

әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті

ӘОЖ 602.3:579.8

Қолжазба құқығында

Қосалбаев Бекжан Дүйсенбіұлы

**Биотехнологияда қолданылатын цианобактериялардың активті
штамдарын бөліп алу және зерттеу**

6D070100 – Биотехнология

Философия докторы (PhD)
дәрежесін алу үшін дайындалған диссертация

Ғылыми кеңесшілері:

Заядан Б.Қ.

биология ғылымдарының докторы,
профессор, ҚР ҰҒА-ның академигі

Татцуя Томо

PhD, профессор

Қазақстан Республикасы

Алматы, 2020

МАЗМҰНЫ

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР	4
КІРІСПЕ	5
1 ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ	9
1.1 Цианобактерия – биотехнологиядағы маңызды зерттеу нысаны	9
1.1.1 Цианобактериялардың агробиотехнологиядағы маңызы	10
1.1.2 Цианобактерия – биоэнергетикадағы маңызды объект	18
1.2 Азот фиксациясының және сутегін алудың биохимиялық негіздері	28
2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ	37
2.1 Зерттеу объектілері мен материалдары	37
2.2 Цианобактериялардың түрлік құрамын анықтау	38
2.3 Цианобактериялардың жинақы дақылдарын алу	38
2.4 Цианобактериялардың альгологиялық таза дақылдарын бөліп алу	38
2.5 Цианобактериялардың бактериялогиялық таза дақылдарын алу	39
2.6 Цианобактериялардың өнімділігін арттыру әдістері	40
2.6.1 Цианобактериялардың клеткаларын сандық есептеу	40
2.6.2 Цианобактериялардың құрғақ биомассасының мөлшерін анықтау	41
2.6.3 Цианобактериялардың өсу жылдамдығының коэффициентін анықтау әдісі	41
2.6.4 Цианобактериялардың морфологиялық дақылдық қасиеттерін зерттеу	42
2.6.5 Цианобактерияларды дақылдау үшін жарық қарқындылығын өлшеу	42
2.6.6 Цианобактерияларды дақылдау үшін CO ₂ өлшеу	42
2.7 Цианобактериялардан сутек алу әдістері	42
2.8 Ацетилен әдісімен нитрогеназаның белсенділігін өлшеу әдісі	45
2.9 Құлпынай көшеттерін өсіру және зерттеу әдістері	45
2.10 Күрішті өсіру және зерттеу әдістері	47
2.11 Филогенетикалық талдау әдістері	48
2.12 Статистикалық анализ жасау	49
3 ЗЕРТТЕУДІҢ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ТАЛҚЫЛАУ	50
3.1 Цианобактериялардың агробиотехнологиядағы потенциалын зерттеу	50
3.1.1 Цианобактериялардың таза дақылдарын бөліп алу	50
3.1.2 Бөлініп алынған цианобактериялардың дақылдарын идентификациялау	57
3.1.3 Бөлініп алынған цианобактериялардың штамдарының нитрогеназа белсенділігін зерттеу	60
3.1.4 Бөлініп алынған цианобактерия штамдарының биомассасының күрішке әсерін зерттеу	68
3.1.5 Цианобактериялардың коллекциялық штамдарының нитрогеназа белсенділігін зерттеу	70

3.1.6	Коллекциялық цианобактерия штамы биомассасының құлпынайға әсерін зерттеу	71
3.2	Цианобактериялардың коллекциялық штамдарының биосутек алудағы потенциалын зерттеу	79
3.2.1	Гетероцистасыз цианобактериялардың сутек бөлуін зерттеу	79
3.2.2	Диурон ингибиторының әсерін зерттеу	84
3.2.3	Зерттелген штамдардың флуоресценция спектрінің белсенділігін анықтау	92
3.3	Гетероцисталы цианобактерия штамдарының сутек бөлуін зерттеу	93
	ҚОРЫТЫНДЫ	99
	ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ	100
	ҚОСЫМШАЛАР 1, 2	117

БЕЛГІЛЕУЛЕР МЕН ҚЫСҚАРТУЛАР

BG₀-11 – азотсыз BG-11 қоректік ортасы
C₂H₂ – ацетилен
C₂H₄ – этилен
СССР – карбонил цианид м-хлорофенил гидразон
ССМКазNU – Culture collection of microalgae of KazNU
DBMIB – 2,5-дибромо-3-метил-6-изопропил-р-бензокинон
DCMU – диурон
KCN – калий цианиді
MB – метил виологен
N₂аза – нитрогеназа
NDH – НАД(Ф) дегидрогеназа
ОПП – пентозды тотықтырғыш
PCP – пентахлорфенол
PEG – полиэтиленгликол
P_i – фотосинтез-сәулелену
PQ – пластохинон
SDH – сукцинатты дегидрогеназа
АҮФ – аденозинүшфосфат
BK – вегетативті клеткалар
ГАФ – глицеральдегид-3-фосфат
ГК – гетероцистады клеткалар
ГХ – газ хроматографы
ДНҚ – дезоксирибоза нуклеин қышқылы
Н₂аза - гидрогеназа
НАД – никотинамидадениндинуклеотид
НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
ПТР – полимеразалық тізбекті реакция
ПХ – пластохинон бассейні
ПЦ – пластоцианин
pPHC – рибосомалық рибонуклеин қышқылы
Рубиско – рибулоза-1,5-бисфосфат карбоксилаза оксигеназы
Фд – ферредоксин
ФЖ – фотожүйелер
ФЖ1 – фотожүйе 1
ФЖ2 – фотожүйе 2
ФНР – ферредоксин НАД(Ф) редуктаза
Хл а – хлорофилл а
Цит – цитохром
Цит b₆f – цитохром b₆f кешені
Цит окс – цитохром оксидазасы
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

КІРІСПЕ

Жұмыстың жалпы сипаттамасы

Дисертациялық жұмыста әр түрлі экожүйелерден бөлініп алынған және коллекциялық белсенді цианобактерия штамдарының агробиотехнологиядағы және сутегін алу биотехнологиясындағы потенциалын зерттеу нәтижелері қарастырылған.

Зерттеу тақырыбының өзектілігі

Цианобактериялардың алуантүрлігі мен физиологиялық ерекшеліктерін осы уақытқа дейінгі зерттелген жұмыстар олардың биотехнология саласында маңызды нысана екендігін дәлелдейді. Соңғы жылдардағы цианобактериялар биоактивті қосылыстардың бай көзі ретінде назарға ие болды және олар биологиялық көптеген метаболиттерді өндіре алатын негізгі продуценттер ретінде танылды. Цианобактерия тағы басқа да көптеген биотехнологиялық өндірістерде қолданылады: тағам, отын, тыңайтқыштар, бояғыш заттар мен токсиндер, дәрумендер, ферменттер және фармацевтикалық препараттар, екінші реттік метаболиттер өндіру.

Соңғы жылдары баламалы энергия көздеріне деген қызығушылықтар артып, нәтижесінде биодизель, биосутек, биобутанол, биоэтанол, биомұнай және биогаз деген жаңа терминдер ғылымға енді. Қазіргі уақытта ғалымдардың қызығушылықтары биоотын өндірісінде қолданылатын сарқылмайтын шикізат көздеріне, оның ішінде биофотоллизге негізделген сутегі алу үдерісіне түсіп отыр. Биоэнергетика салаларының ішіндегі сутегі өндірісі – ең таза, әрі технологиялық тұрғыдан қымбаты болып келеді, дегенмен, сутек болашақта туындаған көптеген мәселелерді шешуде маңызды рөлге ие болуы мүмкін. Сутегі энергиясының 50%-ы қазірде көмірдің реформациясынан алынады, ал биологиялық жолмен 0,1%-ы ғана өндіріледі. Себебі, қарқынды жүргізілген зерттеулерге қарамастан осы уақытқа дейін нақты биосутек өндіруге қабілетті активті продуцент табылмады. Қазірге дейін алуан түрлі биологиялық объектілердің сутек өндіру қабілеттері зерттелінді. Осы тұрғыда цианобактериялар күн сәулесі негізінде алынған энергия көздерін пайдалана отырып биофотоллиз үдерісін жүргізіп, молекулалық сутегін бөлуге бейімделген. Нитрогеназа және гидрогеназа ферменттерінің белсенділігіне негізделген биосутек өндірісін қолға алу ғаламдық тұрғыда туындаған көптеген мәселелердің шешімі болуы мүмкін.

Сонымен қатар, нитрогеназа ферменті сутек бөлумен қатар, ауадағы бос азотты фиксациялап, топырақ құрамына сіңіреді. Клетка құрамындағы нитрогеназа ферменті бір уақытта ауадағы бос азотты сіңіріп, аммиакқа (NH_3) айналдыру, сутекті соңғы өнім ретінде сыртқы ортаға шығару және АҰФ энергиясын АДФ-ке айналдыру үдерістерін қатар атқарады. Гидрогеназа ферменті вегетативті клеткалардағы сутек бөлінуіне жауап береді, ал нитрогеназа ферменттінің белсенділігі негізінде клеткада қорға жинақталған энергия пайдаланылады. Осы жағдайға байланысты нитрогеназа мен гидрогеназа белсенділігі жоғары цианобактериялардың активті штамдарын бөліп алу, олардан биосутегін және биотыңайтқыштар алуға пайдалануға

бағытталған зерттеулер 21 ғасыр биотехнология саласының өзекті мәселерінің бір болып табылады.

Зерттеу жұмысының мақсаты

Әр түрлі экожүйелерден бөлініп алынған және коллекциялық белсенді цианобактерия штамдарының агробиотехнологиядағы және сутегін алу биотехнологиясындағы потенциалын зерттеу.

Зерттеу жұмысының міндеттері

1. Әр түрлі экожүйелерден цианобактериялардың аксеникалық таза дақылдарын бөліп алу және идентификациялау;
2. Бөлініп алынған цианобактериялар дақылдары мен коллекциялық штамдарының нитрогеназа белсенділігін анықтау;
3. Бөлініп алынған цианобактерия штамдарының биомассасының күріштің өнімділігіне әсерін зерттеу;
4. Цианобактерияның коллекциялық штамдары биомассасының құлпынайдың өнімділігіне әсерін зерттеу;
5. Гетероцистасыз цианобактериялар дақылдарынан сутегін бөліп алу жолдарын зерттеу;
6. Гетероцисталы цианобактерия штамдарының сутегін бөлу үдерісін зерттеу.

Зерттеу объектілері

Зерттеу жұмысының объектісі ретінде коллекциялық және әр түрлі экожүйелерден бөлініп алынған цианобактериялардың штамдары қолданылды. Коллекциялық штамдар – *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220, *Synechococcus* sp. I12 және *Phormidium corium* B-26, *Anabaena* sp. 7912, *Anabaena* sp. Z-1, *Anabaena variabilis* R-I-5, *Nostoc caldicola* RI-3, *Nostoc* sp. S-2, *Synechocystis* sp. PCC 6803. Бөлініп алынған;– *Anabaena* sp. B1-4, *Nostoc* sp. J-14, *Cylindrospermum* sp. J-8, *Anabaena* K-31 және *Tolypothrix* J-1, *Oscillatoria* Sh-11 дақылдары және жоғары сатылы өсімдік құлпынайдың *Sunrise* T-4 және Ақмаржан күрішінің сорттары қолданылды.

Зерттеу әдістері

Жұмыс барысында микробиологиялық, альгологиялық, биотехнологиялық, молекулалық генетикалық, агротехникалық және физикалық, химиялық әдістер қолданылды.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы

Алғаш рет Қызылорда облысы, Жаңақорған ауданның күріш алқабының альгофлора құрамы зерттелді. Зерттеу нәтижесінде цианобактериялардың 6 альгологиялық және 5 аксеникалық таза дақылдары бөлініп алынды.

Цианобактериялардың *Anabaena* sp. B1-4, *Nostoc* sp. J-14 және *Tolypothrix tenuis* J-1 штамдары идентификацияланып, филогенетикалық талдауы жасалынды.

Алғаш болып цианобактериялардың нитрогеназа және гидрогеназа белсенділігі зерттелініп, *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамның жарықта биосутек бөлуге жоғарғы қабілеттілігі анықталды.

Құлпынай өсімдігінің (*Sunrise* T-4 сорты) өнімділігіне азотфиксациялаушы цианобактерия *Anabaena* sp. B1-4 штамның оң әсері анықталып, оны топырақ құрамын құнарландыруға пайдалануға ұсынылады.

Жұмыстың ғылыми және практикалық маңызы

Бөлініп алынған *Anabaena* sp. B1-4, *Nostoc* sp. J-14, *Cylindrospermum* sp. J-8, *Anabaena variabilis* K-31, *Oscillatoria* Sh-11, *Tolypothrix tenuis* J-1 цианобактериялардың штамдары ары қарай зерттеу жұмыстарына қолдану үшін әл-Фараби атындағы ҚазҰУ-нің фотобиотехнология зертханасының «ССМКазНУ» микробалдырлар коллекциясына енгізілді.

Фототрофты микроорганизмдерді өсіруге арналған бес секциялы фотобиореактордың технологиялық сызбасы әзірленді және патенттелді («Фототрофты микроорганизмдерді дақылдауға және сұрыптауға арналған фотобиореактор» пайдалы моделіне арналған патент», №38863, 05.06.2019). Осы технологиялық сызба бойынша жасалған фотобиореактор цианобактериялар мен микробалдырлардың штамдарын жаппай өсіру үшін және дақылдармен селекциялық жұмыстар жүргізу үшін ұсынылады.

Зерттеу жұмыстарының нәтижесі бойынша таңдалып алынған *Anabaena variabilis* R-I-5 және *Anabaena* sp. B1-4 штамдарының биомассасы негізінде алынған суспензияның ауылшаруашылық өсімдіктерінің өнімділігіне оң әсері анықталынып, әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық университетінің жылыжайында қолданылуда.

Ғылыми-зерттеу жұмысы барысында таңдалған азот фиксациялаушы *Anabaena variabilis* R-I-5 және *Anabaena* sp. B1-4 штамдары негізінде алынған биомасса қазіргі уақытта ауылшаруашылық өсімдіктеріне биотыңайтқыш ретінде әл-Фараби атындағы ҚазҰУ-нің жылыжайында қолданылуда.

Қорғауға шығарылған негізгі қағидалар

Күріш алқабынан цианобактериялардың аксеникалық 6 дақылдың бөлініп алынуы, олардың 3 дақылының *Anabaena* sp. B1-4, *Nostoc* sp. J-14 және *Tolypothrix tenuis* J-1 түрлері ретінде идентификациясы;

Anabaena sp. B1-4 штамының өсіру қоректік ортасына молибдені (Mo^{+6}) бар 1 мкмоль мөлшерде тұзды қосу нәтижесі нитрогеназа ферментінің белсенділігінің артуы және оның күріштің өнімділігіне оң әсері;

Азотфиксациялау қабілеті жоғары *Anabaena variabilis* R-I-5 және *Anabaena* sp. B1-4 штамдарының биомассасын құлпынай (*Sunrise* T-4) және күріш (Ақмаржан) сорттарының өнімділігіне әсері;

Жарық және қараңғы жағдайда зерттеу кезінде, қараңғы ортада *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамы, ал жарықта *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамының белсенділік көрсетуі;

Гетероцисталы цианобактериялардың сутек бөлу қарқындылығы жарық және қараңғы жағдайда зерттеу кезінде *Anabaena variabilis* R-I-5 штамы нитрогеназа белсенділігі бойынша ерекшеленіп, жарықта жоғары мөлшерде сутегін бөлсе, қараңғыда *Nostoc caldicola* RI-3 штамы белсенділік танытуы.

Автордың жеке үлесі

Зерттелетін мәселеге қатысты әдеби деректерге талдау, жұмыстың мақсат-міндеттерін анықтау, тәжірибелік зерттеулерді жүргізу, нәтижелерді статистикалық өңдеу және талдау, диссертацияны жазу мен қол жазбаны рәсімдеу автордың жеке қатысуымен орындалды.

Жұмыстың мемлекеттік бағдарламалар жоспарымен байланыстылығы

Диссертациялық жұмыс АР05131218 «Ағынды суларды биологиялық тазартудың және биодизельді потенциалды өндіру үшін цианобактериялар негізінде көмірқышқыл газын пайдаланудың қалдықсыз технологиясын жасау» (2018-2020 жж.), АР08052481 «Микробалдырлардың белсенді штамдары негізінде биодизель өндірісінің технологиясын жасау» (2020-2022 жж.) және АР08052402 «Азотты фиксациялаушы цианобактерияларға негізделген тыңайтқыштар өндірісінің технологиясын жасау» (2020-2022 жж.) жобаларының шеңберінде орындалды.

Жұмыстың сыннан өтуі

Зерттеу нәтижелері және диссертациялық жұмыстың негізгі қағидалары төмендегідей халықаралық ғылыми конференциялар мен симпозиумдарда баяндалды және талқыланды:

1. Студенттер мен жас ғалымдардың «Фараби әлемі» атты халықаралық ғылыми конференциясы, 10-11 сәуір 2018 жыл, Алматы, Қазақстан;
2. «Биология – ХХІ ғасыр ғылымы» атты Халықаралық жас ғалымдардың Пушино мектебі-конференциясы, 23-27 сәуір 2018 жыл, Пушино, РФ;
3. Биоғылым және биотехнология бойынша 4-ші халықаралық конференция (BioTech 2019), 2-22 ақпан 2019 жыл, Куала-Лумпур, Малайзия;
4. Тұрақтылыққа арналған фотосинтез және сутегі энергиясын зерттеу жөніндегі 10-шы халықаралық конференция, 23-28 маусым 2019 жыл, Санкт-Петербург, РФ;
5. Цианобактериялар биологиясы бойынша 11-ші Еуропалық семинар, 7-9 қыркүйек 2020 жыл, Руа Альфредо Аллен, Португалия.

Басылымдар

Диссертацияның негізгі құрамы 13 басылып шығарылған жұмыстарда көрсетілген, олардың 4 мақала ҚР білім және ғылым саласын бақылау бойынша Комитет тізіміндегі республикалық ғылыми журналдарда, 1-ші квартильде 3 ғылыми мақалалар және халықаралық конференцияларда 5 тезис жарияланды. Зерттеу нәтижелері бойынша «Фототрофты микроорганизмдерді дақылдауға және сұрыптауға арналған фотобиореактор», №38863, 27.09.2019 пайдалы модельге патент алынды.

Диссертациялық жұмыстың құрылымы мен көлемі

Диссертациялық жұмыс 117 компьютерлік мәтіннен және белгілер мен қысқартылған сөздерден, кіріспе, әдебиетке шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, зерттеу нәтижелері және оларды талқылау, қорытынды және 243 пайдаланылған әдебиеттерден тұрады. Жұмыстың көлеміне 8 кесте, 52 сурет және 1 қосымша бет кіреді.

1 ӘДЕБИЕТТЕРГЕ ШОЛУ

1.1 Цианобактерия – биотехнологиядағы маңызды зерттеу нысаны

Цианобактериялар – метаболиттік ерекшеліктері негізінде табиғатта кең таралған және топырақ пен тұщы сулардан мұхитқа дейінгі әртүрлі экологиялық аймақтарда өмір сүретін микроорганизмдердің үлкен тобы және олар биотехнологиялық өнімдерді алуда маңызды рөлге ие болып келеді. Цианобактерия фототрофты ағзаларға тән әртүрлі биологиялық процестерді, соның ішінде оттегі фотопродукциясы, азот фиксациясы, мембраналық биогенез процесі, клетка дифференциациясы, молекулалық эволюция үдерісі, стресс факторларын қабылдау және олардың бейімделгіштік үдерістері тұрғысындағы әрекеттерді жүзеге асырады [2, 3, 4].

Барлық цианобактериялар оттегі фотосинтезін жүргізеді, бірақ кейбір цианобактериялардың түрлері электрон доноры ретінде сульфидті пайдаланып бактериялық антиоксиданттарды фотосинтез процесін жүргізуге қолданады. Аноксикалық жағдайларда және қараңғы уақытта цианобактериялар ашу үдерісін жүзеге асырады [5]. Кейбір цианобактериялар гетероцисталар түзеді және атмосфералық азотты фиксациялауда маңызды рөл атқарады [6].

Цианобактериялардың әртүрлілігі мен физиологиясы тұрғысындағы осы уақытқа дейінгі зерттелген жұмыстар олардың биотехнологияда кең қолданылуына мүмкіндік береді. Соңғы жылдардағы зерттеу жұмыстарында цианобактериялар биоактивті қосылыстардың бай көзі ретінде назарға ие болды және олар биологиялық көптеген метаболиттерді өндіре алатын негізгі продуценттер ретінде танылды [7]. Бұл цианобактериялық метаболиттерге антибактериалды [8], антифугалды [9], антивирустық [10], антиканцер, антиплазмодиалды, алгицидті және иммуносупрессивті агенттер жатады. Антибиотиктер өндіруге қабілетті цианобактериялардың сұрыптау жұмыстарын жүргізу жаңа препараттардың жасалуына жол ашты. Кейбір цианобактериялар қасиеттері бойынша полиэтилен мен полипропиленмен салыстырылатын клеткаішілік полигидроксилканаттарды жинақтайды [11]. Бұл биологиялық жолмен ыдырайтын заттар кейбір мұнайдан жасалынатын термопластинканы алмастыра алады. Цианобактериялармен соңғы жылдары жүргізілген зерттеулер олардың хемотрофты бактериялармен жақсы консорциум құрайтындығын және мұнаймен ластанған шөгінділер мен ағынды суларды тазартуда тиімді қолданылатындығын көрсетті. Цианобактерия тағы басқа да көптеген биотехнологиялық өндірістерде қолданылады: көкөніс, тамақ, отын, тыңайтқыштар, бояғыш заттар мен токсиндер, дәрумендер, ферменттер және фармацевтикалық препараттар, екінші реттік метаболиттер өндіру.

Біріншілік метаболиттерден басқа, цианобактериялар қоршаған ортаға жануарларға улы болып табылатын көптеген екіншілік метаболиттерді және биологиялық белсенді қосылыстарды (химиялық алкалоидтар мен олигопептидтерді) бөліп шығарады [12]. Сонымен қатар, осы қосылыстардың кейбір бөлігі биологиялық белсенділігіне байланысты рак пен басқа да нерв жүйесінің ауруларын емдеуге арналған дәрі-дәрімектерді жасауда қолданылады. Осы тұрғыда, активті микроорганизмдердің түрлерін энергияның балама

түрлерін алуда, қалдық су қондырғыларындағы макроэлементтерді пайдаға жаратуда, биотыңайтқыш және азық ретінде ауыл шаруашылығының топыраған құнарлатуда қолданылады. Цианобактериялар биотехнологияның көптеген салаларында кеңінен қолданылуы биотехнология ғылымындағы олардың зерттелу аясын кеңейте түседі. Сонымен қатар, әртүрлі цианобактериялардың белсенді штамдары биотехнологиядағы цианобактериялардың маңыздылығын одан әрі дамыта түседі. Осы тұрғыда цианобактериялардың белсенді өсетін түрлерін табиғи ортадан бөліп алудың маңызы өте жоғары болып табылады.

1.1.1 Цианобактериялардың агробиотехнологиядағы маңызы

Цианобактериялар – бұл теңіз, тұщы су және жер үсті орталарында кең таралған аэробты, фотосинтетикалық бактериялар және олардың кей бөлігі атмосфералық азотты фиксациялауға қабілетті болып келеді. Алайда, молекулалық азотты фиксациялауға жауап беретін нитрогеназа ферменті оттегіге сезімталдық танытады. Сондықтан, оттегі бөлінуі мен азотты ауадан сіңіру үдерістері бір уақытта қатар жүрмейді. Демек, осы уақытқа дейін жүзеге асқан эволюция процесінің нәтижесінде цианобактериялар азотты сіңіру үдерісін қалыптастыру жолында бірнеше қосымша химиялық жолдарды жасады. Кейбір жіпшелі цианобактериялар гетероцисталарды вегетативті клеткалардан бөліп жібере алады, ол оттегінің кедергісіне ұшырамай, азотты сіңіру үдерісін қысқа уақыт болсын жүргізуге мүмкіндік береді. Гетероцистасыз цианобактериялар азотты сіңіру процесін қараңғы ортада белсенді жүргізеді. Ауадағы азотты фиксациялау қабілеті тек гетероцисталы цианобактериялармен (*Nostoc*, *Anabaena*, *Aulosira* және т.б.) ғана емес, сонымен қатар, бірнеше гетероцистасыз бір клеткалы (*Gloeocapsa*, *Aphanothese* және т.б) және жіпшелі цианобактериялар (*Oscillatoria*, *Plectonema* және т.б.) арқылы да жүзеге асады (кесте 1). Гетероцистасыз формаларда оттегінің бөлінуі вегетативті клеткаларда жүзеге асатын азот фиксациясымен бір уақытта жүрмеуі мүмкін. Цианобактериялардың кейбір түрлерінде азотты фиксациялау екі түрлі клеткаларда жүргізіледі: вегетативті және гетероцисталы.

1. Вегетативті клеткалардағы азотты фиксациялау үдерісі қараңғы ортада жүргізіледі, ал фотосинтезді жүзеге асыратын Күн энергиясы болғандықтан, оттегінің бөлінуі тек жарық ортада қарқынды болады. Дегенмен, вегетативті клеткалар үшін қараңғы ортада азотты фиксациялау процесі энергия алмасу тұрғысынан тиімсіз болып келеді, бұл үдеріс цианобактериялардың тіршілік ету қасиеттерін дамыту үшін эволюция барысында пайда болған. Вегетативті цианобактериялардағы азотты фиксациялау процесі шоғырланған клеткалардың жиынтығында жүргізіледі. Клеткалардың шоғырында, ішкі бөлікте тұрған клеткалар азот фиксациялауды жүргізсе, сыртқы аймақтарда орналасқан клеткалар көбіне фотосинтезді жүзеге асырады [13].

2. Гетероцисталы цианобактериялардағы азот фиксациясы оттегінің бөлінуінен бөлек, гетероцисталы клеткаларда жүргізіледі. Осы тұрғыда, гетероцисталы цианобактериялар биотыңайтқыш ретінде аса маңыздылыққа ие. Биотыңайтқыштық ретінде қолданылатын гетероцисталы, жіп тәрізді формалар – *Nostocales* және *Stigonematales* жатады, онда нитрогеназаның активтенуі мен

оттегі фотосинтезі кеңістікте бөлінеді, ал нитрогеназа белсенділігі әдетте жарыққа тәуелді болады. *Nostoc*, *Anabaena*, *Tolypothrix*, *Aulosira*, *Cylindrospermum*, *Scytonema* және басқа да бірнеше түрлер егістік алқаптарында кеңінен таралған және топырақтың құнарлануына айтарлықтай ықпал етеді. Цианобактериялар 20-30 кг N/га/жыл топыраққа әкелуі мүмкін, бұл экономикалық тұрғыдан ауылшаруашылық мамандарына үлкен жеңілдік болып табылады. Еркін тіршілік ететін цианобактериялардың шоғырлануы тропикалық аймақтарда жиі кездеседі, ал егістіктерде цианобактерияларды азоттық тыңайтқыш ретінде қолдану Азия елдерінің көпшілігінде жүргізіледі. Күріштен басқа көкөністер, бидай, құмай, жүгері, қызынақ, құлпынай және тағы басқа да өсімдік дақылдары цианобактериялар негізіндегі азотты тұтынады [13, 14]. Субтропикалық аймақтардағы *Azolla* өсімдігінің жапырағының қуысында гетероцисталы *Anabaena azollae* цианобактериясы табылған және осы түр қазірге дейін ең маңызды биотыңайтқыштардың бірі болып табылады.

Оттегінің ортадағы жоғары концентрациясы нитрогеназаның субеотидтерінің протеолизін тудырады, себебі, азоттың биологиялық фиксациясын жүргізетін нитрогеназа ферменті молекулалық оттегіге сезімтал. Сонымен қатар, [15] нитрогеназа ферментінің синтезін басады, ал ол әрекет азотты фиксациялау мен ассимиляциялауға қажетті респираторлар мен тыныс алу субстраттарының жетіспеуіне әкеледі [16]. Орташа деңгейдегі оттегінің ингибиторлық әсері немесе қысқа уақыт әсер ету әрекеті *in vivo* жағдайында қалыпты болуы мүмкін, дегенмен, бұл азот фиксациясының жоғарылауына алып келеді және кейбір diaзотрофтардағы Fe ақуызының белсенділігі артуына ықпал етеді. Сонымен қатар, кейбір diaзотрофиялық цианобактериялар азоттың негізгі бөлігін мұхиттардың [17] ішінде тіршілік ететін өсімдіктерге береді. Осылайша, нитрогеназа ферменті әлемде азоттың қалыпты мөлшерін ұстап тұруда маңызды рөлге ие және Жер бетіндегі азоттың басым көпшілігі осы ферменттің қызметінің негізінде топыраққа сіңіріледі [18]. Ауадағы азотты фиксациялаумен қатар, цианобактериялар гиббереллиндер, индол-3-сірке қышқылы, индол-3-пропион қышқылы, В₁₂ дәрумені, серин, аргинин сияқты аминқышқылдарын ортаға бөліп шығарады. Бұл айтылған биологиялық белсенді заттар өсімдіктердің өсуін ынталандырады және глицин, аспарт қышқылы, треонин, глутамин қышқылы, ксилоза, галактоза, фруктоза және т.б. клеткадан тыс заттарды өндіруге қабілетті болып келеді. Мұндай заттар топырақ құрылымының жақсаруы, өсімдік өсуін ынталандыру сияқты бірнеше пайдалы әсерге ие [19]. Сонымен бірге, цианобактериялар – бастапқы колонизаторлар болып табылады және олардың көпшілігінде триций фосфатын еріту қасиеті бар екендігі дәлелденген. Кейбір цианобактериялар, мысалы, *Tolypothrix*, *Scytonema*, *Hapalosiphon* т.б. тау жыныстарының фосфатын ерітуге қабілетті болып келеді. Төмендегі 1-кестеде азот фиксациялайтын цианобактериялардың түрлерінің морфологиялық ерекшеліктері келтірілген.

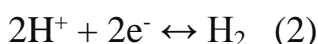
Кесте 1 – N₂ фиксациялайтын цианобактериялардың таксономиялық ерекшеліктері

Цианобактерия штамдары	Цианобактериялардың сипаттамалары
<i>Anabaena</i> тобы	Жіңішке қабығы бар гетероцистикалық түрлер, белгілі бір пішінді мукилагинді колонияларды құрмайды (<i>Anabaena</i> , <i>Nodularia</i> , <i>Cylindrosperinum</i> , <i>Anabaenopsis</i> т.б.)
<i>Nostoc</i> тобы	Қалың қабығы бар гетероцистикалық түрлер, тармақталмай, белгілі бір пішінді мукилагинді колонияларды құрайды (<i>Nostoc</i>)
<i>Aulosira</i> тобы	Қалың қабығы бар гетероцистикалық түрлер, әдетте тармақталмай өседі, агар ортасында диффузды колонияларды құрмайды (<i>Aulosira</i>)
<i>Scytonema</i> тобы	Жалпақ тармақталған гетероцистикалық түрлер, полярсыз, агар ортасында барқыт тәрізді сызықтар жасайды (<i>Scytonema</i>)
<i>Calothrix</i> тобы	Жалпақ тармақталған, полярлығы бар, агар ортасында барқыт тәрізді форма түзетін гетероцисттік түрлер (<i>Calothrix</i> , <i>Tolypothrix</i> , <i>Hassalia</i>)
<i>Gloeotrichia</i> тобы	Белгілі бір пішінді мукилагинді колонияларды құрайтын, полярлығы бар гетероцистикалық түрлер (<i>Gloeotrichia</i> , <i>Rivularia</i>)
<i>Fischerella</i> тобы	Нақты тармақталуы бар гетероцистикалық түрлер (<i>Fischerella</i> , <i>Westiellopsis</i> , <i>Stigonema</i>)
<i>Oscillatoria</i> тобы	Вегетативті, жіпшелі, азотфиксациялаушы цианобактериялар тобы (<i>Desertifilum</i> , <i>Oscillatoria</i>)

Азоттың биологиялық фиксациясы нитрогеназа ферментімен катализденеді, онда молекулалық сутектің түзілуі аммиак өндірісімен қатар жүреді, ол 1-ші теңдеуге сәйкес келеді (1):



Нитрогеназа ферменттері арқылы H₂ түзілуі біржақты емес, 2-ші теңдеуде көрсетілгендей, гидрогеназаның кейбір түрінде H₂ өндірісі қайтымды процесс болып табылады (2):



N фиксациясы және H₂ түзілуі бір-бірімен тығыз байланысты процестер болып табылады, ол Бурнс (1975) зерттеулерінен белгілі болды [20]. Гидрогеназа ферменті N түзілуінде пайда болған сутегіні қайта катализдейді, ал нитрогеназа ферментінің белсенділігі негізінде клеткада қорға жинақталған энергия сыртқа шығарылады.

Цианобактериялар азот фиксациясында өте маңызды рөл атқарады, олар ғалымдық азот айналымының маңызды бір бөлшегі болып табылады. Нитрогеназа ферменттерінің белсенділігіне негізделген азот фиксациялау үдерісі – ауылшаруашылығына пайдасын тигізетін әдіс болып табылады.

Цианобактерияның биотыңайтқыш ретіндегі маңызы. Елімізде ауыл шаруашылық өсімдіктерін қарқынды түрде өсіру органикалық және минералды тыңайтқыштардың, соның ішінде, азот элементінің жеткіліксіздігінен туындайтын топырақ құнарлығының төмендеуіне алып келді. Қазақстан топырақтанушыларының мәліметтері бойынша, еліміздің бүкіл топырақ жамылғысының 60 %-ы топырақ эрозиясына ұшыраған. Соңғы 20-40 жыл ішінде топырақ құнарлығының негізі болған гумустық қабаттың жоғалуы 8-30 %-ды құрады, оның ішінде ең құнды гумин қышқылдары мен гидролизделген азоттың азаюы, сәйкесінше, 45 % және 48 % болды. Азот – өсімдіктердің қоректенуіне қажетті негізгі элементтерінің бірі екені белгілі. Азот элементі олардың құрғақ биомассасының 1-5% құрайды және химиялық үдерістердің маңызды құрамдас бөлігі болып табылады. Әр түрлі ауыл шаруашылық аймақтарындағы дақылдардың өнімділігі, көбінесе, топырақтағы азоттың қорымен тығыз байланысты. Биологиялық азоттың қуаттылығы тыңайтқыш ретінде еңгізілген химиялық азоттан үш есе көп. Сондықтан, қазіргі таңдағы орын алып отқан өзекті мәселе – топырақты қалпына келтіру тұрғысындағы нақты жұмыстарды жүргізу болып отыр. Осы негізде, дәстүрлі түрде қолданылып келген химиялық тыңайтқыштарды биологиялық объектілер негізінде өндірілетін биотыңайтқыштарға ауыстырудың маңызы зор. Биологиялық үдерістер негізінде сіңірілген ауадағы молекулалық азот топырақтың эрозиясын тудырмауға ықпал жасап, өсімдіктерді азоттың қалыпты мөлшерімен қамтамасыз етеді [21,22,23].

Сонымен қатар, микроорганизмдер азық-түлік, маргарин жасау, жем, отын, биотыңайтқыштар, медицина, өнеркәсіп және ластануға қарсы күрес сияқты әртүрлі салаларда үлкен пайдасын тигізе алатын потенциалды объекті болып табылады [24, 25, 26, 27]. Цианобактериялардың ауыл шаруашылығындағы өсімдік өсірудегі маңызы олардың азотты сіңіру қабілетімен байланысты болып келеді [28, 29]. Себебі, өсімдіктер фотосинтез процесінің негізінде көміртегі мен оттегіні бойына сіңіруге бейімделген, ал молекулалық азоттың басым көпшілігін топырақтан алады. Ал, азот – судан кейінгі көптеген егістік орындарында өсімдіктердің өсуіне әсер етуші екінші фактор болып саналады [30]. Көбінесе микробтық инокулянттар ретінде белгілі биотыңайтқыштарға бактериялар (азотобактер), балдырлар (көк-жасыл балдырлар) және микоризальды саңырауқұлақтар жатады. Олар өсімдіктерді қоректік заттармен қамтамасыз етеді және топырақ құрылымын сақтайды. Соңғы алты онжылдықта сулы-батпақты күріш алқаптарында N биологиялық фиксациясын күшейту үшін цианобактериялық инокулянттарды қолдану (альгализация) туралы ақпараттар жарияланды. Цианобактериялар топырақ құнарлығын сақтау мен қалыптастыруда маңызды рөл атқарады, сәйкесінше, табиғи биотыңайтқыш ретінде ауыл шаруашылық дақылдарының өсуі мен өнімділігін арттырады [31].

Де және т.б. (1939) алғаш рет тропикалық күріш алқабы топырақтарының құнарлығының жоғары болуы N түзуге қабілеті бар цианобактериялардың

белсенділігімен тығыз байланысты деген тұжырымға келді [32]. Әртүрлі цианобактериялық штамдар күріш алқаптарын колонизациялайды және онда гетероцисталы түрлер атмосфералық азотты бойына нитрогеназа ферментінің белсенділігі есебінен сіңіріп алып, оны өсімдікке береді.

Әрине, азот алмасу процесіне топырақ құрамындағы басқа да микроорганизмдер өз үлесін тигізеді. Алайда, бірнеше гетероцистасыз цианобактериялар атмосфералық азотты микроаэрофильдік жағдай тудыра отырып түзе алады. Соңғы зерттелген жұмыстар бойынша, нитрогеназа ферменті тек қана гетероцистада ғана кездеспейді, сонымен қатар, вегетативті клеткаларда да активтенуі мүмкін [33]. Ауыл шаруашылық егістіктерінің топырағының құнарлығын арттыруда N түзетін цианобактериялардың рөлі өте жақсы зерттелген. Үндістанда цианобактериялардың көптеген күріш сорттарының өнімділігіне тигізетін әсері бірқатар далалық жерлерде зерттелді [34]. Цианобактерия клеткаларының әсері арпа, сұлы, қызанақ, шалғам, құлпынай, мақта, қант, жүгері, чили және салат сияқты басқа да дақылдарға зерттелді [28, 35]. Сонымен қатар, цианобактериялық популяцияның пайдалы әсері арпа, сұлы, қызанақ, шалғам, мақта, қант, жүгері, чили және салат сияқты басқа да дақылдарға оң әсер етеді. Цианобактериялар көптеген өсімдіктермен симбиозға түсіп, өсімдікке қажетті элементтерді беріп отырады. Азолланың органикалық тыңайтқыш ретіндегі күріш өсірудегі маңызы бірнеше елде жақсы бағаланады және практикада кеңінен қолданылады. N түзетін цианобактериялар *Azolla*-мен бірге өскен кезде топырақ микроорганизмдерімен симбиоз түзе отырып 150-300 тонна га/жыл азотты сіңіруге қабілеттілік танытады [32].

Топырақтың құрамындағы көк жасыл балдырлардың қызметіне келесілер кіреді:

- 1) Топырақтың құрамындағы диффузияны жақсарту;
- 2) Гормондар (ауксин, гиббереллин) сияқты өсуге ықпал ететін заттар және витаминдерді, аминқышқылдарын шығару;
- 3) Топырақтың құрамындағы су өткізгіштігін арттыру;
- 4) Клеткалар летальды жағдайға ұшырап, ыдырағаннан кейін топырақ биомассасының көбеюін арттырады;
- 5) Топырақтың тұздану деңгейінің төмендету;
- 6) Арам шөптердің көбеюінің алдын алу;
- 7) Органикалық қышқылдардың бөлінуімен топырақ фосфатының мөлшерін арттыру.

Егістік топырақтарының көпшілігінде цианобактериялардың табиғи популяциясы бар және ол топырақтың азотпен қамтамасыз етілуіне ықпал жасайды. Сонымен қатар, цианобактерия түрлері қоректік ортаны тазартуда тиімді, өйткені, олар суда өсетін организмдер үшін тамақ көзі бола отырып, оттектенуге және минералдануға әкеледі. Ума және Субраманиан (1990) жариялағандай, Оссейн зауытының лас суларын теңіз цианобактериялары – *Oscillatoria* sp. BDU 10742, *Aphanocapsa* sp. BB 16 және *Halobacterium* US 101 көмегімен тазалағанда кальций мен хлорид деңгейінің 100% төмендеуі байқалды [22]. Осының негізінде ауыр металлдардың концентрациясының төмендеп, нитраттың мөлшерінің артқаны тіркелді. Шаширека және т.б. (1997) [36]

Phormidium valderianum BDU 30501 фенол концентрациясы 50 мг/л болған кезде қалыпты өсетінін және жеті тәуліктің ішінде фенол концентрациясы 38 мг/л төмендететінін жазды. Бұл нәтиже құрамында фенол бар ағынды суларды тазартуға және судың қажетті азотпен қамтамасыз етуіне мүмкіндік береді [37]. Тағы бір теңіз цианобактериясы *Oscillatoria boryana* BDU 92181 тазарту ағындарында көп болатын меланоидин пигментінің деградациясы мен метаболизациясына тиімді әсерін тигізді. «Теңіз цианобактериясының ұлттық орталығында» жүргізілген зерттеулер бойынша құрамында органофосфор пестицидтері, жуғыш заттар, антибиотиктер және басқа да молекулалар бар зиянды ағындарды тазарту жұмыстарында цианобактериялар жоғары көрсеткіштер көрсетті [38], сондай-ақ, қатты қалдықтардың лигнолитикалық әсерімен пайда болған шөгінділерді деградацияға ұшыратты. Осы цианобактериялық тазарту әрекеттерінен соң суды ауыл шаруашылық дақылдарына беру жұмыстарына жүргізуге болады [39]. Соңғы онжылдықтағы жұмыстар цианобактерияларды биотехнологиялық тұрғыдан маңызды салаларда қолдануға мүмкіндік берді. Сондықтан, көптеген тропикалық елдердің зерттелмеген жерлерінде цианобактериялардың биологиялық әртүрлілігін анықтау және сақтау жұмыстарын жүргізіп, оны биотехнологиялық мақсаттарда тиімді пайдалану қажет.

Цианобактериялардың ішінде гетероцисталы формалары ауадағы азотты бойына сіңіріп, оны топырақтың құрамына бөледі. Ал, топырақ – бұл жер асты азот фиксациялаушы микроорганизмдердің тіршілік ету ортасы екендігі белгілі. Топырақтың құрамындағы цианобактерия штамдары атмосфералық азотты фиксациялап, топырақ бөлшектерін бір-бірімен байланыстырады және ылғалдың сақталуына және эрозияны алдын алуға көмектеседі. Сонымен қатар, гетероцисталы цианобактериялар топырақтың құрамындағы микро- және макроэлементтердің мөлшерін арттырып, өсімдіктердің маңызды өсу гормондары – фитогормондармен қамтамасыз етілуді жоғарылатады [40, 41]. Бұдан бөлек, цианобактериялардың биомассасы амин қышқылдары мен витаминдерге бай болып келеді, ол өсімдіктерге қажетті маңызды химиялық қосылыстар болып табылады [42, 43, 44, 45]. Азот фиксациялауға белсенді цианобактериялар – дәстүрлі түрде қолданылатын химиялық тыңайтқыштарды алмастыруға қолайлы микроорганизмдер болып табылады [46, 47]. Азот фиксациялаушы цианобактериялардың әсері бидай, құлпынай, соя бұршақтары, сұлы, шалғам, мақта, қант қабығы, жүгері, чили, бұршақ, қызанақ сияқты дақылдар үшін пайдалы екенін көптеген ғалымдардың зерттеу жұмыстарынан көруге болады [48, 49]. Ригини (2018) өз зерттеуінде дәлелдегендей, микробалдырлардың клеткаларының биомассасы құлпынайдың өсуіне оң әсер етіп, өнімділігінің және өсу көрсеткіштерінің артуына ықпалын тигізді [50].

Ауыл шаруашылығында кең қолданылатын өсімдіктердің бірі – құлпынай. Құлпынай жемісі – бүкіл әлемде сұранысқа ие дақыл болып табылады. Сонымен қатар, құлпынай жемістері өзінің хош иісі, ашық-қызыл түсі, шырынды құрылымы мен тәттілігі жағынан танымал [51]. Айта кететін жайт, оның құрамындағы антиоксиданттық қасиеттері адамның ағзасына пайдалы болып келеді және оны қалыпты түрде тұтыну ағзадағы радикалдардың нитралдануына

оң әсерін тигізеді. Қазіргі уақытта Қытай мен АҚШ жылына шамамен 3,8 Мт және 1,4 Мт көлемінде құлпынай өндіреді. Мексика, Түркия және Испания 2016 жылы шамамен 468 кт, 415 кт және 366 кт шамасында құлпынай өндірді. Италия – өндірушілердің он үшінші елі, бұл ел 2016 жылы шамамен 131 кт құлпынай өнімін өндірді [52]. Қазірде құлпынай коммерциялық бағытта өсіріледі және оның тұқымдары *in vitro* жағдайында дайындалып, жасанды қондырғыларда көбейтіледі [53]. Құлпынай көшеттерін топырақта, гидропониялық және топырақсыз өндіріс жүйелерінде, ашық далада немесе қорғалған аймақта өсіруге болады. Өсіру жүйесін таңдау климаттық жағдайларға, нарықтың сұранысына және экспортқа байланысты. Қытайда ашық егістік және қорғалған егістік жүйелер қолданылады [54], ал ашық алқап АҚШ-да ең көп қолданылатын жүйе, ал Италия өндірушілері арнайы жылыжайларды қолданады.

Сонымен қатар, азотфиксациялаушы цианобактериялардың маңызы күріш өсімдігіне де зерттелген. Цианобактериялардың көпшілігі азотты фиксациялап, күріштің және басқа да өсімдіктердің өсуіне және сол аймақтағы топырақты құнарландыруға үлес қосады [55]. Олар ауыл шаруашылық алқаптарында, әсіресе, күріш аймақтарында биотыңайтқыштар ретінде кең қолданылады, өйткені, күріш дақылы салыстырмалы түрде N элементін көп қажет етеді [56].

Цианобактериялардың активті түрде азот фиксациясына қатысатын түрлерін күріш алқаптарында өсіру жұмыстары антропогендік әрекеттерді жеңілдетіп, өнімнің артуына ықпал етеді. Алайда, азот фиксациялаушы цианобактериялардың барлық түрлері егістік аймақтарында жақсы өсе бермейді.

Цианобактериялардың барлық штамдары экожүйелердің барлық түрлерінде жақсы өсе бермейді. Вайшампаян және т.б. (2001) жариялағандай, гетероцисталы цианобактериялар *Azolla* өсімдігімен бірге өскенде ауадағы молекулалық азотты фиксациялауға, оны топырақ құрамына беруге және күріштің өсуіне ықпал ететін заттарды синтездеуге үлкен үлес қосады [46]. Осылайша, *Anabaena azolla* штамын күріш алқаптарында тиімді био-тыңайтқыш ретінде қолдануға болады деп мәлімдеді. Сонымен қатар, Чодхури мен Кеннеди (2004) күріш алқаптарында N көзі ретінде *Azolla* цианобактерияларын қолдануда ұсынды [30]. Мишра мен Пабби (2004) цианобактериялардың азотты фиксациялау қабілетіне негізделген биотыңайтқыштарды күріш дақылдарына қолдану күріштің өнімділігін арттырып, экологиялық және экономикалық тұрғыдан тиімділік алып келеді деген тұжырым айтты [47].

Алқап өсімдіктерінің өсуі – бұл күрделі құбылыс болып табылады және оның дұрыс өсуіне цианобактериялар мен басқа да топырақ микроорганизмдері ықпал етеді, микроорганизмдер ризосферадағы өсімдіктермен эндофиттік қатынас арқылы жұмыс істейді [57]. Күріш алқаптарында микроорганизмдер топырақ суының бетінде жүзе алады немесе дымқыл топыраққа жиналады [58]. Ризосфераның колонизациясы топырақ құрамындағы цианобактериялардың мөлшеріне және түрлердің физиологиялық белсенділігіне байланысты жүзеге асады. Цианобактериялар азот тыңайтқышынан басқа, қанттар, амин қышқылдары және басқа да қосылыстарды өсімдіктерге береді. Сонымен қатар, метаболизмге қажетті материалдармен тікелей қамтамасыз ету арқылы

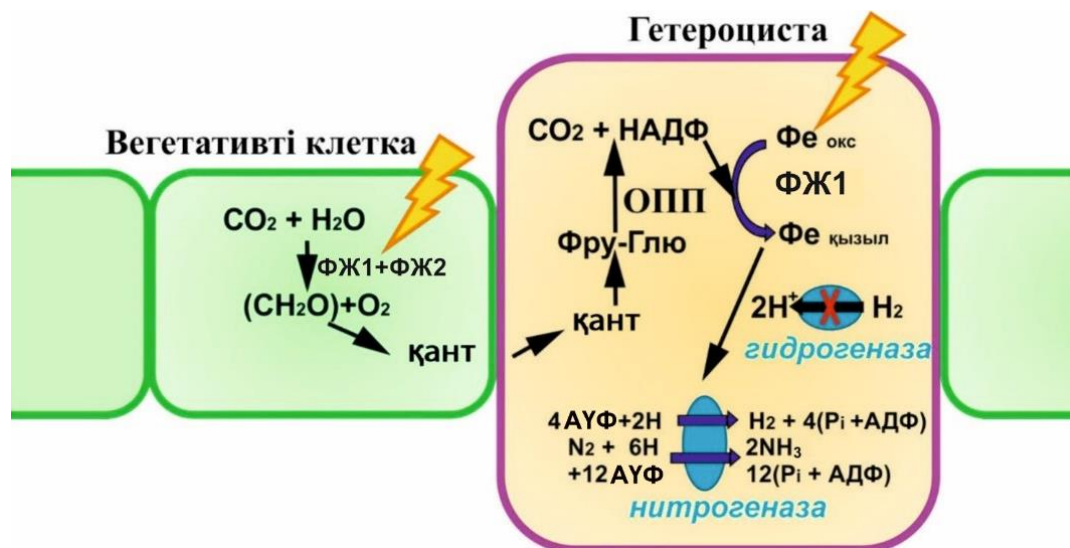
өсімдіктердің өсуіне тікелей немесе жанамалы түрде әсер етеді [59]. Екіншіден, температура, жарық, ылғалдың болуы және топырақтың қоректік құнарлығына арттырады [60]. Осылайша, күріш-цианобактериялы аймақта экологиялық және табиғи факторлар қатар жүріп отырады.

Үндістанда цианобактерияларға негізделген био тыңайтқыштар технологиясын дамытуда айтарлықтай жетістіктерге қол жетті. Бұл технология топырақтың құнарлылығын байытудың және күріш дақылдарының өнімділігін арттырудың қуатты құралы бола алатындығы дәлелденді. Алайда, ауылшаруашылық алқаптарында тұрақты түрде пайдалану үшін технологияны одан әрі жетілдіру қажет. Ауылшаруашылық жүйелеріндегі цианобактериялардың жыл сайынғы циклінің динамикасы туралы неғұрлым егжей-тегжейлі түсінік алу маңызды болып табылады. Сонымен қатар, егістік алқаптарында жоғары сапалы егуді өңдеуге бағытталған кең ауқымды зерттеулер қажет [47].

Клеткалық тұрғыдағы азот фиксациясы. Цианобактериялардың өкілдері әр түрлі нитрогеназаларға ие болғандықтан, азот түзілісіне әкелетін метаболиттік жолдар түрлерде әрқалай болып келеді. Нитрогеназаға негізделген азотты гетероцисталы цианобактериялармен бөліп шығару – перспективті әдіс болып саналады, өйткені, бұл ферменттің оттегіне жоғары сезімталдығына қарамастан, оларда ақуызды оттегімен зақымданудан қорғайтын бірқатар механизмдер бар. Оттегіге сезімтал нитрогеназа үшін квази-анаэробты микроортамен қамтамасыз ететін гетероцистада қалың клетка қабықшасы бар. Гетероцистарлардың ішінде тек ФЖ1 комплексі болғандықтан азоттың продукциясына токсикалық әсер ететін оттектің бөліну үдерісі жүзеге аспайды.

Сонымен қатар, оларда өте белсенді тыныс алу жүйесі бар, олар мембранамен байланысқан кезде цитоплазмада нитрогеназа газға жетпей тұрып кіретін жанама биофотоллиз арқылы азоттың аз мөлшерін тұтына алады. Жанама биофотоллиз – бұл цианобактериялар көмегімен азотты фиксациялау үшін қолданылатын механизм болып табылады. Бұл үдерісте оттегімен синтезделген фотосинтез бір сатыда көміртекті түзу және сақтау үшін қолданылады, нәтижесінде, келесі азот фиксациясы сатысында төмен көміртекті қосылыстар пайда болады. Осылайша, оттегіге сезімтал протонды азайту реакциясы кеңістікте оттегін шығаратын фотосинтезден бөлінеді.

Қазіргі таңда цианобактериялармен азот фиксациясын жүргізуде белгілі бірнеше реакциялар бар, оларды тәжірибеде кең көлемді сутегі өндірісінде қолдануға болады. Осылайша, кейбір жіпшелі цианобактериялар, мысалы, *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Gloethece* sp. strain ATCC51142, *Oscillatoria* sp. штамдарының фотосинтез және тыныс алу үдерістері циркадиандық бақылауда болатын ауыспалы ашық-қараңғы режимде өскенде белсенді болады [61, 62, 63].



Сурет 1 – Гетероцисталы цианобактериялар арқылы азот фиксациялау механизмі [64, 65]. Белгілеулер: ОПП: Пентозды тотықтырғыш; Фд: Ферредоксин; ФЖ: фотожүйе.

1-суретте келтірілгендей, ФЖ1 комплексінің белсенділігінің нәтижесінде пайда болған протондар мен электрондар тасымалдаушы белоктар арқылы ФЖ2-ге жеткізіледі, нәтижесінде пайда болған көмірсулар НАДФ-нда активтенеді. Соның нәтижесінде Fe белогі активтеніп, нитрогеназа мен гидрогеназа ферменттерін белсендіреді. Нитрогеназа азотфиксациясын жүргізу барысында бірнеше химиялық реакцияларды катализдейді.

Циркадиялық немесе циркандиандық ырғақ – азот фиксациясы, тыныс алу және фотосинтездің жоғары белсенділігін басқара отырып, нитрогеназаның оттегі арқылы тежелуіне жол бермейтін үдеріс болып табылады. Нитрогеназа катализденуі нәтижесіндегі азот фиксациялау үдерісі, негізінен, бірқатар гетероцисталы цианобактериялар мен азотобактерияларға тән болып келеді [66, 67, 68]. Алайда, гетероцистасыз *Cyanothece* [69] штамы нитрогеназа арқылы жарықты пайдаланып азотты шығаруға қабілетті, дегенмен, кейбір өсіру жағдайлары әртүрлі ықпал етуі мүмкін: жарықтың аздығы, глицерин мен аргонның әсері. Көбіне, циркадиялық ырғақ қараңғы ортада жүреді. Ал, жарықта фотосинтез қайта басталған кезде, клетка тотықсыздану күйіне оралады деп болжанады. Алайда, оттегі бөлінуі басталған кезде мұндай белсенділік тез тежеліп отырады [70, 71].

Жоғарыдағы қасиеттерінің негізінде цианобактерия түрлерінің ауылшаруашылық дақылдарының өсуіне тигізетін әсері жоғары болып табылады.

1.1.2 Цианобактерия – биоэнергетикадағы маңызы объект

Пайдалы қазба көздерін пайдалану қоршаған ортаны ластаудың түрлі мәселелерін тудыратындығына байланысты қазіргі уақытта қалпына келетін

энергия көздерін қолдануға негізделген жаңа экологиялық тиімді технологияларды жасаудың қажеттілігі туындады [72].

Энергия көзі ретінде биологиялық шикізатты пайдалану көлемін кеңейту арқылы адамзат табиғатқа экологиялық ауыртпалықты азайтады, экологиялық аймақтар мен су объектілерінің ластануын төмендетеді, сонымен қатар, ауыр металдар мен метанның атмосфераға шығарылуын шектейді [73].

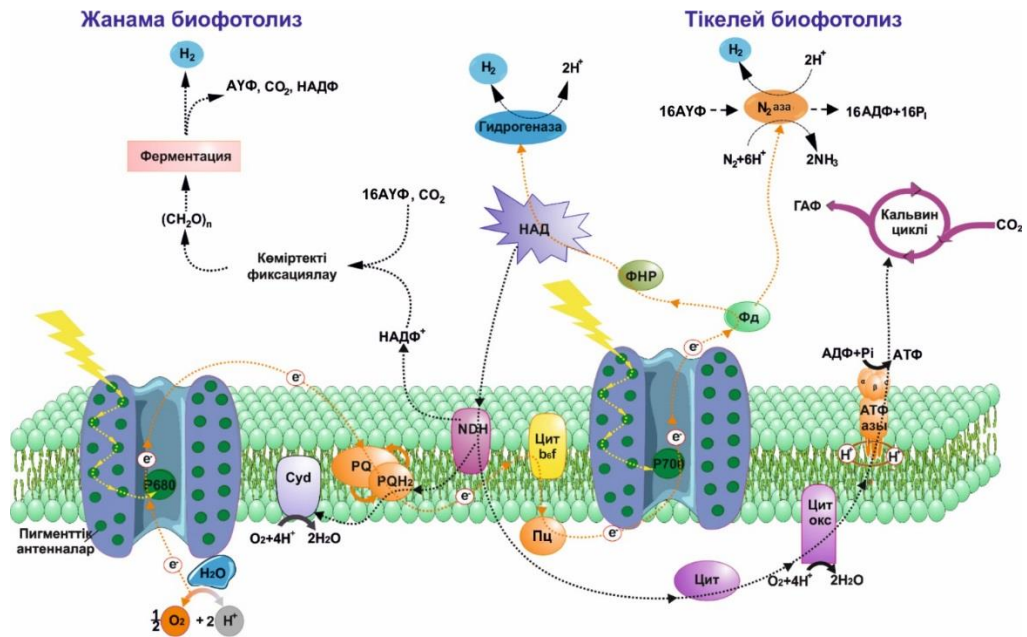
Қазіргі уақытта ғалымдардың қызығушылықтары биоотын өндірісінде қолданылатын сарқылмайтын шикізат көздеріне, оның ішінде биофотоллизге негізделген сутегі алу үдерісіне түсіп отыр. Биоэнергетика салаларының ішіндегі сутегі өндірісі – ең таза, әрі технологиялық тұрғыдан қымбаты болып келеді, дегенмен, сутек болашақта туындаған көптеген мәселелерді шешуде маңызды рөлге ие болуы мүмкін. Осы негізде, бүгінгі таңда оның негізгі өндірісі әртүрлі термохимиялық үдерістерді жүзеге асырумен байланысты болып келеді.

Сутекті биологиялық жолмен алу әдістерінің ішінде фототрофты микроорганизмдерді – цианобактериялар мен бактерияларды қолдану жұмыстары – ең маңыздысы болып табылады. Цианобактерияларды сутегі өндірушілері ретінде қолдану өте тиімді, өйткені, олар күн энергиясын бойына сіңіру арқылы, сутегін түзеді және қымбат макро-микроэлементтерді қажет етпейді. Соңғы таңдағы зерттеулер көрсеткендей, цианобактериялардың барлық түрлері сутек бөлуге қабілеттілік танытады. Дегенмен, олардың тіршілік ету ерекшеліктеріне сай қалыптасқан морфологиялық және генетикалық айырмашылықтары негізінде сутек бөліну мөлшері мен бөліну уақытының ұзақтығы әр түрлі болып келеді. Цианобактериялардың морфологиялық биоалуантүрлілігі және метаболиттік сипаттамалары оларды ең перспективті сутегі өндірушілері етеді. Бұл, әсіресе, цианобактериялардың гетероцисталық формаларына қатысты, себебі, клетка ішінде оттегі бөлінуі жүзеге аспағандықтан сутегі бөлінуіне қатты кедергі туындамайды. Осы ерекшеліктердің негізінде ауада молекулалық оттегі болған кезде гетероцистикалық цианобактериялар H_2 бөлінісін жүзеге асыра алады. Цианобактериялар арқылы сутек бөлінуінің жылдамдығы қажетті ферменттерді синтездейтін генетикалық қабілетімен, сонымен қатар, қажетті энергияны қамтамасыз ететін ішкі және сыртқы ортаға бөлетін метаболиттік ерекшеліктерімен және қоршаған орта жағдайымен анықталады.

Осылайша, цианобактериялар – күн энергиясын бойына сіңіре отырып сутегі бөлуге қабілеттілік танытатын келешегі биологиялық нысан болып табылады. Генетикалық және метаболиттік инженерияның әртүрлі әдістерін қолдана отырып, продуценттерді өсіру үшін қолданылатын фотобиореакторлардың технологиялық сипаттамаларын жақсарту арқылы цианобактериялық сутектің биологиялық өндірісін едәуір жақсартуға болады [65].

Цианобактерия клеткаларының сутек энергетикасындағы маңызы. Микроорганизмдердің метаболизмінің жанама өнімі негізіндегі сутектің биохимиялық өндірісі – бұл қалпына келетін ресурстардан сутегі алудың жаңа технологиялық саласы болып табылады. Тірі ағзалардан H_2 бөліп алу технологиясы жарты ғасырдан астам уақыт бойына зерттелгендігіне қарамастан,

әлі күнге дейін толыққанды және мол өнім беретін технология қалыптаспады. Осы тұрғыда цианобактериялар жүргізетін биофотоллиз негізделген сутегі алу үдерісі соңғы 35 жыл ішінде белсенді зерттелді [74, 75]. Осы уақыт ішінде микробалдырлар мен бактерияларда H_2 түзілудің негізгі молекулалық механизмдері зерттеле түсті. Фотосинтездің электрондық транспорттық тізбегі, соның ішінде, судың ыдырау механизмі мен сутегі түзілуінің катализаторлары сияқты екі элементтен тұратын су биофотоллиз жүйелері концептуалды түрде тікелей биофотоллиз және жанама биофотоллиз ретінде қарастырылады. Белгілі болғандай, тікелей биофотоллиз үдерісі фотосинтетикалық пигменттер сіңірген жарық энергиясын пайдаланып, клетка құрамындағы судың оттегі (O_2) мен протондарға (H^+) ыдырауына қолданылады. Ал, тікелей биофотоллизге негізделген фотосинтез үдерісімен жүзеге асатын ферредоксин мен гидрогеназаны активтендіреді. Клетка жанама биофотоллизде көмірқышқыл газын түзу үшін судың бөлінуі және ферредоксиннің төмендеуі үдерістерін пайдаланады, ал нәтижесінде алынған көміртегі қосындысын бөлек реакция кезінде сутектің бөлінуін ынталандыру үшін қолданады (сурет 2).



Сурет 2 – Фотосинтетикалық микроорганизмдердің биофотоллизінің тікелей және жанама процестері.

Сұр үзік тилакоид мембранасының липидтік қабатын білдіреді. Электронды беру реакциялары мен бағыттары сұр нүктелі жебелер түрінде сызылған. Қара үзік реакцияларды көрсетеді.

Белгілеулер: АҮФазы – АҮФ синтезі; Цит b_6f – цитохром b_6f кешені; Фд – ферредоксин; ФНР – ферредоксин НАД(Ф) редуктаза; NДН – НАД(Ф) дегидрогеназа; ПЦ: пластоцианин; PQ – пластохинон; ФЖ – фотожүйе; ГАФ – глицеральдегид-3-фосфат; Рі – фотосинтез-сәулелену. Сурет [76, 77, 78] мақалалардан өзгертілді.

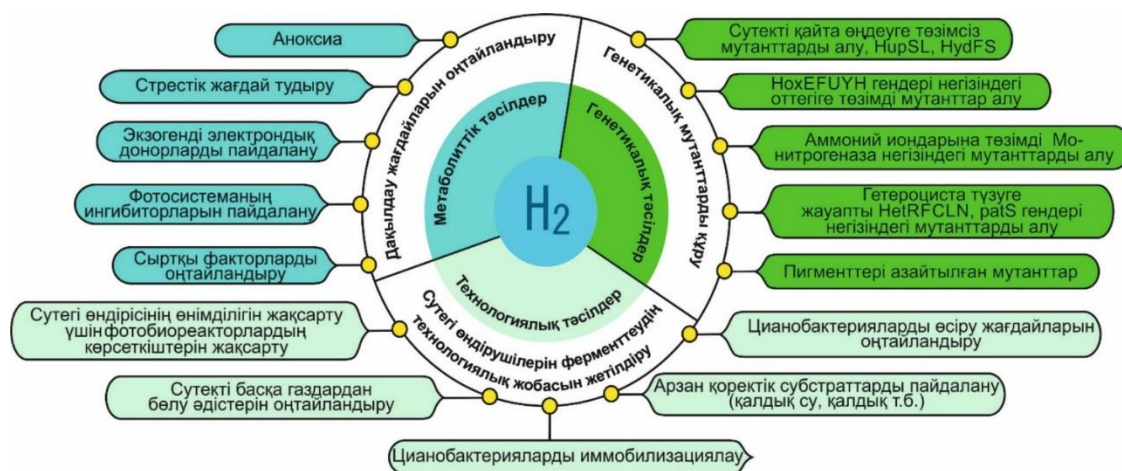
Фототорофты микроорганизмдердегі тікелей биофотолитиз үдерісі күн сәулесін энергия көзі ретінде қолданып, судың ыдырауын тудырып, соның негізіндегі бөлініп шыққан электрондар және протондар арқылы сутегі молекулаларын катализдеу қызметін атқарады.

Фотосинтез үдерісінің нәтижесінде пайда болған электрондар сутек ферменттері – гидрогеназа және нитрогеназа белсенділігін тудырып, соның нәтижесінде газ түріндегі H_2 ортаға бөлініп шығады [79]. Анаэробты жағдай туындағанда немесе артық энергия жинақталған кезде фотосинтетикалық микроорганизмдер H^+ -ды H_2 -ке айналдыратын ферменттерді қолданып артық энергияны қоршаған ортаға бөліп шығарады. Зерттеу нәтижелері көрсеткендей, судың бөліну реакциясы нәтижесінде пайда болатын электрондар мен протондар хлоропласттарда жинақталып, H_2 түзуші ферменттер негізінде жоғары сапалы таза H_2 (99,9% дейін) газына айналады [80, 81, 82, 83, 84].



Цианобактериялар – фотобиологиялық сутегі өндіре алатын фототрофты микроорганизмдер тобының бірі [85, 86]. *Nostoc*, *Anabaena*, *Synechocystis*, *Oscillatoria*, *Synechococcus*, *Phormidium* және т.б. бірқатар цианобактериялар сутегі өндіруге арналған ферменттер – гидрогеназа және нитрогеназа қызметінің нәтижесінде сутекті бөліп шығарады [87]. Олар тыныс алу көзі ретінде атмосферадағы CO_2 пайдаланып, қарапайым қоректік ортада өсе алады және көптеген штамдар атмосфералық N бойына сіңіріп, оны аммиакқа айналдыруға қабілетті [88].

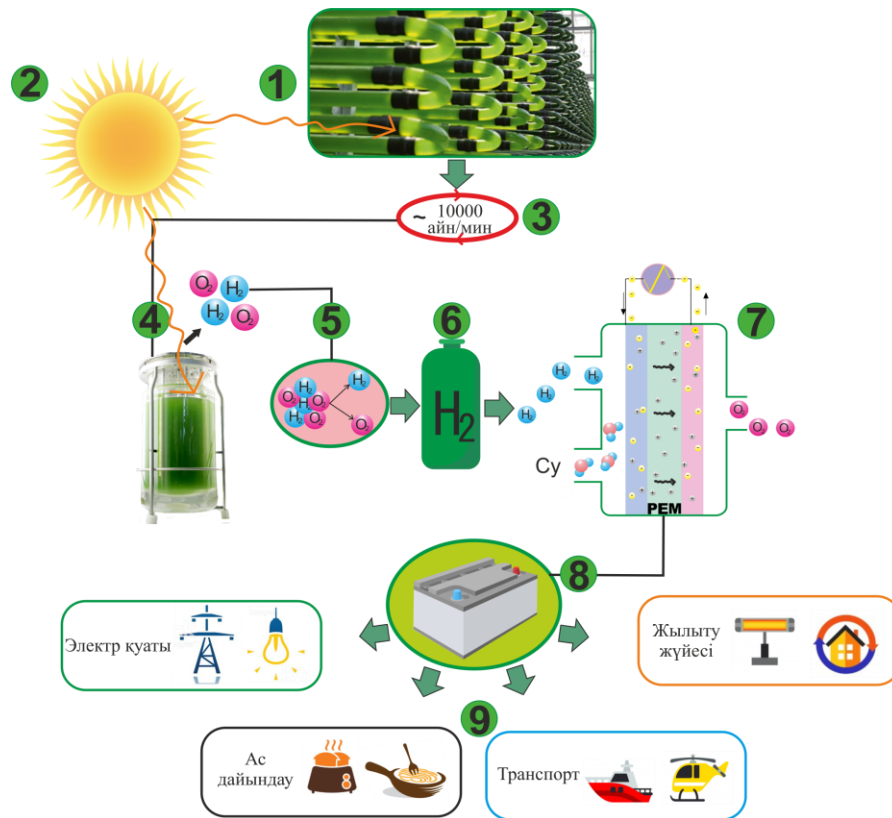
Сутегі өндірудің ферменттік жүйесі және оның цианобактериялардағы реттелуі оған жауап беретін бірнеше гендер – *nif*, *hup*, *hup*, *hox* арқылы жүргізіледі. Нитрогеназа азоттың аммиакқа айналуымен қатар сутегі өндірісін катализдейді. Гидрогеназалар қарапайым химиялық реакцияны, протондар мен электрондардан сутектің қайтымды төмендеуін катализдейді. Бұл ферменттердің екеуі де цианобактерияларда сутектің биологиялық өндірілуіне жауап беретін негізгі клеткалық белоктық құрылымдар болып табылады. Алайда, нитрогеназаның гидрогеназадан айырмашылығы, қайтымсыз үдерісті катализдейді және ол перспективті сутек ферменті ретінде саналады. Барлық цианобактериялар осы ферменттерге ие, бірақ, олардың белсенділігі, ферменттердің жетілуі және құрылымдық ерекшеліктері түрлер арасында әрқалай болып келеді. Дегенмен, түрлердің тіршілік ету ерекшеліктеріне байланысты, олардың белсенділігі мен кездесу жиілігі әртүрлі болып келеді. Көбіне вегетативті клеткалардан құралған түрлер тек гетероцисталардың гендерінен тұрады. Жасушада гидрогеназалардың әр түрлі функциялары бар гендер тобы болуы мүмкін және ол ақуыз биосинтезін белсендіреді [89, 90].



Сурет 3 – Цианобактерия клеткалары арқылы өндірілетін сутектің өнімділігін көтерудің негізгі жолдары

Қазіргі уақытта фототрофты микроорганизмдердің клеткалары арқылы сутегі өндірудің негізгі үдерістерінің механизмдері жақсы зерттелгеніне қарамастан, сутектің биологиялық өндірісінде іс жүзінде көптеген қиындықтар тудырып тұр. Сутектің тұрақты өндірісі үшін негізгі шектеулер – бұл ферменттердің оттегіне сезімталдығы, төмендеген электрондарды қолдана отырып, әртүрлі жолдар арасындағы электрондарға деген бәсекелестік. Сондықтан, цианобактериялармен сутектің бөлінуі әзірге тек ғылыми тұрғыда ғана байқалып отыр. Коммерциялық қолдану үшін сутегі өнімділігінің қарқынын және осы үдерістің ұзақтығын арттыру қажет [65]. Бүгінгі таңда цианобактериялар көмегімен H₂ өндірісін жетілдіру үшін түрлі әдіс-тәсілдер зерттелуде. Зерттелген әдістер үш принципке негізделеді: метаболиттік, генетикалық және сутегі өндірісін арттырудың технологиялық тәсілдері (сурет 3) [91, 92, 93, 94].

Жалпы, цианобактериялардан алынатын сутек өндірісінің технологиялық тізбегін келесідей көрсетуге болады: 1) цианобактерияларды биореакторда өсіру; 2) цианобактериялардың биомассасын өсіру; 3) цианобактерияларды H₂ фотобиореакторында анаэробты өсіру (қараңғыда немесе жарықта); 4) сутегі өндірісі және оны басқа газдардың қоспаларынан тазарту; 5) сутегі газын резервуарда сақтау; 6) сутегі газын электр энергиясына айналдыру (сурет 4).



Сурет 4 – Биосутектің алыну және қолданылу сызба-нұсқасы:

- 1) өндірістік фотобиореактордағы цианобактериялық клеткалардың өсуі; 2) фотосинтез үшін күн энергиясын пайдалану; 3) клетка биомассасын центрифугада 8000-15000 rpm жылдамдықта алу; 4) өнеркәсіптік фотобиореакторда сутегі өндірісі үшін биомассаны қолдану; 5) сутегі газын катализаторлар немесе мембраналар көмегімен газ қоспасынан тазарту; 6) сутекті сақтау; 7) электр энергиясын PEM (ПЭМ) арқылы алу; 8) батарея; 9) сутегі энергиясын қуат көзі ретінде қолдану.

Газ түріндегі сутекті электр энергиясына айналдыру кері электролиз ретінде қарастырылатын механизммен жұмыс жасайды. Онда сутегі мен оттегі біріктіріліп су түзіледі және соның нәтижесінде электр тогы пайда болады. Сутектен энергия алу құрылымы протон алмасу мембранасымен (ПМ) бөлінген екі электрод бетінен тұрады. Сутек құрылғы камерасына бір жағынан «анод» түрінде еніп, каталитикалық бетімен соқтығысады, онда ол протондар мен электрондарға ыдырайды. Мембрана тек протондарға ғана өтеді, ал электрондар «катодқа» сыртқы тізбек арқылы жіберіліп, электр тогын түзеді. Мембрананың екінші жағында оттегі клеткаға енеді, ал протондар мен электрондар сумен бірге $2\text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{энергия}$ реакциясын түзеді.

Белсенді сутек бөлуші цианобактериялық штамдар. Көптеген цианобактерия штамдары сутекті қараңғы және жарық ортада бөлуге бейімделген, ол өз кезегінде түрлерде кездесетін гендердің белсенділігімен тікелей байланысты болып келеді [95, 96, 97, 98, 99]. Сонымен қатар, *Spirulina platensis* дақылы анаэробиз және жарықтың болмауы жағдайында 32°C температурада қарқынды түрде сутек бөледі [97]. *Synechococcus* Nag. PCC 7942

штамымен сутегі бөлінісі қараңғы ортадағы анаэробты жағдайда байқалды. Температура мен рН көрсеткіштерін оңтайландыру ферментативті реакцияларды реттеу арқылы метаболизмді бақылай отырып, цианобактериялардың сутегіні катализдеу қабілетін арттыруда маңызды рөл атқарады. Жарияланған мәліметтерге сәйкес, цианобактериялардың түрлерінде сутек бөлуге температуралық айырмашылықтары бар. Цианобактериялық клеткалармен биосутекті белсенді өндірудің қолайлы температуралық диапазоны 25-40°C аралығында ауытқып отырады [95].

Сондай-ақ, сутек катализдеуші ферменттердің белсенділігіне қоректік орта құрамындағы көміртек көзі мен элементтердің де тигізетін әсері бар. Сонымен қатар, қарапайым органикалық қосылыстардың әсерінен сутегі өндірісі арта түсетіні белгілі, өйткені, кофактор қосылыстары арқылы электрондардың айналымын жылдамдату жұмыстары нитрогеназаның белсенділігін арттырады [100]. Түрлі қанттардың қоректік ортаға қосылуы сутегі өндірісін ынталандыра алады, мысалы, маннозаны қолдану сутегі мөлшерін сағатына бір мг құрғақ биомасса мөлшерінде 5,58 нмоль сутекке дейін арттырды [98, 95, 101].

Фототрофты микроорганизмдердің клеткалары арқылы әртүрлі микроэлементтердің әсеріне байланысты биосутекті өндіруде көптеген әдеби қайшылықтар бар. Дегенмен, Fe, Cu, Co, Mo, Zn және Ni сияқты әртүрлі микроэлементтердің қоректік ортаға қосылуына сутегі өндірісін едәуір арттыратыны белгілі болды. Сонымен қатар, Мин және Шерман (2010) темір микроэлементін темір аммоний цитраты түрінде *Cyanothece* sp. ATC 51142 штамының қоректік ортасына қосу клеткалардың сутек бөлуін 10 есеге арттырды [69]. Никельдің қоректік ортаға қосылуы *Arthrospira* цианобактерияларының биомассасының қалыпты жинақталуын және сутегі өндірісінің қарқынын едәуір арттыруды қамтамасыз ететіндігі туралы деректер бар. Алайда, Ni²⁺ аз концентрациясының H₂ өндірісіне *Anabaena* spp. СА және *Anabaena* spp. 1F штамдарының жасушалармен теріс әсер ететіндігі Жанг және т.б. (2007) зерттеу жұмыстарында байқалды [82].

Сонымен, цианобактериялардың жасушаларымен сутектің катализденуіне әсер ететін көптеген факторлар бар, оларды реттеу және өзгерту арқылы үлкен оң нәтижелерге қол жеткізуге болады. Осы тұрғыда, сутек бөліну көрсеткішін арттыруда цианобактерия штамдарының биомассасы маңызды рөлге ие болуы мүмкін. Себебі, клеткалардың қарқынды өсу жылдамдығы көп мөлшерде сутек алуға мүмкіндік береді. Соңғы 50 жыл бойына көптеген цианобактерия штамдарымен жүргізілген зерттеу жұмыстары осыған дәлел болады. Сутегі өндірісінің тиімділігі микроорганизмдердің метаболиттік потенциалына байланысты және бұл өз кезегінде цианобактериялардың активті сутек бөлетін штамдарын табу жұмыстарының маңызды екендігін көрсетеді. Бүгінгі таңда әртүрлідақылдау жағдайында сутекті өндіретін 14-тен астам цианобактериялардың классы белгілі. 2-кестеде сутекті шығару қабілетімен ерекшеленген цианобактериялардың белсенді штамдары келтірілген.

Кесте 2 – Цианобактерия штамдарының сутегін бөлу көрсеткіштері

Штам аты	Штамның сипаттамасы	H ₂ бөлу көрсеткіші	Әдебиеттер
<i>Anabaena azollae</i>	Жіпшелі гетероцисталы	38,5 ммоль/мг хл а/сағ	[102]
<i>Anabaena cylindrica</i> B-629	Жіпшелі гетероцисталы	0,103 ммоль/мг ҚБ/сағ	[103]
<i>Anabaena cylindrica</i> IAMM-1	Жіпшелі гетероцисталы	2,1 ммоль/мг хл а/сағ	[104]
<i>Anabaena cylindrica</i> IAMM-58	Жіпшелі гетероцисталы	4,2 ммоль/мг хл а/сағ	
<i>Anabaena cylindrical</i> UTEX B-629	Жіпшелі гетероцисталы	0,91 ммоль/мг хл а/сағ	
<i>Anabaena flos-aquae</i> UTEX 1444	Жіпшелі гетероцисталы	1,7 ммоль/мг хл а/сағ	
<i>Anabaena flos-aquae</i> UTEX LB 2558	Жіпшелі гетероцисталы	3,2 ммоль/мг хл а/сағ	
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	Жіпшелі гетероцисталы	2,6 ммоль/мг хл а/сағ	
<i>Anabaena variabilis</i> 1403/4B	Жіпшелі гетероцисталы	20 мкмоль/мг хл а/сағ	[105]
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Жіпшелі гетероцисталы	45,16 ммоль/мг хл а/сағ	[102]
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Жіпшелі гетероцисталы	0,05 ммоль/мг хл а/сағ	[105]
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Жіпшелі гетероцисталы	39,4 ммоль/мг хл а/сағ	[106]
<i>Anabaena variabilis</i> AVM13	Жіпшелі гетероцисталы	68 ммоль/мг хл а/сағ	[107]
<i>Anabaena variabilis</i> PK17R	Жіпшелі гетероцисталы	59,18 ммоль/мг хл а/сағ	[101]
<i>Anabaena variabilis</i> PK84	Жіпшелі гетероцисталы	32,3 ммоль/мг хл а/сағ	[106]
<i>Anabaena variabilis</i> PK84	Жіпшелі гетероцисталы	167,6 ммоль/мг хл а/сағ	[102]
<i>Anabaena variabilis</i> PK84	Жіпшелі гетероцисталы	0,11 ммоль/мг хл а/сағ	[108]
<i>Anabaena variabilis</i> SPU 003	Жіпшелі гетероцисталы	5,58 нмоль/мг ҚБ/сағ	[109]
<i>Anabaenopsis circularis</i> IAM M-13	Жіпшелі гетероцисталы	0,31 ммоль/мг хл а/сағ	[104]
<i>Anabaena siamensis</i> TISTR 8012	Жіпшелі гетероцисталы, Δ hupS	2,426 мкмоль/мг хл а/сағ	[110]

2-кестенің жалғасы

<i>Aphanocapsa montana</i>	Азотты түзбейтін бірклеткалы	0,40 мкмоль/мг хл а/сағ	[109]
<i>Calothrix membrnacea</i> B-379	Жіпшелі гетероцисталы	0,108 ммоль/мг ҚБ/сағ	[103]
<i>Calothrix scopulorum</i> 1410/5	Жіпшелі гетероцисталы	0,128 ммоль/мг ҚБ/сағ	
<i>Chroococcidiopsis thermalis</i> CALU 758	Азотты түзбейтін бірклеткалы	0,7 мкмоль/мг хл а/сағ	[111]
<i>Cyanothece</i> 7822	Азотты түзбейтін бірклеткалы, дiazотрофты	0,92 мкмоль/мг хл а/сағ	[112]
<i>Gloeobacter</i> PCC 7421	Азотты түзбейтін бірклеткалы	1,38 мкмоль/мг хл а/сағ	[111]
<i>Gloeocapsa alpicola</i> CALU 743	Азотты түзбейтін бірклеткалы	0,58 мкмоль/мг протеин	[113]
<i>Microcoleus chthonoplasts</i>	Азотты түзбейтін жіпшелі бірклеткалы	1,7 нмоль/мг протеин/сағ	[114]
<i>Microcystis</i> PCC 7820	Азотты түзбейтін бірклеткалы	0,16 мкмоль/мг хл а/сағ	[109]
<i>Myrocystis</i> PCC 7806	Азотты түзбейтін бірклеткалы	11,3 нмоль/ мг пр/сағ	[114]
<i>Nostoc commune</i> IAM M-13	Жіпшелі гетероцисталы	0,25 мкмоль/мг хл а/сағ	[104]
<i>Nostoc linckia</i> IAM M-30	Жіпшелі гетероцисталы	0,17 мкмоль/мг хл а/сағ	
<i>Nostoc muscorum</i> IAM M-14	Жіпшелі гетероцисталы	0,60 мкмоль/мг хл а/сағ	
<i>Oscillatoria brevis</i> B-1567	Азотты түзбейтін бірклеткалы	0,168 мкмоль/мг ҚБ/сағ	[103]
<i>Oscillatoria limosa</i> strain 23	Азотты түзбейтін бірклеткалы	19,83 мкл/мг хл а/сағ	[115]
<i>Oscillatoria</i> sp. Miami BG7	Азотты түзбейтін бірклеткалы	5,9 мкл/мг ҚБ/сағ	[116]
<i>Oscillatoria</i> sp. Miami BG7	Азотты түзбейтін бірклеткалы	260 мкмоль/мг хл а/сағ	[117]
<i>Phormidium valderianum</i> BDU 20041	Азотты түзбейтін бірклеткалы	0,2 мкл/мг ҚБ/сағ	[118]
<i>Phormidium valderianum</i> BDU 20041	Азотты түзбейтін бірклеткалы	0,22 мкл/мг ҚБ/сағ	[98]
<i>Synechococcus</i> PCC 6301	Азотты түзбейтін бірклеткалы	0,09 мкмоль/мг хл а/сағ	[109]

2-кестенің жалғасы

<i>Synechococcus</i> PCC 602	Азотты түзбейтін бірклеткалы	0,66 мкмоль/мг хл а/сағ	[111]
<i>Synechococcus</i> PCC 602	Азотты түзбейтін бірклеткалы	0,66 мкмоль/мг хл а/сағ	[109]
<i>Synechococcus</i> PCC 6307	Азотты түзбейтін бірклеткалы	0,02 мкмоль/мг хл а/сағ	[111]

Жоғарыдағы 2-кестеде биотехнологиядағы осы күнге дейін зерттелген цианобактерия штамдарының максималды сутек бөлу көрсеткіштері келтірілген.

Нитрогеназа ферментіне негізделген гетероцисталы штамдар бастапқы 2-3 тәулікте активті түрде молекулалық H_2 -ні бөліп, тез арада клеткадағы қорға жиналған энергияны пайдаланады. Ал гетероцистасыз түрлер (*Synechocystis*, *Synechococcus* және т.б.) гидрогеназа ферментінің белсенділігін бір аптадай тұрақты ұстай алады. Себебі, бұл қасиеттер екі сутектік ферменттің энергияны тұтыну ерекшеліктеріне тікелей байланысты жүзеге асады. Қазіргі таңда сутек өндіру мақсатында көптеген штамдардың генетикалық және метаболиттік қасиеттері зерттелінді. Олардың ішінде белсенділігі жоғары кейбір түрлерін атап өтсек. Сонымен, күкіртпен ашығу жағдайында бірклеткалы азот түзбейтін цианобактерия *Gloeocapsa alpicola* сутегі өндірісінің жоғары дәрежесін көрсетті [113]. *Arthrospira (Spirulina platensis)* анаэробты жағдайда қараңғыда сутегін белсенді (1 мкмоль/мг ҚБ/сағ) өндіре алатыны тіркелді [119]. Азот фиксациясына қатысатын цианобактериялардың *Anabaena* тұқымдас түрлері сутегі белсенділігіне қатысты жағы салыстырмалы тұрғыда жақсы зерттелген. Сонымен, *Anabaena cylindrica*, шектеулі жарық жағдайында, 30 тәулік ішінде, аргон атмосферасында сутегі мен оттегін қатар шығара алатыны тіркелді [120]. *Anabaena* sp. көп мөлшерде сутек шығаруға қабілетті, ал *Anabaena cylindrica* азот жетіспеушілігі жағдайында сутектің ең жоғары мөлшерін өндірді (30 мл/л дақыл/сағ) және т.б. Сонымен қатар, ауадағы азотты фиксациялайтын цианобактериялардың бірі – *Cyanothece* 51142 штамы [121]. Осы кезге дейінгі зерттелген ғылыми жұмыстар негізінде, сутек өндіру процесіне қатысты осы штамның толық метаболиттік теориялық моделі қалыптасты. Бұл штам сутегінің 465 мкмоль/мг хл а/сағ мөлшерінде көміртек көзі түріндегі глицерин қатысуымен бөле алады [122].

Қазіргі таңда цианобактериялар арқылы бөлініп шығарылатын сутектің қасиеттері зерттелуде, олардың ішінде *Aphanothece halophytica* салыстырмалы тұрғыда активті түр болып табылады [123].

Молекулалық оттегі гидрогеназа мен нитрогеназа ферменттерінің белсенділігін тежейтіні белгілі [124, 125, 126]. Сондықтан, ФЖ2 комплексі арқылы жүзеге асатын H_2O тотығуының жанама өнімі ретінде түзілген оттегінің ортаға шығарылуына және жарыққа тәуелді сутегі өндірісі үшін жауап беретін гендерді зерттеудің маңызы зор. Осы тұрғыда, генетикалық зерттеулерден басқа сутегі өндірісіндегі цианобактериялардың өнімділігін жоғарылатудың

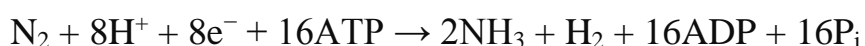
метаболизмдік тәсілдерінің негізгі үдерістері ФЖ2 ингибирлеуге бағытталған, және ол оттегі жоқ орта құру және сол арқылы нитрогеназа белсенділігін арттыруға негізделген әдістер жүйесінен тұрады.

Осы тұрғыда, ГХ флокондарының ішінде цианобактерия клеткаларының сутек ферменттерінің белсенділігін тудыру мақсатында инертті газдарды еңгізуден [123] соң *Anabaena variabilis* цианобактерия штамы сутектің жоғары мөлшерін өндірді [127, 128, 129, 130]. Аргонды қолдану нитрогеназа белсенділігінің жоғарылауына және цианобактериялардағы гетероцисталардың санының артуына алып келді. Себебі, ауадағы және қоректік ортадағы азоттың жетіспеушілігі клеткалардың стресстік жағдайын туғыза отырып, гетероцисталардың санын арттырады. Ал гетероцисталар ауадағы азотты сіңіру мақсатында нитрогеназа ферментін активтендіреді, ал нитрогеназа ферменті азотты сіңіру үдерісімен қатар, сутекті бөлу қызметін де қатар атқарады [131]. *A. variabilis* РК 84 дақылы биомассаны жинау үшін өсіргенде 73% аргон, 25% N және 2% CO₂, ал сутек алу процедурасында 93% аргон, 5% N және 2% CO₂ арақатынасындағы газдардың қоспасымен аэрацияланғанда 167,6 мкмоль/мг хл а/сағ мөлшеріндегі жоғары сутегі өндірісін көрсетті [132, 133].

1.2 Азот фиксациясының және сутегін алудың биохимиялық негіздері

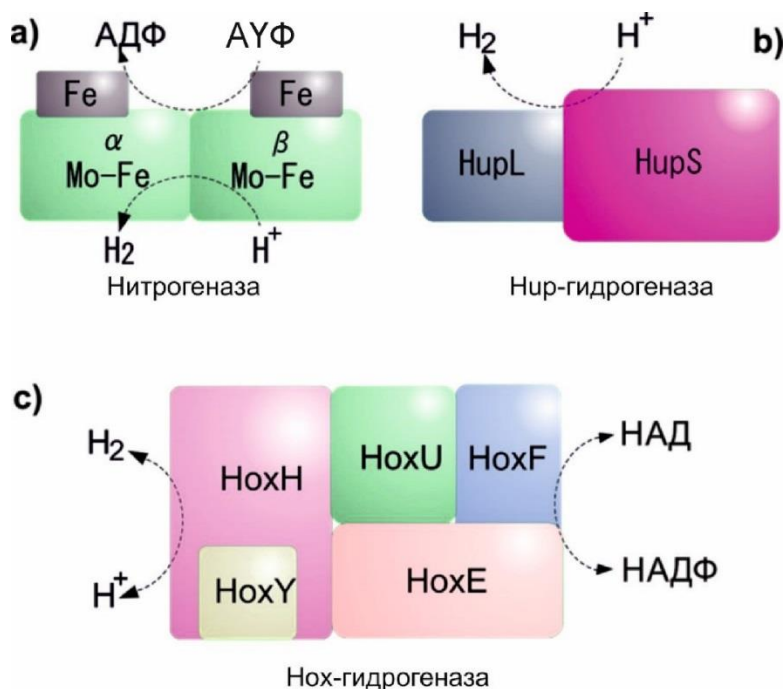
Азот фиксациясын және сутек өндірісін катализдейтін цианобактериялық ферменттер. Азот фиксациясына және сутек өндірісіне қатысатын 2 түрлі фермент бар – N₂аза және H₂аза. Нитрогеназа бір уақытта ауадағы бос азотты бойына сіңіре отырып, стрессті жағдайда қорға жинақталған энергияны сыртқа сутек түрінде бөледі. Сәйкесінше, бұл ферменттің жұмысы өте көп энергияны қажет етеді. Ал, H₂аза ферменті вегетативті клеткаларда орналасып, клеткаларда анаэробты жағдайда қарқындылық танытып, сутек молекулаларын катализдейді.

Нитрогеназа ферменті. Нитрогеназа – азот фиксациясына жауап беретін, көп салалы, мультисубстратты күрделі фермент және негізінен N-нің барлық биохимиялық түзілуін катализдейтін прокариоттардың клеткаларында кездеседі, сонымен қатар, N глобальді биогеохимиялық азот циклін жүргізуді қамтамасыз етеді. Нитрогеназа көптеген субстраттарды (протондарды қосқанда) қалпына келтіру үшін магний аденозин үшфосфатын (MgATP) және электрондарды қолданады.



Жоғарыдағы реакция бойынша нитрогеназа тұрақты азоттың бір молекуласына бір сутегі молекуласын шығарады, ол үшін 8 электрон және 16 АҰФ молекуласын қажет етеді. Анаэробты жағдайдағы клетка энергияны барлық электрондарын босату үшін нитрогеназа арқылы сутекті бөліп шығарады, бұл оның сутекті цианобактериялармен шығарудағы маңызды рөлін анықтайды. Нитрогеназаның оттегінің әсеріне жоғары сезімталдығы кеңістікті бөлу (гетероцисталарда) және фотосинтез үдерістерін уақытша шығару сияқты бірқатар қорғаныс механизмдерімен бейтараптандырылған. Нитрогеназа

құрылымы және оның сутек бөлудегі әртүрлі механизмдері туралы зерттеу жұмыстары соңғы жылдары қарқынды түрде зерттелді [91, 134, 135, 136, 137].



Сурет 5 – Сутегі алмасуына қатысатын цианобактериялық ферменттер. (а) нитрогеназа екі нақты ақуыз компоненттерінен тұрады: Мо-Fe ақуызы, субстратты қалпына келтіретін Р және Fe-MoCo кластері бар α , β кешендері және Мо-Fe ақуызына тән Fe редуктаза ақуызы. Сонымен қатар, сутегі өндірісі ауада азот болмаған кезде нитрогеназамен синтезделетін АУФ гидролизін қажет етеді; (б) Hup-гидрогеназа құрамында сутекті тотықтыруға арналған никель-темір компонентінен тұрады; (с) Hox-гидрогеназа жүйесі де никель-темір гидрогеназасынан тұрады және де ол пиридин динуклеотидтерімен (НАД, НАДФ) әрекеттеседі де, клетка алмасуына байланысты сутегі тотығуын катализдей алады. Қараңғы ортада сутектің бөлінуіне және қараңғы ортадан жаңадан шыққан кездегі сутек өндірісіне жауап береді [138].

Ферменттің белсенді орталығындағы металлдың құрамына байланысты нитрогеназаның үш түрі бар:

1. Мо-нитрогеназа (Mo);
2. V-нитрогеназа (V);
3. Fe-нитрогеназа (Fe).

Осы түрлердің ішінде альтернативті нитрогеназа (Мо-нитрогеназа) ең көп зерттелген фермент болып табылады (сурет 5). Мо-нитрогеназа – бұл азот атомдарын ыдырататын, сәйкесінше, 220-240 кДа молекулалық массасы бар $\alpha_2\beta_2$ гетеротетрамерінен тұратын құрылым. Динитрогеназа редуктазы шамамен 60-70 кДа гомодимері болып табылады және сыртқы электронды донордан (ферредоксин немесе флаводоксин) электрондарды динитрогеназаға ауыстыру кезінде аралық тасымалдаушы рөлін атқарады. Мо-нитрогеназа гетероцисттерде де, вегетативті жасушаларда да синтезделеді [139]. Нитрогеназа синтезі

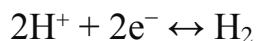
жасушадағы АҮФ деңгейінде метаболизммен реттеледі және тотықсыздандырғыштың эндогендік пулының мөлшеріне тәуелді ферменттің белсенділігімен басқарылады [140, 141, 142].

Мо-нитрогеназадан басқа, цианобактерияларда ванадий және темірден нитрогеназаның белсенді орталықтары анықталды [143].

Цианобактериялық V-нитрогеназа алғаш рет *A. variabilis* [144] штамында анықталынып, толығымен сипатталды [141]. Цианобактерия клеткалары молибден жетіспеушілігі жағдайында және ортада ванадийдің қатысуымен ацетиленді этиленге дейін төмендетіп сутегін көп мөлшерде бөліп шығарды. [145, 104]. Сонымен қатар, ванадий нитрогеназасының құрылымдық гендері *A. variabilis*, *Nostoc punctiforme* штамдарында сипатталған [146]. V-нитрогеназаның V-Fe-ақуызының гетеродимері қосымша тағы 2 δ суббірліктен тұрады.

Fe-нитрогеназа деп аталатын оның белсенді орталығында Мо немесе V жоқ нитрогеназа түрі туралы ақпараттар өте аз. Ол негізінен азотобактер және күлгін бактериялардың кейбір түрлерінде кездеседі. Ал, цианобактериялардың ішінде тек *A. variabilis* жасушаларында белсенділік танытатыны анықталды. Fe-нитрогеназа арқылы клеткадағы сутегі бөлінуінің жылдамдығы молибден немесе ванадий нитрогеназаларына қарағанда төмен болып келеді [143].

Гидрогеназа ферменті. Сутегі бөлуге қатысатын ферменттердің екінші тобы – гидрогеназалар. Бұл гетерогенді ферменттер тобы құрылымы, қасиеттері мен функциялары алуан түрлі болып келеді. Фермент қарапайым химиялық реакцияны, яғни, протондар мен электрондардан сутек түзілуін катализдейді:



Қазіргі уақытта белгілі болғандай, барлық гидрогеназалар белсенді орталықтың құрылымы бойынша үш класқа бөлінеді [147]:

- 1) NiFe-гидрогеназа (никель темірінің гидрогеназалары);
- 2) FeFe-гидрогеназа (темір гидрогеназалары);
- 3) Fe-гидрогеназа («Металл емес» гидрогеназалар).

Көптеген фотосинтетикалық микроорганизмдерде, оның ішінде цианобактериялардағы гидрогеназалар екі топқа жіктеледі: 1) тотығу гидрогеназалары (Нир), нитрогеназдан алынған сутегінің тұтынылуын катализдейді; 2) сіңіру қабілеті бар қайтымды гидрогеназалар (Нох) [148, 149, 150].

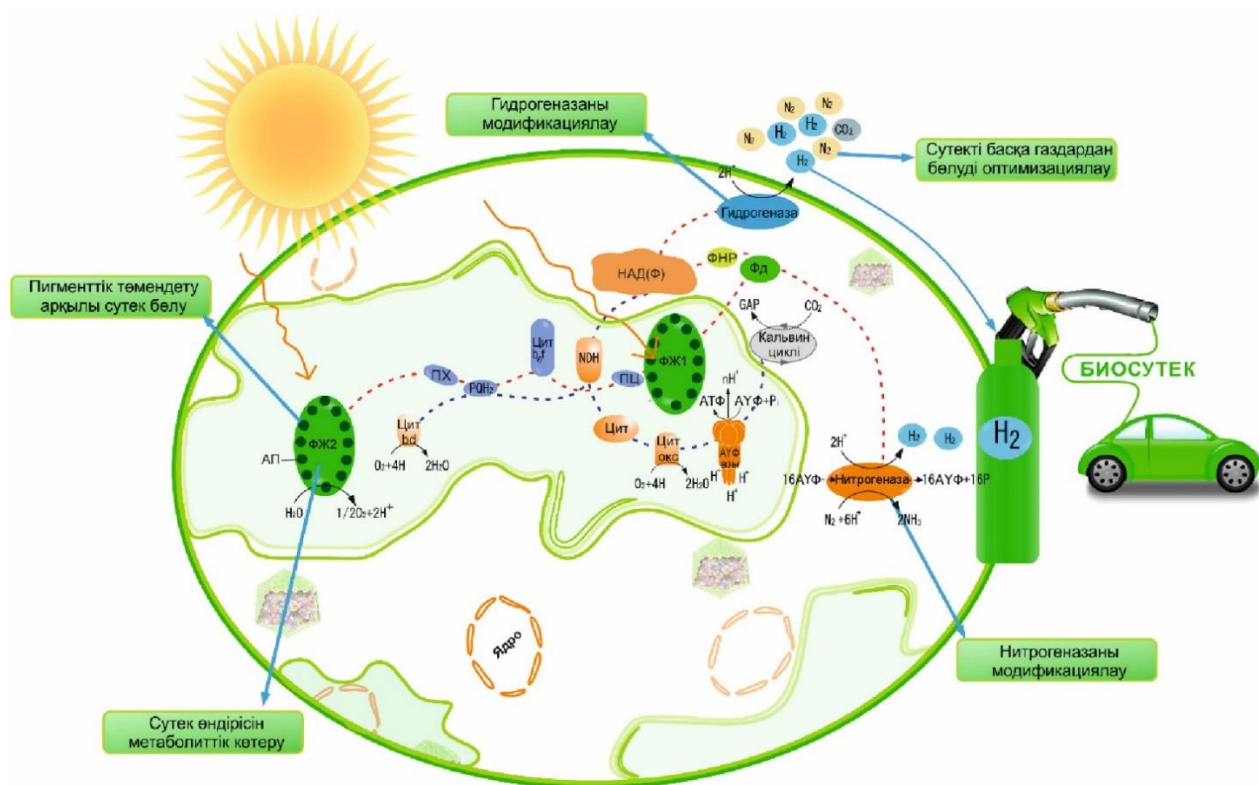
Екі бағытты Нох-гидрогеназа темір-никельді гидрогеназаларға жатады және НохЕ, НохF, НохU, НохY және НохН ақуыздары қамтитын кешеннен тұрады. НохҮН кешенінде НохН құрамында сутектің тотығуын катализдейтін каталитикалық орталық бар (сурет 5). НохY құрамында Fe₄S₄ кластері бар, ол электрондардың каталитикалық орталыққа өтуін жеңілдетеді. Электрондарды НохН ағымындағы белсенді орталық – НохY кіші бөлімі және НохEFU темір-күкірт кластерлері арқылы шығарады [151]. Бұл H₂аза НАД(Ф)-пен тікелей әрекеттеседі, оны сутегі болған кезде азайтады немесе пиридин нуклеотидтерінің төмендеуі арқылы сутекті сыртқа шығарады. Нох-гидрогеназа цианобактериялардың көпшілігінде, морфологиясы мен азотты фиксациялау

қабілетіне қарамастан анықталды. Әдебиеттерде бір клеткалы цианобактериялар – *Synechocystis* және жіпшелі *Anabaena* клеткаларында анықталғаны туралы көптеген деректер кездеседі. *Anabaena variabilis*, *Anabaena* PCC 7120, *Synechococcus* PCC6301 және *Synechocystis* PCC 6803 штамдарындағы H_2 аза ферменттері толығымен сипатталған [152, 153, 154, 125, 155]. Бірақ бұл ферменттің оттегіге сезімтал екенін және оның жұмыс істеуі үшін микроаэробты немесе анаэробты жағдайлардың қажет екенін атап өту керек [156].

Сонымен қатар, HupSL H_2 аза екі бөлімнен тұрады – үлкен HupL субуниті және кіші HupS суббөліктері, сәйкесінше, шамамен 60 кДа және 30 кДа (сурет 5). Үлкен қосалқы бөлікте белсенді орталық бар және биметаллды NiFe орталығымен қоршалған, ал кіші бөлімде электронды беруді қамтамасыз ететін темір-күкірт кластерлері бар. Азот түзуші цианобактериялардың клеткаларында кездесетін HupSL гендері азотсыз ортадағы клетка жағдайында да көрінеді және нитрогеназа белсенділігімен тығыз байланысты болып келеді [150, 157, 158]. 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 [107]. Гетероцисттердегі мұндай реакция нитрогеназаға улы болып келетін оттегінің қысымының деңгейін төмендетуге көмектеседі, сонымен қатар, нитрогеназаны электрондармен қамтамасыз етеді [156, 159, 160, 161, 162]. Мысалы, *Anabaena variabilis*-те HupSL азоттың сарқылуы жағдайында NtcA цианобактериялық азотты реттегішпен әсер ету арқылы транскрипцияланады [159]. Кейбір жағдайларда, HupSL комплексінің жоғары индукциясы сутегі болған кезде айқын байқалады [163].

Цианобактерия клеткалары арқылы сутегі өнімділігін арттырудың метаболиттік тәсілдері. Цианобактериялар арқылы жүзеге асатын биосутек өндірісін метаболиттік тәсілдерді қолдана отырып жоғарылату жұмыстары продуценттің өнімділігіне тікелей байланысты болып келеді (сурет 6).

Цианобактерия клеткалары негізіндегі сутегі бөліну үдерісінің тиімділігі көптеген факторларға байланысты, бұл оның кең масштабты өндірісі үшін өте маңызды болып табылады. Жарықтың қарқындылығы, температура, рН, қоректік орта, оттегі мен азот концентрациясының төмен болуы немесе болмауы, тұздар әсері сынды сыртқы орта факторлары сутектің бөлінуіне өз әсерін тигізеді. Белгілі болғандай, жоғарыдағы әр түрлі факторлар сутек бөлінісіне әрқалай әсер етеді.



Сурет 6 – Цианобактериялар негізінде сутек өндірісін жақсарту жолдары және қолданылуы [164].

Анаэробты орта, жарықтандыру, температура – продуценттің белсенділігіне әсер ететін негізгі факторлар екендігі әдеби шолуларда егжей-тегжейлі көрсетілген [96]. Сутектің бөлінуіне бірнеше сыртқы орта факторлары өз әсерін тигізеді. Соның ішінде рН көрсеткіші – сутегі өндірісіне әсер ететін факторлардың бірі болып табылады. Соңғы зерттеулерге сәйкес сутегі өндірісінің оңтайлы рН көрсеткіші 5-тен 7-ге дейін болады [96, 97]. Бұл көрсеткіш цианобактериялардың ферментативті механизмінің тиімділігін реттейді және клеткалардың тотығу-тотықсыздану реакциясында үлкен рөл атқарады. Жарық әсеріне келер болсақ, цианобактерия штамдары негізінен жарыққа тәуелді, себебі, жарық энергия көзін беруші болып табылады.

Инертті газдарды берумен қатар, цианобактериялық клеткалар арқылы сутегі өндірісін арттырудың келесі тәсілі – макроэлементтермен ашықтыру жұмысын жүргізу болып табылады. Соның ішінде, күкірт, азот және фосфор сияқты маңызды макроэлементтерді де қоректік ортадан алып тастау олардың метаболизмінің өзгеруін тудырып, клеткалар арқылы сутегі өндірісін айтарлықтай ынталандыратыны белгілі болды [113].

Осылайша, аминқышқылдары, ақуыздар, витаминдер, тиамин т.б. сияқты қосылыстардың түзілуіне қажетті күкірт пен азоттың жетіспеушілігі өсуді баяулатады және фотосинтетикалық микроорганизмдердің өміршеңдігін төмендетеді [165]. Макроэлементтердің жетіспеушілігінің цианобактериялардың сутегі өндірісіне әсері *G. Alpicola* CALU 734 және *Synechocystis* sp. PCC 6803 азотты түзбейтін штамдарында зерттелген [113]. *G.*

alpicola CALU 734 штамымен жүргізілген экспериментте азотпен ашықтыру кезінде гликоген деңгейі 40% көтерілгені байқалды. Клеткадағы гликоген мөлшерінің көбеюінің ұқсас көрінісі *Synechocystis* sp. PCC 6803 клеткаларында күкіртпен ашықтыру кезінде байқалды. Оның нәтижелері бойынша, осы микроэлементтермен ашықтыру жағдайында, цианобактерия клеткаларында гидрогеназа белсенділігінің жоғарылауы байқалады және осы тәжірибеде сутегі шығымының максималды жылдамдығы 0,15 ммоль/мг хл а/сағ көрсеткішінде болды. Кейбір зерттеу жұмыстары дәлелдегендей, ортада күкірттің қажетті концентрациясы болмағандықтан, ФЖ2 қызметі бұзылып, оттегінің бөлінуі азая түседі. Атап айтқанда, ФЖ2-де D1 ақуыз синтезінің бұзылуы байқалады, бұл ФЖ2 комплекс циклінің баяулауына және нәтижесінде ФЖ2 белсенді орталықтарының құрамының төмендеуіне әкеледі [167]. Фотобиореактордағы анаэробты жағдайдағы клеткалармен жүзеге асатын ашығу үдерісі ФЖ2 инактивациясының өздігінен пайда болуы үшін маңызды және сутек өндірісі үшін қажетті үдеріс болып табылады. Осылайша, цианобактерия штамдарын макроэлементтермен жарықта ашықтыру үдерісін сутегі өндірісін ұлғайтатын метаболиттік тәсіл ретінде қарастыруға болады. Бұл жағдайда сутегі фотопродукциясы екі стресс факторының: күкірт пен оттегінің жетіспеушілігінің синергетикалық әсерінің нәтижесі екенін атап өткен жөн [168].

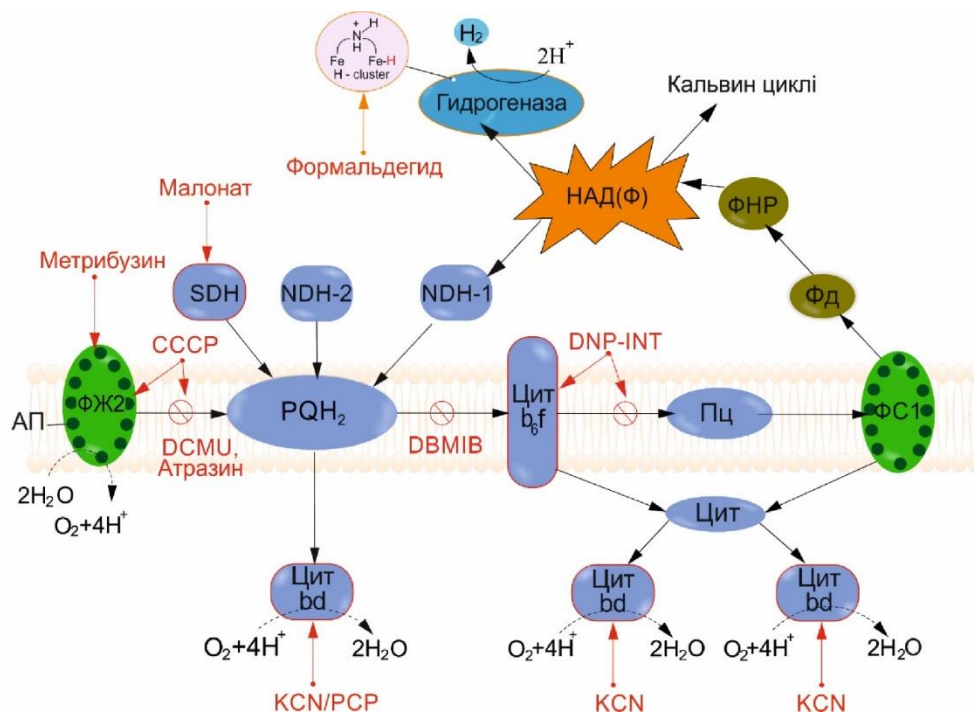
Сутегі өндірісіндегі цианобактериялық клеткалардың өнімділігін арттырудың тағы бір тиімді тәсілі – электрондарды тасымалдау ингибиторларын қолдану. Қазіргі уақытта 15-тен астам әр түрлі ингибиторлар қолданылады, олардың ішінде кеңінен қолданылатын диурон (DCMU), карбонил цианид *m*-хлорофенил гидразон (СССР), метил виологен (МВ), калий цианиді (КСН), хлорамфеникол, 2,5-дибромо-3-метил-6-изопропил-*p*-бензокинон (DBMIB), пентахлорфенол (РСР) және малонат ФЖ ингибиторлары болып табылады (3-кесте).

Сонымен қатар, DCMU (диурон) – кеңінен қолданылатын электрон тасымалдау жүйесінің ингибиторларының бірі болып табылады, оның молекулалық құрылымы біртіндеп қысқарған пластокинонның құрылымына ұқсас және бұл молекулалардың ФЖ2 реакция аймағындағы хинон байланыстыру орталығында белсенді байланыстырылуымен түсіндіріледі. Диуронды қолдану фотожүйе 1 белсенділігін тежеуге және молекулалық сутек өндіруге қолайлы анаэробты жағдай жасауға бағытталған. Осылайша, DCMU ингибиторы хинонның аналогы ретінде QВ ФЖ2-мен байланысады да, QА-дан электрондардың ауысуын тежейді (сурет 7). DCMU әсерінен цианобактериялық клеткалардағы сутегі өндірісінің артуы бірқатар ғалымдардың жұмыстарында көрсетілген [178, 179, 172, 180, 161]. Коурнак және т.б. (2004) авторлар қараңғы, анаэробты жағдайда 75 ммоль DCMU қатысуымен *Synechocystis* sp. PCC 6803 клеткалары сутекті жоғарырақ өндіретінін хабарлады [181].

Кесте 3 – Цианобактериялардағы сутегі өндірісін ұлғайту үшін қолданылатын электрон-транспорт ингибиторларының негізгі түрлері

Атауы	Қысқаша атауы	Жүйелік атауы	Формуласы	Әсер ету механизмі	Әдебиет көздері
Диурон	DCMU	3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	ФЖ2-ден PQH_2 қысқартылған бассейнге электронды тасымалды шектейтін ФЖ2 ингибиторы (бұдан әрі PQ пул қысқартылған PQH_2 пулына әсер етеді)	[169, 170, 171, 172]
Карбонилцианид м-хлорофенилгидразоны	СССР	3-(хлорофенил)гидразон малоннитрил	$C_9H_5ClN_4$	ФЖ2-нің фотохимиялық белсенділігін тежейді	[173, 172]
Дибромтимохинон	DBMIB	2,5-Дибром-3-метил-6-изопропил-р-бензохинон	$C_{10}H_{10}Br_2O_2$	B_6f цитохромының ингибиторы, ол пластокинон (PQ) бассейнінің химиялық азаю дәрежесін арттырады	[174]
Калийцианид	KCN	-	KCN	Барлық терминалды оксидазаларды тежейтін цитохромоксидаза ингибиторы	[175]
Малонат немесе пропанедиат	-	-	$CH_2(COO)_2$	Сукцинат дегидрогеназа ферментін 75%-ға дейін тежейтін ингибитор	[176]

ФЖ ингибиторларының әсерінің негізгі нүктелері және цианобактериялардағы сутегі алмасуының белгілі бір жүйесінің жұмысын блоктау тәсілдері 7-суретте келтірілген. Зерттеу жұмыстары көрсеткендей, жоғарыдағы ингибиторларды қолдану цианобактерия клеткалары арқылы жүзеге асатын H_2 өндірісін ұлғайтады.



Сурет 7 – Цианобактериялар арқылы биосутек өндірісін ұлғайту үшін қолданылатын әртүрлі ингибиторлардың әсер ету орталықтары.

Белгілеулер: ФЖ1 – фотожүйе 1; ФЖ2 – фотожүйе 2; PQH_2 – азайтылған пластокинон бассейні; Цит b_6f – цитохром b_6f ; ПХ – пластоцианин; Цит – цитохром; ФНР – $NADP^+$ редуктаза; Фд – ферредоксин; NDH-1 – $NADPH$ -дегидрогеназа (I кешені); NDH-2 – 2 типті $NADP^+$ -дегидрогеназа; Цит bd – хинол оксидаза, CtaI – цитохром с оксидаза; SDH – сукцинатты H_2 аза [177].

Цианобактериялар мен микробалдырлардағы фотожүйе 2-нің тағы бір танымал ингибиторы – карбонил цианид м-хлорофенил гидразоны (CCCP) болып табылады (кесте 3). Бұл ингибитор DCMU сияқты, карбонилді цианид м-хлорофенил гидразин ФЖ2-нің фотохимиялық белсенділігін тежейді және O_2 өндірісінің төмендеуіне әкеледі. *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Nostoc* sp. және *Lyngbya* sp. штамдарына CCCP ингибиторымен әсер еткенде ФЖ2 фотохимиялық белсенділігі тежелетіндігі туралы хабарланды [173, 182, 183]. Сонымен қатар, *Oscillatoria chalybea* мен *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамдарына CCCP тежегішімен әсер еткенде H_2 өндірісінің жоғарылағаны туралы зерттеу нәтижелері бар. Сондай-ақ, CCCP ингибиторының АҮФ синтезін тежеуі туралы деректер көптеген ғалымдардың жұмыстарында келтірілген және *Anabaena variabilis* және *Anacystis nidulans*

дақылдарының қараңғы ортадағы тыныс алу жылдамдығының жоғарылауына алып келді [172, 184].

KCN және PCP сияқты ингибиторлар хинол оксидазаны блоктайды, бұл PQ пулының азаюын тудыруы [77]. Сонымен қатар, KCN ингибиторы Аппел және т.б. (2007) ұсынған жұмыстарда [177] сутек бөлінуді блоктайды немесе DBMIB-ге сияқты Берг және Крогман (1975) [185] ұсынған жұмыста Цт b₆f комплексінен фотожүйе бірге дейін толығымен электрон транспортын блоктайды. Сонымен қатар, DBMIB нитраттың ассимиляциялық гендерінің реттелуіне ықпал ететіні көрсетілген [186, 177] және нитраттың ассимиляциясының тежелуі өз кезегінде H₂ өндірісінің артуына алып келді [187].

Цианобактерия клеткалары арқылы сутек өндірісінің өнімділігін жоғарылатудың тиімді метаболиттік тәсілінің бірі – ортаға әр түрлі экзогенді электрон донорларын қосу болып табылады. Көміртектің көзі нитрогеназа ферментінің белсенділігіне әсер ететіні белгілі. Қарапайым органикалық қосылыстар болған кезде сутегі өндірісі артады, өйткені, кофактор қосылыстары арқылы электронды тарту нитрогеназаның қызметін белсендіреді. Сонымен, әртүрлі қанттардың қосылысы да сутегі өндірісін ынталандырды, ал маннозаны қосқанда салыстырмалы түрде ең жоғары көрсеткіш байқалды – сағатына 1 мг құрғақ салмаққа 5,58 нмоль сутегі [89, 95, 101].

2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ МЕН ӘДІСТЕРІ

2.1 Зерттеу объектілері мен материалдары

Зерттеу жұмысының объектісі ретінде коллекциялық (CCMKazNU) *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220, *Synechococcus* sp. I12 және *Phormidium corium* B-26, *Anabaena* sp. 7912, *Anabaena* sp. Z-1, *Anabaena variabilis* R-I-5, *Nostoc caldicola* RI-3, *Nostoc* sp. S-2, *Synechocystis* sp. PCC 6803 және әр түрлі эко-жүйелерден бөлініп алынған *Anabaena* sp. B1-4, *Nostoc* sp. J-14.

Зерттеу материалдары ретінде Қызылорда облысы, Жанақорғанның ауданының күріш алқаптарының келесідей цианобактериялары қолданылды: *Cylindrospermum* sp. J-8, *Anabaena variabilis* K-31, *Oscillatoria* Sh-11, *Tolypothrix tenuis* J-1.

Ал, жоғары сатыдағы өсімдіктерден *Sunrise* T-4 құлпынай және Ақмаржан күріш сорттары қолданылды.

Зерттеу материалы 1-2 м тереңдіктен 3-5 нүктеден алынды, содан жалпы сынама шығарылды. Сынама 13 сағат аралығында арнайы салқындатқыш сөмкеде (НПФ-Медтехника, РФ) +6° - +8°С температурада тасымалданды және +4° - +6°С сақталынды.

Жұмыс әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университетінің биология және биотехнология факультеті биотехнология кафедрасының «Микробиология» зертханасында жүргізілді.

Заррука, BG-11, №6, Аллен, Мурасиге-Скуга қоректік орталары мен диурон герпициті қолданылынды.

Заррука қоректік ортасы – цианобактериялардың түрлерін дақылдауға арналған негіздік орта. Биотехнологияда көбіне жіпшелі және бір клеткалы цианобактерияларды (*Spirullina*, *Synechocystis*) дақылдау үшін пайдаланады.

BG-11 қоректік ортасы – цианобактерияларға арналған универсалды қоректік орта. Құрамына кіретін тұздардың мөлшерінің аз болуына байланысты өндірістік мақсаттағы жұмыстарда кеңінен қолданылады.

Аллен қоректік ортасы – цианобактерияларды дақыладуға арналған универсалды қоректік орта.

Мурасиге-Скуга – өсімдіктерді дақылдауға арналған қоректік орта. Зерттеу жұмысында бұл қоректік орта құлпынай және күріш өсімдіктерін өсіру үшін қолданылды.

Құлпынайдың *Sunrise* T-4 сорты Данкук университетінің, биотехнология лабораториясынан (Оңтүстік Корея Республикасы) алынды. Лабораторияда *in vitro* жағдайында өскен құлпынайдың 2 апталық көшеттері «Plant Factory» (Allen, Оңтүстік Корея Республикасы) дақылдау камерасында дақылданды. Көшет тамырларының ұзындығы 3 см ұзындықта кесілді. Өсімдіктің бойының ұзындығы 3-4 см және жапырақтарының саны барлық үлгілерде біркелкі болды. Дақылдау камерасының температурасы 25°С болды. Жарық 12 сағат қараңғы/12 сағат жарық режимі бойынша берілді. Құлпынайдың қалыпты өсуі үшін жасалған арнайы қызыл спектрдегі фотолампарлар қолданылды.

Күріштің Ақмаржан сорты «Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС-нен (Алматы, Қазақстан) алынды. Күріш дәндері

ҚазҰУ-нің, Биотехнология лабораториясының дақылдау камерасында өсірілді. Дақылдау камерасының температурасы 25°C болды. Жарық 12 сағат қараңғы/12 сағат жарық режимі бойынша берілді.

2.2 Цианобактериялардың түрлік құрамын анықтау

Әр түрлі экожүйелерден бөлініп алынған сынамалардағы цианобактериялардың түрлік құрамын анықтау келесі анықтағыштар арқылы жүргізілді: КСРО тұщы су балдырларының анықтағышы, 1-14 том, 1951; Орта Азияның протококкалы балдырларының анықтағышы, 1976; Орта Азияның көк-жасыл балдырларының анықтағышы, 1-2 том; Орта Азияның протококкалы балдырларының анықтағышы, 1-2 том, 1988; КСРО протококкалы балдырларының анықтағышы, 1951; Орта азияның көк-жасыл балдырларының анықтағышы, 1-3 том, 1987; Орта Азияның көк-жасыл балдырларының анықтағышы, 1987; Хлорококкалы балдырлардың қысқаша анықтағышы Укр., КСРО, Киев, 1990 [188, 189, 190, 191, 192].

2.3 Цианобактериялардың жинақы дақылдарын алу

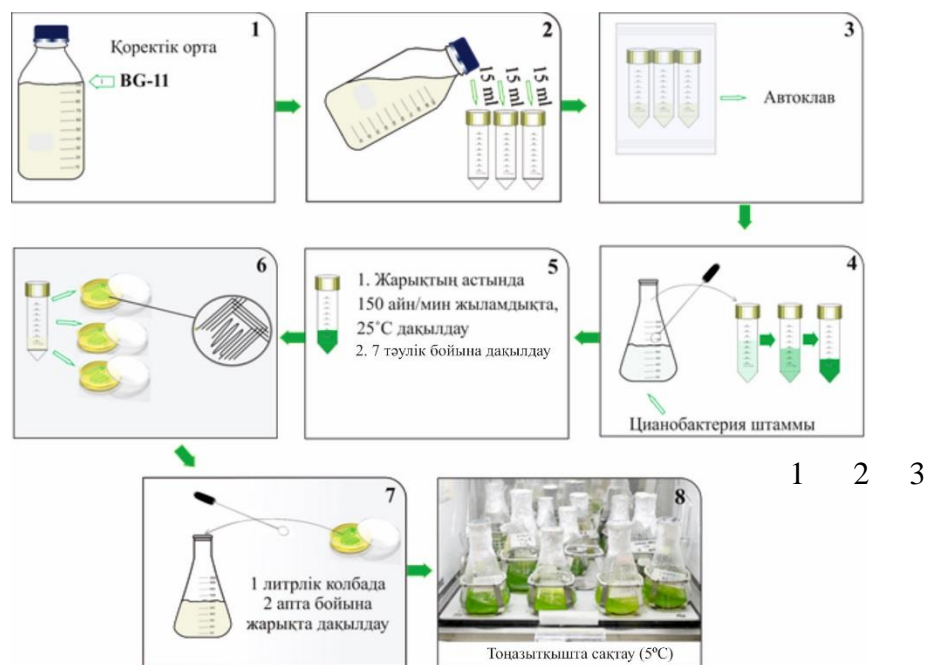
Әр түрлі табиғи көздерден бөлінген сынамалардан жинақы дақыл алу мақсатында алынған үлгілер залалсыздандырылған сұйық қоректік ортасы бар түтіктерге көшірілді. Пробирканың ішіндегі қоректік орта $\frac{1}{2}$ мөлшерде құйылды. Қоректік ортаға егілген үлгілердің жарықтандырылуы люминесцентті лампалар арқылы 50-200 мкмоль фотон/м²/сек қарқындылықта жүргізілді [193].

Цианобактериялардың жинақы дақылдарын алу үшін BG-11, Громов, Прата және Z1 қоректік орталары қолданылды. Осы қоректік орталармен қатар, BG₀-11 және Заррука модификацияланған қоректік орталары да пайдаланылды. Заррука қоректік ортасы тек тұзды аймақтан алынған түрлерді өсіруге таңдалынып алынды. Цианобактериялардың белсенді өсу көрсеткіштерін зерттеу үшін альгологиялық-бактериялогиялық таза штамдармен зерттеу жүргізілді. Содан соң, әр түрлі мөлшердегі (1 мл, 2 мл, 4 мл, 8 мл) цианобактерия үлгілері жаңадан залалсыздандырылған қоректік орталарға көшірілді. Сұйық қоректік орталарға қайталап егу жұмыстары 1-2 ай көлемінде жалғасты. Жарық микроскобының астында (100x) морфологиялық ерекшеліктерін сипаттау жұмыстары жүргізілді. Монодақыл анықталған жағдайда, әр түрлі ортадағы қатты агарға егу жұмыстары жүргізілді. Петри табақшаларының бетінде колония түзілгенге дейін жарықтың астында дақылданды. Өскен колониялардан дақылдардың бір бөлігі ілмектің көмегімен сұйық және қатты ортаға қайтадан көшірілді [194, 195].

2.4 Цианобактериялардың альгологиялық таза дақылдарын бөліп алу

Цианобактериялардың таза түрлері штрих әдісімен қайталап егу арқылы микропипетка көмегімен алынды. Әдістің сызба-нұсқасы 8-суретте келтірілген. Барлық цианобактериялардың альгологиялық таза дақылдары BG-11 қоректік ортасында алынды, дегенмен, кейбір гетероцисталы түрлер үшін BG₀-11 қоректік ортасы қолданылды. Автоклавта залалсыздандырылған, ішінде 15 мл-лік қоректік ортасы бар пробиркаларға түтіктің 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 бір апта сайын микроскоптың астында тек қажетті клеткалар ғана алынып отырылды. Үшінші пробирка қайтадан 150 айн/мин жылдамдықта, 25°C температурада 7 тәулік бойына дақылданды [3].



Сурет 8 – Цианобактериялардың альгологиялық таза дақылдарын алу сызбанұсқасы.

Белгілеулер: 1) BG-11 және BG₀-11 қоректік орталарын дайындау; 2) 15 мл-лік пробиркаларға құю; 3) автоклавта залалсыздандыру; 4) цианобактериялардың жинақы дақылынан 3 пробиркаға апталық үзіліспен егу; 5) соңғы пробирканы дақылдау; 6) қатты ортаға штрих әдісімен егу; 7) қатты ортадан қайтадан сұйық ортаға көшіру; 8) алынған цианобактериялық түрді сақтау.

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

2.5 Цианобактериялардың бактериялогиялық таза дақылдарын алу

Бөлініп алынған цианобактерия түрлері жинақы, альгологиялық таза дақыл болғандықтан, тазалаудың бірнеше кезеңдері жүргізілді, ал бактериялардың тіршілік әрекетін тоқтату үшін ультракүлгін сәулелердің стерилизациялық әсері

(254 нм) қолданылды. Қатты қоректік орталардағы цианобактериялардың дақылдары 30 секундтан 20 минутқа дейін ультракүлгін сәулелермен сәулелендірілді. Ультракүлгін көзі ретінде бактерицидті УК лампалары қолданылды. Сәулелендіру көзінен дақылдың қашықтығы 10-25 см құрады. Сәулеленгеннен кейін цианобактериялардың дақылдары қайтадан жаңа агарлы ортаға егіліп, өсіп шыққан соң бактериялардың тазалығы микроскоп астында иммерсионды майды қолданып 100х үлкейтуімен бақыланды [196].

Сонымен қатар, кейбір дақылдар бактериялардан Бюльд әдісімен тазартылды. Стерильді түтіктерге 1 мл дистилденген су қосылды, содан кейін автоклавта залалсыздандырылды. Сонымен қатар, әр түрлі глюкозаның концентрациялары (0,1-2%) алдын ала дайындалған агарлы ортаға қосылды [196].

2.6 Цианобактериялардың өнімділігін арттыру әдістері

2.6.1 Цианобактериялардың клеткаларын сандық есептеу

Цианобактериялардың клеткаларының санын есептеу Горяев камерасымен жүргізілді. Камераның орташа көлемде, көлденең бөлінген пластинкаларының ішіндегі клеткалардың саны 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 иммерсиондық май тамызылды. Жабындық шыныға нақтылап бекіткен соң, төменгі оң жақ бүйірінен аздап клеткалардың 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 s -ға тең болса, онда кішкентай бір квадратта клетка саны сәйкесінше:

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

ал 1 см^3 ортадағы клетка саны:

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

Сонымен, 1 см^3 қоректік ортадағы клетка санын анықтау үшін 25 квадратты санау кезінде клеткалардың мөлшері n 100-ге бөлініп, 10^6 -не көбейтілді.

Клеткалардың тығыздығы $1,0-3,0 \times 10^6 / \text{см}^3$ 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 клеткалардың бөлуінің ауытқуы жоғары болып келеді [197].

2.6.2 Цианобактериялардың құрғақ биомассасының мөлшерін анықтау

Құрғақ салмақты анықтау әдісі 2 сатыдан тұрды. Бірінші сатысында жалпы құрғақ салмақ анықталынды (балдыр+тұздар), ол үшін цианобактерия суспензиясының белгілі көлемін жақсылап араластырып, 65°C температурадағы ортадағы «SNOL 67/350» (AB Utenos Electrotechnika, Литва) термостатында Петри табақшасының ішіне 3 тәулік бойына құрғатылды. Ыдыс ретінде сол температурада кептірілген және алдын-ала аналитикалық таразыларда өлшенген фарфорлы табақшалар пайдаланылды. Клеткаларды буландырып, кептіргеннен кейін ыдыстар аналитикалық таразыларда қайта өлшенді және салмағының айырмашылығына байланысты жалпы құрғақ салмақ анықталынды.

Екінші сатысында құрғатылған ыдыс дистилденген сумен толтырылды. Толық ерігеннен кейін тұз ерітінділерімен араластырып, ерімеген қалдығымен бірге өлшеуші құтыларға құйылды да, бірінші сатыдағы сынаманың көлеміне дейін дистилденген сумен толтырылып, цианобактериялардың штамдары центрифуганың көмегімен (5810R, Eppendorf) 5,000-10,000 айн/мин жылдамдықпен бөлініп алынды. Центрифугалаудан кейін ерітіндіні тұңбадан бөліп алып, жалпы құрғақ салмақты анықтау кезіндегі әдіспен зерттелінген үлгідегі тұздың құрғақ салмағы анықталынды. Үлгі мен тұздардың құрғақ салмағы арасындағы айырмашылық арқылы клеткалардың құрғақ биомассасы анықталынды [198]. Содан соң, құрғақ биомасса лабораториялық таразы (Clever, Қытай) көмегімен өлшенді.

2.6.3 Цианобактериялардың өсу жылдамдығының коэффициентін анықтау әдісі

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

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

мұндағы X_t және X_0 – t және t_0 уақыттарындағы клетка суспензиясының тығыздығы [198].

Биомассаны екі еселеу уақыты (t_d) келесі формуламен анықталды:

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

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

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

мұндағы T – лаг-фазаның жалғасу уақыты, t – X_f суспензияның белгілі бір тығыздыққа жеткен уақыты [199].

2.6.4 Цианобактериялардың морфологиялық дақылдық қасиеттерін зерттеу

Бөлініп алынған дақылдардың морфологиялық белгілері Meiji Techno (Канада) флуоресценттік микроскобының CAMV500B камерасы арқылы (ACC and CE standarts, Канада) зерттелінді. Зерттеу барысында 10x, 40x, 100x объективтері мен 10x окуляр қолданылынды қолданылды.

2.6.5 Цианобактерияларды дақылдау үшін жарық қарқындылығын өлшеу

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

2.6.6 Цианобактерияларды дақылдау үшін CO₂ өлшеу

Цианобактериялық дақылдар стерильді газбен аэрацияланды және 1% CO₂ газ RMA-0,063 G (Ресей) ротамерімен есептелініп, ауаның құрамына қосылды [200]. Дақылдау BOYU S-4000B (Қытай) ауа компрессорының көмегімен берілді.

2.7 Цианобактериялардан сутек алу әдістері

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, SPP-25GA ауа сорғышының көмегімен аэрацияланды (Такацуки, Осака, Жапония) (сурет 9а). Содан соң, сутек бөліп алуға дайындау үшін 100 мл колбаларға көшірілді (сурет 9ә).

Сутегін алуда цианобактериялардың биомассасын дайындау әдісі. Цианобактерия дақылдары 40 мл түтіктерде өсірілді, содан соң 5 мин бойына 10,000 rpm жылдамдықта центрифугаланды. Супернатантты төгіп тастағаннан кейін клетка дақылдарына 100 мл BG₀-11 қоректік ортасы қосылып, 3 мин бойына араластырылды. Алдын ала өсірілген жасушалар ~730 нм толқын ұзындығында спектрофотометрмен (V-630; JASCO International Co., Ltd, Токио, Жапония) 0,4 оптикалық тығыздыққа (OT₇₃₀) келтірілді. Осыдан соң, дақылдар 24 сағат бойына жарықтың астында (қарқындылығы: 45 ммоль фотон/м²/сек) өсіріліп, центрифугамен (Himac CR 22G high-speed refrigerated centrifuge; Hitachi Co., Ltd., Токио, Жапония) клеткалары 10,000 rpm жылдамдықта 5 минуттан соң жиналып алынды. Қоректік ортаның супернатантын төккеннен соң 30 мл BG₀-11 қоректік ортасы үстіне қосылды. Одан әрі, клеткалар тағы да 5 мин бойына 10,000 rpm жылдамдықта центрифугаланды (сурет 9). Екі мәрте жуудан соң, супернатанттан бөлініп алынған клеткалар спектрофотометр арқылы OT₇₃₀ – 1,5 бірлікке келтірілді. Концентрацияланған клеткалардың үстіне 7,5 мл BG₀-11 қоректік ортасы құйылып, ол 50 ммоль HEPES-КОН (pH-7,4) суспензиясы және 100 ммоль NaHCO₃ химиялық қоспаларымен модификацияланды. ГХ виалының ішінде 10 мл кеңістік клеткалардан бөлінген газдар жинақталуы үшін қалдырылды [201].

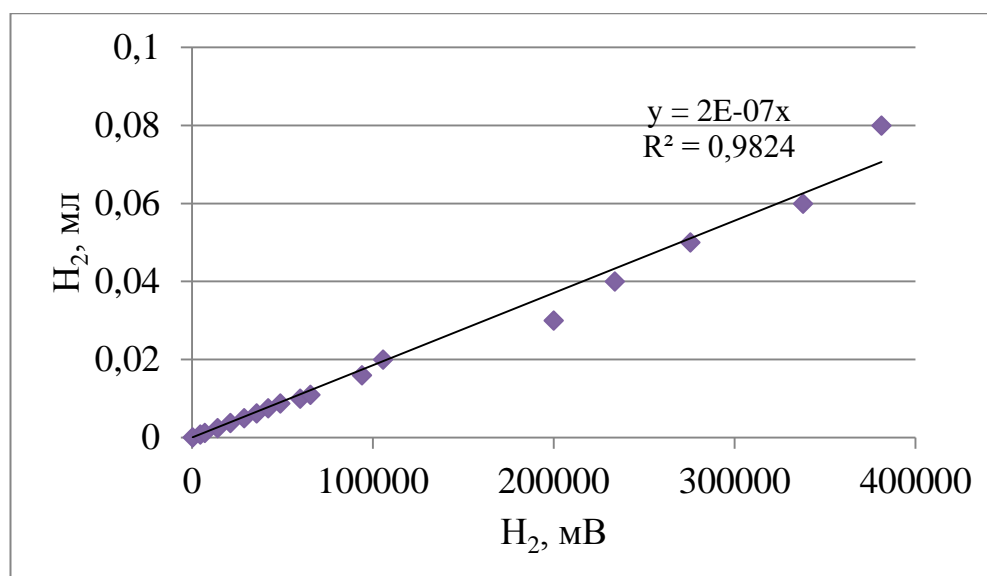
Содан соң, аргон газы оттегін алмастыру үшін ГХ шприцінің көмегімен ГХ виалына еңгізіліп, бөлме температурасында жарық немесе қараңғы жерге орналастырылды. Жарық ГХ виалының бір жағынан берілді және оның қарқындылығы 30 мкмоль фотон/м²/сек құрады. Клеткалардың биомассасы HS-10VA микроараластырғышымен 150 айн/мин жылдамдықта шайқалды (AS ONE International, Inc., Санта Клара, Калифорния, АҚШ). Қараңғы процедурада ГХ виалы фольгамен жабылып, BioShaker BR-22FP-де (Таитек корпорациясы, Сайтама, Жапония) ішінде 25°C температурада дақылданды.



Сурет 9. Цианобактериялардың штамдарын сутек алуға дайындау.

Белгілеулер: А – Н₂ өндіру үшін биомасса алу әдісі; Ә – анаэробты жағдайда өсіру (аргонда). Цианобактерияларды жарықта және қараңғыда сутек алу үшін дақылдау: Б – жарықта, В – қараңғыда, Г – екі түрлі (жарық, қараңғы) фазаға дайындалған ГХ виалдары

Молекулалық сутегін өлшеу әдісі. Жиналған молекулалық Н₂ газы ГХ өндірушінің нұсқауларына сәйкес (3210; GL Sciences, Inc., Токио, Жапония) өлшенді. Инжектор мен колонка 80°C, детектор 120°C температурада жұмыс жасады. ГХ шприц көмегімен (Гамильтон компаниясы, Рено, АҚШ) ГХ виалдан 0,15 мл газ тартылып алынып, ГХ-қа еңгізілді. Тәжірибелер кезінде температура 25,0±0,5°C және бастапқы рН көрсеткіші 7,4 болды.



Сурет 10 – Сутегінің стандартты линиялық сызығы

Бөлініп шыққан сутегі мольдерін есептеу үшін сутегі стандартты калибрленген қисығы пайдаланылды (сурет 10). Сутегі калибрін реттеу үшін Microsoft Excel программасы (ANOVA) қолданылды. Бірнеше рет жүргізілген тәжірибелерден соң, мВ пен мл ара-қатынасының линиялық сызығы есептелінді, орташа ауытқуы 0,9824 көрсеткішісіне тең болды. Конвертацияланған сутегі нәтижелері мкмоль-ге ауыстырылып, хлорофилл концентрациясына (мг) бөлінді. Содан соң, виалдың ішіндегі бос кеңістікке (15 мл) көбейтілініп, сутектің шыққан сағатына бөлініп, соңғы сутек өндірісі ммоль H₂/мг хл а/сағ түрінде көрсетілді. Аргон тасымалдаушы газ ретінде пайдаланылды.

Цианобактериялардың хлорофилл а концентрациясын өлшеу. Әр үлгідегі 1 мл аликвот 1,5 мл түтікке жиналып, жоғары жылдамдықты, тоңазытылған SS-1500X микроцентрифугасының көмегімен 5 минут ішінде 10,000 грм жылдамдықта центрифугаланды (Сакума Сейсакушо, Токио, Жапония). Супернатантты бөліп тастағаннан кейін 1 мл 100% метанол дақыл клеткасына қосылды және пробирка 5 мин ішінде 10000 грм жылдамдықпен центрифугаланды. 665,2 және 750 нм жарық спектрлері хлорофилл а концентрациясын өлшеу үшін пайдаланылды, бақылау ретінде 100% метанол алынды.

Цианобактериялы суспензияға диурон ингибиторын қосу. Анаэробты орта құрмас бұрын, 0,046 г DCMU 5 мл диметилфоксидте ерітіліп, 10 ммоль, 30 ммоль, 45 ммоль концентрациялары жасалынды. Одан соң, ГХ шприці арқылы ГХ виал ішіне 3 түрлі концентрацияда қосылды. DCMU қосқаннан кейін, клетка дақылдары DCMU құрамына ену үшін 30 минут шайқалынып, суспензия араластырылды.

ФЖ1 және ФЖ2 флуоресценциясын өлшеу. Флуоресценцияны өлшеу үшін 5 мл H₂O-да 1,5 г PEG (полиэтиленгликол) ерітілді. Содан кейін, 30% PEG 150 мкл және әр штамның 150 мкл үлгісі 1,5 мл түтікке араластырылды. Барлық штамдарға бірдей PEG концентрациясы қолданылды. ФЖ1 және ФЖ2

флуоресценттік спектрлері қозу толқынының ұзындығы 435 нм болды және спектрофторометр (FP-8500; JASCO International Co., Ltd, Токио, Жапония) көмегімен сұйық азот ағынының астында тексерілді.

2.8 Ацетилен әдісімен нитрогеназаның белсенділігін өлшеу әдісі

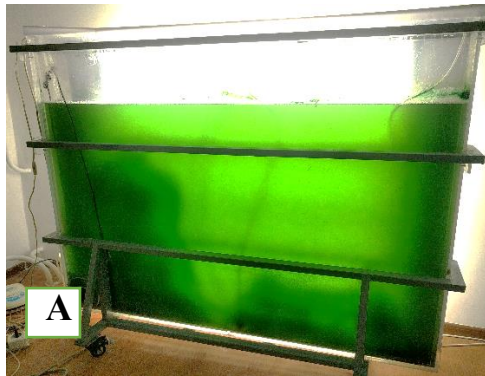
Нитрогеназаның белсенділігі Давид және т.б. (1980) жұмысына сәйкес 10% ацетилен/90% аргон газдық қоспаны виалдың ішіне 30 мин бойына енгізу тәсілімен анықталды [202]. 30 мл виалдағы клеткалар 250 мкмоль фотон м²/сек жарық қарқындылығында 24 сағат бойына дақылданды. Инкубациядан кейін 500 мкл газ үлгілері алынып, газдық қоспаның құрамындағы этиленнің концентрациясы анықталды. Ацетиленнің тотықсыздану белсенділігі GC-15A (Shumadzu, АҚШ) газды хроматографында анықталды, нмоль этилен/мг ҚБ/сағ көрсеткішінде ұсынылды.

Ауыр металлдарды суспензияға қосу әдісі. Жасушалар 22°C-де Na₂MoO₄ металлы алынып тасталған Аллен ортасында, жарық астында (50 мкмоль фотон м²/сек) өсіріліп, металлсыз ортада 3 рет жуылып, шамамен 10×10⁶ кл/мл концентрациясында қайтадан анаэробты ортаға көшірілді. 3 түрлі мкмоль концентрациядағы Na₂MoO₄, Na₃VO₄ және Na₂WO₄ тұздары дақылдарға қосылды.

2.9 Құлпынай көшеттерін өсіру және зерттеу әдістері

Құлпынайдың құрғақ биомассасын дайындау әдісі. Құлпынайдың көшеттері эксперимент соңында топырақтан алынып, үш рет жуылды. 70°C температурадағы қараңғы ортадағы «SNOL 67/350» (AB Utenos Electrotechnika) термостатында Петри табақшасының ішіне 3 тәулік бойына құрғатылды. Содан соң, құрғақ биомасса лабораториялық таразы (Clever, ҚХР) көмегімен өлшенді.

Құлпынайға цианобактерияның биомассалық сығындысын дайындау әдісі. Массалық биомасса алу мақсатында гетероцисталы цианобактерия *Anabaena variabilis* R-I-5 штаммы қарқынды түрде 200 литрлік фотобиореакторда 50 мкмоль фотон м²/сек жарық астында, 25°C температурада «Air pump 350» (Қытай) қондырғысымен аэрациялау арқылы өсірілді. Гетероцисталардың жинақталуын арттыру үшін BG₀-11 қоректік ортасы қолданылды. Оптикалық тығыздығы 0,6 тең болғанда клеткалардың биомассасы «Centrifuge 5810» центрифугасы (Eppendorf, АҚШ) арқылы 5000 rpm жылдамдықта 15 минутта айналдыру арқылы жинақталып алынды. Клеткалардың өсу қарқындылығының оптикалық тығыздығы КФК-3-01 спектрофотометрімен 720 нм толқын ұзындығында өлшенді. 6 түрлі концентрациядағы суспензияның оптикалық тығыздығы дайындалды (сурет 11).



Сурет 11 – Цианобактерияларды дақылдау.

Белгілеулер: А – 200 литрлік фотобиореактор; Ә – 5 литрлік фотобиореактор; Б – 12 литр х 6 фотобиореактор; В – 20 литрлік фотобиореактор.

Құлпынайға әр түрлі цианобактериялық суспензияларды дайындау әдісі. Sunrise T-4 құлпынай сортының көшеттері 250 мл ылғал сақтағыш ыдыстағы 200 мл көлемдегі гидропоникада өсірілді. Зерттеу ұзақтығы 30 тәулікті құрады. 50 мл көлемдегі Мурасиге-Скуга қоректік ортасының үстіне 50 мл *Anabaena variabilis* R-I-5 сұйық биомассасы құйылып, 100 мл сұйықтық 6 түрлі клетка концентрациясындағы нұсқаларда дайындалды:

Бақылау 1 – азотты 100 мл Мурасиге-Скуга қоректік ортасы (+KNO₃);

Бақылау 2 – азотсыз 100 мл Мурасиге-Скуга қоректік ортасы (- KNO₃);

1-нұсқа (0,1 оптикалық тығыздық) – 50 мл азотсыз Мурасиге-Скуга қоректік ортасы+50 мл *Anabaena variabilis* R-I-5 штаммы суспензиясы – мұндағы 100 мл-дегі жалпы клетка саны 4×10^6 кл/мл құрады;

2-нұсқа (0,3 оптикалық тығыздық) – 50 мл азотсыз Мурасиге-Скуга қоректік ортасы+50 мл *Anabaena variabilis* R-I-5 штаммы суспензиясы – мұндағы 100 мл-дегі жалпы клетка саны 12×10^6 кл/мл құрады;

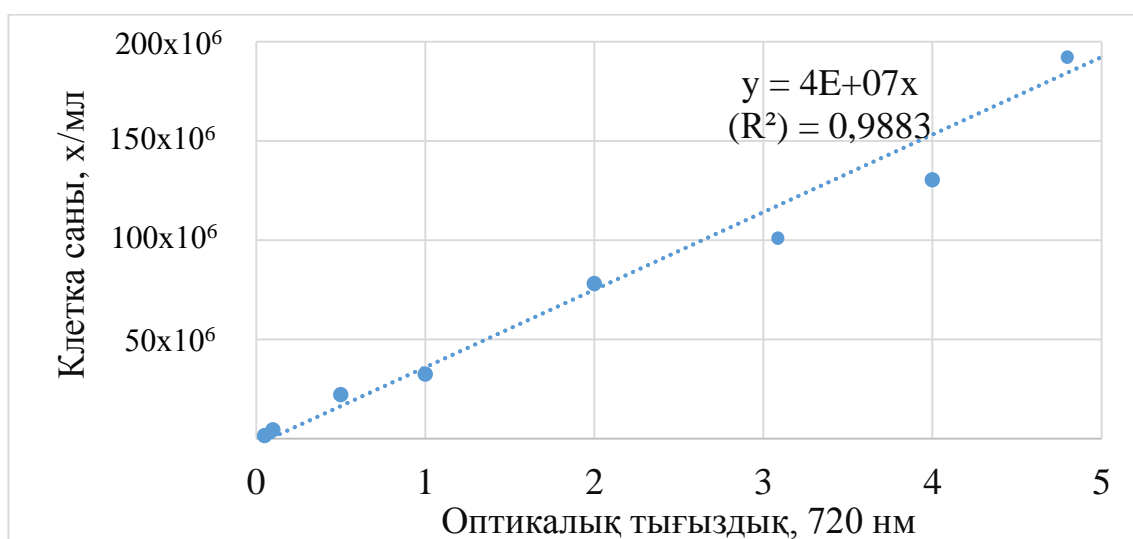
3-нұсқа (0,6 оптикалық тығыздық) – 50 мл азотсыз Мурасиге-Скуга қоректік ортасы+50 мл *Anabaena variabilis* R-I-5 штаммы суспензиясы – мұндағы 100 мл-дегі жалпы клетка саны 24×10^6 кл/мл құрады;

4-нұсқа (1,2 оптикалық тығыздық) – 50 мл азотсыз Мурасиге-Скуга қоректік ортасы+50 мл *Anabaena variabilis* R-I-5 штаммы суспензиясы – мұндағы 100 мл-дегі жалпы клетка саны 48×10^6 кл/мл құрады;

5-нұсқа (2,4 оптикалық тығыздық) – 50 мл азотсыз Мурасиге-Скуга қоректік ортасы+50 мл 2,4 оптикалық тығыздықтағы *Anabaena variabilis* R-I-5 штамы суспензиясы – мұндағы 100 мл-дегі жалпы клетка саны 96×10^6 кл/мл құрады;

6-нұсқа (4,8 оптикалық тығыздық) – 50 мл азотсыз Мурасиге-Скуга қоректік ортасы+50 мл *Anabaena variabilis* R-I-5 штамы суспензиясы – мұндағы 100 мл-дегі жалпы клетка саны 192×10^6 кл/мл құрады.

Клеткалардың саны әр түрлі оптикалық тығыздықта (0,05, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5) өлшелініп, *Excel* программасының трендік сызығын пайдалана отырып, сызғыштық өлшем арқылы 6 түрлі концентрацияның клеткаларының саны $y=4E+07x$ формуласы бойынша есептелінді. Өлшелінген оптикалық тығыздықтардың орташа ауытқу мәні (R^2)=0,9883 болды (сурет 12).



Сурет 12 – 1 мл-дегі *Anabaena variabilis* R-I-5 штамының оптикалық тығыздығының клетка санына қатынасының трендік сызығы

2.10 Күрішті өсіру және зерттеу әдістері

Күріштің құрғақ биомассасын дайындау әдісі. Құлпынай өсімдігі тәжірибе соңында топырақтан бөлініп алынып, үш рет жуылды. 70°C температурада қараңғы ортадағы «SNOL 67/350» (AB Utenos Electrotechnika) термостатында Петри табақшасының ішінде 3 тәулік бойына құрғатылды. Содан соң, құрғақ биомасса лабораториялық таразы (Clever, ҚХР) көмегімен өлшенді.

Күрішке цианобактериялық биомасса сығындысын дайындау әдісі. Көптік биомасса алу мақсатында гетероцисталы цианобактерия *Anabaena* sp. B1-4 штамы қарқынды түрде 200 литрлік фотобиореакторда 50 мкмоль фотон м²/сек жарық астында, 25°C температурада «Air pump 350» (Bony, ҚХР) қондырғысымен аэрациялау арқылы өсірілді, қалған процедуралар құлпынай көшеттерінің әдісімен бірдей болды (2.6 бөлімді қараңыз).

Күрішке әр түрлі цианобактериялық суспензияларды дайындау әдісі. Ақмаржан күріш сортының көшеттері 500 мл ылғал сақтағыш ыдыстағы гидропоникада өсірілді. Зерттеу ұзақтығы 30 тәулікті құрады. 50 мл көлемдегі Мурасиге-Скуга қоректік ортасының үстіне 50 мл *Anabaena* sp. B1-4 сұйық

биомассасы құйылып, 100 мл сұйықтық 6 түрлі клетка концентрациясындағы нұсқаларда дайындалды.

2.11 Филогенетикалық талдау әдістері

Электрофорез процедурасы үшін ДНҚ материалын дайындау. ДНҚ экстракциясы стандартты процедураларға сәйкес жүзеге асырылды [203]. Экспонентті түрде өсіп келе жатқан (70 мл) жасушалар центрифугалау арқылы түйіршікке айналдырылды және 0,5 мл лизис буфері (25% сахароза, 50 ммоль Трис-НСІ, 100 ммоль ЭДТА) қосылды. Клеткалар бөлме температурасында 25 минут ішінде 5 мг лизоциммен өңделді. $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ және протеиназа К, сәйкесінше, 1% және 100 мкг/мл соңғы концентрациясына қосылды және сынамалар 50°C температурада 1 сағат бойына инкубацияланды. ДНҚ үш рет фенол/хлороформ/изоамил спиртімен (25: 24: 1) және екі рет хлороформ/изоамил спиртімен (24:1) экстракцияланды. ДНҚ 70% этанолмен тұндырылды, 100 мкл Трис-ЭДТА буферінде қайта өңделіп және -20°C температурада сақталды. Bio-Rad 4 T100 жүйесінде полимеразды тізбекті реакциялар (ПТР) жүргізілді.

16S рРНҚ гендерін амплификациялау және филогенетикалық ағашты құру. ПТР тазартылған цианобактериялардың ДНҚ-мен жүргізілді [204]. 16S рРНҚ гендерін амплификациялау ПТР көмегімен тура және кері праймерлерді қолданып жүргізілді (кесте 4). ПТР қоспасында 10 мкл Таq (10 X) коммерциялық буфері, 10 мкл тазартылған ДНҚ (50-100 нг), әр dNTP-дан 150 мкмоль, әр праймерден 500 нг және 2,5 Таq полимераз болды. Жалпы реакция көлемі 95°C температурада 3 минут, 55°C-де 2 минут және 72°C температурада, содан соң 30°C температурадан тұратын 30 циклді құрады (95°C-та 1,5 мин, 55°C-та 2,5 мин). Аяқталу циклі 72°C-да 7 минутты құрады. ПТР өнімдері 0,5 X ТБЭ бар 1,5% (к/т) агарозды гелге қондырылды және 0,5 мкг/мл этидий бромиді бояуымен көрінді.

Кесте 4 – ПТР және секвенирлеу үшін қолданылған 16S рРНҚ универсалды праймерлері

Праймерлер		Праймер түрі
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Тура
M23f	TGGTTGATCCTGCCAGAGG	Тура
M23'f	CGTTTGATCCTGCCGGAGG	Тура
1492r	GGCTACCTTGTTACGACTT	Кері
1525r	AAAGGAGGTGATCCAGCC	Кері

Реттіліктер CLUSTAL W бірнеше реттілікті туралау бағдарламасының көмегімен тураланды [205]. Филогенетикалық ағаш, қолда бар цианобактериялы гендер тізбегін қоса, осы зерттеуде көршілес-қосылу әдісі бойынша анықталған тізбектермен бірге салынды. Бұл бағдарламада жүктемелік талдау 1000 қайта көшіру арқылы ағаш топологияларын бағалау үшін қолданылды.

2.12 Статистикалық анализ жасау

Барлық зерттеу жұмыстары 3-5 рет қайталауда жүргізілді. Нәтижелер «ANOVA» статистикалық жүйесі бойынша өңделді. Суреттерде зерттеу жұмыстарының арифметикалық нәтижелері мен олардың стандарт ауытқулары көрсетілген. Нәтижелерді талқылауға стандартты ауытқу 10% -дан аспайтын нәтижелер алынды [206].

3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛДАУ

3.1 Цианобактериялардың агробиотехнологиядағы потенциалын зерттеу

3.1.1 Цианобактериялардың таза дақылдарын бөліп алу

Фототрофты микроорганизмдердің алуан түрлілігін анықтау және азот фиксациялайтын цианобактериялардың жана түрлерін бөлу мақсатында күріш алқабынан суарудан соң күріштің өну және оруға жақын кезендерінде екі рет су, топырақ үлгілері алынды. Қызылорда облысының, Жаңақорған аудан орталығының күріш алқаптарында микробалдырлар мен цианобактериялардың алуан түрлілігін зерттеу жұмыстары фототрофты микроорганизмдердің биоалуантүрлілігіне бай екендігін көрсетті. Күріш алқаптары Жаңақорған аудан орталығының 12-15 км қашықтықта орналасқан. Сынамалар Жаңақорған аудан орталығының Сырдария өзенінің жанында орналасқан күріш алқаптарынан алынды.



Сурет 13 – Күріш алқаптарынан фототрофты микроорганизмдердің сынамаларын алу

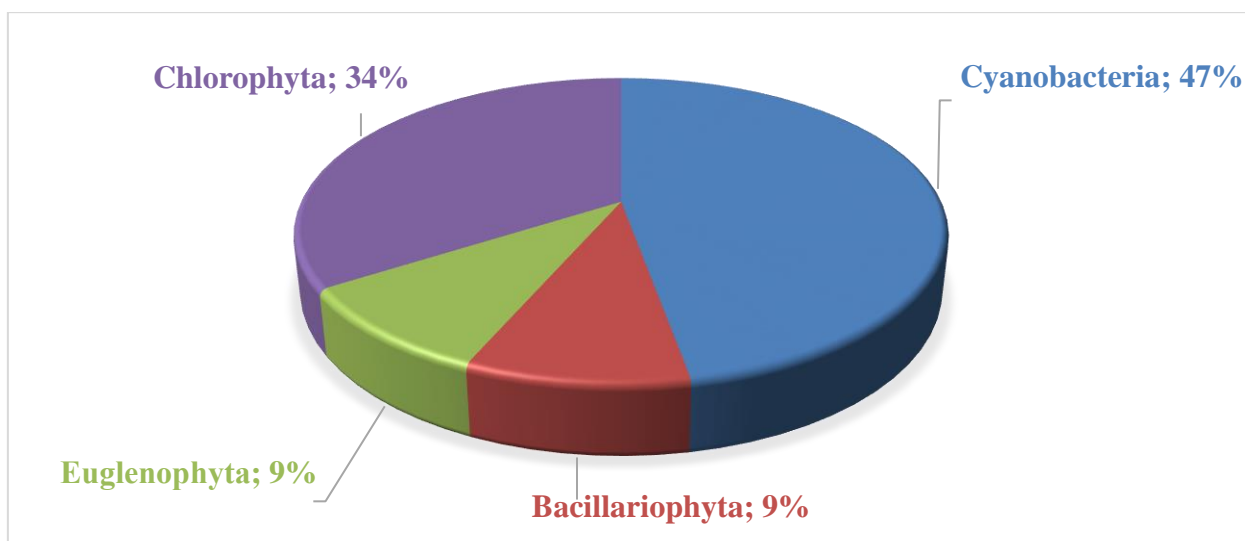
Кейбір зерттелген жерлерде жасыл және қою жасыл түстердің өзгермелі және бекітілген цианобактериялық шоғырлары байқалды. Ал, цианобактериялық шоғырлардың бетінде көптеген газ тәрізді везикулалар байқалды, ол бұл аймақтағы фотосинтез үдерісі қарқындылығының жоғары екендігін көрсетеді [207].

Ботаникалық зерттеулер бойынша 5 бөлімге, 10 классқа, 19 отрядқа, 26 тұқымдастарға және 29 тұқымға жататын фототрофты микроорганизмдердің бір-бірінен морфологиялық ерекшелігі бар 58 түрі анықталды. Зерттелген фототрофты микроорганизмдердің флорасының таксономиялық-пайыздық құрылымы келесідей болды: *Cyanobacteria* – 25 (47%), *Bacillariophyta* – 5 (9,4%), *Euglenophyta* – 5 (9,4%), *Chlorophyta* – 18 (33,9%) (сурет 14).

Зерттелінген аймақтардағы фототрофты микроорганизмдердің тіршілік етуі маусымға байланысты екендігін айта кету керек. Күріштердің өнуінің аяқталу фазасында барлық зерттеу аймағында *Chlorophyta* бөліміне жататын микробалдырлардың түрлері басымдық танытып, судың беткі қабатында ашық-

жасыл түсті қабатты құрады, ал күріштердің жетілген кезінде (өсудің 2-3 айларында) *Cyanobacteria* бөліміне жататын келесідей түрлердің басымдылық танытқаны тіркелді: *Cylindrospermum sp.*, *Nostok pruniforme*, *Microcystis pulverea*, *Merismopedia elegans*, *Gloeocapsa minuta*, *Stranonostoc linkia*, *Anabaena variabilis*, *Oscillatoria limosa*, *Spirulina major*, *Phormidium ambiguum*. Chlorophyta бөліміне жататын келесідей микробалдырлар активті тіршілік ететіні анықталды: *Ankistrodesmus spiralis*, *Auxenochlorella protothecoides*, *Botryococcus braunii*, *Bracteacoccus sp.*, *Chlorella sp.*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorobotrys regularis*, *Chlorococcum infusionum*, *Choricystis sp.*, *Coccomyxa gloeobotrydiformis*. Bacillariophyta бөліміне жататын келесідей микробалдырлар активті тіршілік ететіні анықталды: *Navicula sp.*, *Asterionellopsis glacialis*, *Psammodictyon sp.*, *Gomphonema sp.*, *Cyclotella cryptica*. Euglenophyta бөліміне жататын келесідей микробалдырлар активті тіршілік ететіні анықталды: *Discoplastis*, *Lepocinclis*, *Cercaria viridis*.

Олар күріш түбінде және су бетінде, күріш пен арамшөптердің жапырақтары мен сабақтарында және қураған күріштердің сабақтарында көптеп кездеседі. Зерттеу жүргізу барысында цианобактерияларға қарағанда микробалдырлардың түрлері күріштің жетілу барысында доминанттылық танытуымен сипатталды.

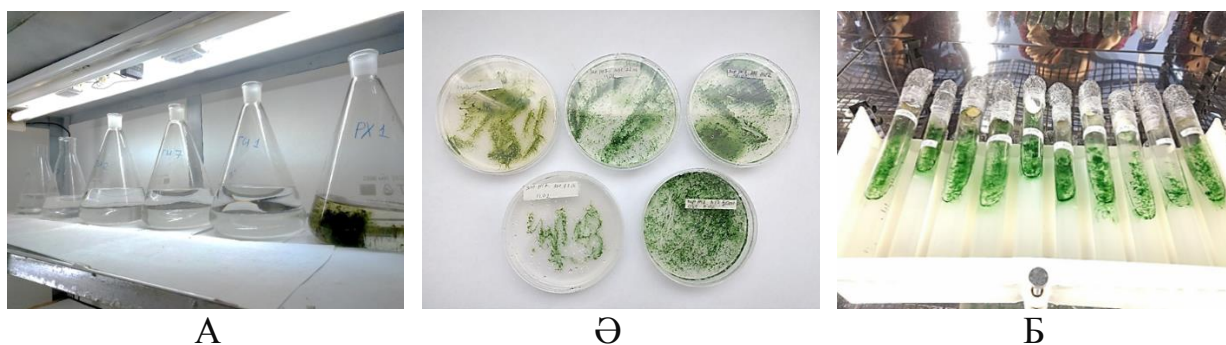


Сурет 14 – Күріш алқабының цианобактерияларының таксономиялық пайыздық кездесуі

Алынған топырақ және су сынамаларын бірнеше рет қайталап егу арқылы фототрофты микроорганизмдердің 18 жинақы дақылы бөлініп алынды. Олардың ішінен 13 цианобактерия түрі әрі қарай альгологиялық таза дақыл алу үшін таңдалынып алынды. Жүргізілген жұмыстардың нәтижесі бойынша 6 микробалдырлар мен цианобактериялардың альгологиялық таза дақылдары бөлініп алынды.

Келесі кезекте цианобактериялардың бактериологиялық таза дақылдарын бөліп алу жұмыстары жүргізілді. Алынған альгологиялық дақылдардан таза

бактериологиялық түрлерді бөліп алу үшін «Зерттеу материалдары мен әдістері» бөлімінде көрсетілген микробиологиялық әдістер қолданылды. Заррука, BG-11, BG₀-11 және Громов сұйық және агарланған қатты орталарында, Петри табақшалары мен құтыларда бактериялогиялық таза дақыл алу жұмыстары жүгізілді. Цианобактериялардың бөлініп алынған дақылдары қайтадан сұйық ортаға немесе қиғаш агарға егілді. Пайдаланылған қоректік орталар тек қана цианобактериялардың түрлерін өсіруге арналғандықтан, оларды басқа да фототрофты микроорганизмдерден бөліп алу қиындық тудырмады (сурет 15).



Сурет 15 – Фототрофты микроорганизмдердің таза дақылын бөліп алу кезеңдері.

Белгілеулер: А – сынамаларды жарықтың астында адаптациялау; Ә – агарлы ортада таза дақыл бөліп алу; Б – бөлініп алынған дақылдарды сақтау.

Бактериялогиялық таза дақылдарды алу барысында алдын ала берілген стандартты протоколдарға дақылдардың жеке сипаттамаларының болуына байланысты біршама өзгерістер енгізілді. Жекелеген таза дақылдарды бөліп алу «қиғаштау» әдісімен жүзеге асты. Сынаманың аз мөлшері микробиологиялық ілмекпен алынды, содан кейін қоректік ортаға егілді. Біріншіден, тәжірибелерде цианобактерия клеткаларының саны көп болды, алайда, цикл жалғасқан сайын клеткалар саны азайды. Петри табақшасында колониялар өсуі басталғанға дейін инкубацияланды.

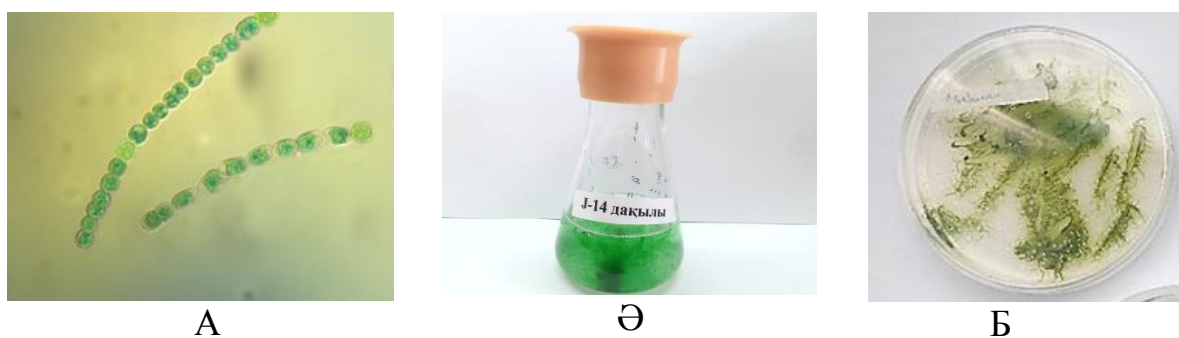
Цианобактерияларды бактериялардан «Бонд» әдісімен тазарту да қажетті нәтиже бермеді, өйткені, әдіс цианобактерияларды бактериялардың колониясынан механикалық түрде бөлуге негізделген. *Anabaena* жіпшелі цианобактерияларын «қараңғы-жарықта» оқшаулау әдісімен бөлініп алынды. Ал, антибиотиктерді пайдалану арқылы тек бір ғана дақылды бөліп алдық, себебі, цианобактериялар Грам теріс бактерия болғандықтан олардың клетка қабықшасы өте жұқа болып келеді және ол антибиотиктерден қорғамайды.

Жоғарыда көрсетілген әдіс-тәсілдерді пайдаланудың нәтижесінде цианобактериялардың ілеспе бактериялардан тазартылған 5 штамы бөлініп алынды. Барлық цианобактериялық дақылдардың бактериялогиялық тазалығы LB қоректік ортаға егу арқылы тексерілді. Бөлініп алынған таза альгологиялық дақылдар биомасса алу мақсатында қолдан жасалынған құрылғыда стерильді түрде өсірілді, алынған биомасса ПТР анализ жұмыстарына пайдаланылды.

Жұмысымыздың мақсаты цианобактериялардың азот фиксациялаушы штамдарын іздеу және зерттеу болғандықтан, көбіне жіпшелі цианобактерияларды бөліп алу жұмыстары жүргізілді. Сонымен қатар, бөлініп алынған дақылдардың атаулары бөлініп алынған аймақтың қысқарған әріптерімен және сынамалардың алынған нөмерлері бойынша аталды. Зерттеу жұмысында барлық дақылдар жіпшелі цианобактериялар болды.

Бөлініп алынған нұсқаларды микроскопиялық зерттеу барысында морфологиялық ерекшеліктері бойынша *Nostocales* қатарына жататыны анықталынды. Ал, жалғыз *Oscillatoria* Sh-11 түрі *Oscillatoriales* қатарына жататыны анықталды.

Бөлініп алынған дақылдардың айрықша ерекшелігі – өсірудің 8-12-ші тәуліктерінде ортада азот көзі болмағанда терминальды және интеркалярлық гетероцисталардың пайда болуында болды, гетероцисталар мен акинеттердің мөлшері вегетативті жасушалармен салыстырғанда бірнеше есеге жоғары болды. Төменде әр бөлініп алынған дақылдың сипаттамалары келтірілген.



Сурет 16 – Күріш алқабынан бөлініп алынған альгологиялық және бактериялогиялық таза *Nostoc* J-14 дақылының микросуреті, «А» суреті 100 есе үлкейтілген.

Белгілеулер: А – клетка, Ә – сұйық ортада өсіру, Б – қатты ортада өсіру.

Nostoc J-14 дақылы. Жіп тәрізді цианобактериялар. Трихомалары бар, түзу, көк-жасыл сфералық вегетативті жасушалардан тұрады (ұзындығы 6-8 мкм, ені 3-5 мкм), ұштары тарылмаған және бөлгіш жерлерде айқын тармақталған. Көп жағдайда гетероцисталар интеркалярлы, жалғыз, ашық-қоңыр түсті болып келеді. Акинеттер сирек кездеседі, сопақша, олардың өлшемдері вегетативті жасушалардан өзгеше болады, олар түйіршікті болып келеді және гормогониялы түрде көбейеді. Дақылдың белгілері: Аллен, Громов, Больд және BG-11 орталарында 23-25°C температурада жақсы өседі, қолайлы өсу рН көрсеткіші – 6.5-7. Сонымен бірге, қатты және сұйық қоректік ортада, құтының түбінде пленка түрінде өсуге бейімделген. Ескі дақылдарда немесе азот азайтылған ортада гетероцисталар мен акинеттің дамуы байқалады. Жүйелік позициясы бойынша дақыл цианобактериялар тобына, *Hormogoneae* класына, *Nostocales* отрядына, *Nostoc* тұқымына, *Nostoc* түрлеріне жатады (сурет 16).



Сурет 17 – Күріш алқабынан бөлініп алынған альгологиялық және бактериялогиялық таза *Cylandrospermum* J-8 дақылының микросуреті, «А» суреті 100 есе үлкейтілген.

Белгілеулер: А – клетка, Ә – сұйық ортада өсіру, Б – қатты ортада өсіру.

Cylandrospermum J-8 дақылы. Жіп тәрізді цианобактериялар. Жасуша ұзындығы 72 мкм дейінгі түзу, еркін тармақталған, әлсіз қозғалмалы трихомалардан тұрады, трихоманың көбінде бір-бірімен байланысқан 30-ға жуық жасушалары бар. Цилиндр немесе бөшке тәрізді изодиометриялық 1,8-6,8x2,3-4,3 мкм болатын жасушалардан тұрады. Трихоманың жасушалары ашық, көк-жасыл, біркелкі, түйіршіктелмеген. Гетероцисталары біркелкі, бір полярлы, шар тәрізді немесе ұзартылған, сары-жасыл түсті, мөлшері 3-5,9 x 2,3-3,2 мкм құрайды. Акинеттер, әдетте, цилиндр тәрізді, сопақша, үлкен өлшемді (5,1-7,7 x 2,6-3,4 мкм), ашық қоңыр, сары түсті, түйіршікті және гетероцисталармен іргелес орналасады. Кейде трихоманың бір ұшында екі акинет болады. Жасушаның екіге бөлінуі арқылы бір жазықтықта көбейеді. Дақылдың сипаттамалары: қатты ортада алдымен жасыл, содан кейін қоңыр түске боялған колониялар түзіледі. Олар 23-28°C температурада, Аллен мен Больд ортасында жарықта, ортаның бастапқы рН-7,1-де жақсы өседі. Ескі дақылдарда (өсірудің 2-3 айында) гетероцисталар мен акинеттердің түзілуі байқалады. Филогенетикалық жүйе бойынша дақыл *Hormogoneae* класына *Nostocales* отрядына, *Cylandrospermum* түріне жатады (сурет 17).



Сурет 18 – Күріш алқабынан бөлініп алынған альгологиялық және бактериялогиялық таза *Anabaena* B1-4 дақылының микросуреті, «А» суреті 100 есе үлкейтілген.

Белгілеулер: А – клетка, Ә – сұйық ортада өсіру, Б – қатты ортада өсіру.

Anabaena В1-4 дақылы. Жіп тәрізді цианобактерия, шырышты қабығы бар. Трихомалары салыстырмалы параллель орналасқан гомоцитті, дара, түзу, унисериальді, қою көк-жасыл формалы болып келеді. Трихомалардың белсенді қозғалысы байқалмайды, бірақ, трихомалардың ұштары тербеліп тұрады. Клетканың ені 2,6-5 мкм, яғни, ұзындығынан 2-3 есе қысқа. Дақыл тек жасушалардың екіге бөлінуі арқылы және бір жазықтықта ғана көбейеді. Дақылдың ерекшеліктері: сұйық ортада клетка биомассасының суспензиясы көк-жасыл түсті, оңай қозғалады, аморфты тұнбаға тез айналуы байқалады. Дақыл сыртқы орта жағдайына және жыл мезгіліне қарамастан дамиды және өсу кезінде аксеникалық қасиетін жоғалтпайды. Громов ортасында бөлініп алынды, Аллен және ВГ-11 қоректік орталарында жақсы өседі. Громовтың агарлы ортасының бетінде трихомды жіптердің көк-жасыл тоғысуы пайда болды. Громов ортасында өсірудің оңтайлы шарттары 23-25°C инкубациялық температура, рН-6,5-7 көрсеткішін құрады. Жүйелік позициясы бойынша олар цианобактериялар тобына, *Hormogoneae* класына, *Nostocales* отрядына, *Nostocaceae* тұқымдасына, *Anabaena* тұқымына жататыны белгілі болды (сурет 18).

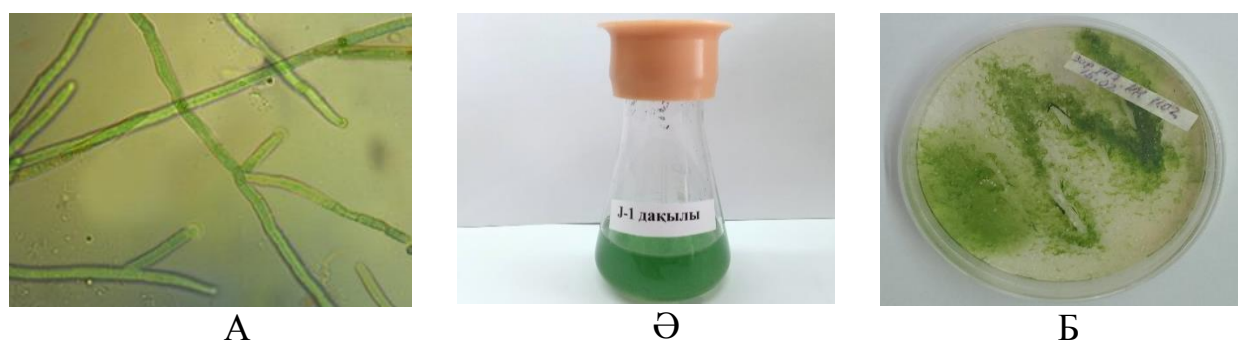


Сурет 19 – Күріш алқабынан бөлініп алынған альгологиялық және бактериялогиялық таза *Anabaena* К-31 дақылының микросуреті, «А» суреті 100 есе үлкейтілген.

Белгілеулер: А – клетка, Ә – сұйық ортада өсіру, Б – қатты ортада өсіру.

Anabaena К-31 дақылы. Жіпшелі цианобактериялар. Трихомалары көбінесе бір-біріне шатасып орналасады, ал жалғыз трихомалар сфералық жасушалардан тұрады. Олардың арасында гетероцисталар сирек кездеседі және әр жерінде акинеттер кездеседі. Трихомалардың ұштары тарылмаған, ал қабырғаларында азды-көпті терең тарылулары бар, шырышты қабықшалармен жабылған. Жасушалар цилиндр тәрізді, бөшке тәрізді немесе шар тәрізді, ақшыл немесе ашық көк-жасыл болып келеді. Құрамында газ көпіршіктері (вакуольдер) бар немесе газ көпіршіктері аз, бірақ, кейде түйіршіктелген болады. Терминальді жасушалары аздап созылған, вакуольденбеген. Гетероцисталар – бұл аралық, жалғыз, бір-бірінен белгілі бір қашықтықта орналасқан, сопақша, кейде шар тәрізді жасушалар вегетативті жасушалардан үлкен болып келеді. Гетероцисталардың дамуы қоректік ортаның құрамындағы химиялық элементтердің азаюы кезінде өсірудің 8-15-ші тәулігінде байқалды. Акинеттер –

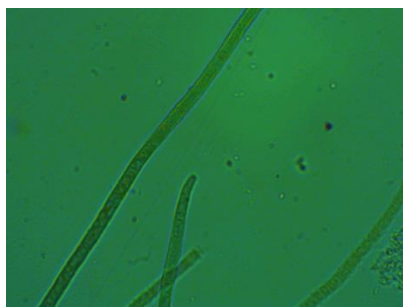
гетероцисталарға жақын орналасқан сфералық, жалғыз клеткалар. Олар белгілі бір реттілікпен вегетативті клеткалардың арасынан көбейеді. Дақылдың ерекшеліктері: қатты ортада шырышты колониялар, сұйық ортада шырышты аморфты плексус пайда болады, тұнбаға түседі, колбалардың қабырғалары өсіндіге айналады. BG-11 қоректік ортасында бөлініп алынды және Аллен, Болд, Чу-10 қоректік орталарында жақсы өседі. Гетероцисталардың дамуы ортаның химиялық заттары азаю кезінде, өсірудің 8-15-ші тәулігінде байқалды. Осы ортадағы оңтайлы өсу 22-25°C температурада болды. Ол цианобактериялар тобына, *Hormogeneae* класына, *Nostocales* отрядына, *Nostocaceae* тұқымдасына, *Anabaena* туысына жатады (сурет 19).



Сурет 20 – Күріш алқабынан бөлініп алынған альгологиялық және бактериялогиялық таза *Tolypothrix* J-1 дақылының микросуреті, «А» суреті 100 есе үлкейтілген.

Белгілеулер: А – клетка, Б – сұйық ортада өсіру, В – қатты ортада өсіру.

Tolypothrix J-1 дақылы. Жіпшелі цианобактериялар. Жасушалар ұзындығы 68-74 мкм дейін жетеді, түзу, кей жерлерде аздап қисық, қозғалмайтын трихомалар түзеді. Сонымен бірге, гетероцисталар түзілетін жерлерде жиі пайда болатын трихомалардың жалған тармақталуы салдарынан бұталар (бұталар түрінде өсу) байқалады. Трихомалардағы жасушалар көбінесе цилиндр тәрізді, изодиометриялық, мөлшері 1,3-3,2 мкм құрайды. Трихоманың жасушалары ашық, жасыл, біртектес және түйіршікті емес. Гетероцисталары – бұл аралық, шар тәрізді немесе ұзартылған, сары-жасыл, мөлшері 3-5,9 x 2,3-3,2 мкм болатын клеткалар. Акинеттің түзілуі байқалмады. Жасушалары тек бір жазықтықта екіге бөліну арқылы көбейеді. Дақылдың сипаттамалары: қатты ортада олар сары-жасыл колониялар түзеді. Олар 25-28°C температурада жақсы өседі, жарықта BG-11, Аллен, Болд қоректік орталарында бастапқы рН-7 көрсеткішінде өседі. Таксономиялық тобы бойынша олар *Hormogeneae* класының цианобактериялары, *Nostocales* отрядына, *Scytonemataceae* тұқымдасы, *Tolypothrix* туысына жатады (сурет 20).



А



Ә

Сурет 21 – Күріш алқабынан бөлініп алынған альгологиялық таза *Oscillatoria* Sh-11 дақылының микросуреті, «А» суреті 100 есе үлкейтілген.

Белгілеулер: А – клетка, Ә – сұйық ортада өсіру.

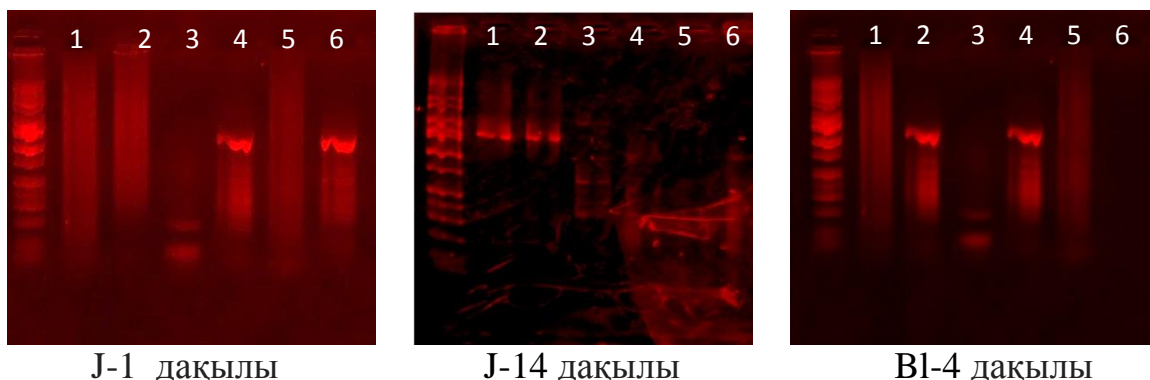
Oscillatoria Sh-11 дақылы. Жіпшелі цианобактериялар. Жасушалар ұзындығы 10-25 мкм дейін жетеді, тұзу, бір-біріне жабысқан вегетативті клеткалардан тұрады. Сонымен бірге, гетероцисталардың орнына клетка соңында азот жетіспеген жағдайда трихомалар түзілуі мүмкін. Трихомалардағы жасушалар көбінесе цилиндр тәрізді, изодиометриялық, мөлшері 1,1-1,4 мкм құрайды. Трихоманың жасушалары ашық, біртектес және түйіршікті емес болып келеді. Дақылдың сипаттамалары: қатты ортада жақсы өспейді, көк-жасыл колониялар түзеді. Олар 21-26°C температурада қарқынды өседі, жарықта BG-11, Аллен, Болд қоректік орталарында бастапқы рН-7.4 көрсеткішінде дақылданады. Таксономиялық байланысы бойынша олар *Hormogoneae* класының цианобактериялары, *Oscillatoriales* отрядына, *Oscillatoriaceae* тұқымдасы, *Oscillatoria* туысына жатады (сурет 21).

Күріш алқабынан бөлініп алынған штамдар әл-Фараби атындағы ҚазҰУ биотехнология кафедрасының биотехнология зертханасындағы «ССМҚазНУ» микробалдырлар мен цианобактериялар коллекциясында сақталынды.

3.1.2 Бөлініп алынған цианобактериялардың дақылдарын идентификациялау

Алдын ала анықтауыштарды пайдаланып анықталған дақылдардың филогенетикалық ағашын жасау мақсатында ПТР арқылы жұмыстар жүргізілді. Алынған алынған *Nostoc* J-14, *Anabaena* B1-4, *Tolypothrix* J-1 дақылдарын амплификациялау үшін 16S рРНҚ универсалды праймерлері пайдаланылды.

Жүргізілген жұмыстар әдістер мен материалдар бөлімінде келтірілген протоколдар арқылы жасалынды. 16S рРНҚ универсалды праймерлерін 6-нұсқада пайдалана отырып төмендегі электрофорездік суреттері алынды (сурет 22).



Сурет 22 – Электрофорез геліндегі бөлініп алынған дақылдардың әр түрлі праймерлер жұптарының амплификациялық өнімдері.
 Белгілеулер: 1 – 27f-1492r, 2 – 27f-1525r, 3 – M23f-1492r, 4 – M23f-1525r, 5 – M23'f-1492r, 6 – M23'f-1525r

Жұмыс барысында J-1 дақылы M23f-1525r, M23'f-1525r, J-14 дақылы 27f-1525r, M23f-1525r, B1-4 дақылы 27f-1492r, тура және кері праймерлерлік жұптарда амплификацияланды. Sh-11, J-8, K-31 дақылдары ешқандай универсалды праймерлермен амплификацияланбады. Оған себеп – дақылдардың клеткалары агарлы ортада таза болып өспеуі және бактериологиялық таза дақылы алынбауы болуы мүмкін. ДНҚ құрамын тазарту мақсатында қосымша «ДНҚ-ны тазалау киттері» қолданылды.

Бөлініп алынған штамдардың молекулалық идентификациясын жасау үшін әр түрлі ұзындықтағы ДНҚ фрагменттері алынды (1354, 1285, 1282 н.т.). Бұл ДНҚ фрагменттері универсалды праймерлермен (27f, M23f, M23'f, 1492r, 1525r) амплификацияланып, ұқсас тізбектері BLAST онлайн (<http://www.NCBI.nlm.nih.gov/>) дерекқорында анықталынды.

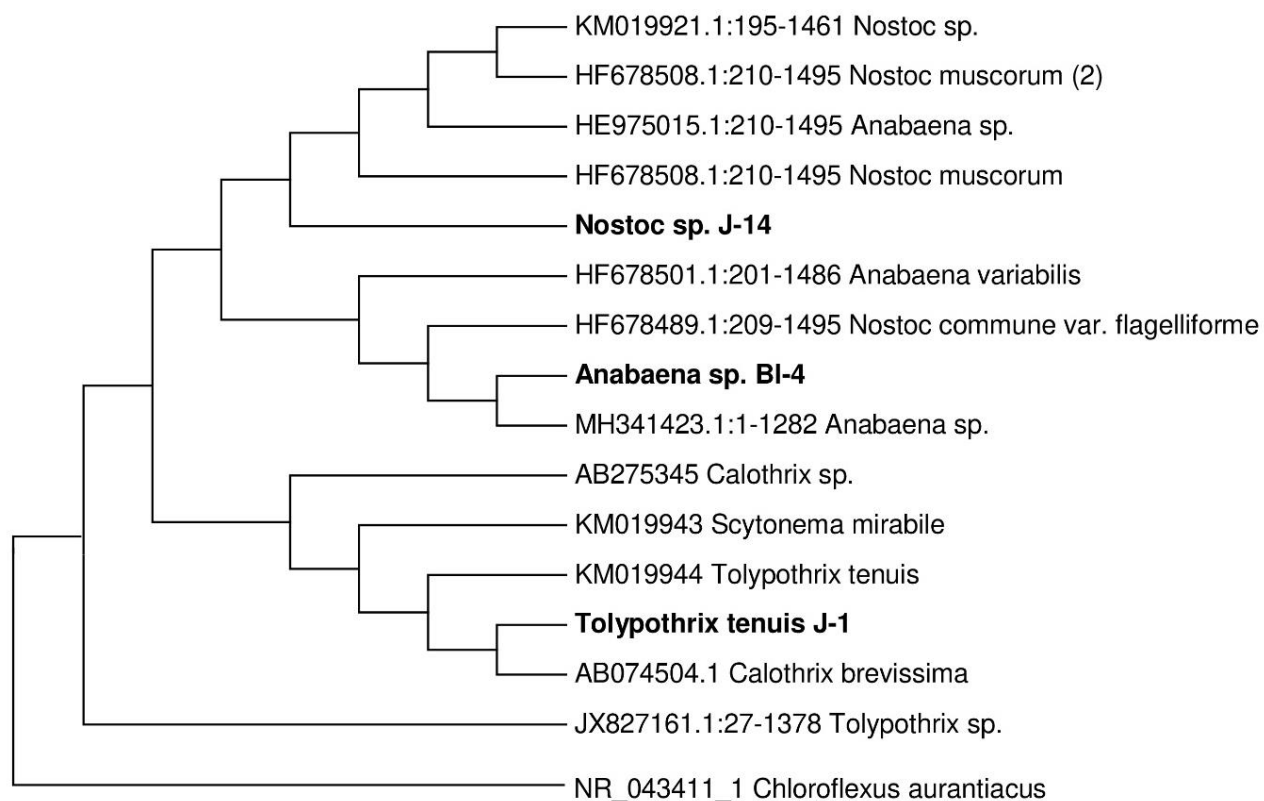
GenBank деректер базасында алынған ампликон тізбектерін іздеуде универсалды праймерлер қолданылғаны байқалды.

Алынған деректерде үлкен ұқсастығы бар тізбектің 13 жазбасы алынды және MUSCLE бағдарламасының көмегімен бірнеше рет туралау жүргізілді. Филогенетикалық ағаш эволюциялық қашықтыққа негізделген MEGA 6-бағдарламалық жасақтаманың көмегімен салынды, олар Kimura-2-Parameter алгоритмі негізіндегі Neighbor-Joining әдісі арқылы есептелді. Ағаш топологияларын статистикалық бағалау 1000 қайталанған сынақтармен жүктеуді талдау көмегімен жүзеге асырылды [208].

Chloroflexus aurantiacus штамы (NR_013411_1) сыртқы топ ретінде пайдаланылды. 23-суретте көршілес штамдардың филогенетикалық ара-қатынасы және таксондарды дәйектілікпен салыстыру негізін көрсететін ағаш топологиясы көрсетілген.

Филогенетикалық ағаш үш негізгі кластерден және бір топтан тұрады, олардың әрқайсысында негізінен *Anabaena*, *Nostoc*, *Tolypothrix* түрлерінің әр түрлі өкілдері келтірілген. Секвенирлеуден кейін J-14 штамында 1285 н.т. анықталды. Фенограмма көрсеткендей, J-14 штамы *Nostoc muscorum* (балл = 2368; иден. = 99,92%), *Anabaena* sp. (балл = 2335, идентификация = 99.92%),

Nostoc sp. (балл = 2368, идентификация = 99,92%) түрлеріне жақындық танытты. Бұл жерде біз *Nostoc* sp. J-14 штамының бірнеше штамға филогенетикалық жақындығын байқағанымызбен, морфологиялық тұрғыдан негізінен *Nostoc* түріне жататыны анықталынды.



Сурет 23 – Бөлініп алынған цианобактерия штамдары мен көршілес түрлердің филогенетикалық ағашы

B1-4 түріндегі филогенетикалық талдау үшін 1282 нуклеотидтік тізбектер қолданылды. Бүкіл тізбекті жобалау үшін екі қосымша праймер пайдаланылды, ол әмбебап праймерлердің көмегімен алынған тізбектелу нәтижелері негізінде 18-20 нуклеотидтік тізбектен жасалды. Tm мәндері 56-66°C аралығында болды. B1-4 штамының *Anabaena* sp. (MH341423) штамына 100,00% жақын екендігі анықталды. Сонымен қатар, мұнда *Nostoc commune* var. *flagelliforme* (балл = 2368, иден. = 99,46%) және *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (балл = 2338, иден. = 99,53%) штамы да зерттелген штаммен генетикалық ұқсастық көрсетті.

J-1 штамы *Calothrix brevissima* түріне 99,33% жақындықты көрсетті (балл = 2451), ал *Tolypothrix tenuis* пен *Scytonema mirabile* сәйкесінше 99,48% және 99,41% ұқсастығын көрсетті. Морфологиялық зерттеулер бұл штамның *Tolypothrix* түріне жақын екенін көрсетеді. Секвенирлеу арқылы алынған 1354 нуклеотидтік тізбектер екі қосымша праймерлерді қосып пайдалана отырып алынды.

Зерттеу нәтижесі бойынша филогенетикалық талдау негізінде 3 түрдің генетикалық анализі (J-14, B1-4, J-1) жүргізіліп, олардың жақын топтары анықталып, филогенетикалық ағаштары құрылды.

3.1.3 Бөлініп алынған цианобактериялардың штамдарының нитрогеназа белсенділігін зерттеу

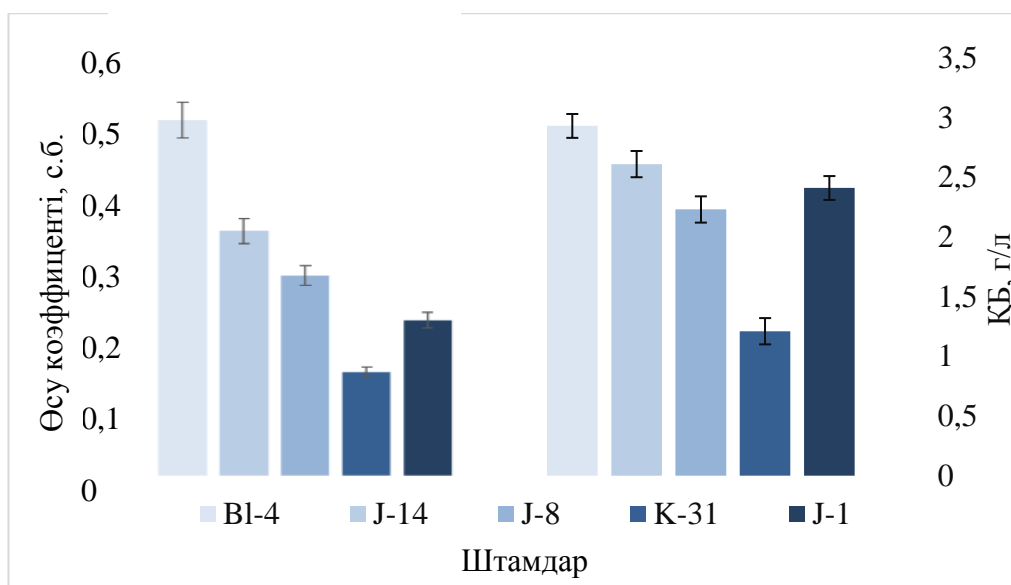
Ацетилен тотығуы негізіндегі нитрогеназа белсенділін анықтау – бөлініп алынған микроорганизмдердің азотты фиксациялау қабілеттілігін көрсететін ең маңызды әдіс болып табылады. Ауадағы азотты фиксациялауға қабілетті микроорганизмдер (*Azotobacter*, *Cyanobacteria*) ацетиленді (C_2H_2) этиленге (C_2H_4) айналдырады [209]. Молекулалық азот пен ацетиленнің қалпына келу үдерістері ұқсас болғандықтан, олар азот фиксациясын зерттеу үшін кеңінен қолданылады. Газ хроматограф виалының ішінде N_2 және C_2H_2 газдары бір уақытта болса, онда ацетилен алдымен көміртек атомына электронды жақындықтың болуына байланысты азаяды. Сондықтан, тәжірибе барысында анаэробты жағдай (азотсыз, оттексіз, көміртексіз) тудыру маңызды болып саналады [210].

Нитрогеназа ферменті негізінде азотты фиксациялау белсенділігі прокариоттар арасында кең таралған. Нитрогеназа ферментінің құрамында темір-молибден кофакторы ($FeMoCo$) түрінде молибден орналасқан [211]. Мо иондарының тапшылығы жағдайында *Azotobacter vinelandii* екінші альтернативті нитрогеназаны белсендіреді деген жорамалдар бар. Қазірде екінші альтернативті нитрогеназаның *Azotobacter vinelandii* штамында кездесетіні және олардың біреуінің құрамында ванадий кофакторы бар және біреуінде Mo және V жоқ, тек Fe -де болатын кофакторлар ғана кездесетіні туралы ақпараттар бар [210, 211].

Азотсыз ортадағы дақылдардың өнімділігін анықтау үшін BG_0-11 (азот көзін қоспай) қоректік ортасы қолданылды және өсу жылдамдығының коэффициенті мен құрғақ биомасса шығымы анықталынды. Нәтижелер 24-суретте келтірілген.

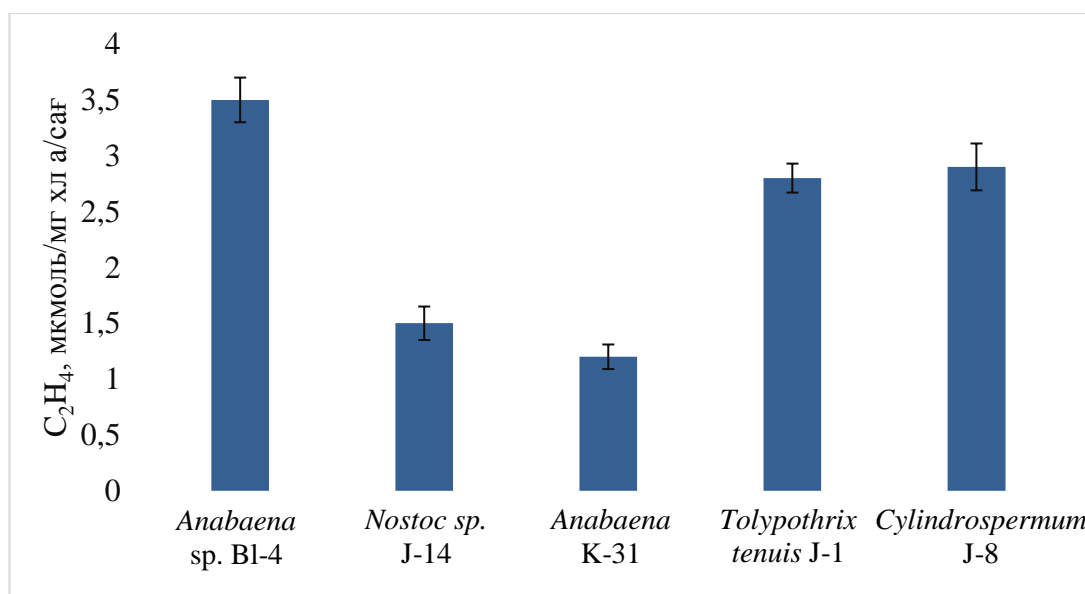
Жалпы, зерттелген штамдардың барлығы азотсыз ортада өсу қабілетіне ие болғандығын атап өткен жөн. Өсіру кезінде зерттелген штамдардың өсу коэффициенті әртүрлі мәндерге ие болды, ең белсенді өсу *Anabaena* өкілдерінде байқалды. Эксперименттің соңында *Anabaena* sp. B1-4, *Tolypothrix tenuis* J-1 және *Nostoc* sp. J-14 штамдарының құрғақ биомассаның шығымы, сәйкесінше, $2,93 \pm 0,1$ г/л, $2,61 \pm 0,1$ г/л және $2,41 \pm 0,11$ г/л болды.

Жүргізілген жұмыстың мақсаты – азотфиксациялаушы цианобактериялардың нитрогеназа белсенділігін анықтау. Жаңақорғанның аудан орталының күріш аймағынан бөлініп алынған 5 түрлі цианобактериялық штамдардың жоғары нитрогеназа белсенділігін анықтау мақсатында зерттеу жұмысы жүргізілді. Күріш алқабынан бөлініп алынған штамдар анаэробты жағдайда 24 сағат бойына жарықтың астында дақылданып, газ хроматографта бөлініп шыққан этиленнің көлемі анықталды (сурет 25). Алынған газ хроматограф нәтижелері көрсеткендей, барлық гетероцисталы цианобактериялардың штамдары ацетиленді ортада нитрогеназа белсенділігін көрсетті.



Сурет 24 – Азотсыз ортада цианобактериялардың бөлініп алынған дақылдарының өнімділігін анықтау нәтижелері

Бөлініп алынған дақылдардың азотты фиксациялау белсенділігі екі жолмен зерттелді: штамдардың нитрогеназа белсенділігі азотсыз ортадағы дақылдардың өнімділігімен және ацетилен әдісімен анықталды.



Сурет 25 – Бөлініп алынған цианобактерия дақылдарының нитрогеназа белсенділігін зерттеу нәтижелері

Алынған нәтижелер азотсыз ортадағы *Nostocales* қатарының өкілдерінің әр түрлі азот фиксациялау қабілеттіліктерін көрсетеді. *Anabaena* sp. B1-4 және *Tolypothrix tenuis* J-1 штамдарының клеткалары зерттелген штамдар арасында ең жоғары өнімділікті көрсетті.

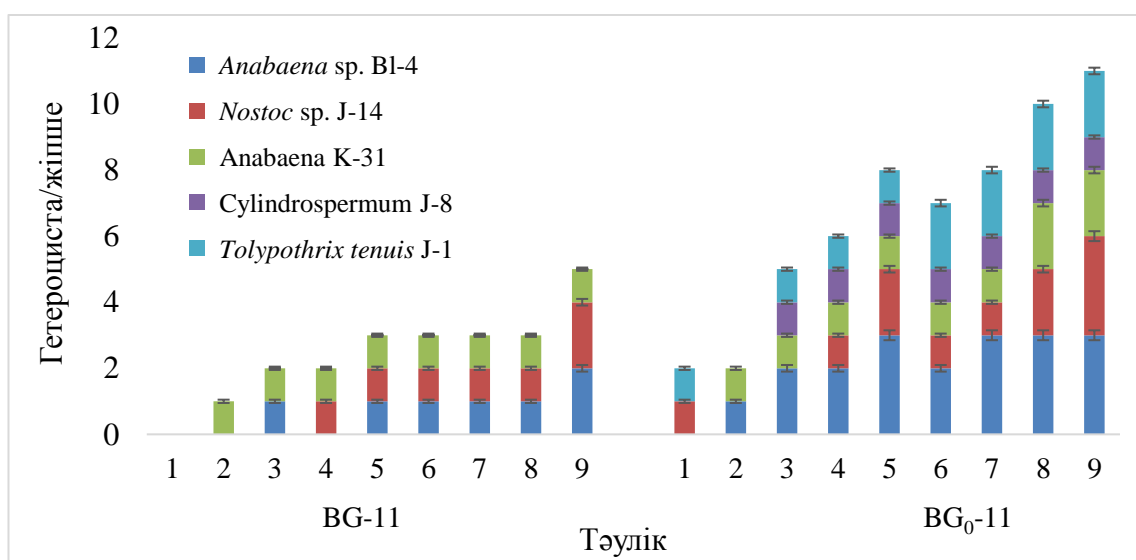
Осылайша, бөлініп алынған 5 цианобактерия штамдарының нитрогеназа белсенділігі зерттелінді. Бақылау ретінде алынған гетероцистасыз *Synechocystis*

sp. PCC 6803 цианобактерия штамымен газ тәрізді этиленнің тотығуы байқалмады.

Газ хроматограф нәтижелері гетероцисталы цианобактериялардың барлық штамдары ацетилендік ортада нитрогеназа белсенділігін көрсететіндігін тіркеді. Алынған нәтижелер бойынша, күтілгендей, зерттелген түрлердің арасында K-31 дақылы (*Anabaena*) салыстырмалы түрде төмен этилен мөлшері ($1,2 \pm 0,11$ мкмоль этилен/мг хл а/сағ) жиналды, ал *Anabaena* sp. B1-4 штамында этиленнің жоғары мөлшері болды ($3,5 \pm 0,2$ мкмоль этилен/мг хл а/сағ). Сонымен қатар, *Nostoc* sp. J-14 штамдары ($1,5 \pm 0,5$ мкмоль этилен/мг хл а/сағ) және *Tolypothrix tenuis* J-1 ($2,8 \pm 0,13$ мкмоль этилен/мг хл а/сағ) штамдары салыстырмалы түрде жақсы нәтиже көрсетті. J-8 дақылы үшін бұл көрсеткіш $2,9 \pm 0,21$ мкмоль этилен/мг хл а/сағ құрады (сурет 25).

Осылайша, *Anabaena* sp. B1-4, *Nostoc* sp. J-14 және *Tolypothrix* J-1 штамдарымен жоғары азот фиксациялау қабілеттілі тіркелінді. Жүргізілген тәжірибелер негізінде цианобактериялардың барлық бөлініп алынған штамдарының әр түрлі деңгейде азотты фиксациялау қабілеті бар екендігі анықталды.

Келесі зерттеу жұмысы тек гетероцисталы цианобактериялармен BG₀-11 қоректік ортасында жүргізілді. Әр тәулік сайын бір жіпшедегі вегетативті клеткалардың (ВК) арасында өсіп шыққан гетероцисталы клеткалардың (ГК) саны тіркелініп отырылды. Барлық дақылдарда азотты және азотсыз орталарда өсу қарқындылығы төмендегеніне қарамастан гетероцисталардың саны жоғарылағаны байқалды.



Сурет 26 – Цианобактериялардың белсенді штамдарының екі түрлі қоректік ортада өскен гетероцисталы клеткалардың саны

Азотсыз ортада жүргізілген жұмыста 1 апта өткен соң гетероцисталы клеткалардың бір аймақтағы шоғырға жиналуы байқалды. Қоректік ортада азоттың жетіспеушілігінен вегетативті клеткалардың өлуі байқалып, гетероцисталы клеткалар тобы пайда болды. BG-11 қоректік ортасында өскен

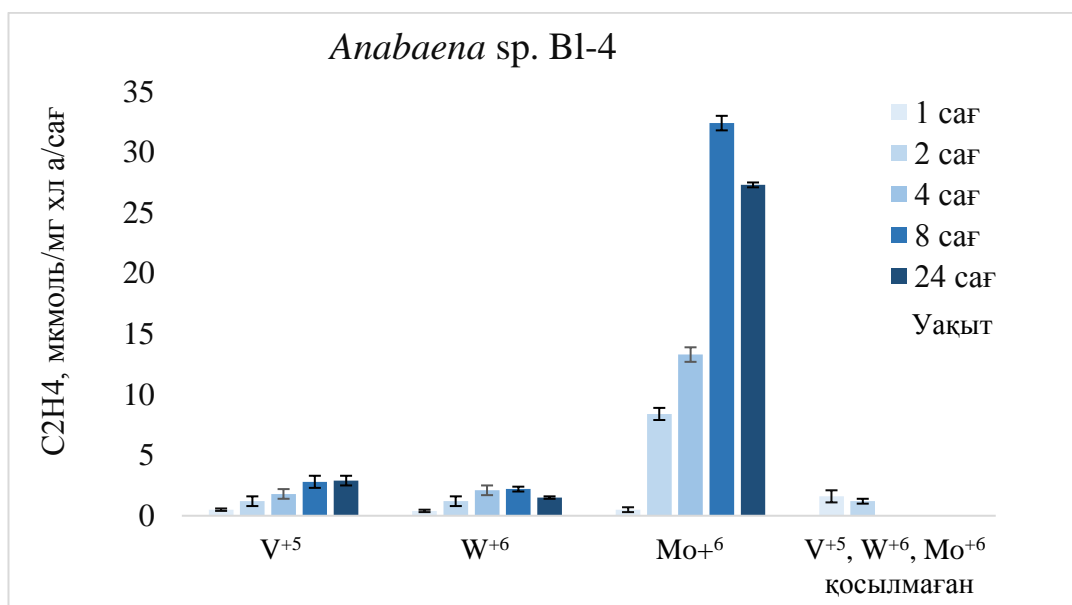
дақылдарда бір-бірінен салыстырмалы түрде қатты айырмашылықтар байқалмады. Ал, BG₀-11 қоректік ортасында үш штамм өте белсенді түрде гетероцисталарды бөлумен ерекшеленді. *Anabaena* sp. В1-4 штамы 3 дана гетероциста/жіпше, ал *Nostoc* sp. J-14 штамы 3 гетероциста және *Tolypothrix tenuis* J-1 штамы 2 дана гетероциста/жіпше көрсеткішінде максималды түрде гетероцисталарды бөлді. (сурет 26). Ал, қалған J-8 және K-31 түрлері де азотты ортамен салыстырғанда азотсыз ортада гетероцисталардың жоғары өнімділігін көрсетті. Зерттелген 5 штамм да сызықтық өсуімен ерекшеленіп, тәулік өткен сайын гетероцисталардың саны артқаны тіркелді.

Жарық микроскобымен зерттеу барысында *Nostoc* sp. J-14 және K-31 дақылдарында 7 тәуліктен асқан соң, гетероцисталардың вегетативті клеткалардан бөлінгені байқалды. Вегетативті клеткалардан бөлінген гетероцисталарда гликоген/глутамин алмасуы бұзылып, электрондардың қозғаласы тоқтайды. Ферродоксиннің толыққанды активтенуіне қажетті энергия көзі болмағандықтан гетероцистада орналасқан нитрогеназа ферментінің жұмысы ұзаққа созылмайды. Себебі, нитрогеназа ферменті бір уақытта 3 түрлі қызметті атқарғандықтан, оның қызметі жоғары энергияны қажет етеді. Гетероцисталы клеткалар ФЖ2 нәтижесінде пайда болатын энергия көзін нитрогеназа ферментінің белсенділігіне пайдаланып, ВК-дан бөлініп қалуы салдарынан летальді жағдайға ұшырайды. Сондықтан, табиғатта вегетативті клеткалардан бөлінген гетероцисталардың маңыздылығы төмен болып саналады.

Mo, *W* және *V* ауыр металлдарының нитрогеназа белсенділігіне әсерін зерттеу. Жоғарыда зерттелген жұмыстар нәтижесінде 3 цинобактериялық штамм іріктелініп алынып, олардың нитрогеназа ферментінің белсенділігін арттыру мақсатында зерттеу жұмыстары жүргізілді. Аллен қоректік ортасында тек *Mo* элементі кездескендіктен дақылдардың биомассасын алу барысында бұл элемент тұздардың құрамынан алынып тасталынды. Молибденсіз ортада цианобактериялық дақылдар 7 тәулік өсіріліп, Лог-фазада Na_2MoO_4 , Na_3VO_4 немесе Na_2WO_4 тұздары қоректік ортаға 1 мкмоль концентрациясында бір рет қосылды, ары қарай анаэробты жағдай тудырғанға дейін тағы 7 тәулік дақылданды. Алдын ала зерттеу жұмыстарының нәтижесінде осы үш металл үшін 1 мкмоль концентрациясы оптималды болған. 3 штаммда да 0,1 мкмоль және 10 мкмоль металлдардың (Na_2MoO_4 , Na_3VO_4 және Na_2WO_4) концентрациясындағы этиленнің төмен тотығу көрсеткіштері тіркелген болатын. Ацетиленнің редукциясын анықтау мақсатында 3 штамм да 5 рет 1, 2, 4, 8, 24 сағаттарда өлшелініп, хлорофиллмен қатынасы есептелініп, әр сағаттағы C_2H_4 мөлшері алынды.

Anabaena sp. В1-4 штамының нитрогеназа белсенділігін зерттеу жұмысында ең жоғары нәтижелер 1 мкмоль концентрациядағы *Mo* элементінде тіркелді. Бұл жағдайда C_2H_4 максималды жиналу мөлшері $32,4 \pm 0,6$ мкмоль этилен/мг хл а/сағ жетіп, бақылаумен салыстырғанда (27-ші суреттегі Аллен қоректік ортасы) ~10 есеге жоғары болды. Зерттеу жұмысында *Mo* қосылғаннан соң нитрогеназа ферментінің белсенділігі 8 сағатқа дейін жоғары болып, келесі сағаттарда этиленнің мөлшері төмендей түсті. Бұл өз кезегінде қорға жинақталған гликоген

қорының төмендеуімен тығыз байланысты болып келеді. Ванадий элементінің (V) 1 мкмоль концентрациясын 0 минутта қосқан кезде, алғашқы сағатта этиленнің мөлшері $0,5 \pm 0,1$ мкмоль этилен/мг хл а/сағ жетті. ВІ-4 штамында 8-ші сағатқа дейін сызықтық өсу тіркеліп, максималды C_2H_2 газының редуциясы $2,9 \pm 0,4$ мкмоль этилен/мг хл а/сағатқа жетті. Ал, Вольфрам элементінің осы концентрациясында жоғары нәтижелер байқалмады. Ең жоғары C_2H_4 тотығуы $2,2 \pm 0,2$ мкмоль этилен/мг хл а/сағ көрсетіп, келесі сағаттарда төмендеу тіркелді.



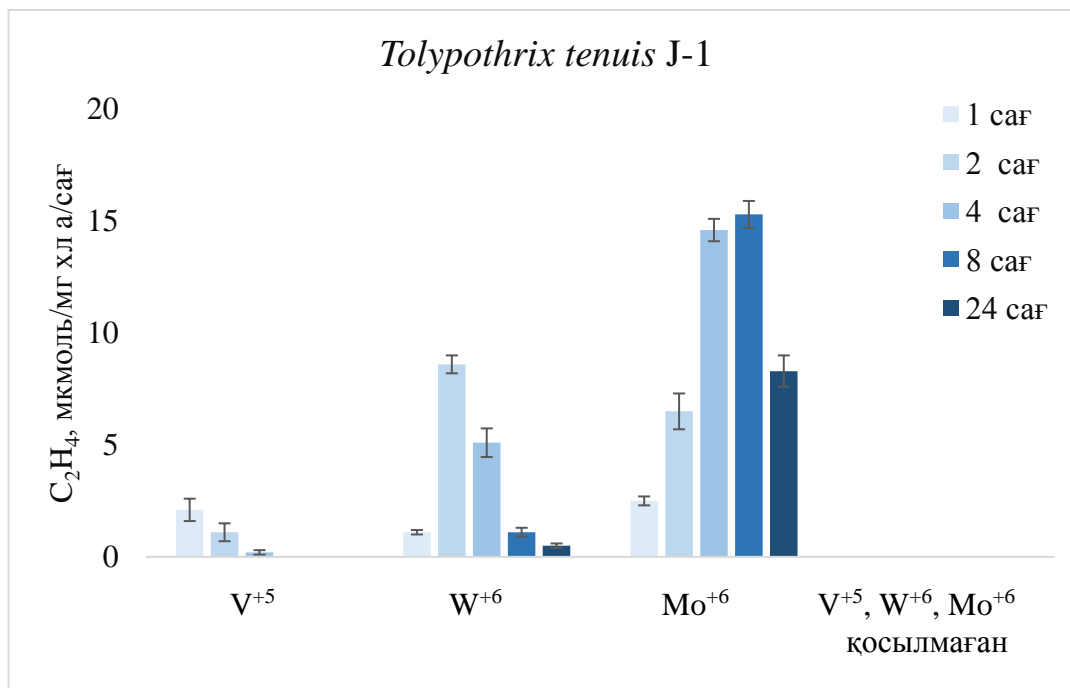
Сурет 27 – Қоректік ортаға қосылған V, W, Мо металлдарының 1 мкмоль концентрациясының *Anabaena sp.* ВІ-4 штамының нитрогеназа белсенділігіне әсері

Қоректік ортадан Мо элементін (және W, V элементтерін) алып тастағанда төмен көрсеткіштер тіркелді. Сәйкесінше, бастапқы сағатта $1,6 \pm 0,5$ мкмоль этилен/мг хл а/сағ анықталып, 4-ші сағаттан бастап нитрогеназаның белсенділігі байқалмады. Сонымен қатар, клеткалардың түсінің сарғайып, летальді жағдайға тез ұшырағаны тіркелді.

Осы металлмен зерттеу жұмысында 1 мкмоль концентрациясында C_2H_4 шығымы жоғары болып, нитрогеназаның жұмысына оң әсер ететіндігі анықталды. Қоректік ортадан V, W және Мо металлдарын алып тастау нитрогеназа ферментінің белсенділігін ингибирлейтіні байқалды.

Tolypothrix tenuis J-1 штамымен жүргізілген экспериментте C_2H_4 тотығуы ВІ-4 штамымен салыстырғанда біршама төмен болды. J-1 штамы V, W және Мо металлдары болмаған жағдайда ешқандай этиленнің белсенділігін көрсетпеді. Ал, 1 мкмоль Мо элементінің нұсқасында бастапқы сағатта $2,5 \pm 0,2$ мкмоль/мг хл а/сағ C_2H_4 газы тіркелді. C_2H_2 газының C_2H_4 газына тотығуының жоғары көрсеткіші 8 сағаттан соң байқалды ($15,3 \pm 0,6$ мкмоль этилен/мг хл а/сағ) және ол осы эксперименттегі ең жоғары нәтижені көрсетті. 24 сағаттан соң, бұл көрсеткіш 7 бірлікке төмендеді. Осы штаммен ванадийдің әсерін зерттегенімізде Мо салыстырғанда 7 есе төмен нәтижелер алынды және ең жоғары этиленнің

шығымы $2,1 \pm 0,5$ мкмоль/мг хл а/сағ құрады. Келесі сағатта (2 сағ) төмен көрсеткіштер байқалып, 24-ші сағатта мүлдем нитрогеназаның белсенділігі тіркелмеді. Ал, вольфрамда салыстырмалы түрде жоғары нәтижелер алынды. Нитрогеназаның белсенділігі 2-ші тәулікте байқалып, C_2H_4 мөлшері $8,6 \pm 0,4$ мкмоль/мг хл а/сағ құрады. Ал, келесі сағаттарда сызықтық төмендеу тіркелді (сурет 28).



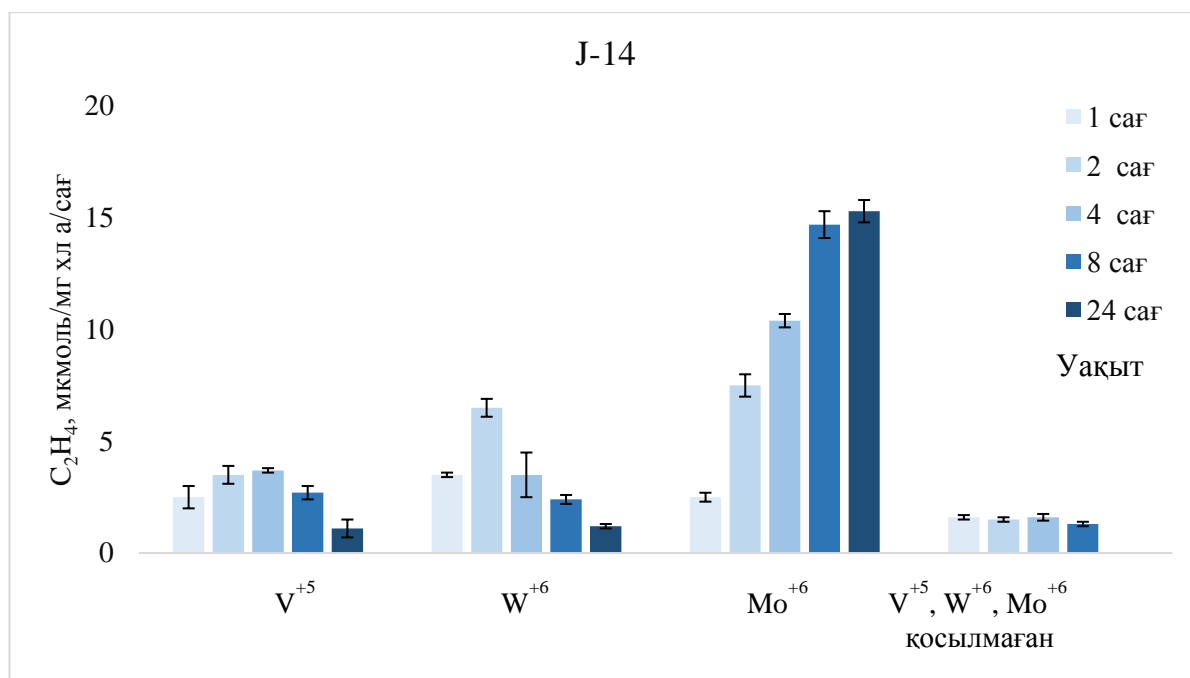
Сурет 28 – Қоректік ортаға қосылған V, W, Мо металлдарының 1 мкмоль концентрациясының *Tolypothrix tenuis* J-1 штамының нитрогеназа белсенділігіне әсері

Зерттеу барысында J-1 штамының нитрогеназа белсенділігі тікелей қоректік ортадағы микроэлементтердің концентрациясына тәуелді екендігі байқалды. Жүргізілген зерттеу жұмыстарында J-1 штамы Мо металлының 1 мкмоль концентрациясында нитрогеназа белсенділігін көрсетіп, ферменттің максималды белсенділігі 8 тәулікке дейін сақталды (нәтижелер көрсетілмеген). Сонымен қатар, осы штамен V, W, Мо элементтерін (1 мкмоль көрсеткіштерінде) бірге қосып жасалған эксперименттерде нитрогеназа ферментінің ингибируленетіні тіркелді. Сонымен, зерттеулер нәтижелеріне сүйене отырып, Мо элементінің 1 мкмоль мөлшері нитрогеназаны белсендіретіні және нитрогеназа тікелей осы үш элементтің иондарына тәуелді екендігі байқалды.

Келесі кезекте *Nostoc* sp. J-14 түрінің нитрогеназа белсенділігі зерттелінді. Бұл штамм көбіне күрішті аймақтарда тіршілік етуге бейімделген түр болып табылғандықтан, ауадағы азотты белсенді түрде фиксациялауға қабілетті.

J-1 штамымен эксперименттің ұзақтығы 48 сағатты құрады. Анаэробты ортадағы (90% аргон/10% ацетилен) клеткалардың белсенділігі 24 сағатқа дейін сақталынды (Mo). J-1 түрінің C_2H_4 тотықтыруы В1-4 штамымен салыстырғанда төмен болғанымен, оның нитрогеназа ферментінің белсенділігі салыстырмалы

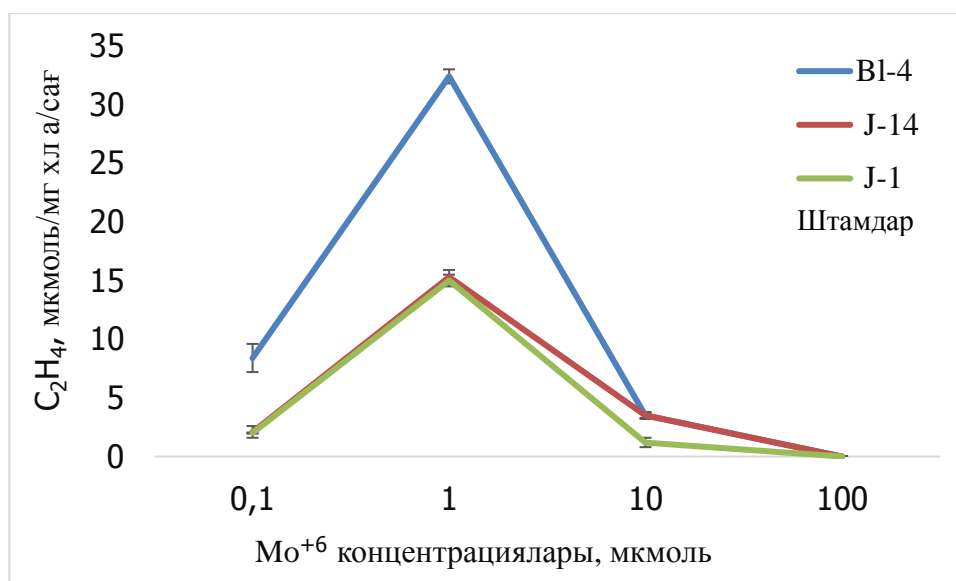
түрде ұзақ болып, 48 сағатқа дейін сызықтық өсуді көрсетті (нәтиже келтірілмеді) (сурет 29).



Сурет 29 – Қоректік ортаға қосылған V, W, Mo металлдарының 1 мкмоль концентрациясының *Nostoc* sp. J-14 штамының нитрогеназа белсенділігіне әсері

Басқа екі штаммен салыстырғанда J-14 штамы V, W және Mo металлдарының қатысуынсыз да біршама C₂H₄ белсенділігін көрсетті. Дегенмен, ең жоғары көрсеткіштер молибден қосылған ортада тіркелді. ВІ-4 салыстырғанда екі есеге жуық аз этиленнің тотығуын көрсеткенімен, нитрогеназаның белсенділігі 24 сағатқа дейін сақталынып, максималды C₂H₄ тотықтырды – 15,3±0,5 мкмоль/мг хл а/сағ. Ал, V және W элементтерімен жүргізілген зерттеу жұмыстарында бірнеше есе төмен нәтижелер алынды. V элементінде жоғары этилен тотығу 3,7±0,1 мкмоль/мг хл а/сағ болса, вольфраммен жоғары шығым 6,5±0,4 мкмоль/мг хл а/сағ этиленді құрады.

Осы зерттеу жұмысында келтірілген деректер аэробты түрде өсіріліп, кейін анаэробты жағдайға көшірілген штамдарда (ВІ-4, J-8, J-1) кем дегенде екі нитрогеназа жүйесінің болуын растайды және бұл ақпараттар бұған дейін Зиел және т.б. (1993) зерттеулерінде келтірілген. Бұл цианобактерияларда Mo жоқ кезде және V болғанда жұмыс істейтін Mo-нитрогеназаны (*nifl* гендері) кодтаса, ал баламалы V-нитрогеназаны (*vnf* гендер) кодтайтын гендер де бар [146]. Екі нитрогеназаның синтезі аммонийдің қатысуымен жүзеге асады және екі нитрогеназалық фермент те аэробты жағдайда гетероцистада жұмыс істейді. Жуырда *A. variabilis*-те вегетативті жасушалар мен гетероцисталарда анаэробты жағдайда ғана жұмыс істейтін, *nif2* гендерімен кодталған екінші Mo-нитрогеназаның бар екендігі анықталды [146]. *A. variabilis* штамындағы үшінші (тек Fe-де) нитрогеназаның физиологиялық және генетикалық дәлелдер болғанымен, кейінгі зерттеулер олардың болуын растай алмады.



Сурет 30 – Цианобактерия штамдарының әр түрлі Мо концентрациясындағы максималды этиленді тотықтыруы

Зерттелген диазотрофты штамдар (B1-4, J-14, J-1) Аллен қоректік ортасында өсірілді. Келтірілген жұмыстар [212] нитрогеназа белсенділігін анықтайтын ең қолайлы орта – Аллен қоректік ортасы екендігі айтылған. Осы тұрғыда, бізбен жүргізілген жұмыстарда табиғи ортадан бөлініп алынған диазотрофты штамдардың нитрогеназа белсенділігіне үш элементтің белгілі бір концентрациясы әсер ететіндігі анықталды. Үш штаммен де жүргізілген зерттеу жұмысында Мо мөлшерін 0,1 мкмоль-ден 100 мкмоль-ге арттырғанда әр түрлі көрсеткіштер тіркелді. 30-суретте келтірілгендей, Мо оптималды концентрациясы 1 мкмоль-ді құрады және осы көрсеткіш қалған екі элемент (W, V) үшін де қолайлы болды (нәтижелер келтірілмеді). Зерттеу жұмыстарында Мо 1 мкмоль концентрациясында J-1 штамы B1-4 штамымен салыстырғанда 1,2 есеге төмен болды және осы көрсеткіш Мо-нің 0,1 мкмоль мөлшерінде де байқалды. Мо элементінің 100 мкмоль концентрациясына көтерілуі клеткалардың өсуін ингибирлеп, гетероцисталардың вегетативті клеткалардан алшақтауын тудырды. Келтірілген әдебиеттерде [212] вегетативті клеткалар гетероцисталарды энергиямен қамтамасыз ететіндігі айтылған. Ал, вегетативті клеткалардан глутамин қышқылы гетероцисталы клеткаларға беріліп отырады. Ауыр металлдар арқылы ингибирлену процесі туындағанда осы байланыс үзіліп, нәтижесінде, клеткалар летальді жағдайға ұшырайды [213].

Сонымен қатар, клеткалардың ішінде вольфрам молибден сияқты әрекет етеді. modA генінің транскрипциясын төмендетіп, ModABC ақуызын периплазматикалық белокпен байланыстырады. Мо⁺⁶ және V⁺⁵ элементтері клеткаларға электрон транспорты үшін қажет. Сондықтан, Мо және V қажет ететін клеткаларда W қосылуы V-нитрогеназа синтезін тежемейді. Мо және V жетіспейтін жабайы түрлер – B1-4, J-1 жасушаларына 1 мкмоль молибдат, ванадат немесе W металлын қосқаннан кейін 2 сағат ішінде ацетиленді

тотықтыру белсенділігінің едәуір артуына алып келді және келесі 6 сағат ішінде белсенділік жоғарылады. Ал, зерттелген 3 жабайы түрлердің ішінде J-14 штамымен Mo-дің 1 мкмоль концентрациясында нитрогеназаның белсенділігі 48 сағатқа дейін белсенді болды, дегенмен, бөлінген C_2H_4 мөлшері аса көп болмады. Бұл өз кезегінде қорға жинақталған энергияның мөлшерінің көп болуымен байланысты болуы мүмкін және Mo оптималды концентрациясы нитрогеназа ферментін белсендіре алады.

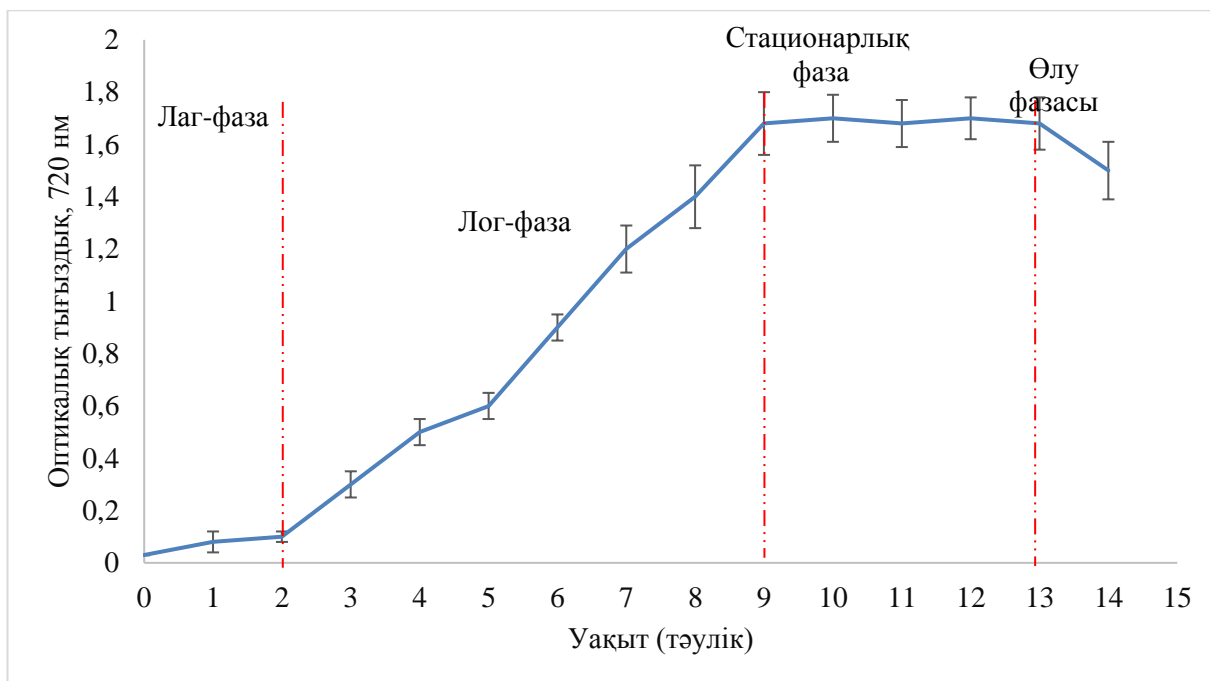
Mo-ді қоректік ортаға қосу басқа элементтермен салыстырғанда жоғары нәтиже беріп, V-нитрогеназамен салыстырғанда FeMo-нитрогеназаның белсенділігі жоғары болды. Ацетиленнен этиленді алудағы W-дің әсер ету эффектісі V-ге ұқсас болды. Күткендей, Mo қосылуы ацетиленнің 6 сағаттан кейін этиленге тотығуын қатты ынталандырды, ал V-нің қосылуы нитрогеназаның белсенділігіне аз әсер етті.

Күріш алқабынан бөлініп алынып, идентификацияланған 3 цианобактериялардың азотфиксациялаушы түрлері (*Anabaena* sp. B1-4, *Nostoc* sp. J-14, and *Tolypothrix tenuis* J-1) ацетилен әдісімен зерттелінді. Mo^{+6} , W^{+6} , V^{+5} элементтерінің негізінде нитрогеназаның белсенділігін арттыру жұмысы бойынша 1 мкмоль Mo-нің концентрациясы үш штамға да оптималды болып, этиленнің тотығу мөлшері біршама жоғары болды. Сонымен қатар, W^{+6} және V^{+5} металлдарын Аллен қоректік ортасына 1 мкмоль концентрациясында қосу клеткалардың азотфиксациялау қарқындылығын белсендіретіні анықталды. Қорытындылай келе, биомасса жинау барысында қоректік ортаның құрамына 1 мкмоль концентрациясындағы Mo^{+6} металы бар тұзды қосу қосу арқылы гетероцисталардың түзілуін арттыру негізінде нитрогеназа ферментінің белсенділігін жоғарылатуға болатынын айтуға болады. Сонымен қатар, күріш алқаптарынан бөлініп алынған цианобактериялардың азотфиксациялаушы дақылдарын ауыл шаруашылығында биостимулятор ретінде қолдануға болады.

3.1.4 Бөлініп алынған цианобактерия штамдарының биомассасының күрішке әсерін зерттеу

Келесі кезекте *Anabaena* sp. B1-4 штам биомассасының күріштің өсуіне әсерін зерттеу жұмыстары жүргізілді. Азотфиксациялау белсенділігін арттыру үшін 1 мкмоль Mo қосылған, модификацияланған Аллен қоректік ортасы қолданылынды.

Сонымен қатар, *Anabaena* sp. B1-4 штамының биомассасының өсу динамикасы анықталды (сурет 31). Клеткалардың бастапқы оптикалық тығыздығы 0,03 бірлікті құрады және белсенді өсу 10-шы тәулікке дейін жалғасты. 9-ші тәулікте дақылдың лог-фазасы аяқталып, стационарлық фазада клеткалардың биомассасы алынды және жоғары оптикалық тығыздығы 1,7 бірлікті құрады. 11-ші тәулікте өлу фазасының басталғаны анықталды. Арнайы қолдан жасалған фотобиореакторда өскен клеткалардың биомассасы 10-шы тәулікте центрифуга көмегімен суспензиядан бөлініп алынды.



Сурет 31 – *Anabaena* sp. B1-4 цианобактерия штаммының өсу динамикасы

Келесі кезекте гетероцисталы цианобактерия штаммының биомассасының әсерін күріштің өсу көрсеткіштеріне тигізетін әсері зерттелді. Зерттелген штамдар арасында нитрогеназа белсенділігі бойынша ерекшелеген *Anabaena* sp. B1-4 штаммының әр түрлі концентрациядағы суспензиясының *Ақмаржан* сортының өсу көрсеткіштеріне әсері зерттелінді.

Anabaena sp. B1-4 суспензиясының әр түрлі концентрациясының *Ақмаржан* сортына әсерін зерттеуде 1 мл-дегі клетка саны есептелінді.

6-кестеде көрсетілгендей, күріштің өсу көрсеткіштері әртүрлі болды. Бұл зерттеу жұмысында өсіп шыққан күріштердің бойының ұзындығы есепке алынды. Себебі, топырақтағы азоттың қалыпты концентрациясы өсімдіктердің өсуінде маңызды қызмет атқарады және тамырдың өсуіне оң әсерін тигізеді. Зерттеу жұмысында бақылау 1 нұсқасында өсіп шыққан күріштердің орташа ұзындығы $35 \pm 1,4$ см құрады, ал азотсыз ортадағы бақылау 2 нұсқасында бұл көрсеткіш $20 \pm 1,3$ см құрады, яғни, бақылау 1-мен салыстырғанда 15 см-ге төмен көрсеткіш тіркелді. 6×10^6 кл/мл концентрациядағы күріштердің максималды өсу көрсеткіші $24 \pm 1,3$ болса, 12×10^6 кл/мл нұсқасы 4 см-ге жоғары болды ($28 \pm 1,2$ см). Тәжірибе барысында ең оптималды клетка концентрациясы 24×10^6 кл/мл ($34 \pm 1,9$ см) және 48×10^6 кл/мл ($32 \pm 1,1$ см) нұсқаларында болды. Клеткалардың суспензияларының шамадан тыс болуы өсімдіктің өсуіне теріс әсер етіп, келесі екі нұсқада (96 және 192×10^6 кл/мл) салыстырмалы түрде төмен көрсеткіштер тіркелді.

Кесте 6 – Азотфиксациялаушы *Anabaena* sp. В1-4 штамының әртүрлі суспензиясының күріштің бойының өсуіне әсері

№	Тәжірибенің нұсқалары	Күріш бойының ұзындығы, см
1	Бақылау 1 – азотты Мурасиге-Скуга қоректік ортасы	35±1,4
2	Бақылау 2 – азотсыз Мурасиге-Скуга қоректік ортасы	20±1,3
3	1-нұсқа – 6x10 ⁶ кл/мл	24±1,3
4	2-нұсқа – 12x10 ⁶ кл/мл	28±1,2
5	3-нұсқа – 24x10 ⁶ кл/мл	34±1,9
6	4-нұсқа – 48x10 ⁶ кл/мл	32±1,1
7	5-нұсқа – 96x10 ⁶ кл/мл	29±1,1
8	6-нұсқа – 192x10 ⁶ кл/мл	25±1,9

Anabaena sp. В1-4 цианобактерия штамы Ақмаржан сортының өсуіне әсер ететіні байқалды. Күріш алқабынан бөлініп алынған штамм нитрогеназа ферменттерінің белсенділігімен ауадағы азотты фиксациялау процесін жүргізіп, топырақтың құрамын молекулалық азотпен байытады. Тәжірибедегі гетероцисталы цианобактерия дақылы биомассасының әртүрлі концентрациясы күріштің бойының өсуіне әсерін әрқалай тигізетіні тіркелді. Қорытындылай келе, 24x10⁶ кл/мл және 48x10⁶ кл/мл концентрациядағы клетка биомассасы күріштің өсуіне оң әсерін тигізетіні анықталды және осы штамм агробиотехнологиядағы болашағы мол объекті ретінде ауылшаруашылық-егістік жұмыстарына ұсынылады.

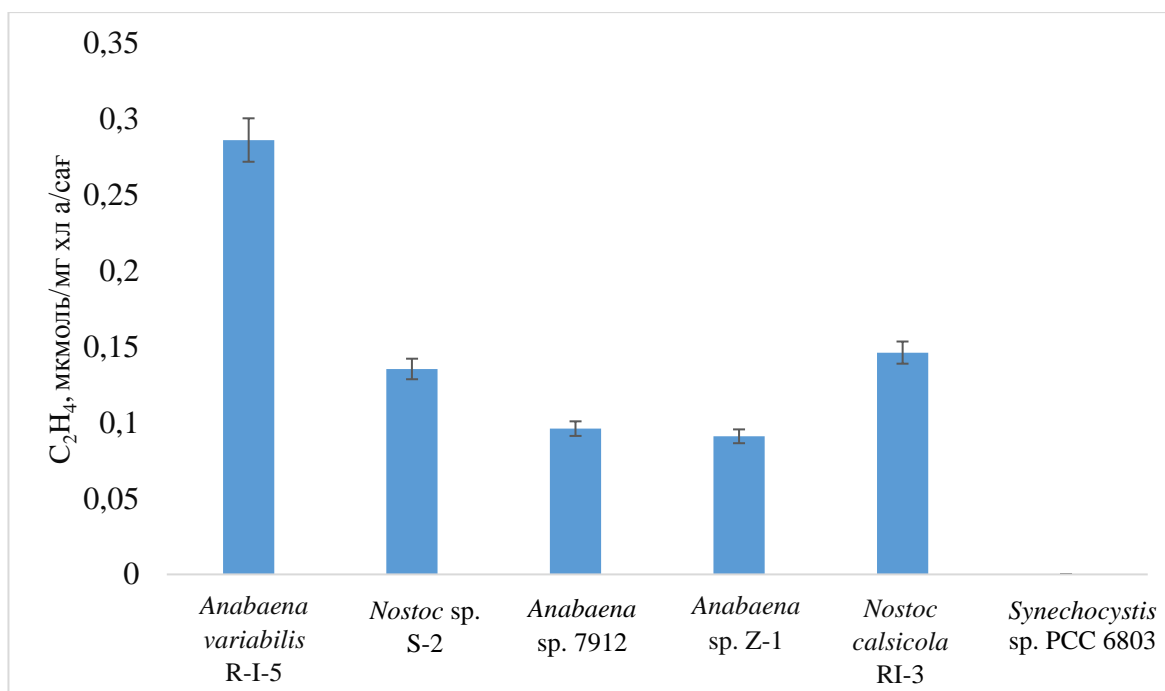
3.1.5 Цианобактериялардың коллекциялық штамдарының нитрогеназа белсенділігін зерттеу

Диссертациялық жұмыстың келесі бөлімінде цианобактерия штамдарының нитрогеназа ферментінің белсенділігін зерттеу жұмыстары қамтылды.

Жүргізілген жұмыстың мақсаты – азотфиксациялаушы цианобактериялардың нитрогеназа белсенділігін анықтау. Коллекциядан алынған бес түрлі азотфиксациялаушы штамдардың жоғары нитрогеназа белсенділігін анықтау мақсатында зерттеу жұмысы жүргізілді. Бақылау ретінде гетероцистасыз *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамы алынды.

Алынған газ хроматограф нәтижелері көрсеткендей, барлық азотфиксациялаушы цианобактериялардың штамдары ацетиленді ортада нитрогеназа белсенділігін көрсетті. Дегенмен, олардың ацетиленді этиленге «төмендету» қабілеттілігі әр түрлі екендігі байқалды. Алынған нәтижелерге сәйкес, зерттелген түрлердің арасында *Anabaena variabilis* R-I-5 штамы этиленді салыстырмалы тұрғыда төмен жинайтыны тіркелді, ал *Anabaena variabilis* R-I-5 штамымен ең жоғары этилен мөлшері (0,28±0,02 нмоль этилен/мг хл а/сағ) жинақталды. Сонымен қатар, *Nostoc caldicola* RI-3 штамымен жүргізілген тәжірибеде 0,14±0,006 мкмоль этилен/мг хл а/сағат көрсеткіші тіркелді.

Күтілгендей, *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамымен нитрогеназа белсенділігі байқалмады (сурет 32).



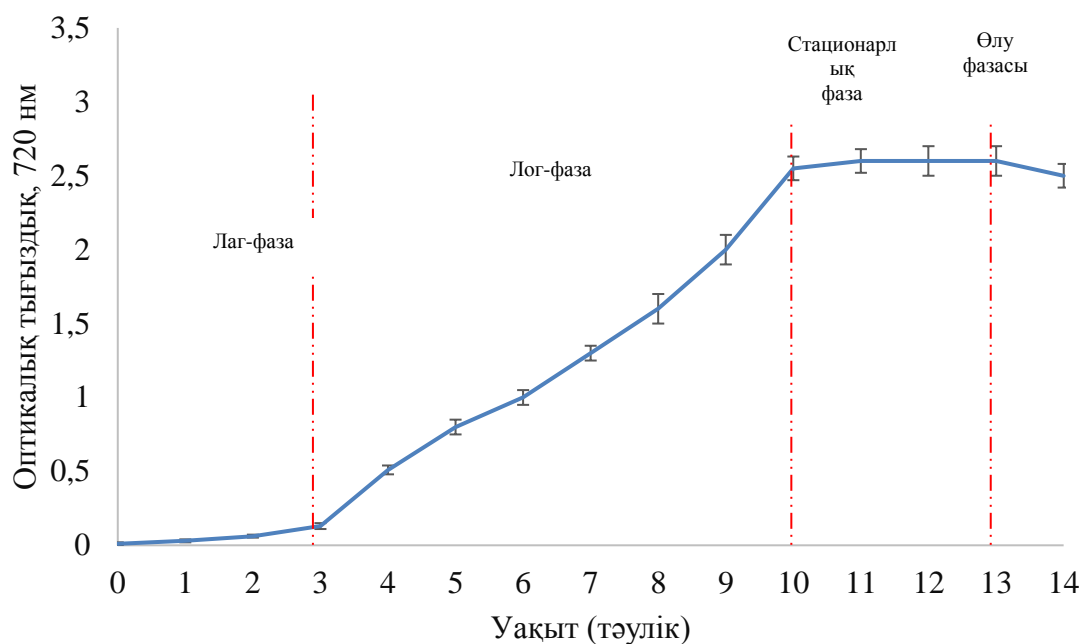
Сурет 32 – Коллекциялық цианобактерия штамдарының нитрогеназа белсенділігін зерттеу нәтижелері

Тәжірибе барысында *Nostoc* sp. S-2 ($0,13 \pm 0,005$ мкмоль этилен/мг хл а/сағат), *Anabaena* sp. 7912 ($0,096 \pm 0,003$ мкмоль этилен/мг хл а/сағат) және *Anabaena* sp. Z-1 ($0,09 \pm 0,001$ мкмоль этилен/мг хл а/сағат) штамдары бір-біріне этилен бөлу мөлшері бойынша ұқсас нәтижелер көрсетті.

Anabaena variabilis R-I-5 штамы *in vitro* жағдайында жүргізілген тәжірибеде этилен көлемінің жоғары деңгейін көрсетті және ол ары қарай зерттеу жұмыстарын жүргізу үшін таңдалынып алынды.

3.1.6 Коллекциялық цианобактерия штамы биомассасының құлпынайға әсерін зерттеу

Ацетилен әдісі бойынша жүргізілген жұмыста *Anabaena variabilis* R-I-5 штамы азотфиксациялау қасиетінің жоғары белсенділігімен сипатталды. Осы тұрғыда, өсу динамикасының белсенділігін зерттеу жұмыстарын жүргізу маңызды болып табылады. Келесі кезекте *Anabaena variabilis* R-I-5 штамының клеткаларының өсуін зерттеу жұмыстары жүргізілді (сурет 39). Клеткалардың белсенді өсуі бірінші тәуліктен бастап тіркелді және 0,03 бірліктегі оптикалық тығыздықты құрады. Келесі тәуліктерде (2-11) сызықтық өсу байқалып, клеткалардың санының артуы тіркелді. 11-ші тәулікте дақылдың лог-фазасы аяқталып, стационарлық фазада клеткалардың биомассасы алынды және жоғары оптикалық тығыздығы 2,6 бірлікті құрады. 13-шы тәулікте өлу фазасының басталғаны анықталды (сурет 33).

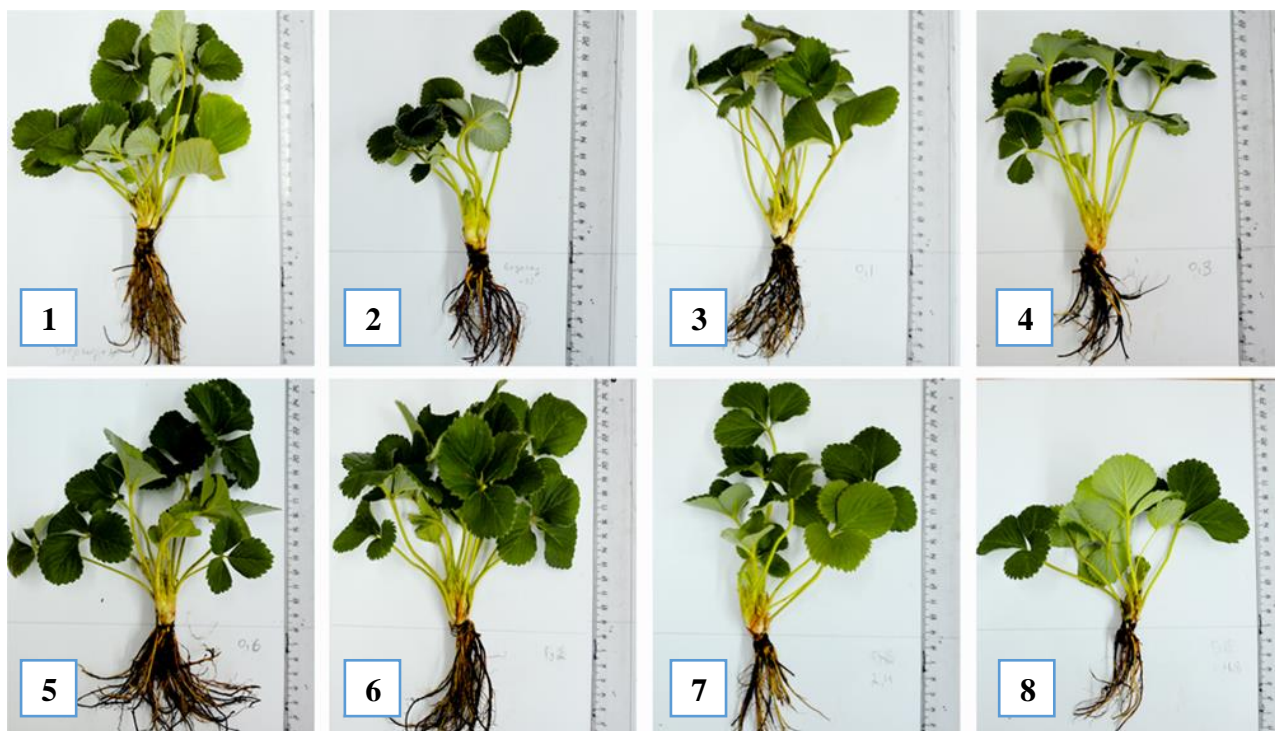


Сурет 33 – *Anabaena variabilis* R-I-5 цианобактерия штаммының өсу динамикасы

Келесі кезекте азотфиксациялаушы цианобактерия штаммының әсерін құлпынайдың өсу көрсеткіштеріне тигізетін әсерін анықтау жұмыстары жүргізілді. Сонымен қатар, басқа цианобактериялық түрлермен салыстырғанда азот фиксациялау белсенділігі жоғары *Anabaena variabilis* R-I-5 штаммының әр түрлі концентрациядағы суспензиясының *Sunrise* T-4 құлпынай сортының өсу көрсеткіштеріне әсерін зерттеу жұмыстары жүргізілді. Кейбір жарияланған мақалаларда [214, 135] *Anabaena* және *Nostoc* штамдары қоректік ортадағы химиялық азотты биологиялық азотпен алмастыруға қабілеттілік танытты. Себебі, олар ауадағы бос азотты гетероцисталардың ішіндегі нитрогеназа ферментінің көмегімен бойына фиксациялап алып, оны топырақтың құрамына бөле алады [215].

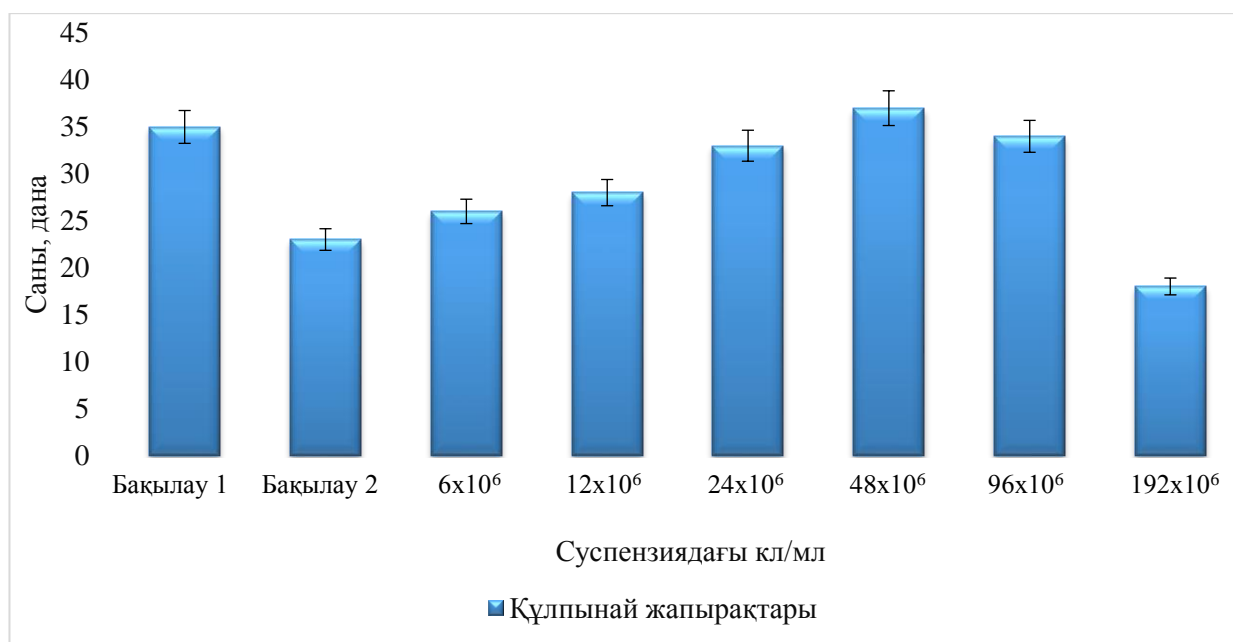
Anabaena variabilis R-I-5 штаммы суспензиясының әр түрлі концентрациясының *Sunrise* T-4 сортына әсерін зерттеуде 1 мл-дегі клетка саны есепке алынды.

34,35-суреттерде көрсетілгендей, құлпынайдың көшеттерінің өсу көрсеткіштері әртүрлі болды. Бірінші кезекте, өсіп шыққан көшеттердің жапырақтарының саны тіркелді. Тәжірибенің соңында берілген цианобактерия штаммы суспензиясының әртүрлі концентрацияларында, сәйкесінше, әртүрлі жапырақ саны тіркелді. Бақылау 1-де $35 \pm 6,3$ дана жапырақ өсіп шыққаны тіркелді. 1-ші нұсқада өсіп шыққан жапырақ саны – $26 \pm 5,4$, ал бақылауда 2-де шамалы төмен көрсеткіш ($23 \pm 4,3$ жапырақ) анықталды. 3-ші және 4-ші нұсқада жапырақ санының артуы байқалды.



Сурет 34 – Азотфиксациялаушы *Anabaena variabilis* R-I-5 цианобактерия штаммының әр түрлі концентрациясының *Sunrise* T-4 сортының өсу көрсеткіштеріне әсері.

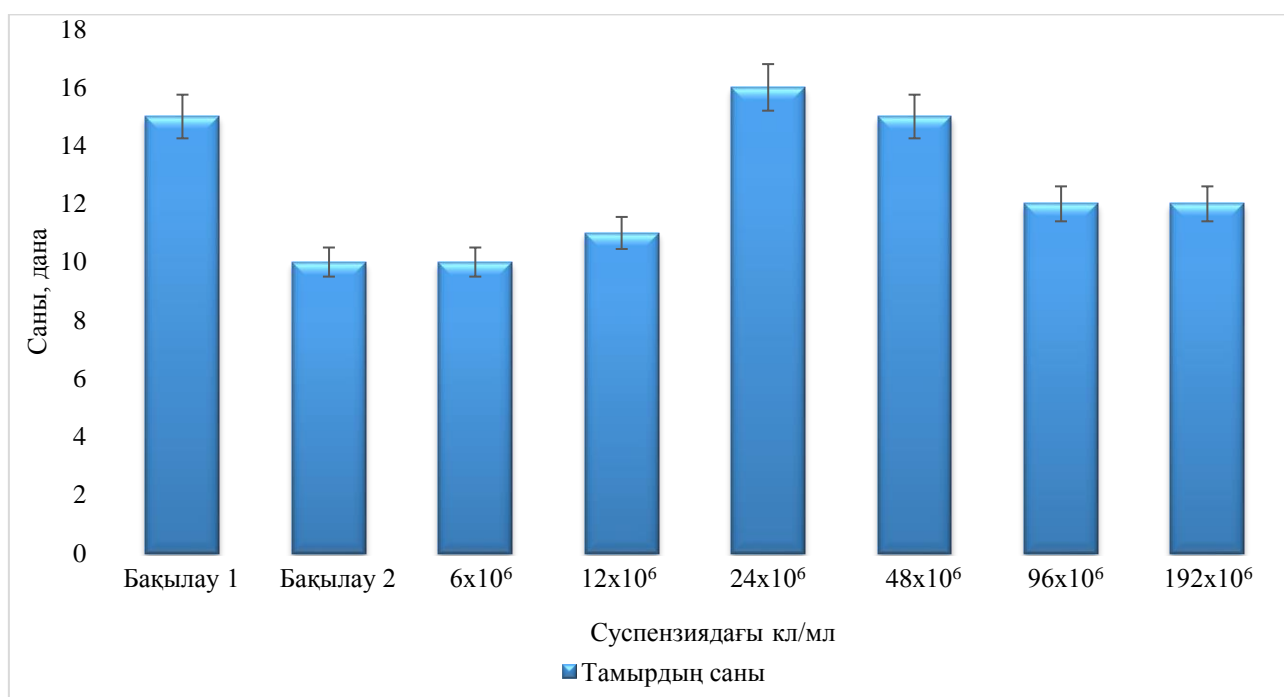
Белгілеулер: 1 – бақылау 1; 2 – бақылау 2; 3 – 6×10^6 кл/мл; 4 – 12×10^6 кл/мл; 5 – 24×10^6 кл/мл; 6 – 48×10^6 кл/мл; 7 – 96×10^6 кл/мл; 8 – 192×10^6 кл/мл.



Сурет 35 – Азотфиксациялаушы *Anabaena variabilis* R-I-5 цианобактериясының әртүрлі суспензия концентрациясының құлпынай жапырақшаларының өсуіне әсері

Өсудің оң көрсеткіштері клеткалардың 48×10^6 кл/мл концентрациясында жоғары болғанына қарамастан, цианобактериялардың 96×10^6 кл/мл концентрацияға көтерілуі төмен нәтиже берді және эксперименттің осы нұсқасындағы жапырақтардың саны 34 дана болды. Сонымен қатар, айта кету керек, цианобактериялар суспензиясының 192×10^6 кл/мл концентрациясы құлпынай өсуіне теріс әсер етті. 34-суретте эксперименттің 30-ші тәулігінде бақылау және эксперименттік нұсқадағы құлпынайдың микросуреттері көрсетілген.

36-суретте цианобактерия штамдарының әртүрлі суспензиясының әсерін құлпынай көшеттеріне зерттеудегі алынған нәтижелер келтірілген. Келесі кезекте, *Sunrise T-4* көшеттерінің сортының тамырының саны тіркелді. Тамыр өсімдіктердің қалыпты өсуін және топырақтағы макро және микроэлементтердің өсімдіктің бойына қалыпты жағдайда берілуін қамтамасыз ететіні белгілі [216]. Сондықтан цианобактериялардың суспензиясының өсімдіктердің тамыр жүйесіне әсерін зерттеу өте маңызды болып табылады.



Сурет 36 – Азотфиксациялаушы *Anabaena variabilis* R-I-5 цианобактериясының штамының әртүрлі суспензия концентрациясының құлпынай тамырының санына әсері

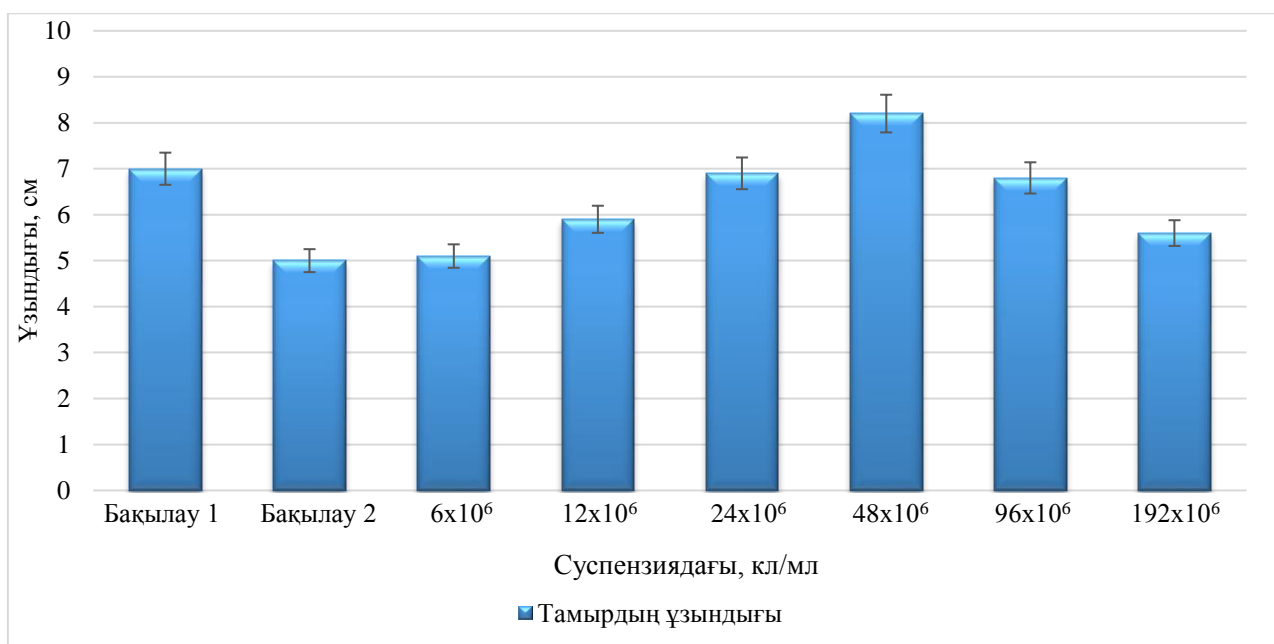
Бақылау 1 нұсқасында $15 \pm 2,2$ дана жанама және кіндік тамырлар өсіп шыққаны анықталды. Ал, бақылау 1-де $10 \pm 2,1$ дана тамыр тіркелді. 1-ші және 2-ші нұсқада өсіп шыққан тамыр саны бақылау 2-мен салыстырғанда аса қатты айырмашылық тудырмады – $10 \pm 3,2$ және $11 \pm 2,2$. Дегенмен, 3-нұсқада ең жоғары тамырдың көрсеткіші тіркелді, ол бақылаудың азотты нұсқасымен салыстырғанда 1 бірлікке жоғары болды ($16 \pm 1,5$). Ал, 4-нұсқада тамыр санының төмендеуі байқалды және ол бақылау бірмен тең нәтиже көрсетті. Зерттеу

нәтижелері көрсеткендей, 3-ші нұсқадағы цианобактериялардың суспензиясы *Sunrise T-4* сортының өсуіне оң әсерін тигізді. 37, 38-суреттерде көрсетілгендей, көптеген жанама, шашақ тамырлардың өсуіне жақсы әсер ететіні анықталды. Осы жағдайдағы 5-ші және 6-шы нұсқаларда 12 ± 3 дана тамыр тіркелді [217]. Ол цианобактериялардың артық мөлшердегі клеткаларының суспензиясы өсімдіктердің өсуіне токсикалық тұрғыда әсер ететінін көрсетеді. Суспензияның артық мөлшерін енгізгенде өсімдіктің өсуі баяулап, топырақтың бетіндегі клеткалардың көбейіп кетуінен ауа алмасуының бұзылып, зиянды микроорганизмдердің топырақ бетіне жиналуы байқалды. Бұл өз кезегінде өсімдіктердің ауруға тез шалдығуына алып келеді [218].

Келесі кезекте тамырдың ұзындығын зерттеу жұмыстарын жүргіздік. Себебі, тамырдың ұзындығы өсімдіктердің өсуінде маңызды қызмет атқарады және молекулалық азот тамырдың өсуіне жоғары ықпал етеді. Барлық макро- және микроэлементтер өсімдіктің бойына тамыр арқылы келгендіктен, тамырдың санының көп болуы және ұзын болуы өсімдіктің қалыпты өсуіне әсер етеді. Цианобактерия түрлерінің әртүрлі суспензияларында, сәйкесінше әртүрлі тамыр ұзындықтары өсіп шықты. Бақылау 1 көшеттері бақылау 2-мен көшеттерімен салыстырғанда жоғары көрсеткіштер көрсетті – $7\pm 0,5$ см және $5\pm 1,2$ см.



Сурет 37 – Азотфиксациялаушы цианобактериялардың әр түрлі концентрациясының құлпынайдың өсу көрсеткіштеріне әсерін зерттеу.
Белгілеулер: А – бақылау және N бақылау; Ә – N бақылау және 0,6 оптикалық тығыздық



Сурет 38 – Азотфиксациялаушы *Anabaena variabilis* R-I-5 цианобактериясының штамының әртүрлі суспензия концентрациясының құлпынай тамырының ұзындығына әсері

Бақылау 1 тәжірибесінде $7 \pm 0,5$ см орташа тамыр ұзындығы тіркелінді. Ал, 1-ші және 2-ші нұсқада шамалы өсу көрсеткіштері жоғарылады – $7 \pm 0,8$ см және $5,9 \pm 1,3$ см. Сонымен қатар, 48×10^6 кл/мл клетка суспензиясындағы 4-нұсқада өсіп шыққан тамырлардың орташа ұзындығы – $8,2 \pm 1,12$ см болды және бұл ең жоғары көрсеткіш болды. 5-ші нұсқада тамыр ұзындығының төмендеуі байқалды. Ең төменгі тамыр ұзындығы бақылау 2 мен 6-нұсқада байқалды – $5 \pm 1,12$ см және $5,6 \pm 0,67$ см. Алынған нәтижелер көрсеткендей, клеткалардың оңтайлы суспензиясы құлпынайдың өсуін ынталандырып, артық мөлшері өсімдіктің тамырының өсуін төмендетті. *Anabaena variabilis* R-I-5 клеткаларының 48×10^6 кл/мл санында жасалған 4-нұсқада *Sunrise* T-4 сортының көшеттерінің өсуіне оң әсерін тигізетіні анықталды (сурет 38).

Келесі кезекте өсімдіктердің бойының ұзындығының көрсеткіштері тіркелді (кесте 7). Әртүрлі суспензиясындағы азот фиксациялауға қабілетті цианобактерияның құлпынайдың өсу көрсеткішіне әсерін зерттегенде, сәйкесінше, олардың бойының ұзындығы әртүрлі болғаны байқалды. Бақылау 1 мен бақылау 2-нің айырмашылығы 5 см құрады (сурет 37). Бұл құлпынай өсімдігі топырақтағы азоттың мөлшеріне тікелей тәуелді екендігін көрсетеді. $16 \pm 1,5$ см өсімдік ұзындығы 4-нұсқада тіркелді, ал 96×10^6 кл/мл клетка сұйықтығындағы 5-нұсқада және 12×10^6 кл/мл клеткадағы 2-нұсқада бірдей төмен көрсеткіш – 13 ± 2 тіркелді.

Кесте 7 – Азотфиксациялаушы *Anabaena variabilis* R-I-5 штамының әртүрлі суспензиясының құлпынай бойының өсуіне әсері

№	Тәжірибенің нұсқалары	Құлпынайдың бойының ұзындығы, см
1	Бақылау 1 – азотты Мурасиге-Скуга қоректік ортасы	17 ±1,5
2	Бақылау 2 – азотсыз Мурасиге-Скуга қоректік ортасы	12 ±1
3	1-нұсқа – 6x10 ⁶ кл/мл (ОТ–0,1)	13 ±1,2
4	2-нұсқа – 12x10 ⁶ кл/мл (ОТ–0,3)	13 ±1,3
5	3-нұсқа – 24x10 ⁶ кл/мл (ОТ–0,6)	14 ±1,5
6	4-нұсқа – 48x10 ⁶ кл/мл (ОТ–1,2)	16 ±1,5
7	5-нұсқа – 96x10 ⁶ кл/мл (ОТ–2,4)	13 ±1,2
8	6-нұсқа – 192x10 ⁶ кл/мл (ОТ–4,8)	14 ±1,2

Сонымен қатар, айта кету керек, клеткалар санының 96x10⁶ кл/мл мөлшерден жоғары көтерілуі көшеттердің өсуіне теріс әсерін тигізгені байқалды. Ең жоғары тығыздықтағы 6-нұсқада 14 ±1,5 см құлпынайдың ұзындығы тіркелді. Ал, 4-нұсқа өсімдіктердің бойының қалыпты өсуіне оң әсер ететіні анықталды.

Құлпынай өсуінің барлық көрсеткіштерін өлшегеннен кейін биомасса шығымдылығы анықталды. Осы көрсеткішті тіркеуде өсімдіктердің тамырының, жапырағының, сабағының құрғақ биомассалары есептелінді. Эксперимент соңында, көшеттер жуылып, 60°C температураға 72 сағатқа қойылды. Күтілгендей, алынған нәтижелердегі азотты Мурасиге-Скуга қоректік ортасындағы бақылау 1-де 2,9±0,6 г құрғақ биомасса тіркелінді және ол 5-нұсқамен шамалас болды (кесте 8).

Кесте 8 – Азотфиксациялаушы *Anabaena variabilis* R-I-5 штамының әртүрлі суспензиясының құлпынайдың салмағына әсері

№	Тәжірибенің нұсқалары	Құлпынайдың құрғақ салмағы, г
1	Бақылау 1 – азотты Мурасиге-Скуга қоректік ортасы	2,9±0,6
2	Бақылау 2 – азотсыз Мурасиге-Скуга қоректік ортасы	1,5±0,5
3	1-нұсқа – 6x10 ⁶ кл/мл (ОТ–0,1)	2,1±0,65
4	2-нұсқа – 12x10 ⁶ кл/мл (ОТ–0,3)	2,5±0,5
5	3-нұсқа – 24x10 ⁶ кл/мл (ОТ–0,6)	2,6±0,8
6	4-нұсқа – 48x10 ⁶ кл/мл (ОТ–1,2)	3,1±0,71
7	5-нұсқа – 96x10 ⁶ кл/мл (ОТ–2,4)	2,8±0,53
8	6-нұсқа – 192x10 ⁶ кл/мл (ОТ–4,8)	1,3±0,5

Ал, ең жоғары көрсеткіш 4-нұсқада тіркелді және бұл бақылау 1-ден 0,2 г-ға жоғары болды (3,1±0,71 г). Дегенмен, бұл көрсеткіште 24x10⁶ кл/мл

суспензиясындағы 3-нұсқадағы құлпынайдың құрғақ биомассасы $2,6 \pm 0,8$ г тең болды.

Цианобактерия штамдарының әр түрлі концентрациясымен әсер еткен құлпынайдың биомассасы әр түрлі болды. Зерттеу барысында көшеттердің сабақтарының ұзындығы, жапырақтарының көлемі және тамырдың жуандығы есепке алынды. Дегенмен, зерттеу кезінде нақты ортақ көрсеткіштер алынбауына байланысты график түрінде көрсетілмеді.

Қорытындылай келе, *Anabaena variabilis* R-I-5 цианобактерия штамы құлпынайдың өсуіне әсер ететіні байқалды. Бұл штамм нитрогеназа ферментінің көмегімен ауадағы азотты сіңіріп алып, оны топыраққа беретіні анықталды. Зерттелген цианобактерия штамының клеткаларының әртүрлі концентрациясы құлпынайдың өсу көрсеткіштеріне (жапырақ саны, тамыр саны, тамыр ұзындығы, өсімдіктің бойының ұзындығы, өсімдіктің құрғақ салмағы) әрқалай әсер ететіні анықталды.

Осы тәжірибе аясында азотты фиксациялайтын цианобактериялардың құлпынай өсуіне әсері туралы нәтижелер алынды. Нитрогеназа белсенділігін зерттеу кезінде *Anabaena variabilis* R-I-5 штамы жоғары азотты фиксациялауға қабілеттілік танытқанын атап өткен жөн. Осы жүргізілген тәжірибелерде алынған нәтижелер бақылаумен салыстырғанда шамалы айырмашылықтар көрсетті. Тәжірибелік нұсқаларында кейбір өсу көрсеткіштері стандартты Мурасиге-Скуга қоректік ортасымен салыстырғанда жоғары болды. *Anabaena variabilis* R-I-5 штамы тамырдың ұзындығына, жапырақтардың өсуіне, өсімдіктің құрғақ салмағына және тамыр санының артуына оң әсерін тигізетіні анықталды. Осы негіздегі зерттеулерде цианобактериялар тамырдың өсу көрсеткіштеріне оң әсер етіп, топырақтағы су мен азот алмасуын жақсарта алатындығын көрсетті [219, 220]. Цианобактерия клеткаларымен өңделген өсімдіктің өсуіне бірнеше факторлар әсер етуі мүмкін, әсіресе, цианобактериялардан бөлініп шығатын химиялық заттар мен қоректік ортадағы макро- және микроэлементтердің әсері жоғары екендігін атап өткен жөн [221]. Осы гетероцисталық цианобактериялар азотты фиксациялау қабілетінің арқасында топырақтағы азот пен аммонийдің мөлшерін арттырады. Топырақтағы химиялық азоттың мөлшерін арттыруда цианобактериялар арнайы нитрогеназа ферментін пайдаланады және бізбен нитрогеназаның белсенділігі 5 түрлі азотфиксациядаушы штамда анықталды. Осы 5 түрдің азотты түзу жылдамдығын бағалау бұл гетероцисталы цианобактериялар табиғи жағдайда атмосфералық N түзе алатындығын көрсетеді (32-сурет). Солардың ішінде *Anabaena variabilis* R-I-5 штамында жоғары нитрогеназа белсенділігі байқалды. Біздің нәтижелерімізде, сонымен қатар, өсуге ықпал ететін заттардың болуы осы цианобактерия жасушаларының өсімдіктердің өсу көрсеткіштеріне пайдалы әсер беретіні анықталды. Сонымен қатар, айта кету керек, Shariatmadari, (2013) зерттеуінде жарияланғандай, кейбір цианобактериялардың клеткалары атмосфералық азотты фиксациялаумен қатар, IAA (индол 3-сірке қышқылы) және IBA (индол 3-бутир қышқылы) фитогормондарын бөлетіндігін хабарлады [221]. Ауксиндер (IBA) – тамырлардың өсуін ынталандыру үшін қолданылатын өсімдік гормоны [222]. Сонымен қатар, кейбір зерттеулерде азотфиксациялаушы

цианобактериялардың өсімдіктердің өсуіне және қоректік заттардың сіңуіне оң әсерін тигізетіні туралы айтылады [223]. *Nostoc* түрлері топырақтағы органикалық заттардың – (С, N және т.б.) мөлшерін жоғарылатып, өсімдіктердің өсуі мен зат және энергия алмасу белсенділігін артырады [221]. Сонымен қатар, цианобактериялардан бөлінетін полисахаридтер топырақтың құрылымдық тұрақтылығына, топырақтың сапасының жоғарылауына және өсімдіктердің қалыпты өсуіне әсер етеді [221].

Біздің зерттеуімізде құлпынайды жоғары тығыздықтағы цианобактерия суспензиясымен суарғанда (5,6-нұсқалар) шамалы төмен көрсеткіштер тіркелді. Келтірілген әдеби материалдарға сәйкес, клеткалардың артық мөлшері топырақтағы зат алмасуды бұзып, топырақтың құрамындағы пайдалы микроорганизмдердің тыныс алуына кедергі келтіруі мүмкін. Сонымен қатар, топырақтың бетіне жиналған клетка биомассасы әр түрлі химиялық заттарды (фитогормондар, биологиялық белсенді заттар т.б.) артық мөлшерде бөлуіне байланысты өсімдіктердің өсуін ингибирлеуі ықтимал. Якоби (2017) зерттеулерінде келтірілгендей, топырақтағы азоттың артық мөлшері өсімдіктің өсуіне теріс әсер етуі ықтимал [218]. Себебі, азотсыз BG-11 қоректік ортасында бір жіпшелі гетероцисталардың максималды жинақталуы 8-12 клеткаға жетуі мүмкін. Дымқыл ортадағы гетероцисталар нитрогеназа ферментінің негізінде ауадағы азотты артық мөлшерде сіңіріп, оны топыраққа бөледі. Сонымен қатар, жоғары клеткалардың концентрациясы топырақтағы ластанудың пайда болуына алып келеді. Осы жағдайда летальді жағдайға ұшыраған цианобактерия клеткаларының артуы бактериялогиялық ластануға да себеп болуы мүмкін.

Цианобактерия штамдарының нитрогеназа ферментінің белсенділігін ацетилен әдісі арқылы зерттеу жұмыстары жүргізілді. Салыстырмалы түрде азот фиксациялау қарқындылығы жоғары *Anabaena variabilis* R-I-5 штамының алты түрлі концентрациядағы суспензиясының құлпынай өсу көрсеткіштеріне (жапырақ саны, бойының ұзындығы, тамыр саны, тамырдың ұзындығы, құрғақ салмағы) тигізетін әсері зерттелінді. Азот фиксациялаушы цианобактерия штамының *Sunrise* T-4 сортының өсуіне тигізетін әсерін зерттеу жұмысында 24×10^6 кл/мл дақыл суспензиясы өсімдіктердің тамырының артуына оң әсерін тигізгені анықталды. Ал, 48×10^6 кл/мл цианобактерия суспензиясы құлпынайдың жапырақ саны, тамыр мен бойының ұзындығы және құрғақ биомассасының жинақталуына оң әсерін тигізді. Жүргізілген зерттеу жұмыстары көрсеткендей, *Anabaena variabilis* R-I-5 штамы құлпынайдың өсуін жақсартып, оны қалыпты азот көзімен қамтамасыз ете алады. Қорытындылай келе, 48×10^6 кл/мл *Anabaena variabilis* R-I-5 цианобактерия суспензиясы құлпынайдың *Sunrise* T-4 сортының өсуіне оң әсерін тигізетіндігі анықталды.

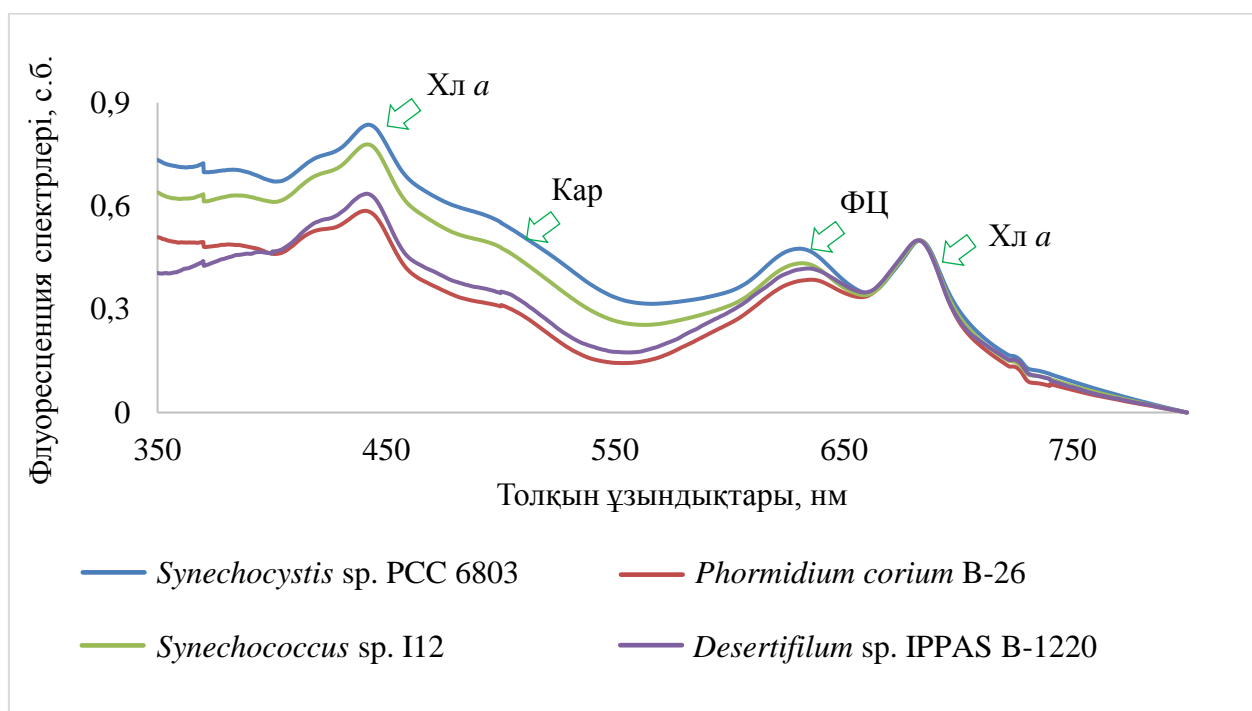
3.2 Цианобактериялардың коллекциялық штамдарының биосутек алуындағы потенциалын зерттеу

3.2.1 Гетероцистасыз цианобактериялардың сутек бөлуін зерттеу

Фототрофты микроорганизмдер стромада орналасқан әр түрлі пигменттердің көмегімен кең спектрлі жарық толқындарын бойына сіңіруге бейімделген. Цианобактерияларда максималды жарықты сіңірудің

салыстырмалы шамаларынан тұратын пигменттер (хлорофиллдер, каротиноидтар және фибобилипротеидтер) тізбегі бар [224, 225]. Ерекше және қарапайым композициялар арқылы пигменттер әртүрлі толқын ұзындығын сіңіре алады. Фототрофты микроорганизмдердегі осы абсорбциялық спектрлерді пайдалана отырып оларды жылдам ажыратуға болады.

Биотехнологияда маңызды фототрофты микроорганизмдердің жаңа, өнімді штамдарын іздеу мақсатында келесідей цианобактериялардың штамдарының жарықты сіңіру спектрлерін зерттедік: *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220, *Synechococcus* sp. I12 және *Phormidium corium* B-26, *Synechocystis* sp. PCC 6803 (сурет 39).



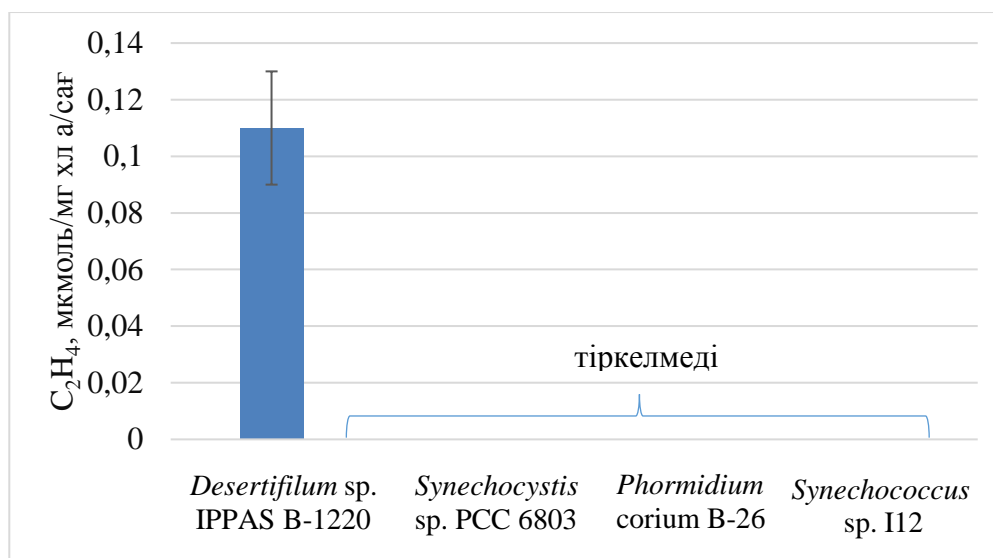
Сурет 39 – Цианобактериялардың әртүрлі штамдарының жарықты сіңіру спектрлері.

Белгілеулер: Хл а – хлорофилл а, Кар – каротиноидтар, Фц – фикоцианин.

Цианобактериялар дақылдарындағы суда еритін пигменттердің сіңіру спектрлері 39-суретте көрсетілген. Спектрлер қоректік заттармен байытылған BG-11 қоректік ортасында өлшелінді және 800 және 686 нм-де минимальді сіңірілуге дейін қалыпқа келтірілді. Тиімді сіңіру спектрлері *in vivo* арқылы анықталды. Зерттелетін цианобактериялар жасушаларының *in vivo* ортада аспалы бөлшектердің шашырауын ескере отырып (Rayleigh шашырауы және М дисперсиясы) әртүрлі цианобактериялар түрлерінің арасында пигмент кешендерінің байланысын тиімді сіңіруде айтарлықтай айырмашылықтар анықталмады. Жалпы алғанда, штамдардың клеткаларының ішіндегі пигменттердің концентрациясы әртүрлі болуы мүмкін, өйткені, пигмент кешендерінің сіңіру қабілеті пигмент-ақуыздар кешеніндегі пигменттердің оралу дәрежесіне тікелей байланысты болып келеді.

Жоғарыда көрсетілген пигменттер көмегімен цианобактериялар әр түрлі жарық толқындарын бойына сіңіріп, нәтижесінде пайда болған электрондарды қорға жинау арқылы, бос протондарды сутек молекулаларын катализдейтін ферменттердің жұмысына пайдаланады. Бұл әрекетті цианобактерияларда екі фермент катализдейді – H_2 аза және N_2 аза.

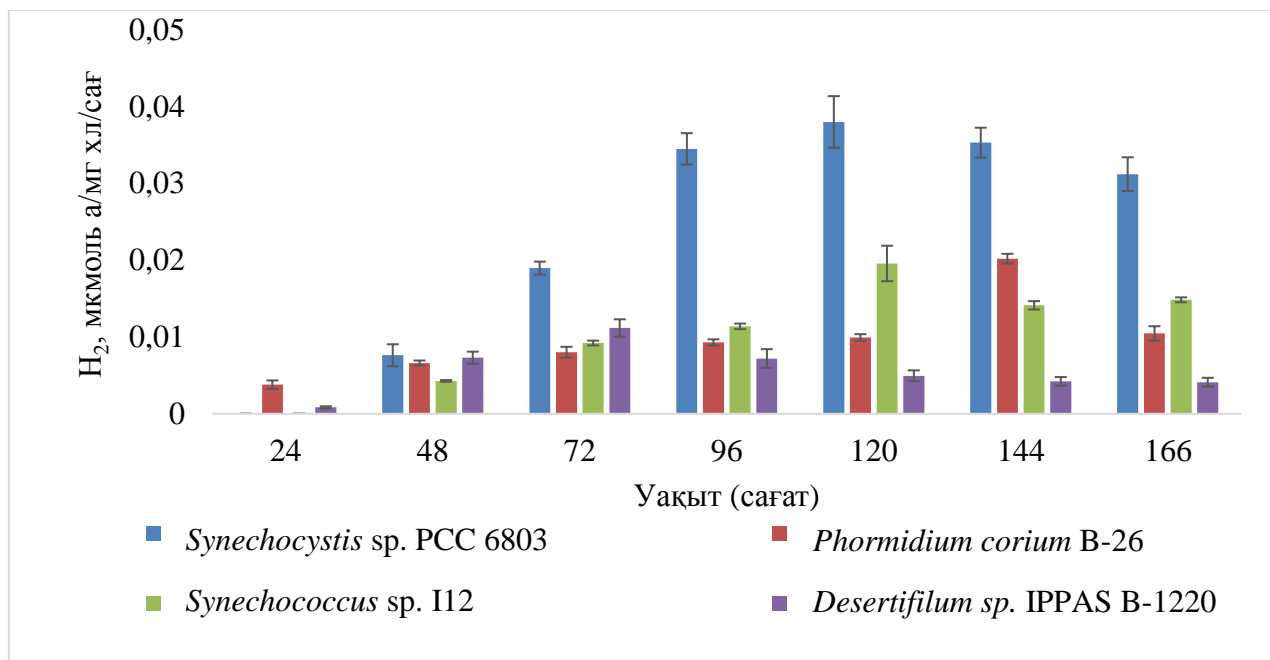
Цианобактериялардың сутек өндіруге белсенділік танытатын штаммын анықтау мақсатында гетероциста түзуге қабілетті емес үш түр зерттелінді: *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220, *Synechococcus* sp. I12, *Phormidium corium* B-26. Ал, *Synechocystis* sp. PCC 6803 штаммы сутекті белсенді түрде өндіретін бақылау объектісі ретінде таңдап алынып, оның сутек бөлу қарқындылығы тәжірибелік үш цианобактерия штамдарымен салыстырылды. Ацетиленді әдіс арқылы жүргізілген зерттеу жұмысы бойынша *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штаммында нитрогеназаның белсенділігі байқалды (сурет 40). Филогенетикалық зерттеулер бойынша *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штаммының вегетативті клеткасының ішінде екі түрлі сутек бөлуші фермент – нитрогеназа және H_2 аза бар екендігі анықталды. Ацетилен әдісі бойынша осы штаммен 24 сағаттан соң этиленнің $0,11 \pm 0,02$ мкмоль этилен/мг хл а/сағ концентрациясы тіркелді. *Synechococcus* sp. I12, *Phormidium corium* B-26 штамдарында этиленнің бөлінуі тіркелмеді. Ацетиленнің этиленге айналмауы цианобактерия штамдарында нитрогеназа ферменті жоқ екендігін көрсетеді [226]. Зерттелінген 4 штамм да клеткада жинақталған энергияны тұтыну мөлшері бойынша болашағы мол штамм ретінде қарастырылды.



Сурет 40 – Гетероцистасыз цианобактерия штамдарының ацетилен әдісімен нитрогеназа белсенділігін зерттеудегі нәтижелер

Зерттеу нәтижелері көрсеткендей, барлық штамдар қараңғыда H_2 бөліп шығаруға қабілеттілік танытты. Ең жоғары өнімділік *Synechocystis* sp. PCC 6803 штаммында тіркелді. Бұл штамның клеткалары ГХ виалдың ішіндегі бос кеңістікті аргонмен алмастырғаннан кейін 24 сағаттан 48 сағатқа дейін қараңғыда H_2 бөлуге қабілеттілік танытты (сурет 41).

H_2 шығымдылығы 24 сағаттың ішінде 0,007 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ көрсеткішті құрады. Осы дақылмен сутектің жоғары дәрежеде жинақталуы 120 сағаттық инкубациядан кейін байқалды және көрсеткіш 0,037 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ тең болды. Эксперименттің келесі сағаттарында сутегі бөлінуінің аздап төмендеуі тіркелді, бұл өз кезегінде клетка ішіндегі гликоген қорының азаюымен тығыз байланысты болуы мүмкін [227, 1].

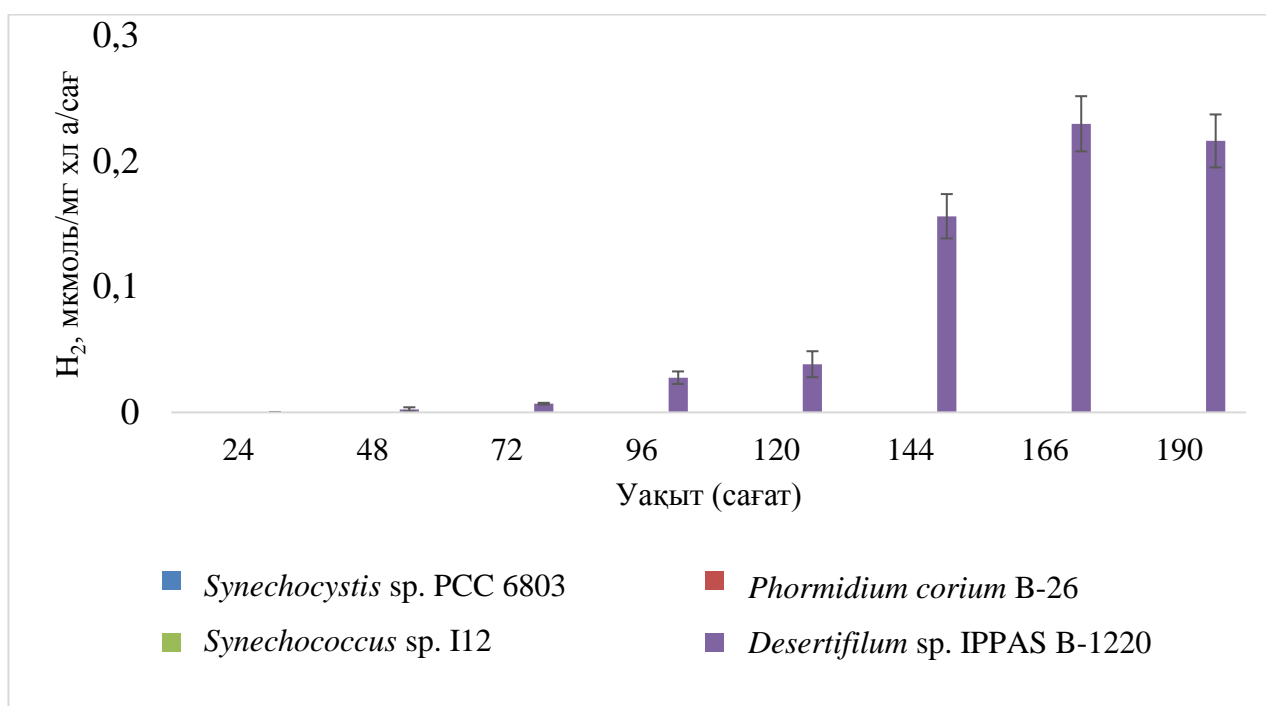


Сурет 41 – Қараңғы ортада цианобактериялардың сутек бөлу қарқындылығын зерттеу

Зерттелген тәжірибелік штамдарда бақылау штамымен салыстырғанда қараңғыда H_2 өнімділігі төмен болды. Тәжірибелік штамдардың арасынан *Phormidium corium* B-26 және *Synechococcus* sp. I12 сутектің салыстырмалы түрде көп мөлшерін бөліп шығарды. Осы екі штам бір-біріне жақын H_2 шығару мөлшерімен сипатталды. 24 сағаттан кейін *Phormidium corium* B-26 клеткаларынан H_2 жиналуы 0,003 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ көрсеткішті құрады, сутектің бөлінуі 144 сағаттан кейін 0,02 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ дейін жоғарылады. *Synechococcus* sp. I12 штамының максималды түрде сутек шығарылуы 120 сағаттық инкубациядан кейін тіркелді (0,019 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ). Зерттелген цианобактерия штамдарының арасында *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 қараңғыда ең аз H_2 мөлшерін бөлді (H_2 максималды өнімі = 0,111 мкмоль H_2 /мг хл/сағ). Алайда, бұл мән 72 сағаттық инкубациядан кейін тіркеліп, келесі тәуліктерде H_2 шығарылымы біртіндеп азайды (сурет 41).

Бұдан әрі, жарық жағдайында цианобактерия штамдарының H_2 бөлу көрсеткіші зерттелінді. Себебі, жарық энергиясы H_2 шығару үшін маңызды және тікелей биофотоллиз үшін электрон доноры ролін атқарады. Тікелей биофотоллиз процесі цианобактериялардың фотожүйе 2 құрылымы арқылы клетка құрамындағы суды H^+ және O_2 -ге жарық энергиясын қолдана отырып бөлу

қызметін атқарады. Жарық энергиясы цианобактериялардың фотожүйелерінде орналасқан пигменттер арқылы қабылданып клеткаға енеді, содан соң, ол ФЖ2-дегі H_2O молекулаларының тотығуын күшейтеді, осы процесс негізіндегі босатылған протондар АҮФ синтезін белсендіру үшін қолданылады, ал электрондар ФЖ1 арқылы хлоропласт-ферредоксинге тасымалданады. Фд [FeFe]-гидрогеназасы үшін электрон беруші донор рөлін атқарғандықтан, бұл клеткадағы протондарды H_2 молекуласына дейін қалпына келтіруге көмектеседі. Бұл тәжірибеде де цианобактериялардың штамдары қараңғы ортадағы тәжірибеге ұқсас дақылданды және сутегі бөлуін зерттеуде клеткалық инкубация шарттары бірдей болды, тек жарықтың берілуімен ғана ерекшеленді. Жүргізілген эксперимент нәтижесі бойынша, жарықта тек *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамы ғана сутек бөлуге қабілеттілік танытты (сурет 42).



Сурет 42 – Жарық ортада цианобактериялардың сутек бөлу қарқындылығын зерттеу

Desertifilum sp. IPPAS B-1220 штамымен анаэробты жағдай құрылғаннан бастап 24 сағаттың ішінде сутек бөлінуі тіркелмеді (сурет 42). Ал, екінші тәуліктен бастап H_2 өндірісі байқалып, ол 6 тәулік ішінде белсенді түрде бөлінді және келесі тәуліктерде аздап төмендеу тіркелді. Сутегі жинақтаудың ең жоғары көрсеткіші 166 сағаттан кейін байқалды және ол 0,299 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ құрады.

Айта кету керек, H_2 жиналуы қараңғыда салыстырмалы түрде жоғары болғанына қарамастан жарық жағдайындағы сұрыптау кезінде бақылау штамымен бірге қалған 2 штамм да H_2 түзбеді. *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамының H_2 шығаруы қараңғыға қарағанда жарықта 20 есе көп болды және *Synechocystis* sp. PCC 6803 бақылау штамынан алты есе жоғары болды.

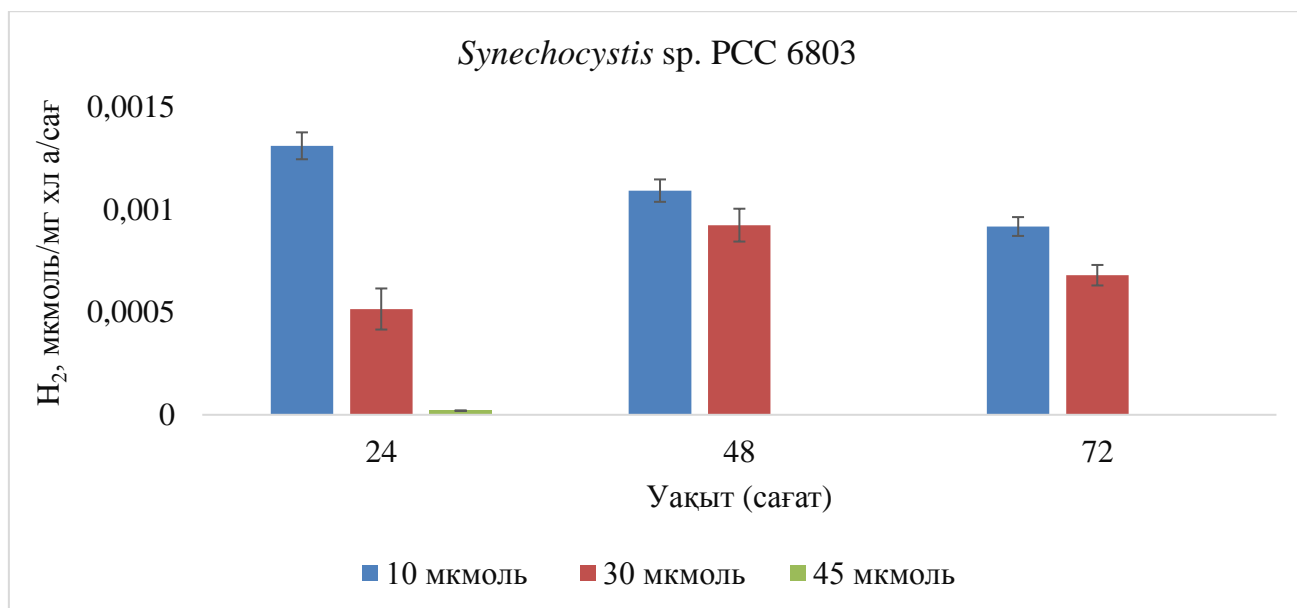
Осылайша, зерттелген штамдар арасында *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 жарықта H_2 бөлу бойынша жоғары болды.

3.2.2 Диурон ингибиторының әсерін зерттеу

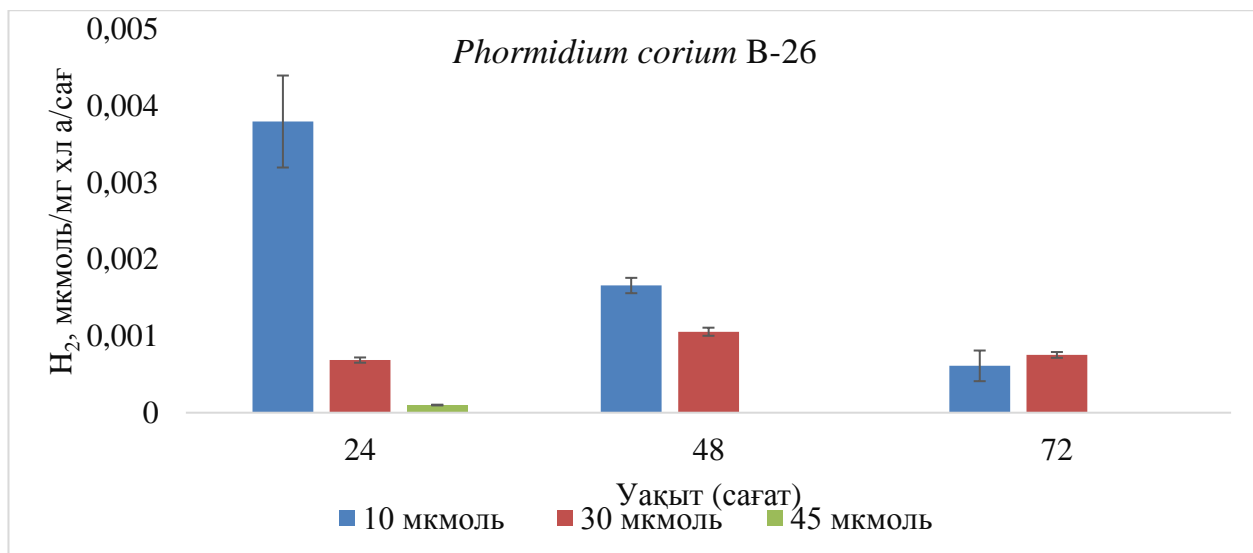
Фотосинтез ингибиторы диуронның жарықта цианобактерия штамдарының сутек бөлу қарқындылығына әсері зерттелді. Диуронның құрылымы, электронды тасымалдаудың ингибиторы ретінде, қысқартылған пластокинонның құрылымына ұқсас болып келеді және ол ФЖ2 реакция орталығындағы хинон байланыстырушы аймақтағы молекулалардың өзара байланысын шектейді.

DCMU фотожүйе 2-нің белсенділігін тежеу және H_2 молекулалық өндірісін басатын оттегінің концентрациясын азайту арқылы анаэробты жағдай жасау үшін қолданылады. Цианобактериялық штамдардың суспензиясына анаэробты жағдайды құрған соң DCMU бір рет қосылды, содан кейін оның сутегі жинақталуына әсері әр 24 сағат сайын 3 тәулік бойы зерттелінді.

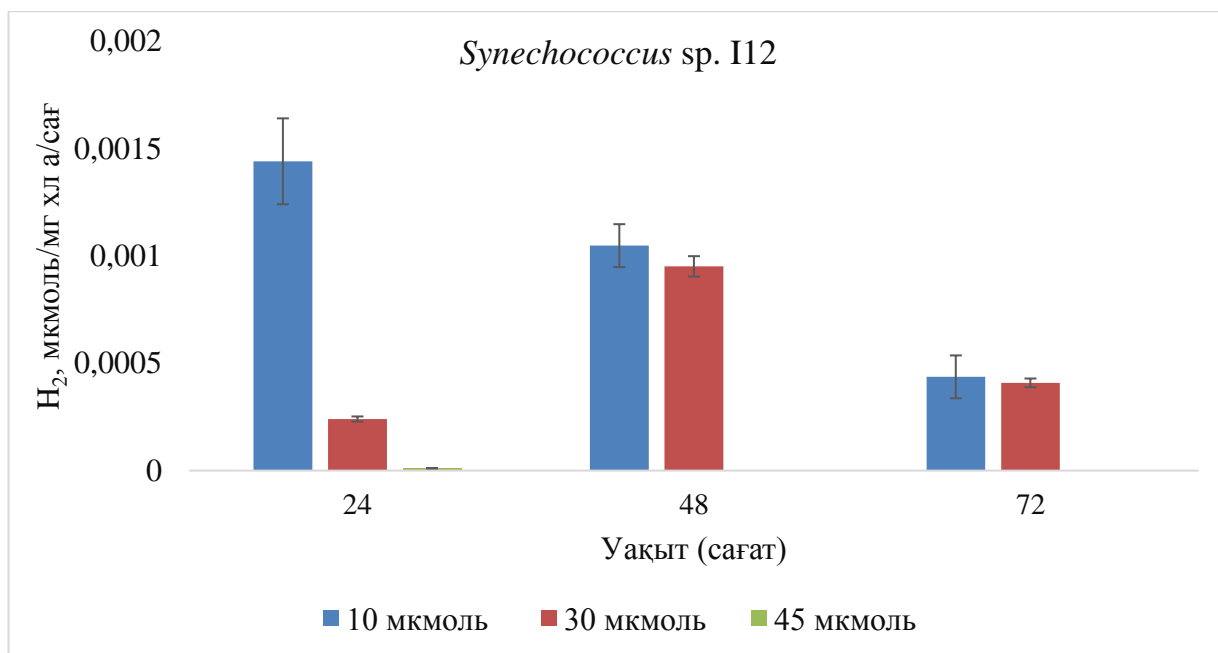
Алынған нәтижелерге сәйкес, барлық зерттелген штамдарда сутектің ең жоғары шығымы 10 мкмоль және 30 мкмоль DCMU концентрацияларында 24-48 сағаттан кейін ортада оттегі азайған кезде байқалды, ал келесі тәуліктерде сутегі концентрациясының төмендеуі тіркелді (43-46 суреттер).



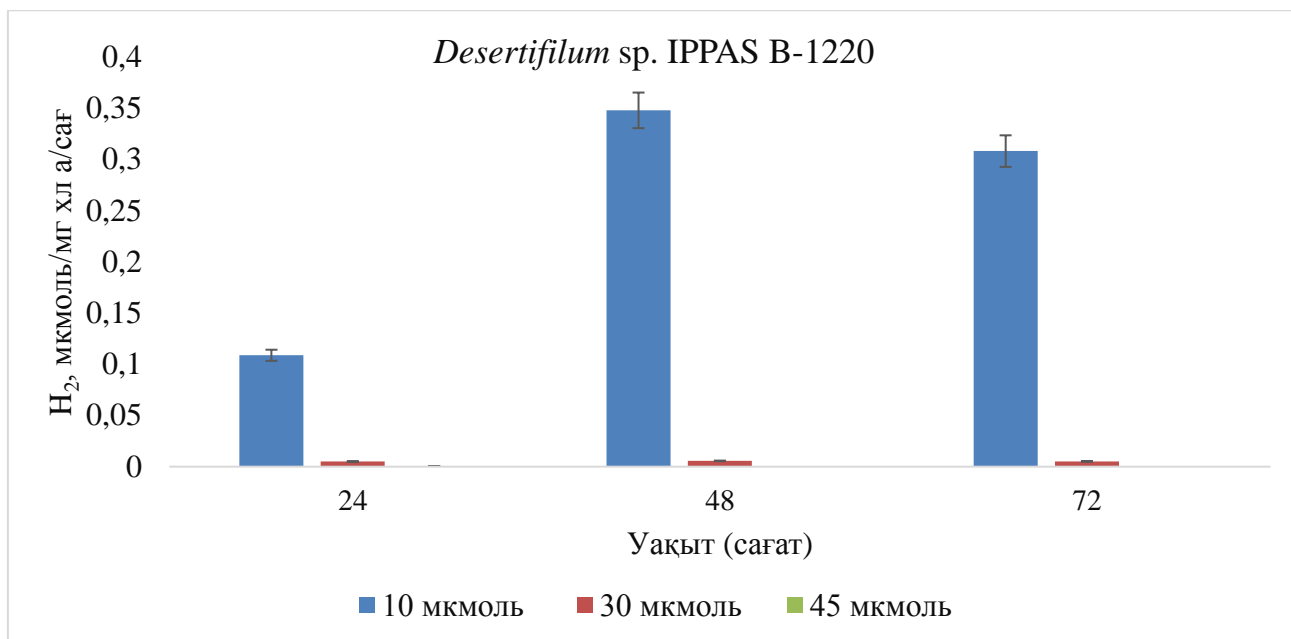
Сурет 43 – Диуронның үш түрлі концентрациясының *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамының сутек бөлу қарқындылығына әсерін зерттеу



Сурет 44 – Диуронның үш түрлі *Phormidium corium* B-26 штамының сутек бөлу қарқындылығына әсерін зерттеу



Сурет 45 – DCMU ингибиторының үш түрлі концентрациясының *Synechococcus* sp. I12 штамының сутекті бөлуіне әсерін зерттеу



Сурет 46 – DCMU ингибиторының үш түрлі концентрациясының *Desertifilum sp. IPPAS B-1220* штамының сутекті бөлуіне әсерін зерттеу

Зерттелген цианобактерия штамдары 10 мкмоль DCMU концентрациясында басқа түрлермен салыстырғанда жоғары мөлшерде сутек бөліп шығарды. Бұл жағдайда *Synechocystis sp. PCC 6803* штамының H₂ шығымдылығы 24 сағаттан кейін 0,0013 мкмоль H₂/мг хл а/сағ құраса, ал 48-72 сағ-тан кейін 0,001-0,0009 мкмоль H₂/мг хл а/сағ тіркелді. *Phormidium corium* B-26 клеткалары 24 сағаттан кейін 0,003 мкмоль H₂/мг хл а/сағ бөлді, ал 48 сағаттан кейін 0,0016-0,0007 мкмоль H₂/мг хл а/сағ дейін төмендеді. Осындай көрсеткіштер *Synechococcus sp. P12* тәжірибелік штамы үшін де алынды, H₂ жинақталуы 24 сағаттан кейін 0,001 мкмоль H₂/мг хл а/сағ болды. Ал, келесі тәуліктерде H₂ концентрациясының төмендеуі байқалды. Осы ингибитордың концентрациясында *Desertifilum sp. IPPAS B-1220* штамы сутекті ең жоғары дәрежеде бөлуге қабілеттілік танытты.

Осылайша, 48 сағаттан кейін H₂ фотопродукциясы 0,348 мкмоль H₂/мг хл а/сағ құрады, ол 72 сағаттан кейін 0,308 мкмоль H₂/мг хл а/сағ дейін төмендеді. Айта кету керек, фотосинтез ингибиторының әсер етуі жарық жоқ жағдайда сутектің бөлінуіне оң әсер етпеді.

Сонымен қатар, бұл фотосинтез ингибиторы сутектің бөлінуіне қысқа мерзімде (2 тәулік ішінде) ынталандырушы әсер етіп, ұзақ мерзімде сутек бөлуді жалғастыру молекулалық H₂ фотопродукциясының төмендеуіне әкелді. H₂ фотопродукциясындағы диуронның ингибиторлық әрекеті оның ФЖ2-ге токсикалық әсерінен H₂ түзілу жолының артуымен тығыз байланыста болды. Анықталғандай, клеткаға бөлініп шыққан оттегі өз кезегінде H₂аза және N₂аза ферменттерінің белсенділігін төмендетіп, соның нәтижесінде, H₂ фотопродукциясы басылады. Бұған анаэробты жағдайда *Desertifilum sp. IPPAS B-1220* штамынан 10 мкмоль DCMU концентрациясында ГХ виал ішіне клеткадан бөлініп шыққан үш газдың (яғни оттегі, сутегі және азот) жинақталуы дәлел бола алады. 10 мкмоль DCMU концентрациясындағы анаэробты жағдайда

алғашқы 2 тәулікте *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамы сутекті белсенді түрде шығарды, ал 3-ші тәулікте сутектің шығарылымы төмендеді және оттегінің, азоттың көлемімен салыстырғанда өндіріс мөлшерінің айтарлықтай өсуі байқалды. Диурон фотосинтез ингибиторының 30 мкм және 45 мкмоль концентрациясы цианобактерия клеткаларының өсуін тоқтатып, сутектің бөлінуін азайтты. Сонымен қатар, 30 мкмоль DCMU концентрациясында цианобактериялар клеткалары шығаратын сутегінің максималды төмен мәндері алынды. 30 мкм тәжірибесінде *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамының сутекті максималды бөлуі 0,005 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ құрады, бұл 10 мкмоль DCMU концентрациясымен салыстырғанда 61 есе төмен болды. Қалған цианобактерия штамдары фотосинтез ингибиторының осы концентрациясында молекулалық сутектің әртүрлі мөлшерін көрсетті. Алайда, барлық зерттелген штамдар тәрізді, сутектің максималды бөлінуі диуронның берілген 30 мкмоль концентрациясында едәуір төмен болды. *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамында H_2 максималды жинақталуы 2 тәуліктен кейін 0,0009 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ құрады. *Phormidium corium* B-26 және *Synechococcus* sp. I12 үшін бұл көрсеткіштер, сәйкесінше, 0,001-0,0009 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ құрады.

45 мкмоль DCMU кезінде барлық зерттелген штамдарда сутектің бөлінуі байқалмады. Осылайша, H_2 өндірісі үшін DCMU-нің оңтайлы концентрациясы 10 мкмоль құрады. DCMU цианобактериялар жасушалары арқылы H_2 -нің «фотобөлінуін» алғашқы 2 тәулік ішінде қоздыратыны, содан кейін кері әсер ететіндігі анықталды.

Сутек әлемде жоғары сапалы электр энергиясының көзі ретінде пайдаланылады. Микроорганизмдерден алынған сутек оттеппен реакцияға түсуі барысында электр көзі мен суға бөлінеді. Болашақта цианобактериялар H_2 энергиясының потенциалды көзі ретінде пайдаланылуы мүмкін, себебі, бұл организмдер суды H^+ және оттегіге күн энергиясын пайдалана отырып бөле алады [228, 229]. ФЖ2 нәтижесінде бөлінген протондар сутек бөлуші ферменттердің жұмысының активтенуіне ықпал жасайды. Сонымен қатар, бірқатар микробалдырлар қараңғыда сутекті ферментативті түрде бөлуге қабілеттілік таныта алады. Мұндай өндіріс биотехнологиялық тұрғыда тиімді және аз энергияны қажет етеді. Алайда, қазіргі уақытта цианобактериялардан алынған сутек энергиясының шығыны жоғары болуына байланысты экономикалық тұрғыда тиімсіз болып отыр. Осыған байланысты цианобактериялар арқылы жүзеге асатын биосутектің өндірісін метаболиттік және ген-инженериялық жұмыстар жасау арқылы жеделдетуге болады [230, 231]. Осы тұрғыда, сутек бөлуге қабілетті цианобактериялардың белсенді штамдарын жасап шығару – осы салада тұрған ең басты міндеттердің бірі болып табылады.

Сутекті цианобактериялар арқылы фотопродукциялауда жарық энергиясы екі маңызды үдерісті жүзеге асырады: 1) фотосинтетикалық электронды реакциялық орталықтардан гидрогеназаға немесе нитрогеназа жеткізу және 2) оттегінің ФЖ2-ге ауысуын жүргізеді, бұл өз кезегінде гидрогеназаның белсенділігі мен фотобөлінудің жылдамдығына әсер етеді. Бұған дейінгі жүргізілген зерттеулер мұхиттан бөлініп алынған *Oscillatoria limosa* strain 23 штамының тікелей биофотоллиз нәтижесінде H_2 белсенді түрде өндіретінін жазды

[232]. Сонымен қатар, *Phormidium valderianum* strain BDU 20041 штамы бірнеше сағат ішінде тікелей және жанама биофотоллиз арқылы H_2 көп мөлшерін синтездеді. [233]. Бурроус және т.б. (2008) сәйкес [234], жанама биофотоллиз процесінде, атмосферадағы азотты фиксацияламайтын *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамы сутекті $18,4$ мкмоль H_2 /мг хл а/сағ көрсеткішінде максималды жылдамдықпен өндірді. Алынған мәліметтерге сәйкес, барлық зерттелген цианобактерия штамдары белгілі бір дәрежеде анаэробты қараңғы жағдайда сутекті бөліп шығарады, ал ең жоғары өнімділік бақылау ретінде алынған жабайы түр *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамында байқалды. Нитрогеназаның әсерімен сутегі бөлетін цианобактериялар фотосинтез негізінде қорда сақталатын қантты ашыту кезінде қараңғыда сутекті шығаруға қабілетті екендігі белгілі [201]. Біздің нәтижелерімізді сараптай келе, 24 сағаттық инкубациядан кейінгі жасушалардағы гликоген қоры мен H_2 аза белсенділігінің деңгейі қараңғы анаэробты жағдайда H_2 алу үшін жеткілікті болды деп болжауға болады.

Бұл жағдайдағы сутектің бөлінуі фотосинтез үдерісінің нәтижесінде жинақталған гликоген арқылы жүзеге асады. Осы тұрғыда клеткадағы Нох-гидрогеназа ферменті жинақталған гликоген қорын бастапқы субстрат ретінде пайданалады деп болжауға болады. Цианобактериялар биомассаны өндіру және қорға заттарды жинақтау үшін клеткаға бағытталған жарық энергиясын қолданатын болғандықтан, зерттелінген штамдар қоректік ортада азот жетіспеушілігі жағдайында фотосинтез негізінен эндогендік аккумуляция жүргізу үшін қордағы гликогенді пайдаланады. Осы үдерістен кейін қараңғыда гликогеннің ферментациясы цианобактериялар клеткалары арқылы сутектің шығымын едәуір арттырады. Кейін қараңғы ортадағы цианобактерия клеткалары арқылы жүретін гликогеннің ферментациясы сутектің шығымын едәуір жоғарылатады. Осыған ұқсас мәліметтерді бірқатар зерттеушілер алды [235], онда бірклеткалы ауадағы азотты түзе алмайтын *Gloeocapsa alpicola* өсіру кезінде нитраттың жетіспеушілігі жағдайында жинақталған гликоген жарық кезінде құрғақ биомасса салмағының 40-50%-на дейін өседі, алайда, нитраттың қалыпты концентрациясы гликоген мөлшерінің 10%-нан аспады [181]. Қараңғыдағы ферментация кезінде бір моль глюкозадан шамамен 4 моль сутек, 2 моль көмірқышқыл газы және 2 моль ацетат синтезделеді [181].

Фотосинтез үдерісінің негізінде пайда болатын оттегіні сутегі өндіру механизмінен бөлу жұмыстары өте маңызды бөліп көрінуі мүмкін, дегенмен, осы тұрғыда жүргізілген зерттеу жұмыстары әлі күнге дейін нақты нәтижелі көрсеткіштерге жете алмады.

Біздің зерттеуімізде анаэробты жарық жағдайындағы белсенді сутегі өндірісі тек *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 жабайы штамымен ғана тіркелді. Сонымен қатар, *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамы сутекті жарықта қараңғыға қарағанда 20 есе, ал *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамымен салыстырғанда 6 есе көп бөлетіні белгілі болды. *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 клеткаларында сутегі өндірісі анаэробты жарық процедурадан кейінгі екінші тәулікте байқалды. *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 клеткасының құрамында N_2 аза және H_2 аза ферменттері болғандықтан, анаэробты жағдайда жарық астында сутегінің жоғарғы тұрғыда өндірілуінің мүмкін болатын түсіндірмесі – қалыпты өсіру

жағдайынан азотсыз ортаға көшу кезінде клеткалардағы нитрогеназаның индукциясы болып табылады. Әдебиет деректеріне сәйкес, көп клеткалы цианобактериялар: *Synechocystis* sp. strain RF-1, *Synechococcus* sp strain Miami BG43511, *Gloethece* sp. strain ATCC51142 штамдарын ауыспалы ашық-қараңғы режимде өсіру кезінде нитрогеназа ферментінің белсенділігі байқалды, бұл жерде фотосинтез және тыныс алу үдерістерінің циркадиялық бақылауда болатыны анықталды [236]. Циркадиялық ырғақ ауадағы азотты сіңіру, тыныс алу және фотосинтездің максималды белсенділігін қадағалайды, сонымен қатар, нитрогеназаның оттегіден қорғану қызметін де атқаруы ықтимал. Бірқатар цианобактериялар жарық ортада нитрогеназа және гидрогеназа арқылы сутекті шығаруға қабілетті. Бір клеткалы цианобактерия *Cyanothece* sp. Miami BG 043511 [237] сутекті қараңғы, аэробты ортада гликолиттік көмірсулардың катаболизмінен алынған тотықсыздандырғышты пайдаланып H_2 аза арқылы жүретін аутоферментация процесі арқылы бөліп шығарады, ал нитрогеназаға негізделген сутектің фотопродукциясы ФЖ1-дегі реакциялық орталықта орналасқан пигменттер арқылы қабылданған жарық энергиясының негізінде пайда болатын электрондармен жүзеге асуы мүмкін. Алынған нәтижелерге сәйкес, *Cyanothece* sp. Miami BG 043511 штамы қараңғыда клеткаішілік оттегінің концентрациясының төменгі деңгейін циркад циклінің көмегімен сақтай алады. Осылайша, бұл штамның тыныс алу метаболизмінің жоғары және оның ферменттік кешенінің ерекше қасиетінің болуы нитрогеназаның оттегі кедергісіз жұмыс істеуіне алып келіп, сутекті жоғары мөлшерде бөлуге мүмкіндік береді [237]. Осы жоғарыда келтірілген ақпараттарға сүйене отырып зерттелінген *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамының басқа түрлермен салыстырғанда сутегі бөлу қабілеті неліктен басым екендігін түсіндіруге болады. Осы күнге дейін *Desertifilum* түрлерінің штамдарының молекулалық сутекті бөлуі зерттелмегенін атап өткен жөн. Бұл түр осциллятория түрлеріне жақын және нәтижелер қосымша зерттеуді қажет етеді.

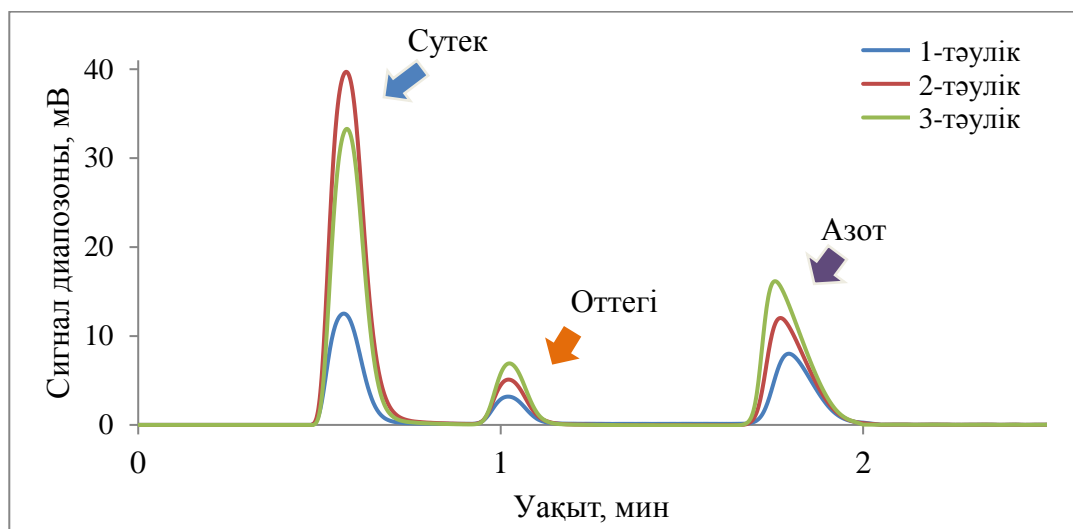
H_2 молекуласының белсенді өндірушілерін таңдап алудан басқа, бұл бағыттағы маңызды фактор – әр түрлі цианобактериялар арқылы H_2 өндірісінің белсенділігін арттыруға бағытталған ғылыми зерттеулер болып табылады. Сондықтан, цианобактерияларды өсіруді оңтайландыру субстраттың H_2 -ге айналу тиімділігін арттыру үшін қажет. Демек, H_2 шығарылуын ынталандыратын әртүрлі клеткалық факторларды анықтау маңызды болып табылады. Осыған байланысты H_2 бөлінуін ынталандыру үшін биосутек шығарылуына ықпал ететін фактор ретінде жарық астында фотосинтез ингибиторының (DCMU) әр түрлі концентрациясының (10 мкмоль, 30 мкмоль, 45 мкмоль) әсерін зерттедік.

Диурон – электронды тасымалдаудың кеңінен қолданылатын ингибиторларының бірі, оның молекулалық құрылымы біртіндеп қысқарған пластокинонның құрылымына өте ұқсас, бұл ФЖ2 реакция орталығындағы хинонның байланысына әсер етеді. DCMU қолдану осы фотожүйе 2-нің белсенділігін тежеуге және молекулалық сутек өндіруге қолайлы анаэробты жағдай жасауға бағытталған. Хинондық аналог болып табылатын диурон QB және ФЖ2-мен байланысады, бірінші және екінші реттік акцепторлар

арасындағы электрондардың қозғалысын блоктайды. Бұл фотосинтез кезінде электрондардың фотосинтетикалық сызықтық, электрондық тізбегіне кедергі келтіреді, осылайша, ФЖ2 арқылы су молекулаларының бөлінуі мен оттегінің түзілуін азайтады.

Дегенмен, диуронның әсер етуі әр түрлі штамдарда әрқалай болуы мүмкін, осы тұрғыда, оңтайлы әсер ететін концентрациясын таңдап алу – сутек өндірісінің маңызды зерттеу жұмыстарының бірі болып табылады.

Біздің нәтижелеріміз бойынша 10 мкмоль DCMU концентрациясы сутектің жинақталуына оң ықпал етті. Күтілгендей, ингибитордың қатысуымен болған экспериментте молекулярлы сутектің бөлінуі тек жарықтың астында жасалған тәжірибемен салыстырғанда жоғары болды.



Сурет 47 – *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамымен 10 мкмоль диурон концентрациясында газдардың (H₂, N₂ және O₂) бөлінуі

47-суретте 10 мкмоль концентрациясында дақылданған *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамының сутек, оттегі, азот бөлу көрсеткіштері көрсетілген. Диуронмен әсер еткеннен кейін сутек мөлшерінің 2-ші тәулікте жоғары болғанын көруге болады. Оттектің және азоттың мөлшерінің аздап өскенін көруге болады. Ортадағы азот пен оттегінің аз мөлшерінің өзі, сутек ферменттерінің деактивациясына алып келуі мүмкін [238].

Бізбен алынған нәтижелер көрсеткендей, DCMU цианобактерия клеткаларының сутегі өндірісін ұлғайтады және басқа зерттеушілердің мәліметтеріне сәйкес келеді [239, 238, 240]. Фотосинтетикалық электрондарды тасымалдауды ингибитор арқылы бұғаттау жұмыстары *Anabaena siamensis* TISTR 8012 цианобактериясында жүргізілді және жұмыстың нәтижесі бойынша сутегі өнімділігі біршама жоғары болды [92]. Жүргізілген жұмыстың нәтижелері бойынша азотфиксациялайтын *Anabaena siamensis* TISTR 8012 штамымен H₂-нің ең жоғары көрсеткіші жарықтың астында диуронды қосқаннан соң тіркелді. Алайда, олар қолданған DCMU концентрациясы бірнеше есе жоғары және 50 мкмоль құрады, бұл цианобактериялардың кейбір түрлерінің қасиеттеріне

байланысты екенін атап өткен жөн. Байқалған H_2 өндіру жылдамдығы 22 ммоль H_2 /мг хл а/сағ құрады, бұл бақылау штамдарына қарағанда шамамен төрт есе жоғары болып келеді.

Коурнак және т.б. (2004) қараңғы, анаэробты жағдайда 75 мкмоль DCMU концентрациясында көп клеткалы цианобактерия *Synecocystis* sp. PCC 6803 клеткаларында H_2 салыстырмалы түрде жоғары бөлетіні туралы жазды [181].

Біздің зерттеулерімізде диурон ингибиторы қосылған клеткалар DCMU 10 мкмоль концентрациясында сутекті жоғары мөлшерде бөлетіні байқалды. Осылайша, зерттелген штамдар арасында диурон қосылған түрлері бақылаумен салыстырғанда біршама көп мөлшерде H_2 бөлді. Алайда, DCMU концентрациясының жоғарылауы және ұзақ мөлшерде әсер ету молекулалық H_2 фотопродукциясын азайтты, бұл ингибитордың улы әсерімен тығыз байланысты болып келеді. DCMU концентрациясы 30 мкмоль болған кезде H_2 максималды шығымы төмендеді. 45 мкмоль DCMU-ді клетка суспензиясына қосу барлық зерттелген штамдардың H_2 фотопродукциясын толықтай басуға әкелді. Бұл эффект H_2 фотопродукциясы үшін пластокинон (PQ) бассейні мен ферредоксиндер (Фд) арасындағы аймақтағы фотосинтетикалық электронды тасымалдауға нақты қажеттілікті көрсетеді. Жалпы, концентрацияның жоғарылауымен және ингибиторға ұзақ әсер етуімен өңделген жасушалардағы H_2 -нің аздап шығуы, НАДФ-тен Фр-нің жоғары мөлшерде кері кетуіне байланысты болуы мүмкін. Сондай-ақ, ферментативті ашыту реакциялары арқылы сутектің төмен өндірісі тіркелуі мүмкін.

Осылайша, зерттеу барысында сутегіні бөлу үдерісін ынталандыратын DCMU фотосинтез ингибиторының оңтайлы концентрациясы 10 мкмоль болатындығы анықталды. DCMU алғашқы 2 тәулік ішінде цианобактерия клеткаларымен сутектің фотобөлінуін ынталандыратыны, содан кейін оның қарсы әсері байқалатыны анықталды. Стимуляциялық әсерден кейін DCMU-дің сутектің фотопродукциясына әсер етуі ФЖ2-ге тәуелсіз сутегінің шығарылу жолының басылуымен, оның токсикалық әсерімен, ортаға оттегінің бөлінуіне алып келеді, бұл өз кезегінде қосымша сутектің фотопродукциясын тежейді.

Қорытындылай келе, *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамы өсу қабілетіне байланысты, сутегі метаболизмінің жеткілікті ферментативті жүйесіне ие және клеткаішілік жағдайларды сақтай алады, бұл сутекті белсенді түрде шығаруға мүмкіндік береді. Сонымен қатар, цианобактериялардың жарық көзін пайдалана отырып сутек молекуласын сыртқы ортаға бөліп шығару реакциясы болашағы бар үдеріс ретінде үлкен қызығушылық тудырады.

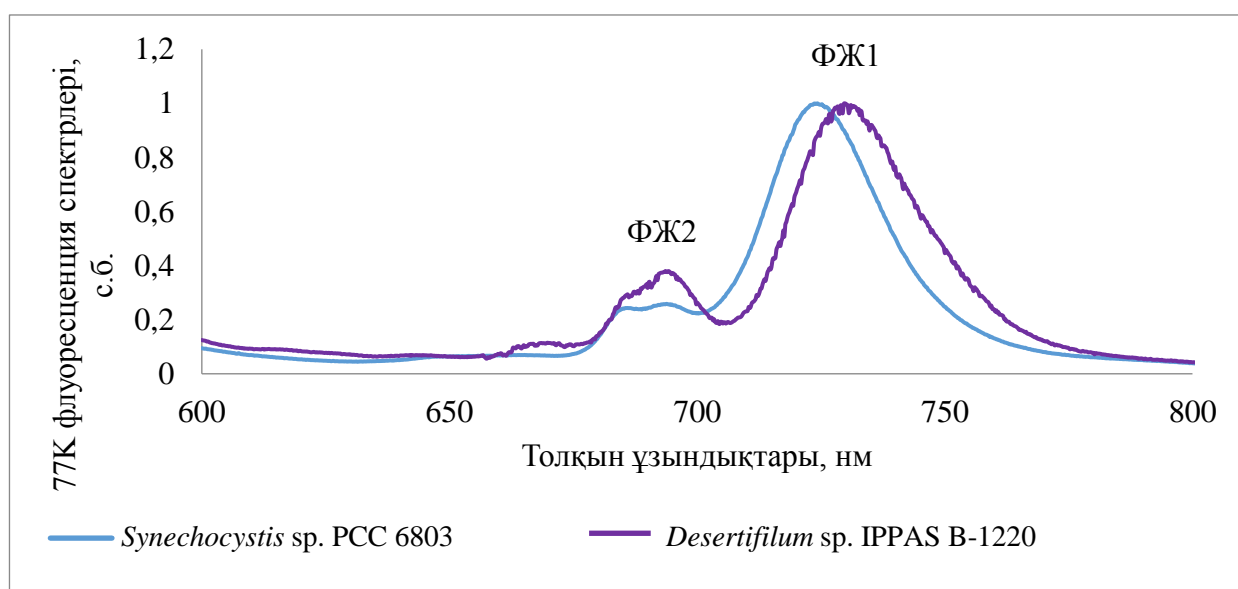
Фототрофты микроорганизмдерден сутегі алу әдісі – биотехнологияның пайдалы бір саласы болып табылады. Биосутекті бөлуде белсенді түрлерді сұрыптау жұмыстары және сутектің фотобиологиялық өндірісінің штамдарының генетикалық жұмыстарының стратегияларын құру сияқты ғылыми зерттеу жұмыстарын жүргізудің маңызы зор болып табылады. Осы негізде, біздің зерттеуіміздің мақсаты – цианобактериялар арасында перспективті сутегі өндірушілерді табу және осы биосутегі өндірісін ұлғайту жұмыстарын жүргізу болды. Алынған нәтижелер бойынша *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамында сутектің жоғары жинақталуы байқалды, ол қараңғыда 120 сағат ішінде 0,037

мкмоль H_2 /мг хл а/сағ өндірді. Сонымен қатар, *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 сутек ферменттерімен жарықта 166 сағат инкубациядан кейін 0,229 мкмоль/мг хл/сағ H_2 молекулалары катализденді. DCMU концентрациясы 10 мкмоль кезінде (0,348 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ) *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамының сутек бөлуін 1,5 есе ұлғайтты. Алынған нәтижелер цианобактерияларды жарық энергиясын молекулалық сутекке, яғни, тиімді экологиялық таза отынға айналдыруға қабілетті түрлер ретінде әрі қарай зерттеу қажеттілігін көрсетеді.

3.2.3 Зерттелген штамдардың флуоресценция спектрінің белсенділігін анықтау

Флуоресценттік зерттеулердің нәтижелері барлық зерттелген цианобактериялар штамдарының ішінде *Synechocystis* sp. PCC 6803 және *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 ең жоғары мөлшерде H_2 -ні өндіретінін көрсетті. *Synechocystis* sp. PCC 6803 жабайы түрдегі штам, оң бақылау ретінде таңдалды және қараңғыда анаэробты жағдайда H_2 жинайтын белсенді H_2 өндірушісі ретінде сипатталды. *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 жабайы штамы жарықта анаэробты жағдайда H_2 молекулалық белсенді түрде шығарды (сурет 48).

Алынған флуоресценттік сәулелену спектрінің 77 К-ге сәйкес зерттелетін цианобактериялар штамдарында ФЖ1 және ФЖ2 пигментті-ақуызды кешендерінің реакциялық орталықтарының ара-қатынасы анықталды. *Synechocystis* sp. PCC 6803 және *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 жоғары ФЖ1/ФЖ2 коэффициенттеріне ие болды, бұл ~730 нм толқын ұзындығында флуоресценция қарқындылығының жоғарылауынан көрінеді.



Сурет 48 – *Synechocystis* sp. PCC 6803 және *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамдарының 77К флуоресценция спектрлері
Белгілеулер: ФЖ2 – фотожүйе 2, ФЖ1 – фотожүйе 1

Synechocystis sp. PCC 6803 және *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 үшін 77 К температурада флуоресценттік эмиссия және флуоресценттік қоздыру

спектрлері 48-суретте көрсетілген. Қоздыру кезінде 435 нм-де сәйкесінше ФЖ2 және ФЖ1 хлорофилл молекулаларынан туындайтын үш сипаттамалық жолақтарда – 686, 695 және 725-730 нм анық шешілді. ФЖ ең жоғары максимумы сәйкесінше *Synechocystis* sp. PCC6803 және *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220-де 726,6 және 727,4 нм болды. Бұл қызыл-хл а саны бір-бірінен өзгеше екенін білдіреді. ФЖ1/ФЖ2 комплекстеріндегі F685/F725 рациондары бір-біріне жақын екеніндігін көрсетті.

Жоғарыдағы сызықтық линиядан екі штамның да флуоресценттік белсенділігі бір-біріне жақын екенін көруге болады. *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамының ФЖ2 және ФЖ1 хлорофилл молекулаларының белсенділігі жоғары екендігі анықталды.

3.3 Гетероцисталы цианобактерия штамдарының сутек бөлуін зерттеу

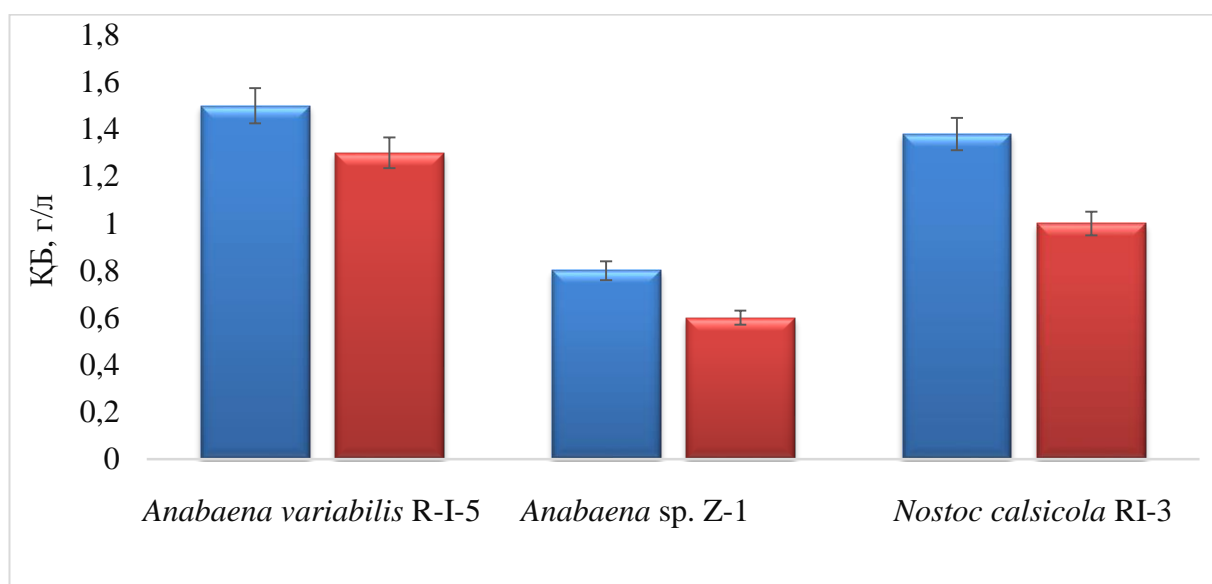
Фотобиологиялық сутегі өндірісінде азот фиксациялаушы гетероцисталы цианобактерияларды қолдану – болашағы мол әдіс болып табылады. Олар электронды донор ретінде суды қолдана отырып, анаэробты/аэробты жағдайда H_2 өндіруге бейімделген. Бұл цианобактериялардағы сутегі өндірісі кем дегенде үш ферменттер арқылы катализденеді: нитрогеназа, сіңіру гидрогеназасы және екі бағытты гидрогеназа. Кейбір зерттеушілер гидрогеназаны жоғары энергия тиімділігіне байланысты сутегі өндірісіне тиімді деп санайды, дегенмен, гетероцисталардың қалың қабығы сыртқы ортадан оттегі молекулаларын ішке өткізбеуіне байланысты нитрогеназа ферменттеріне тоқтаусыз катализдеуге мүмкіндік береді.

Қазіргі таңда цианобактериялар негізінде сутек өндіру жұмыстарының көпшілігі құрамында гетероцисталары бар түрлерге бағытталған. Сутегін өндіретін фототрофты микроорганизмдердің белсенді штамдарын анықтау мақсатында биотехнология зертханасында гетероцисталы цианобактериялардың үш штамы зерттелді: *Nostoc caldicola* RI-3, *Anabaena variabilis* R-I-5 және *Anabaena* sp. Z-1. Осы жұмысымызда біз коллекциялық штамдардың нитрогеназа белсенділігін зерттеу және сутек бөлу қарқындылығын бағалау жұмыстарын жүргіздік. Төменде коллекциялық штамдардың микросуреттері келтірілген (сурет 49).



Сурет 49 – Коллекциялық цианобактериялардың микросуреттері (100х).
Белгілеулер: А – *Nostoc caldicola* RI-3; Б – *Anabaena variabilis* R-I-5; В – *Anabaena* sp. Z-1.

Коллекциялық цианобактерия штамдарының азотсыз ортада өсу қабілетін анықтау үшін цианобактериялардың дақылдары BG₀-11 (тәжірибе) және BG-11 (бақылау) қоректік орталарында дақылданды. Биомассаның өнімділігі өсу коэффициентімен және цианобактериялардың құрғақ биомассасының шығымымен анықталды. Ол үшін зерттелген штамдар қоректік орталарда 9 тәулік бойы өсірілді және барлық зерттелген дақылдар үшін жасушаның бастапқы оптикалық тығыздығы 0,5 бірлік болды. Тоғызыншы тәуліктен кейін цианобактериялардың биомассасы қоректік ортадан бөлініп алынып, кептіріліп, құрғақ биомассаның шығымы анықталды. Нәтижелер 50-суретте көрсетілген.



Сурет 50 – Коллекциялық микробалдыр штамдарының өнімділігін анықтау нәтижелері

Гетероцисталы цианобактериялардың штамдарын азотсыз қоректік ортада өсіргенде азотты ортамен салыстырғанда төмен өнімділік тіркелді және *Anabaena variabilis* R-I-5 және *Nostoc caldicola* RI-3 штамдары жоғары мәндерді көрсетті. *Anabaena variabilis* R-I-5 штамының BG₀-11 қоректік ортада клеткалары BG-11 салыстырғанда 0,2 г/л төмен өнімділік көрсетті. *Anabaena* sp. Z-1 штамымен азотсыз ортада өсіргенде ең төмен өсу қарқындылығы тіркелді – 0,6 г/л.

Жоғарыда алынған нәтижелер ацетилен әдісімен расталды. Нитрогеназаның белсенділігі 3 штамда жарықтың астында 24 сағат өсіргеннен кейін анаэробты жағдайда анықталды. Ацетиленнің этиленге тотығуы негізінде өлшенген нитрогеназа ферментінің қарқындылығы тікелей сутегі өндірісіне тәуелді болып келеді. Алынған нәтижелер бойынша, *Anabaena* sp. Z-1 штамында этилен (нитрогеназа белсенділігі) өндірісі бойынша айтарлықтай төмен нәтижелер байқалса, қалған екі штамда жоғары көрсеткіш тіркелді – *Anabaena variabilis* R-I-5 штамында 0,28 мкмоль этилен/мг хл а/сағ, *Anabaena* sp. Z-1 штамы үшін бұл

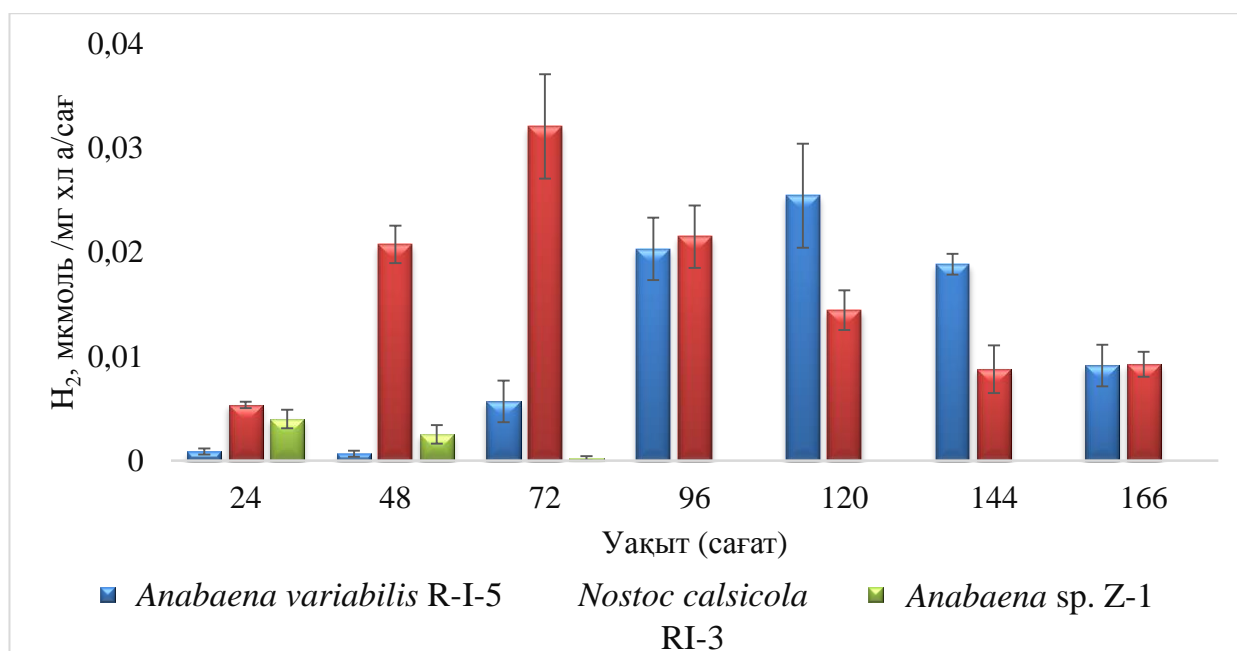
мән 0,09 мкмоль этилен/мг хл а/сағ болды. Осылайша, *Anabaena variabilis* R-I-5 штамы этилен өндірісінің салыстырмалы жоғары деңгейін көрсетті (сурет 32).

Келесі кезеңде жоғары сутегі шығаратын белсенділігімен сипатталатын цианобактериялардың штамдарын таңдау үшін, қараңғыда және жарық жағдайында осы үш штамның сутегі бөлу қарқындылығы зерттелінді.

Гетероцисталы цианобактериялар сутек өндіру үшін нитрогеназа және гидрогеназа ферменттерін пайдаланатыны белгілі. *Anabaena* және *Nostoc* штамдарында нитрогеназа ферменті негізінен мамандандырылған клеткалар – гетероцисталарда локализацияланған, олар қоректік ортада азоттың молекулалары болмаған жағдайда түзіледі. Гетероцисталардың ерекшелігі – оларда ФЖ2 комплексінің жоқтығында және олар оттегін бөлуге қабілетсіз, молекулалық азот фиксациялауға қатысатын ФЖ1 комплексінен тұрады. Бұл жағдайда оттегі тек вегетативті жасушаларда түзіледі. Гетероцистаның сыртқы қалың қабықшасы сыртқы ортадан оттегін өткізбейді және ол нитрогеназа ферментінің толыққанды жұмыс істеуіне мүмкіндік беріп, оттегі молекулаларының басуына жол бермейді. Сондықтан да, гетероцисталы цианобактериялар – қоректік ортада оттегі болған жағдайдың өзінде аз мөлшерде сутегін бөлуге қабілеттілік танытатын жалғыз микроорганизмдер түрі болып саналады.

Алынған нәтижелерге сәйкес, зерттелген дақылдардың барлығында сутектің бөлінуі қараңғыда байқалды. Сутектің ең жоғары өнімділігі *Nostoc caldicola* RI-3 штамында болды, оның жасушалары қараңғыда анаэробты жағдайдан кейін 24 сағаттан соң сутек шығара бастады. Осы кезде сутектің шығымы 0,005 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ құрады. Бұл дақылдардағы сутектің максималды жинақталуы 72 сағ инкубациядан кейін байқалды, ол уақытта сутектің бөлінуі 0,032 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ құрады, ал эксперименттің келесі сағаттарында сутегі эволюциясының баяу төмендеуі байқалды [241].

Nostoc caldicola RI-3 салыстырғанда қалған штамдардың қараңғыда сутек өндіретін белсенділігі төмен болды. Сонымен қатар, H_2 өндірісінің анағұрлым жоғары деңгейі *Anabaena variabilis* R-I-5 штамында байқалды. Бұл екі штамм сутегі шығымының әртүрлі мәндерімен сипатталды және бір-бірінен сутектің максималды жинақталу уақытымен ерекшеленді. Осылайша, 24 сағаттан кейін *Anabaena variabilis* R-I-5 жасушаларының H_2 -нің жиналуы 0,0008 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ құрады, ал 120 сағаттан кейін H_2 ең көп өндірілуі тіркеліп, 0,025 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ құрады. Цианобактериялардың зерттелген штамдарының арасында *Anabaena* sp. Z-1 штамында сутекті қараңғыда бөлу қабілеті айтарлықтай төмен екендігі анықталды және 24 сағаттық инкубациядан кейін бұл штамда сутегінің аздап бөлінуі байқалды. Бұл көрсеткіш 0,004 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ құрады, содан кейін көрсеткіштің одан әрі төмендеуі байқалды, ал 72 сағаттан кейін сутектің өндірісі мүлдем тіркелмеді (сурет 51).



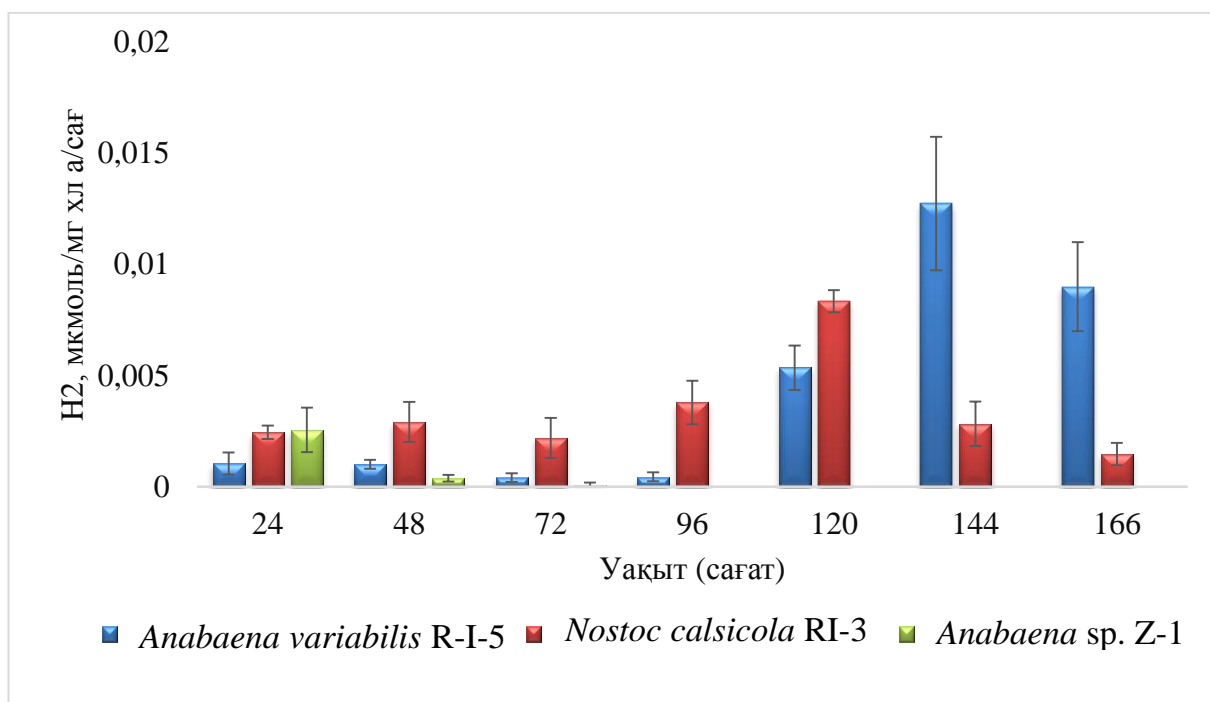
Сурет 51 – Қараңғыда анаэробты жағдайда цианобактериялардың зерттелген штамдары бойынша сутегінің бөлінуі

Жұмыстың келесі кезеңінде зерттелген цианобактериялардың штамдарымен сутектің жинақталуы жарық жағдайында зерттелді. Жарық энергиясы сутегі эволюциясы үшін маңызды екендігі және тікелей биофотоллиз үшін электронды донор рөлін атқаратыны белгілі [242]. Цианобактериялардың тилакоид мембраналарында фотохимиялық реакциялар кезінде күн сәулесінің энергиясына байланысты арнайы жағдайларда молекулалық сутегі бөлінеді. Қалыпты жағдайда микроскопиялық цианобактериялар сутегі түзбейді. Цианобактерияларда ФЖ2 қызметінің нәтижесінде пайда болған электрондар ФЖ1 комплексі арқылы H_2 аза ферментіне тасымалданады. Бұл қысқа уақыт ішінде цианобактерия жасушаларында оттегі мен сутегінің түзілісіне алып келеді [154, 151].

Бұл тәжірибеде цианобактериялардың зерттелген дақылдары алдыңғы тәжірибеге ұқсас өсірілді, сутектің өнімділігін зерттеу кезінде жасушаларды инкубациялау шарттары бірдей болды және тек жарықтың болуымен ерекшеленді. Цианобактериялардың штамдары бойынша сутектің бөлінуі 30 мкмоль фотон/ m^2 /сек жарықтандыруда, аргон атмосферасында 190 сағат инкубациялау кезінде байқалды.

Сутектің жарықтағы ең белсенді өндірушісі *Anabaena variabilis* R-I-5 штамы екендігі анықталды. *Anabaena variabilis* R-I-5 жасушаларының сутегіні өндіруі анаэробты жағдай құрған соң бірінші тәулікте байқалды. Белсенді сутегі тотығуы алты тәулік бойына сақталды, содан кейін азая бастады. Сутегі жинақталуының ең жоғары жылдамдығы 144 сағаттан кейін байқалды, ол 0,012 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ құрады. Қараңғыда сутекті белсенді түрде шығаратын *Nostoc caldicola* RI-3 штамы жарық жағдайындағыдай жоғары сутек өндіру белсенділігін көрсетпегенін атап өткен жөн. 24 сағаттан кейін жарық астында сутегі эволюциясы 0,002 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ құрады, ал 120 сағаттан кейін H_2

максималды өндірісі 0,008 мкмоль H_2 /мг хл а/сағатқа тең болды, содан кейін оның бөлінісінің біртіндеп төмендеуі тіркелді. *Anabaena* sp. Z-1 штамында алғашқы тәжірибедегідей сутегі бөлінісі байқалды, сутектің 0,002-0,0003 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ өндірілуі 24 және 48 сағаттан кейін байқалды (сурет 52).



Сурет 52 – Жарық жағдайында цианобактерия штамдарының сутек бөлу көрсеткіштері

Осылайша, зерттеулер нәтижесінде қараңғыда *Nostoc caldicola* RI-3 және *Anabaena variabilis* R-I-5 цианобактерияларының штамдарымен жарық жағдайында сутегі өндірудің жоғары қабілеттілігі тіркелді. Бұл жағдайда *Nostoc caldicola* RI-3 цианобактерия штамының жасушаларымен сутектің максималды шығуы қараңғыда 0,032 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ құрады, бұл штамм бойынша сутек өндіру *Anabaena variabilis* RI-5 салыстырғанда 2,5 есеге жоғары болды. Біздің нәтижелер осы уақытқа дейін жарияланған мәліметтермен сәйкес келеді. *Spirulina platensis* түрімен сутегінің жоғары өндірісі туралы әдебиеттерде мәліметтер бар. Бұл штамм жарықта және қараңғыда анаэробты жағдайда, 25°C температурада сутекті қалыпты бөледі [97]. Ал *Synechococcus* түрі анаэробты жағдайда, қараңғы ортада сутегіні белсенді түрде шығаратындығы туралы деректер зерттеу жұмыстарында келтірілген [243].

Біздің эксперименттік мәліметтерге сүйенсек, коллекциялық штамдардан *Nostoc caldicola* RI-3 және *Anabaena variabilis* R-I-5 жасушаларына жарықсыз орта сутегі өндірісі үшін оңтайлы болды, ал жарықтың болуы H_2 өндірісінің күрт төмендеуіне әкелді. Мұның себебі – ФЖ2 өте жоғары активтенуі, бұл бағытталған фотосинтетикалық электронның әсерінен протондардың молекулалық сутекке дейін тотықсыздануын катализдейтін H_2 аза

ферменттерінің инактивациясы салдарынан сутегі эволюциясы процесін тежейтін оттегі концентрациясының пайда болуына ықпал етеді.

Фотосинтез пигменттері арқылы молекулалық сутектің биологиялық өндірісінің H_2 өндірудің басқа әдістерімен салыстырғанда бірнеше артықшылығы бар. Осы тұрғыда, қазіргі заманғы қалпына келмейтін энергия технологияларына балама ретінде зерттеушілерді көбірек қызықтыруы мүмкін. Мұндай технологиялар болашақта белсенді штамдарды іздеу және сутегі фотобиологиялық өндірісі үшін олардың штамдарын жақсарту мақсатында тиісті стратегияларды таңдау сияқты ғылыми жетістіктерге жетуде пайдаланылады. Біздің зерттеулеріміз ең алдымен азотты түзетін цианобактериялар арасында перспективті өндірушілерді табуға және осы процестің маңызын түсінуге бағытталды. Алынған нәтижелерге сәйкес, гетероцисталы цианобактериялардың коллекциялық 3 штамы (*Anabaena variabilis* R-I-5 және *Anabaena* sp. Z-1) қараңғыда салыстырмалы түрде жоғары сутегі өндіруде белсенділік көрсетті. Алынған ғылыми нәтижелер цианобактерияларды жарық энергиясын сутегінің химиялық энергиясына балама және экологиялық таза отынға тиімді айналдыруға қабілетті биожүйе ретінде әрі қарай зерттеу қажеттілігін көрсетеді.

Бұл ғылыми ақпаратты қосымша зерттеулерден кейін гетероцистикалық цианобактериялардың клеткалары арқылы биологиялық сутекті алу әдістеріне қолдануға болады. Фотосинтез процесіне негізделген молекулалық сутегінің биологиялық өндірісі H_2 өндірудің басқа әдістеріне қарағанда көптеген артықшылықтары бар. Қазіргі таңда қалпына келетін энергия көздерін өндіруде бәсекелестік тудыра алатын биоэнергетиканың бір саласы болып табылады. Мұндай технологиялардың болашақтағы өркендеуі белсенді фототрофты штамдарды іздеу және сутектің фотобиологиялық өндірісі үшін тиісті стратегияларды таңдау сияқты ғылыми жұмыстармен тығыз байланысты болып келеді.

Біздің зерттеуіміз азот фиксациялауға қабілетті цианобактериялардың ішінен болашағы мол өндірушілерді табуға және осы процестің механизмдерін түсінуге бағытталды. Диссертацияда гетероцисталы цианобактериялардың жаңа штамдарын табиғи көздерден бөліп алудың және олардың сутегі өндірісіндегі мүмкіндіктерін зерттеудің нәтижелері ұсынылды. *Nostoc caldicola* RI-3 қараңғыда салыстырмалы түрде жоғары сутек өндіруге белсенділік көрсетті. Бұл ғылыми ақпаратты қосымша зерттеулерден кейін гетероцисталы цианобактериялардың клеткалары арқылы биологиялық сутегіні алу әдістерін әзірлеуге кешенді түрде қолдануға болады.

Қорытынды

1. Қызылорда облысы, Жаңақорғанның ауданының күріш алқаптарының альгофлора құрамын зерттеу нәтижесінде, олардың 5 бөлімге, 10 классқа, 19 отрядқа, 26 тұқымдастарға және 58 түрге жататыны анықталып, таксономиялық құрылымы бойынша цианобактериялар *Cyanobacteria* – 25 (47%), *Bacillariophyta* – 5 (9,4%), *Euglenophyta* – 5 (9,4%), *Chlorophyta* – 18 (33,9%) болатыны байқалды.

2. Цианобактериялардың 5 аксеникалық таза түрлері күріш алқабынан бөліп алынып, активтілігі жоғары 3 дақылды филогенетикалық талдауы нәтижесінде *Nostoc* sp. J-14, *Anabaena* sp. B1-4 және *Tolypothrix tenuis* J-1 болып идентификацияланды.

3. Бөлініп алынған штамдардың азотфиксациялау қабілеті зерттеу нәтижесінде *Anabaena* sp. B1-4 штамның белсенділігі анықталып, *Anabaena* sp. B1-4 штамның өсіру қоректік ортасына молибден (Mo^+) металын 1 мкмоль мөлшерде қосу кезінде нитрогеназа ферментінің белсенділігін 10 есеге артуы байқалып, C_2H_4 газының тотығуының жоғары көрсеткіші 8 сағаттан соң $15,3 \pm 0,6$ мкмоль этилен/мг хл а/сағ құрады.

4. Іріктеліп алынған *Anabaena* sp. B1-4 штамның 24×10^6 кл/мл ($34 \pm 1,9$ см) және 48×10^6 кл/мл ($32 \pm 1,1$ см) концентрациядағы клетка биомассасы азотсыз ортадағы бақылаумен ($20 \pm 1,3$ см) салыстырғанда күріштің өсуіне оң әсерін беретіні тіркелді.

5. Нитрогеназа белсенділігімен ерекшеленген цианобактерияның *Anabaena variabilis* R-I-5 штамның *Sunrise* T-4 сортының көшеттерінің өсуіне тигізетін әсерін зерттеу жұмысында 24×10^6 кл/мл суспензиясы өсімдіктердің тамырының өсуіне, ал 48×10^6 кл/мл суспензиясы құлпынайдың жапырақ саны, тамыр мен бойының ұзындығы оң әсерін тигізіп, құрғақ биомассасының жинақталуын жақсартумен қатар оны қалыпты азот көзімен қамтамасыз ете алатыны анықталды.

6. Коллекциялық цианобактерия штамдарының сутегін бөлу қарқындылығын жарық және қараңғы жағдайда зерттеу кезінде, қараңғы ортада *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамы 6 есеге, ал *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамның H_2 шығаруы қараңғыға қарағанда жарықта 20 есеге белсенді болатыны анықталды. Сонымен қатар, 10 мкмоль диуронның қосылуы *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штамның сутегін бөлуін 1,5 есеге ұлғайтатыны анықталды.

7. Гетероцисталы цианобактериялар штамдарының сутек бөлу қарқындылығы жарық және қараңғы жағдайда зерттелді. Жарықта *Anabaena variabilis* R-I-5 штамы белсенділік танытып, сутегі жинақталуының ең жоғары жылдамдығы 0,012 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ болса, қараңғы ортада *Nostoc caldicola* RI-3 цианобактерия штамның сутектің максималды бөлінуі 0,032 мкмоль H_2 /мг хл а/сағ құрады, бұл штам бойынша сутек өндіру *Anabaena variabilis* RI-5 салыстырғанда 2,5 есеге жоғары болатыны байқалды.

Пайданылған әдебиеттер

1. Bhadury P., Wright P.C. Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications // *Planta*. - 2004. - Vol. 219. -P. 561-578.
2. Akbayeva L., Muratov R., Zhamangara A., Beisenova R., Zhantokov B. Seasonal Dynamics of Phytoplankton and Bacterial Plankton Characteristics in Esil River.// *Biosciences Biotechnology Research Asia*. - 2014. - Vol.11. -P. 1087-1093.
Akabayeva, Lyailya & Muratov, Ruslan & Zhamangara, Aizhan & Beisenova, Raikhan & Zhantokov, Bolatbek. (2014). Seasonal Dynamics of Phytoplankton and Bacterial Plankton Characteristics in Esil River. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 11. 1087-1093. 10.13005/bbra/1493.
3. Усербаева А., Сарсекеева Ф. Выделение штаммов цианобактерий из экстремальных источников Казахстана // *Материалы международной конференции студентов и молодых ученых «МИР НАУКИ»*. Алматы: КазНУ им аль-Фараби. -2014. - С. 227.
4. Jiyeubekov A., Barinova S., Bigaliev A., Nurashov S., Sametova E., Fahima T. Bioindication using diversity and ecology of algae of the Alakol lake, Kazakhstan. *Applied Ecology and Environmental Research*. - 2018. -P. 7799-7815.
5. Stal L.J., Moezelaar R. Fermentation in cyanobacteria // *FEMS Microbiol Rev*. -1997. - Vol. 21. -P. 179-211.
6. Capone D.G., Burns J.A., Montoya J.P., Subramaniam A., Mahaffey A.C., Gunderson T., Michaels A.F., Carpenter, E.J. Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: an important source of new nitrogen to the tropical and subtropical North Atlantic Ocean // *Global Biogeochem Cycles*. - 2005. - Vol. 19. -P. GB2024.
7. Abed R.M.M., Dobretsov S., Sudesh K. Applications of cyanobacteria in biotechnology // *Journal of Applied Microbiology*. - 2009. - V 106. - P. 1-12.
8. Jaki B., Heilmann J., Sticher O. New antibacterial metabolites from the cyanobacterium *Nostoc commune* (EAWAG 122b) // *J Nat Prod*. - 2000. - Vol. 63. - P. 1283-1285.
9. Kajiyama S., Kanazaki H., Kawazu K., Kobayashi A. Nostifungicidine, an antifungal lipopeptide from the field-grown terrestrial blue-green algae *Nostoc commune* // *Tetrahedron Lett*. - 1998. - Vol. 39. - P. 3737-3740.
10. Patterson G.M.L., Larsen L.K., Moore R.E. Bioactive natural products from blue-green algae // *J Appl Phycol*. - 1994. - Vol. 6. - P. 151-157.
11. Steinbuchel A., Fuchtenbusch B., Gorenflo V., Hein S., Jossek R., Langenbach S., Rehm B.H.A. Biosynthesis of polyesters in bacteria and recombinant organisms // *Polymer Degrad Stabil*. -1997. - Vol. 59. - P. 177-182.
12. Carmichael WW. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins // *J Appl Bacteriol*. - 1992. - Vol. 72. - P. 445-459.
13. Abd-Alla M.H., Mahmoud A.L.E., Issa A.A. Cyanobacterial biofertilizer improved growth of wheat // *Phyton*. - 1994. - Vol. 34. - P. 11-18.
14. Suitability of some local Agro. Industrial wastes as carrier materials for Cyanobacterial inoculant's // *Folia Microbiol*. -1994b. - Vol. 39. - P. 576-578.

15. Durner J., Bohm I., Knorz O.C., Boger P. Proteolytic degradation of dinitrogenase reductase from *Anabaena variabilis* (ATCC 29413) as a consequence of ATP depletion and impact of oxygen // *J. Bacteriol.* - 1996. 178. - P. 606-610.
16. Gallon J.R. Tansley Reconciling the incompatible: N₂ fixation and O₂ // *New Phytol.* - 1992. - Vol. 122. - P. 571-609.
17. Berman-Frank I., Lundgren P., Falkowski P.G. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria // *Res. Microb.* - 2003. - Vol. 154. - P. 157-164.
18. Falkowski P.G. Evolution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean // *Nature.* - 1997. - Vol. 387. - P. 272-275.
19. El-Enany A.E., Issa A.A. Cyanobacteria as a biosorbent of heavy metals in sewage water // *Envir Toxicol Pharmacol.* - 2000. - Vol. 8. - P. 95-101.
20. Burns R.C., R.W.F. Hardy. Nitrogen fixation in bacteria and higher plants // *Mol. Biol. Biochem. Biophys.* - 1975. - Vol. 21. - P. 1-189.
21. Масирбаева А.Д., Байдылдаева Ж.А., Саданов А.К., Байгонусова Ж.А., Ултанбекова Г.Д. Изучение азотфиксирующей активности и конкурентной способности клубеньковых бактерий рода *Rhizobium* // Серия биологическая и медицинская. 2014. № 2. С. 3252-3262.
22. Д.М. Сытников. Биотехнология микроорганизмов азотфиксаторов и перспективы применение препаратов на их основе // *Биотехнология.* 2012. № 4. С. 34-45.
23. Жакеева М.Б., Бекенова У.С., Жумадилова Ж.Ш., Шорабаев Е.Ж., Саданов А.К. Изучение эколого-трофических групп микроорганизмов почвы под люцерной и соей при использовании биопрепаратов серии «Ризовит-АКС» (russ) // *Успехи современного естествознания : журнал.* 2015. № №2. С. 144-147.
24. Venkataraman L.V. In A Monograph on *Spirulina platensis* - Biotechnology and Application // DST, New Delhi, 1983.
25. Prabhakaran D., Subramanian G., Hydrogen photoproduction by marine cyanobacteria *Diclothrix bauriana* BDU 40481 // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* - 1995. - Vol. 1. - P. 45-57.
26. Gustafson K.R., Cardellina J.H., Fuller R.W., Weislon O.S., Kiser R.F., Snader K.M. Antiviral sulfolipids from cyanobacteria (blue-green algae) // *J. Nat Caner Inst.* - 1989. - Vol. 81. - P. 1254.
27. Sundararaman M., Subramanian G., Averal H.I., Akbharsha M.A. Evaluation of the bioactivity of marine cyanobacteria on some biochemical parameters of rat serum // *Phytotherapy Res.* - 1996. - Vol. 10. - P. 9-12.
28. Kaushik B.D., Venkataraman G. S., Effect of algal inoculation on the yield and vitamin C content of two varieties of tomato // *Plant Soil.* - 1979. - Vol. 52. - P. 135-137.
29. Choudhary K.K. Occurrence of nitrogen fixing cyanobacteria during different stages of paddy cultivation // *Bangladesh J. Plant Taxon.* - 2011. - Vol. 18. - P. 73-76.
30. Смирнова И.Э., Галимбаева Р.Ш., Султанова А.Ж., Сабденова А.А. Влияние фосфатмобилизирующих бактерий на биологическую активность почв (рус.) // *Известия НАН РК. Сер. биол. и мед. : журнал.* 2014. № №6. С. 96-100.

31. Dey H.S., Bastia A.K. Cyanobacterial Flora from rice growing areas of Mayurbhanj // Plant. Sc. Res. - 2008. - Vol. 30. - P. 22-26.
32. De P.K. The role of blue-green algae in nitrogen fixation in rice fields // Proc. R. Soc. B. - 1939. - Vol. 127. - P. 121-139.
33. Watanabe I., Cholitzkul W., Field studies on nitrogen fixation in paddy soils // In Nitrogen and Rice, IRRI, Los Banos, Philippines, 1979, pp. 223.
34. Venkataraman G.S. Blue-green algae for rice production // FAO Soil Bull. - 1981. - Vol. 16. - P. 33-42.
35. Dadhich K.S., Verma A.K., Venkataraman G.S. Effect of *Calothrix* inoculation on vegetable crops // Plant Soil. - 1969. - Vol. 31. - P. 377-379.
36. Shashirekha S., Uma L., Subramanian G., Phenol degradation by the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 30501 // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. - 1997. - Vol. 19. - P. 130-133.
37. Karna R.R., Uma L., Subramanian G., Mohan P.M. Biosorption of toxic metal ions by alkali extracted biomass of a marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 30501 // World J. Microbiol. Biotechnol. - 1999. - Vol. 15. - P. 729-732.
38. Subramanian G., Uma L., Cyanobacteria in pollution control // J. Sci. Ind. Res. - 1996. - Vol. 55. - P. 685-692.
39. Malliga P., Uma L., Subramanian G. Lignolytic activity of the cyanobacterium *Anabaena-Azollae* ML 2 and the value of coir waste as a carrier for BGA biofertilizer // Microbios. - 1996. - Vol. 86. - P. 175-183.
40. Misra S., Kaushik B.D. Growth promoting substances of cyanobacteria I. Vitamins and their influence on rice plant // Proc. Indian Natl Sci. Acad. - 1989. - Vol. 55. - P. 295-300.
41. Misra S., Kaushik B.D. Growth promoting substances of cyanobacteria II. Detection of amino acids, sugars and auxins // Proc. Indian Natl Sci. Acad. - 1989. - Vol. 55. - P. 499-504.
42. Whitton B.A. Soil and rice-fields. Their Diversity in Time and Space // The Ecology of Cyanobacteria. - 2000. - Vol. 66. - P. 233-255.
43. Irisarri P., Gonnet S., Monza J. Cyanobacteria in Uruguayan rice fields: Diversity, nitrogen fixing ability and tolerance to herbicides and combined nitrogen // J. Biotechnol. - 2001. - Vol. 91. - P. 95-103.
44. Obana S., Miyamoto K., Morita S., Ohmori M., Inubushi K. Effect of *Nostoc* sp. on soil characteristics, plant growth and nutrient uptake // J. Appl. Phycol. - 2007. - Vol. 19. - P. 641-646.
45. Stirk M.A., Ördög V., Van Staden J., Jäger K. Cytokinin and auxin-like activity in cyanophyta and microalgae // J. Appl. Phycol. - 2002. - Vol. 14. - P. 215-221.
46. Vaishampayan A., Sinha R.P., Hader D.P., Dey T., Gupta A.K., Bhan U., Rao A.L. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture // Bot. Rev. - 2001. - Vol. 67. - P. 453-516.
47. Mishra U., Pabbi S. Cyanobacteria: A potential biofertilizer for Rice // Reson. - 2004. - P. 6-10.

48. Maqubela M.P., Mnkeni P.N.S., Malam O., Pardo M.T., Acqui L.P.D. Nostoc cyanobacterial inoculation in South African agricultural soils enhances soil structure, fertility and maize growth // *Plant Soil*. - 2008. - Vol. 315. - P. 79-92.
49. Thajuddin N., Subramanian G. Cyanobacterial biodiversity and potential application in biotechnology // *Cur. Sci.* - 2005. - Vol. 89. - P. 47-57.
50. Righini H., Roberti R., Baraldi E. Use of algae in strawberry management // *Journal of Applied Phycology*. - 2018. - Vol. 30. - P. 3551-3564.
51. Khoshnevisan B., Rafiee S., Mousazadeh H. Environmental impact assessment of open field and greenhouse strawberry production // *Eur J Agron.* - 2013. - Vol. 50. - P. 29-37.
52. Электронды ресурс: <https://edis.ifas.ufl.edu/fe971>
53. Lieten P. Advances in strawberry substrate culture during the last twenty years in the Netherlands and Belgium // *Inte J Fruit Sci.* - 2013. - Vol. 13. - P. 84-90.
54. Herrick, C. (2012) Strawberry growers gather in China. <http://www.growingproduce.com/fruits/strawberry-growers-gather-in-china/>
55. Nain L., Rana A., Joshi M., Jadhav S.D., Kumar D., Shivay Y.S., Prasanna R. Evaluation of synergistic effects of bacterial and cyanobacterial strains as biofertilizers for wheat // *Plant Soil*. – 2010. - Vol. 331. - P. 217-230.
56. Fageria N.K., Baligar V.C. Methodology for evaluation of lowland rice genotypes for nitrogen use efficiency // *J. Plant Nut.* – 2003. - Vol. 26. - P. 1315-1333.
57. Vessey J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers // *Plant Soil*. – 2003. - Vol. 255. - P. 571-586.
58. Prasanna R., Jaiswal P., Nayak S., Sood A., Kaushik B. D., Cyanobacterial diversity in the rhizosphere of rice and its ecological significance // *Indian J. Microbiol.* – 2009. - Vol. 49. - P. 89.
59. Berg G., Smalla K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2009. - Vol. 68. - P. 1-13.
60. Mendes R., Garbeva P., Raaijmakers J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms // *FEMS Microbiol. Rev.* - 2013. - Vol. 37. - P. 634-663.
61. Саданов А.К., Ултанбекова Г.Д., Хасенов А.Х., Масирбаева А., Пархатқызы Н., Мырзатай Қ., Есіркепұлы М.. Изучение перспективных штаммов азотфиксирующих актиномицетов рода *frankia* в лабораторных// Серия биологическая и медицинская. 2017. . №5. С. 82-77.
62. Colbn-Lbpez M.S., Sherman D., Sherman L.A. Transcriptional and translational regulation of nitrogenase in light-dark and continuous-light-grown cultures of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142 // *Bacteriol.* - 1997. - Vol. 179. - P. 4319-4327.
63. Huang T.C., Chow T.J. Comparative studies of some nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria isolated from rice fields // *J. Gsn. Microbiol.* -1988. - Vol. 134. - P. 3089-3097.

64. Hajime M., Masaharu K., Kazuhito I., Hidehiro S., Robert H. Genetic engineering of cyanobacteria to enhance biohydrogen production from sunlight and water // *Ambio*. - 2012. - Vol. 41. - P. 169-173.
65. Khetkorn W., Rastogi R., Incharoensakdi A., Lindblad P., Madamwar D., Pandey A., Larroche C. Microalgal hydrogen production // *Int. A review. Bioresource Technology*. - 2017. - Vol. 243. - P. 1-544.
66. Kumazawa S. Hydrogen production capability in unicellular cyanobacteria // *Plant Cell Physiol*. - 2004. - Vol. 45. - P. 23.
67. Troshina O., Serebryakova L., Sheremetieva M., Lindblad P. Production of H₂ by the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 during fermentation // *Int. J. Hydrogen Energy*. - 2002. - Vol. 27. - P. 1283-1289.
68. Prabakaran D., Kumar D. A., Uma L., Subramanian G. Dark hydrogen production in nitrogen atmosphere: an approach for sustainability by marine cyanobacterium *Leptolyngbya valderiana* BDU 2004 // *Int. J. Hydrogen Energy*. - 2010. - Vol. 35. - P. 10725-10730.
69. Min H., Sherman L.A. Hydrogen production by the unicellular, Diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142 under Conditions of Continuous Light // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2010. - Vol. 76. - P. 4293-4301.
70. Schwarz S., Poss Z., Hoffmann D., Appel J. (2010) Hydrogenases and hydrogen metabolism in photosynthetic prokaryotes. In: Hallenbeck PC (ed) *Recent advances in phototrophic prokaryotes* // Springer, New York, pp 305-348.
71. Tsygankov A.A., Fedorov A.S., Kosourov S.N., Rao K.K. Hydrogen production by cyanobacteria in an automated outdoor photobioreactor under aerobic conditions // *Biotechnology and Bioengineering*. - 2002. - Vol. 80. - P. 777-783.
72. Voloshin R.A., Rodionova M.V., Zharmukhamedov S.K., Veziroglu T.N., Allakhverdiev S.I. Review. Biofuel production from plant and algal biomass // *Int J Hydrogen Energy*. - 2016. - Vol. 41. - P. 17257-17273.
73. Das D., Veziroglu TN. Hydrogen production by biological processes a survey of literature // *Int J Hydrogen Energy*. - 2001. - Vol. 26. - P. 13-28.
74. Benemann J.R., Weare N.M. Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica*. III. Hydrogen-supported nitrogenase activity // *Arch. Mikrobiol.* - 1974. - Vol. 101. - P. 401-408.
75. Weare N.M., Benemann J. R. Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica*. II. Nitrogenase activity during induction and aging of batch cultures // *Arch. Mikrobiol.* - 1973. - Vol. 93. - P. 101-112.
76. Akkerman M.J., Rocha J.M.S., Reith J.H., Wijffels R.H. Photobiological hydrogen production: Photochemical efficiency and bioreactor design. In: Reith, J.H., Wijffels, R.H., Barten, H. (Eds.), *Bio-methane and Bio-hydrogen*. Dutch Biological Hydrogen Foundation, The Netherlands. - 2003. - P. 124-145.
77. Peltier G., Tolleter D., Billon E., Cournac L. Auxiliary electron transport pathways in chloroplasts of microalgae // *Photosynth. Res.* - 2010. - Vol. 106. - P. 19-31.
78. Oh Y.-K., Raj S.M., Jung G.Y., Park S. Metabolic engineering of microorganisms for biohydrogen production // *Biohydrogen*. - 2013. - P. 45-65.

79. Manis S., Banerjee R. Comparison of biohydrogen production processes // Int. J. Hydrogen Energy. - 2008. - Vol. 33. - P. 279-286.
80. Hankamer B., Lehr F., Rupprecht J., Mussnug J., Posten C., Kruse O. Photosynthetic biomass and H₂ production by green algae: from bioengineering to bioreactor scale-up. *Physiol // Plantarum*. - 2007. - Vol. 131. - P. 10-21.
81. Horiuchi J., S. Kikuchi., M. Kobayashi., T. Kanno., T. Shimizu., Modeling of pH response in continuous anaerobic acidogenesis by an artificial neural network // *Biochem. Eng. J.* - 2001. - Vol. 9. - P. 199-204.
82. Zhang Z.P., J.H. Tay., K.Y. Show., R. Yan., D.T. Liang., D.J. Lee., W.J. Jiang. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor // *Int. J. Hydrogen Energy*. - 2007. - Vol.32. - P. 185-191.
83. Lee K.S., Y.S. Lo., Y.C. Lo., P.J. Lin., J.S. Chang. H₂ production with anaerobic sludge using activated-carbon supported packed-bed bioreactors // *Biotechnol. Lett.* - 2003. -Vol. 25. - P. 133-138.
84. Show K.Y., Y.G. Yan., Duu-Jong Lee. Chapter 16 - Biohydrogen Production: Status and Perspectives // *Biohydrogen (Second Edition)*. - 2019. - P. 391-411.
85. Hansel A., Lindblad P. Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 1998.- Vol 50. - P.- 153-160.
86. Nagarajan D., Lee D.J., Kondo A., Chang J.S. Recent insights into biohydrogen production by microalgae – from biophotolysis to dark fermentation // *Bioresour. Technol.* - 2017. - Vol. 227. - P. 373-387.
87. Eroglu E., Melis A. Microalgal hydrogen production research // *Int. J. Hydrogen Energy*. - 2016. - Vol. 41. - P. 12772-12798.
88. Akkerman I., Janssen M., Rocha J., Wijffels R.H. Photobiological hydrogen production: photochemical efficiency and bioreactor design // *Int. J. Hydrogen Energy*. - 2002. - Vol. 27. - P. 1195-1208.
89. Carrieri D., Wawrousek K., Eckert C., Yu, I., maness, P.-J. The role of bidirectional hydrogenases in cyanobacteria // *Bioresour. Technol.* - 2011. - Vol.102. - P. 8368-8377.
90. Kim D.H., Kim, M.-S. Hydrogenases for biohydrogen production // *Bioresour. Technol.* - 2011. - P. 102.
91. Baebprasert W., Jantaro S., Khetkorn W., Lindblad P., Incharoensakdi A. Increased H₂ production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by redirecting the electron supply via genetic engineering of the nitrate assimilation pathway // *Metabol. Engineer.* - 2011. - Vol. 13. - P. 610-616.
92. Khetkorn W., Baebprasert W., Lindblad P., Incharoensakdi A. Redirecting the electron flow towards the nitrogenase and bidirectional Hox-hydrogenase by using specific inhibitors results in enhanced H₂ production in the cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012 // *Bioresource technology*. - 2012. - Vol. 118. - P. 265-271.
93. Khetkorn W., Lindblad P., Incharoensakdi A. Enhanced biohydrogen production by the N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* strain TISTR 8012 // *Int. J. Hydrogen Energy*. - 2010. - Vol. 35. - P. 12767-12776.

94. Nyberg M., Heidorn T., Lindblad P. Hydrogen production by the engineered cyanobacterial strain *Nostoc* PCC 7120 Δ hupW examined in a flat panel photobioreactor system // J. Biotechnol. - 2015. - Vol. 215. - P. 35-43.
95. Datta M., Nikki G., Shah V. Cyanobacterial hydrogen production // World J. Microbiol. Biotechnol. - 2000. - Vol. - 16. - P. 8-9.
96. 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.
97. Aoyama K., Uemura I., Miyake J., Asada Y. Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis* // J Ferment Bioeng. - 1997. - Vol. 83. - P. 17-20.
98. Shah V., Gard N., Madamwar D. An integrated process of textile dye removal and hydrogen evolution using cyanobacterium, *Phormidium valderianum* // World Journal of Microbiology & Biotechnology. - 2001. - Vol. 17. - P. 499-500.
99. Shah V., Gard N., Madamwar D. Ultrastructure of the fresh water cyanobacterium *Anabaena variabilis* SPU 003 and its application for oxygen-free hydrogen production // FEMS Microbiol. Lett. - 2001. - Vol. 194. - P. 71-5.
100. Brennan L., Owende P. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products // Renew Sustain Energy Rev. - 2010. - Vol. 14. - P. 557-577.
101. Neuer G., Bothe H. Electron donation to nitrogenase in heterocysts of cyanobacteria // Arch Microbiol. - 1985. - Vol. 143. - P. 185-191.
102. Fedorov A.S., Tsygankov A.A., Rao K.K., Hall D.O. Production of hydrogen by an *Anabaena variabilis* mutant in photobioreactor under aerobic outdoor conditions. In: Miyake J., Matsunaga T., San Pietro A., editors // BioHydrogen II. Oxford, United Kingdom: Elsevier. - 2001. - P. 223-228.
103. Lambert G.R., Smith G.D. Hydrogen formation by marine Blue-green algae // FEBS Lett. - 1977. - Vol. 83. - P. 159-162.
104. Masukawa H., Nakamura K., Mochimaru M., Sakurai H. Photobiological hydrogen production and nitrogenase activity in some heterocystous cyanobacteria. In: Miyake J., Matsunaga T., San Pietro A., editors // BioHydrogen II. Elsevier. - 2001. - P. 63-6.
105. Markov S.A., Bazin M.J., Hall D.O. Hydrogen photoproduction and carbon dioxide uptake by immobilized *Anabaena variabilis* in a hollow-fiber photobioreactor // Enz. Microb. Technol. - 1995. - Vol. - 17. - P. 306-310.
106. Sveshnikov D.A., Sveshnikova N.V., Rao K.K., Hall D.O. Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and under nutritional stress // FEBS Microbiol Lett. - 1997. - Vol. 147. - P. 297-301.
107. Happe T., Schutz K., Bohme H. Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 // J. Bacteriol. - 2000. - Vol. 182. - P. 1624-1631.
108. Famiglietti M., Hochkoeppler A., Luisi P.L. Surfactant-induced hydrogen production in cyanobacteria // Biotechnol Bioeng. - 1993. - Vol. 42. P. 1014-1018.
109. Howarth D.C., Codd G.A. The uptake and production of molecular hydrogen by unicellular cyanobacteria // J. Gen. Microbiol. - 1985. - Vol. 131. - P. 1561-1569.

110. Taikhao S., Phunpruch S. Increasing Hydrogen Production Efficiency of N₂-Fixing Cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012 by Cell Immobilization // *Energy Procedia*. - 2017. - Vol. - 138. - P. 366-371
111. Serebryakova L.T., Sheremetieva M.E., Lindblad P. H₂-uptake and evolution in the unicellular cyanobacterium *Chroococcidiopsis thermalis* CALU 758 // *Plant Physiol. Biochem.* - 2000. - Vol. 38. - P. 525-530.
112. Oost V.J., Bulthuis B.A., Feitz S., Krab K., Kraayenhof R. Fermentation metabolism of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece* PCC 7822 // *Arch Microbiol.* - 1989. - Vol. 152. - P. 415-419.
113. Antal TK., Lindblad P. Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH // *Journal of Applied Microbiology*. - 2005. - Vol. - 98. - P. 114-120.
114. Moezelaar R., Bijvank SM., Stal LJ. Fermentation and sulfur reduction in the mat-building cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes* // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1996. - Vol. 62. - P. 1752-1758.
115. Heyer H., Stal L., Krumbein W.E. Simultaneous heterolactic and acetate fermentation in the marine cyanobacterium *Oscillatoria limosa* incubated anaerobically in the dark // *Arch. Microbiol.* - 1989. - Vol. 151. - P. 558-564.
116. Philips E.J., Mitsui A. Role of light intensity and temperature in the regulation of hydrogen photoproduction by the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. strain Miami BG7 // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1983. - Vol. 45. - P. 1212-1220.
117. Kumazawa T., Sato S., Kanenari D., Kunimatsu A., Hirose R., Matsuba S., Obara H., Suzuki M., Sato M., Onodera J. Carthamin A. Precursor of Constituent of Safflower // *Chemistry Letters*. - 1994. - P. 2343-2344.
118. Prabakaran D., Subramania G. Oxygen-free hydrogen production by the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 20041 // *Bioresource Technology*. - 1996. - Vol. - 57. - P. 111-116.
119. Cheng J., Xia A., Song W., Su H., Zhou J., Cen K. Comparison between heterofermentation and autofermentation in hydrogen production from *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* wet biomass // *International Journal of Hydrogen Energy*. - 2012. - Vol. 37. - P. 6536-6544.
120. Thomas J., Timourian H., Ward R.L. Hydrogen production by *Anabaena cylindrica*: Effects of varying ammonium and ferric ions, pH, and light // *Applied and environmental microbiology*. - 1978. - Vol. 35. - P. 704-710.
121. Nicholas J., Skizim G.M., Ananyev A.K., Charles G.D. Metabolic Pathways for Photobiological Hydrogen Production by Nitrogenase- and Hydrogenase-containing Unicellular Cyanobacteria *Cyanothece* // *The Journal of Biological Chemistr.* - 2011. - Vol. 287. - P. 2777-2786.
122. Kufryk G. Advances in Utilizing Cyanobacteria for Hydrogen Production // *Advances in Microbiology*. - 2013. - Vol. 3. - P. 60-68.
123. Taikhao S., Incharoensakdi A., Phunpruch S. Dark fermentative hydrogen production by the unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* grown in seawater // *Journal of Applied Phycology*. - 2014. - Vol. 27. - P. 187-196

124. Cassier-Chauvat C., Veaudor T., Chauvat F. Advances in the Function and Regulation of Hydrogenase in the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803 // *Int. J. Mol. Sci.* - 2014. - Vol. 15. - P. 19938-19951
125. Tamagnini P., Costa J.L., Almeida L., Oliveira M.J., Salema R., Lindblad P. Diversity of cyanobacterial hydrogenases, a molecular approach // *Curr. Microbiol.* - 2000. - Vol. 40. - P. 356-361.
126. Hannah S., Shafaat O. R., Hideaki O., Wolfgang L. [NiFe] hydrogenases: A common active site for hydrogen metabolism under diverse conditions // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics.* - 2013. - Vol. 1827. - P. 986-1002.
127. Ding-Ji S., David O. Hall. The Azolla-Anabaena Association: Historical Perspective // *Symbiosis and Energy Metabolism Botanical Review.* - 1988. - Vol. 54. - P. 353-386.
128. Bothe H., Schmitz O., Yates M.G., Newton W.E. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* - 2010. - Vol. 74. - P. 529-551.
129. Tsygankov A., Serebryakova L.T., Rao K.K., Hall D.O. Acetylene reduction and hydrogen photoproduction by wild-type and mutant strains of *Anabaena* at different CO₂ and O₂ concentrations // *FEMS Microbiology Letters.* - 2006. - Vol. 167. - P. 13-17.
130. Tsygankov A.A., Serebryakova L.T., Rao K.K., Hall D.O. Acetylene reduction and hydrogen photoproduction by wild-type and mutant strains of *Anabaena* at different CO₂ and O₂ concentrations // *FEMS Microbiology Letters.* - 1998. - Vol. 167. - P. 13-17.
131. Dutta D., Debojyoti D., Chaudhuri S., Bhattacharya S. Hydrogen production by Cyanobacteria // *Microbial cell factories.* - 2005. - Vol. 4. - P. 36.
132. Sveshnikov D.A., Sveshnikova N.V., Rao K.K., Hall D.O. Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and nutritional stress // *FEBS Microbiol.* - 1997. - Vol. 147. - P. 297-301.
133. Zolotareva Y.K., Shnyukova Y.I., Podorvanov V.V. Mikrovodorosli kak produtsenty vodoroda // *Al'gologiya.* - 2010. - Vol. 20. - P. 224-249.
134. Fani R., Gallo R and Liò P Molecular evolution of nitrogen fixation: The evolutionary history of the *nifD*, *nifK*, *nifE*, and *nifN* genes // *J. Mol. Evol.* - 2000. - Vol. 51. - P. 1-11.
135. Herrero A, Muro-Pastor A.M and Flores E (2001) Nitrogen control in Cyanobacteria // *J Bacteriol.* - 2001. - Vol. 183. - P. 411-425.
136. Miller R.W., Eady R.R. Molybdenum and vanadium nitrogenases of *Azotobacter chroococcum*. Low temperature favours N₂ reduction by vanadium nitrogenase // *Biochem. J.* - 1988. - Vol. 256. - P. 429-432.
137. Valladares A., Muro-Pastor A.M., Fillat M.F., Herrero A., Flores E. Constitutive and nitrogen-regulated promoters of the *petH* gene encoding ferredoxin: NADP⁺ reductase in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. // *FEBS Lett.* - 1999. - Vol. 449. - P.159-164.
138. Hallenbeck P.C. (2012) Hydrogen Production by Cyanobacteria. In: Hallenbeck P. (eds) *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production.* Springer, Boston, MA.

139. Alberto A.E.F., Henrique C.J., Marcelo V., Alvarenga V., Nunes- Adriano N., Wagner A. Cyanobacterial nitrogenases: Phylogenetic diversity, regulation and functional predictions // Genetics and Molecular Biology. - 2017. - Vol 40.
140. Suzuki I., Horie N., Sugiyama T and Omata T. Identification and characterization of two nitrogen-regulated genes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942 required for maximum efficiency of nitrogen assimilation // J. Bacteriol. - 1995. - Vol. 177. - P. 290-296.
141. Alfonso M., Perewoska I., Kirilovsky D. Redox control of ntcA gene expression in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Nitrogen availability and electron transport regulate the levels of the NtcA protein // Plant Physiol. - 2001. - Vol. 125. - P. 969-981.
142. Bergman B., Gallon J.R., Rai A.N., Stal L.J. N₂ fixation by non-heterocystous cyanobacteria // FEMS Microbiol Rev. - 1997. - Vol. 19. - P. 139-185.
143. Thiel T., Lyons E.M., Erker J.C. Characterization of genes for a second Mo-dependent nitrogenase in the cyano-bacterium *Anabaena variabilis* // J. Bacteriol. - 1997. - Vol. 179. - P. 5222-5225.
144. Kentemich T., Danneberg G., Hundeshagen B., Bothe H. Evidence for the occurrence of the alternative, vanadium-containing nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // FEMS Microbiol. Lett. - 1988. - Vol. 51. - P. 19-24.
145. Gudrun B., Caroline S., Lucas S., Hermann B. The rice field cyanobacteria *Anabaena azotica* and *Anabaena* sp. CH1 express vanadium-dependent nitrogenase // Archives of microbiology. - 2006. - Vol. 186. - P. 367-376.
146. Thiel T. Isolation and characterization of the *vnfEN* genes of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // J. Bacteriol. - 1996. - Vol. 178. - P. 4493-4499.
147. Paulette V. Hydrogenases and H⁺ Reduction in Primary Energy Conservation // Results and problems in cell differentiation. - 2008. - Vol. 45. - P. 223-252.
148. Ghirardi M.L., Mohanty P. Oxygenic hydrogen photoproduction - current status of the technology // Current Science. - 2010. - Vol. 98. - P. 499-507.
149. Tamagnini P., Leitao E., Oliveira P., Ferreira D., Pinto F., Harris D.J., Heidorn T., Lindblad P. Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications // FEMS Microbiology Reviews. - 2007. - Vol. 31. - P. 692-720.
150. Tamagnini P., Axelsson R., Lindberg P., Oxelfelt F., Wunschiers R., Lindblad P. Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria // Microbiology and Molecular Biology Reviews. - 2002. - Vol. 66. - P. 1-20.
151. Smith G.D., Ewart G.D., Tucker W. Hydrogen production by cyanobacteria // Int. J. Hydrogen Energy. - 1992. - Vol. 17. - P. 695-698.
152. Boison G., Schmitz O., Mikheeva L., Shestakov S., Bothe H. Cloning, molecular analysis and insertional mutagenesis of the bidirectional hydrogenase genes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* // FEBS Lett. - 1996. - Vol. 394. - P. 153-158.
153. Boison G., Bothe H., Schmitz O. Transcriptional analysis of hydrogenase genes in the cyanobacteria *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* monitored by RT-PCR // Curr Microbiol. - 2000. - Vol. 40. - P. 315-321.

154. Tamagnini P., Troshina O., Oxelfelt F., Salema, R., Lindblad P. Hydrogenases in *Nostoc sp.* strain PCC 73102, a strain lacking a bidirectional enzyme // *Appl Environ Microbiol.* - 1997. - Vol. 63. - P. 1801-1807.
155. Sheremetieva M.E., Troshina O.Y., Serebryakova L.T., Lindblad P. Identification of hox genes and analysis of their transcription in the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 growing under nitrate-limiting conditions // *FEMS Microbiol Lett.* - 2002. - Vol. 214. - P. 229-233.
156. Houchins J.P. The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1984. - Vol. - 768. - P. 227-255.
157. Schmitz O., Boison G., Salzmann H., Bothe H., Schutz K., Wang S.H., Happe T. HoxE – a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2002. - Vol. 1554. - P. 66-74.
158. Oxelfelt F., Tamagnini P., Lindblad P. Hydrogen uptake in *Nostoc sp.* strain PCC 73102 cloning and characterization of a hupSL homologue // *Arch. Microbiol.* - 1998. - Vol. 169. - P. 267-274.
159. Weyman P., Brenda P., Thiel T. Transcription of hupSL in *Anabaena variabilis* ATCC 29413 Is Regulated by NtcA and Not by Hydrogen // *Applied and environmental microbiology.* - 2008. - Vol. 74. - P. 2103-2110.
160. Carrasco C.D., Buettner J.A., Golden J.W. Programmed DNA rearrangement of a cyanobacterial hupL gene in heterocysts // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1995. - Vol. 92. - P. 791-795.
161. Tsygankov A.A. Azotfiksiruyushchiye tsianobakterii - producsenty vodovoda (Obzor) // *Prikl. biokhim. i mikrobiol.* - 2007. - Vol. 43. - P. 279-288.
162. Carrasco C.D., Garcia J.S, Golden J.W. Programmed DNA rearrangement of a hydrogenase gene during *Anabaena* heterocyst development // *BioHydrogen.* - 1998. - P. 203-207.
163. Axelsson R., Lindblad P. Transcriptional regulation of *Nostoc* hydrogenases: effects of oxygen, hydrogen, and nickel // *Appl Environ Microbiol.* - 2002. - Vol. - 68. - P. 444-447.
164. Sadvakasova A.K., Kossalbayev B.D., Zayadan B.K., Bolatkhan K. Bioprocesses of hydrogen production by cyanobacteria cells and possible ways to increase their productivity // *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* - 2020. - V. 133. - P. 110054.
165. Lewandowska M., Sirko A. Recent advances in understanding plant response to sulfur-deficiency stress // *Acta biochimica Polonica.* - 2008. - Vol. 55. - P. 457-471.
167. Wykoff D., Davies J., Melis A., Grossman A. The Regulation of Photosynthetic Electron Transport during Nutrient Deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant physiology.* - 1998. - Vol. - 117. - P. 129-139.
168. Srirangan K., Pyne M.E., Perry C.C. Biochemical and genetic engineering strategies to enhance hydrogen production in photosynthetic algae and cyanobacteria // *Bioresour. Technol.* - 2011. - Vol. 102. - P. 8589-8604.
169. Antal T., Galina K., & Volgusheva A., Krendeleva T., Tyystjärvi, E., Rubin A. Hydrogen photoproduction by immobilized S-deprived *Chlamydomonas*

reinhardtii: Effect of light intensity and spectrum, and initial medium pH // *Algal Research*. - 2016. - Vol. 17. - P. 38-45.

170. Antal T., Matorin D., Kukarskikh G., Lambreva M., Tyystjärvi E., Krendeleva T., Tsygankov A., Rubin A. Pathways of hydrogen photoproduction by immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* cells deprived of sulfur // *International Journal of Hydrogen Energy*. - 2014. - Vol. 39. - P. 18194-18203.

171. Spiller H., et al. Increase and Stabilization of Photoproduction of Hydrogen in *Nostoc muscorum* by Photosynthetic Electron Transport Inhibitors // *Zeitschrift für Naturforschung*. - 1978. - Vol. 33. - P. 541-547.

172. Pansook S., Incharoensakdi A., Phunpruch S. Effects of the Photosystem II Inhibitors CCCP and DCMU on Hydrogen Production by the Unicellular Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* // *Scientific World Journal*. - 2019. - Vol. 10. - P. 302-336.

173. Meunier P.C., Burnap R.L., Sherman L.A. Interaction of the photosynthetic and respiratory electron transport chains producing slow O₂ signals under flashing light in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Photosynthesis Research*. - 1995. - Vol. 45. - P. 31-40.

174. Burrows E., Chaplen F., Ely R. Effects of selected electron transport chain inhibitors on 24-h hydrogen production by *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Bioresource technology*. - 2010. - Vol. 102. - P. 3062-3070.

175. Abdelwahab H.E.M. Hydrogen Production in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 with Engineered Subunit of the Bidirectional H₂-ase // *Advances in Life Science and Technology*. - 2014. - Vol. 18.

176. Peschek G.A., Obinger C., Paumann-Page M. The respiratory chain of blue-green algae (cyanobacteria) // *Physiologia plantarum*. - 2004. - Vol. 120. - P. 358-369.

177. Gutthann F., Egert M., Marques A., Appel J. Inhibition of respiration and nitrate assimilation enhances photohydrogen evolution under low oxygen concentrations in *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics*. - 2007. - Vol. 1767. - P. 161-169.

178. Batyrova K., Hallenbeck P. Hydrogen Production by a *Chlamydomonas reinhardtii* Strain with Inducible Expression of Photosystem II // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2017. - Vol. 18.

179. Weissman J.C., Benemann J.R. Hydrogen production by nitrogen starved cultures of *Anabaena cylindrica* // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1977. - Vol. - 33. - P. 123-131.

180. J. Komenda. Photosystem 2 photoinactivation and repair in the *Scenedesmus* cells treated with herbicides DCMU and BNT and exposed to high irradiance // *Photosynthetica*. - 1998. - Vol. 35. - P. 477-480.

181. Cournac L., Guedeney G., Peltier G., Vignais P.M. Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex // *J. Bacteriol.* - 2004. - Vol. 186. - P. 1737-1746.

182. Torimura M., Miki A., Wadano A., Kano K., Ikeda T. Electrochemical investigation of cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC7942-catalyzed photoreduction

of exogenous quinones and photoelectrochemical oxidation of water. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. - 2001. - Vol. 496. - P. 21-28.

183. Pisciotta J.M., Zou Y., Baskakov I.V. Light-dependent electrogenic activity of cyanobacteria // *PLoS ONE*. - 2010. - Vol. 5. - P. 1-10.

184. Imafuku H., Katoh T. Intracellular ATP level and light-induced inhibition of respiration in a blue-green alga, *Anabaena variabilis* // *Plant & Cell Physiology (PCP)*. - 1976. - Vol. 17. - P. 515-524.

185. Berg S.P., Krogmann D.W. Mechanism of KCN inhibition of photosystem I // *J. Biol. Chem.* - 1975. - Vol. 250. - P. 8957-8962.

186. Hihara Y., Sonoike K., Kanehisa M., Ikeuchi M. DNA Microarray Analysis of Redox-Responsive Genes in the Genome of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 // *Journal of bacteriology*. - 2003. - Vol. 185. - P. 1719-1725.

187. Boris V., Trubitsin V.V., Ptushenko O.A., Koksharova M.D., Mamedov L.A., Vitukhnovskaya I.A., Grigorev A.Y., Semenov A.N., Tikhonov E.P.R. Study of electron transport in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803: Oxygen-dependent interrelations between photosynthetic and respiratory electron transport chains // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. - 2005. - Vol. - 1708. - P. 238-249.

188. Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф., Лукина Л.Ф. и др. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. - Киев: - Наукова думка, 1975. - 247 с.

189. Музафаров А.М., Эргашев А.Э., Халилова С.Х. Определитель сине-зеленых водорослей Средней Азии. - Ташкент: Фан, 1987. - Т. 1. - С. 3-405.

190. Эргашев А.Э. Определитель протоккокковых водорослей Средней Азии. - Ташкент, 1979. - Кн. 1. - 344 с.

191. Голлербах М.М., Косинская Е.К., Полянский В.И. Определитель пресноводных водорослей СССР: Диатомовые водоросли. М., 1951. Вып. 4. - 644 с.

192. Баринаева С.С., Медведева Л.А. Атлас водорослей - индикаторов сапробиости (российский Дальний Восток). - Владивосток: Дальнаука, 1996. - 364 с.

193. Кузяхметов Г.Г., Дубовик И.Е. Методы изучения почвенных водорослей: учебное пособие. Уфа: Изд-е Башкирск. ун-та, 2001. - 60 с.

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

195. Абакумов В.А. Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений. Ленинград: Гидрометеиздат, 1983. - 240 с.

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

196. Бауенова М.Ө. Микробалдыр және су өсімдіктерінің ассоциациясы негізінде ластанған су экожүйелерін биоремедиациялау: 2019.

<https://www.kaznu.kz/ru/18071/page/>

197. Zayadan B., Ussebayeva A., Bolatkhan K., Akmukhanova N., Kossalbayev B., Baizhigitova A., Los D. Screening of isolated and collection strains of cyanobacteria on productivity for determining their biotechnological potential // Bulletin KazNU, Ecological series. - 2018. - Vol. 2. - P. 121.

198. Усербаева А.А., Бейсембек А.Е., Косалбаев Б.Д., Рысбекулы К., Болатхан К., Какимова А.Б., Заядан Б.К. Влияние различных концентраций CO₂ на продуктивность штаммов цианобактерий // Вестник КазНУ, серия экологическая. - 2019. №4 (61). С. 72-79.

199. Темралеева А.Д., Минчева Е.В., Букин Ю.С., Андреева А.М. Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (*Chlorophyta*). - Кострома: Костромской печатный дом, 2014. - 215 с.

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

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

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

203. Sambrook J.E.F.F, Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

204. Itean I., Rippka R., De Marsac N.T., Herdman M. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria // Microbiology. - 2000. - Vol. 146. - P. 1275-1286

205. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids. Research. -1994. - Vol. 22. - P. 4673-4680.

206. Eisenmann D.M. Wnt signaling (2005) // WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.7.1, <http://www.wormbook.org>.

207. Ussebayeva A.A., Sarsekeeva F.K., Bolatkhan K., Zayadan B.K. Morphological and cultural properties of cyanobacterial strains isolated from extreme natural conditions // Bulletin KazNU. - 2014. - Vol. 60. - P. 414-441.

208. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Molecular biology and evolution. - 2011. - Vol. 28. - P. 2731-2739.

209. Hardy R.W., Holsten R.D., Jackson E.K., Burns R.C. The acetylene-ethylene assay for n(2) fixation: laboratory and field evaluation // Plant Physiol. - 1968. - Vol. 43. - P. 1185-1207.

210. Das S., De T.K. Microbial assay of N₂ fixation rate, a simple alternate for acetylene reduction assay // *MethodsX*. - 2018. - Vol. 6. - P. 909-914.
211. Hernandez J.A., George, S. J., & Rubio, L. M. Molybdenum trafficking for nitrogen fixation. *Biochemistry*. - 2009. - Vol. 48. - P. 9711-9721.
212. Attridge E.M., Rowell P. Growth. Heterocyst differentiation and nitrogenase activity in the cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Anabaena cylindrica* in response to molybdenum and vanadium // *New Phytologist*. – 1997. - Vol. 135. - P. 517-526.
213. Anthony E. Walsby, Cyanobacterial heterocysts: terminal pores proposed as sites of gas exchange, *Trends in Microbiology*, Volume 15, Issue 8, 2007, Pages 340-349, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.06.007>.
214. Bothe H., Schmitz O., Yates M.G., Newton W.E. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* - 2010. - Vol. 74. - P. 529-551.
215. Takuji O. Nitrogen as a major essential element of plants // *Nitrogen Assimilation in Plants*. - 2010. - P.18.
216. Fageria N., Adonis M. The Role of Mineral Nutrition on Root Growth of Crop Plants // *Advances in Agronomy*. - 2011. - Vol. 110. - P. 251-331.
217. Kossalbayev B.D., Zayadan B.K., Sadvakasova A.K., Bolatkhan K., Token A., Wefag S. Study of the effect of nitrogen-fixing cyanobacteria on the growth rate of the *Strawberry Sunrise T-4* strawberry variety // *KazNU Bulletin, ecological series*. - 2020. - Vol. 1. - P. 4-15.
218. Jacoby R., Peukert M., Succurro A., Koprivova A., Kopriva S. The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition-Current Knowledge and Future Directions // *Front Plant Sci*. - 2017. - Vol. 8. - P. 1617-1622.
219. Pan B., Bai Y.M., Leibovitch S., Smith D.L. Plant growth promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short growing season area // *Eur. J. Agron.* - 1999. - Vol. 11. - P. 179-186.
220. Zahir A.Z., Abbas S.A., Khalid A., Arshad M. Substrate dependent microbially derived plant hormones for improving growth of maize seedling // *Pak. J. Biol. Sci.* - 2000. - Vol. 3. - P. 289-291.
221. Shariatmadari Z., Riahi H., Hashtroudi M. S., Ghassempour A., Aghashariatmadary Z. Plant growth promoting cyanobacteria and their distribution in terrestrial habitats of Iran // *Soil Science and Plant Nutrition*. - 2013. - Vol. 59. - P. 535-547.
- 222 Lee C.I., Hackett W.P. Root regeneration of transplanted *Pistacia chinensis* Bunge seedlings at different growth stages // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* - 1976. - Vol. 101. - P. 236-240.
223. Obana, S., Miyamoto, K., Morita, S., Ohmori, M., Inubushi, K. “Effect of *Nostoc* sp. on soil characteristics, plant growth and nutrient uptake // *J. Appl. Phycol.* - 2007. - Vol. 19. - P. 641-646.
224. Klementiev K.E., Maksimov E.G., Gvozdev D.A., Tsoraev G.V., Protopopov F.F., Elanskaya I.V., Abramov S.M., Dyakov M.Y., Ilyin V.K., Nikolaeva N.A., Moisenovich M.M., Slonimskiy Y.B., Sluchanko N.N., Lebedev V.M., Spassky A.V.,

Friedrich T., Maksimov G.V., Rubin AB. Radioprotective role of cyanobacterial phycobilisomes // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2019. - Vol. 1860. - P. 121-128.

225. Mosharova I.V., Ilinskii V.V., Matorin D.N., Mosharov S.A., Akulova A.Y., Protopopov F.F. Monitoring of the Moskva river water using microbiological parameters and Chlorophyll a fluorescence // *Mikrobiologiya.* - 2015. - Vol. 84. - P. 712-724.

226. Sinetova M., Bolatkhan K., Sidorov R., Mironov K.S., Skrypnik A.N., Kupriyanova E., Zayadan B., Shumskaya M., Los D. Polyphasic characterization of the thermotolerant cyanobacterium *Desertifilum* sp. strain IPPAS B-1220 // *FEMS Microbiol. Lett.* - 2017. - Vol. 364. - P. 27.

227. Khetkorn W., Lindblad P., Incharoensakdi A. Inactivation of uptake hydrogenase leads to enhanced and sustained hydrogen production with high nitrogenase activity under high light exposure in the cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012 // *J. Biol. Eng.* - 2012. Vol. 6. - P. 19.

228. Eroglu E, Melis A. Microalgal hydrogen production research // *Int. J. Hydrogen Energy.* - 2016. - Vol. 41. - P. 12772-12798.

229. Lindblad P. Cyanobacterial H₂ Metabolism: Knowledge and Potential/Strategies for a Photobiotechnological Production of H₂ // *Biotecnol. Apl.* - 1999. - Vol. 16. - P. 141-144.

230. Hallenbeck P.C. Photofermentative Biohydrogen Production // *Biohydrogen.* - 2013. - P. 145-159.

231. Yeager C.M., Milliken C.E., Bagwell C.E., Staples L., Berseth P.A., Sessions H.T. Evaluation of experimental conditions that influence hydrogen production among heterocystous cyanobacteria // *Int. J. Hydrogen Energy.* - 2011. - Vol. 36. - P. 7487-7499.

232. Heyer H., Stal L., Krumbein W.E. Simultaneous heterolactic and acetate fermentation in the marine cyanobacterium *Oscillatoria limosa* incubated anaerobically in the dark // *Arch Microbiol.* - 1989. - Vol. 151. - P. 558-64.

233. Prabaharan D., Subramania G. Oxygen-free hydrogen production by the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU 20041 // *Bioresour Technol.* - 1996. - Vol. 57. - P. 111-116.

234. Burrows E.H., Chaplen F.W.R., Ely R.L. Optimization of media nutrient composition for increased photofermentative hydrogen production by *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Int. J. Hydrogen Energy.* - 2008. - Vol. 33. - P. 6092-6099.

235. Antal T.K., Lindblad P. Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH // *J. Applied Microbiol.* - 2005. - Vol. 98. - P. 114-120.

236. Huang X., Zang X., Wu F., Jin Y., Wang H., Liu C., Ding Y., He B, Xiao D., Song X., Liu Z. Transcriptome Sequencing of *Gracilariopsis lemaneiformis* to Analyze the Genes Related to Optically Active Phycoerythrin Synthesis // *PLoS ONE.* - 2017. - Vol. 12. - P. 17.

237. Skizim N.J., Ananyev G.M., Krishnan A., Dismukes G.C. Metabolic pathways for photobiological hydrogen production by nitrogenase- and hydrogenase-

containing unicellular cyanobacteria Cyanothece // J Biological Chemistry. - 2011. - Vol. 287. - P. 2777-2786.

238. Kossalbayev B.D., Tatsuya T., Zayadan B.K., Sadvakasova A.K., Bolatkhan K., Alwasel S., Allakhverdiev S.I. Determination of the potential of cyanobacterial strains for hydrogen production // International Journal of Hydrogen Energy. - 2020. - Vol. 45. - P. 2627-2639.

239. Tsygankov A.A., Serebryakova L.T., Rao K.K., Hall D.O. Acetylene reduction and hydrogen photoproduction by wild-type and mutant strains of *Anabaena* at different CO₂ and O₂ concentrations // FEMS Microbiol. - 2006. - Vol. 167. - P. 13-7.

240. Antal T.K., Matorin D.N., Kukarskikh G.P., Lambreva M.D., Tyystjarvi E., Krendeleva T.E., Tsygankov A.A., Rubin A.B. Pathways of hydrogen photoproduction by immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* cells deprived of sulfur // Int. J. Hydrogen Energy. - 2014. - Vol. 3918. - P.194-203.

241. Zayadan B.K., Kossalbayev B.D., Tatsuya T., Allakhverdiev S.I., Sadvakasova A.K., Bolatkhan K., Kakimova A. Study of promising heterocystic cyanobacterial strains for biohydrogen production // Series of biological and medical journal. - 2020. - Vol. 3. - P. 41-48

242. Bolatkhan K., Kossalbayev B.D., Zayadan B.K., Tomo T., Veziroglu T.N., Allakhverdiev S.I. Hydrogen production from phototrophic microorganisms: Reality and perspectives, International Journal of Hydrogen Energy. – 2019. - Vol. 44. - P. 5799-5811.

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

Қосымша 1

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ  **РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН**

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT
№ **4566**

ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL

(21) 2019/0512.2
(22) 05.06.2019

Қазақстан Республикасы Пайдалы модельдер мемлекеттік тізімінде тіркеу күні / Дата регистрации в Государственном реестре полезных моделей Республики Казахстан / Date of the registration in the State Register of Utility Models of the Republic of Kazakhstan: 19.12.2019

(54) Фототрофты микроорганизмдерді дақылдауға және сұрыптауға арналған фотобиореактор
Фотобиореактор для выращивания и скрининга фототрофных микроорганизмов
Photobioreactor for growing and screening phototrophic microorganisms

(73) "Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігінің шаруашылық жүргізу құқығындағы "әл-Фараби" атындағы Қазақ Ұлттық университеті республикалық мемлекеттік кәсіпорнының шаруашылық жүргізу құқығындағы "Биология және биотехнология проблемалары ғылыми-зерттеу институты" еншілес мемлекеттік кәсіпорны (KZ)
Дочернее государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии" Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения "Казахский национальный университет им. аль-Фараби" Министерства образования и науки Республики Казахстан (KZ)
"Institute of Plant Biology and Biotechnology" Subsidiary State Enterprise on the Right of Economic Management of "Al-Farabi Kazakh National University" Republican State Enterprise on the Right of Economic Management of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (KZ)

<p>(72) Заядан Болатхан Казыханұлы (KZ) Садвақасова Асемгуль Калыкумаровна (KZ) Усербаява Айжан Асхаровна (KZ) Қосалбаев Бекжан Дүйсенбіұлы (KZ) Болатхан Кенжегул (KZ) Кожан Данияр Малықұлы (KZ)</p>	<p>Zayadan Bolatkhan Kazykhanuly (KZ) Sadvakassova Assengul Kalyikumarovna (KZ) Usserbayeva Aizhan Askharovna (KZ) Kossalbayev Bekzhan Duisenbiuly (KZ) Bolatkhan Kenzhegul (KZ) Kozhan Daniyar Malikuly (KZ)</p>
--	---

ЭЦҚ қол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed by EDS

Е. Оспанов
Y. Ospenov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE