

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И.Сәтбаев атындағы қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

“Химиялық және биохимиялық инженерия” кафедрасы

Ағыбаева Айдана Сәндібекқызы

Сутек биоэнергетикасындағы цианобактериялардың биотехнологиялық әлеуетін
зерттеу

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

5B070100 – «Биотехнология» мамандығы

Алматы 2021


ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И.Сәтбаев атындағы қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

“Химиялық және биохимиялық инженерия” кафедрасы

ҚОРҒАУҒА ЖІБЕРІЛДІ
«ХжБИ» кафедра
меңгерушісі


_____ Х.С Рафикова
«18» мамыр 2021 ж.

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

Тақырыбы: «Сутек биоэнергетикасындағы цианобактериялардың
биотехнологиялық әлеуетін зерттеу»

5B070100 – «Биотехнология» мамандығы

Орындаған



Ағыбаева А.С

Ғылыми жетекші PhD



Қосалбаев Б.Д

Алматы 2021

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Қ.И.Сәтбаев атындағы қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

“Химиялық және биохимиялық инженерия” кафедрасы

БЕКІТЕМІН

Кафедра меңгерушісі
«ХЖБИ» кафедрасы
PhD, ассоцирленген доктор



Рафикова Х.С

“7” желтоқсан 2020 ж.

**Дипломдық жұмысты
орындауға ТАПСЫРМА**

Білім алушы: Ағыбаева Айдана Сәндібекқызы

Тақырыбы: «Сутек биоэнергетикасындағы цианобактериялардың биотехнологиялық әлеуетін зерттеу»

Университет Ректорының 2020 жылғы "24" қараша №2131-б бұйрығымен бекітілген

Аяқталған жұмысты тапсыру мерзімі 2021 жылғы "16" мамыр

Дипломдық жұмыстың бастапқы берілістері: диплом алдындағы практикалық жұмыс қорытындысы, тақырып бойынша әдебиеттерге шолунәтижелері, теориялық мәліметтердің жиыны

Дипломдық жұмыста қарастырылатын мәселелер тізімі:

- а) Коллекциялық цианобактерия штамдарының азотсыз ортада өсу қабілетін анықтау
- ә) Зерттелетін штамдарды қараңғы анаэробты жағдайдағы сутек бөлінісін анықтау
- б) Жарық жағдайында цианобактерия штамдарының сутек бөлу көрсеткіштерін анықтау.

Дипломдық жұмыс 47 бет, 9 сурет, 2 кесте, 92 әдебиеттен тұрады.

Дипломдық жұмысты дайындау
КЕСТЕСІ

Бөлімдер атауы, қарастырылатын мәселелер тізімі	Ғылыми жетекші мен кеңесшілерге көрсету мерзімдері	Ескерту
Кіріспе. Дипломдық жұмысқа бастапқы шолу	15.02.2021	
Негізгі бөлім	27.02.2021	
Практикалық бөлім және зерттеу нәтижелері	09.04.2021	

Дипломдық жұмысының бөлімдерінің кеңесшілері мен нормабақылаушыларының аяқталған жобаға қойған **қолтаңбалары**

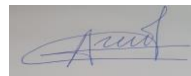
Бөлімдер атауы	Кеңесшілер, аты, әкесінің аты, тегі (ғылыми дәрежесі, атағы)	Қол қойылған күні	Қолы
Норма бақылаушы	Нұрсұлтанов М.Е	31.05.2021	

Ғылыми жетекші



Қосалбаев Б.Д

Тапсырманы орындауға алған білім алушы



Ағыбаева А.С

АҢДАТПА

Бұл жұмыста қараңғыда *Nostoc caldicola* RI-3 цианобактерия штаммы, ал жарық жағдайында *Anabaena variabilis* RI-5 штамын сутегі өндірудің жоғары қабілетіне ие екендігі анықталды. Зерттеу барысында цианобактериялардың *Nostoc caldicola* RI-3 штаммының жасушаларының сутегінің максималды шығуы қараңғылық жағдайында 0,032 мкмоль H_2 /мг хл/сағ құрады, бұл *Anabaena variabilis* RI-5 штамымен салыстырғанда 2,5 есеге жоғары болды. *Spirullina platensis* түрімен сутегінің жоғары өндірісі туралы әдебиеттерде мәліметтер бар. Бұл штамм жарықта және қараңғыда анаэробты жағдайда, 25°C температурада сутекті қалыпты бөледі. Ал *Synechococcus* түрі анаэробты жағдайда, қараңғы ортада сутегіні белсенді түрде шығаратындығы туралы деректер зерттеу жұмыстарында келтірілген.

Біздің эксперименттік мәліметтерге сүйенсек, зерттелген жаңа штамдардың сутектің өндірісі жарықтың болуына байланысты. *Nostoc caldicola* RI-3 және *Anabaena variabilis* RI-5 жасушаларының сутегі бөлінуінің оңтайлы шарты жарықтандырудың болмауында болды, жарықтандырудың болуы сутегі өндірісінің күрт төмендеуіне әкелетіндігі анықталды. Бұл ФЖП-нің тым жоғары активтену себебінен болуы мүмкін. ФЖП-нің активтенуі бағытталған фотосинтетикалық электрондардың әсерінен протондардың молекулалық сутегіне дейін тотықсыздануын катализдейтін гидрогеназа ферменттерінің инактивациясы салдарынан сутегі эволюциясы процесін тежейтін оттегі концентрациясының пайда болуына ықпал етеді.

АННОТАЦИЯ

В данной работе для исследования водорода из коллекции были взяты 3 штамма азотфиксирующих цианобактерий: *Nostoc calsicola* RI-3, *Anabaena variabilis* R-I-5 и *Anabaeba sp.* Z-1. Для отбора штаммов цианобактерий, характеризующихся высокой водородной активностью, проведено исследование по производству водорода с тремя новыми штаммами, выделенными в темных и светлых условиях. Согласно полученным результатам, из 3 коллекционных штаммов цианобактерий *Nostoc Calsicola* RI-3 и *Anabaena sp.* Z-1 показал относительно высокую водородообразующую активность в темноте. Установлено, что наибольшее выделение водорода произошло в штамме *Nostoc calsicola* RI-3. Максимальное накопление водорода в этой культуре наблюдалось после 72-часовой инкубации, которое составило 0,032 мкмоль H₂/мг хл/ч. На свету штамм *Anabaena variabilis* R-I-5 имела активное накопление водорода, активность нитрогеназы была значительно выше на свету, чем у других штаммов. Максимальная скорость накопления водорода этим видом штамма составило 0,012 мкмоль H₂/мг хл/ч. Согласно экспериментальным данным, свет оказал негативное влияние на производство водорода. Для высокопроизводительности водорода через клетки *Nostoc calsicola* RI-3 и *Anabaeba sp.* Z-1 оптимален темничные условия, свет приводит к резкому снижению производства водорода. Хлорофиллы ФС2 могут иметь слишком высокую активность, что вызывает инактивацию ферментов гидрогеназы, катализирует снижение протонов к молекулярному водороду под действием направленного потока фотосинтетических электронов и способствует образованию концентрации кислорода, которая ингибирует эволюцию водорода.

ANNOTATION

For the study of hydrogen production, 3 strains of nitrogen-fixing cyanobacteria *Nostoc calsicola* RI-3, *Anabaena variabilis* R-I-5 and *Anabaeba sp.* Z-1 were taken from the collection. To select cyanobacteria strains characterized by high hydrogen activity, a hydrogen production study was conducted with three new strains isolated under dark and light conditions. According to the results obtained, from 3 collection strains of cyanobacteria *Nostoc Calsicola* RI-3 and *Anabaena sp.* Z-1 showed relatively high hydrogen-forming activity in the dark. It was found that the greatest hydrogen release occurred in the *Nostoc calsicola* RI-3 strain. The maximum accumulation of hydrogen in this culture was observed after 72-hour incubation, which was 0.032 micromol H₂/mg chl/h. In light, the strain *Anabaena variabilis* R-I-5 had an active accumulation of hydrogen, the activity of nitrogenase was significantly higher in light than in other strains. The maximum rate of hydrogen accumulation by this type of strain was 0.012 micromol H₂/mg hl/h. According to experimental data, light had a negative effect on the production of hydrogen. For high-throughput of hydrogen through *Nostoc calsicola* RI-3 and *Anabaeba sp.* Z-1 cells is optimal in dark conditions, light leads to a sharp decrease in hydrogen production. Chlorophylls of PS2 may have too high activity, which causes inactivation of hydrogenase enzymes, catalyzes the reduction of protons to molecular hydrogen under the action of a directed flow of photosynthetic electrons, and promotes the formation of an oxygen concentration that inhibits the evolution of hydrogen.

МАЗМҰНЫ

Кіріспе	9
Негізгі бөлім	12
1 ӘДЕБИЕТКЕ ШОЛУ	12
1.1 Цианобактериялардың клетка құрылысы және морфологиясының ерекшеліктері	12
1.2 Фототрофты микроорганизмдерден сутегі өндірудің әлеуеті	15
1.3 Биосутегі өндірісінің механизмдері	17
1.3.1 Тікелей биофотоллиз	18
1.3.2 Жанама фотоллиз	19
1.3.3 Қараңғы ферментация	19
1.3.4 Фотоферментация	20
1.4 Биосутегіні өндіруге арналған биомасса	20
1.5 Культивирлеу шарттары	22
1.5.1 РН әсері	22
1.5.2 Температура әсері	23
1.6 Сутегі өндірісінің ферменттері	23
1.6.1 Гидрогеназалар	23
1.6.2 Нитрогеназалар	24
2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ	25
2.1 Зерттеу объектілері мен материалдары	25
2.2 Цианобактериялардың түрлік құрамын анықтау	25
2.3 Цианобактериялардың жинақы дақылдарын алу	25
2.4 Цианобактериялардың альгологиялық таза дақылдарын бөліп алу	26
2.5 Цианобактериялардың бактериялогиялық таза дақылдарын алу	27
2.6 Цианобактериялардың клеткаларын сандық есептеу	28
2.7 Цианобактериялардың құрғақ биомассасының мөлшерін анықтау	28
2.8 Цианобактериялардың өсу жылдамдығының коэффициентін анықтау әдісі	29
2.8.1 Цианобактерияларды дақылдау үшін жарық қарқындылығын өлшеу	29
2.8.2 Цианобактерияларды дақылдау үшін көміртегіні өлшеу	30
2.9 Цианобактериялардан сутек алу әдістері	30
2.10 Ацетилен әдісімен нитрогеназаның белсенділігін өлшеу әдісі	32
3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ МЕН ОЛАРДЫ ТАЛҚЫЛАУ	33
3.1 Гетероцисталы цианобактерия штамдарының сутек бөлуін зерттеу	33
3.1.1 Коллекциялық цианобактерия штамдарының азотсыз ортада өсу қабілетін анықтау	33
3.1.2 Зерттелетін штамдарды қараңғы анаэробты жағдайдағы сутек бөлінісін анықтау	35
3.1.3 Жарық жағдайында цианобактерия штамдарының сутек бөлу көрсеткіштерін анықтау	36
Қорытынды	39
Пайдаланылған әдебиеттер тізімі	40

КІРІСПЕ

Әлемдік энергетикалық проблемалар мен қоршаған ортаның өзгеруі - адамзат баласын жаңа энергия көздерін іздеуге мәжбүр ететін екі негізгі тенденция. Микроорганизмдер қазіргі кезде пайдаланатын, көмір, мұнай және газ сияқты отындарды қалыптастыруда басты рөл атқарды. Миллиондаған жылдар бұрын отынның бұл түрлері биохимиялық реакциялар нәтижесінде пайда болған жасушалық органикалық материал болды. Қазіргі уақытта биотехнологияның дамуына байланысты көптеген тірі организмдерді жаңа, арзан және сонымен бірге экологиялық таза энергия көздерін - биоотынның әр түрін алу үшін шикізат ретінде қарастыруға болады [1].

Экологиялық таза отын ретінде баламалардың бірі - биосутекті өндіру. Сутегі - болашақ энергетика саласы үшін экологиялық таза энергия тасымалдаушысы. Микроорганизмдер пайдаланатын энергия көздеріне және электронды донорларға сүйене отырып, сутекті өндіруге арналған микробиологиялық процестерді қараңғы анаэробты сутегі бөлінуі, жарыққа тәуелді сутегі бөлінісі және сутегі мен оттегі бөлінісі деп бөлуге болады, оны жалпы түрде бифототиз деп атайды [2,3].

Сутегі өндірісінде жасыл микробалдырлармен салыстырғанда, цианобактериялар зерттеушілердің назарын көбірек аударуда. Осы түрлердің арасында азот жетіспеушілігі жағдайында сутек бөлетін нитрогеназа ферментін қолданатын жіп тәрізді цианобактерияларға ерекше назар аударылады. Сонымен бірге сутегі азотты фиксациялаудың және оны мочевиінаға айналдырудың қосымша өнімі ретінде өндіріледі, сонымен қатар, нитрогеназа бұл реакция үшін субстрат ретінде АТФ пайдаланады. Осы ферментті қолданатын цианобактерияларда нитрогеназа гетероцисталарда орналасады және осылайша ол оттегінің тежегіш әсерінен қорғалады, оның өте қалың, оттегіні әлсіз өткізгіш қабығы бар, сонымен қатар гетероцисттерде белсенді тыныс алу (сіңіру) бар.

Алайда, цианобактериялар дақылдары арқылы сутегі алудың салыстырмалы түрде жоғары тиімділігі мен ашық жарықта сутегін алу мүмкіндігін көрсететін әдебиеттерге қарамастан, күн энергиясын түрлендіру үшін цианобактериялардың қолданылуын шектейтін мәселелер бар екенін ескеру қажет. Бұл процестің оттегіге сезімталдығына және оттегі мен сутектің бір уақытта бөлінуінен басқа, ең алдымен процестің төмен тиімділігі мен жылдамдығымен байланысты. Осыған байланысты фотосинтетикалық микроорганизмдер арқылы сутегі эволюциясының жылдамдығын арттыруға бағытталған ғылыми зерттеулер қазіргі кезде өте өзекті болып табылады. Ең алдымен, осы саладағы зерттеулер сутегі шығаратын цианобактериялардың жаңа, неғұрлым өнімді штамдарын іздеуге және оларды сутекке айналдырудың тиімділігін арттыру үшін оларды өсіру процесін оңтайландыруға бағытталуы керек [5].

Жұмыстың өзектілігі Қазіргі уақытта биотехнологияның дамуына байланысты көптеген тірі организмдерді жаңа, арзан және сонымен бірге

экологиялық таза энергия көздерін - биоотынның әр түрін алу үшін шикізат ретінде қарастыруға болады. Микроорганизмдер пайдаланатын энергия көздеріне және электронды донорларға сүйене отырып, сутекті өндіруге арналған микробиологиялық процестерді қараңғы анаэробты сутегі эволюциясы, жарыққа тәуелді сутегі эволюциясы және сутегі мен оттегі эволюциясы деп бөлуге болады, оны бифототиз деп атайды. Алайда, цианобактериялар дақылдары арқылы сутегі алудың салыстырмалы түрде жоғары тиімділігімен және ашық жарықта сутегін алу мүмкіндігін көрсететін әдебиеттерге қарамастан, күн энергиясын түрлендіру үшін цианобактериялардың қолданылуын шектейтін мәселелер бар екенін ескеру қажет. Бұл процестің оттегіге сезімталдығынан және оттегі мен сутектің бір уақытта бөлінуінен басқа, ең алдымен процестің төмен тиімділігі мен жылдамдығымен байланысты. Осыған байланысты фотосинтетикалық микроорганизмдер арқылы сутегі эволюциясының жылдамдығын арттыруға бағытталған ғылыми зерттеулер қазіргі кезде өте өзекті болып табылады.

Жұмыстың мақсаты: гетероцистозды цианобактериялардың жаңа штамдарын, белсенді сутек өндірушілерін іздеу. Жұмыста цианобактериялардың 3 коллекциялық штамдарының нәтижелері келтірілген және олардың сутегіні қараңғыда және жарықта өндіру қабілеттері зерттелген.

Диплом жұмысының міндеттері:

а) Коллекциялық цианобактерия штамдарының азотсыз ортада өсу қабілетін анықтау

ә) Зерттелетін штамдарды қараңғы анаэробты жағдайдағы сутек бөлінісін анықтау

б) Жарық жағдайында цианобактерия штамдарының сутек бөлу көрсеткіштерін анықтау.

Зерттеу объектісі: биотехнология зертханасынан алынған коллекциялық цианобактериялардың гетероцисталы үш штамдары *Nostoc caldicola* RI-3, *Anabaena variabilis* RI-5 және *Anabaena sp.* Z-1 зерттелді.

Зерттеу әдістері: Культуралардың оптикалық тығыздығы толқын ұзындығы 720 нм болатын ПД-303 ультрафиолет спектрофотометрінде тіркелді. Культуралды дақылдар 25 ° С температурада 250 мкмоль/м²/с қарқындылығымен 250 мл конустық колбаларда жарықтандырылды. Дақылдардың өсу динамикасы спектрофотометриялық жолмен ПД-303 спектрофотометрінде 750 нм толқын ұзындығында анықталды, өлшеулер әр 24 сағат сайын жүргізілді. Сутегі шығару қабілетін анықтау үшін биомасса алу үшін, штамдар жасанды жарық астында өсірілді (45 мкмоль/м²/с), құрамында 70 мл BG-11 сұйық қоректік ортасы бар шыны түтіктердің үш жағынан жеткізілді. Нитрогеназа белсенділігі ацетилен әдісімен цианобактериялардың ацетиленді тотықсыздандырғыш белсенділік деңгейімен анықталды. Н₂ жинақталуы GC 3210 (GL Science, Жапония) көмегімен өлшенді. Метанол (100%) хлорофилл концентрациясын өлшеу үшін қолданылған, ал супертатенттің сіңіргіштігі 665,2 және 750 нм-де спектрофотометриялық жолмен өлшенген.

Практикалық базасы: Тәжірибелер ҚазҰУ-дың биотехнологиялық

зертханасының коллекциясынан алынған цианобактериялардың үш штаммымен жүргізілді (Алматы, Қазақстан)

Практикада қолданылуы: Бұл ғылыми ақпаратты қосымша зерттеулерден кейін гетероцистозды цианобактериялардың жасушалары арқылы биологиялық сутегіні алу әдістерін жасауда кешенді қолдануға болады.

1 Әдебиетке шолу

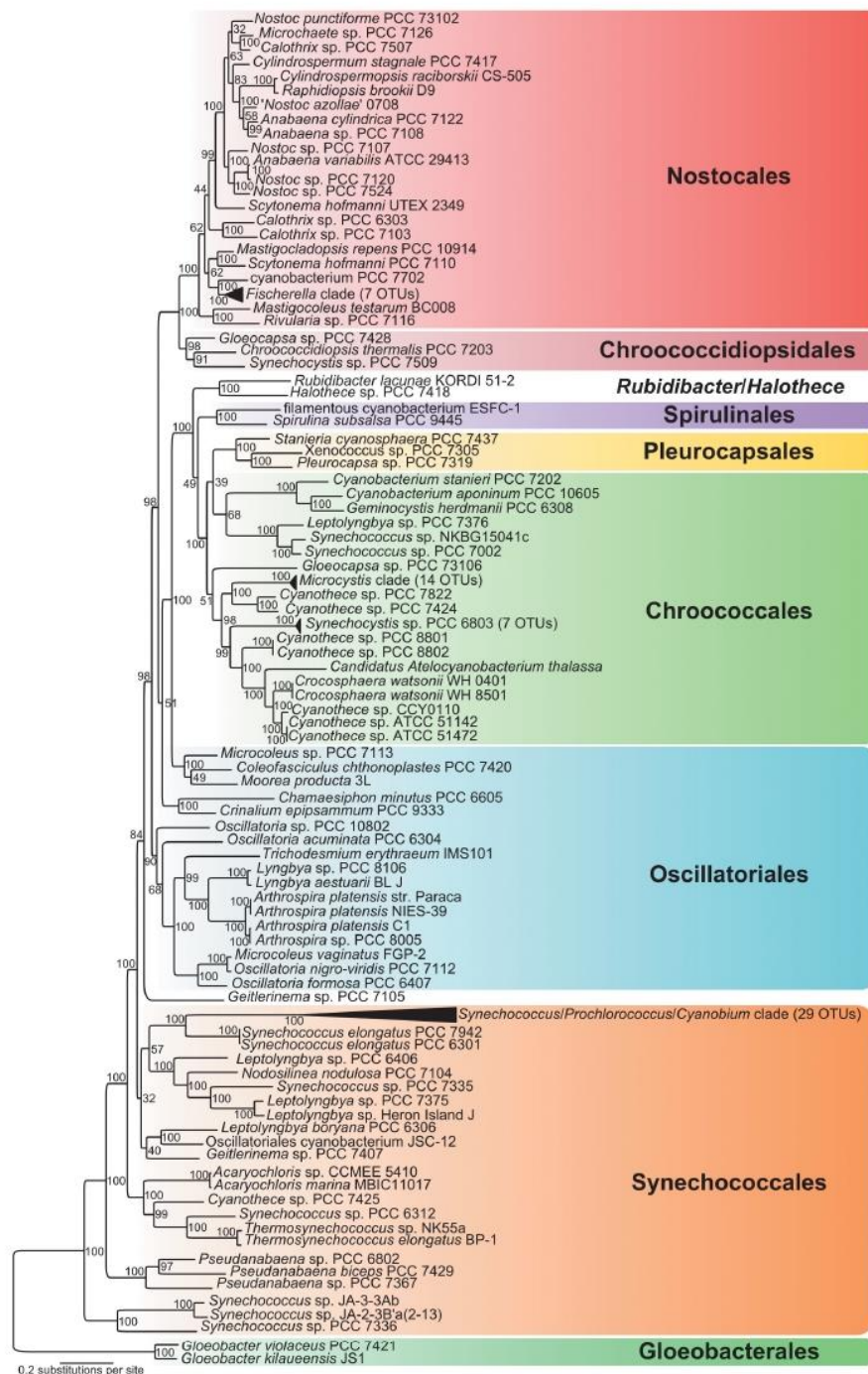
Цианобактериялар – метаболиттік ерекшеліктері негізінде табиғатта кең таралған және топырақ пен тұщы сулардан мұхитқа дейінгі әртүрлі экологиялық аймақтарда өмір сүретін микроорганизмдердің үлкен тобына жатады. Қазіргі таңда цианобактериялардың активті штаммдары қалпына келетін энергия көздерін (биодизель, биосутек, биоэтанол, т.б.) алуда белсенді түрде қолданылады. Цианобактериялар биожанармай алу үшін Күн сәулесінің негізінде жүзеге асатын фотосинтез процесін қолданады және нәтижесінде пайда болған энергияны АТФ және НАДФ түрінде қорға жинап, клеткалардың тіршілігіне қолданады. Солардың ішінде цианобактериялармен биосутек өндіру процесі – осы күнге дейін қалыптасқан әдістердің ең маңыздысы болып табылады. Соңғы таңдағы зерттеулер көрсеткендей, цианобактериялардың барлық түрлері сутек бөлуге қабілетті. Дегенмен, олардың тіршілік ету ерекшеліктеріне сай қалыптасқан морфология-генетикалық айырмашылықтары негізінде сутек бөліну мөлшері мен уақыты әртүрлі болып келеді. Цианобактериялар H_2 молекулаларын екі фермент – гидрогеназа және нитрогеназа белсенділігі арқылы бөліп шығарады. Нитрогеназа – азот фиксациясына жауап беретін, күрделі фермент және олар көбіне гетероцисталарда орналасып, сутек бөлуге қабілеттілік танытады. Ал, гидрогеназа тек қана вегетативті клеткаларда шоғырланып, қарапайым химиялық реакцияны, яғни, протондар мен электрондардан сутек түзілуін катализдейді.

Клеткалардың сутек бөліп шығаруы тікелей биофотоллиз процесіне байланысты болып келеді. Биофотоллиз – бұл суды молекулалық оттегі мен сутекке бөлу үшін биологиялық жүйелерде жарық энергиясы қолданылатын процесс. Ал биофотоллиз процесі пайдаланылатын энергия көзіне байланысты тікелей және жанама деп екі бөлінеді. Тікелей фотоллиз - цианобактериялар клеткалары арқылы фотосинтез негізінде алынған энергияны суды оттегі мен протондарға ыдырату процесі болып табылады. Ал, жанама биофотоллиз – сутегі алу процесі, онда электрондар цианобактериядағы гликоген сияқты сақталған органикалық қосылыстардан алынады. Қазіргі таңда жүргізілген зерттеулер дәлелдегендей, екі түрлі процесс те цианобактериялар үшін маңызды болып табылады, себебі клеткалардың тіршілік етуіне байланысты олардың қабілеттіліктері әр түрлі болып келеді.

1.1 Цианобактериялардың клетка құрылысы және морфологиясының ерекшеліктері

Кез келген тірі организмдердің классификациясын объектілерді сәйкестендіруге ықпал ететін реттілікті сипаттауды қамтамасыз ететін алгоритм ретінде ғана қарастырған жөн. Биологиялық классификацияның міндеті тірі организмдердің ұйымдастырылуы мен эволюциясының заңдылықтарын түсіндіру және барынша объективті таксономияның негізін құрау.

Қазіргі уақытта фенотиптік классификация 16S рибосомалық РНҚ генінде нуклеотидтер тізбегінің қатарын анықтау нәтижесінде әзірленген филогенетикалық классификацияға ауыстырылды (сурет 2).



Сурет 1 - Цианобактериялардың филогенетикалық бұтағы (Komarek бойынша)

Нуклеотидтердің реттілігінен филогения құрылады, оның маңызды ерекшелігі тірі организмдерді үш ірі бұтақтарға бөлу болып табылады: бактериялар – *Bacteria*, архей – *Archaea* және эукариот – *Eukarya* [6]. Табиғи популяцияларға 16S РНҚ бойынша объектілерді сәйкестендіруді қолдану ең аз алуантүрлілік жағдайларында да культурада бар организмдердің генетикалық жағынан ерекшеленетінін көрсетті. Ал бактериялардың табиғаттағы рөлін танып

білу үшін олардың морфо-физиологиялық туыстығы негізіндегі классификациясы табиғи процестердегі бактериялардың функционалдық рөлінің сәйкес келуіне байланысты өте ыңғайлы болып табылады [7].

Тірі әлем жүйесіндегі цианобактериялардың орны туралы мәселенің ұзақ әрі қарама-қайшы тарихы бар. Ұзақ уақыт бойы олар төменгі сатыдағы өсімдіктердің бір өкілі – көк-жасыл балдырлар ретінде қарастырылды, сондықтан жүйелеу ботаникалық номенклатураның Халықаралық кодексінің ережелеріне сәйкес жүзеге асырылды. XX ғасырдың 60-шы жылдары ғана клеткалық ұйымдасуының прокариотты және эукариотты типтері арасындағы айқын айырмашылық анықталған сәттен бастап оларды прокариотты құрылымы бар организмдер ретінде бактериялар тобына жатқызу қажеттігі анықталып, көк-жасыл балдырлардың таксономиялық жағдайын қайта қарау туралы мәселе тұрды [8]. Көк жасыл балдырлар қарапайым прокариоттар екендігі белгілі болды [9]. Сондықтан оларға "цианобактерия" (ЦБ) атауы берілді, цианобактериялар, архебактериялар сияқты органикалық әлем дамуының жеке дербес тармағы болып табылады [10, 11]. Альгологтардың (әсіресе гидробиологтардың) арасында осы күнге дейін бұл организмдер көк-жасыл балдырлар, ал микробиологтар арасында – цианобактериялар деп аталады.

Бактериялардың Берджи анықтағышының таксономиялық сызбасында цианобактериялар бес кіші топтармағына бөлінеді. I және II топтармақтарға клеткалық қабырғаның сыртқы қабатымен немесе гель тәрізді матрикспен біріктірілген бір клеткалық нысандар немесе жасушалардың жіп тәрізді емес колониялары жатады. Әрбір топтармағындағы цианобактериялар өзара көбею тәсілімен ерекшеленеді. III, IV және V топтармақтарына жіпшелі организмдер жатады. Әрбір тармақтың цианобактерияларының клеткаларды бөліну тәсілімен және трихомдардың пішінімен (тармақталған немесе тармақталмаған, бір қатарлы немесе көп қатарлы) ерекшеленеді. Әрбір тармаққа цианобактерияның бірнеше түрі кіреді, сондай-ақ туыстармен қатар, "дақылдар топтары" немесе "туысүсті" деп аталады, олар одан әрі қосымша туыстар қатарына бөлінуі мүмкін [12].

Мысалы, *Cyanothece* (I тармақ) "дақылдар тобы" әртүрлі мекендеу орта жағдайларынан бөлінген жеті зерттелген штаммдарды қамтиды. Жалпы бірінші тармақ тоғыз туыстан тұрады (*Chamaesiphon*, *Cyanothece*, *Gloeobacter*, *Microcystis*, *Gloeocapsa*, *Gloeothece*, *Myxobaktron*, *Synechococcus*, *Synechocystis*). II тармақ алты туыстан тұрады (*Chroococciopsis*, *Dermocarpa*, *Dermocarpella*, *Myxosarcina*, *Pleurocapsa*, *Xenococcus*). III тармақ тоғыз туыстан құралады (*Arthrospira*, *Crinalium*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Oscillatoria*, *Pseudanabaena*, *Spirulina*, *Starrria*, *Trichodesmium*). IV тармаққа жеті туыс кіреді (*Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Scytonema*, *Calothrix*). V тармаққа морфологиялық күрделілігі мен дифференциялаудың жоғары дәрежесімен ерекшеленетін жіпшелі цианобактериялардың он бір туысы кіреді (көп қатарлы жіптер). Бұлар: *Chlorogloeopsis*, *Fisherella*, *Geitleria*, *Stigonema*, *Cyanobotrys*, *Loriella*, *Nostochopsis*, *Mastigocladopsis*, *Mastigocoleus*, *Westiella*, *Napalosiphon* туыстары [13, 14].

Цианобактериялар түрлі экологиялық жүйелерде маңызды рөл атқарады. Олар теңіз, тұзды және тұщы суларды қоса алғанда, су экологиялық нишалар, жартастар мен Арктикада, әсіресе ылғалды жерлерде, шөлдерде кең таралған, оларды ыстық суларда және күшті-сілтілі көлдер сияқты экстремалды жерлерде табуға болады. Цианобактериялардың мұндай кең таралуы, ең алдымен, олардың қолайсыз жағдайлардың әсеріне төзімділігімен және қоректік заттарға талғамайтындығымен байланысты [15, 16].

Цианобактериялар бірінші болып құрлыққа шыққан организмдер болып есептеледі, осылайша басқа эукариотикалық өсімдіктердің өсуі үшін физикалық және химиялық субстратты қамтамасыз етті. Саңырауқұлақпен қауымдастықта, олар тастардың басқа ағзалардың өміріне жарамды топыраққа айналуына ықпал ететін қыналар қалыптастырады [17]. Цианобактериялардың көптеген түрлері белсенді тіршіліктен тыныштық күйге және тыныштық күйден керісінше белсенді күйге тез өтуге қабілетті. Олар ондаған жылдар бойы кептірілген күйде өміршеңдігін сақтайды және субстраттың немесе ауаның ылғалдылығы ұлғайған жағдайда бірнеше минут ішінде белсенді тіршілік процестерін қайта жанданады [18, 19].

Цианобактериялар – фототрофты организмдердің ең кең тобы. Олар қараңғы үңгірлерді, судағы түрлі қатты субстраттарды, биік таулы жартастағы биотоптарды мекендейді [20]. Цианобактериялар температурасы қоршаған ортаға тәуелді емес термалды көздерде де кездеседі. Олар жылы және ыстық су көздерінде және жоғары температуралы 30-дан 80°C-қа дейінгі аралықтағы су қоймаларда кең таралған [21].

Көптеген цианобактериялар сулар мен лайда, лайлы тұнбаларда өмір сүреді және цианобактериялардың кейбір түрлері вулкандардың баурайларын игеруге белсенді қатысады [22].

1.2 Фототрофты микроорганизмдерден сутегі өндірудің әлеуеті

Сутегіні балама түрде өндіруде фототрофты микроорганизмдерді қолдану коммерциялық тұрғыда тиімді, пайдалы болып келеді, сонымен қатар ол жаңартылатын энергия көзіне жатады. Соңғы 10-15 жылда микробтық жасушадан отын алу ғылыми ортада маңызды нысан болып табылады. Болашақта сутегі бізге экологияға байланысты жергілікті мәселелерді шешуге көмектесетін негізгі отын болады. Сонымен қатар сутегіні автомобиль конструкцияларында, авиақұрылыста пайдаланады [23]. Осылайша, сутегіні болашақтың негізгі биоотыны ретінде қарастыруға болады [24, 25]. Сутегін алу үшін күн сәулесін пайдалану жаңартылатын күн энергиясын қолдана отырып, тұрақты энергия өндірудің оңтайлы тәсілі болуы мүмкін. Осылайша, сутектің сутегі мен биомасса энергиясы түріндегі биологиялық өндірісі CO₂ шығарындыларын азайту, қалдықтарды басқару және пайдалы қазбаларды тұрақты биоотынмен алмастыру сияқты бірқатар артықшылықтарға әкеледі [26]. Биосутегі өндірісі физиологиялық және биохимиялық процестерді реттеу үшін жарық көзін қажет етеді [27].

Қазіргі уақытта энергиямен жабдықтаудың жалпы көлемінің 80% - ы және электр энергиясын өндірудің 66% - ы мұнай, көмір және газ сияқты табиғи қазбалы отындарға негізделген [28]. Мұнай мен көмір сияқты табиғи отынды жағу кезінде көмірқышқыл газы пайда болады, ол климаттың өзгеруіне әкелетін парникті газдарды құрайды [29]. Сонымен қатар, бізде қазба отындары жетіспейді және олар бір күні олар таусылады. Табиғатта минералды органикалық қосылыстар немесе көмір, мұнай және табиғи газ сияқты қазбалы отын түрінде миллиондаған жылдар бойы биологиялық және биологиялық емес процестерде жинақтады [30]. Балдырлардың биомассасы сапалы газдар мен дәрі-дәрмектер алу үшін қолданылады. Сонымен қатар, балдырлардың су биомассасын табиғи балдырлардың гүлденуінен алуға болады, ол сутегі өндірісінің субстраты ретінде қарастырылады [31]. Сутегі таза отын түріне жатады және экологиялық таза [32,33], жаңартылатын энергия көзі және энергияның ең жоғары үлесі бар әлеуетті үміткер нысан ретінде қарастырылады. Ол барлық басқа белгілі отын түрлерінің арасында көптеген техникалық, әлеуметтік-экономикалық және экологиялық артықшылықтарға ие. Сонымен қатар, бұл электр энергиясын өндіру үшін отын ұяшықтарында қолданылған кезде көмірқышқыл газын жанама өнім ретінде шығармайтын жалғыз белгілі отын [34]. Электролиз, фотолиз немесе биодидор өндірісі сияқты сутекті алудың бірнеше басқа әдістері мен көптеген операциялары бар [35].

Сутегіні алу үшін биосутек көздерін таңдау өте маңызды қадам болып табылады [36]. Цианобактериялар мен микробалдырлардың биомассасының жинақталу жылдамдығы өсімдік биомассасына қарағанда жоғары. Алайда, балдырлар биомассасының өсуінің маңызды бөлігіне фотобиореактордың (ККЖ) арнайы түрін таңдауды қажет етеді [37]. CO₂ газын тиімді пайдалану-балдырлар мен цианобактериялардың штаммдарының қосымша артықшылығы болып табылады. Ғылыми қауымдастық балдырларды биоотын өндірісі мен басқа да өндіріс үшін ең перспективалы объект ретінде таниды, алайда олардың әлеуетін кеңінен пайдалану үшін әлі де терең зерттеулер қажет етіледі [38]. Цианобактериялар мен жасыл балдырлар сияқты микроскопиялық микроорганизмдерді араластырудан алынған экологиялық пайдалы отын ретінде қарастыруға болатын бірнеше балама отын бар. Балдырлардың жасушалары цианобактериялардан қоршаған орта факторларынан қорғайтын жасуша қабырғаларымен ерекшеленеді [39]. Цианобактерияларда целлюлозадағы сияқты жасуша қабырғасы болмайды. Цианобактериалды биосутек азот ферменттері жүргізетін жарыққа тәуелді реакциялар нәтижесінде пайда болады, кейде оны қараңғы анаэробты жағдайда сутегі ферменттері жүргізе алады, ал жасыл балдырлар мен цианобактерияларда сутегі фотосинтетикалық түрде пайда болады [40].

Ластанған судан қоректік заттарды алып тастаудың әдісіне-алгинат сұйықтықтарындағы балдырлар мен цианобактериялардың жасушаларын иммобилизациялау жатады, бұл үнемді механизм және тиімді нәтиже береді. Сонымен қатар, микробалдырлар мен цианобактериялардың иммобилизациясы синтетикалық мутуализмді құру және зерттеу құралы ретінде қолданылады [41].

Ең маңыздысы, жасушаларды иммобилизациялау әдісі бес түрлі түрге бөлінеді: аффиндік иммобилизация, сұйық эмульсияға түсіру, жартылай өткізгіш мембрананың артына түсіру, коваленттік байланыс адсорбциясы [42].

Микробалдырлар биосутегіні көп көлемде өндіретін арнайы биореакторларды қажет етеді[43]. Жаңа биореактор жобасының дамуына әсер ететін негізгі факторлар резервуардың тереңдігі мен ауырлық күші болып табылады [44].

1.3 Биосутегі өндірісінің механизмдері

Табиғаттағы ең көп таралған элементтердің бірі-сутегі [45]. Алайда сутегі молекулалары суда және қазбалы отында жиналады. Жыл сайын шамамен 55 миллион тонна сутегі өндіріледі, ал оны пайдалану жылына шамамен 6% өседі және оның өсімі 10% жетуі мүмкін. Сутегі өндірісі көптеген әлемдік өнеркәсіптік компаниялардың қызығушылығын тудыруда. Қазіргі уақытта бірнеше әлемдік өнеркәсіптік компаниялар пайда табу үшін сутегі өндірісіне үлкен қызығушылық танытуда, өйткені 1 кг H₂ шамамен 1,25 доллар тұрады, оны күн энергиясын немесе арзан электр энергиясы өндірілетін судың электролизі арқылы алуға болады. Энергия тұрғысынан бұл өндіріс 1 кг сутегі 3,8 л бензин энергиясына тең келеді[46].

Биофотоллиз-бұл әр түрлі биологиялық протоколдар арасында таза сутегі алудың перспективалық тұжырымдамаларының бірі, өйткені су жалғыз қажетті субстрат болып табылады, ал сутегі алу метаболикалық көміртек жолдарымен байланысты емес [47](сурет. 1). Қазіргі уақытта биологиялық сутекті алудың төрт әдісі бар және микроорганизмдердің әр түрі үшін тиісті әдістер қолданылады. Қалай болғанда да олардың кейбір артықшылықтар мен кемшіліктер бар .

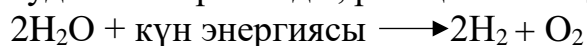
Кесте 1 - Тікелей және жанама биотоллизбен сутегі өндірісін салыстыру

Процесс	Артықшылықтары	Кемшіліктері
Тікелей биофотоллиз	Жоғары теориялық тиімділік Субстратқа қоректік заттарды қосудың қажеті жоқ Су субстрат, ал Күн энергиясы энергия көзі болып табылады. АТФ қажет емес	Оттегі сезімтал гидрогеназаның жанында оттегі бөлінуі Гидрогеназа ферменттерінің O ₂ -ге сезімталдығы O ₂ арқылы тежелу. Жарықты түрлендірудің төмен тиімділігі
Жанама биофотоллиз	H ₂ O-дан H ₂ өндіре алады Қарапайым механизм және арзан Микроорганизмдер қарапайым минералдары бар ортада өседі	Жоғары энергия шығыны Жарықтандыру қажет АТФ қажеттілігі Жоғары энергия шығыны
Фотоферментация	O ₂ аз бөлінеді Ұзын жарық спектрін пайдалану мүмкіндігі Қалдықтардан алынған органикалық субстраттарды тұтыну мүмкіндігі	Күн энергиясын түрлендірудің төмен тиімділігі Үлкен ауданы бар анаэробты фотобиореакторлар қажет Жарық қажет

	Жарықтың кең спектрін қолдану мүмкіндігі	
Қараңғы ферментация	О ₂ -ге тәуелді емес (анаэробты процесс) Ол коммерциялық құндылығы бар органикалық қышқылдары бар жанама өнімдер шығарады Субстрат ретінде көміртегі көздерінің алуан түрлілігі	Құрамында Н ₂ және СО ₂ , сонымен қатар СН ₄ , Н ₂ С және СО бар биогаз шығарады; Ашытудың қалған бөлігі ластануды болдырмау үшін өңделуі керек.

1.3.1 Тікелей биофотоллиз

Тікелей биофотоллиз өсімдіктер мен балдырлар жасушаларында болатын фотосинтез процесіне ұқсас. Бұл әдіс биологиялық және химиялық процесстердің жиынтығы, ол күн энергиясын молекулалық сутегі түрінде химиялық энергияға айналдыру мақсатында микробалдырлардың фотосинтез жүйесін қолдана отырып, БиоН₂ тікелей судан шығара алады, реакция төменде келтірілген [48]:



Анаэробты жағдайда биогидроген өндіретін жасыл балдырлар, мысалы *Chlamydomonas reinhardtii*, Н₂ түзе алады немесе Н₂ электронды донор ретінде қолдана алады [49]. Төмендетілген ферредоксин(Fd) гидрогеназа ферменті (Н₂ase) сутегі алу үшін су биофотолизи деп аталатын процесте электронды донор ретінде әрекет етеді. Осы процестің соңына қарай су мен отын протондары сутегі газына айналады [50]. Гидрогеназа ферменті 2-суретте көрсетілгендей сутегі алу үшін Fd-ден электрондар алады.

Фотосинтездің екі процесі бар: фотожүйе I (ФЖI)-СО₂ тотықсызданады, және фотожүйе II (ФЖII) -суды бөліп, оттегі молекулаларын шығарады. Биофотоллиз процесі кезінде судан екі фотон түзіледі: гидрогеназа қатысуымен сутегінің түзілуі немесе СО₂-нің ФЖI-де қалпына келуі. Барлық жасыл өсімдіктерде гидрогеназаның болмауына байланысты тек СО₂ төмендеуі мүмкін. Бұл процесс кезінде 2ші фотожүйе Күн жүйесінен жарық энергиясын сіңірген кезде су электрондары пайда болады. Содан кейін электрондар күн энергиясы арқылы Fd компонентіне ауысады [51].

Гидрогеназа ферменті оттегі молекулаларына сезімтал болғандықтан, сутегі өндірісін тұрақты ұстау үшін оттегінің мөлшерін 0,1% деңгейінде ұстау керек. *Chlamydomonas reinhardtii* жасыл балдырлары тотығу тыныс алу кезінде оттегі молекулаларын ұқсас жұмысты көрсетті. Алайда, бұл процесс кезінде ингаляциялық және тұтынылатын субстраттың көп мөлшеріне байланысты ол төмен тиімділікті көрсетеді. Жақында микробалдырлар мен цианобактериялардан алынған мутанттардың О₂ шығаруға жақсы қабілеті бар екендігі анықталды, сондықтан сутегі өндірісі жоғарылады [52].

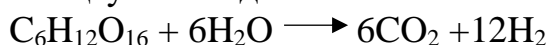
Цианобактериялар мен микробалдырлар фотосинтез үшін жарықты қолдана алады, өйткені оларда хлорофилл (Chl) және фотосинтетикалық жүйелер(ФЖII және ФЖI) бар [53].

1.3.2 Жанама фотолиз

Микробалдырлар мен цианобактериялар жанама биофотолизі кезінде сақталған гликоген мен крахмалдан сутегі бөлініп шығарады. Бұл процесс екі кезеңнен тұрады. Біріншіден, көмірсулар синтезі жарық астында жүреді. Екіншіден, сутегі көмірсулардан фотоферментация арқылы түзіледі [54]. Балдырларды жанама биофотолиз арқылы сутегі өндірісі фотонды түрлендіруді жақсартуға болатын болса, жүзеге асырылмақ. Фотосинтездің тиімділігін арттыру қарапайым мәдени өсімдіктер үшін өте қиын (3-сурет).

Жасыл балдырлармен сутегі өндіру әдісінің басты артықшылығы-жасуша өсуінің қараңғы кезеңдерінде көміртектің тұрақты көзінің болуы. Бұл жасыл балдырларды қараңғы ферментацияға (ҚФ) ықпал ететін қараңғы тыныс ретінде де суреттеуге болады [55].

Цианобактериялармен жанама биофотолиз нәтижесінде сутектің түзілуін келесі реакциялар арқылы байқауға болады:



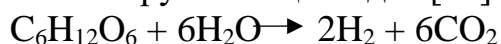
1.3.3 Қараңғы ферментация

Биосутектің қараңғы ферментативті өндірісі үнемді және экологиялық таза процесі қамтамасыз етеді [56]. Бұл бактериялардың әртүрлі топтары анықталған, анаэробты ауысу сияқты бірнеше сатылардан тұратын, биохимиялық реакциялар жиынтығын білдіретін процесс. Қараңғы ферментацияда негізінен анаэробты бактериялар қолданылады, дегенмен жеңіл энергияны қажет етпестен көмірсуларға бай субстраттарда өсірілген кейбір балдырлар қолданылады (4-сурет).

Сутегі газын өндіруге арналған биологиялық қараңғы ферментация өте тартымды, өйткені бұл процесс жаңартылатын және көміртекті бейтарапқа айналдырады [57]. Алайда, әртүрлі улы немесе шамадан тыс қосылыстар тұрақты процесі және биотехнология саласын кеңінен тануды едәуір шектейді, ал қазіргі уақытта ҚФ процесі сутегі өндірісінің төмен өнімділігіне байланысты кең таралмады [58].

ҚФ жүйесіндегі микробтардың метаболизмі- артық субстрат, микроэлементтер, макроэлементтер, металл иондары, жоғары температура, қышқыл рН, органикалық қышқылдар, бәсекелес микробтар және субстраттың улы заттары сияқты бірнеше химиялық компоненттерден тұрады. Тежеуді басқару бойынша инженерлік перспективалар қамтамасыз етіледі.

Қараңғы ферментация арқылы жарыққа тәуелсіз сутегі өндірісі әдетте жоғары жылдамдықпен жұмыс істейді. ҚФ сутегі көміртек көзі ретінде әр түрлі қалдықтардан өндіріледі және негізінен басқа ұшпа май қышқылдарымен бірге сірке және май қышқылдарын шығарумен аяқталады [59]:



1.3.4 Фотоферментация

Фотоферментация-бұл фотосинтетикалық микроорганизмдердің әртүрлі тобындағы органикалық субстраттың сутекке ферментативті айналуы. Фотоферментация биосутек [60] өндірісі үшін жоғары тәуекелсіз ең тиімді режимдердің бірі ретінде ұсынылған. Бұл жұмыста биосутек өндірісін модельдеу фотоферментация әдісімен ұсынылған. Электрондар 2-фотожүйеде фотохимиялық тотығу арқылы судан бөлініп, [Fe]- гидрогеназаға өтіп, тікелей биофотоллиз процесінде сутектің фотосинтетикалық түзілуіне әкеледі [61] (5-суретті қараңыз).

Сутектің микробтық өндірісінің негізгі процесі пируваттық анаэробты метаболизммен анықталады, ал пируваттың деградациясы теңдеулерде көрсетілген екі ферменттік жүйенің бірімен катализденеді.:



1.4 Биосутегіні өндіруге арналған биомасса

Бүгінгі таңда биосутегіні жаңартылатын ресурстардың биомассасынан қазбалы отынның энергиясын пайдаланбай алуға болатындығы белгілі [62]. Биомасса-тірі немесе жақында тірі организмдерден алынатын жаңартылатын энергия көзі. Цианобактериялардың, балдырлардың және өсімдіктердің биомассасы фотосинтез процесінде CO₂-нің атмосфералық немесе суда еруі нәтижесінде пайда болады [63]. Биомасса сутекпен қамтамасыз етудің негізгі энергия көзі болып саналады және оны бірқатар биологиялық және химиялық әдістермен нәтижелі түрде энергияға айналдыруға болады. Биосутегінің перспективалы көзі-балдырлар биомассасының конверсиясы, ол мол, таза және жаңартылатын. Биоэтанол және биодизель сияқты басқа жақсы дамыған биоотын түрлерінен айырмашылығы, балдырлар биомассасынан сутегі өндірісі әлі де дамудың алғашқы сатысында екендігінде. Балдырлардан сутегі алудың әртүрлі технологиялары, сонымен қатар бірнеше зерттеу орындары мен ауқымды жүйелері бар, олар толық көлемде іске асырудың жақсы әлеуетін көрсетті [64]. Балдырлардың көптеген түрлері қолайлы жағдайларда сутегі шығара алады. Тұщы немесе тұзды суда өмір сүретін цианобактериалды және микробалдырлар фотосинтез арқылы көмірқышқыл газын, су мен күн сәулесін биомассаға айналдыра алады. Микробалдырлардың өсу қарқыны мен май мөлшері макробалдырларға қарағанда тезірек және жоғары. Сонымен қатар, олар макро балдырларға қарағанда күрделі құрылымға ие. Биоотынның әртүрлі формаларын суретте көрсетілгендей әртүрлі жолдармен микробалдырлардың биомассасынан алуға болады.

Балдырлар биомассасының құрылымы олардың түрлеріне байланысты тез өзгертіндіктен, зерттеулер балдырлар мен цианобактериялардың штаммдарына сәйкес жинақталады және тізімделеді. Шамасы, микробалдырлардың компоненттері макробалдырлардың биомассасына қарағанда пайдалы субстрат болып табылады. Микробалдырлардың биомассасы макробалдырларға қарағанда қарапайым құрылымға ие, сондықтан қарапайым алдын-ала сауықтыруды қажет

етеді. Сонымен қатар, микробалдырларды әртүрлі жағдайларда өсіруге болады және оларды алу оңай [65].

Микроорганизмдерден сутегі өндірісін жақсарту бойынша зерттеулердің көпшілігі штамдардың генетикалық жақсартылуына негізделген. 2-кестеде сутегі өндірісіне қатысатын көптеген микроорганизмдер түсіндіріледі. Соңғы биоэнергетикадағы жетістіктер фототрофты организмдермен жүргізіліп жатқан зерттеулердің нәтижесінде дамып келеді. Микроорганизмдердің кейбір түрлері қолайлы жағдайларда биосутек өндіре алады. Микробалдырлар, цианобактериялар (гетероцисто түзетін цианобактериялар, жіп тәрізді гетероцист емес цианобактериялар және бір клеткалы цианобактериялар) және күлгін бактериялар биомассадан биосутегі шығара алады. Микробалдырлар мен цианобактериялардың түрлері гидрогеназа және нитрогеназа ферменттерінің көмегімен биосутегі шығарады. Цианобактериялар-эукариотты жасыл балдырлар сияқты оттегі фотосинтетикалық белсенділігі бар прокариоттар. Оларда тек Chl а бар, Chl В жоқ, ал негізгі антенналар-фикобилиндер деп аталатын пигментті ақуыз кешендері болып табылады[66].

Күлгін бактериялар грам-теріс қызғылт және күлгін-қоңыр бактериялар тобын құрайды, оған суды электронды донор ретінде қолдана алмайтын ФЖІІ түріне кіреді, ал цианобактериялар, балдырлар және жер өсімдіктері сияқты организмдер ФЖІІ қамтиды (2-кестені қараңыз).

Кесте 2 - Сутегі өндіруші микроорганизмдер

Микроорганизм	Штамдардың түрі	Жұмыс режимі
<i>Calothrix</i> sp. 336/3	жабайы типтегі	Анаэробты ашыту
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	Д. хм Lmutant	Фото ашыту
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> CC-124	Күкіртсіз	Анаэробты ашыту
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Stm6	жабайы түрі	Фото ашыту
<i>Scenedesmus obliquus</i>	жабайы түрі	Фото ашыту
Хлорелла вульгарисі	жабайы түрі	Қараңғы ашыту
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 <i>Spirulina</i>	Иммобилизацияланған	Анаэробты ашыту
<i>Platensis</i>	жабайы типтегі	Анаэробты ашыту
Хламидомоналар MGA 161	жабайы типтегі	Қараңғы-ашыту
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Күкіртсіз	Қараңғы ашыту
<i>Anabaena</i> sp.	азоттан айыру	Анаэробты ашыту
<i>Anabaena siamensis</i> TISIR 8012	жабайы түрі	Анаэробикаментация
<i>Nostoc</i> PCC 7120,	хм Wmutant	Анаэробты ашыту
<i>Clostridium butyricum</i> CWBI10	қатаң анаэробты штамм	Анаэробты ашыту
<i>Clostridium pasteurianum</i> (MTCC116)	жабайы түрі	Қараңғы ашыту

1.5 Культивирлеу шарттары

Сутегі алу процесі рН, қоректік заттар, температура және субстрат концентрациясы сияқты бірнеше факторлардың қолайлы жағдайында жүреді. *BioH2* өндірісінде қолданылатын жоғары технологиялық фотобиореакторлар осы факторларды қамтамасыз етеді.

Культураның жай-күйі зерттеушілер ғылыми салаларда қолданатын балдырлар мен цианобактериялардың түрлерін қолдана отырып, өнімді биосутегі алудың негізгі факторы болып табылады. Соңғы уақытта микробиологиялық нысандар биосутегінің өнімділігін арттыруға байланысты әртүрлі культуралды жағдайларда және вариацияларда өсірілгені туралы бірнеше қызықты мақалалар жарияланды [67]. Культураның жай-күйі биосутегі өндірісінің ең әсер етуші факторы болып табылады. Ферментация процесінде азот, фосфат және басқа бейорганикалық микроэлементтер сутегі өндірісі үшін қажетті қоспалар болып табылады. Лин және т. б. Ғалымдар микроэлементтердің көміртегіге әсерін зерттеді, ал *Yoko* және т.б органикалық азот бейорганикалықпен салыстырғанда сутектің бөлінуіне қолайлы болып табылатынын анықтаған.

1.5.1 рН әсері

Сутегі өндірісіне әртүрлі факторлар әсер етеді және олардың маңыздысының бірі- рН әсері. Соңғы зерттеулерге сәйкес рН оңтайлы мәні 5-тен 7-ге дейін болды. рН әсері барлық реакциялармен байланысты биосутегі өндірісінің негізгі химиялық параметрлерінің бірі болып табылады. Ол микроорганизмдердің ферментативті механизмінің тиімділігін басқарады және жасушалардың тотығу потенциалында, жасуша алмасуында маңызды рөл атқарады [68].

Алайда кейбір иммобилизацияланған цианобактериялар, мысалы *Synechocystis* sp. PCC 6803 үшін рН-тың бастапқы мәні 7,4 болғанда ғана жоғары өнімді сутегі шығарады. Трошинаның және т.б зерттеулері бойынша *Gloeocapsa alpicola* цианобактериясынан биосутегіні алуды рН мәнін 6,8 және 8,3 арасында сақтау арқылы оңтайландырылған. Фан және т.б. CSTR глюкозадан биогидроген өндіруді рН әсері 4,0-7,0 диапазонында зерттеген және рН мәні 5,5 кезінде пайда болатын сутектің оңтайлы шығымы дәлелденген.

1.5.2 Температура әсері

Қолайлы температура сутегі синтезінің оңтайлы метаболикалық жолдарын, сондай-ақ сутегі тұтыну процестерін тежейтін негізгі параметр болып табылады. Анаэробты процестерге температура қатты әсер етеді және биологиялық сутегі өндірісі үшін қолайлы және қолайсыз температура туралы айтарлықтай келіспеушіліктер бар. рН әсеріне ұқсас, температура ферментативті реакциялар арқылы метаболизмді де басқарады. Әрбір ферменттің жоғары белсенділік байқалатын оңтайлы температуралық диапазоны бар[69].

Миннан және т.б. культураның 25 ° С-тан 35 ° С-қа дейінгі әртүрлі температурада сутегі өндіру қабілетін зерттеді және олар сутегі өндірісінің белсенділігін жақсартты.

1.6 Сутегі өндірісінің ферменттері

Биологиялық әдістермен катализделген сутегі гидрогеназа және нитрогеназа сияқты екі ферменттің көмегімен жүреді.

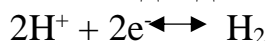
1.6.1 Гидрогеназалар

[FeFe]-гидрогеназалар темір мен күкірттің ерекше коэффициенттеріндегі молекулалық сутектің сіңуін және шығарылуын катализдейді. H₂ босату реакциясында электрохимиялық артық потенциалдың болмауы [FeFe]-гидрогеназаны биокатализдің тиімді мысалы етеді, сондай-ақ гидрогеназалар нитрогеназалар сияқты оттегіге де сезімтал [70].

Гидрогеназа ферменттерінің тіршілігі оттегінің төмен концентрациясында қысқа. Тек сутегі өндірісіне жоғары сезімталдығы бар модификацияланған гидрогеназа коммерциялық сутегі өндірісін жүзеге асыруға мүмкіндік береді.

Гидрогеназалар-бұл сутегі өндірісі мен тұтынылуын катализдейтін ферменттер. Микроорганизмдер жасушаларында гидрогеназалар 1930 жылдары табылған, бірақ олардың молекулалық құрылымдары жиырма жыл бұрын ғана белгілі болды [71]. Жасыл микробалдырлар мен цианобактериялық гидрогеназалар ферменттердің әртүрлі тобы болып табылады. Гидрогеназаның үш түрлі тобы бар, олар [FeFe]- гидрогеназа, [NiFe] - гидрогеназа және [Fe]-гидрогеназа.

Гидрогеназа келесі реакцияны катализдейді:



[FeFe]-гидрогеназа H₂ түзілуін немесе сутектен босатылған протонды катализдей алады. Ол ядродағы *hydA* геномымен шифрланған, сонымен қатар фермент пісіп болғаннан кейін хлоропласттардың ішінде локализацияланады [72]. Тек эукариоттарда табылған [FeFe]-гидрогеназалар ақуызбен байланысқан. Қазіргі уақытта бұл ақуыз цитоплазмалық күкірт кластерінің биосинтезінде немесе репарациясында маңызды рөл атқарады деп саналады және тәжірибе көрсеткендей, [FeFe]- 2Fe субкластері жоқ гидрогеназаға ұқсайды.

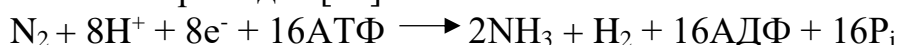
[NiFe]-гидрогеназа көптеген гидрогеназа шығарады. Цианобактериялардың құрамында [NiFe]-екі бағытты сіңіру процестері мен гидрогеназа ферменттері үшін қажетті гидрогеназалар бар [73]. [NiFe]-гидрогеназа үлкен (~34 кДа) және кіші (~64 кДа) бөлімшелерден тұрады. Сутегі молекуласын байланыстыратын және ыдырататын белсенді аймақ [NiFe] үлкен субунитеттің ортасына орнатылады, оны сутегі арнасы да қолдайды, ол арқылы H₂ газы белсенді орталыққа өтеді [74]. Шағын бөлім 3 кластерден тұрады [FeS]. Электрондар [NiFe] аймағынан [FeS] кластерлері арқылы дистальды кластерге [FeS] ауысады, онда олар электронды акцепторға өтеді [75].

Ферменттің жаңа белгілі гомодимері [Fe] кейбір метаногендік археаларда табылды және ол әлі де зерттелуде. [Fe]-гидрогеназа құрылымы жағынан да, белсенділігі жағынан да қолайлы. Белсенді аймақ [Fe]-гидрогеназа құрамында бір цистеин күкірт, екі цис-бағытталған СО және гуанилилпиридинол бидентатты лиганд бар бір ғана Fe аймағы бар фермент болып табылады [76].

1.6.2 Нитрогеназа

Нитрогеназа планетадағы ғаламдық азот циклінде шешуші рөл атқарады және диазотрофтар деп аталатын микроорганизмдер тобына жататын нитрогеназа атмосфералық динитрогеннің (N₂) нуклеотидке тәуелді процесте биожетімді аммиакқа (NH₃) қалпына келуін катализдеуге қабілетті. Нитрогеназа инертті үштік қатынастарды үзу қабілеті $n|n$ қоршаған орта жағдайында биологиялық операция арқылы азоттың жеткілікті мөлшерін өндіруге мүмкіндік беріп қана қоймайды, сонымен қатар нитрогеназа химиялық энергия тұрғысынан тиімді нысан болып табылады және ол соңғы он жыл ішінде қарқынды зерттеу тақырыбы болып қала береді [77,78].

N₂аза кейбір микроорганизмдерде, соның ішінде бактериялар мен архейлік тіршілік домендерінде табылды және ол барлық N₂ биохимиялық бекітуді катализдейді, дәлірек айтсақ, ғаламдық азот биогеохимиялық циклі N-нің 60% - ы N₂-ден N₂-ге шығарылады. [79].



Үш гомологиялық гидрогеназа анықталды, атап айтқанда молибден (Mo), ванадий (V) және темір (Fe)-тек гидрогеназалары [80].

Соңғы зерттеулер көрсеткендей, Mo нитрогеназа қос және үштік байланысы бар кішкентай молекулалардың санын азайтуға қабілетті [81]. V-нитрогеназа CO₂-ны CH₄, C₂ және C₃ көмірсутектеріне дейін төмендетуге қабілетті. Соңғы уақытта *in vivo* және *in vitro* Fe нитрогеназасын зерттеу көрсеткендей, бұл фермент CO₂-нің үш нитрогеназадан CH₄-ке дейін төмендеуін көрсетеді.

2 Зерттеу материалдары мен әдістері

2.1 Зерттеу объектілері мен материалдары

Зерттеу жұмысының объектісі ретінде коллекциялық (ССМКазНУ) *Anabaena* sp. Z-1, *Anabaena variabilis* R-I-5, *Nostoc caldicola* RI-3 алынды. Зерттеу материалы 1-2 м тереңдіктен 3-5 нүктеден алынды, содан жалпы сынама шығарылды. Сынама 13 сағат аралығында арнайы салқындатқыш сөмкеде (НПФ-Медтехника, РФ) +6° - +8°С температурада тасымалданды және +4° - +6°С сақталынды.

Жұмыс әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университетінің биология және биотехнология факультеті биотехнология кафедрасының «Микробиология» зертханасында жүргізілді. Заррука, BG-11, №6, Аллен, қоректік орталары қолданылынды.

Заррук қоректік ортасы – спиролина сияқты жішелі цианобактерия түрлерін өсірудің негізгі стандартты ортасы болып табылады.

BG-11 ортасы - цианобактериялардың қатысуымен жүргізілетін зерттеулерде негізгі орта болып табылады. Ол негізінен тұщы су ағзалары немесе жоғары иондық күшті қажет етпейтін теңіз ағзалары үшін қолданылады. Оны топырақтан шыққан кейбір организмдер үшін де қолдануға болады. Бұл ортаның туындыларына азот жетіспеушілігімен өсіру үшін қолданылатын BG-11(N -) кіреді, мұндай жағдайлар цианобактерияларда РНА жиналуына тән. Фосфатпен шектелген орта, BG-11(P -) цианобактерияларда РНА жиналуына байланысты зерттеулерде қолданылды.

Аллен қоректік ортасы – цианобактерияларды дақылауға арналған универсалды қоректік орта болып табылады.

Дақылдау жұмыстары Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық университетінде, Биотехнология лабораториясында арнайы дақылдау камераларында жүргізілді. Дақылдау камерасының температурасы 25°С болды. Жарық 12 сағат қараңғы және 12 сағат жарық режимі бойынша берілді.

2.2 Цианобактериялардың түрлік құрамын анықтау

Әр түрлі табиғи орталардан алынған цианобактериялардың сынамаларының түрлік құрамын анықтау үшін келесі анықтағыштар қолданылды: КСРО тұщы су балдырларының анықтағышы, 1-14 том, 1951; Орта Азияның протококкалы балдырларының анықтағышы, 1976; Орта Азияның көк- жасыл балдырларының анықтағышы, 1-2 том; Орта Азияның протококкалы балдырларының анықтағышы, 1-2 том, 1988; КСРО протококкалы балдырларының анықтағышы, 1951; Орта азияның көк-жасыл балдырларының анықтағышы, 1-3 том, 1987; Орта Азияның көк-жасыл балдырларының анықтағышы, 1987; Хлорококкалы балдырлардың қысқаша анықтағышы Укр., КСРО, Киев, 1990.

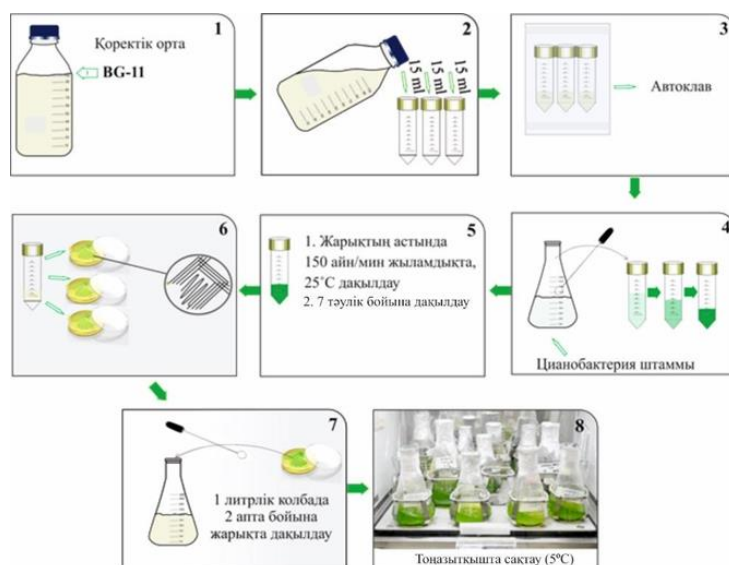
2.3 Цианобактериялардың жинақы дақылдарын алу

Әр түрлі экожүйелерден бөлінген сынамалардан жинақы дақыл алу мақсатында алынған үлгілер залалсыздандырылған сұйық қоректік ортасы бар түтіктерге ауыстырылды. Пробирканың ішіндегі қоректік орта $\frac{1}{2}$ мөлшерде құйылды. Қоректік ортаға салынған үлгілердің жарықтандырылуы люминесцентті лампалар арқылы 50-200 мкмоль фотон/м²/сек қарқындылықта жүргізілді.

Цианобактериялардың жинақы дақылдарын алу үшін BG-11, Громов, Прата және Z1 қоректік орталары қолданылды. Сонымен қатар, BG₀-11 және Заррука модификацияланған қоректік орталары пайдаланылды. Заррука қоректік ортасында тек тұзды аймақтан алынған цианобактерия түрлерін өсірілді. Зерттелетін штамдардың белсенді өсу көрсеткіштерін анықтау үшін альгологиялық-бактериялогиялық таза штамдармен зерттеу жүргізілді. Содан кейін, әр түрлі мөлшердегі (1 мл, 2 мл, 4 мл, 8 мл) коллекциялық штамм үлгілері жаңадан залалсыздандырылған қоректік орталарға көшірілді. Сұйық қоректік орталарға қайта дақылдау жұмыстары 1-2 ай көлемінде жалғасты. Морфологиялық ерекшеліктерін сипаттау жұмыстары жарық микроскобының астында (100x) жүргізілді. Кейін монодақыл анықталған жағдайда, әр түрлі ортадағы қатты агарға егілді. Сынамалар петри табақшаларының бетінде колония түзілгенге дейін жарықтың астында дақылданды. Өскен колониялардан дақылдардың бір бөлігі ілмек арқылы сұйық және қатты ортаға қайтадан көшірілді [82].

2.4 Цианобактериялардың альгологиялық таза дақылдарын бөліп алу

Цианобактериялардың таза түрлері штрих әдісімен қайталап егу арқылы микропипетка көмегімен алынды. Әдістің сызба-нұсқасы 2-суретте келтірілген. Барлық цианобактериялардың альгологиялық таза дақылдары BG-11 қоректік ортасында өсірілді, дегенмен кейбір гетероцисталы түрлер үшін BG₀-11 қоректік ортасы пайдаланылды. Автоклавта залалсыздандырылған, ішінде 15 мл-лік қоректік ортасы бар сынамаларға түтік арқылы ламинарлық бокстың астында, от жалынының қасында цианобактериялардың жинақы дақылы қосылып отырылды. Арасына 1 апта салынып дайындалған үш пробиркадағы үлгілер ауыстырылып отырылды. Қайта-қайта егу жұмыстарының нәтижесінде цианобактериялардың альгологиялық таза түрін бөліп алуға қол жеткіздік. Себебі, әрбір бір апта сайын микроскоптың астында тек қажетті жасушалар ғана алынып отырылды. Үшінші пробирка қайтадан 150 айн/мин жылдамдықта, 25°C температурада 7 тәулік бойына дақылданды.



Сурет 2 – Цианобактериялардың альгологиялық таза дақылдарын алу сызбанұсқасы.

Белгілеулер: 1) BG-11 және BG₀-11 қоректік орталарын әзірлеу; 2) 15 мл-лік пробиркаларға құю; 3) автоклавта залалсыздандыру; 4) цианобактериялардың жинақы дақылынан 3 пробиркаға апталық үзіліспен егу;

5) соңғы үшінші пробирканы дақылдау; 6) қатты қоректік ортаға штрих әдісімен егу; 7) қатты қоректік ортадан қайтадан сұйық қоректік ортаға көшіру; 8) алынған цианобактериялық түрді сақтау.

2-суреттегі 6-шы этапта көрсетілгендей дақылданған түрден 1 мл суспензия 15 мл-лік жаңа қоректік ортаға көшірілді. Зерттелінетін дақылдың біраз биомассасын аралас дақылдан микробиологиялық тұзақтың көмегімен жүргізіліп, қоректік ортасы бар жаңа Петри табақшасындағы агар бетіне штрих жүргізу арқылы қайта дақылданды, кейін қалыпты жағдайда климатостатқа көшірілді. Келесі қайта дақылдау жұмыстары штрихтап егуден өскен жеке колониялардан алынып жүргізілді.

2.5 Цианобактериялардың бактериялогиялық таза дақылдарын алу

Бөлініп алынған цианобактерия түрлері жинақы, альгологиялық таза дақыл болғандықтан, тазалаудың бірнеше кезеңдері жүргізілді, ал бактериялардың тіршілік әрекетін тоқтату мақсатында ультракүлгін сәулелердің стерилизациялық әсері (254 нм) қолданылды. Қатты қоректік орталардағы цианобактериялардың дақылдары 30 секунд пен 20 минут аралығында ультракүлгін сәулелермен сәулелендірілді. Ультракүлгін сәуле көзі ретінде бактерицидті УК лампалары пайдаланылды. Дақыл ультракүлгін көзінен 10-25 см қашықтықта сәулелендірілді. Содан соң, цианобактериялардың дақылдары қайтадан жаңа агарлы ортаға көшіріліп, өскеннен соң бактериялардың тазалығы микроскоп астында иммерсионды майды қолдану арқылы 100х үлкейтуімен бақыланды [83].

Сонымен қатар, кейбір дақылдар бактериялардан Больд әдісінің көмегімен тазартылды. Стерильді түтіктерге 1 мл дистилденген су қосылып, содан кейін автоклавта залалсыздандырылды. Сонымен қатар, алдын ала дайындалған агарлы ортаға әр түрлі глюкозаның концентрациялары (0,1-2%) қосылды.

2.6 Цианобактериялардың жасушаларын сандық есептеу

Цианобактериялардың жасушаларының санын есептеу үшін Горяев камерасы қолданылды. Камераның орташа көлемде, көлденең бөлінген пластинкаларының ішіндегі жасушалардың саны тіркелінді. Горяев камерасының ортаңғы бөлігі 0,1 мм болғандықтан, яғни басқа аймақтарынан төмен орналасқандықтан жабынды шыны сол аймақты толық жаппайды. Сондықтан, ортаңғы аймақта орналасқан жасушаларды тіркеу қолайлы болып табылды. Микроскоптың астында көрінген торлы шаршыларды торлы қабатты жабындық шынымен жауып, үстіне имерсиондық май тамызылды. Жабындық шыныға нақтылап бекіткен соң, төменгі оң жақ бүйіріне аздап жасушалардың сұйытылған тобы тамызылды. Шыныны мықтылап орналастырғаннан кейін, астаушаның айналасындағы артық сұйықтық фильтр қағазының көмегімен алынып тасталынды. Әрбір квадраттағы цианобактерия жасушаларының саны есепке алынып, Горяев камерасының көлемі және биіктігі есептелініп, 1 мл қоректік ортадағы жасушаның саны төмендегі формула бойынша анықталды. Камерадағы әрбір үлкен шарша 16 кіші шаршылардан тұрады. Егер 25 үлкен шаршылардағы жасушалардың саны с-ға тең болса, онда кішкентай бір шаршыда жасуша саны сәйкесінше:

$$n=c/16 \times 25,$$

ал 1 см³ қоректік ортадағы жасуша саны:

$$x = n \times 4 \times 10^6 = 4c \times 10^6 / 16 \times 25 = c \times 10^6 / 100$$

Сонымен, 1 см³ қоректік ортадағы жасуша санын анықтау үшін 25 шаршыны санау кезінде жасушалардың мөлшері m 100-ге бөлініп, 106-не көбейтілді.

Жасушалардың тығыздығы 1,0-3,0x10⁶/см³ болу үшін суспензия 50x, 100x, 250x, 500x сұйылту жұмыстарынан өткізілді. Көп жағдайда жоғары концентрациядағы Жасушалардың санын есептеу 100% нақты нәтиже бермейді. Себебі, сұйылту кезінде суспензияда жасушалардың бөлуінің ауытқуы жоғары болып келеді [84].

2.7 Цианобактериялардың құрғақ биомассасының мөлшерін анықтау

Құрғақ салмақты анықтау әдісі 2 кезеңнен тұрды. Бірінші кезеңде балдыр+тұздарды қоса алғандағы жалпы құрғақ салмақ анықталынды. Жалпы құрғақ салмақты анықтау үшін цианобактерия суспензиясының белгілі бір көлемін жақсылап араластырып, 65°C температурадағы ортадағы «SNOL 67/350» (AB Utenos Electrotechnika, Литва) термостатында Петри табақшасының ішіне 3 тәулік бойына құрғатылды. Ыдыс ретінде алдын-ала аналитикалық таразыларда

өлшенген және сол температурада кептірілген фарфорлы табақшалар қолданылды. Жасушаларды буландырып, кептіргеннен кейін ыдыстар аналитикалық таразыларда қайта өлшеніп, салмағының айырмашылығына байланысты жалпы құрғақ салмақ анықталынды.

Екінші кезеңде құрғатылған ыдыс дистилденген сумен толтырылды. Толық араласып, ерігеннен кейін тұз ерітінділерімен араластырып, ерімеген қалдығымен қоса өлшегіш пробиркаларға құйылды да, бірінші кезеңдегі сынаманың көлеміне дейін дистилденген сумен толтырылып, цианобактериялардың штамдары центрифуганың көмегімен (5810R, Eppendorf) 5,000-10,000 айн/мин жылдамдықта бөлініп алынды. Центрифугалаудан соң ерітіндіні тұңбадан бөліп алып, жалпы құрғақ салмақты анықтау кезіндегі әдіспен зерттелінген үлгідегі тұздың құрғақ салмағы анықталынды. Үлгі мен тұздардың құрғақ салмағы арасындағы айырмашылық арқылы жасушалардың құрғақ биомассасы анықталынды [84]. Содан соң, құрғақ биомасса лабораториялық таразыда өлшенді.

2.8 Цианобактериялардың өсу жылдамдығының коэффициентін анықтау әдісі

Биомассаның өсуі жасуша суспензиясының максималды және бастапқы тығыздығы арасындағы айырмашылық ретінде анықталды. Цианобактериялардың жасуша биомассасы келесі формула арқылы есептелінді:

$$\mu = (\ln X_t - \ln X_0) / (t - t_0),$$

мұндағы X_t және X_0 – t және t_0 уақыттарындағы жасуша суспензиясының тығыздығы [84].

Биомассаны екі еселеу уақыты (t_d) келесі формула бойынша анықталды:

$$t_d = \ln 2 / \mu,$$

Лаг-фазаның өсу көрсеткішінің формуласы:

$$T = t - (\ln X_t - \ln X_0) / \mu,$$

мұндағы T – бастапқы фазаны жалғасу уақыты, t – X_t суспензияның белгілі бір тығыздыққа жеткен уақыты.

2.8.1 Цианобактерияларды дақылдау үшін жарық қарқындылығын өлшеу

Зерттеу жұмыстарында жарықтың қарқындылығы Quantum Q 40555 LI-250A (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) жарық өлшегіші арқылы ыдыстың 5 жерінен өлшелінді және олардың ортақ көрсеткіші алынып, мкмоль фотон/м²/сек өлшем бірлігінде көрсетілді.

2.8.2 Цианобактерияларды дақылдау үшін көміртегіні өлшеу

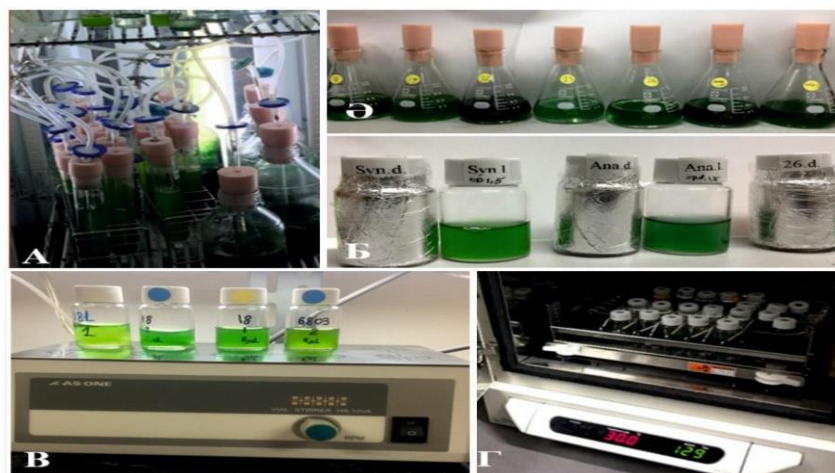
Цианобактериялық дақылдар стерильді газбен аэрацияланды және 1% CO₂ газ RMA-0,063 G (Ресей) ротаметімен есептелініп, ауаның құрамына қосылды [85]. Дақылдау BOYU S-4000B (Қытай) ауа компрессорының көмегімен жүргізілді.

2.9 Цианобактериялардан сутек алу әдістері

Цианобактерия түрлерін сутек алу үшін өсіру жұмыстарында жарық (қарқындылығы: 45 ммоль фотон/м²/сек) сынаманың үш жағынан берілді. Биомасса жинақтау мақсатында дақылдар 70 мл сұйық BG-11 қоректік ортасында өсіріліп, SPP-25GA ауа сорғышының көмегімен аэрацияланды. Содан соң, сутек бөліп алуға әзірлеу үшін 100 мл колбаларға көшірілді.

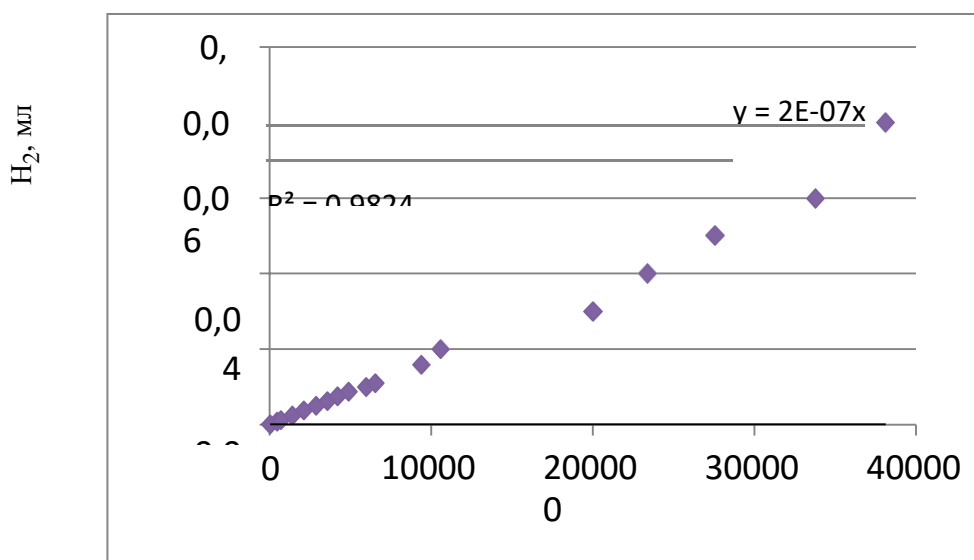
Цианобактериялардан сутегіні алу үшін биомасса дайындау әдісі. Цианобактерия дақылдары 40 мл түтіктерде өсірілді, содан соң 5 мин бойы 10,000 rpm жылдамдықта центрифугаланды. Супернатантты төгіп тастағаннан кейін жасуша дақылдарына 100 мл BG₀-11 қоректік ортасы қосылып, 3 мин бойы араластырылды. Алдын ала өсірілген жасушалар ~730 нм толқын ұзындығында спектрофотометрмен 0,4 оптикалық тығыздыққа (OT₇₃₀) келтірілді. Осыдан соң, дақылдар 24 сағат бойы жарықтың астында (қарқындылығы: 45 ммоль фотон/м²/сек) дақылданып, центрифугамен (Himac CR 22G high-speed refrigerated centrifuge; Hitachi Co., Ltd., Токио, Жапония) жасушалары 10,000 rpm жылдамдықта 5 минут өткен соң жиналып алынды. Қоректік ортаның супернатантын төккеннен соң 30 мл BG₀-11 қоректік ортасы үстіне қосылды. Арықарай жасушалар тағы да 5 мин бойы 10,000 rpm жылдамдықта центрифугаланды (сурет 9). Екі мәрте жуудан соң, супернатанттан бөлініп алынған жасушалар спектрофотометр арқылы OT₇₃₀ – 1,5 бірлікке келтірілді. Концентрацияланған жасушалардың үстіне 7,5 мл BG₀-11 қоректік ортасы қосылып, ол 50 ммоль HEPES-KOH (pH-7,4) суспензиясы және 100 ммоль NaHCO₃ химиялық қоспаларымен модификацияланды. Газ хроматограф виалының ішінде 10 мл кеңістік жасушалардан бөлінген газдар жинақталуы үшін қалдырылды [86].

Содан соң, аргон газы оттегін алмастыру үшін газ хроматограф шприцінің көмегімен газ хроматографының виалына еңгізіліп, бөлме температурасында жарық немесе қараңғы жерге орналастырылды. 30 мкмоль фотон/м²/сек қарқындылықтағы жарық газ хроматографының виалының бір жағынан берілді. Жасушалардың биомассасы HS- 10VA микроараластырғышымен 150 айн/мин жылдамдықта шайқалды. Қараңғылық жағдайындағы процедурада газ хроматографының виалы фольгамен жабылып, BioShaker BR-22FP ішінде 25°C температурада дақылданды.



Сурет 3 - Цианобактериялардың штамдарын сутек алуға дайындау.
 Белгілеулер: А – сутегі өндіру үшін биомасса алу әдісі; Ә – анаэробты жағдайда аргон газында өсіру. Цианобактерияларды жарықта және қараңғыда сутек алу үшін дақылдау: Б – жарықта, В – қараңғыда, Г – екі түрлі (жарық, қараңғы) фазаға дайындалған газ хроматографы виалдары

Молекулалық сутегін өлшеу әдісі. Жиналған молекулалық сутек газы газ хроматографын өндірушінің нұсқауларына сәйкес өлшенді. Инжектор мен колонка 80°C, детектор 120°C температурада жұмыс жасады. Газ хроматографы шприцінің көмегімен (Гамильтон компаниясы, Рено, АҚШ) газ хроматографының виалынан 0,15 мл газ тартылып алынып, газ хроматографқа еңгізілді. Тәжірибелерде температура 25,0±0,5°C және бастапқы рН көрсеткіші 7,4 болды.



Сурет 4 – Сутегінің стандартты линиялық сызығы
 Бөлінген сутегі мольдерін есептеу үшін сутегі стандартты калибрленген қисығы пайдаланылды (сурет 10). Сутегі калибрін реттеу үшін Microsoft Excel программасы қолданылды. Бірнеше рет жүргізілген тәжірибелерден соң, мВ пен мл ара-қатынасының линиялық сызығы есептелініп, орташа ауытқу 0,9824 тең

екендігі анықталды. Конвертацияланған сутегі нәтижелері мкмоль-ге ауыстырылып, хлорофилл концентрациясына (мг) бөлінді. Содан кейін, виалдың ішіндегі бос кеңістікке (15 мл) көбейтілініп, сутектің шыққан сағатына бөлініп, соңғы сутек өндірісі ммоль H_2 /мг хл а/сағ түрінде көрсетілді. Аргон тасымалдаушы газ ретінде қолданылды.

Цианобактериялардың хлорофилл а концентрациясын өлшеу. Әр үлгідегі 1 мл аликвот 1,5 мл түтікке жиналып, жоғары жылдамдықты, тоңазытылған SS-1500X микроцентрифугасының көмегімен 5 минут ішінде 10,000 rpm жылдамдықта центрифугаланды. Супернатантты бөліп тастағаннан кейін 1 мл 100% метанол дақыл жасушасына қосылып, пробирка 5 мин ішінде 10000 rpm жылдамдықпен центрифугаланды. 665,2 және 750 нм жарық спектрлері хлорофилл а концентрациясын өлшеу үшін пайдаланылып, бақылау ретінде 100% метанол алынды.

Цианобактериялы суспензияға диурон ингибиторын қосу. Анаэробты орта жасамас бұрын, 0,046 г DCMU 5 мл диметилфоксидте ерітіліп, 10 ммоль, 30 ммоль, 45 ммоль концентрациялары жасалынды. Одан соң, газ хроматограф шприці арқылы гах хроматогра виалының ішіне 3 түрлі концентрацияда қосылды. DCMU қосқаннан кейін, жасуша дақылдары DCMU құрамына ену үшін 30 минут шайқалынып, суспензия араластырылды.

ФЖ1 және ФЖ2 флуоресценциясын өлшеу. Флуоресценцияны өлшеу үшін 5 мл H_2O -да 1,5 г PEG (полиэтиленгликол) ерітілді. Содан кейін, 30% PEG 150 мкл және әр штамның 150 мкл үлгісі 1,5 мл түтікке араластырылды. Барлық штамдарға бірдей PEG концентрациясы қолданылды. ФЖ1 және ФЖ2 флуоресценттік спектрлері қозу толқынының ұзындығы 435 нм болды және спектрофторометр көмегімен сұйық азот ағынының астында тексерілді.

2.10 Ацетилен әдісімен нитрогеназаның белсенділігін өлшеу әдісі

Нитрогеназаның белсенділігі Давид және т.б жұмысына сәйкес 10% ацетилен 90% аргон газдық қоспаны виалдың ішіне 30 мин бойына енгізу тәсілімен анықталды [87]. 30 мл виалдағы жасушалар 250 мкмоль фотон $m^2/сек$ жарық қарқындылығында 24 сағат бойы өсірілді. Инкубациядан кейін 500 мкл газ үлгілері алынып, газдық қоспаның құрамындағы этиленнің концентрациясы анықталды. Ацетиленнің тотықсыздану белсенділігі GC-15A газды хроматографында анықталды, ммоль этилен/мг ҚБ/сағ көрсеткішінде ұсынылды.

Ауыр металлдарды суспензияға қосу әдісі. Клеткалар 22°C-де Na_2MoO_4 металлы алынып тасталған Аллен ортасында, жарық астында өсіріліп, металлсыз ортада 3 рет жуылып, шамамен 10×10^6 кл/мл концентрациясында қайтадан анаэробты ортаға көшірілді. 3 түрлі мкмоль концентрациядағы Na_2MoO_4 , Na_3VO_4 және Na_2WO_4 тұздары дақылдарға қосылды.

3 Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

3.1 Гетероцисталы цианобактерия штамдарының сутек бөлуін зерттеу

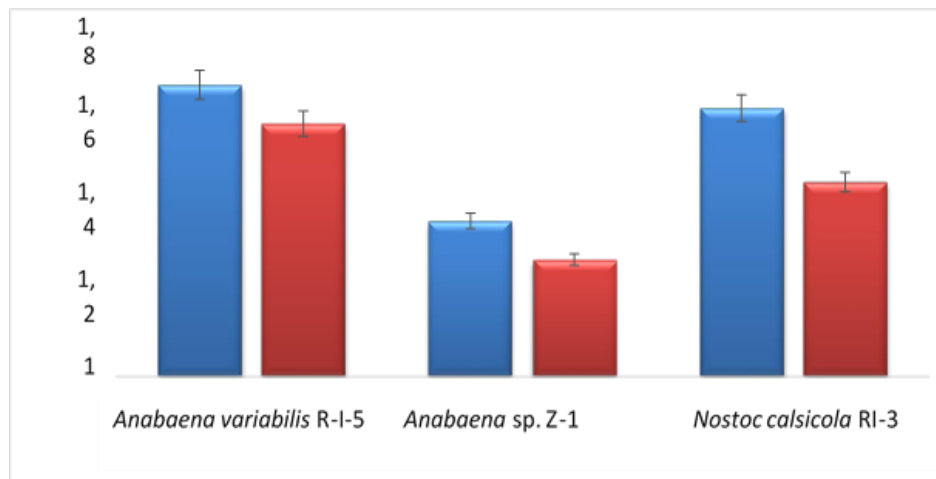
Зерттеулердің көп бөлігі сутегіні гетероцисталы цианобактериялардың нитрогеназа ферменттерімен өндірілуіне бағытталған. Сутекті белсенді түрде өндіретін фототрофты микроорганизмдердің өнімді штамдарын табу үшін биотехнология зертханасынан цианобактериялардың гетероцисталы үш штамдары зерттелді: *Nostoc caldicola* RI-3, *Anabaena variabilis* RI-5 және *Anabaena* sp. Z-1. Бұл жұмыста жоғары өнімділікпен сипатталатын цианобактериялардың таза дақылдарын зерттеп, оқшауланған микробалдыр штамдарының сутегі өндіруші белсенділігін анықтадық. Төменде олардың микрофотографтары және олардың мәдени, морфологиялық, физиологиялық және биохимиялық қасиеттерін зерттеу негізінде алынған қысқаша сипаттама келтірілген (сурет 5).



Сурет 5 – Коллекциялық цианобактериялардың микросуреттері (100х)
Белгілеулер: А – *Nostoc caldicola* RI-3; Ә – *Anabaena variabilis* R-I-5; Б –
Anabaena sp. Z-1

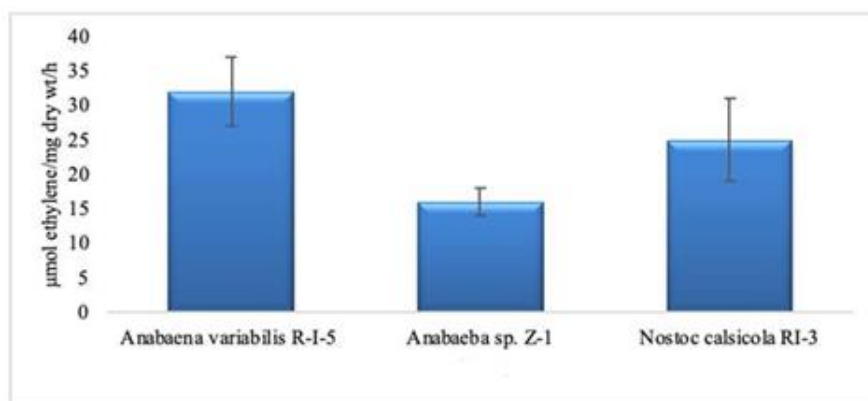
3.1.1 Коллекциялық цианобактерия штамдарының азотсыз ортада өсу қабілетін анықтау

Коллекциялық цианобактерия штамдарының азотсыз ортада өсу қабілетін анықтау үшін цианобактериялардың дақылдары BG0-11 (тәжірибе) және BG-11 (бақылау) орталарында таңдалды. Биомассаның өсу өнімділігі өсу коэффициентімен және цианобактериялардың құрғақ биомассасының шығымымен анықталды. Ол үшін зерттелген штамдар қоректік орталарда 9 күн бойы өсірілді, барлық зерттелген дақылдар үшін жасушаның бастапқы тығыздығы 0,5 болды. 9 күннен кейін цианобактериялар биомассасы культуралық сұйықтықтан бөлініп, кептіріліп, құрғақ биомассаның шығымы анықталды. Нәтижелер 6-суретте көрсетілген.



Сурет 6 - оқшауланған микробалдыр штамдарының өнімділігін анықтау нәтижелері

Алынған нәтижелер азотсыз ортадағы жинау штамдарының өнімділігінің шамалы айырмашылығын көрсетеді, алайда *Anabaena variabilis* RI-5 және *Nostoc caldicola* RI-3 штамдары жоғары мәндерді иеленді. Бұл нәтижелер ацетилен әдісімен зерттелген штамдардың нитрогеназа белсенділігін анықтау нәтижелерімен расталды. Үшеуінің нитрогеназалық белсенділігі барлық 3 штамда жарықта 24 сағат культивирлегеннен кейін анаэробты жағдай жасағаннан кейін газ хроматограф арқылы анықталды. Этиленнің түзілуі ретінде өлшенген нитрогеназа белсенділігін спецификалық H_2 -мен салыстыру нәтижесі бойынша, зерттелген оқшауланған штамдар арасында *Anabaena* sp. Z-1 этилен (нитрогеназа) өндірісі бойынша айтарлықтай төмен нәтиже, ал *Anabaena variabilis* RI-5 штаммы 3,57 нмоль этилен/мг DW/сағ, штамм үшін *Anabaena* sp. Z-1 бұл көрсеткіш 1,82 нмоль этилен/мг DW/сағатты құрады. Осылайша, *Anabaena variabilis* RI-5 штамы этилен өндірісінің салыстырмалы жоғары деңгейін көрсетті (7-сурет).



Сурет 7 - оқшауланған штамдардың нитрогеназа белсенділігін өлшейтін ацетиленнің тотықсыздану жылдамдығы

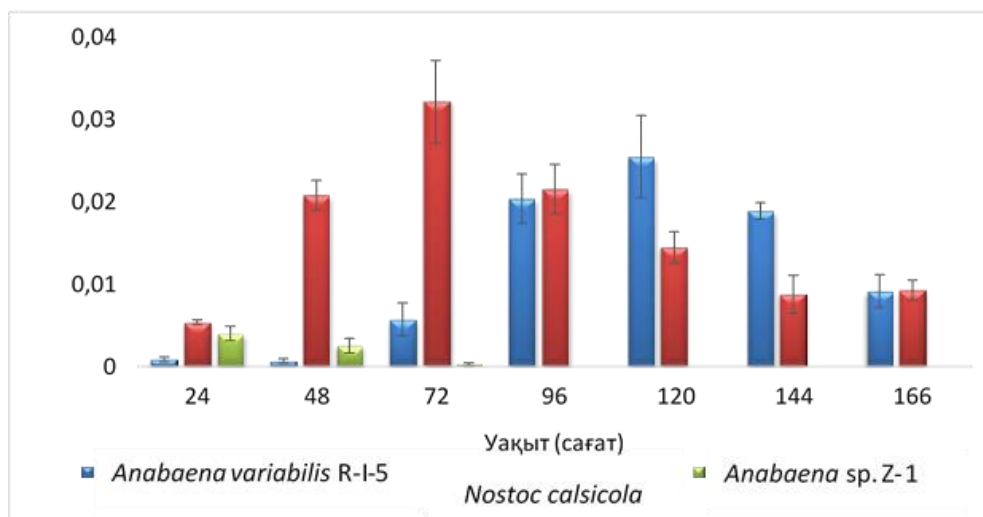
Келесі кезеңде жоғары сутегі өндіруші белсенділігімен сипатталатын цианобактериялардың штамдарын таңдау үшін сутектің өсімі оқшауланған үш жаңа штаммен қараңғыда және жарық жағдайында зерттелді.

3.1.2 Зерттелетін штамдарды қараңғы анаэробты жағдайдағы сутек бөлінісін анықтау

Құрамында гетероцисталар бар және азотты фиксациялайтын дақылдардағыдай, нитрогеназа мен гидрогеназаның көмегімен сутегі өсімі үшін қолданылатын цианобактерияларды қолдану перспективалы екені белгілі. Оларда нитрогеназа ферменті негізінен мамандандырылған жасушаларда - азоттың байланысқан формаларының жетіспеуі жағдайында түзілетін гетероциттерде локализацияланған. Бұл жағдайда оттегі тек вегетативті жасушаларда түзіледі. Гетероцистаның сыртқы қалың қабықшасы сыртқы ортадан оттегін өткізбейді және ол нитрогеназа ферментінің толыққанды жұмыс істеуіне мүмкіндік беріп, оттегі молекулаларының басуына жол бермейді. Бұл гетероцисталы цианобактерияларды молекулалық оттегінің қатысуымен сутегіні шығара алатын жалғыз организм етеді [88].

Алынған нәтижелерге сәйкес сутектің бөлінуі қараңғыда зерттелген барлық культураның байқалды. Сутектің ең жоғары өнімділігі *Nostoc caldicola* RI-3 штаммында болды, оның жасушалары қараңғыда газсыздандырылғаннан кейін, 24 сағаттан соң сутек шығара бастады. Осы кезде сутектің шығымы 0,005 мкмоль H_2 /мг хл/сағ құрады. Бұл культураның сутектің максималды жинақталуы 72 сағ инкубациядан кейін байқалды, ол бір уақытта 0,032 мкмоль H_2 /мг хл/сағ құрады; эксперименттің келесі сағаттарында сутегі эволюциясының баяу төмендеуі байқалады.

Қалған штамдар *Nostoc caldicola* RI-3-пен салыстырғанда қараңғыда сутек өндіретін белсенділігі аз болды. Сонымен қатар, сутек өндірісінің анағұрлым жоғары деңгейі *Anabaena variabilis* RI-5 штаммында байқалды. Бұл екі штамм сутектің шығымының әртүрлі мәндерімен сипатталды және бір-бірінен оның максималды жинақталу уақытымен ерекшеленді. Осылайша, 24 сағаттан кейін *Anabaena variabilis* RI-5 жасушалары арқылы H_2 жиналуы 0,0008 мкмоль H_2 /мг хл/сағ құрады, ал 120 сағаттан кейін 0,225 мкмоль H_2 /мг хл/сағ-қа тең H_2 өндірісі жоғары болды. Цианобактериялардың зерттелген штамдарының арасында *Anabaena sp.* Z-1 штаммында сутекті қараңғыда бөлу қабілетінің айтарлықтай төмен екендігі анықталды. 24 сағаттық инкубациядан кейін осы штамм бойынша сутектің аздап өсуі байқалды, бұл көрсеткіш осы уақытқа дейін 0,004 мкмоль H_2 /мг хл/сағ құрады.



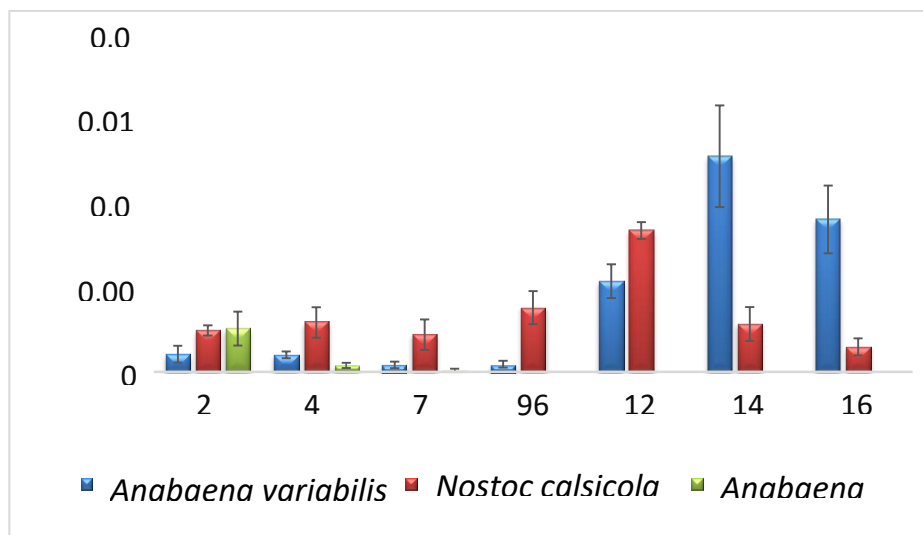
Сурет 8 - қараңғыда анаэробты жағдайда цианобактериялардың зерттелген штамдары бойынша сутектің бөлінуі.

3.1.3 Жарық жағдайында цианобактерия штамдарының сутек бөлу көрсеткіштерін анықтау.

Жұмыстың келесі кезеңінде цианобактериялардың зерттелген штамдары бойынша сутектің жинақталуы жарық жағдайында зерттелді. Жарық энергиясы сутегі өндірісі үшін маңызды екендігі және тікелей биофотоллиз үшін электронды донор рөлін атқаратыны белгілі. Цианобактериялардың тилакоидты мембраналарында фотохимиялық реакциялар кезінде күн сәулесінің энергиясы әсерінен белгілі бір жағдайларда молекулалық сутегі бөлінеді. Қалыпты жағдайда микроскопиялық цианобактериялар сутегі түзбейді. ФЖІ белсенділігі сутекті фотоқабылдауының алғышарты емес, дегенмен судың фотодиградациясы кезінде тилакоидты электрондарды тасымалдау тізбегіне (ЕТТ) енетін электрондарды гидрогеназа арқылы қабылдауға болады. Бұл қысқа уақыт ішінде цианобактерия жасушаларында оттегі де, сутегі де түзілуіне әкеледі [89,90].

Бұл тәжірибеде цианобактериялардың зерттелген дақылдары алдыңғы тәжірибеге ұқсас өсірілді, сутектің өнімділігін зерттеу кезінде жасушаларды инкубациялау шарттары бірдей болды және тек жарықтың қатысуымен ерекшеленді. Әр өсіру үшін суспензияның бастапқы оптикалық тығыздығы 730 нм-де 1,5 құрады. Сутектің цианобактериялардың штамдары бойынша өсімі оларды аргон атмосферасында 190 сағ 30 минутта жарықтандыру кезінде инкубация кезінде байқалды. Сутектің жарықтағы ең белсенді өндірушісі *Anabaena variabilis* RI-5 штаммы екендігі анықталды. *Anabaena variabilis* RI-5 жасушаларының сутегіні өндіруі анаэробты жағдайлар орнатылғаннан кейінгі бірінші күні байқалады. Белсенді сутегі бөлінуі алты күн бойы сақталады, содан кейін азая бастады. Сутектің жинақталуының ең жоғары жылдамдығы 144 сағаттан кейін байқалды, ол 0,012 мкмоль H_2 /мг хл/сағ құрады. Қараңғыда сутекті белсенді түрде шығаратын *Nostoc calsicola* RI-3 штамы жарық жағдайында ұқсас белсенділік көрсетпегенін атап өткен жөн. 24 сағаттан кейін жарықтандыру

жағдайындағы сутегі эволюциясы 0,002 мкмоль H_2 /мг хл/сағ құрады, ал 120 сағаттан кейін H_2 ең көп өндірілуі 0,008 мкмоль H_2 /мг хл/сағ-қа тең болды, содан кейін оның эволюциясының біртіндеп төмендеуі байқалды. *Anabaena sp.* Z-1 штаммы алғашқы тәжірибедегідей сутегі өсімінде ұқсас заңдылық байқалды, сутектің 0,002-0,0003 мкмоль H_2 /мг хл/сағ аз өндірілуі 24 сағаттан және 48 сағаттан кейін байқалды (5-сурет).



Сурет 9 - жарық кезінде анаэробты жағдайда цианобактерия штамдарының сутекті бөлуі

Сонымен, зерттеулердің нәтижесінде қараңғыда *Nostoc caldicola* RI-3 цианобактерия штаммы ал жарық жағдайында *Anabaena variabilis* RI-5 штаммына сутегі өндірудің жоғары қабілетіне ие екендігі анықталды. Бұл жағдайда цианобактериялар *Nostoc caldicola* RI-3 штаммының жасушаларының сутегінің максималды шығуы қараңғыда 0,032 мкмоль H_2 /мг хл/сағ құрады, бұл штамм бойынша сутек өндіру *Anabaena variabilis* RI-5 салыстырғанда 2,5 есеге жоғары болды. Біздің нәтижелер жалпы жарияланған мәліметтермен сәйкес келеді. *Spirullina platensis* түрімен сутегінің жоғары өндірісі туралы әдебиеттерде мәліметтер бар. Бұл штамм жарықта және қараңғыда анаэробты жағдайда, 25°C температурада сутекті қалыпты бөледі [91]. Ал *Synechococcus* түрі анаэробты жағдайда, қараңғы ортада сутегіні белсенді түрде шығаратындығы туралы деректер зерттеу жұмыстарында келтірілген [92]. Біздің эксперименттік мәліметтерге сүйенсек, жаңа штамдардың сутектің өндірісі жарықтың болуына байланысты. *Nostoc caldicola* RI-3 және *Anabaena variabilis* RI-5 жасушаларының сутегі бөлінуінің оңтайлы шарты жарықтандырудың болмауында болды, жарықтандырудың болуы сутегі өндірісінің күрт төмендеуіне әкелетіндігі анықталды. Мұның ықтимал себебі ФЖІІ-нің тым жоғары активтенуінде болуы мүмкін. Бұл бағытталған фотосинтетикалық электрондардың әсерінен протондардың молекулалық сутегіне дейін тотықсыздануын катализдейтін гидрогеназа ферменттерінің инактивациясы салдарынан сутегі эволюциясы процесін тежейтін оттегі концентрациясының пайда болуына ықпал етеді.

ҚОРЫТЫНДЫ

Фотосинтез арқылы молекулалық сутектің биологиялық өндірісі сутегі отынын өндірудің басқа әдістеріне қарағанда бірнеше артықшылыққа ие. Бұл технологияны күн сәулесін сутегі энергиясына айналдыра алатын фототрофты микроорганизмдерді қолдану арқылы жүзеге асыруға болады. Мұндай технологиялардың болашағы қажетті сипаттамалары бар белсенді штамдарды іздеу және сутектің фотобиологиялық өндірісі үшін олардың штамдарын жақсартудың тиісті стратегияларын таңдау сияқты ғылыми жетістіктерге байланысты. Бұл жұмыс бірінші кезекте азотты бекітетін цианобактериялардың ішінен перспективалы өндірушілерді табуға және осы процестің механизмдерін түсінуге бағытталған. Дипломдық жұмыста гетероцистозды цианобактериялардың жаңа штамдарын табиғи көздерден бөліп алудың және олардың сутегі өндірісіндегі мүмкіндіктерін зерттеудің нәтижелері келтірілген. Алынған нәтижелерге сәйкес, гетероцистикалық цианобактериялардың үш штаммы, *Nostoc caldicola* RI-3 және *Anabaeba sp* Z-1 штамдары қараңғыда салыстырмалы түрде жоғары сутегі өндіру белсенділігін көрсетті. Алынған ғылыми нәтижелер жарық энергиясын сутектің химиялық энергиясына - баламалы және экологиялық таза отынға айналдыруға қабілетті биожүйелер ретінде оқшауланған цианобактерияларды әрі қарай зерттеудің қажеттілігі туралы куәландырады. Бұл ғылыми ақпаратты қосымша зерттеулерден кейін гетероцистозды цианобактериялардың жасушалары арқылы биологиялық сутегіні алу әдістерін жасауда кешенді қолдануға болады.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 Khetkorn K, Rastogi RP, Incharoensakdi A, Lindblad P, Madamwar D, Pandey A, Larroche C. (2017) Microalgal hydrogen production – A review, *Bioresource Technology*, 243, 1194-1206. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.085>.
- 2 Bolatkhan K, Kossalbayev BD, Zayadan BK, Tomo T, Veziroglu TN, Allakhverdiev SI. (2019) Hydrogen production from phototrophic microorganisms: Reality and perspectives, *International Journal of Hydrogen Energy*, 44, 5799-5811. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.01.092>.
- 3 Kossalbayev BD, Tomo T, Zayadan BK, Sadvakasova AK, Bolatkhan K, Alwasel S, Allakhverdiev SI. (2020) Determination of the potential of cyanobacterial strains for hydrogen production, *International Journal of Hydrogen Energy*, 45, 2627-2639. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.11.164>.
- 4 Markov SA, Protasov ES, Bybin VA, Stom DI. (2013) Hydrogen production by microorganisms and microbial fuel cells using wastewater and waste products, *International Scientific Journal for Alternative Energy and Ecology*, 118, 108-116.
- 5 Hallenbeck PC. (2013) Chapter 7 – Photofermentative Biohydrogen Production, *Biohydrogen*, 1, 145–159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59555-3.00007-6>.
- 6 Woese C.R. et al. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya // *Proceedings of the National Academy. - United States of America*, 1990. - № 87. - P. 4576-4579.
- 7 Zavarzin G.A., Zhilina T.N. Anaerobic chemotrophic alkaliphiles. In *Microbial Diversity* (Ed. Joseph Seckbach). /In: *Journey to diverse microbial worlds* (Ed. Seckbach J.) Kluwer Academic publishers. – Dordrecht. - 2000. - P. 191-208.
- 8 Масюк Н.И., Костиков И.Ю. Современные взгляды на положение водорослей в системе органического мира // *Альгология*. - 2002. - Т. 12., №2. - С. 151 -182.
- 9 Заварзин Г.А., Орлеанский В.К., Герасименко Л.М., Пушко С.В., Ушатинская Г.Т. Лабораторные модели цианобактериальных матов щелочного геохимического барьера // *Микробиология*. – 2003. - Т.72, №1. - С. 93–98.
- 10 Кондратьева Н.В., Сиренко Л.А. Хозяйственное значение Cyanophyta (Обзор) // *Альгология*. - 1997. - Т.7, № 1. - С. 87-102.
- 11 Ефимова М.В., Ефимов А.А. Синезеленые водоросли или цианобактерии? Вопросы систематики // *Современные проблемы науки и образования*. - 2007. - № 6. - С. 34-39.
- 12 Кокшарова О., ЛиAUD М. Ф., Церфф Р. Цианобактерии: общие сведения // *Микробиология*. - 2004. - Т.73, № 3. - С. 393.
- 13 Андреюк Е.И., Коптева Ж.П., Занина В.В. Цианобактерии. - АН УССР, Ин-т микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного. - Киев: Наукова думка, 1990. - 197 с.
- 14 Pankratova Je. M., Zyablykh R. J., Kalinin A. A., Kovina A. L., Treilova L.V. Designing of microbial binary cultures based on blue-green algae (Cyanobacteria)

Nostoc paludosum Kiltz // *International Journal of Algae*. - 2004. - Т. 14, № 4. - С. 445-458.

15 Pitois F., Thoraval I., Baurès E., Thomas O. Geographical patterns in cyanobacterial distribution: climate influence at regional scale // *Toxins (Basel)*. - 2014. - Vol. 6(2). – P. 509-22.

16 Полянская Л.М., Звягинцев Д.Г. Содержание и структура микробной биомассы как показатель экологического состояния почв // *Почвоведение*. - 2005. - №6. - С.706-714.

17 Зенова Г.Н. Лишайники // *Соратовский образовательный журнал*. - 1999. - № 6. - С. 30-34.

18 Пятаева С.В., Лобакова Е.С., Косевич И.А. Цианобактерии - эндо - симбионты колониальных гидроидов // *Вестник московского университета*. – 2006. - Серия 16: биология, № 4. - С. 39-43.

19 Кокшарова О.А. Цианобактерии: перспективные объекты научного исследования и биотехнологии // *Успехи современной биологии*. - 2008. - Т. 128, №1. - С. 3-20.

20 Абдуллин Ш.Р. Цианобактерии и водоросли пещеры шульган-таш (каповой): автореф. ... канд. биол. наук.: 03.00.05, 03.00.07. – Уфа: БГУ, 2005. - 29 с.

21 Ефимова М.В. Синезеленые водоросли (цианобактерии) поверхностных термопроявлений камчатки и возможности их использования в биотехнологии: автореф. ... канд. биол. наук.: 03.00.32 - Тихоокеанский институт биоорганической химии дальневосточного отделения российской академии наук, Владивосток, 2005. - 32 с.

22 Белых О.И., Гладких А.С., Сороковикова Е.Г., Тихонова И.В., Потапов С.А., Федорова Г.А. Микроцистин-продуцирующие цианобактерии в водоемах России, Беларуси и Украины // *Химия в интересах устойчивого развития*. - 2013. - Т. 21, № 4. - С. 363-378.

23 He L, Huang H, Lei Z, Liu C, Zhang Z. Enhanced hydrogen production from anaerobic fermentation of rice straw pretreated by hydrothermal technology. *Bioresour Technol* 2014;171:145e51.

24 Hosseini SE, Wahid MA. Hydrogen production from renewable and sustainable energy resources: promising green energy carrier for clean development. *Renew Sustain Energy Rev* 2016;57:850e66.

25 Khetkorn W, Rastogi RP, Incharoensakdi A, Lindblad P, Madamwar D, Pandey A, Larroche C. Microalgal hydrogen production. *Bioresour Technol* 2017;243:1194e6.

26 Aziz M, Zaini IN. Production of hydrogen from algae: integrated gasification and chemical looping. *Energy Procedia* 2017;142:210e5.

27 Santoro C, Arbizzani C, Erable B, Ieropoulos I. Microbial fuel cells: from fundamentals to applications. A review. *J Power Sources* 2017;356:225e44.

28 Allakhverdiev SI. Photosynthetic and biomimetic hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* 2012;37:8744e52.

29 Sekoai PT, Ouma CNM, Preez SP, Modisha P, Engelbrecht N, Bessarabov DG, Ghimire A. Application of nanoparticles in biofuels: an overview. *Fuel* 2019;237:380e97.

30 Bicakova O, Straka H. The resources and methods of hydrogen production. *Acta Geodyn Geomater* 2010;7:175e88.

31 A Chatzitakis, Nikolakaki E, Sotiropoulos S, Poullos I. Hydrogen production using an algae photoelectrochemical cell. *Appl Catal B* 2013;142e143:161e8.

32 Marban G, Valdes-Solís T. Towards the hydrogen economy? *Int J Hydrogen Energy* 2007;32:1625e37.

33 Kotay SM, Das D. Biohydrogen as a renewable energy resource e prospects and potentials. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:258e63.

34 Zebda A, Alcaraz J-P, Vadgama P, Shleev S, Minteer SD, Boucher F. Challenges for successful implantation of biofuel cells. *Bioelectrochemistry* 2018;124:57e72.

35 Srivastava N, Srivastava M, Kushwaha D, Gupta VK, Manikanta A, Ramteke PW, Mishra PK. Efficient dark fermentative hydrogen production from enzyme hydrolyzed rice straw by *Clostridium pasteurianum* (MTCC116). *Bioresour Technol* 2017;238:552e8.

36 Musazade E, Voloshin R, Brady N, Mondal J, Atashova S, Zharmukhamedov SK, Huseynova I, Ramakrishna S, Najafpour MM, Shen J-R, Bruce BD, Allakhverdiev SI. Biohybrid solar cells: fundamentals, progress, and challenges. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev* 2018;35:134e56.

37 Baykara SZ. Hydrogen: a brief overview on its sources, production and environmental impact. *Int J Hydrogen Energy* 2018;43:10605e14.

38 Kosourov S, Murukesan G, Seibert M, Allahverdiyeva Y. Evaluation of light energy to H₂ energy conversion efficiency in thin films of cyanobacteria and green algae under photoautotrophic conditions. *Algal Res* 2017;28:253e63.

39 Liao CH, Huang CW, Jeffrey C, Wu S. Hydrogen production from semiconductor-based photocatalysis via water splitting. *Catalysts* 2012;2:490e516.

40 Xia A, Cheng J, Song W, Su H, Ding L, Lin R, Lu H, Liu J, Zhou J, Cen K. Fermentative hydrogen production using algal biomass as feedstock. *Renew Sustain Energy Rev* 2015;51:209e30.

41 Lin C-Y, Nguyen TM-L, Chu C-Y, Leu H-J, Lay C-H. Fermentative biohydrogen production and its byproducts: a mini review of current technology developments. *Renew Sustain Energy Rev* 2018;82:4215e20.

42 Mohan SV, Bhaskar YV, Sarma PN. Biohydrogen production from chemical wastewater treatment in biofilm configured reactor operated in periodic discontinuous batch mode by selectively enriched anaerobic mixed consortia. *Water Res* 2007;41:2652e64.

43 Sharma A, Kumar SA. Hydrogen from algal biomass: a review of production process. *Biotechnol Reports* 2017;15:63e9.

44 Demirci UB, Miele P. Overview of the relative greenness of the main hydrogen production processes. *J Clean Prod* 2013;52:1e10.

45 Voloshin RA, Rodionova MV, Zharmukhamedov SK, Veziroglu TN, Allakhverdiev SI. Review: biofuel production from plant and algal biomass. *Int J Hydrogen Energy* 2016;41:17257e73.

46 Simionato D, Basso S, Giacometti GM, Morosinotto T. Optimization of light use efficiency for biofuel production in algae. *Biophys Chem* 2013;182:71e8.

47 Zayadan B, Sadvakasova AK, Userbaeva A, Bolatkhan K. Isolation. Mutagenesis. And optimization of cultivation of microalgal strains for biodiesel production. *Russ J Plant Physiol* 2014;62:135e42.

48 Ainas M, Hasnaoui S, Bouara R, Abdi N, Drouiche N, Mameri N. Hydrogen production with the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Int J Hydrogen Energy* 2017;42:4902e7.

49 Lopez BR, Hernandez J-P, Bashan Y, Bashan LE. Immobilization of microalgae cells in alginate facilitates isolation of DNA and RNA. *J Microbiol Methods* 2017;135:96e104.

50 Lee HS, Vermaas WFJ, Rittmann BE. Biological hydrogen production: prospects and challenges. *Trends Biotechnol* 2010;28:262e71.

51 Jesus SS, Filho RM. Potential of algal biofuel production in a hybrid photobioreactor. *Chem Eng Sci* 2017;171:282e92. [30] Prabakar D, Manimudi VT, Suvetha SK, Sampath S, Mahapatra DM, Rajendran K, Pugazhendhi A. Advanced biohydrogen production using pretreated industrial waste: outlook and prospects. *Renew Sustain Energy Rev* 2018;96:306e24.

52 Holladay JD, Hu J, King DL, Wang Y. An overview of hydrogen production technologies. *Catal Today* 2009;139:244e60.

53 Show K-Y, Lee D-J, Chang J-S. Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresour Technol* 2011;102:8525e33.

54 Hoshino T, Johnson DJ, Scholz M, Cuello JL. Effects of implementing PSI-light on hydrogen production via biophotolysis in *Chlamydomonas reinhardtii* mutant strains. *Biomass Bioenergy* 2013;59:243e52.

55 Bharathiraja B, Sudharsanaa T, Bharghavi A, Jayamuthunagai J, Praveenkumar R. Biohydrogen and biogas e an overview on feedstocks and enhancement process. *Fuel* 2016;185:810e28.

56 Veras TS, Mozer TS, Santos DCRM, Cesar AS. Hydrogen: trends, production and characterization of the main process worldwide. *Int J Hydrogen Energy* 2017;42:2018e33.

57 Miura Y. Hydrogen production by biophotolysis based on microalgal photosynthesis. *Process Biochem* 1995;30:1e7.

58 Azwar MY, Hussain MA, Abdul-Wahab AK. Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes. *Renew Sustain Energy Rev* 2014;31:158e73.

59 Das D, Veziroglu TN. Advances in biological hydrogen production processes. *Int J Hydrogen Energy* 2008;33:6046e57.

60 Nagarajan D, Lee DeJ, Kondo A, Chang J-S. Recent insights into biohydrogen production by microalgae e from biophotolysis to dark fermentation. *Bioresour Technol* 2017;227:373e87.

- 61 Ni M, Leung DYC, Leung KHM, Sumathy K. An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Process Technol* 2006;87:461e72.
- 62 Hallenbeck PC. Hydrogen production by cyanobacteria. In: Hallenbeck PC, editor. *Microbial technologies in advanced biofuels production*; 2012. p. 15e28.
- 63 Rai PK, Singh SP. Integrated dark- and photo-fermentation: recent advances and provisions for improvement. *Int J Hydrogen Energy* 2016;41:19957e71.
- 64 Hallenbeck PC, Benemann JR. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energy* 2002;27:1185e93.
- 65 Show K-Y, Yan Y, Ling M, Ye G, Li T, Lee D-J. Hydrogen production from algal biomass e advances, challenges and prospects. *Bioresour Technol* 2018;257:290e300.
- 66 Seifert K, Zagrodnik R, Stodolny M, Laniecki M. Biohydrogen production from chewing gum manufacturing residue in a two-step process of dark fermentation and photofermentation. *Renew Energy* 2018;122:526e32.
- 67 Kapdan IK, Kargi F. Bio-hydrogen production from waste materials. *Enzym Microb Technol* 2006;38:569e82.
- 68 Ghimire A, Frunzo L, Pontoni L, d'Antonio G, Lens PNL, Esposito G. Dark fermentation of complex waste biomass for biohydrogen production by pretreated thermophilic anaerobic digestate. *J Environ Manag* 2015;152:43e8. [48] Lukajtis R, Holowacz I, Kucharska K, Glinka M, Rybarczyk P, Przyjazny A. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renew Sustain Energy Rev* 2018;91:665e94.
- 69 Ntaikou I, Antonopoulou G, Lyberatos G. Biohydrogen production from biomass and wastes via dark fermentation. *Waste Biomass Valori* 2010;1:21e39.
- 70 Bundhoo MAZ, Mohee R. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: a review. *Int J Hydrogen Energy* 2016;41:6713e33.
- 71 Kruse O, Hankamer B. Microalgal hydrogen production. *Curr Opin Biotechnol* 2010;21:238e43.
- 72 Das D, Veziroglu TN. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int J Hydrogen Energy* 2001;26:13e28.
- 73 Allakhverdiev SI, Kreslavski VD, Thavasi V, Zharmukhamedov SK, Klimov VV, Nagata T, Nishihara H, Ramakrishna S. Hydrogen photoproduction by use of photosynthetic organisms and biomimetic systems. *Photochem Photobiol Sci* 2009;8:148e56.
- 74 Xu T, Chen D, Hu X. Hydrogen-activating models of hydrogenases. *Coord Chem Rev* 2015;303:32e41.
- 75 Peters JW, Schut GJ, Boyd ES, Mulder DW, Shepard EM, Broderick JB, King PW, Adams MWW. [FeFe]- and [NiFe]- hydrogenase diversity, mechanism, and maturation. *Biochim Biophys Acta* 2015;1853:1350e69.
- 76 Ceccaldi P, Etienne E, Dementin S, Guigliarelli B, Leger C, Burlat B. Mechanism of inhibition of NiFe hydrogenase by nitric oxide. *Biochim Biophys Acta* 2016;1857:454e61.
- 77 Bagyinka C. How does the ([NiFe]) hydrogenase enzyme work? *Int J Hydrogen Energy* 2014;39:18521e32.

78 Meyer J. [FeFe] hydrogenases and their evolution: A genomic perspective. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:1063e83.

79 Hu Y, Ribbe MW. Nitrogenase assembly. *Biochim Biophys Acta* 2013;1827:1112e22.

80 Seefeldt LC, Yang Z-Y, Duval S, Dean DR. Nitrogenase reduction of carbon-containing compounds. *Biochim Biophys Acta* 2013;1827:1102e11.

81 Bellenger JP, Xu Y, Zhang X, Morel FMM, Kraepiel AML. Possible contribution of alternative nitrogenases to nitrogen fixation by asymbiotic N₂-fixing bacteria in soils. *Soil Biol Biochem* 2014;69:413e20.

82 Нурашов С. Б., Саметова Э. С. Культивирование токсичных водорослей на сточных водах и изучение их роли в биологической очистке сточных вод // Материалы I межд. науч. конф. молодых ученых и студентов.-Алматы, 2001. С. 70-71.

83 Hartmann A., Albert A., Ganzera M. Effects of elevated ultraviolet radiation on primary metabolites in selected alpine algae and cyanobacteria // *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology.* - 2015. - Vol. 149. - P. 149-155.

84 Усербаева А.А., Бейсембек А.Е., Косалбаев Б.Д., Рысбекулы К., Болатхан К., Какимова А.Б., Заядан Б.К. Влияние различных концентраций СО₂ на продуктивность штаммов цианобактерий // *Вестник КазНУ, серия экологическая.* - 2019. №4 (61). С. 72-79.

85 Владимирова М.Г., Семененко В.Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. – М.: АН СССР, 1962. - 60 с.

86 Schutz K., Happe T., Troshina O., Lindblad P., Leitao E., Oliveira P., Tamagnini P. Cyanobacterial H₂ production – a comparative analysis // *Planta.* - 2004.- Vol. 218. - P. 350-359.

87 David K. .V., Apte S. K., Banerji A., Thomas, J. Acetylene reduction assay for nitrogenase activity: gas chromatographic determination of ethylene per sample in less than one minute // *Applied and Environmental Microbiology.* - 1980. - Vol. 39. - P. 1078-1080.

88 Zayadan BK, Akmukhanova NR, Userbayeva AA, Bayzhigitova AM, Kossalbayev BD. (2018) Screening of isolated and collection strains of cyanobacteria on productivity for determining their biotechnological potential, *Eurasian Journal of Ecology*, 55, 10-21. DOI: 10.26577/EJE-2018-2-823

89 Tamagnini P, Troshina P, Oxelfelt F, Salema R, Lindblad P. (1997) Hydrogenase in *Nostoc* sp. strain PCC 73120, a strain lacking a bi-directional enzyme, *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1801-1807.

90 Smith G.D., Ewart G.D., Tucker W. (1992) Hydrogen production by cyanobacteria. *Int J Hydrogen Energy*, 17, 695-658.

91 Aoyama K, Uemura I, Miyake J, Asada Y. (1997) Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis*, *J Fermentation and Bioengineering*, 8, 17-20. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(97\)87320-5](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(97)87320-5).

92 Asada Y, Koike Y, Schnackenberg J, Miyake M, Uemura I, Miyake J. (2000) Heterologous expression of clostridial hydrogenase in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942, *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr.*, 1490, 269-278.