

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҒЫЛЫМ ЖӘНЕ ЖОҒАРЫ БІЛІМ МИНИСТРЛІГІ

“Қ.И.Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық зерттеу техникалық университеті”
коммерциялық емес акционерлік қоғамы

Қ.Тұрысов атындағы Геология және мұнай-газ ісі институты
Химиялық және биохимиялық инженерия кафедрасы

Қуанышева Дариға

Мамыразакова Айгерим

Сутегін өндіретін цианобактерия штаммдарын іздеу, іріктеу және олардың өсіру
жағдайларын оңтайландыру

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

6B05101 - Химиялық және биохимиялық инженерия

Алматы 2025

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҒЫЛЫМ ЖӘНЕ ЖОҒАРЫ БІЛІМ МИНИСТРЛІГІ

"Қ.И.Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті"
коммерциялық емес акционерлік қоғамы

Қ.Тұрысов атындағы Геология және мұнай-газ ісі институты

Химиялық және биохимиялық инженерия кафедрасы



ҚОРҒАУҒА ЖІБЕРІЛДІ

Кафедрасының меңгерушісі ХиБи
қауымдастырылған профессор, х.ғ.к
Мангазбаева Р.А.

«10» маусым 2025 ж

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

Тақырыбы: «Сутегін өндіретін цианобактерия штаммдарын іздеу, іріктеу
және олардың өсіру жағдайларын оңтайландыру»

6B05101 - Химиялық және биохимиялық инженерия

Орындағандар:

Қуанышева Дариға

Мамыразакова Айгерим

Рецензент

қауымдастырылған профессор, PhD

 Болатхан К.

«05» маусым 2025 ж.

Ғылыми жетекші

қауымдастырылған профессор, PhD

 Какимова А. Б.

«05» маусым 2025 ж.

Алматы 2025

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҒЫЛЫМ ЖӘНЕ ЖОҒАРЫ БІЛІМ МИНИСТРЛІГІ

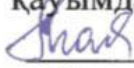
"Қ.И.Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті"
коммерциялық емес акционерлік қоғамы

Қ.Тұрысов атындағы Геология және мұнай-газ ісі институты

Химиялық және биохимиялық инженерия кафедрасы

6B05101 - «Химиялық және биохимиялық инженерия»

БЕКІТЕМІН

Кафедрасының меңгерушісі ХиБи
қауымдастырылған профессор, х.ғ.к
 Мангазбаева Р.А.

«10» маусым 2025 ж

Дипломдық жұмысты орындауға арналған
ТАПСЫРМА

Білім алушы: *Қуанышева Дарига, Мамыразакова Айгерим*

Тақырыбы: *«Сутегін өндіретін цианобактерия штаммдарын іздеу, іріктеу және олардың өсіру жағдайларын оңтайландыру»*

Академиялық мәселелер жөніндегі проректор 2025 жылғы "29" қаңтар №26 – П/Ө бұйрығымен бекітілген.

Аяқталған жұмысты тапсыру мерзімі: *«12» маусым 2025 ж.*

Дипломдық жұмыстың бастапқы деректері: *Цианобактериялардың альгологиялық және бактериологиялық дақылын алу; Цианобактерия штаммдарының жарық және қараңғы жағдайындағы сутегі шығару көрсеткіштерін анықтау*

Дипломдық жұмыста қарастырылатын мәселелер тізімі:

а) Сутектің түзілу механизмі

б) Азотсыз ортада бөлінген цианобактерия штаммдарының жасушаларын сандық есептеу

в) Оқшауланған цианобактерия клеткаларының өсуіне температураның әсері

Графикалық материалдар тізімі (міндетті сызбаларды дәл көрсете отырып): 9

Жұмыс презентациясы слайдтарда 14 көрсетілген

Ұсынылатын негізгі әдебиеттер: *90 атау*

**Дипломдық жұмысты дайындау
КЕСТЕСІ**

Бөлімдердің атауы, зерттеп дайындалатын мәселелер тізімі	Ғылыми жетекшіге ұсыну мерзімдері	Ескерту
Биосутегіні өндіруге арналған цианобактериялардың перспективалы дақылдары	15.03.2025ж	Орындалды
Зерттеу объектілері (Шонжы ыстық су көздері мен Түркістан облысы күріш алқаптары)	12.04.2025ж	Орындалды
Цианобактериялардың аксенді (таза) дақылдарын бөліп алу	01.05.2025ж	Орындалды
Цианобактерия штаммдарының қараңғы және жарық жағдайындағы сутегі шығару көрсеткіштерін анықтау	28.05.2025	Орындалды

Аяқталған дипломдық жұмыс (жоба) үшін, оған қатысты бөлімдердің жұмыстарын (жобасын) көрсетумен, кеңесшілер мен норма бақылаушының қойған қолдары

Бөлімдер атауы	Кеңесшілер, тегі, аты, әкесінің аты, (ғылыми дәрежесі, атағы)	Қол қойылған күні	Қолы
Биосутегіні өндіруге арналған цианобактериялардың перспективалы дақылдары	Какимова А. Б PhD қауым.профессор	15.03.2025ж	
Зерттеу объектілері (Шонжы ыстық су көздері мен Түркістан облысы күріш алқаптары)	Какимова А. Б PhD қауым.профессор	12.04.2025ж	
Норма бақылаушы	Какимова А. Б PhD қауым.профессор	01.06.2025ж	

Ғылыми жетекші:



Какимова А. Б

Білім алушы тапсырманы орындауға алды



Куанышева Д
Мамыразакова. А

Күні

«05» маусым 2025 ж.

АНДАТПА

Диссертация 54 беттен, 26 суреттен, 3 кестеден, 62 пайдаланылған әдебиеттерден тұрады.

Түйінді сөздер: ЦИАНОБАКТЕРИЯЛАР, БИОСУТЕГІ, СУТЕГІ ПРОДУЦЕНТТЕРІ, ЖАРЫҚ ЖАҒДАЙЫ, БИОМАССА.

Ғылыми зерттеу жұмысының мақсаты: Әртүрлі табиғи экожүйелерден сутегі өндіргіш цианобактериялардың жаңа штаммдарын бөліп алу және зерттеу.

Ғылыми зерттеу жұмысының міндеттері:

1. Әртүрлі табиғи экожүйелерден бөлініп алынған цианобактериялардың жаңа штаммдарын іздестіру және іріктеу;
2. Әртүрлі экожүйелерінен бөлініп алынған цианобактериялардың альгологиялық және бактериологиялық таза штаммдарын бөліп алу;
3. Бөлініп алынған аксеникалық цианобактерия штаммдарының сутегі бөлу потенциалын зерттеу.

Зерттеу объектілері: әртүрлі су тоғандарынан бөлініп алынған *Anabaena* sp. CBK-7, *Oscillatoria* sp. CBS-5, *Synechococcus* sp. CBV-6 штаммдары.

Ғылыми зерттеу жұмысының нәтижелері:

1. Цианобактериялардың 3 аксеникалық таза штаммдары *Anabaena* sp. CBK-7, *Oscillatoria* sp. CBS-5, *Synechococcus* sp. CBV-6 бөлініп алынды.
2. Бөлініп алынған штаммдардың нитрогеназа белсенділігі азотсыз ортадағы культивирлеу арқылы зерттелінді. Белсенділігін зерттеу кезінде *Nostocales* қатарының өкілі *Anabaena* sp. CBK-7 белсенді нитрогеназа белсенділігін көрсетті.
3. Цианобактерия штаммдарының сутегін бөлу қарқындылығына жарық қарқындылығының әсері зерттелінді. 40 фотон/мс² жарық қарқындылығында бөлініп алынған цианобактерия дақылдарының өсуі белсенді екені анықталды.
4. Цианобактериялар штамдарының сутек бөлу қарқындылығы жарық жағдайында зерттелінді. Жарықта *Synechococcus* sp. CBV-6 штаммы белсенділік танытып, сутегі жинақталуының ең жоғары жылдамдығы 0,35 мкмоль Н₂/мг хл а/сағ құрады. *Synechococcus* sp. CBV-6 штаммымен анаэробты жағдай құрылғаннан бастап 24 сағаттың ішінде сутек бөлінуі тіркелмеді. Ал, екінші тәуліктен бастап Н₂ өндірісі байқалып, ол 4 тәулік ішінде белсенді түрде бөлінді және келесі тәуліктерде аздап төмендеу тіркелді.

Практикалық маңыздылығы: Н₂ жоғары тиімді электр энергиясын өндіру үшін таза энергия көзі ретінде пайдаланылуы мүмкін. Цианобактериялардың бөлініп алынған дақылдары сутегі продуценттері ретінде қолданыла алады.

АННОТАЦИЯ

Диссертация состоит из 54 страниц, 26 рисунков, 3 таблиц, 62 использованных источников литературы.

Ключевые слова: ЦИАНОБАКТЕРИИ, БИОВОДОРОД, ВОДОРОДНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ, В УСЛОВИЯХ ОСВЕЩЕНИЯ, БИОМАССА.

Цель научно-исследовательской работы: выделение и исследование новых штаммов цианобактерий, продуцирующих водород, из различных природных экосистем.

Задачи научно-исследовательской работы :

1. Поиск и отбор новых штаммов цианобактерий, выделенных из различных природных экосистем;
2. Выделение альгологически и бактериологически чистых штаммов цианобактерий, выделенных из различных экосистем;
3. Исследование потенциала выделения водорода выделенными штаммами аксенических цианобактерий.

Объекты исследования: штаммы *Anabaena* sp. CBK-7, *Oscillatoria* sp. CBS-5, *Synechococcus* sp. CBV-6, выделенные из различных водоемов.

Методы исследования: микробиологические, альгологические, биотехнологические, физико-химические методы.

Результаты научно-исследовательской работы :

1. Выделены аксенически чистые штаммы цианобактерий *Anabaena* sp. CBK-7, *Oscillatoria* sp. CBS-5, *Synechococcus* sp. CBV-6.

2. Нитрогеназная активность выделенных штаммов изучалась путем культивирования в среде, свободной от азота. При исследовании активности представитель ряда *Nostocales Anabaena* sp. показал активную нитрогеназную активность.

3. Изучено влияние интенсивности света на интенсивность выделения водорода штаммами цианобактерий. Было обнаружено, что рост выделенных штаммов цианобактерий активен при интенсивности света 40 фотонов/мс².

4. Изучена интенсивность выделения водорода штаммами цианобактерий в условиях освещения. На свету *Synechococcus* sp. CBV-6 проявила активность и наибольшая скорость накопления водорода составила 0,35 мкмоль Н₂/мг хл а / ч. Высвобождение водорода не регистрировалось в течение 24 часов с момента создания анаэробной ситуации со штаммом *Synechococcus* sp. А со вторых суток наблюдалось производство Н₂, которое активно выделялось в течение 4 суток и зафиксировано небольшое снижение в последующие сутки.

Практическая значимость: Н₂ можно использовать в качестве источника чистой энергии. Выделенные штаммы цианобактерий можно использовать в качестве продуцентов водорода.

ABSTRACT

The dissertation 54 consists of pages, 26 figures, 3 tables, 62 references.

Keywords: CYANOBACTERIA, BIOHYDROGEN, HYDROGEN PRODUCERS, UNDER LIGHTING CONDITIONS, BIOMASS.

The purpose of the research work: to isolate and study new strains of hydrogen-producing cyanobacteria from various natural ecosystems.

The tasks of the research work:

1. Search and selection of new cyanobacteria strain isolated from various natural ecosystems.
2. Isolation of algologically and bacteriologically pure cyanobacteria strain isolated from various ecosystems.
3. Investigation of the potential of hydrogen release by isolated strains of axenic cyanobacteria.

Research objects: strains *Anabaena* sp. CBK-7, *Oscillatoria* sp. CBS-5, *Synechococcus* sp. CBB-6 isolated from different reservoirs.

Research methods: microbiological, algological, biotechnological, physico-chemical methods.

The research work results:

1. Axenically pure species of *Anabaena* sp. CBK-7, *Oscillatoria* sp. CBS-5, *Synechococcus* sp. CBB-6.
2. The nitrogenase activity of the isolated strain was studied by cultivation in a nitrogen-free medium. In the study of activity, a representative of a number of *Nostocales Anabaena* sp. CBK-7 showed active nitrogenase activity.
3. The effect of light intensity on the intensity of hydrogen release by cyanobacterial strains was studied. It was found that the growth of isolated cyanobacteria cultures is active at a light intensity of 40 photons/ms².
4. The intensity of hydrogen release by cyanobacteria strains under lighting conditions was studied. *Synechococcus* sp. CBB-6 showed activity in the light and the highest rate of hydrogen accumulation was 0.35 mmol H₂/mg hl a / h. The release of hydrogen was not recorded within 24 hours from the moment of the creation of an anaerobic situation with the *Synechococcus* sp. strain. And from the second day, H₂ production was observed, which was actively released for 4 days, and a slight decrease was recorded in the following days.

Practical significance: H₂ can be used as a clean energy source for high-efficiency electricity generation. Isolated cultures of cyanobacteria can be used as hydrogen producers.

НОРМАТИВТІК СІЛТЕМЕЛЕР

ГОСТ 4217–77. Азотты қышқылды калий.

ГОСТ 1770–74 (ИСО 1042–83, ИСО 4788–80). Зертханалық өлшеуіш шыны ыдыс. Цилиндрлер, стакандар, колбалар, түтіктер. Жалпы техникалық шарттар.

ГОСТ 4198–75 Реактивтер. Фосфор қышқылының калий.

ГОСТ 4517–87 Реактивтер. Талдау кезінде қолданылатын қосалқы реактивтер мен ерітінділерді дайындау әдістері.

ГОСТ 6825–91 (МЭК 81–84). Бокс ламинарын жарықтандыруға арналған люминесцентті шамдар.

ГОСТ 29227–91 (ИСО 835-1-81). Зертханалық шыны ыдыс. Пипеткалар градуирленген. Жалпы талаптар.

ГОСТ 8.229–2013. Өлшем бірлігін қамтамасыз етудің мемлекеттік жүйесі. Спектрофотометрлер инфрақызыл. Тексеру әдістемесі.

ГОСТ 17567–81. Газ хроматографиясы. Терминдер мен анықтамалары.

АНЫҚТАМАЛАР

Цианобактериялар – морфологиялық және физиологиялық тұрғыдан өте алуан түрлі, грам-теріс жасуша қабырғасы бар оттегі фототрофты прокариоттар.

Гетероциста – көптеген жіпшелі цианобактерияларды жақсы дамыған екі қабығы бар және құрамдас заттары бірқалыпты түрде өлуімен сипатталатын шекаралы жасушалар деп аталатын ерекше жасушалар.

Биофотолиз – судың сутегі және оттегіге микробиологиялық жүйелердің қатысуымен ыдырау процесі..

Нитрогеназа – азот фиксациялаушы прокариотты микроорганизмдерде түзілетін азотты бекіту процессін – молекулярлы азоттың аммиакка дейін тотығуын жүзеге асыратын ферменттер комплексі.

Гидрогеназа – әртүрлі қосылыстарға молекулалық сутегі қосылуының тотықсыздануының қайтымды реакциясын катализдейтін оксидоредуктаза классының ферменті.

Молекулалық сутегі – кейбір бактериялар ферментативті катализ арқылы энергия мен электрондарды қамтамасыз етуі үшін ыдырататын түссіз, иіссіз және дәмсіз, суда нашар ерігіш газ молекуласы.

ҚЫСҚАРТУЛАР

ФБС	—	фикобилисомалар
ФЭ	—	фикоэритрин
ФЦ	—	фикоцианин
АФЦ	—	аллофикоцианин
ФЭЦ	—	фикоэритроцианин
ФЖ	—	фотосинтез жүйесі
АТФ	—	аденозин три фосфат
НАДФ	—	никотинамидадениндиннуклеотидфосфат
pPHK	—	Рибосомды рибонуклеин қышқылы
PAR	—	Фотосинтетикалық белсенді сәулелену
Ar	—	аргон
CO ₂	—	көмірқышқыл газы
ChI	—	хлорофилл
PS II	—	Фотосинтетикалық жүйе II
PS I	—	Фотосинтетикалық жүйе I
Хл а	—	Хлорофилл а

МАЗМҰНЫ

КІРІСПЕ	9
1. Әдебиетке шолу	11
1.1. Биосутегіні өндіруге арналған цианобактериялардың перспективалы дақылдары	11
1.2. Биосутегі өндіруде цианобактерияларды пайдаланудың өзектілігі	12
1.3. Физиология және сутегі синтездейтін цианобактериялардың метаболизміне қоршаған орта жағдайларының әсері (жарық, температура, рН)	14
1.4. Жоғары сутегі өндіруші белсенділігі бар белгілі штаммдарға шолу (<i>Anabaena sp</i> , <i>Synechococcus sp</i> , <i>Oscillatoria sp.</i>)	16
1.5. Сутектің түзілу механизмі және фотожүйе	19
1.5.1. Фотосинтездің сутек түзілуіндегі рөлі	19
1.5.2. Биосутек синтезіне қатысатын ферменттер (<i>Nitrogenases</i> , <i>Hydrogenases</i>)	21
2. Зерттеу материалдары мен әдістері	
2.1. Зерттеу объектілері мен материалдары	26
2.2. Сынамаларды іріктеу мен дақылдау	26
2.3. Цианобактериялардың альгологиялық таза дақылдарын бөліп алу	27
2.4. Цианобактериялардың бактериологиялық таза дақылдарын бөліп алу	28
2.5. Дақылды тазарту, іріктеу әдістері мен цианобактериялардың өнімділігін арттыру	28
2.5.1. Альгологиялық әдістер	31
2.5.2. Микробиологиялық әдістер	32
2.5.3. Биотехнологиялық әдістер	33
3. Алынған нәтижелер	
3.1. Цианобактериялар мен микробалдырлардың түрлік әртүрлілігін зерттеу	35
3.2. Цианобактериялардың аксенді (таза) дақылдарын бөліп алу	37
3.3. Цианобактериялардың альгологиялық таза штаммдарын алу	38
3.4. Цианобактериялардың бактериологиялық таза штаммдарын алу	40
3.5. Азотсыз ортада бөлінген цианобактерия штаммдарының жасушаларын сандық есептеу	41
3.6. Оқшауланған цианобактерия дақылдарының өсу жағдайларын анықтау	42
3.6.1. Оқшауланған цианобактерия жасушаларының өсуіне рН әсері	43
3.6.2. Оқшауланған цианобактерия жасушаларының өсуіне температураның әсері	44
3.6.3. Оқшауланған цианобактерия штаммдарының өсуіне жарық интенсивтілігінің әсерін зерттеу	44
3.7. Цианобактерия штаммдарының жарық және қараңғы жағдайындағы сутегі шығару көрсеткіштерін анықтау	45
3.8. Цианобактерия штаммдарының қараңғы жағдайындағы сутегі шығару көрсеткіштерін анықтау	47
ҚОРЫТЫНДЫ	48
ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ	49

КІРІСПЕ

Биоэнергетика саласындағы маңызды зерттеу бағыттарының бірі – сутегі өндіретін цианобактерия штаммдарын іздеу болып табылады. Цианобактериялардың сутегі өндіру қабілетін арттыру үшін генетикалық модификацияларды қолдануға болады.

Цианобактериялар – (көк-жасыл балдырлар) ежелгі және табиғатта кең таралған, тіршілік ету жағдайларының алуан түріне бейімделу қабілеті бар, олардың әртүрлі типтегі экожүйелерде кең таралуына ықпал ететін организмдер тобы. Цианобактериялар қоршаған және қоректік ортаға тез бейімделгіш және жоғары өсу қарқынына ие болып келеді. Гидрогенді дәстүрлі әдістермен (химиялық, фотоэлектрлік) өндірумен салыстырғанда, цианобактериялар арқылы сутек өндіру коммерциялық жағынан тиімді. Цианобактериялар – жоғары өсу жылдамдығына ие, қарапайым, төмен шығынмен өсірілетін, оттек түзетін прокариотты фотосинтездеуші микроорганизмдер, сондықтан биосутек өндіруде кеңінен қолданылатын басты объектілер болып табылады. Бұл организмдер күн сәулесін және арзан бейорганикалық субстраттарды қолданып, бір уақытта фотосинтез арқылы сутек синтездеуге және бөліп шығаруға қабілетті. Кейбір штаммдар жүгері немесе соя сияқты дәстүрлі ауылшаруашылық дақылдарымен салыстырғанда әлдеқайда тез өседі. Сонымен қатар, цианобактериялар әртүрті ортада - тұщы суда, тұзды суда, тіпті сарқынды суларда да өсе алады. Бұл олардың ауылшарушылық өнімдерімен тәтті су мен жер ресурстары үшін бәсекелестігін азайтады. Алайда, барлық цианобактерия штаммдарының сутек өндіру тиімділігі бірдей емес. Өсу жағдайлары олардың өнімділігіне үлкен әсер етеді. Сондықтан, тиімді сутек өндіруші цианобактерия штаммдарын анықтау және іріктеу, сондай-ақ олардың өсуін ынталандыру үшін өсірілетін жағдайларды оңтайландыру керек. Бұл зерттеу биоэнергетика саласында жоғары әлеуетке ие, өйткені микробтық штаммдардың қорын кеңейтуге бағытталған. Зерттеу тақырыбымыз өзекті, себебі ол маңызды ғылыми және әлеуметтік мәселені шешуге бағытталған, әрі практикада қолдану арқылы жаңа іргелі білім алуға ықпал етеді.

Ғылыми жаңалығы : Алматы облысы Шонжы ыстық бұлақтарының, Түркістан мен Алматы облысының күріш егістіктеріндегі альгофлора зерттеліп, сутек түзуші цианобактериялардың анықталуында. Таксономиялық құрылым бойынша олар 4 бөлімге, 7 класқа, 7 отрядқа, 19 тұқымға және 50 түрге жатады. Цианобактерия штаммдары арқылы сутек түзілу жылдамдығына жарықтың әсері зерттелді.

Теориялық және практикалық маңыздылығы: Сутек түзуші болашағы бар цианобактерия штаммдарын зерттеу – оларды биожанармай ретінде қолдану үшін перспективалы бағыт болып табылады. Зерттеу нәтижесінде *Synechococcus sp7*, *CVB-6*, *Oscillatoria sp. CVB-5* және *Anabaena sp. CVK-7* атты үш таза (аксенді) штамм бөлініп алынды.

Ғылыми зерттеу жұмысының мақсаты: Әртүрлі табиғи экожүйелерден сутегі өндіргіш цианобактериялардың жаңа штаммдарын бөліп алу және зерттеу.

Ғылыми зерттеу жұмысының міндеттері:

1. Әртүрлі табиғи экожүйелерден бөлініп алынған цианобактериялардың жаңа штаммын іздестіру және іріктеу;

2. Әртүрлі экожүйелерінен бөлініп алынған цианобактериялардың альгологиялық және бактериологиялық таза штаммдарын бөліп алу;

3. Бөлініп алынған аксеникалық цианобактерия штаммдарының сутегі бөлу потенциалын зерттеу.

Зерттеу әдістері: микробиологиялық, альгологиялық, биотехнологиялық, физико-химиялық әдістер.

Ғылыми зерттеу жұмысының нәтижелері:

1. Цианобактериялардың 3 аксеникалық таза штаммдары *Anabaena* sp. СВК-7, *Oscillatoria* sp. CBS-5, *Synechococcus* sp7 бөлініп алынды.

2. Бөлініп алынған штаммдардың нитрогеназа белсенділігі азотсыз ортадағы культивирлеу арқылы зерттелінді. Белсенділігін зерттеу кезінде *Nostocales* қатарының өкілі *Anabaena* sp. белсенді нитрогеназа белсенділігін көрсетті.

3. Цианобактерия штаммдарының сутегін бөлу қарқындылығына жарық қарқындылығының әсері зерттелінді. 40 фотон/мс² жарық қарқындылығында бөлініп алынған цианобактерия дақылдарының өсуі белсенді екені анықталды.

4. Цианобактериялар штамдарының сутек бөлу қарқындылығы жарық жағдайында зерттелінді. Жарықта *Synechococcus* sp7.штаммы белсенділік танытып, сутегі жинақталуының ең жоғары жылдамдығы 0,35 мкмоль Н₂/мг хл а/сағ құрады. *Synechococcus* sp7.штаммымен анаэробты жағдай құрылғаннан бастап 24 сағаттың ішінде сутек бөлінуі тіркелмеді. Ал, екінші тәуліктен бастап Н₂ өндірісі байқалып, ол 4 тәулік ішінде белсенді түрде бөлінді және келесі тәуліктерде аздап төмендеу тіркелді.

5. Цианобактериялар штамдарының сутек бөлу қарқындылығы қараңғы жағдайында зерттелінді. Қараңғы жағдайда *Anabaena variabilis* A-1 штаммы жоғары белсенділік көрсетіп, 4,4 мкмоль Н₂ / мг хл а/сағ құрады. Яғни, гидрогеназа белсенділігі жоғары екенін танытып, 72 сағатта ең жоғары сутек бөлу қабілетін байқалды.

Практикалық база: Қ.И.Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті (ҚазҰТЗУ), әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті **Биология және биотехнология факультетінің** биотехнология зертханасында жүргізілді.

1. Әдебиетке шолу

1.1. Биосутегі өндіру үшін цианобактериялардың перспективалы дақылдары

Цианобактериялар – ең көне тірі ағзалар, олар 3,5 миллиард жыл бойы жер бетінде өмір сүріп, әртүрлі тіршілік ету орталарында таралған, соның ішінде ыстық бұлақтар, жоғары тұздылығы бар көлдер және поляр аймақтар сияқты экстремалды мекендерде де кездеседі[1]. Оксигенді фотосинтезге қабілетті тек цианобактериялар ғана, олар күн энергиясын пайдаланып, суды O_2 және протондарға ыдыратыды. Табиғатта, тіпті экстремалды климаттық жағдайларда да, цианобактериялар кең таралған және олар әртүрлі өмір түрлеріне ие. Цианобактериялардың көптеген штаммдары мен түрлері сутегі өндіру қабілетін зерттеу объектісі болып табылады. Цианобактериялар сутегі өндіруге арналған болашағы зор микроорганизмдер болып табылады. Дәстүрлі сутегі өндіру әдістерімен (химиялық, фотоэлектрлік) салыстырғанда, цианобактериялар арқылы сутегі өндіру коммерциялық жағынан тиімді болып саналады[2]. Қазіргі уақытта кем дегенде 14 цианобактерия түрінің сутегі өндіре алатыны белгілі, олар түрлі өсіру жағдайларында сутегі өндіріп отырады. Сутегін метаболизмі жөнінде ең жақсы зерттелген тұқымдары – *Synechococcus*, *Oscillatoria*, *Synechocystis*, *Anabaena* және *Nostoc* болып табылады.

Цианобактериялар кең ауқымды тіршілік ету орталарында өмір сүре алады. Олар су айдындарында, құрлықта және қатал қоршаған ортада өмір сүре алады. Мысалы, Антарктикадағы суық көлдер немесе сілтілі сода көлдері, рН деңгейі 9,5-тен 11-ге дейін өзгертін жерлерде *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Microcystis* және *Anabaena* сияқты цианобактериялар кең ауқымды ортада кездеседі. Бұрын Антарктика полярлық шөлдерде тіршілік аз деп есептелінген[3]. Цианобактериялардан сутегі өндіру, әсіресе жіпше тәрізді және азот фиксациялайтын түрлерінің зерттелуі жан-жақты жүргізілген. Олардың негізінен фотосинтетикалық вегетативті жасушаларынан басқа, азот тапшылығына ұшыраған кезде олар гемоциттер - азотты фиксациялауға арналған мамандандырылған жасушаларда өндіреді[4]. Себебі, сутегі – азоттың NH_3 -ке дейін төмендеу реакциясының жанама өнімі, ал гетероциттер фотобиологиялық сутегі өндірісінің маңызды құрамдас бөлігі болып табылады. Цианобактерия жасушаларының сутекті бөлу процесінің тиімділігі көптеген факторларға тәуелді болады, яғни бұл оның ауқымды өндірісі үшін ерекше маңызды. Жарық қарқындылығынан, ортаның температурасы мен рН – тан маңызды факторлардан басқа, молекулалық оттегінің болуы, тұздылығы, қоректік және газ тәріздес орталардың құрамы болады[5]. Олар суды фотолизге ұшыратып, оттегі мен сутегі бөле алады. Көптеген түрлері азот фиксациясына бейім және экстремалды ортада да тіршілік ете алады.

1.2. Биосутегі өндіруде цианобактерияларды пайдаланудың өзектілігі

Биосутегі – бұл болашақтағы экологиялық таза энергия көзі ретінде қарастырылатын энергия ресурсы. Ол жану кезінде тек су бөлінетін газ ретінде қолданылып, қоршаған ортаға ешқандай зиян келтірмейді[6]. Сонымен қатар, биосутегі метаболизмінің биологиялық жолмен алынып, дәстүрлі әдістерге қарағанда экологиялық таза болуы да үлкен маңызға ие. Цианобактериялар – фотосинтезге қабілетті біржасушалы прокариоттар, олар күн энергиясын пайдаланып, су молекулаларын оттегі мен сутегіне ыдырата алады[7]. Сонымен қатар, цианобактериялар азотты фиксациялау қабілетіне ие, яғни бұл процессте сутегі жанама өнім ретінде бөлінеді. Бұл қасиет цианобактерияларды сутегі өндіретін ең перспективалы организмдер қатарына қосады. Фотосинтетикалық цианобактериялар күн сәулесін пайдаланып, судан сутегі өндіріп, оттегіні бөледі, осылайша экологиялық таза энергия көзіне айналады.

Цианобактериялардан биосутегі өндіру тек теориялық тұрғыдан ғана емес, практикада да маңызды. Бұл зерттеулер әртүрлі цианобактериялар тұқымдастарын зерттеп, олардың сутегі өндірісінің тиімділігін арттыру жолдарын анықтауға мүмкіндік береді. Сонымен қатар, цианобактериялардың генетикалық өзгерістер арқылы сутегі өндірісін жақсарту бағытындағы зерттеулерде белсенді жүргізілуде. Мысалы, *Anabaena*, *Synechocystis*, *Nostoc* сияқты түрлердің генетикалық модификациясы олардың сутегі өндірісін бірнеше есе арттырады[8]. Цианобактериялардың биосутек өндірісін зерттеудегі модельдік объектілерінің бірі – *Synechocystis* штамдары болды. Соның ішінде PCC 6803 штаммымен көптеген зерттеулер жүргізілген болатын. *SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803* – бұл көптеген зерттеулерде кеңінен қолданылатын цианобактерия бір түрі болып табылады. Ол фотосинтез процесі арқылы сутек шығара алатын қабілетке ие[9].

Lambert және *Smith* мәдени коллекциялардан алынған бес гетероцитті цианобактерия штаммы арқылы сутегі өндіру бойынша алғашқы зерттеу жүргізген[10]. *Berchtold* және *Bachofen* диазотрофты жағдайда 71 цианобактериялы дақылды байытып, оларды 1% CO₂ және жарық жағдайында 48 сағат бойы аргон атмосферасында сутегі өндіру бойынша тексерген[11]. Штаммдардың көбісі сутегін өндіре алған. Соңғы уақытта, *Allahverdiyeva* және оның серіктестері Балтық теңізі мен Финляндия көлдерінен бөлініп алынған 400 – ге жуық цианобактерия штаммдарын зерттеп, олардың сутек өндіру қабілетін бағалаған. Зерттеу нәтижесінде шамамен 50% штаммдар сутегін өндіру қабілетіне ие екені анықталған[12].

Кесте 1 – Сутегіні алудың дәстүрлі және микробиологиялық әдістері

<i>Артықшылықтар</i>	<i>Цианобактериялар арқылы алынатын биосутегі</i>	<i>Дәстүрлі әдістер (қазба отындар, электролиз)</i>
Қоршаған ортаға әсері	Цианобактериялар сутегін өндіру кезінде тек су шығарады, яғни олар экологиялық таза және көмірқышқыл газын бөлмейді.	Көптеген дәстүрлі әдістер (қазба отындарды жағу) CO ₂ және басқа зиянды шығарындыларды бөлетін әсерге ие.
Өндіріс жылдамдығы мен тиімділігі	Цианобактериялар тез өсіп, өздерінің өнімділігін арттыра алады, арнайы шарттарда сутегі өндіруді тиімді іске асырады.	Дәстүрлі әдістердің тиімділігі көбінесе жоғары энергия шығындарына және ұзақ уақытқа тәуелді болады.
Табиғи ресурстарды пайдалану	Цианобактериялар табиғи ресурстарды әсіресе күн сәулесін пайдаланады. Бұл экологиялық тұрғыдан жақсы әсерін тигізеді.	Дәстүрлі әдістер қазба орындарды (мұнай, табиғи газ) пайдалану арқылы жүргізіледі, бұл табиғи ресурстардың таусылуына себеп болады.
Құны мен технологиялық күрделілігі	Цианобактерияларды өсіру үшін күрделі жабдықтар мен қымбат технологиялар қажет емес, арзан және оңай өсіруге болады.	Дәстүрлі әдістер қымбат технологиялар мен күрделі жабдықтарды қажет етеді, мысалы, жоғары температура жағдайында жұмыс істеу.

Дәстүрлі энергия көздерінің теріс жақтары артуына байланысты микроорганизмдерден алынатын сутегі өндірісі тез арада қарқынды зерттеу нысанына айналды. Сутек продуценттері – цианобактерия штаммдарын анықтап, сутек бөлу мүмкіндіктерін арттыру қазіргі кезде маңызды болып табылады[13].

1.3. Физиология және сутегі синтездейтін цианобактериялардың метаболизміне қоршаған орта жағдайларының әсері (жарық, температура, рН)

Цианобактериялар – фотосинтез жасайтын прокариотты микроорганизмдер. Олар су ортасында, топырақта, тіпті экстремалды жағдайларда да өмір сүре алады. Бірақ олардың тіршілігі қоршаған орта факторларына қатты тәуелді. Цианобактериялар – фотосинтетиктер, яғни жарық олардың басты энергия көзі болып табылады және жарық қарқындылығы фотосинтездің тиімділігіне тікелей әсер етеді[14]. Тым әлсіз жарық фотосинтезді шектесе, тым күшті жарық фотожүйелерге зақым келтіруі мүмкін. Цианобактериялардың көптеген түрлері сутекті жарық және қараңғы орталарда бөлуге қабілетті. Мысалы, цианобактерияның *Spirulina platensis* түрі жарықтың болмауы және анаэробизм жағдайында 32°C температурада белсенді түрде сутек бөледі. *Synechococcus* Nag PCC 7942 24 түрі де қараңғы ортадағы анаэробты жағдайда сутегін бөлуге бейім болды[15]. Жарықтандыру – жарықтың қарқындылығы мен ұзақтығы фотосинтез процессінің жүру жылдамдығына, яғни биосутегінің өндірілуіне қатты әсер етеді. Әрбір цианобактерия түрінің өзіне тән оптималды жарық қарқындылығы бар, ол жағдайда фотосинтездің тиімділігі максималды болады. Мысалы, терең су қоймаларында өмір сүретін цианобактериялар әлсіз жарық жағдайында фотосинтез жасауға бейімделген, ал жер бетінде тіршілік ететіндерді жоғары жарық қарқындылығына жақсы төзеді. Себебі, әртүрлі цианобактериялардың тіршілік ету ортасына байланысты бұл мәндер өзгеріп отырады[16]. Тым жоғары жарық қарқындылығы өте жоғары болса, онда цианобактериялар фотодеструкция құбылысына ұшырайды. Ал тым төмен жарық қарқындылығында, егер, жарықтың қарқындылығы төмен болса, фотосинтез процесі баяулайды, себебі цианобактериялар қажетті энергияны ала алмайды. *Nostoc* – тұщы су қоймаларында кездесетін цианобактериялар, *Nostoc* түрінің өсуі үшін төмен жарық қарқындылығы өте қолайлы. Бұл цианобактерия терең су қабаттарында немесе көлеңкелі ортада өмір сүре алады[15].

Цианобактериялар – фототрофты организмдердің ең кең тобы. Олар қараңғы үңгірлерді, судағы түрлі қатты субстраттарды, биік таулы жартастағы биотоптарды мекендейді[17]. Цианобактериялар температурасы қоршаған ортаға тәуелді емес термалды көздерде де кездеседі. Олар жылы және ыстық су көздерінде және жоғары температуралы 30 – дан 80 ° C дейінгі аралықтағы су қоймаларда кең таралған. Көптеген цианобактериялар сулар мен лайда, лайлы тұнбаларда өмір сүреді және цианобактериялардың кейбір түрлері вулкандардың баурайларын игеруге белсенді қатысады[18]. Цианобактериялардың өсуі мен белсенділігінің артуы немесе кемуі үшін оңтайлы температура қажет және түрлері мен штаммдарына байланысты температура өзгеруі мүмкін. Ал температура өзгерген сайын фотосинтез бен биосутектің көлеміне әсер етеді. Цианобактериялардың көпшілігі орташа температурада (20–30°C) белсенді өседі және кейбір түрлері термалды көздерде өмір сүре алады (50°C-тан жоғары)[19]. Әрбір цианобактерия түрінің өзіне тән оптималды температурасы болады. Тұщы су қоймаларында кездесетін цианобактериялар, әдетте, 20–30°C аралығында

жақсы дамиды. Ал термофильді түрлері – *Thermosynechococcus* немесе *Trichodesmium* 40°C температурада тіршілік ете алады[20]. Төмен температураның әсері 0-10°C аралығында болған жағдайда, көптеген цианобактериялар фотосинтезді баяу жүргізеді, ал 0°C төмен температурада олардың тіршілігі тоқтауы мүмкін. Мысалы, психрофильді немесе суыққа төзімді цианобактериялар (*Chroococcidiopsis*) , өте төмен температураларға бейімделген және олар терең мұхиттар мен поляр аймақтарында кездеседі.

Температура – цианобактериялардың өсуі мен метаболизмі үшін ең маңызды факторлардың бірі болып саналады. Цианобактериялар жоғары температурада басқа балдырларға қарағанда жақсы өсіп, олардың токсиндері жоғары өсу жылдамдығымен артатыны көрсетілген[21]. Температураның өзгеруі жиі фотосинтезбен байланысты екінші метаболиттердің өсуіне оңтайлы температурамен байланысты болып келеді. Сол сияқты, жарық пен температура цианобактериялардың өсуі мен пигменттердің жинақталуында маңызды рөл атқарады.

Көптеген цианобактерия түрлері үшін сутегі өндіруге арналған оңтайлы температура 30 - 40 °C аралығында болып табылады және бұл көрсеткіш цианобактерия түріне байланысты өзгереді. Мысалы: *Nostoc* бактериясы 22 °C температурада өсірілгенде 32 °C – қарағанда сутегіні көбірек өндірген, ал *Nostoc muscorum* SPU004 үшін сутегі өндірудің оңтайлы температурасы 40 °C болған. Ал *Anabaena variabilis* SPU003, керісінше, 30 °C температурада сутегіні ең жоғарғы мөлшерде өндіреді.[22]. *Chlorella vulgaris* пен *Anabaena sp.* PCC штаммының өсуі мен бәсекелестігіне температура, жарық, қоректік заттар мен рН деңгейінің өзара әсері ортогоналдық жобалау әдісі арқылы бағаланды. Климаттың өзгеруіне байланысты цианобактериялар санының артуы әбден мүмкін, бұл ішінара температураның жоғарылауына байланысты олардың салыстырмалы санының өзгеруімен түсіндіріледі[23].

Цианобактериялардың бөлініп алынған дақылдарын өсіру жағдайларын оңтайландыру (рН деңгейі). Көптеген цианобактериялар бейтарап немесе сәл сілтілі ортада (рН 7-9) жақсы дамиды. Тым қышқыл немесе сілтілі орта олардың өсуін тежеп отырады және рН өзгерісі олардың ферменттерінің белсенділігіне әсер етеді. Цианобактериялар әртүрлі температуралық режимдерге бейімделген. Олар психрофильді (суықты жақсы көретін), мезофильді (қалыпты температурада тіршілік ететін) және термофильді (жоғары температураға төзімді) болып бөлінеді. Цианобактерияларды өсіру кезінде жоғары нәтижелерге қол жеткізу үшін ортаның рН көрсеткіші олардың өсуіне қолайлы болуы керек. Қоректік орталарды дайындау кезінде сутегі иондарының концентрациясын бақылау қажет[24].

Температура өсу жылдамдығына, фотосинтез қарқындылығына және биомасса түзілуіне тікелей әсер етеді. *Spirulina platensis* сияқты түрлер 35-38°C аралығында жақсы дамиды. Ал кейбір термофильді цианобактериялар ыстық бұлақтарда 50 – 60°C дейін тіршілік ете алады. рН – орта қышқылдығының немесе сілтілілігінің көрсеткіші[25].

Цианобактериялар көбінесе бейтарап (pH 6.5-7.5) және сәл сілтілік (pH 7.5-9.5) ортада жақсы дамиды. Олар ферменттік белсенділік пен фотосинтезге тәуелді, ал бұл процестер pH өзгерісіне өте сезімтал. Мысалы, *Spirulina* түрлері pH 8.5-10.5 арасында өте жақсы дамиды, сондықтан оларды өнеркәсіптік мақсатта қолдану кең таралған[25].

Температура мен pH – өзара байланысты екі экологиялық фактор. Температура артқан сайын ферменттердің белсенділігі де өседі, алайда бұл жағдай тек pH мәні қолайлы болғанда ғана тиімді болады. Сонымен қатар, pH жоғары болғанда көмірқышқыл газының формасы (CO_2 , HCO_3^-) өзгереді, бұл фотосинтездің қарқынына әсер етеді[26]. Егер температура немесе pH тым жоғары немесе тым төмен болса, жасуша метаболизмі бұзылып, өсу процесі тежеледі, ал кейде өлімге әкелуі мүмкін.

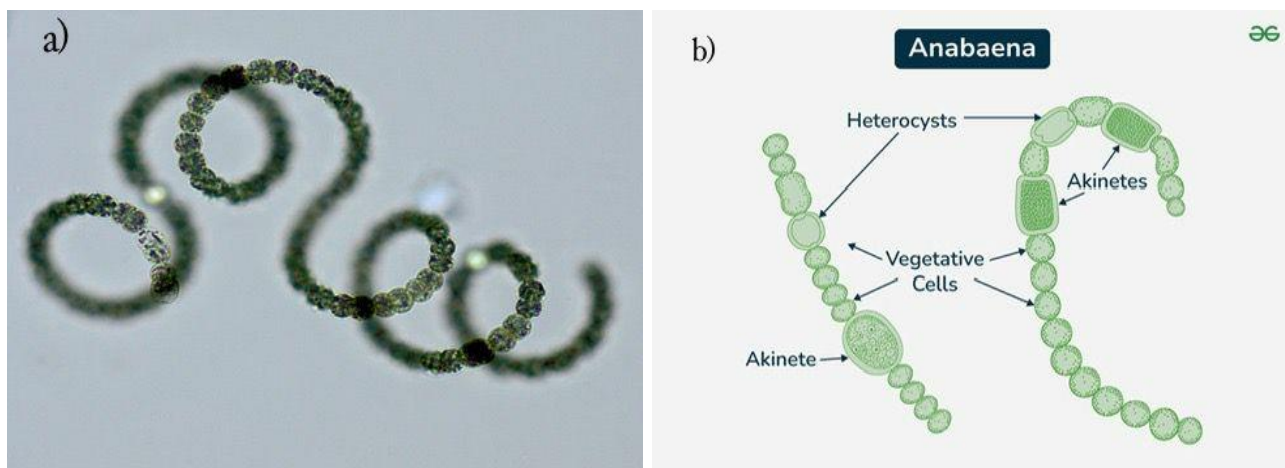
Сутегі түзілуіне pH әсері, яғни төмен pH (қышқыл орта) жағдайда:

- Гидрогеназа ферментінің белсенділігі төмендейді
- Клеткалар стресске ұшырайды
- Өсу тежеледі.

1.4. Жоғары сутегі өндіруші белсенділігі бар белгілі штаммдарға шолу (*Anabaena* sp, *Synechococcus* sp, *Oscillatoria* sp)

Anabaena – алғаш рет 1830-1850 жылдары, яғни 19- ғасырдың ортасына қарай зерттеліп басталған. Осы жылдары микроскопия қарқынды дамып және цианобактериялар алғашында көк – жасыл балдырлар ретінде тіркелді. *ANABAENA* туралы алғаш швед ботанигі және микробиологы *Elias Magnus Fries* бастапқыда оны жасыл өсімдік ретінде қарастырып, кейін 20 ғасырда бактерия екенін анықтаған ғалым[27]. Кең таралған бір түрі *Anabaena* spp. – цианобактериялардың азотты бекітетін түрлері сутекті өндіру белсенділігі үшін жақсы зерттелген. *Anabaena* spp. – азот жетіспеушілігі кезінде сутектің көп мөлшерін өндіруге қабілетті және оның цилиндрикасы сутектің көп мөлшерін шығарады. *Anabaena* жіп тәрізді колониялар құрайды, ал жіптер бір-бірімен тізбектеліп орналасқан жасушалардан тұрады.

Anabaena атмосфералық азотты (N_2) байлап, оны өсімдіктер сіңіре алатын түрге айналдырады. Бұл қасиет топырақты азотпен байытуға көмектеседі[27]. Көбінесе су бетінде гүлдену (су гүлдеуі- *water bloom*) құбылысын туындататын негізгі организмдердің бірі. *Anabaena* бейтарап немесе сәл сілтілі, жылы ортада жақсы дамиды. *Anabaena* – экожүйе үшін де, адам қызметі үшін де маңызды ағзалардың бірі. Оның азот фиксациялау қабілеті мен қолайсыз ортаға бейімделуі оны биология мен ауыл шаруашылығы саласында бағалы етеді[28].



1-сурет – Цианобактерия штаммы *Anabaena*: а) жіп тәрізді колония пішіні; б) гетероциста мен вегетативті жасушалар құрылымы

Anabaena үшін тұрақты температура мен рН деңгейі – оның өсуі мен метаболизміне қатты әсер ететін негізгі экологиялық факторлар[29]. Мысалы, оңтайлы температура 25-30°C, кейбір штаммдар 40°C -қа дейін шыдай алады, бірақ өсуі баяулайды немесе тоқтайды.

Oscillatoria sp. - бұл жіптәрізді (филаментті) цианобактериялар туысына жататын фотосинтездеуші микроорганизмдер. Олар табиғи және жасанды су көздерінде, топырақта және ылғалды ортада жиі кездеседі[30].

Кесте 2 – *Oscillatoria sp.* цианобактериясының физиологиялық ерекшеліктері

Ерекшеліктері	Сипаттамасы
Тіршілік ету ортасы	Тұщы, ащы және теңіз суында, кейде ылғалды топырақта
Құрылысы	Көпжасушалы жіптерден тұрады
Қозғалысы	Тербелмелі қозғалыс арқылы (жіптің ұшымен алға-артқа қозғалады)
Фотосинтез	Хлорофилл <i>a</i> және фикобилин пигменттері арқылы

Oscillatoria sp. - хлорофилл *a* және фикобилин пигменттерінің көмегімен жарық энергиясын пайдаланып, көмірқышқыл газын органикалық қосылыстарға айналдырады және бұл процесс нәтижесінде оттегі бөлініп отырады. *Oscillatoria sp.* жіптері тербеліп немесе сырғып қозғала алады. Ол қозғалыс су бетіндегі жарыққа бағытталуға көмектеседі. Кейбір түрлері атмосферадағы молекулалық азотты (N_2) байланыстырып, аммиакқа айналдырады, ол экожүйедегі азот айналымының маңызды бөлігі. *Oscillatoria sp.* жоғары температурада, тұздылығы

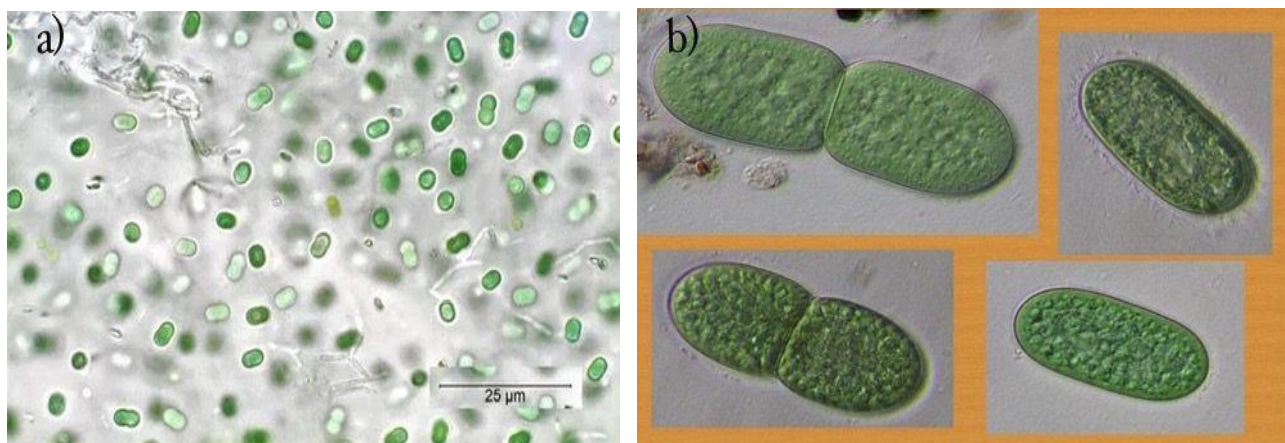
жоғары суларда өмір сүре алады. Осы қасиеттері биотехнология саласында қолдануға қолайлы етеді[30,31].

Oscillatoria оттекті фотосинтез жүргізетін цианобактерия. Ол күн сәулесін пайдаланып, көмірқышқыл газын және суды глюкоза мен оттекке айналдырады. Оның құрамында хлорофилл *a* фикоцианин, аллофикоцианин сияқты жарықты сіңіретін ферменттер болады[32]. *Oscillatoria* түрлері атмосфералық азотты (N₂) азот жетіспеген жағдайда аммиакқа айналдыра алады. Бірақ олар *Anabaena* немесе *Nostoc* сияқты гетероциста (арнайы азотфиксациясы жасушасы) түзбейді. Бұл цианобактерия ұзын, бұтақталмаған жіптер (трихомдар) түрінде өседі. Олар бір бірінің үстінде орналасқан жасушалардан тұрады. Трихомдар қозғала алады, бұл қасиет бактерия атауының шығуына себеп болған (лат. *Oscillare* - «тербелу»)[33]. Көптеген *Oscillatoria* түрлерінде газ вакуольдері болады және олар бактерияның суда қалқуына немесе түсуіне мүмкіндік береді[34].

Synechococcus sp. – бұл фотосинтезге қабілетті цианобактериялардың туысы, және олар биосутек (биологиялық сутек) өндірісінде болашағы зор микроорганизмдер ретінде қарастырылады. Олар жарық энергиясын пайдаланып, судан сутек газын шығара алады[35]. Бұл процесс негізінен нитрогеназа немесе гидрогеназа ферменттерінің көмегімен жүзеге асады. *Synechococcus* негізінде биосутек өндірісінің ерекшеліктері: ол күн сәулесін тиімді пайдаланып, тұрақты фотосинтез жүргізе алады. Ғалымдар *Synechococcus* штаммдарын гендік инженерия арқылы модификациялап, сутегі өндірісін арттыра алады. Кейбір түрлері оттегі болмаған жағдайда сутек өндіру қабілетіне ие[36].

Физиологиялық құрылымы: Олардың пішіні шар тәріздес немесе таяқша тәрізді болып келеді. Өлшемі көбінесе 0.8-1.5 мкм шамасында, өте ұсақ прокариоттар қатарына жатады[37]. Жасуша қабырғасы грамм-теріс типте. Қабырғасы сыртқы мембранамен қоршалған және гликопротеидтерден тұратын шырышты қапшықпен (слизь) жабылған болуы мүмкін. *Synechococcus* – қалыпты және тропиктік мұхиттардағы прокариоттық автотрофты пикопланктонның ең маңызды компоненттерінің бірі. Бұл туыс алғаш рет 1979 жылы сипатталған[38,39].

Көптеген зерттеу жұмыс нәтижелері бойынша, температура, жарық деңгейі және минералды фосфор концентрациясы сияқты абиотикалық факторлар *Synechococcus* биомассасымен функционалдық күйіне әсер етеді. Қазақстанның түрлі экожүйелерінен алынған фототрофты микроорганизмдер арасында *Synechococcus sp.* штаммы да бар. Бұл штаммдар морфологиялық, физиологиялық және молекулалық сипаттамалар бойынша зерттеліп, биотехнологияда қолдану мүмкіндіктері қарастырылуда. Зерттеу нәтижелері бойынша, бұл штаммдар сутегі өндірісінде жоғары өнімділік көрсеткен[40]. *Synechococcus sp.* штаммдары генетикалық инженерия және мутагенез әдістері арқылы сутегі өндірісін арттыру мақсатында зерттелуде.



2-сурет – *Synechococcus elongatus*: микроскоптағы 100 (a) және 200 (b) есе үлкейтілген көрінісі

1.5. Сутектің түзілу механизмі және фотожүйе

1.5.1. Фотосинтездің сутек түзілуіндегі рөлі

Цианобактериялар оксигенді фотосинтез жасайды, яғни олар суды ыдырата отырып, оттегін (O_2) бөліп шығарады. Бұл процесс өсімдіктердегі фотосинтез процесіне ұқсас болып келеді[41].

- Жарық фазасы – су молекуасын ыдыратып, оттегін (O_2) бөледі және күн сәулесінің энергиясын пайдаланып, химиялық энергияға (АТФ) және тотықсыздандырғыш зат (НАДФН) айнадырады.
- Қараңғы фазасы (Кальвин циклі) – олар цитоплазмада жүреді және жарық фазасынан жиналған энергияны пайдаланып, CO_2 - дан органикалық заттар түзеді. Яғни, көмірқышқыл газын көмірсуларға айналдырады[42].

Фотосинтез процесі тек жарық болған жағдайда ғана жүреді, бірақ қараңғы фазасы жарыққа тікелей тәуелді емес. Цианобактериялар оттегін бөліп шығарған алғашқы тіршілік иелері болғандықтан, олар Жер атмосферасын оттегімен байытуда маңызды рөл атқарды. Цианобактериялар оттек бөліп шығаратын фотосинтезбен сипатталатын толығымен қалыптасқан фотосинтез аппаратына ие. Басқа да оттек бөлетін бактериялар сияқты, цианобактериялардың фотосинтездейтін аппараты екі фотожүйемен (ФЖ I және ФЖ II) ұсынылған, олар электрондарды тасымалдау тізбегімен (электрондардың Z-сұлбасы) байланысқан. Бұл жерде ФЖ II фотолиз жүйесімен — H_2O -ны ыдырататын және фотосинтез кезінде электрон доноры болып табылатын жүйемен тығыз байланысқан[43]. Кейбір цианобактериялар (мысалы, *Oscillatoria*, *Microcoleus* туыстарының өкілдері) белгілі бір жағдайларда аноксигендік фотосинтезге (яғни, оттек бөлінбейтін фотосинтез) көше алады. Бұл жағдайда тек ФЖ I жұмыс істейді, ал электрон доноры ретінде су емес, H_2S , H_2 және басқа қосылыстар пайдаланылады. Мұндай бір ғана ФЖ арқылы жүретін фотосинтез — күлгін, жасыл және басқа аноксигендік фототрофты бактерияларға тән, және кейде ол оттек бөлетін фотосинтезден эволюциялық тұрғыда ертерек пайда болған деп есептеледі. 20-ғасырдың соңында оттек бөлетін фототрофты бактериялар —

прохлорофиттер (яғни жасыл өсімдіктердің хлоропласттарының арғы тегі) табылды. Бұл организмдердің жасушалары өсімдіктер мен көптеген балдырлардікіндей хлорофилл *a* және *b* пигменттерін қамтыды, алайда фикобилиндер болмады. Кейінірек молекулалық-генетикалық деректердің негізінде олар цианобактериялар құрамына қосылды[44]. Цианобактерияларда фотосинтездің жарық фазасы фотофизикалық және фотохимиялық процестерден тұрады. Бұл процестер жарық энергиясын қажет етеді және тилакоидтардың екі түрінің (стромалық және граналық) мембраналарында жүзеге асады. Осы мембраналарда фотосинтетикалық жүйелер – фотожүйе I (ФС I) және фотожүйе II (ФС II), сондай-ақ электрон тасымалдау тізбегінің (ЭТТ) компоненттері мен АТФ-синтаза кешені орналасқан. Фотожүйелер өзара байланысқан, бірақ олар ақуыздық құрамы, пигменттік құрамы және осы пигменттердің оптикалық (спектрлік) қасиеттері бойынша бір-бірінен ерекшеленеді. ФС I стромалық және граналық тилакоидтарда, ал ФС II негізінен граналық тилакоидтарда шоғырланған[45].

Күн энергиясы – фотосинтез нәтижесінде миллиардтаған жылдар бойы жиналып, жердегі негізгі энергия көзіне айналған. Осыған байланысты, суды тотығуға қабілетті фотосинтездеуші ағзалардың эволюциясы Жер тарихындағы ең маңызды оқиғалардың бірі болып табылады[46]. Бұл ағзаларда фотожүйе II күн сәулесін пайдалана отырып, суды ыдырату реакциясын жүзеге асырады – бұл термодинамикалық тұрғыдан тиімсіз процесс, алайда нәтижесінде судан электрондар мен протондар бөлініп шығады, ал оттегі жанама өнім ретінде түзіледі. Өз кезегінде, оттегінің жиналуы аэробты атмосфераның қалыптасуына алып келеді. Фотосинтездің арқасында күн энергиясы көмір, мұнай және аз түрінде жиналады. Бұл отын түрлері қарқынды пайдаланылып, тапшылыққа ұшырап жатыр. 2005 жылы әлемдік энергия тұтынуының 86% - қазба отындарына, 37% - мұнай, 23% - көмір және 26% - табиғи газдарға тиесілі болды[47].

Фотосинтез арқылы биологиялық жолмен сутегі өндіру – химиялық және электрохимиялық технологияларға балама бола алатын перспективалы әдіс. Біріншіден, күн энергиясы мен су – арзан әрі қалпына келетін энергия көздері. Екіншіден, H_2 - ні жағу таза процесс, нәтижесінде тек су түзіледі, бұл оны экологиялық тұрғыдан тиімді етеді[48]. Жарық фазасында жарық сіңіргіш пигменттер (бактерио) хлорофиллдер мен каротиноидтар антенналар ретінде әрекет етіп, күн сәулесін сіңіреді. Бұл жарық энергиясы фотохимиялық реакция орталықтарына жетіп, бірнеше сатылы электрон тасымалдау процестері арқылы химиялық энергияға айналады. ФЖ II реакциялық орталығы бірнеше тотығу – тотықсыздану компоненттерін қамтиды, соның ішінде хлорофилл *a* – ның ерекше формасы бар[49].

1.5.2. Биосутек синтезіне қатысатын ферменттер (*Nitrogenases, Hydrogenases*)

Сутегі алмасуына қатысатын цианобактерия ферменттерінің екі тобы бар: азотфиксация ферменттері (нитрогеназалар, N_2ase) және сутегі ферменттері (гидрогеназалар, H_2ase) [50].

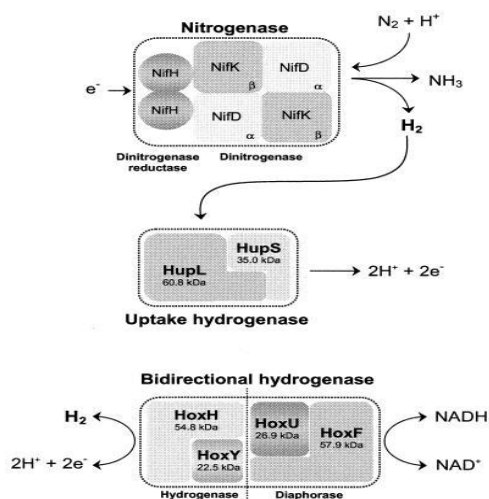
Нитрогеназалар құрамындағы кластерлердің құрылымына байланысты көптеген қызмет атқарады және ішкі кластерлерінің жұмысын тікелей гендер бақылап отырады. Нитрогеназа молекулалық азотты бөліп, оны аммиакқа айналдыра алады. Бұл процесс энергияны (АТФ) көп қажет етеді және анаэробты жағдайда жүреді, өйткені нитрогеназа оттегіге өте сезімтал болып келеді [51]. Цианобактерия нитрогеназасы екі негізгі ақуыз бөлігінен тұрады:

Fe-ақуыз (ферредоксинге ұқсас) – *nifH* генімен кодталады, электрондарды тасымалдайды.

MoFe-ақуыз – *nifD* және *nifK* гендерімен кодталады, азотты бөлу реакциясын тікелей катализдейді [52].

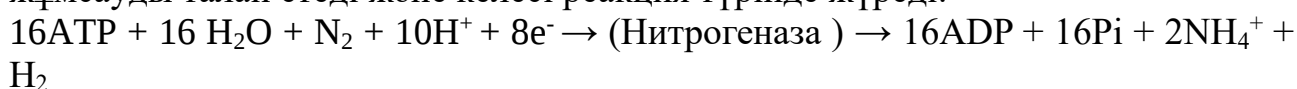
Цианобактериялардың әрқайсысында ерекше металл кофакторлар болады және олар үш түрлі нитрогеназа болып бөлінеді. Мысалы: біріншісі – молибден (Mo) ең кең таралған түрі, екіншісі – ванадий (V), үшіншісі – темір (Fe). Нитрогеназа кешенін құрайтын ферменттер *nif* ген кластерімен реттеледі. Мысалы: *nifH* – кіші Fe-ақуыз; *nifD*, *nifK* – MoFe-ақуыз компоненттер [53].

Нитрогеназа – сутек өндірісіне жауапты басты фермент болып табылады. Ол генетикалық өзгерістер арқылы бұл ферменттің белсенділігін арттыру цианобактериялардың сутек шығару мүмкіндігін арттыруға көмектеседі. Жаңа гендерді енгізе отырып, яғни, цианобактериялардың жасушаларына сутек өндірісін жақсартуға мүмкіндік беретін жаңа гендерді енгізу. Мысалы: сутек өндірісі үшін қажетті ферменттерді тиімді өндіруге мүмкіндік беретін генетикалық өзгерістерді енгізу. Нитрогеназалар археялар мен бактерияларда кездеседі және Жердегі азот айналымы үшін маңызды. Олар N_2 - ні аммиакқа дейін тотықсыздандырып, қосалқы өнім ретінде сутегі өндіреді. Нитрогеназа екі компоненттен тұрады: динитрогеназа және динитрогеназа -редуктаза (Fe - ақуыз), олардың екеуінде де бірегей металл орталықтары бар. Нитрогеназа көмегімен сутегі өндіру үдерісі N_2 қалпына келуіне тәуелсіз болғандықтан, N_2 - ні Ar (аргон) газына алмастыру протондарды қалпына келтіруге бағытталған электрон ағынын арттырып, N_2 қалпына келуін болдырмауы мүмкін. Бұл әдіс тек N_2 өндіру үшін тиімді, бірақ жоғары операциялық шығындарға әкелуі мүмкін [54].



4-сурет – Сутегі алмасуында тікелей рөл атқаратын цианобактерия ферменттері.

Барлық зерттелген азотфиксациялайтын штаммдарда сутегін тұтынушы гидрогеназа бар болса, екібағыттағы фермент азотфиксациялайтын және фиксацияламайтын цианобактериялардың екеуінде де кездеседі. Аммиакқа дейін азотты фиксациялау барысында сутегі бөлініп шығады. Бұл үдеріс АТФ жұмсауды талап етеді және келесі реакция түрінде жүреді:



Бұл реакцияның негізгі мақсаты – атмосфералық молекулалық азотты (N_2) аммиакқа айнадыру, а сутегі – жанама өнім ретінде бөлінеді және нитрогеназа, гидрогеназа сияқты, оттегіге өте сезімтал болып келеді [55].

Гидрогеназа (Hydrogenases) ферменттері – цианобактерияларда H_2 өндіруге қатысатын екінші маңызды фермент. Көптеген цианобактериялар әртүрлі типтегі H_2 аза ферменттеріне ие[44]. H_2 – ны тотықтыра алатын H_2 қабылдаушы гидрогеназалар (hupSL генімен кодталады) және H_2 – ны сіңіріп немесе түзетін екіжақты H_2 аза (hoxFUYH генімен кодталады) бар[56]. H_2 қабылдаушы H_2 аза көбінесе жіп тәрізді бактериялардың гетероцисталарының тилакоидтарында кездеседі. Оттегімен гидрлену немесе Кналлгас реакциясы H_2 – ден тыныс алу тізбегі арқылы электрондарды тасымалдау арқылы O_2 реакцияларын жүргізуді білдіреді.

[FeFe]-гидрогеназалар – микроорганизмдерде кездесетін тағы бір гидрогеназа түрі. Бұл ферменттің құрамында екі түрлі кофактор: темір мен күкірт бар. Сонымен қатар, бұл фермент ақуыз қанқасына үш цистеин қалдығы арқылы байланысады[57]. Темір кластері төртінші цистеин қалдығы арқылы ди – темір бөлігімен байланысады. Бұл кластердегі гидрогеназа цианобактерияларда кездеспейді. Алайда, бөгде гендер тобы ретінде цианобактериялық жасушаларда белсендірілуі мүмкін. Гидрогеназа мен азотфиксациялаушы фермент – нитрогеназа – сутегін өндіретін екі фермент болып табылады. Сутегін тұтыну және өндіру процесін гидрогеназа ферменті катализдейді. Бұл фермент алғаш рет 1930 жылы Стивенсон мен Стиклэнд

тарапынан ашылған, содан бері бұл бағытта көптеген зерттеу жұмыстары жүргізілген. Алайда оның кристалдық құрылымы шамамен 20 жыл бұрын ғана анықталды.

Гидрогеназа ферменті көк – жасыл балдырларда (цианобактериялар) , жасыл балдырларда және қараңғыда ашу арқылы сутегі өндіретін бактерияларда кездеседі. Фермент катализдейтін ең қарапайым химиялық реакция – бұл сутегіні протондар мен электрондардан кері тотықсыздандыру арқылы түзу процесі. Гидрогеназалар белсенді орталығындағы металл құрамына байланысты үш негізгі топқа бөлінеді[58]. Цианобактерияларда сутегі метаболизміне тікелей қатысатын бірнеше ферменттер болуы мүмкін:

- Нитрогеназалар – бұл фермент сутегін динитрогенді аммиакқа тотықсыздандырумен қатар өндіреді.
- Сутегіні тұтынатын гидрогеназа (hupSL генімен кодталады) – нитрогеназа арқылы өндірілген сутегіні тұтынады.
- Екі бағытты гидрогеназа (hoxFUYH генімен кодталады) – сутегіні өндіре отырып, оны сіңіре де алады.

[FeFe] – гидриназалар екі бағытта әсер ететін ферменттер болып табылады, бірақ олардың сутегі өндіру жылдамдығы [NiFe] – гидриназалармен салыстырғанда 100 еседен аса жоғары. [NiFe] – гидриназалар әдетте сутегіні тұтынатын ферменттер ретінде қызмет ететін болса, [FeFe] – гидриназалар көбінесе сутегі өндіруге қатысады, сондықтан олар биологиялық сутегі өндіруді арттыру үшін орынды тандау ретінде қарастырылады. Ең жақсы зерттелген [FeFe] – гидриназалар жасыл балдырлар: *Clostridium*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Thermotoga maritima* түрлерінен алынған.

O₂ – ге төзімді гидрогеназа құру, гидрогеназалардың O₂ – ге сезімталдығы фотобиологиялық жолмен H₂ өндірудің тиімді жүйесін дамытудағы басты кедергілердің бірі. [NiFe] – гидрогеназалар – цианобактерияларға тән ферменттер[54]. Олар екі түрге бөлінеді.

- Hup – гидрогеназа (абсорбциялық, 2H⁺ → H₂)
- Hox – гидрогеназа (екіжақты, 2H⁺ → H₂)

Көптеген [NiFe] – гидрогеназалар микрофагофильді (аз мөлшердегі O₂ – ге төзімді) болып табылады және O₂ – мен тек уақытша ғана тежеледі[59]. Кейбір микроорганизмдерде, мысалы, *Ralstonia eutropha* бактериясында, атмосфералық қысымдағы O₂ қатысында да H₂ тотыға алатын O₂ – ге төзімді гидрогеназалар бар. Нитраттың сіңуін төмендету электрон ағынын сутегі өндіруге бағыттап, оның өнімділігін арттыруы мүмкін. Мысалы: *Synechocystis* PCC 6803 – тің *Dhar* және *Dhir* гендері жойылған мутанттары жоғары H₂ өнімділігін көрсетті. Сондай ақ, *Synechococcus* PCC 7002 түрінде гилоксидозаны белсенсіздендіру in vivo жағдайында сутегі өнімін арттырды [60].

Қазақстанда гидрогеназа ферментін зерттеу жұмыстары негізінен цианобактериялардың сутек өндіру қабілетін арттыруға бағытталған. Әл – Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің ғалымдары бірнеше перспективті штаммдарды зерттеп, олардың биосутек өндірісіндегі әлеуетін анықтады. Азот түзуші цианобактериялардың клеткаларында кездесетін HupSL

гендері азотсыз ортадағы клетка жағдайында да көрінеді және нитрогеназа белсенділігімен тығыз байланысты болып келеді[60]. Сондықтан, HupSL гидрогеназасы экзогендік және нитрогеназамен бөлінетін сутекті сіңіру үшін гетероцисттердің ішінде синтезделеді. Оның қатысуымен гетероцисталық цианобактериялар азотты фиксациялау жағдайында ауаға сутекті шығармайды. *Nostoc punctiforme* клеткаларында нитрогеназамен тығыз байланыста болатын H_2 аза ферментіне жауапты ақуыздар бар екендігі көрсетілген. Бірнеше бейорганикалық азотты қосылыстар сутектің өндірілу жылдамдығына көп жағынан әсер етеді. Нитрит, нитрат және аммиак *Anabaena variabilis* SPU003 және *Anabaena cylindrica* түрінде нитрогеназаны тежейді. *Anabaena cylindrica* аммонийдің қосылуы ($0,2 \text{ Mm NH}_4^+$) белгілі бір уақытта сутегі өндірісін басады, бірақ мерзімді түрде аз мөлшерде қосу ($0,1 \text{ Mm}$ аммоний хлориді) сутегі эволюциясын тежемейді[61].

Қазіргі уақытта гидрогеназаларды қамтитын ферменттік жасушаларды өндіру қиын, өйткені O_2 олардың белсенділігін тежейді. Бұл ферменттердің O_2 – ге сезімталдығы – тиімді фотобиологиялық сутегі өндірісін дамыту жолындағы басты кедергі болып табылады. [NiFe] – гидрогеназалар – цианобактерияларға тән ферменттер, олар сутегіні тұтынушы Hup – гидрогеназа ($2H^+ \rightarrow H_2$) және екі бағытты Нох – гидрогеназа ($2H^+ \rightleftharpoons H_2$) түрінде кездеседі. Жалпы [NiFe] – гидрогеназалар микроаэрофильді жағдайларға төзімді және O_2 әсерінен тек уақытша ғана тежеледі. Кейбір микроорганизмдерде, мысалы *Ralstonia eutropha* бактериясында, атмосфералық оттегі қысымында H_2 тотығуына қабілетті O_2 – ге төзімді H_2 азалар бар. Бұл плазмидтер барлық түрлерге сай келмесе де, табиғи ақуыздарды кодтайтын гендерді қажетті цианобактерияларға тасымалдауға бағытталған зерттеулер өте перспективалы болып көрінеді[62].

2. Зерттеу материалдары мен әдістері

2.1 Зерттеу объектілері мен материалдары

Зерттеу жұмысының объектісі ретінде Шонжы ыстық су көздерінен және Түркістан облысынан бөлініп алынған *Anabaena* sp. CBK-7, *Synechococcus* sp. CBV-6, *Oscillatoria* sp. CBS-5 алынды.

2.2 Сынамаларды іріктеу мен дақылдау

Зерттеу материалы 1–2 м тереңдігінен әртүрлі аумақтарда 3–5 нүктеден алынды, содан алынған үлгілерден жалпы сынама жасалынды. Сынама 13 сағат аралығында арнайы салқындатқыш сөмкеде (НПФ-Медтехника, РФ) +6° - +8°С температурада тасымалданып, +4° - +6°С сақталынды.

Жұмыс Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университетінің биология және биотехнология факультеті биотехнология кафедрасының «Фототрофты микроорганизмдер» зертханасында жүргізілді. Заррука, Громова №6, BG-11 қоректік орталары қолданылынды.

Заррука қоректік ортасы – цианобактерияларды дақылдауға арналған негіздік орта. Биотехнологияда жіпшелі және бір жасушалы цианобактерияларды өсіруде *Spirulina*, *Oscillatoria*, *Phormidium* сияқты жіпшелі цианобактерия түрлерін өсірудің негізгі стандартты ортасы болып табылады.

Заррука (тұздар құрамы (г/л): NaHCO_3 - 16,8; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ - 1,0; K_2SO_4 - 1,0; NaNO_3 - 2,5; K_2SO_4 - 1,0; NaCl - 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; $\text{NaCl} - \text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,04; $\text{Fe} + \text{ЭДТА}$ ерітіндісі - 1,0 мл; микроэлементтер ерітіндісі 1–1,0 мл; микроэлементтер ерітіндісі 2–1,0 мл.

Громова №6 қоректік ортасы – *Anabaena*, *Nostoc* сияқты гетероцисталы цианобактерияларды өсіруде қолданылатын ортаның бірі болып табылады.

Громова №6 (тұздар құрамы (г/л): KNO_3 - 1,0; K_2HPO_4 - 0,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; CaCl_2 - 0,15; NaHCO_3 - 0,2; ЭДТА - 1,0 мл; микроэлементтер ерітіндісі 1–1,0 мл; микроэлементтер ерітіндісі 2–1,0 мл.

BG - 11 қоректік ортасы – цианобактерияларға арналған универсалды қоректік орта. Өндірістік мақсатта қолдануға жарамды, себебі құрамында тұз мөлшері аз болғандықтан, қолданысы жеңіл. Сутегі бөліп алу мақсатында цианобактериялардың дақылдау кезінде азотсыз түрі BG-11 (-N) дайындалады.

BG - 11 (тұздар құрамы (г/л): NaNO_3 - 0,3; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ - 0,04; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,076; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,036; лимон қышқылы - 0,006; Fe_2SO_4 - 0,006; Na_2CO_3 - 0,02; ЭДТА (Трилон Б) - 0,001; BG - 11 ортасы үшін микроэлементтер ерітіндісі - 1 мл/л : Na_3BO_3 - 2,86; $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ - 1,81; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,022; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,079; $\text{Na}_2\text{Mo}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,39; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,05.

Қатты қоректік ортаны дайындау үшін 1–2% бактериологиялық агар қолданылды. Стерилизация 30 минут бойы, 1 атм жүргізілді.

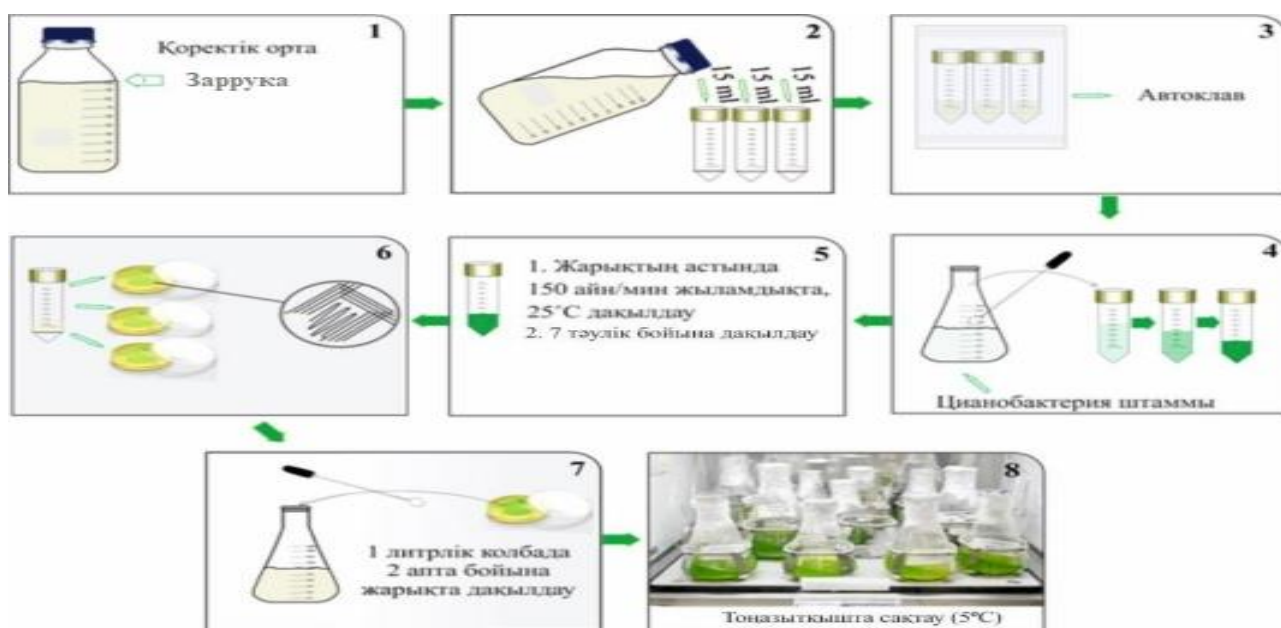
Дақылдау жұмыстары Әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық университетінде, Фототрофты микроорганизмдер зертханасында арнайы дақылдау камераларында жүргізілді.

Дақылдау камерасының температурасы 25 °С болды. Жарық 12 сағат қараңғы және 12 сағат жарық режимі бойынша берілді.

2.3. Цианобактериялардың альгологиялық таза дақылдарын бөліп алу

Жинақы дақылдан бактериялар мен саңырауқұлақтардан тазартылмаған альгологиялық таза дақыл алынады.

Альгологиялық таза дақылды жинақы дақылдан оқшаулау үшін әдеттегі микробиологиялық әдіс – штрих әдісімен қайта егу әдісі қолданылды. Әдістің сызба – нұсқасы 5 – суретте келтірілген. Барлық цианобактериялардың альгологиялық таза дақылдары Заррука және BG-11 қоректік орталарында алынды, дегенмен, гетероцисталы түр үшін Громова №6 қоректік ортасы қолданылды. Автоклавта залалсыздандырылған, ішінде 15 мл-лік қоректік ортасы бар пробиркаларға микропипетка көмегімен ламинарлық бокстың астында, от жалынының қасында цианобактериялардың жинақы дақылы қосылды. Дайындалған үш пробиркаға арасына 1 апта салынып үлгілер ауыстырылып отырылды. Бұл қайта егу жұмыстары арқылы цианобактериялардың альгологиялық таза түрін бөліп алуға қол жеткіздік. Себебі, әрбір 1 апта сайын микроскоптың астында тек қажетті клеткалар ғана алынып отырылды. 3 колбаға қайтадан 150 айн/мин жылдамдықта 25° С температурада 7 тәулік бойына дақылданды.



5-сурет – Цианобактериялардың альгологиялық таза дақылдарын алу сызбанұсқасы. Альгологиялық таза дақылды жинақы дақылдан оқшаулау үшін микробиологиялық әдіс – штрих әдісімен қайта егу әдісі

Осыдан соң, суреттегі 6-ы этапта көрсетілгендей дақылданған түрдің аз мөлшері, яғни 1 мл суспензия 15 мл-лік жаңа қоректік ортаға Петри табақшаларына стерильді түрде көшірілді. Зерттелінетін өскен дақылдың

колонияларынан трихомалар жиналуы микробиологиялық ілмектің көмегімен алынып, қоректік ортасы бар жаңа Петри табақшасындағы агар бетіне штрих әдісі арқылы қайта дақылданды немесе сұйық ортаға егіледі, кейін қалыпты жағдайда климатостатқа көшірілді. Келесі қайта дақылдау жұмыстары штрих әдісімен егуден өскен жеке колониялардан алынып жүргізілді.

Бірнеше рет қайта егу кезінде және Петри табақшасына егу үшін пайдаланған кезде суспензиялар жеткілікті болады және бөлек клеткадан колония өсіп шығады.

Альгологиялық таза дақылдар мұқият түрде микроскопиялық бақылаумен оқшаулап алынады.

2.4. Цианобактериялардың бактериологиялық таза дақылдарын алу

Бактериологиялық таза дақыл алу жұмыстың ең көп уақытты қажет ететін кезеңдерінің бірі болып табылады. Цианобактерияларды бактериялардан тазарту күрделі процесс. Бөлініп алынған цианобактерия түрлері жинақы, альгологиялық таза дақыл болғандықтан, тазалаудың бірнеше кезеңдері жүргізілді, ал бактериялардың тіршілік әрекетін тоқтату үшін ультракүлгін сәулелердің (254 нм) зарарсыздандыру әсері пайдаланылды. Қатты қоректік ортада дақылданған цианобактериялардың дақылдары 30 секунд пен 10-20 минут аралығында ультракүлгін сәуле астында сәулелендірілді. Ультракүлгін сәуле көзі ретінде бактерицидті УК лампалары БУВ -20 пайдаланылды. Дақыл ультракүлгін сәулелену көзінен 10-25 см қашықтықта сәулелендірілді. Цианобактерияларды сәулеленуден соң, дақылдары қайтадан жаңа агарлы ортаға көшіріліп, өскеннен соң бактериялардың тазалығы микроскоп астында иммерсионды майды қолдану арқылы 100х үлкейтумен бақылау жүргізілді.

Сонымен қатар, бөлініп алынған цианобактерия дақылдарын тазарту мақсатында әртүрлі антибиотиктер (тетрациклин, левомецетин) 1500 бірлік/мл-ден 25000 бірлік/мл-ге дейін әртүрлі концентрацияда қолданылды. Саңырауқұлаққа қарсы антибиотик ретінде барлық нұсқаларда кең спектрлі фунгицидті антибиотик – нистатин таңдалды. Дақыл тазалығын тексеру үшін стерильді 0,25% ет сорпасына ауыстырылды. Сонымен қатар, микроскоптың көмегімен стерильді циклмен (қайта себу әдісіне ұқсас) Петри табақшаларынан сұйық ортасы бар колбаларға ауыстырылды. Егуден кейін колбалар клеткалар санының өсуі үшін 1 аптадан 1,5 аптаға дейін жарық астына орналастырылды. Колбада өсірілген дақыл бірқалыпты өсу мақсатында шайқалып отырды.

2.5. Дақылды тазарту, іріктеу әдістері мен цианобактериялардың өнімділігін арттыру әдістері

Цианобактериялардың клеткаларын сандық есептеу кезінде цианобактерияларды өсіру зертханалық жағдайда шейкерде 20, 40 және 60 фотон мс^{-2} жарықтандырумен жүргізілді. Дақылдың өсуін $\lambda = 750 \text{ нм}$ (ОП_{750}) толқын ұзындығында клетка суспензиясының оптикалық тығыздығын өзгеруі бойынша $\text{Arel PD} - 303 \text{ UV}$ спектрофотометрін (Жапония) қолдану көмегімен бақыланып

отырды. Деректерді статистикалық өңдеу Microsoft Excel программасының көмегімен жүргізілді.

Цианобактериялардың жасушаларының санын есептеу үшін Горяев камерасы қолданылды. Клеткалар саны камераның орташа көлемді, көлденең бойымен бөлінген пластинкалардың ішіндегісі тіркелінді. Горяев камерасының ортаңғы бөлігі 0,1 мм басқа аймақтарынан төмен орналасқандықтан жабынды шыны сол аймақты толыққанды жаппайды. Сондықтан, ортаңғы аймақта орналасқан клеткаларды тіркеу қолайлы болып келеді. Микроскоптың астында торлы квадраттар көрінеді, сол торлы қабатты жабындық шынымен жауып, үстіне имерсиондық май тамызылды. Жабындық шыныға нақтылап бекіткен соң, төменгі оң жақ бүйірінен аздап жасушалардың сұйытылған тобы тамызылды. Шыныны мықтылап орналастырғаннан соң, астаушаның айналасындағы артық сұйықтық фильтр қағазының көмегімен алынып тасталынды. Әрбір квадраттағы цианобактерия клеткаларының саны есепке алынып, Горяев камерасының көлемі және биіктігі саналынып, 1 мл қоректік ортадағы клетканың саны төмендегі формула бойынша анықталды. Камерадағы әрбір үлкен квадрат 16 кіші квадраттардан тұрады. Егер 25 үлкен квадраттардағы клеткалардың саны с- ға тең болса, онда кішкентай бір квадратта клетка саны сәйкесінше:

$$N=c/16 \times 25 \quad (1)$$

ал 1 см³ ортадағы клетка саны:

$$x = n \times 4 \times 10^6 = 4cx10^6/16 \times 25 = cx10^6/100 \quad (2)$$

Сонымен, 1 см³ қоректік ортадағы клетка санын анықтау үшін 25 квадратты санау кезінде клеткалардың мөлшері m 100-ге бөлініп, 10⁶ – не көбейтілді.

Клеткалардың тығыздығы 1,0-3,0x10⁶/см³ болу үшін суспензия 50х, 100х, 250х, 500х сұйылту жұмыстарынан өтті. Көп жағдайда жоғары концентрациядағы клеткалардың санын есептеу 100% нақты нәтиже бермейді. Себебі, сұйылту кезінде суспензияда жасушалардың бөлінуінің ауытқуы жоғары болып келеді.

Цианобактериялардың өсу жылдамдығының коэффициентін анықтау әдісі бойынша биомассаның өсуі клетка суспензиясының максималды және бастапқы тығыздығы арасындағы айырмашылық ретінде анықталды.

Цианобактериялардың клетка биомассасы келесі формула арқылы есептелінді:

$$\mu=(\ln X_t - \ln X_0)/(t-t_0) \quad (3)$$

мұндағы X_t және X_0 – t және t_0 уақыттарындағы клетка суспензиясының тығыздығы.

Биомассаны екі еселеу уақыты (t_d) келесі формуламен анықталды.

$$td = \ln 2 / \mu \quad (4)$$

Лаг – фазаның (бастапқы өсу фазасы) өсу көрсеткішінің формуласы:

$$T = t - (\ln X_r - \ln X_0) / \mu \quad (5)$$

Мұндағы Т- лаг- фазаның жалғасы уақыты, t- X_r суспензияның белгілі бір тығыздыққа жеткен уақыты.

Цианобактериялардың морфологиялық – дақылдық қасиеттерін зерттей отырып, бөлініп алынған цианобактериялардың морфологиялық ерекшеліктері және мөлшерін Биомед – 4 микроскобының көмегімен (Биомед, Ресей) зерттелінді. Зерттеу барысында 10х, 40х, 100х объективтері мен 10х окуляр қолданылды. Цианобактериялардың әртүрлі синтетикалық ортада өсу динамикасы оптикалық тығыздығын PD-303 UV спектрофотометрінде (Жапония) 7 тәулік бойы өшеу арқылы анықталынды. Цианобактериялар кеткалар санының тығыздығын өлшеу кезінде бақылау ретінде қоректік орта пайдаланылды.

Зерттеу барысында жарық қарқындылығы Quantum Q 40555 LI- 250A (LI-C5R Biosciences, Lincoln, NE, USA) жарық өлшегіші арқылы ыдыстың 5 жерінен өлшелінді және ортақ көрсеткіші алынып, мкмоль фотон/м²/сек өлшем бірлігінде көрсетілді.

Цианобактерияларды дақылдау үшін СО₂ өлшей отырып, цианобактериялық дақылдар стерильді газбен аэрацияланды және 1% СО₂ газ RMA – 0,063 G (Ресей) ротамерімен есептелініп, ауаның құрамына қосылды. Дақылдау SOBO SB-1106 (Қытай) ауа компрессорының көмегімен берілді. Цианобактериялардың түрлерін сутек алу үшін өсіру жұмыстарында жарық (қарқындылығы: 45 ммоль фотон/м²/сек) пробирканың үш жағынан берілді. Биомасса жинақтау мақсатында дақылдар 70 мл сұйық BG-11 қоректік ортасында дақылданып, SOBO SB-1106 (Қытай) ауа сорғышының көмегімен аэрацияланады. Содан соң, сутек бөліп алуға дайындау үшін 100 мл колбаларға көшірілді.

Цианобактерия дақыдары 40 мл пробиркаларға ауыстырылған соң, 5 минут бойы 10,000 айн/мин жылдамдықта центрифугаланып, супернатат төгілініп тастағалынған соң, клетка дақыдарына 100 мл көлемде BG₀-11 қоректік ортасы қосылып, 3 минут бойы араластырылды. Өсірілініп алынған клеткалар спектрофотометр (Arel PV-303 UV; Токио, Жапония) көмегімен 730 нм (OD₇₃₀) толқын ұзындығында 0,4 А оптикалық тығыздығына келтірілді. Дақылдар бір жағынан берілетін жасанды жарықтандыру астында 24 сағат бойы өсіріліп (қарқындылығы: 45 мкмоль фотон/м²/с), центрифуганы (Eppendorf Centrifuge 5810R, Гамбург, Германия) қолданып, 10,000 айн/мин жылдамдықта 5 минуттан соң, жиналынып алынды. Супернатантты төгіп тастаған соң, дақыл үстіне BG₀-11 қоректік ортасы қосылды. Осыдан соң, клеткаларды тағы да центрифуга көмегімен 5 минут бойына, 10,000 айн/мин жылдамдықта центрифугалады. Екі рет жуылған соң, супернататтан бөлініп алынған жасушалар спектрофотометр көмегімен OD₇₃₀ -1,5 бірлікке келтірілініп алынды. Газ хроматограф виалының ішінде клеткалардан бөлінген газдар жиналуы мүмкін 10 мл кеңістік

калдырылды. Содан соң, аргон газы оттегін алмастыру үшін газ хроматограф шприцінің көмегімен 1 сағат ішінде газ хроматограф виалына енгізіліп, бөлме температурасында жарық жерге орналастырылды. Жарық процедурасы үшін газ хроматограф виалының бір жағынан қарқындылығы 30 мкмоль фотон//м²/сек құрайтын жарық беріліп отырды. Газ хроматограф виалының ішіндегі клеткалардың биомассасы үздіксіз OS-20 орбиталды үстел шейкерімен (Biosan, Рига, Латвия) 150 айн/мин жылдамдықта араластырылды.

Сутегі молекулалық газы жинақталған газ хроматограф өндірушінің нұсқаулығына сәйкес (Porapak N 15 DC-200/500 Мәскеу, Ресей) газ хроматографына енгізілген 0,15 мл газ тәрізді кеңістікті тікелей таңдау үшін пайдаланылды. Сутегі стандартты қисығы шыңдардың тіркелген аудандары бойынша сутегі мольдерін есептеу үшін қолданылды. Экспериментте сутегі алудың осы кезеңінде бастапқы рН 7,4 кезінде температура 25,0± 0,5°C деңгейінде сақталды. Н₂ өндірісі мкмоль Н₂/мг хл/сағ түрінде ұсынылған, аргон тасымалдаушы газ ретінде пайдаланылды.

Осу хлорофилл а және Н₂ туралы деректерді статистикалық талдау 96% сенімділік деңгейімен біржақты дисперсиялық талдау (anova) әдісімен жүргізілді. Газ хроматографиясы (ГХ) – сутегі молекулаларын дәл және сенімді түрде анықтауға мүмкіндік беретін аналитикалық әдіс болып табылады. Бұл әдіс сутегі өндірісін өлшеуде кеңінен қолданылады, себебі ол газдардың құрамындағы аз мөлшердегі сутегіні де анықтай алады.

Цианобактерияларды дақылдау үшін жарық қарқындылығын өлшеу арқылы жүргізілген зерттеу жұмыстарында жарықтың қарқындылығы *Quantum Q40555 l-25a LI- 25A (L-COR Biosciences, Lincoln, NE USA)* жарық өлшегіші арқылы ыдыстың 5 жерінен өлшенілді және ортақ көрсеткіші алынып, мкмоль фотон /м²/сек өлшем бірлігінде көрсетілді.

Хлорофилл дәрежесін өлшеу арқылы, яғни әр үлгінің 1 мл аликвоты көлемі 1,5 мл пробиркаға жиналды және 5 минут ішінде 10,000 айн/мин жылдамдықта *Eppendorf Centrifuge 5810R* жоғары жылдамдықты центрифуга (Гамбург, Германия) көмегімен центрифугаланды. Супернатантты алып тастағаннан кейін жасуша культурасына 1 мл 100% метанол қосылып, пробирка 5 минут ішінде 10,000 айн/мин жылдамдықта центрифугаланды. 665,2 және 750 нм жарық спектрлері хлорофилл а концентрациясын өлшеу үшін пайдаланылды, бақылау ретінде 100% метанол алынды. Мәліметтерді статистикалық өңдеу кезінде зерттеу жұмысы барысында мәліметтер Excel бағдарамасын қолданып статистиканың вариациялық әдістерінің көмегімен жүргізілді.

2.5.1. Альгологиялық әдістер

Тығыз мәдениетті дайындау үшін жиналған материал (жасыл жабын, шырыш, бірнеше текше сантиметр су) стерильді сұйық қоректік орта бар пробиркаларға себілді, кейін бұл орта колбаларға құйылды (сұйықтық көлемі колба көлемінің 1/3-1/4 бөлігін құрады). Себілген материал салынған ыдыстар флуоресцентті шамдар бекітілген раманың үстіне әйнектің үстіне орналастырылды, шамдардың жарықтандыруы шамамен 45 ммоль фотон/ м² секунд шамасында болды. Дақылдар себілген Петри табақшалары жарықта колониялар пайда болғанға дейін қалдырылды. Өсу байқалған колониядан алынған дақылдың бір бөлігі қайтадан сұйық ортаға көшірілді. Сұйытылған суспензиямен Петри табақшасына себу әрбір колонияның бір жасушадан өсу мүмкіндігін арттырды. Аралас дақылдан зерттелетін дақылдың бір бөлігін алу үшін микробиологиялық тұзақ пайдаланылды, ал алынған қоспа жаңа қоректік ортасы бар Петри табақшасына агар бетіне сызық сызып себілді. Осыдан кейін өнім қалыпты температурада климастатқа орналастырылды. Тікенек себу арқылы алынған дақылдан өсірілген жеке колониялар кейінгі себулер үшін пайдаланылды. Алынған таза дақылдар зерттеліп, олардың морфологиялық сипаттамалары мен өсу динамикасы анықталды.



6-сурет – Цианобактерия штаммдары: а) *Oscillatoria*; б) *Anabaena*; в) *Synechococcus*

Бір жасушалы цианобактериялар BG-11 және Zarruk орталарында өсірілді. Осы қоректік орталардан бөлек, таңдау азотсыз BG₀-11 қоректік ортасында жүргізілді. Цианобактериялар үлгілері түрлі көлемдерде (1 мл, 2мл, 4мл, 8мл) жаңа стерильді қоректік орталарға ауыстырылды. Сұйық қоректік ортаға қайта себу 1-2 айға созылды. Морфологиялық көрсеткіштердің сипаттамасы жарық микроскопында 100х үлкейту арқылы жүргізілді. Монодақылдар әртүрлі орталармен араластырылған қатты агармен себу арқылы анықталды. Дақыл себілген Петри табақшалары жарықта колониялар пайда болғанға дейін сақталды. Өсу байқалған колониядан алынған өнім қайтадан сұйық ортаға немесе басқа Петри табақшаларына ауыстырылды. Сұйытылған суспензиямен Петри табақшасын себу әрбір колонияның бір жасушадан өсу ықтималдылығын арттырды. Аралас дақылдан зерттелетін дақылдың бір бөлігін алу үшін микробиологиялық тұзақ қолданылды, алынған материал жаңа Петри

табақшасының агар бетіне сызып себу арқылы қайта егілді. Өнім қалыпты климат жағдайында отырғызылды. Тікенек себу арқылы алынған дақылдан өсірілген жеке колониялар кейінгі себулер үшін пайдаланылды.

2.5.2. Микробиологиялық әдістер

Цианобактерия дақылдарын тазарту процесінің күрделілігі ерекше назар аударуға тұрарлық. Басқа организмдермен байланысы жоқ, яғни аксенді цианобактерия дақылдары, таза альгологиялық үлгілерден алынған дақылдарға карағанда өсу қарқыны жағынан салыстырмалы түрде баяу болады. Сонымен қатар, олар морфологиялық және физиологиялық, биохимиялық параметрлерде өзгерістер көрсетеді. Цианобактериялардың альгологиялық таза күйінде бөлініп алынған дақылдардың тазалығын тексеру үшін бірнеше тазарту әдістері қолданылды, сондай – ақ бактериялар 254 нм толқын ұзындығындағы ультракүлгін сәулелену арқылы инактивацияланды. Цианобактериялардың дақылдары қатты қоректік ортада өсіріліп, бактерицидтік ультракүлгін шамдар арқылы 30 секундтан 20 минутқа дейін ультракүлгін сәулеге ұшыратылды. Ультракүлгін сәуленің көзі мен дақыл арасындағы қашықтық 10-25 см болды. Сәулеленуден кейін цианобактерия дақылдары жаңа агар ортасына қайтадан егілді, ал бактериялардың тазалығы микроскоппен (100 есе үлкейтілген) иммерсиялық май арқылы тексерілді.

Антибиотиктер ретінде (ампициллин, неомицин, тетрациклин, пенициллин) әртүрлі концентрацияда – 1500 бірліктен 25000 бірлік/мл дейін қолданылды. Барлық нұсқаларда кең спектрлі зеңге қарсы антибиотик ретінде нистатин пайдаланылды. Дақылдың тазалығын қамтамасыз ету үшін ол стерильді 0,25%ет сорпасымен алмастырылды. Сол уақытта микроскопия әдісі арқылы қосымша микроорганизм анықталды. Цианобактериялар Петри табақтарынан стерильді сұйық ортасы бар колбаға немесе еңкіш агарлы пробиркаға стерильді әдіспен ауыстырылды. Себуден кейін колбалар мен пробиркаларда жасуша санының артуы үшін 1-1,5 апта бойы өсіру жүргізілді. Мерзімді түрде колбада өсірілген дақыл шайқалып отырды. Цианобактериялар жеткілікті өскен кезде - бұл сұйық ортаның жасылдануы немесе агар бетінің ашық жасыл түске боялуымен анықталады - пробиркалар мен колбалар люминесцитті шам астынан үздіксіз әлсіз жарықпен жарықтандырылған тоңазытқышқа ауыстырылды. Мұндай жағдайда дақылды ұзақ уақыт сақтауға болады және агар кеуіп кеткен жағдайда ғана сирек қайта егу қажет болады(1,5-2 айдан кейін). Минералды қоректік орталарды (BG-11, Zarruk) дайындау: 500 мл көлеміндегі колбаларды толтыру; автоклавта зарарсыздандыру; тығыз цианобактерия дақылын 1-2 апта аралығымен екі сынақтық колбаға көшіру; цианобактериялардың соңғы дақылын пробиркада өсіру; агарлы ортада егу; агарлы ортадан сұйық ортаға қайта егу; бөлінген цианобактерия дақылын сақтау.

Цианобактериялардың құрғақ биомассасын алу кезінде цианобактериялық суспензияның белгілі бір мөлшері араластырылып, Петри табақшасында 65°C температурада 48 сағат бойы электронды термостатта кептірілді. Жасушалар буланып, кептірілгеннен кейін, ыдыстар зертханалық таразыда қайтадан

өлшеніп, олардың жалпы құрғақ массасы анықталды. Цианобактерия штаммдарын бөлу үшін суспензия физиологиялық ерітіндіде араластырылып, ерімеген тұнбалар сүзілгеннен кейін бірінші үлгінің көлеміне тең таза сумен толтырылған сынақ түтіктеріне центрифугалау арқылы ажыратылды. Төмен температуралы кептіру (50 – 70 °C) – фотосинтетикалық пигменттердің, соның ішінде хлорофилл *a* фикобилиндердің, термиялық деградациясын азайтады. Цианобактериялық биомасса табиғи тыңайтқыш ретінде, ақуыз қоспасы немесе биоэнергия көзі ретінде пайдаланылуы мүмкін.

2.5.3. Биотехнологиялық әдістер

Цианобактериялардан сутегін алу үшін төменде сипатталған әдістерге сәйкес тәжірибелер жүргізілді. Цианобактерияларды өсіру: цианобактериялар 250 мл BG-11 сұйық қоректік ортасында өсірілді. Сутегі алу мақсатында жүргізілген тәжірибелерде олар 70 мл көлеміндегі BG-11 ортасында өсіріліп, ауа беру SPP-25ga құрылғысы арқылы жүзеге асырылды. Жарықтандыру цилиндрдің үш жағынан қамтамасыз етіліп, жарық қарқындылығы 45 ммоль фотон/ м²/с болды. Сутегіні бөлу: Цианобактериялар 20 мл көлеміндегі түтіктерге орналастырылып, зертханалық жағдайда сутегіні бөлу мүмкіндігі қарастырылды. Цианобактерия биомассасын сутегі алу үшін дайындау: Цианобактерия штаммдары 40 мл көлеміндегі колбаларда инкубацияланды. Кейін жасушалар 10000 айн/мин жылдамдықта 5 минут бойы вихрлі араластырғышта өңделіп, супернатанттан бөлінді. Супернатант шығарылғаннан кейін әрбір культураға 100 мл BG-11 қоректік ортасы қосылып, 3 минут араластырылды. Культивирлеу үшін алдын ала өсірілген, оптикалық тығыздылығы 0.4 болатын жасушалар мен *Jasco International Co., Ltd.* Компаниясының V-630 спектрофотометрі (толқын ұзындығы шамамен 730 нм, OT730) қолданылды. Клеткалар 24 сағат бойы 45 ммоль/ м²/с жарықта өсірілді. Содан кейін жасушалар 10 000 айн/мин жылдамдықпен 5 минут бойы *Hitachi Co., Ltd* шығарған *Himac CR 22g* жоғары жылдамдықты тоңазытылған центрифугада центрифугаланады. Супернатант алынып тасталғаннан кейін жасушаларға 30 мл BG0-11 ортасы қосылды және олар 10 000 айн/мин жылдамдықпен 5 минут вихрлі араластырғышта қай өңделді. Екі рет жуылғаннан кейін, супернатанттан бөлінген жасушалар OT730 спектрофотометрі арқылы 1.5 оптикалық тығыздыққа дейін қалпына келтірілді. Шоғырланған жасушаларға 50 ммоль *HEPES-KOH* буфері (pH 7.4) және 100 ммоль NaHCO₃ қосылған 7.5 мл BG0-11 ортасына ауыстырылды.



7-сурет – Спектрофотометр



8-сурет – Центрифуга

Газдарды жинау процесінің негізгі кезеңдері: жасушалардан бөлінетін газдар жиналуы үшін GC түтігінде 10 мл бос кеңістік қалдырылды. Түтікке GN шприці арқылы аргон газы енгізіліп, оттегі толықтай ығыстырылды. GC түтігі жарық және қараңғы аймақта бөлме температурасында орналастырылды. Биомасса HS-10va микс-паттернерімен 150 айн/мин жылдамдықпен араластырылды (*One International, Inc., Santa Clara, CA, USA*). Қараңғыда GC түтігі фольгамен оралып 25°C температурада BioShaker BR-22fr инкубаторында (*Taitec Corporation, Saitama, Japan*) өсірілді.



9-сурет – Виальдарға аргон газын толтыру барысы; Сутегі бөліну деңгейін анықтау мақсатында виальдарға 96% таза аргон газын жіберу

Стресс жағдайларын жасау үшін модификацияланған қоректік ортаны дайындау: цианобактериялар азот жетіспейтін ортада (BG₀-11) өсірілді, бұл бір уақытта азот жетіспеушілігіне негізделген стресс жағдайындағы дақылдар жиыны.

3. Алынған нәтижелер

3.1. Цианобактериялар мен микробалдырлардың түрлік әртүрлілігін зерттеу.

Фототрофты микроорганизмдердің алуан түрлілігін анықтау және сутегі түзуші жаңа цианобактерия түрлерін бөліп алу мақсатында 2024 жылдың жазында Алматы облысы Шонжы ыстық бұлақтары мен Түркістандағы күріш алқаптарының балдырлы флорасы зерттелді. Шонжы ыстық бұлақтары мен Түркістан облысының күріш егілген жерлеріндегі цианобактериялардың әртүрлілігіне жүргізілген зерттеулер фототрофты микроорганизмдердің көп мөлшерде таралғанын көрсетті.

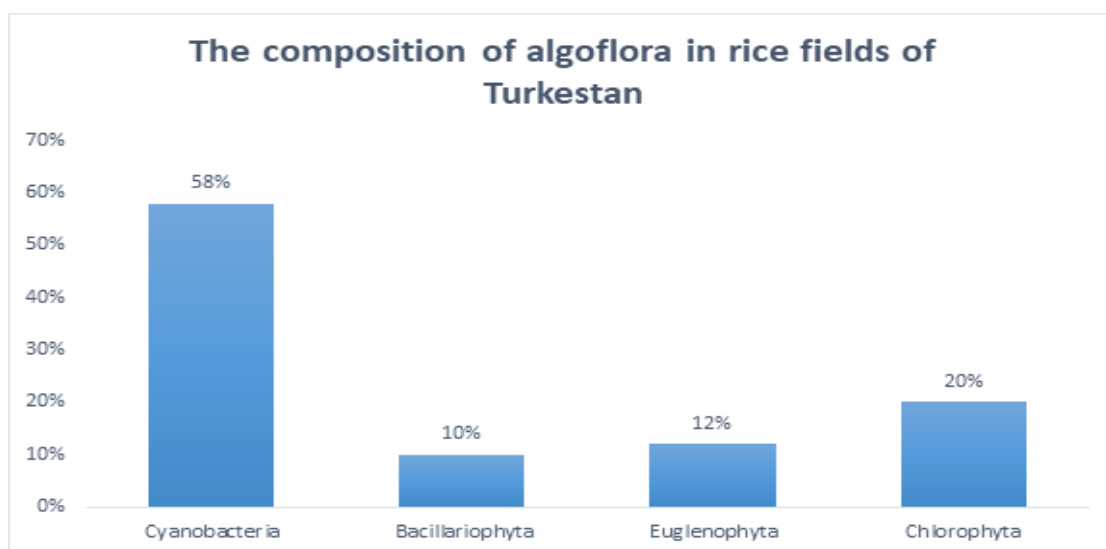
Шонжы бұлақтарындағы судың температурасы $+45 - 55^{\circ}\text{C}$ аралығында рН $\sim 7,2 - 7,6$ шамасында болды.



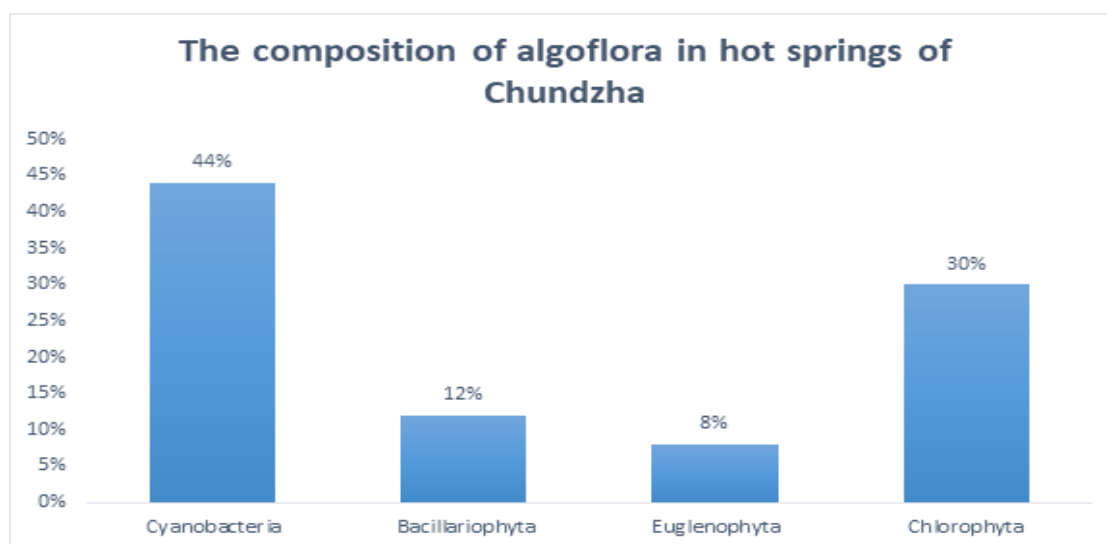
10 – сурет Шонжы мен Түркістан көлінен су үлгілерін алу

Зерттелген аумақтардың көбінде жасыл балдырлар басым болғанымен, көкшіл – жасыл түсті түрленетін және тұрақты топтармен берілген цианобактериялар жиі кездескен. Ботаникалық зерттеулер барысында фототрофты микроорганизмдер бөлім, класс, қатар, туыс және түр деңгейіндегі морфологиялық тұрғыдан бір – бірінен ажыратылатын түрлер ретінде сипатталған.

Шонжы ыстық су көздері – геотермалды белсенді аймақтардың бірі болып, ол жерде жоғары температуралы су мен минералдарға бай орта цианобактериялардың ерекше штаммдарының тіршілік етуіне қолайлы жағдай жасайды. Мұндай орталарда термофильді (жоғары температураны жақсы көтеретін) цианобактериялар кең таралған.



11-сурет – Түркістандағы ыстық бұлақ күріш алқаптарындағы альгофлора құрамы

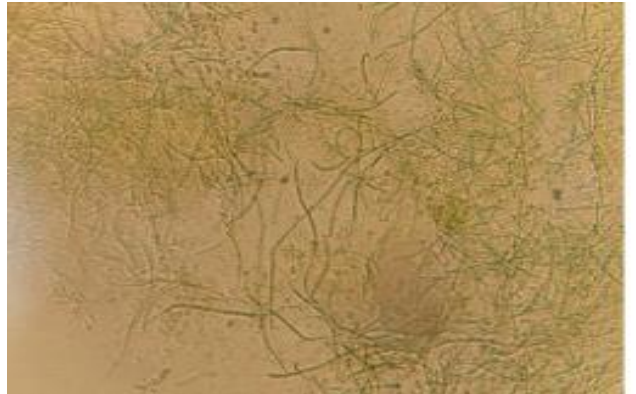


12-сурет – Алматы облысы Шонжыдағы ыстық бұлақтың альгофлора құрамы

Зерттелген фототрофты микроорганизмдердің балдырлы флорасының таксономиялық құрылымы: 4 қатар, 7 класс, 7 отряд, 19 туыс және 50 түр анықталды. Таксономиялық құрылымы бойынша цианобактериялар 29 түрмен (58%), *Bacillariophyta* – 5 түрмен(10%), *Euglenophyta* – 6 түрмен(12%), *Chlorophyta* – 10 түрмен(20%) ұсынылған. Цианобактериялар арасында *Synechococcus* және *Anabaena* туыстарына жататын *Oscillatoria* түрлері көптеп кездескен.



13-сурет – Шонжы ыстық су көзінен таңбаланған, микроскоп астында түсірілген жіп тәрізді цианобактериялардың бейнесі



14-сурет – Түркістан облысындағы күріш алқаптарынан алынған су үлгісінің микроскоп астындағы бейнесі

3.2. Цианобактериялардың аксенді (таза) дақылдарын бөліп алу

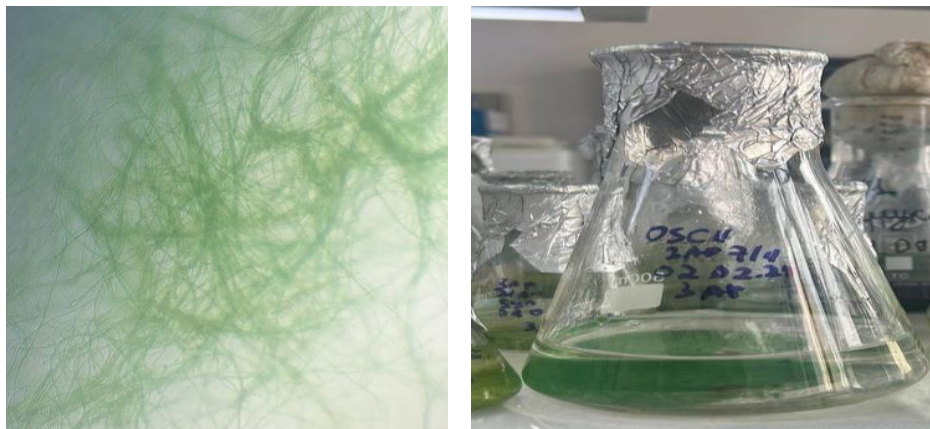
Жеткізілген үлгілер *BG-11* және *Zarruk* сұйық қоректік ортасына көшірілді. Бұл әдіс сутегі өндіретін цианобактериялардың басым дамуына ықпал ететін селективті жағдайларды жасауды қамтиды.

Заррука қоректік ортасы – цианобактерияларды дақылдауға арналған негіздік орта. Биотехнологияда *Spirulina*, *Oscillatoria*, *Phormidium* сияқты жіпшелі цианобактерия түрлерін өсірудің негізгі стандартты ортасы болып табылады.

BG - 11 қоректік ортасы – цианобактерияларға арналған универсалды қоректік орта. Өндірістік мақсатта қолдануға жарамды, себебі құрамында тұз мөлшері аз болғандықтан, қолданысы жеңіл.

Oscillatoria sp. CBS-5

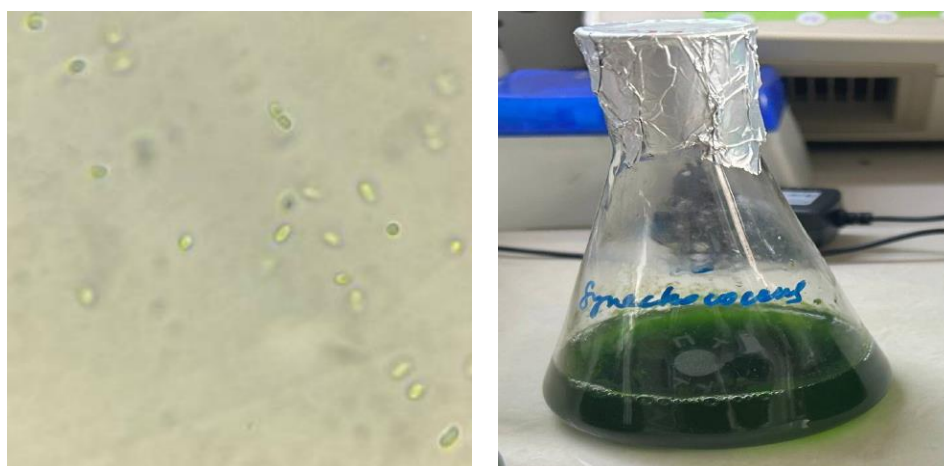
Бұл түр цианобактерияларға жатады, *Hormogoneae* класы, *Oscillatoriales* қатары және *Oscillatoria* туысы. Олардың трихомдары негізінен домалақ пішінді шар тәрізді жасушалардан тұрады. Жасушалар арасында гетероцисттер мен акинеттер кездеседі. Трихомның ұш жақтарында да осындай құрылымдар байқалады.



16-сурет – жіптері тербеліп немесе сырғып орналасатын цианобактерия түрі (*Oscillatoria sp. CBS-5*)

Synechococcus sp. CBB-6

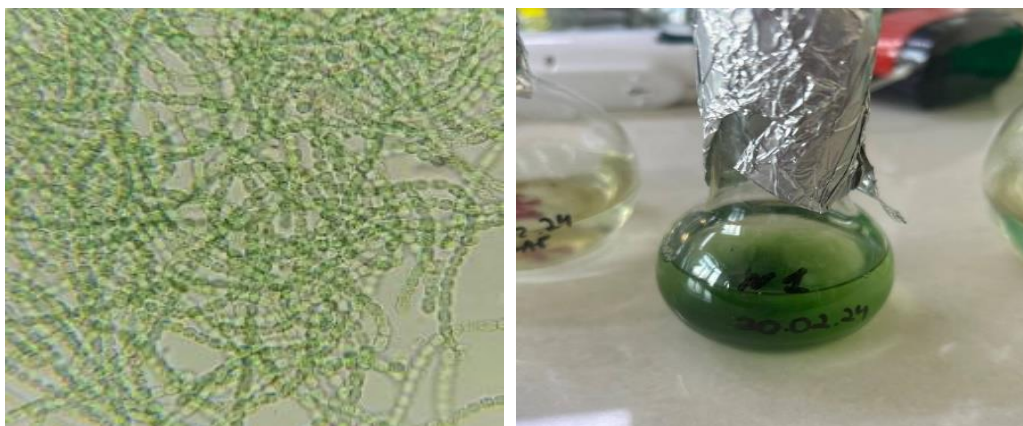
Бұл түр цианобактерияларға жатады, *Coccobactereae* қатары және *Synechococcus* туысы. Жасушалары домалақ, диаметрі 2,5 – 3,5 мкм, бөлінуден кейін бір-бірден немесе жұп болып орналасады. Түрдің түсі бозғылт көк-жасыл. Бұл пигменттер жарықты кең спектрде сіңіріп, тиімді фотосинтез жүргізуге мүмкіндік береді. Бұл штаммды бөліп алу үшін *BG-11* қоректік ортасы пайдаланылды. Өсуге ең қолайлы температура 25 – 30°C аралығында анықталды.



17-сурет – таяқша тәрізді немесе сопақ тәріздес цианобактерия түрі (*Synechococcus sp. CBB-6*)

Anabaena sp. CBK-7

Бұл түр цианобактерияларға жатады, *Hormogeneae* класы, *Nostocales* қатары және *Anabaena* туысы. Трихомдары жеке, домалақ, шар тәрізді жасушалардан тұрады. Құрамында гетероцисттар және сирек жағдайда акинеттер бар. Жақыннан қарағанда, трихомдар ұзынша, бөшке тәрізді пішінді және аралық перделер (септалар) айқын көрінеді. Жасушалар шамамен 2 – 10 мкм шаршы. Гетероцисттер цилиндр тәрізді, суреттерде анық байқалады. Олар көбінесе тік орналасады және аздаған иілімдерге ие. Өсіру Громовтың *Bg-11* қоректік ортасында жүргізілді. Белсенді өсу 25-30°C температурада байқалды.



18-сурет – жіп тәрізді колония құрайтын көпжасушалы цианобактерия (*Anabaena* sp. CBK-7)

3.4. Цианобактериялардың бактериологиялық таза штаммдарын алу

Цианобактериялардың бактериологиялық тұрғыдан таза (аксенді) дақылдарын алу – көп кезеңді әрі күрделі процесс. Бұл әдісті қолдану зерттелетін ағзаның тазалығын нақты бағалауға мүмкіндік береді. Бактериологиялық талдау нәтижесінде барлық дақылдарда микрофораның бар екені анықталды. Цианобактериялар көбіне әртүрлі микроағзалар қауымдастығында кездеседі. Оқшауланған цианобактерия дақылдары көбінесе бактериялық микрофлорамен, споралармен және зендердің мицелийімен ластанған болады. Көк-жасыл балдырларды (цианобактерияларды) тазарту ең оңай болып саналады. Цианобактериялар бактериясыз ортада әлдеқайда баяу өседі, бұл оларды альгологиялық таза дақылдармен салыстырғанда күрделендіреді. Сонымен қатар, морфологиялық және физиолого – биохимиялық сипаттамаларында түрлер арасында айтарлықтай айырмашылықтар болады, бұл олардың жүйелік орнын анықтауды қиындатады. Барлық үш оқшауланған цианобактерияның ілеспе микрофлорасы негізінен спора түзбейтін, грам – теріс бактериялардан, әсіресе *Pseudomonas* туысына жататын өкілдерден құралды. Зенге қарсы антибиотик ретінде кең әсер ауқымына ие нистатин (nystatin) қолданылды.

Кесте 3 – Цианобактерия штамдарының әртүрлі антибиотиктерге төзімділігі (тетрациклин, нистатин, левомецетин)

	Strain	Bacterial viability in tetracycline		Bacterial viability in nistatin		Bacterial viability in levomycetin	
		C	A	C	A	C	A
1	<i>Synechococcus</i> sp. CBB-6	+	+	-	-	+	-
2	<i>Oscillatoria</i> sp. CBS – 5	-	+	-	-	+	+
3	<i>Anabaena</i> sp. CBK – 7	-	+	-	+	-	+

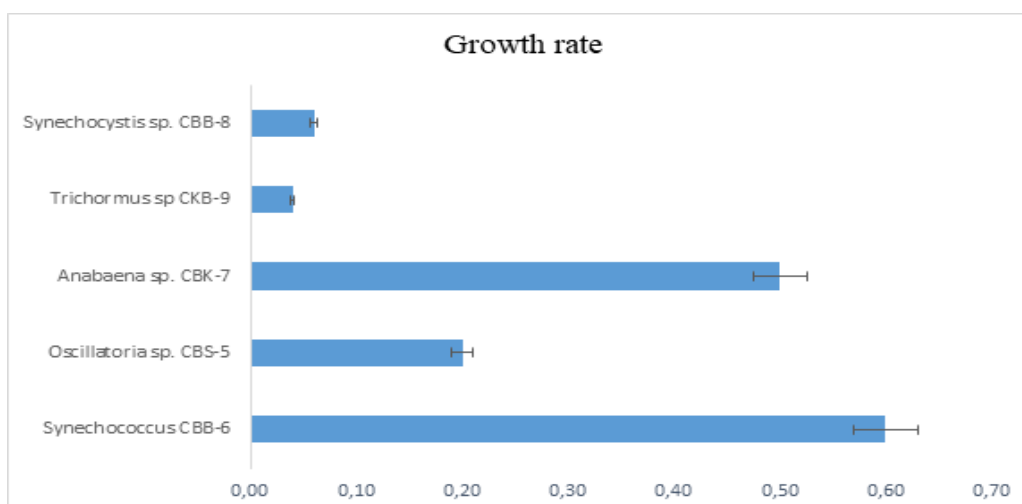
Осылайша, түрлі табиғи экожүйелерден антибиотиктер арқылы оқшауланған цианобактериялардың туыстас микроорганизмдерін анықтауға бағытталған әрекеттер үш зерттелген дақылдың үшеуінде де сәтті орындалды. Бұл зерттеулер барысында тетрациклин аталған дақылға қарсы ең тиімді антибиотик ретінде танылды.

Synechococcus spp. CBB – 6 штаммы біржасушалы цианобактерия болғанына қарамастан, бір реттік қоданудан кейін де ілеспе микрофлорамен ластанған цианобактерияларды айтарлықтай тазарта алды. Алайда антибиотик мөлшерін арттыру бактериялық серіктерге ғана емес, цианобактерияның өзіне де бактерицидтік әсер көрсетті, бұл олардың тіршілік ету қабілетін төмендетті. Оқшауланған цианобактерия штаммының бактериологиялық тазалығы LPU (лейофильді қоректік орта) ортасына себу арқылы тексеріліп отырды.

Цианобактериялар табиғи ортадан бөлініп алынған кезде олармен бірге әртүрлі гетеротрофты бактериялар бірге өсіп шығады. Цианобактериялардың аксендік (таза) дақылдарын алу үшін антибиотиктермен өңдеу, қайта себу, микропипеткамен жеке клеткаларды бөліп алу және ультракүлгін сәуле немесе жарық/қараңғылыққа негізделген сұрыптау әдістері жиі қолданылады.

3.5. Азотсыз ортада оқшауланған цианобактерия штамдарының жасушаларын сандық есептеу

Оқшауланған дақылдардың азот фиксациялау қабілеті штамдардың нитрогеназалық белсенділігі олардың азотсыз ортада өсу өнімділігі арқылы анықталды. Осы мақсатта цианобактерия штамдарын өсіру үшін BG₀-II(тәжірибелік) және BG-II(бақылау) қоректік ортасы таңдалды.



19-сурет – Цианобактерия штаммдарының өсу жылдамдығы

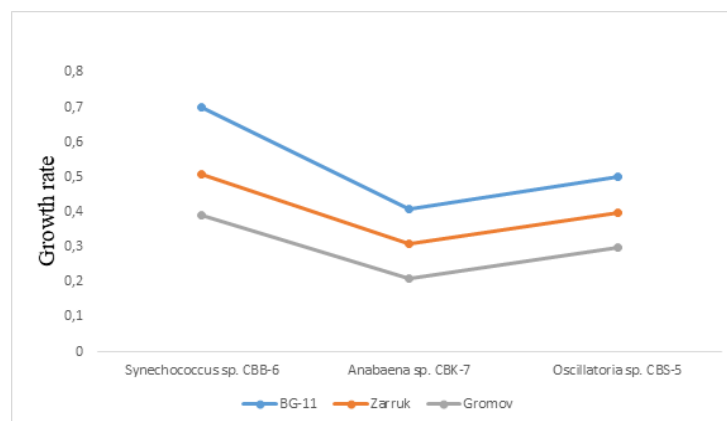
Цианобактериялардың өсу факторы және оптикалық тығыздығы биомассаның өсу көрсеткіштерін бағалау үшін қолданылды. Зерттеліп отырған дақылдар бастапқы жасуша тығыздығы 0.1 болған жағдайда 9 күн бойы қоректік ортада өсірілді. Алынған нәтижелер *Nostocales* қатарына жататын *Anabaena sp.* штаммының белсенді азот фиксациялау қасиеттерін көрсеткенін дәлелдеді. Зерттелген барлық штаммдар арасында *Oscillatoria sp.* ең төмен өнімділік көрсетті. Осылайша, оқшауланған төрт цианобактерия штаммының ішінен нитрогеназалық белсенділігі мен жоғары өсу қарқыны бойынша әрі қарай зерттеуге *Synechococcus sp. CBB-6*, *Oscillatoria sp. CBS-5* және *Anabaena sp. CBK-7* таңдалды. Келесі кезеңде жарық жағдайында сутегі өндіру қабілетін зерттеу жүргізілді, бұл жоғары сутегі өнімділігіне ие цианобактерия дақылдарын анықтауға бағытталған болатын.

3.6. Оқшауланған цианобактерия дақылдарының өсу жағдайларын анықтау.

Оқшауланған цианобактерия штаммдары үш түрлі қоректік ортада (Zarruk, BG-11, Громов) 8 күн бойы өсірілді. Зерттеу нәтижесінде *Synechococcus sp. CBB-6*, *Oscillatoria sp. CBS-5* және *Anabaena sp. CBK-7* штаммдарының ең жақсы өсуі BG-11 ортасында байқалды, ал Zarruk және Громов орталарында олардың өсуі салыстырмалы түрде төмен болды. Осылайша, BG-11 ортасы болашақ инкубация үшін таңдалды.

Цианобактериялардың өсуін бағалау үшін келесі көрсеткіштер қолданылады:

- Оптикалық тығыздық (OD_{750}),
- Хлорофилл «a» мөлшері,
- Құрғақ биомасса массасы,
- Сутегі өндірісі (қажет жағдайда).

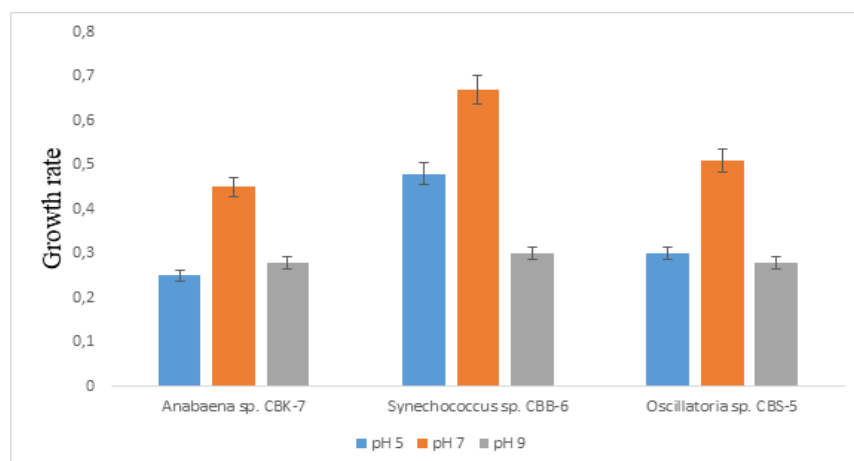


20-сурет – Әртүрлі қоректік орталарда цианобактерия штаммдарының өсу жылдамдығы

Қоректік ортаның құрамы маңызды фактор болса да, өсуге әсер ететін басқа да маңызды параметрлер бар, мысалы, рН, температура және жарықтың интенсивтілігі. Кез келген тірі ағзаның өсуі үшін оптималды жағдайлар қажет, олар рН, температура, жарық интенсивтілігі, оттегі мен көмірқышқыл газының концентрацияларын қамтиды. Осыған байланысты, біз таңдаған таза цианобактерия штаммдарының өсу динамикасына жоғарыда аталған факторлардың әсерін зерттедік.

3.6.1. Оқшауланған цианобактерия жасушаларының өсуіне рН әсері

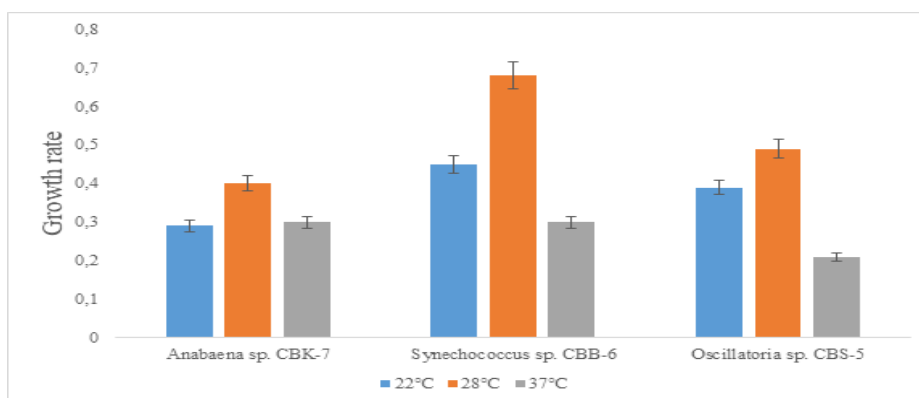
Көптеген цианобактерия дақылдары рН мәні 7-8 және температура 25°C – тан 35°C – қа дейін аралықта жақсы өседі. Әрбір түрдің өсуі үшін минималды, максималды және оптималды рН мәндері бар. Көптеген цианобактериялар нейтралды немесе сәл сілтілі орталарда жақсы дамиды.



21-сурет – Цианобактерия штаммдарына рН әсері

3.6.2. Оқшауланған цианобактерия жасушаларының өсуіне температураның әсері

Оптималды жағдайлар жасау, мысалы, оптималды температура, цианобактериялардың өсуін басқаруға мүмкіндік береді. Жоғары температура цианобактериялардағы ферменттердің денатурациясына әкеліп, олардың өсуін баяулата алады. Алайда, төмен температура цианобактериялардың өсу қарқынын баяулатып, олардың жасушаларындағы процестердің тежелуіне себеп болады. Осы себептермен, цианобактериялардың оңтайлы өсуіне қолайлы температураны табу маңызды.



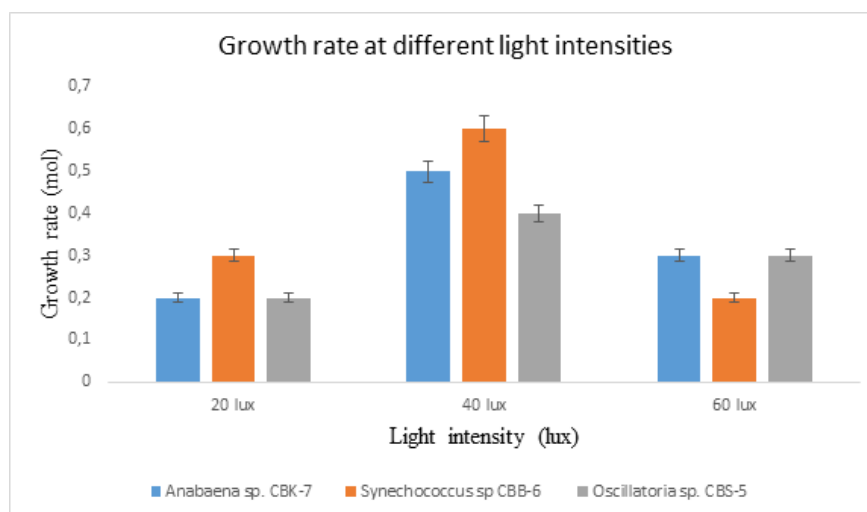
22-сурет – Цианобактерия штаммдарына температура әсері

Оқшауланған цианобактерия штаммдары үш түрлі температурада (22°C, 28°C, 37°C) өсірілді. *Synechococcus sp. CBB-6*, *Oscillatoria sp. CBS-5* және *Anabaena sp. CBK-7* штаммдарынынан алынған 3 суспензия 10 күн бойы өсірілді. Зерттеу нәтижесінде, цианобактериялар 28°C температурада ең жоғары өсу қарқынын көрсетті.

3.6.3. Оқшауланған цианобактерия штаммдарының өсуіне жарық интенсивтілігінің әсерін зерттеу

Цианобактериялардың сутегі шығару процесіне әсер ететін жарық интенсивтілігі зерттелді. Цианобактериялар жарықты су молекулаларын оттегі мен сутегі иондарында ыдырату үшін пайдаланады, ал жарыққа тәуелді азоттық ферменттер сутегіні өндіреді.

Жарық – цианобактериялардың негізгі энергия көзі болғандықтан, оның қарқындылығы олардың өсу динамикасына тікелей әсер етеді. Төмен жарық жағдайында фотосинтетикалық белсенділік баяулап, клеткалардың көбеюі тежеледі. Жарық жеткілікті болғанда, фотосистемаларда түзілген электрондар гидрогеназа немесе нитрогеназа арқылы H_2 түзуге жұмсалады.



23-сурет – Жарық жағдайында 20, 40 және 60 фотон MS2 интенсивтілігімен өсірілген оқшауланған цианобактерия штамдарының өсу белсенділігі көрсетілген.

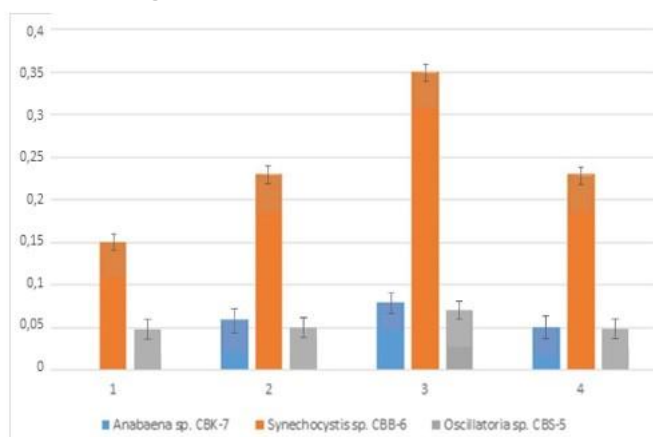
Эксперимент нәтижесінде, 40 фотон MS2 интенсивтілігі *Synechococcus sp. CBV-6*, *Oscillatoria sp. CBS-5* және *Anabaena sp. CBK-7* дақылдарының өсуіне тиімді болып, олардың ең жоғары өсу қарқыны 0.6 (OT750) деңгейінде тіркелді.

3.7. Цианобактерия штамдарының жарық жағдайындағы сутегі шығару көрсеткіштерін анықтау

Зерттеудің келесі кезеңі – зерттелген цианобактерия штамдарына жарық жағдайында сутегі жинақталуын зерттеу болды. Себебі, жарық энергиясы H_2 өндірісі үшін қажет және тікелей биофотоллизде электрон доноры ретінде қызмет етеді. Тікелей биофотоллизде жарық энергиясы жасушадағы суды $H + O_2$ бөлшектеріне бөлу үшін цианобактериялардың фотосистема 2 құрылымын пайдаланды. Жарық энергиясы цианобактериялардың фотосистемаларында кездесетін пигменттер арқылы жасушаға кіреді, кейін олар H_2O молекулаларының тотықтануын Fd_2 деңгейінде күшейтеді. Осы процестен шыққан протондар АТФ синтезін ынталандыру үшін пайдаланылады, ал электрондар Fd_1 арқылы хлоропласт ферредоксиніне беріледі. Fd , $[Fed]$ – гидрогеназаның электрон доноры ретінде, жасушадағы протондарды H_2 молекуласына қалпына келтіруге үлес қосады.

Цианобактерия штамдары қараңғы ортада жүргізілген сынақтармен ұқсас түрде боялды, ал жасушалардың инкубация жағдайлары сутегі шығару зерттеулерімен байланысты болды, айырмашылық тек жарықтың өткізілуінде болды. Тесттердің соңында *Synechococcus sp. CBV-6* штаммы жарық жағдайында жоғары деңгейде сутегі шығаруын көрсетті. *Synechococcus sp. CBV-6* штаммы 24 сағат ішінде анаэробты жағдайларды орнатқаннан кейін сутегі шығармаған. Ал екінші күннен бастап сутегі өндіру байқалып, төрт күн бойы белсенді түрде

шығарыла бастады, кейін келесі күні аздап төмендетеді. 72 сағаттан кейін сутегі жинақталуы $0.35 \mu\text{mol H}_2/\text{mg chl a/h}$ деңгейінде шыңына жетті.



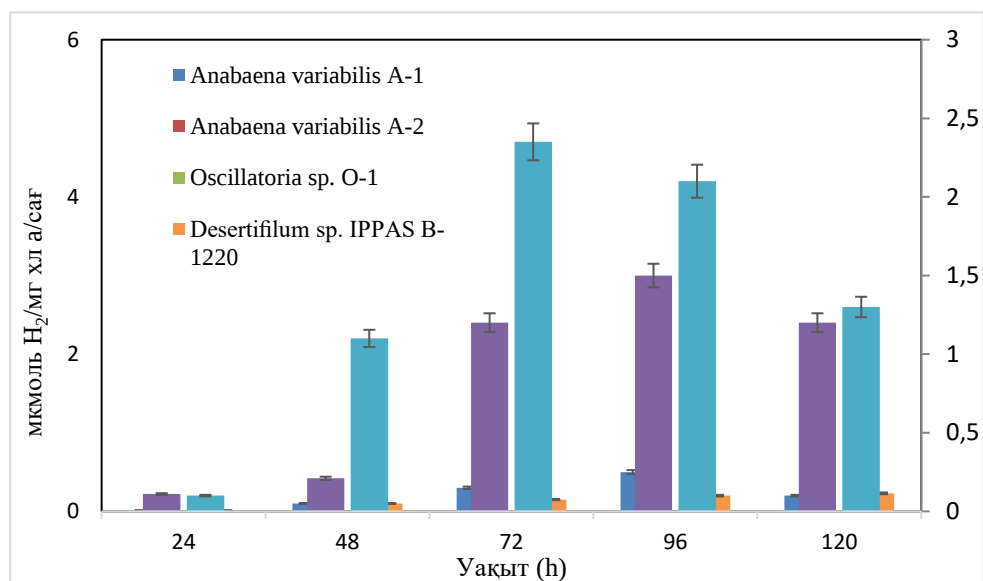
24-сурет – Цианобактериялардың жарық ортада сутегі шығару интенсивтігін зерттеу.

Жұмыстың мақсаты – жарықтың түсу интенсивтілігі, жарықтың әлсіреуі және температураның азотты бекітетін цианобактериялардың фотоавтотрофты өсуі мен сутегі өндіруіне әсерін модельдеу; Түрлі цианобактерия штаммдарының (*Anabaena*, *Oscillatoria*, *Synechococcus*) салыстырмалы өнімділігін зерттеу; Мұндай зерттеулер күн сәулесін пайдаланып сутегі өндіру әдістерін жетілдіруге көмектеседі.



25-сурет – Жұмыс істеу барысы

3.8. Цианобактерия штамдарының қараңғы жағдайындағы сутегі шығару көрсеткіштерін анықтау



26-сурет – Цианобактериялардың қараңғы ортада сутегі шығару интенситетін зерттеу

Сутек өндірісі – фотосинтетикалық электрон тасымалдау мен ферменттік (гидрогеназа немесе нитрогеназа) белсенділігіне байланысты. Барлық штамдарда сутек өндірісі уақыт өте келе көбейеді, бұл микробтардың бейімделуі мен фотосинтетикалық белсенділігінің артуын көрсетеді. Ең жоғары сутек өндірісі 72 сағатта байқалады.

Штамдар арасындағы айырмашылық:

Anabaena variabilis A-1 – сутек өндірісі жағынан ең тиімді штамм. 72 сағатта максимум (~ 4.4 $\mu\text{mol H}_2 / \text{mg chl a/h}$) байқалады. Бұл штаммның гидрогеназа белсенділігі жоғары екенін көрсетеді.

Desertifilum sp. IPPAS B-1220 – ол орташа көрсеткіш береді, бірақ 96 және 120 сағатта A-2 штаммынан асып түседі.

Anabaena variabilis A-2 және *Oscillatoria sp. O-1* – салыстырмалы түрде төмен сутек шығарады. *Oscillatoria* – ең төмен белсенділікке ие штамм.

Бұл график төрт түрлі цианобактерия штамдарының сутек өндіріс қабілетін салыстыруға мүмкіндік береді. Зерттеу нәтижелері бойынша, *Anabaena variabilis* A-1 штаммы ең жоғары сутек өндіру қабілетіне ие, ол болашақта биологиялық сутек өндіру үшін ең перспективалы штамм болып табылады, ал *Oscillatoria sp. O-1* – ең төмен көрсеткішке ие штамм екенін байқадық.

ҚОРЫТЫНДЫ

1. Ұйғыр ауданының, Шонжы ыстық су көзінен және Оңтүстік Қазақстанда орналасқан Түркістан облысынан алынған альгофлора құрамын зерттеу нәтижесінде, олардың 4 бөлімге, 9 классқа, 9 отрядқа, 17 тұқымдастарға және 50 түрге жататыны анықталып, таксономиялық құрылымы бойынша цианобактериялар *Cyanobacteria* – 29 (58%), *Bacillariophyta* – 5 (10%), *Euglenophyta* – 6 (12%), *Chlorophyta* – 10 (20%) болатыны байқалды.

2. Цианобактериялардың 3 аксеникалық таза штаммдары *Synechococcus* sp. CBV-6, *Oscillatoria* sp. CBS-5, *Anabaena* sp. CBK-7 бөлініп алынды.

3. Бөлініп алынған штаммдардың нитрогеназа белсенділігі азотсыз ортадағы культивирлеу арқылы зерттелінді. Белсенділігін зерттеу кезінде *Nostocales* қатарының өкілі *Anabaena* sp. белсенді нитрогеназа белсенділігін көрсетті. Цианобактерия штаммдарының сутегін бөлу қарқындылығына жарық әсері зерттелінді. 40 фотон/мс² жарық қарқындылығында бөлініп алынған цианобактерия дақылдарының өсуі белсенді екені анықталды. Цианобактериялар штамдарының сутегі бөлу қарқындылы жарық жағдайында зерттелінді. Жарықта *Synechococcus* sp. штаммы белсенділік танытып, сутегі жинақталуының ең жоғары жылдамдығы 0,35 мкмоль Н₂/мг хл а/сағ құрады. *Synechococcus* sp штаммымен анаэробты жағдай құрылғаннан бастап 24 сағаттың ішінде сутек бөлінуі тіркелмеді. Ал, екінші тәуліктен бастап Н₂ өндірісі байқалып, ол 4 тәулік ішінде белсенді түрде бөлінді және келесі тәуліктерде аздап төмендеу тіркелді.

4. *Anabaena variabilis* A-1 – сутек өндірісі жағынан ең тиімді штамм екенін байқадық. 72 сағатта максимум (~ 4.4 мкмоль Н₂ / мг Хл а/сағ) байқалады. Бұл штаммның гидрогеназа белсенділігі жоғары екенін көрсетеді.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1. Woese C., Kandler O., Wheelis M.L. Towards a Natural System of Organisms: Proposals for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. // Proc Natl Acad Sci USA. 2000.-T. 87.-P. 4576-4579. <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.87.12.4576>
2. Debajyoti Dutta, Debojyoti De, Surabhi Chaudhuri & Sanjoy K Bhattacharya; Hydrogen production by Cyanobacteria. 21 December 2005., <https://link.springer.com/article/10.1186/1475-2859-4-36>
3. S. M. Singh Ph.D & J. Elster Ph.D; Cyanobacteria in Antarctic Lake Environments., pp 303-320; https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-6112-7_16
4. Herbert Bohme., Botanisches Institut, Universitat Bonn, Kirschallee 1, 53115 Bonn, Germany; Regulation of nitrogen fixation in heterocyst – forming cyanobacteria; Volume 3, Issue 9, P346-351, September 01, 1998; [https://www.cell.com/trends/plant-science/abstract/S1360-1385\(98\)01290-4?large_figure=true](https://www.cell.com/trends/plant-science/abstract/S1360-1385(98)01290-4?large_figure=true)
5. Giorgos Markou., Dries Vandamme, Koenraad Muylaert; Microalgal and Cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. Volume 65, 15 November 2014, Pages 186-202 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135414005211>
6. Xianxian Xu, Quan Zhou, Dehai Yu; The future of energy: Bio- hydrogen production technology. Volume 47, Issue 79, 15 September 2022, Pages 33677-33698 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319922033961>
7. Patrick C. Hallenbeck., Departement de microbiologie et immunologie, University de Montreal; Pubmet., Hydrogen Production by Cyanobacteria: 12 November 2011 pp 15-28; https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-1208-3_2
8. Kajan Srirangan., Michael E. Pyne, C. Perry Chou; Biochemical and genetic engineering strategies to enhance hydrogen production in photosynthetic algae and cyanobacteria.,; Volume 102, Issue 18, September 2011, Pages 8589-8604. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852411004445>
9. Arnau Montagud, Daniel Gamermann, Pedro Fernandez de Cordoba & Javier F. Urchueguia., Pages 184-198 Received 14 Jan 2013, Accepted 25 Jul 2013, Published online: 03 Oct 2013; Synechocystis sp. PCC6803 metabolic models for the enhanced production of hydrogen. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07388551.2013.829799>
10. Chris Yeager (Los Alamos National Laboratory), Charles E Milliken, Christopher E Bagwell; Evaluation of experimental conditions that influence hydrogen production among heterocystous Cyanobacteria; May 2011. International Journal of hydrogen Energy. 36(13). https://www.researchgate.net/publication/230604010_Evaluation_of_experime

ntal_conditions_that_influence_hydrogen_production_among_heterocystous_Cyanobacteria

11. M. Berchtold, R. Bachofen. Published in Archives of Microbiology 1 December 1979. Biology, Environmental Science., Hydrogen formation by cyanobacteria cultures selected for nitrogen fixation; <https://www.semanticscholar.org/paper/Hydrogen-formation-by-cyanobacteria-cultures-for-Berchtold-Bachofen/41a1ca9f26ddbc4fcf652193885f4fb34762e91c>
12. Allahverdiyeva Yagut, Leino Hannu, Saari Lyudmila, Fewer David P, Shunmugam, Sumathy; Sivonen, Kaarina; Aro, Eva – Mari; Screening for biohydrogen production by cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes; <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2010IJHE...35.1117A/abstract>
13. Ravindra Kumar, Anil Kumar, Amit Pal; An overview of conventional and non-conventional hydrogen production methods; Volume 46, Part 11, 2021, Pages 5353-5359. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214785320366839>
14. Lucas J. Stal Ph.D. Netherlands Institute of Ecology,; Cyanobacteria Diversity and Versatility, Clues to Life in Extreme Environments; pp 659-680. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-6112-7_36
15. Panayiotis- Ilias Broussas, George E. Romanos, Kostas Stamatakis; H₂ production by the unicellular freshwater cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942 PAMCOD strain; Volume 52, Part D, 2 January 2024, Pages 1298-1303; <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0360319923058536>
16. Wim Vermaas (Arizona State University); Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria; April 2001; https://www.researchgate.net/publication/227981266_Photosynthesis_and_Respiration_in_Cyanobacteria
17. Абдуллин Ш.Р. Цианобактерии и водоросли пещеры шульган – таш (каповой): ... канд. Биол. Наук.: 03.00.05, 03.00.07. – Уфа: БГУ, 2005. -29 С. <https://www.dissercat.com/content/tsianobakterii-i-vodorosli-peshchery-shulgan-tash-kapovoi>
18. 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. <https://www.dissercat.com/content/sinezelenye-vodorosli-tsianobakterii-poverkhnostnykh-termoproyavlenii-kamchatki-i-vozmognos>
19. Richard D. Robarts & Tamar Zohary; Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria; Pages 391-399, Received 19 Feb 1987, Accepted 21 Apr 1987, Published online: 30 Mar 2010. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00288330.1987.9516235>

20. Cyanobacteria; From Wikipedia, the free encyclopedia.
<https://en.wikipedia.org/wiki/Cyanobacteria>
21. Jakob O. Nalley, Daniel R. O'Donnell, Elena Litchman; Temperature effects on growth rates and fatty acid content in freshwater algae and cyanobacteria; Volume 35, November 2018, Pages 500-507;
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2211926418301577>
22. Datta Madamvar (Charotar University of Science and Tech)., PubMed; Ultrastructure of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* and exploitation of the culture for hydrogen production; February 2003. *Folia Microbiologica* 48(1): 65-70.
https://www.researchgate.net/publication/10762657_Ultrastructure_of_the_cyanobacteriumNostoc_muscorum_and_exploitation_of_the_culture_for_hydrogen_production
23. Steven Chapra, Brent Boehlert, Charles Fant; Climate Change Impacts on Harmful Algal Blooms in U.S. Freshwater: A Screening- Level Assessment; June 2017 Environmental Science and Technology.
https://www.researchgate.net/publication/317926381_Climate_Change_Impacts_on_Harmful_Algal_Blooms_in_US_Freshwater_A_Screening-Level_Assessment
24. B. K. Zayadan G.B. Baimakhanova, G. Oraz, K. Bolatkhan, E.V. Zenina; Isolation of new stammes of cyanobacteria and their consortium with microalgae
25. Stal L.J., Krumbein W.E. Oxygen protection of nitrogenase in the aerobically nitrogen fixing, non – heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. // Archives of Microbiology . – 1985. – Vol. -143.- P. 72-76
<https://link.springer.com/article/10.1007/bf00414771>
26. Katsutoshi Hori, Shun'ichi Ishii, Gakuro Ikeda, Jun'ichi Okamoto, Yasunori Tanji, Chutimonthana Weeraphasphong, Hajime Unno; Biochemical Engineering Journal; Behavior of filamentous cyanobacterium *Anabaena* spp. In water column and its cellular characteristics. Volume 10, Issue 3, April 2002, Pages 217-225.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X01001851>
27. *Anabaena*; From Wikipedia, the free encyclopedia;
<https://en.wikipedia.org/wiki/Anabaena>
28. Radha Prasanna, Ramesh Kumar, Anjuli Sood B.M. Prasanna P.K. Singh; Morphological, Physiochemical and molecular characterization of *Anabaena*; Volume 161, Issue 3, July 2006, Pages 187-202.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501305000819>
29. Niraj Kumar Singh, Asha Parmar, Ravi R. Sonani, Datta Madamwar; Isolation, identification and characterization of novel thermotolerant *Oscillatoria* sp. N9DM: Change in pigmentation profile in response to temperature; Volume 47, Issue 12, December 2012, Pages 2472-2479;
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511312003789>
30. Ivan Carralero Bon Lucas M. Salvatierra, Luciana D. Lario, Jordi Morato, Leonardo M. Perez; Prospects in Cadmium-Contaminated Water Management

Using Free-Living Cyanobacteria (*Oscillatoria* sp.); Accepted: 17 February 2021/ Published: 20 February 2021. <https://www.mdpi.com/2073-4441/13/4/542>

31. Refat Abdel – Basset Klaus P. Bader; Physiological analyses of the hydrogen gas exchange in Cyanobacteria; Volume 43, Issue 2, 15 May 1998, Pages 146-151.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1011134498000979>
32. Anton F. Post, Rutger de Wit, Luuc R. Mur; Interactions between temperature and light intensity on growth and photosynthesis of the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*; Volume 7, Issue 4, 1985, Pages 487-495.
<https://academic.oup.com/plankt/article-abstract/7/4/487/1403271>
33. About : *Oscillatoria*
https://dbpedia.org/page/Oscillatoria?utm_source=chatgpt.com Anton F. Post, Rutger de Wit, Luuc R. Mur; Interactions between temperature and light intensity on growth and photosynthesis of the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*; Volume 7, Issue 4, 1985, Pages 487-495.
<https://academic.oup.com/plankt/article-abstract/7/4/487/1403271>
34. Cyanobacterial morphology; From Wikipedia , the free encyclopedia;
https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Cyanobacterial_morphology&utm_source=chatgpt.com#Filamentous
35. Spectral characteristic of fluorescence induction in a model cyanobacterium, *Synechococcus* sp. (PCC 7942); *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics*: Volume 1787, Issue 10, October 2009, Pages 1170-1178; <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272809001376>
36. Hydrogenases and Hydrogen Metabolism of Cyanobacteria; Paula Tamagnini, Rikard Axelsson, Pia Lindberg, Fredrik Oxelfelt, Peter Lindblad; 1 March 2002;
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272809001376>
37. Rees Rillema, Joshua S. MacCready, Anthony G. Vecchiarelli; 10.1101/2020.06.01. 127845; Cyanobacterial growth and morphology are influenced by carboxysome positioning and temperature;
https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.06.01.127845v2.full?utm_source=chatgpt.com
38. Джонсон, П.У .; Зиберт, Дж.М (1979). «Хроококковые цианобактерии в море: повсеместно распространенная и разнообразная фототрофная биомасса». *Лимнология и океанография*. 24(5): 9288-935.
<https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2007-8-12-r259>
39. Уотербери, Дж.Б.; Уотсон, С.У.; Гиллар, Р.Р.Л.; Брэнд, Л.Э. (1979). «Широко распространенная одноклеточная морская планктонная цианобактерия». *Nature*. 277(5694): 293-4.
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.00267-11>
40. Rosmarie Rippka, Josette Deruelles, John B. Waterbury, Michael Herdman and Roger Y. Stanier; Published: 01 March 1979; *Generic*

- Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. Volume 111, Issue 1; <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-111-1-1>
41. Elisabeth Gantt; Department of Cell Biology and Molecular Genetics, University of Maryland; Oxygenic photosynthesis and the distribution of chloroplasts; Published: 29 December 2010; Volume 107, pages 1-6 (2011); <https://link.springer.com/article/10.1007/s11120-010-9605-1>
 42. Gernot Renger., Light induced oxidative water splitting in photosynthesis: Energetics, kinetics and mechanism; Volume 104, Issues 1-2; July – August 2011, Pages 35-43; <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1011134411000376>
 43. J. A. Bassham & M. Calvin; The part of carbon in photosynthesis; pp 884-922. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-94798-8_30#citeas
 44. Manju A. Lal (Kirori Mal College, University of Delhi)., Satish. C. Bhatla (Department of Botany, University of Delhi).,; Photosynthesis; Chapter – first online: 05 December 2023; pp 107-154; https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-99-5736-1_5
 45. James D. Johnson M. S. Alumnus, Department of Chemistry Florida State University, Tallahassee, June 2006.; The Manganese-calcium oxide cluster of Photosystem II and its assimilation by the Cyanobacteria; https://www.chm.bris.ac.uk/motm/oec/motm_old.htm
 46. Judith M. Klatt, Dirk de Beer, Lubos Polerecky, Stefan Hausler; Cyanobacteria in Sulfidic Spring Microbial Mats Can Perform Oxygenic and Anoxygenic Photosynthesis Simultaneously during an Entire Diurnal Period; Microbiol., 15 December 2016; Volume 7 -2016; <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.01973/full>
 47. Dmitry Shevela, Jan F. Kern, Govindjee Govindjee & Johannes Messinger; Solar energy conversion by photosystem II: principles and structures; Published: 24 February 2023; Volume 156, pages 279-307(2023); <https://link.springer.com/article/10.1007/s11120-022-00991-y>
 48. N. Abas, A. Kalair, N. Khan; Review of fossil fuels and future energy technologies; Volume 69, May 2015, Pages 31-49; <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016328715000397>
 49. Vecchi V, Barera S, Bassi R, Dall'Osto L. Potential and challenges of improving photosynthesis in algae. Plants 2020; 9:67. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31947868/>
 50. Eilenberg H, Weiner I, Ben – Zvi O, Pundak C, Marmari A, Liran O, et al. The dual effect of a ferredoxin – hydrogenase fusion protein in vivo: successful divergence of the photosynthetic electron flux towards hydrogen production and elevated oxygen tolerance. Biotechnol Biofuels 2016; 9:182. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27582874/>

51. Bernat G, Waschewski N, Rogner M. Towards efficient hydrogen production: the impact of antenna size and external factors on electron transport dynamics in *Synechocystis* PCC 6803. *Photosynth Res* 2009; 99:205-16. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19137411/>
52. Photosynthetic hydrogen production: Suleyman I. Allakhverdiev, Velmurugan Thavasi, Vladimir D. Kreslavski; September 2015, Pages 101-103. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19247505/>
53. Photosynthetic, respiratory and extracellular electron transport pathways in cyanobacteria: David J. Lea-Smith, Paolo Bombelli, Ravendran Vasudevan, Christopher J. Howe; March 2016; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26498190/>
54. Peters JW, Schut GJ, Boyds ES, Mulder DW, Shepard EM, Broderick JB, et al. [FeFe]- and [NiFe]- hydrogenase diversity, mechanism, and maturation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2015;1853:1350-69 <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.021>
55. Wetanabe T, Wagner T, Huang G, Kahnt J, Ataka K, Ermler U, et al. The bacterial [Fe]- Hydrogenase paralog HmdII Uses Tetrahydrofolate derivatives as substrates. *Angew Chem, Int Ed Engl* 2019;58:3506-10. 10. <https://doi.org/10.1002/anie.201813465>
56. Rapson TD, Wood CC. Analysis of the ammonia production rates by nitrogenase. *Catalysts* 2022;12;844. <https://doi.org/10.3390/catal12080844>
57. Bandyopadhyay A, Ye Z, Benedikty Z, Tritlek M, Pakrasi HB. Antenna modification leads to enhanced nitrogenase activity in a high light tolerant cyanobacterium. *mBio* 2021;12:e0340821. <https://doi.org/10.1128/mbio.03408-21>
58. Masuawa H, Sakurai H, Hausinger R, Inoue K. Sustained photobiological hydrogen production in the presence of N₂ by nitrogenase mutants of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena*. *Int J Hydrogen Energy* 2014;39:19444-51. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.09.090>
59. Buhrke T, Lenz O, Krauss N, Friedrich B, Oxygen tolerance of the H₂-sensing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site. *J Biol Chem* 2005;280:23791-6. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503260200>
60. Reade JPH, Dougherty LJ, Rogers LJ, Gallon JRY. Synthesis and proteolytic degradation of nitrogenase in cultures of the unicellular cyanobacterium *Gloeotheca* strain ATCC 27152. *Microbiol* 1999;145:1749-58. <https://doi.org/10.1099/13500872-145-7-1749>
61. Wunschiers R, Batur M, Lindblad P. Prese and expression of hydrogenase specific C- terminal endopeptidases in cyanobacteria. *BMC Microbiol* 2003;3:8. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-3-8>
62. Buren S, Jimenez – Vicente E, Echavarr – Erasun C, Rubio LM. Biocynthesis of nitrogenase cofactors. *Chem Rev* 2020;120:4921-68. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00489>

**Қ.И.Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті
6В05101 – «Химиялық және биохимиялық инженерия» білім беру
бағдарламасының 4 курс студенттері Қуанышева Дариға мен
Мамыразакова Айгерімнің «Сутегін өндіретін цианобактерия
штамдарын іздеу, іріктеу және олардың өсіру жағдайларын
оңтайландыру» тақырыбындағы дипломдық жобасына**

РЕЦЕНЗИЯ

Цианобактериялар жарықты негізгі энергия көзі ретінде пайдаланатын фотосинтетикалық микроорганизмдер тобына жатады. Жарық қарқындылығы фотосинтез процесінің тиімділігіне тікелей ықпал етеді және бұл организмдер әртүрлі экологиялық жағдайларға бейімделу қабілетінің жоғары болуымен ерекшеленеді. Олар кең ауқымды тіршілік ету орталарында өмір сүре алады. Цианобактериялар негізінде биосутегі өндіру – теориялық қана емес, сонымен қатар практикалық маңызы зор бағыттардың бірі. Осы бағыттағы зерттеулер түрлі цианобактерия тұқымдастарының сутегі өндіру әлеуетін бағалауға және оны арттырудың ғылыми негізделген жолдарын анықтауға мүмкіндік береді.

Дипломдық жұмыста табиғи ортадан бөлініп алынған цианобактерия штамдарының биотехнологиялық әлеуеті жан-жақты қарастырылып, олардың морфологиялық және физиологиялық сипаттамалары анықталған. Зерттеу барысында студенттер Шонжы ыстық су көздері мен Түркістан өңірінен алынған табиғи үлгілерді зерттеп, оларды альгологиялық және бактериологиялық әдістер арқылы сипаттаған.

Жұмысқа енген әдеби шолуда биосутегі өндірісіндегі цианобактериялардың рөлі мен олардың метаболизміне сыртқы орта факторларының әсері жөнінде өзекті әрі құнды ғылыми деректер келтірілген. Зерттеу нәтижелері цианобактериялардың таза дақылдарын бөліп алу, оларды идентификациялау және өндірістік мақсатта қолдану мүмкіндіктерін нақты түрде көрсетеді. Алынған мәліметтер ғылыми негізделген, қолданылған әдістер дәйекті, ал жұмыс ғылыми тіл талаптарына толық сай жазылған.

Қорытынды

Қуанышева Дариға мен Мамыразакова Айгерімнің дипломдық жобасы зерттеліп отырған тақырыптың өзектілігімен, ғылыми жаңалығымен және практикалық құндылығымен ерекшеленеді. Жоба мазмұны бакалаврдың бітіру біліктілік жұмыстарына қойылатын барлық талаптарға толық сәйкес келеді. Зерттеу барысында алынған нәтижелердің ғылыми негізділігі мен орындалу сапасы жоғары деңгейде. Жұмыс жоғары деңгейде орындалғандықтан, «өте жақсы» деген бағаға лайық деп есептеледі.

Әл-Фараби атындағы ҚазҰУ
Биотехнология кафедрасының
қауымдастырылған профессоры, PhD



Болатхан К.

**6B05101 - «Химиялық және биохимиялық инженерия» білім беру
бағдарламасы**

Қуанышева Дариға және Мамыразакова Айгерім дипломдық жобасына

ҒЫЛЫМИ ЖЕТЕКШІНІҢ ПІКІРІ

**Тақырыбы: «СУТЕГІН ӨНДІРЕТІН ЦИАНОБАКТЕРИЯ
ШТАММДАРЫН ІЗДЕУ, ІРІКТЕУ ЖӘНЕ ОЛАРДЫҢ ӨСІРУ
ЖАҒДАЙЛАРЫН ОҢТАЙЛАНДЫРУ»**

Қуанышева Дариға және Мамыразакова Айгерім 6B05101 – «Химиялық және биохимиялық инженерия» білім беру бағдарламасы бойынша орындаған «Сутегін өндіретін цианобактерия штаммдарын іздеу, іріктеу және олардың өсіру жағдайларын оңтайландыру» тақырыбындағы дипломдық жобасы - биоэнергетика саласындағы өзекті мәселелердің біріне – биологиялық жолмен сутегі өндірудің тиімді әдістерін іздеуге арналған. Жоба аясында студенттер Шонжы ыстық су көздерінен және Түркістан өңірлерінен алынған цианобактерия үлгілерінің морфологиялық ерекшеліктерін зерттеп, оларды альгологиялық және бактериологиялық әдістермен сипаттаған.

Зерттеу барысында түрлі орта жағдайларының (жарық, температура, рН деңгейі) сутегі синтездейтін цианобактериялардың физиологиясы мен метаболизміне әсері жан-жақты талданып, *Anabaena sp.*, *Synechococcus sp.*, және *Oscillatoria sp.* сияқты штаммдардың биологиялық белсенділігіне ерекше көңіл бөлінген. Сонымен қатар, студенттер іріктелген штаммдардың (*Anabaena sp.* СВК – 7, *Synechococcus sp.* СВВ – 6, *Oscillatoria sp.* CBS – 5) жарық және қараңғы жағдайларындағы сутегі шығару көрсеткіштерін тәжірибе жүзінде анықтаған.

Дипломдық жоба құрылымдық және мазмұндық жағынан барлық талаптарға толықтай сай келеді. Зерттеу жұмыстары ғылыми негізделген, тәжірибелік бөлімі нақты нәтижелерге сүйенген және өзекті мәселені шешуге бағытталған. Студенттер зерттеу барысында жоғары жауапкершілік, ғылыми қызығушылық және ізденімпаздық танытты.

Жоғарыда аталғандарды ескере отырып, Қуанышева Дариға мен Мамыразакова Айгерімнің дипломдық жұмысы 6B05101 – «Химиялық және биохимиялық инженерия» білім беру бағдарламасы бойынша жаратылыстану ғылымдарының бакалавры академиялық дәрежесін алу үшін қорғауға жіберуге ұсынылады.

Ғылыми жетекші:
қауым. профессор PhD Какимова А. Б



Отчет подобию

Метаданные

Название организации

Satbayev University

Название

СУТЕГІН ӨНДІРЕТІН ЦИАНОБАКТЕРИЯ ШТАММДАРЫН ІЗДЕУ ЖӘНЕ ІРІКТЕУ ЖӘНЕ ОЛАРДЫҢ ӨСІРУ ЖАҒДАЙЛАРЫН
ОҢТАЙЛАНДЫРУ

Автор

Научный руководитель / Эксперт

Қуанышева Дариға, Мамыразакова Айгерім Сандугаш Сандыбаева

Подразделение

ИГИНГД

Объем найденных подобию

КП-ия определяют, какой процент текста по отношению к общему объему текста был найден в различных источниках.. Обратите внимание! Высокие значения коэффициентов не означают плагиат. Отчет должен быть проанализирован экспертом.



КП1

25

Длина фразы для коэффициента подобию 2



КП2

19960

Количество слов



КЦ

99799

Количество символов

Тревога

В этом разделе вы найдете информацию, касающуюся текстовых искажений. Эти искажения в тексте могут говорить о ВОЗМОЖНЫХ манипуляциях в тексте. Искажения в тексте могут носить преднамеренный характер, но чаще, характер технических ошибок при конвертации документа и его сохранении, поэтому мы рекомендуем вам подходить к анализу этого модуля со всей долей ответственности. В случае возникновения вопросов, просим обращаться в нашу службу поддержки.

Замена букв		19
Интервалы		0
Микропробелы		0
Белые знаки		0
Парафразы (SmartMarks)		5

Подобия по списку источников

Ниже представлен список источников. В этом списке представлены источники из различных баз данных. Цвет текста означает в каком источнике он был найден. Эти источники и значения Коэффициента Подобия не отражают прямого плагиата. Необходимо открыть каждый источник и проанализировать содержание и правильность оформления источника.

10 самых длинных фраз

		Цвет текста
ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ И АДРЕС ИСТОЧНИКА URL (НАЗВАНИЕ БАЗЫ)	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
1	Қазақстанда дзюдо күресінің дамуына үлесқосқан жаттықтырушылардың рөлі 12/7/2022 Kostanai State University A.Baitursynov (Кафедра теории и практики физической культуры и спорта)	16 0.08 %

2	Микроорганизмдердің басқа организмдермен қарым-қатынасы 12/8/2022 Kostanai State University A.Baitursynov (Кафедра естественно-научных дисциплин)	11 0.06 %
3	Қазақстанда дзюдо күресінің дамуына үлесқосқан жаттықтырушылардың рөлі 12/7/2022 Kostanai State University A.Baitursynov (Кафедра теории и практики физической культуры и спорта)	11 0.06 %
4	https://repo.kspi.kz/bitstream/handle/123456789/7024/2024-2_102-107.pdf?sequence=1	8 0.04 %
5	2022 Хамит Гүлжан Курстык Метаболизм.doc 12/5/2022 Kostanai State University A.Baitursynov (Кафедра естественно-научных дисциплин)	8 0.04 %
6	2022 Хамит Гүлжан Курстык Метаболизм.doc 12/5/2022 Kostanai State University A.Baitursynov (Кафедра естественно-научных дисциплин)	7 0.04 %
7	Жумабаева Акбота (Желаев) 12/1/2022 West Kazakhstan Agrarian Technical University named after Zhangir Khan (Институт агротехнологии)	7 0.04 %
8	Ұйым қызметінің тиімділігін арттыру факторы ретінде маркетингтік саясатты жетілдіру.docx 11/30/2022 International Kazakh-Turkish University named after Khoja Ahmed Yasawi (Экономика, басқару және құқық факультеті)	7 0.04 %
9	Алтыбаев А.КП 2022.doc 12/1/2022 Atyrau University of Oil and Gas n.a. Safi Utebaev (Центр академического превосходства)	6 0.03 %
10	2022 Хамит Гүлжан Курстык Метаболизм.doc 12/5/2022 Kostanai State University A.Baitursynov (Кафедра естественно-научных дисциплин)	6 0.03 %

из базы данных RefBooks (0.00 %)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---

из домашней базы данных (0.00 %)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---

из программы обмена базами данных (0.51 %)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
1	2022 Хамит Гүлжан Курстык Метаболизм.doc 12/5/2022 Kostanai State University A.Baitursynov (Кафедра естественно-научных дисциплин)	37 (6) 0.19 %
2	Қазақстанда дзюдо күресінің дамуына үлесқосқан жаттықтырушылардың рөлі 12/7/2022 Kostanai State University A.Baitursynov (Кафедра теории и практики физической культуры и спорта)	27 (2) 0.14 %
3	Ұйым қызметінің тиімділігін арттыру факторы ретінде маркетингтік саясатты жетілдіру.docx 11/30/2022 International Kazakh-Turkish University named after Khoja Ahmed Yasawi (Экономика, басқару және құқық факультеті)	13 (2) 0.07 %
4	Микроорганизмдердің басқа организмдермен қарым-қатынасы 12/8/2022 Kostanai State University A.Baitursynov (Кафедра естественно-научных дисциплин)	11 (1) 0.06 %

5	Жумабаева Акбота (Желаев) 12/1/2022 West Kazakhstan Agrarian Technical University named after Zhangir Khan (Институт агротехнологии)	7 (1) 0.04 %
6	Алтыбаев А.КП 2022.doc 12/1/2022 Atyrau University of Oil and Gas n.a. Safi Utebaev (Центр академического превосходства)	6 (1) 0.03 %

из интернета (0.12 %)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	ИСТОЧНИК URL	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
1	https://peerj.com/articles/6294/	11 (2) 0.06 %
2	https://repo.kspi.kz/bitstream/handle/123456789/7024/2024-2_102-107.pdf?sequence=1	8 (1) 0.04 %
3	https://evpahealth.org.ua/info/uk/vozdejstvie-sircana-kislota.php	5 (1) 0.03 %

Список принятых фрагментов (нет принятых фрагментов)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	СОДЕРЖАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	------------	---