы	Мөлшері
1	Ерітінді 1	2 мл
	Дистильденген су	200 мл
2	Ерітінді 2	50 мл
	Ерітінді 3	2 мл
	Ерітінді 6	1 мл
	А6	1 мл
	1 М TES-КОН	20 мл
	Na ₂ S ₂ O ₃	3 г
	Бакто-агар	15 г

Кесте А.3.1 – BG-11 ортасы үшін қолданылатын ерітінділер

Ерітінді	Қосылыс (формула)	Тұздың/реагенттің толық атауы (қазақша)	Мөлшері
Ерітінді 1	Лимон қышқылы	Лимон қышқылы	0,3 г/100 мл
Ерітінді 1	Аммоний темір(III) цитраты	Аммоний темір(III) цитраты	0,3 г/100 мл
Ерітінді 1	Na ₂ EDTA	ЭДТА динатрий тұзы	0,5 г/100 мл
Ерітінді 2	NaNO ₃	Натрий нитраты	30 г/л
Ерітінді 2	K ₂ HPO ₄	Калийдің гидрофосфаты (дикалий фосфаты)	0,78 г/л
Ерітінді 2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	Магний сульфаты гептагидраты	1,5 г/л
Ерітінді 3	CaCl ₂ ·2H ₂ O	Кальций хлориді дигидраты	1,9 г/100 мл
Ерітінді 6	Na ₂ CO ₃	Натрий карбонаты	2 г/100 мл
А6	H ₃ BO ₃	Бор қышқылы	2,86 г/л
А6	MnCl ₂ ·4H ₂ O	Марганец(II) хлориді тетрагидраты	1,81 г/л
А6	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Мырыш сульфаты гептагидраты	0,22 г/л
А6	Na ₂ MoO ₄	Натрий молибдаты	0,021 г/л
А6	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	Кобальт(II) нитраты гексагидраты	0,0494 г/л
1 М TES-КОН (рН 8,2)	TES	N-трис(гидроксиметил)метил-2-аминоэтансульфон қышқылы (TES)	229,25 г/л
1 М TES-КОН (рН 8,2)	КОН	Калий гидроксиді	рН 8,2-ге дейін реттеу

Кестесі А.4 – Зерттеу тәжірибелерінде қолданылатын тұздар

№	Атауы	Өндіруші
1	Калийдің дигидрофосфаты (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich Solutions, Германия
2	Натрий молибдаты дигидраты ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich Solutions, Германия
3	Натрий нитраты (NaNO_3)	Sigma-Aldrich Solutions, Германия
4	Мыс(II) сульфаты пентагидраты ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich Solutions, Германия
5	Кобальт(II) нитраты гексагидраты ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich Solutions, Германия
6	Мырыш сульфаты гептагидраты ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Fisher Scientific Inc, Дублин, Ирландия
7	Марганец(II) хлориді тетрагидраты ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich Solutions, Германия
8	Бор қышқылы (H_3BO_3)	Sigma-Aldrich Solutions, Германия
9	ЭДТА динатрий тұзы дигидраты ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich Solutions, Германия
10	Темір(II) сульфаты гептагидраты ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich Solutions, Германия
11	Натрий карбонаты (Na_2CO_3)	Sigma-Aldrich Solutions, Германия
12	Лимон қышқылы	Sigma-Aldrich Solutions, Германия
13	Калийдің дигидрофосфаты (монофосфат калия) (KH_2PO_4)	Fisher Scientific Inc, Дублин, Ирландия
14	Магний(II) сульфаты гептагидраты ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich Solutions, Германия
15	HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$)	Sigma-Aldrich Solutions, Германия
16	TES	Fisher Scientific Inc, Дублин, Ирландия
17	Кальций хлориді дигидраты ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich Solutions, Германия
18	TRIS	Sigma-Aldrich Solutions, Германия

Кесте А.5 – Зерттеу жұмысында қолданылатын жабдықтар

№	Атауы	Өндіруші
1	Камерасы бар микроскоп	CAMV500B, АСС және СЕ стандарттары, Канада
2	CO ₂ газдық ротаметр	RMA-0,063 G, Ресей
3	Термостат	SNOL 67/350, AB Utenos Electrotechnika, Литва
4	Термоциклер	T100, Bio-Rad Laboratories, Inc., Калифорния, АҚШ
5	Ультракүлгін спектрофотометр	UV-2600i, Shimadzu, Токио, Жапония
6	Флуоресцентті микроскоп	Meiji Techno, Канада
7	Жоғары тиімді сұйықтық хроматографы (ЖТСХ)	Agilent, Германия
8	Центрифуга	Жоғары жылдамдықты тоңазытқыш центрифуга Hitachi, Жапония
9	Центрифуга	Centrifuge 5810, Eppendorf, АҚШ
10	Шейкер	BioShaker BR-22FP, Taitec corporation, Сайтама, Жапония
11	Шейкер	AS ONE International, Inc., Санта Клара, Калифорния, АҚШ

Кестесі А.6 – Негізгі шығын материалдары

№	Компоненттер	Өндіруші
1	10 мл виалдар	ИКА, Германия
2	30 мл виалдар	ИКА, Германия
3	1 мл пробирка	Sigma-Aldrich Solutions, Германия
4	1,5 мл пробирка	Хроматек, РФ
5	Крекер	
6	Аргон баллоны	
7	Оттегі баллоны	
8	CO ₂ , N, Ar, O ₂ газ баллондары	
9	Газдық хроматографияға арналған шприцтер	Hamilton компаниясы, Рено, АҚШ

Кесте А.7 – Фотосинтез ингибиторлары

№	Қысқаша атауы	Толық атауы (қазақша)	Көрсетілген өндіруші	Балама өндірушілер
1	СССР	Карбонилцианид 3-хлорфенилгидразон (Carbonyl cyanide <i>m</i> -chlorophenyl hydrazone)	Sigma-Aldrich, Дармштадт, Германия	Tocris (Bio-Techne), Cayman Chemical
2	DBMIB	2,5-дибромо-6-изопропил-3-метил-1,4-бензохинон (дибромотимохинон)	Fisher Scientific Inc, Дублин, Ирландия	Sigma-Aldrich (Merck)
3	DCMU	3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина (диурон)	Sigma-Aldrich, Дармштадт, Германия	TCI Chemicals
4	KCN	Калий цианиді	Himedia, Махараштра, Үндістан	TCI Chemicals

Кесте А.8 – ПТР талдауында қолданылатын праймерлер

№	Прай мер (қысқа)	Ныс ана (target)	Праймердің толық атауы (мағынасы)	Тізбек (5'→3')	Ұзындығы (нт)	G C, %	Tm (°C)
1	2	3	4	5	6	7	8
1	27F	16S rRNA	~27 позициясы маңындағы әмбебап бактериялық тура праймер	AGAGTTTGATCCTG GCTCAG	20	50,0	57,3
2	U149 2R	16S rRNA	~1492 позициясы маңындағы әмбебап бактериялық кері праймер (нұсқа)	GGTTACCTTGTTAC GACTT	19	42,1	52,4
3	785F	16S rRNA	~785 позициясы маңындағы әмбебап бактериялық тура праймер	GGATTAGATACCCT GGTA	18	44,4	51,4

А.8 кестенің жалғасы

1	2	3	4	5	6	7	8
4	149 2R	16S rRN A	~1492 позициясы маңындағы әмбебап бактериялық кері праймер (5'-ұшында қосымша С бар нұсқа)	CGGTTACCTTG TTACGACTT	20	45, 0	55,3
5	M2 3f	16S rRN A	Цианобактерияларға бағдарланған тура праймер (M23)	TGGTTGATCCT GCCAGAGG	19	57, 9	58,8
6	M2 3'f	16S rRN A	Цианобактерияларға бағдарланған тура праймер (M23' нұсқасы)	CGTTTGATCCT GCCGGAGG	19	63, 2	61,0
7	149 2r	16S rRN A	1492R праймерімен бірдей (атауы кері бағыттағы нұсқа ретінде берілген)	GGCTACCTTGT TACGACTT	19	47, 4	54,5
8	152 5r	16S rRN A	~1525 позициясы маңындағы әмбебап кері праймер	AAAGGAGGTG ATCCAGCC	18	55, 6	56,0
9	nif H1 (Zehr)	nifH	Нитрогеназа темір- ақуызы геніне арналған тура праймер (Zehr & McReynolds жиынтығы)	TGYGAYCCNA ARGCNGA	Дегене ративт і	~4 7,5 – 50, 4	46
10	nif H2 (Zehr)	nifH	Нитрогеназа темір- ақуызы геніне арналған кері праймер	ADNGCCATCAT YTCNCC	Дегене ративт і	~4 7,0 – 52, 3	46
11	IG K3	nifH	Әмбебап <i>nifH</i> тура праймері	GCIWTHTAYGG IAARGGIGGIAT HGGIAA	Инози н (I) бар	69, 4–	58
12	pol R	nifH	Poly және т.б. ұсынған <i>nifH</i> кері праймері	ATSGCCATCAT YTCRCCGGA	Дегене ративт і	60, 7–	55