

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
**ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**  
ИМ. К. А. ТИМИРЯЗЕВА РАН  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

---

*На правах рукописи*



**БОЗИЕВА**

**Айшат Магомедовна**

**Выявление и исследование фототрофных  
микроорганизмов для получения молекулярного  
водорода**

(1.5.21. Физиология и биохимия растений)

Диссертация

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель: д.б.н., чл.-корр. РАН  
**Аллахвердиев Сулейман Ифхан оглы**

Москва – 2024

## Оглавление

Список сокращений.....	4
Введение.....	5
<b>Глава 1. Обзор литературы.....</b>	<b>11</b>
1.1 Молекулярный водород – перспективный энергоноситель.....	11
1.2 Фототрофные микроорганизмы – продуценты H <sub>2</sub> .....	12
1.3 Цианобактерии .....	15
1.3.1 Морфология, классификация, распространение в природе, образ жизни.....	16
1.3.2 Физиолого-биохимическая характеристика.....	19
1.3.3 Водородный метаболизм.....	22
1.3.4 Азотный метаболизм.....	30
1.3.5 Взаимосвязь нитрогеназы с водородпоглощающей гидрогеназой. Оксигородная реакция.....	31
1.3.6 Переносчики электронов, взаимодействующие с ферментами, вовлеченными в водородный метаболизм.....	32
1.4 Биологическое разнообразие цианобактерий, генерирующих водород.....	33
1.5 Гетероцистные цианобактерии – перспективные продуценты водорода.....	39
1.6 Стратегии, используемые для повышения продуктивности процесса выделения водорода.....	42
<b>Глава 2. Объекты и методы исследования.....</b>	<b>46</b>
2.1 Объекты исследования и условия культивирования.....	46
2.2 Методы исследования.....	48
2.2.1 Подбор оптимальной температуры культивирования для штамма <i>Dolichospermum</i> sp. IPPAS B-1213.....	48
2.2.2 Определение скорости роста цианобактерий.....	49
2.2.3 Анализ содержания фотосинтетических пигментов.....	50
2.2.4 Определение скорости выделения кислорода.....	50
2.2.5 Определение скорости выделения водорода.....	51
2.2.6 Определение частоты образования гетероцист.....	54

2.2.7	Определение активности нитрогеназы.....	55
2.2.8	Определение способности к хемоорганогетеротрофному росту.....	55
2.3.	Точность и воспроизводимость измерений.....	55
<b>Глава 3. Результаты и обсуждение.....</b>		<b>56</b>
3.1	Определение оптимальной температуры культивирования для штамма <i>Dolichospermum</i> sp. IPPAS B-1213.....	56
3.2	Ростовые характеристики исследуемых культур.....	57
3.3	Пигментный состав.....	59
3.4	Скорость выделения кислорода .....	60
3.5	Водород-продуцирующая активность цианобактерий.....	63
3.5.1	Влияние DCMU и DBMIB на скорость выделения водорода.....	63
3.5.2	Влияние частоты образования гетероцист на скорость выделения водорода.....	68
3.5.3	Влияние экзогенных источников органического углерода на скорость выделения водорода.....	70
3.5.4	Обратный переход от производства водорода к нормальным физиологическим функциям.....	80
3.6	Скорость ацетиленредукции.....	81
3.7	Хемоорганогетеротрофный рост.....	82
<b>Заключение.....</b>		<b>84</b>
<b>Выводы.....</b>		<b>85</b>
<b>Список публикаций по теме диссертации.....</b>		<b>87</b>
<b>Список использованной литературы.....</b>		<b>91</b>

## Список сокращений

H<sub>2</sub> – молекулярный водород

ФСА – фотосинтетический аппарат

ФС I – фотосистема I

ФС II – фотосистема II

РЦ – реакционный центр

Фд – ферредоксин

Флд – флаводоксин

ССК – светособирающие комплексы

Хл – хлорофилл

Кар – каротиноиды

Цит – цитохром

ПХ – пластохинон

DCMU – 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина, диурон

DMSO – диметилсульфоксид

DBMIB – 2,5-дибромо-6-изопропил-3-метил-1,4-бензохинон

$\mu_{\max}$  – максимальная скорость роста

T<sub>удв.</sub> – время удвоения биомассы

H<sub>2</sub>аза – гидрогеназа

N<sub>2</sub>аза – нитрогеназа

ССМ – углерод-концентрирующий механизм

ЛСИК – лабораторная система интенсивного культивирования

## **Введение**

Быстрое истощение мировых запасов нефти, угля и других видов органического топлива, рост населения планеты, увеличение спроса на энергию, а также отрицательное влияние продуктов сгорания ископаемого топлива на экологию являются стимулом к активному поиску альтернативных источников энергии. Перед человечеством встает задача своевременно выявить и научиться эффективно использовать новые источники энергии и энергоносители. Молекулярный водород ( $H_2$ ) – один из наиболее перспективных кандидатов на роль экологически чистого энергоносителя, который может способствовать дальнейшему внедрению возобновляемых источников энергии в трудноэлектрифицируемые секторы: транспорт, промышленность, а также в те секторы, которые полагаются на существующие газовые сети (Радченко и др., 2014; IRENA, 2018). Разработка эффективных методов получения различных видов топлива из сырья биологического происхождения и его использование совместно с традиционными ископаемыми видами топлива позволят решить множество проблем в энергетике (Цыганков, 2006; Hallenbeck, 2012; Зуева и др., 2014; Hallenbeck et al., 2018).

### **Актуальность темы исследования**

В настоящее время проблема поиска экологически чистых, возобновляемых источников энергии особенно актуальна. Одним из подходов к решению этой проблемы является исследование и эффективное использование альтернативных источников энергии (Цыганков, 2006; Дебабов, 2008; Радченко и др., 2014). Основная цель поиска альтернативных источников энергии заключается в создании возможности получать ее из возобновляемых и практически неисчерпаемых природных ресурсов, особое внимание в этом отношении уделяется экологичности, экономичности и безопасности процесса (Назаренко, 2012). Этим требованиям отвечает водород, получаемый биологическим путем (Melis, 2007; Khetkorn et al., 2017). Водород – это экологически чистый источник энергии, важным преимуществом которого является то, что его можно получить из воды, путем биофотолиза. При этом конечным продуктом его сгорания также является вода –

экологически нейтральное соединение. Генерировать  $H_2$  способны хемотрофные (анаэробные бактерии, факультативно анаэробные бактерии, аэробные бактерии, простейшие) и фототрофные микроорганизмы (пурпурные бактерии, зеленые бактерии, цианобактерии, водоросли) (Khetkorn et al., 2017). Использование цианобактерий в качестве продуцентов молекулярного водорода является наиболее предпочтительным способом, поскольку они выделяют водород в результате конверсии солнечной энергии, а также для культивирования этих микроорганизмов не требуются сложные питательные среды. Кроме того, из всех групп фототрофных микроорганизмов только среди цианобактерий, обнаружены виды, способные выделять водород в аэробных условиях. В процесс выделения водорода у цианобактерий вовлечены ферменты: нитрогеназы и гидрогеназы. Нитрогеназы катализируют при участии АТФ восстановление протонов ( $H^+$ ) до  $H_2$  в процессе азотфиксации. Поглощающая гидрогеназа катализирует поглощение молекулярного водорода, высвобождающегося в клетках с активной нитрогеназой. Обратимая гидрогеназа катализирует как образование, так и поглощение  $H_2$  и не связана с процессом фиксации азота (Vignais and Colbeau, 2004; Tamagnini et al., 2007).

Для практического применения методы получения биоводорода с использованием микроорганизмов требуют повышения эффективности и стабильности процесса. Особую важность представляют поиск и исследование новых штаммов цианобактерий, перспективных для получения водорода; изучение ферментных систем метаболизма  $H_2$  и путей их регуляции.

### **Цель и задачи исследования**

Цель работы: исследование штаммов цианобактерий для выявления наиболее активных продуцентов молекулярного водорода.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Выбрать и проанализировать ранее не изученные штаммы цианобактерий, относящиеся к разным морфологическим группам, из коллекции микроводорослей и цианобактерий ИФР РАН (IPPAS), с высоким фотосинтетическим потенциалом

и способностью к быстрому росту и накоплению биомассы в разных условиях для исследования их потенциала в производстве молекулярного водорода.

2. Исследовать водород-продуцирующую способность выбранных штаммов цианобактерий. Изучить влияние внешних факторов, таких как источники углерода и ингибиторы фотосинтетической активности, на предмет увеличения скорости и продолжительности выделения водорода. Исследовать влияние частоты образования гетероцист на скорость выделения водорода.

3. Оптимизировать методику получения водорода с использованием комбинированного действия нескольких факторов: дефицит связанных форм азота в среде культивирования, полное замещение  $N_2$  и  $O_2$  инертным газом, включение источника органического углерода и освещение.

4. Предложить схему возможных метаболических путей выделения водорода у выбранных штаммов цианобактерий.

### **Научная новизна**

Впервые исследована способность к выделению водорода у штаммов цианобактерий: *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213, *Sodalinema gerasimenkoae* IPPAS B-353. Показано, что ингибиторы фотосинтетической активности 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевина (DCMU) и 2,5-дибромо-3-метил-6-изопропил-п-бензохинон (DBMIB) кратковременно усиливают выделение водорода. На примере *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 продемонстрировано эффективное воздействие экзогенных органических источников углерода на скорость, стабильность и длительность процесса выделения водорода. Впервые показан эффект комбинированного действия на выделение водорода гетероцистными цианобактериями следующих факторов: дефицит связанных форм азота в среде культивирования, полное замещение  $N_2$  и  $O_2$  инертным газом, включение источника органического углерода и освещение. Предложена схема возможных метаболических путей выделения водорода у штаммов цианобактерий: *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213, *Sodalinema gerasimenkoae* IPPAS B-353.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Исследование биологического разнообразия потенциальных продуцентов водорода является важной составляющей частью глобального поиска высокопродуктивных производителей водорода. Применение метаболических подходов дает возможность повысить продуктивность процесса выделения водорода.

Полученные в ходе работы результаты имеют важное теоретическое и практическое значение.

### **Методология и методы исследования**

В данной работе применялись методы газохроматографического анализа для определения концентраций водорода, кислорода, азота, этилена и ацетилена; метод световой микроскопии для определения частоты гетероцист; полярографический метод для определения скорости выделения кислорода; а также спектрофотометрические методы анализа. Для обработки результатов использовали компьютерные программы: Цвет-Аналитик, PowerGraph, OriginPro 9.1, ImageJ, Microsoft Excel.

### **Положения, выносимые на защиту**

1) Ранее неисследованные штаммы *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213, *Sodalinema gerasimenkoae* IPPAS B-353 и *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 способны выделять водород.

2) Ингибирование фотосинтетической активности с помощью DCMU и DBMIB приводит к кратковременному ускорению процесса выделения  $H_2$ , а экзогенные органические источники углерода усиливают выделение  $H_2$  в 30 и более раз, положительно влияя на продолжительность процесса; частота образования гетероцист влияет на скорость выделения водорода у штамма *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213.

3) Оптимальная комбинация внешних условий приводит к длительному выделению водорода у *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 за счет стимуляции образования гетероцист, синтеза нитрогеназы, перехода нитрогеназы к функции АТФ-зависимой гидрогеназы, блокирования поглощения водорода в



оксигородной реакции и обеспечения нитрогеназы экзогенным донором электронов и АТФ.

### **Степень достоверности**

Все эксперименты проводились в достаточных для построения достоверной статистики биологических и аналитических повторностях. Выводы обоснованы экспериментально и отражены в печатных работах.

### **Степень разработанности темы**

В настоящее время активно исследуются фототрофные микроорганизмы, способные эффективно производить водород (Allahverdiyeva et al., 2010; Yeager et al., 2011; Touloupakis et al., 2016; Pansook et al., 2019; Kossalbayev et al., 2020), а также осваиваются новые методы и подходы (метаболические, генетические, технологические) с целью повышения продуктивности процесса и наладки устойчивого производства водорода (Cournac et al., 2004; Antal, Lindblad, 2005; Prince, Kheshgi, 2005; Ananyev et al., 2008; Dickson et al., 2009; Bandyopadhyay et al., 2010; Min, Sherman, 2010; Savakis, Hellingwerf, 2015; Kamshybayeva et al., 2022; Kossalbayev et al., 2022; Bozieva et al., 2023). Метаболизм  $H_2$  лучше всего изучен у цианобактерий следующих родов: *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Cyanothece*, *Oscillatoria*, *Anabaena* и *Nostoc*. Скорость выделения водорода, согласно имеющимся в литературе данным, колеблется в диапазоне от 0.001 до 465 мкмоль  $H_2$  (мг Хл ч)<sup>-1</sup> (Kumazawa, Mitsu, 1981; Suda et al., 1992; Mitsui, Suda., 1995; Fedorov et al., 2001; Tsygankov et al., 2002; Lindberg et al., 2004; Gutthann et al., 2004; Antal, Lindblad., 2005; Yoshino et al., 2007; Burrows et al., 2008; Min, Sherman., 2010; Yeager et al., 2011; Skizim et al., 2012; Kossalbayev et al., 2020; Kamshybayeva et al., 2023).

### **Апробация работы**

По теме диссертации опубликовано 6 статей, из которых 5 – в международных рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК РФ.

Результаты работы представлены на: 74 Всероссийской с международным участием школе-конференции «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 20-23 апреля 2021); IX Съезде Российского фотобиологического общества (Шепси, 12-19 сентября 2021); VII Съезде

биохимиков, молекулярных биологов и физиологов России (Дагомыс, 2021); Всероссийской конференции с международным участием «От первичных процессов фотосинтеза до альтернативной энергетики» (Пушино, 19-24 июня 2022); IV Международной научной школе-конференции «Цианопрокариоты/цианобактерии: систематика, экология, распространение, использование в биотехнологии» (Уфа, 16-21 мая 2022); VI Всероссийской научной конференции и школе молодых ученых «Водоросли: проблемы таксономии и экологии, использование в мониторинге и биотехнологии» (Звенигород, 12-17 сентября 2022); XIII молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 16-18 ноября 2022); V Международной научной школе-конференции «Цианопрокариоты/цианобактерии: систематика, экология, распространение, использование в биотехнологии» (Москва, 13-16 июня 2023); XI Международной конференции “Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability-2023” (Istanbul, Turkey, 3-9 July 2023); X Международной конференции “Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability-2024” (Istanbul, Turkey, 13-19 October 2024).

#### **Личный вклад автора в исследование**

Автор работы принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов, а также в обсуждении результатов и подготовке рукописей к публикации. Большая часть экспериментальных результатов получена лично автором или при его активном участии.

#### **Структура и объем диссертационной работы**

Диссертация имеет стандартную структуру и состоит из титульного листа, оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы.

Материалы диссертации изложены на 117 страницах и содержат 2 таблицы и 22 рисунка. Список использованной литературы состоит из 285 источников, в т.ч. 241 иностранных.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Молекулярный водород – перспективный энергоноситель

Молекулярный водород ( $H_2$ ) – горючий газ без цвета, запаха и вкуса, в 14.4 раза легче воздуха. Водород самый распространенный элемент во Вселенной, в основном встречается в виде соединений, относится к основным биогенным элементам и входит в состав всех органических веществ. Содержание водорода в атмосфере составляет около 0.0001% по числу атомов (Кондратьева, Гоготов, 1981; Osman et al., 2022).

Благодаря высокой удельной теплоте сгорания водород рассматривается в качестве кандидата на роль перспективного энергоносителя будущего (Khetkorn et al., 2017; Aziz, 2016; Hosseini, Wahid., 2016).  $H_2$  не токсичен, не вызывает коррозии, не самовоспламеняется; при сжигании в чистом кислороде образует – высокотемпературное тепло и воду (Adam et al., 2020; Радченко и др., 2014). Водород обладает высокой плотностью энергии по весу и низкой по объему по сравнению с углеводородами. В отличие от сжиженного природного газа, сжиженный водород содержит в 2.4 раза больше энергии, но требует в 2.8 больше объема для хранения (Osman et al., 2022). К достоинствам водорода относится его высокая энергоемкость и возможность использования в топливных элементах. Удельный тепловой эффект от сжигания  $H_2$  равен 143 МДж/кг, что в 3-3,5 раза превосходит теплотворную способность углеводородов (42-48 МДж/кг) (Maazloomi, Gomes, 2012). Также важно, что системы водородного аккумулирования энергии, в отличие от других энергетических систем, способны обеспечивать длительное хранение запасенной энергии, поскольку для них не характерен саморазряд при хранении, и отсутствует зависимость энергетической емкости от температуры (Kulova et al., 2018).

Наиболее предпочтительной технологией получения водорода является фоторазложение воды на молекулярный водород и кислород, основанное на неисчерпаемых ресурсах – воде и солнечной энергии (Allakhverdiev et al., 2010).

Такой водород принято обозначать как «зеленый», технология производства данного вида водорода отличается практически нулевым углеродным следом.

Основным препятствием на пути развития и внедрения данного экологически чистого вида энергии в промышленные масштабы по-прежнему остается высокая стоимость. Для практического использования этого процесса важно иметь: высокие скорости и высокий выход  $H_2$ ; дешевый субстрат; дешевый источник энергии; высокий КПД преобразования энергии. Другой проблемой развития водородной энергетики является проблема хранения/аккумулирования  $H_2$  (Kozlov, Fateyev, 2009; Dunikov et al., 2024). В настоящее время имеются различные технологии хранения водорода, среди которых можно выделить следующие: хранение сжатого газообразного водорода в резервуарах высокого давления; хранение газообразного водорода при обычном и повышенном давлении в подземных хранилищах; хранение жидкого водорода; хранение водорода в виде гидридов; хранение водорода в носителях, в микросферах, в капиллярных структурах (Фатеев и др., 2018; Dunikov et al., 2024). Однако, технологии хранения водорода также должны быть усовершенствованы для их эффективного использования.

## 1.2 Фототрофные микроорганизмы – продуценты $H_2$

В атмосферу ежегодно поступает около  $22-23 \cdot 10^6$  т  $H_2$ , а скорость потребления равна  $26 \cdot 10^6$  т/год (Seiler et al., 1977). Около  $4 \cdot 10^6$  т, от общей продукции, учтенного водорода образуется в результате деятельности микроорганизмов (Seiler, 1976).

Выделять водород способны фототрофные и хемотрофные микроорганизмы. Фототрофные организмы более перспективны как продуценты  $H_2$ , в связи с тем, что образованный ими водород может являться продуктом биоконверсии солнечной энергии. К фототрофным микроорганизмам, способным выделять  $H_2$  относятся пурпурные бактерии, зеленые бактерии, микроводоросли и цианобактерии (Кондратьева, Гоготов, 1981).

Впервые способность микроорганизмов выделять водород была открыта в 1935 году Рюеллофсенем у *Chromatium* sp. D, который выделял водород в темноте в

анаэробных условиях (Roelofsen, 1935). Субстратами для такого процесса могут быть сахара, пируват, формиат, глицерофосфат, глицерин, процесс протекает при участии гидрогеназы и нитрогеназы (Roelofsen, 1934, 1935; Кондратьева, 1963, 1974; Кондратьева, Гоготов, 1981). У микроводорослей способность выделять водород была описана Гаффроном и Рубиным (Gaffron, 1939; Gaffron, Rubin, 1942), позднее Гест и Камен открыли светозависимое выделение (фотовыделение) водорода пурпурными бактериями *Rhodospirillum rubrum* (Gest, Kamen, 1949). А у цианобактерий способность к производству водорода была открыта Френкелем, Гаффроном и Батли в 1950 году (Frenkel et al., 1950).

*Пурпурные бактерии (ПБ)* – это преимущественно водные микроорганизмы, осуществляющие фотосинтез без выделения кислорода. У ПБ процесс выделения водорода наиболее исследован (Кондратьева, Гоготов, 1981). Больше число видов ПБ способны к фотовыделению водорода, чем к выделению за счет темновой ферментации (Gest, Kamen, 1960; Кондратьева, 1963), кроме того, скорость выделения водорода в условиях освещения выше, чем в темноте (Кондратьева, Гоготов, 1981). Количество и скорость генерации  $H_2$  ПБ зависят от характеристик штаммов, возраста культуры и используемых субстратов. Наиболее активно выделяют водород такие штаммы, как: *Rhodopseudomonas capsulata*, *Rh. sulfidophila*, *Rh. rubrum*, *Rh. spheroides* (Weare, 1978; Кондратьева, 1979; Weaver et al., 1979). Среди субстратов, обеспечивающих высокую скорость процесса, выделяют малат, пируват, сукцинат и лактат (Gest, Kamen, 1960; Кондратьева, 1963; Gogotov, 1973; Weaver et al., 1979). Среди фототрофных организмов, способных выделять водород, некоторым пурпурным бактериям характерна наибольшая скорость данного процесса. Но использование ПБ в широких масштабах ограничивается необходимостью больших количеств дешевых органических субстратов или восстановленных соединений серы (Кондратьева, 1979).

*Зеленые бактерии*, как и ПБ, относятся к водным микроорганизмам, и способны осуществлять фотосинтез без выделения  $O_2$  (Горленко и др., 1977;

Кондратьева, Гоготов, 1981). Эта группа микроорганизмов способна выделять небольшие количества водорода на свету (Кондратьева, Гоготов, 1969, 1976).

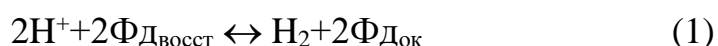
*Цианобактерии* в отличие от пурпурных и зеленых бактерий осуществляют фотосинтез с выделением кислорода за счет наличия у них двух фотосистем и способности использовать в качестве донора электронов воду (Кондратьева, Гоготов, 1981). Донором электронов для фотосинтеза является вода, но известно, что некоторые виды цианобактерий способны переходить к аноксигенному типу фотосинтеза и расти в анаэробных условиях используя  $H_2S$ , который является селективным ингибитором ФС II, в качестве донора электронов. В микроаэрофильных условиях с низким восстановительным потенциалом цианобактерии осуществляют факультативно бескислородный фотосинтез (Padan, 1979; Гоготов, 1983; Андреюк и др., 1990). Первое сообщение об образовании водорода культурой *Anabaena*, помещенной в закрытые сосуды, сделано в 1896 году, однако сделать точный вывод о том, выделялся  $H_2$  цианобактериями или другими микроорганизмами-спутниками не удалось (Weissman, Venemann, 1977). Во второй половине 20 века было доказано, что выделять водород способны ряд цианобактерий относящиеся к родам: *Anabaena*, *Nostoc*, *Plectonema*, *Chlorogloea*, *Mastigocladus* и др. (Weare, Venemann, 1974; Ефимцев и др., 1975; Косяк, 1977; Bothe et al., 1978; Кондратьева, 1979)

Среди *микроводорослей* способность к генерации водорода выявлена у видов, относящихся к родам *Chlomydomonas*, *Dunalliella*, *Chlorella*, *Scenedesmus* и другие (Кондратьева, Гоготов, 1981). Нитраты, аммоний,  $N_2$  не оказывают влияния на выделение водорода водорослями как при освещении, так и в темноте, главным фактором, негативно влияющим на длительность выделения водорода водорослями, является  $O_2$ , поэтому чаще всего водород образуется при низкой интенсивности света, когда выделение  $O_2$  идет слабо или отсутствует (Ощепков, Красновский, 1972, 1974; Кондратьева, Гоготов, 1981).

Биологическое производство водорода можно подразделить на три основных метода: биофотолиз (прямой и непрямой), фотоферментация и темновая

ферментация. В основе светозависимого выделения водорода микроорганизмами лежит процесс фотосинтеза (Цыганков, 2006).

Прямой биофотолиз – это процесс выделения водорода из воды, под действием света, фотоавтотрофными микроорганизмами (Levin et al., 2004). При прямом биофотолизе восстановитель, образованный в ходе фотосинтеза (ферредоксин/НАД(Ф)Н) может переносить под действием света электроны на гидрогеназу, и приводить к синтезу молекулярного водорода (1) (Hallenbeck, 2012; Touloupakis, Torzillo, 2019).



В ходе непрямого биофотолиза донорами электронов для генерации водорода служат органические запасы (крахмал, гликоген), синтезированные за счет электронов, образованных при разложении воды (Ananyev et al., 2008; Taikhao et al., 2014; Singh, Das, 2020).

Фотоферментация происходит за счет окисления углеродного субстрата и передачи электронов к нитрогеназе путем восстановления/окисления никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и ферредоксина (Фд), а аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) обеспечивается за счет фотосистемы I (ФСІ) с участием АТФ-синтазы (Akhladgi, Najofpour-Darzi, 2020).

Темновое выделение водорода связано с разложением пирувата, формиата, ацетальдегида, пиридиннуклеотидов и конверсии оксида углерода водой. При брожении углеводов помимо водорода выделяются и другие соединения такие как этанол, бутанол, ацетат и другие (Цыганков, 2006).

### 1.3 Цианобактерии

Цианобактерии (лат. *Cyanobacteria*) – наиболее древняя ветвь эволюционного древа *Bacteria* (Пиневич, Аверина, 2002). Появление первых цианобактерий на Земле и возникновение механизма фотолиза воды произошли в один период времени. Выделение кислорода в результате жизнедеятельности цианобактерий обусловило переход от анаэробной жизни к аэробной (Гусев, Никитина, 1979).

Эволюционная устойчивость этой группы микроорганизмов обусловлена удачным сочетанием эффективных метаболических путей: цианобактерии могут одновременно осуществлять кислородный фотосинтез и дыхание в пределах одного и того же клеточного компартмента. Кроме того, многие виды цианобактерий способны фиксировать азот, что позволяет им выживать в самых разных условиях окружающей среды (Vermaas, 2001).

### **1.3.1 Морфология, классификация, распространение в природе, образ жизни**

Цианобактерии – это большая группа грамотрицательных прокариот, которые осуществляют кислородный фотосинтез, по строению являются типичными прокариотами; не имеют оформленного ядра (Полянский, 1936), органеллы отсутствуют, нити ДНК локализованы у центра клетки (Кокшарова, 2008; Allaf, Peerhossaini, 2022). Размеры клеток варьируют от 0.5 мкм до 100 мкм (Лось, 2010).

Протоплазма цианобактерий обладает высокой степенью вязкости и находится в состоянии геля (Drawert, 1949). Внешним покровом цианобактерий является слизистый чехол, защищающий клетки от высыхания и способствующий их скользящему движению (Drews, Nultsch, 1962; Drews and Giesbrecht, 1966). Клеточная стенка цианобактерий состоит из 4 слоев – L1-L4. Слой L2 толще, чем у других бактерий. У цианобактерий, как и у всех прокариот в клеточной стенке присутствует  $\alpha$ - $\epsilon$ -диаминопимелиновая кислота. Клетки окружены трехслойной полупроницаемой цитоплазматической мембраной, с толщиной около 7 нм (Frank et al., 1962; Drews, 1973; Echlin, 1963; Pankratz, Bowen, 1963; Гусев, Никитина, 1979). Все клетки содержат плоские мембранные мешочки – тилакоиды – на наружной поверхности которых локализованы: хлорофиллы, каротиноиды, а также фикобилисомы, содержащие фикоэритрин и фикоцианин (Гусев, Никитина, 1979; Андреюк и др., 1990). Функционально тилакоиды являются энергетическими органеллами, способными альтернативно осуществлять фотосинтез и дыхание. Цитохром *b<sub>6</sub>f*-комплекс является универсальным компонентом последовательно участвующим в фотосинтетическом и дыхательном



переносе протонов в люмен (внутритилакоидное пространство) (Громов, 1976; Баулина, 2010). Название цианобактериям дано по окраске, обусловленной фикобилипротеинами, пигментированными белками фотосинтетического аппарата (Tamagnini et al., 2007; Стадничук и др., 2015). Особенностью фотосинтетического аппарата цианобактерий является экстратилакоидальное расположение основных поглощающих свет пигментов – фикобилипротеинов. Эти пигменты располагаются в фикобилисомах, прикрепленных правильными рядами к внешним поверхностям тилакоидов (фикобилисомы не прикрепляются к внутренней поверхности клеточной мембраны) (Stanier, Cohen-Bazire, 1977; Андреюк и др., 1990; Стадничук и др., 2015). Установлено, что фикобилисомы передают на Хл поглощенную ими световую энергию с очень высокой эффективностью, около 100% (Гусев и др., 1971). В РЦ содержится только Хл *a* (Лось, 2010). Тилакоидные мембраны содержат как дыхательные, так и фотосинтетические цепи переноса электронов. Эти цепи переноса электронов пересекаются и частично состоят из одних и тех же мембранных компонентов. У большинства цианобактерий фотосинтетические электроны переносятся исключительно внутри тилакоидов, тогда как дыхательные электроны проходят как через тилакоидную, так и через цитоплазматическую мембраны (Vermaas, 2001).

Ядерный материал локализован в центре клетки (Гусев, Никитина, 1979). ДНК представлена в виде гранулярных включений или фибрилл 5-7 нм шириной, трехслойных или агрегированных (Leak, 1967). Клетки цианобактерий богаты РНК, содержание которой зависит от фазы роста (Mann, Carr, 1974). Рибосомы представлены электронно-плотными гранулами 10-15 нм в диаметре (Fogg et al., 1973).

В вегетативных клетках цианобактерий присутствуют 4 основных класса включений: гранулы полифосфата, гликогена, цианофицина и карбоксисомы. Другими включениями, присутствующими в вегетативных клетках некоторых цианобактерий являются гранулы поли- $\beta$ -гидроксибутирата и газовые пузырьки (Stanier and Cohen-Bazire, 1977).

Карбоксисомы – это включения полигональной формы диаметром 200-300 нм, ответственные за фиксацию  $\text{CO}_2$  восстановительным пентозофосфатным путем. Карбоксисомы являются местом локализации рибулезодифосфаткарбоксилазы. Они присутствуют в вегетативных клетках цианобактерий, независимо от того, выращиваются ли они фотоавтотрофно, фотогетеротрофно или хемогетеротрофно (Stanier and Cohen-Bazire, 1977).

Газовые вакуоли – палочковидные образования с заостренными концами, расположенные по периферии клеток в виде сотовидно упакованных ячеек, окружены однослойной мембраной, содержат газ и являются проницаемыми для  $\text{N}_2$ ,  $\text{O}_2$ , Ar (Гусев, Никитина, 1979).

По морфологии эта группа микроорганизмов весьма разнообразна, включает одноклеточные, нитчатые и колониальные формы. Некоторые нитчатые штаммы образуют дифференцированные клетки, специализирующиеся на фиксации азота – гетероцисты, и спороподобные покоящиеся клетки – акинеты (Tamagnini et al., 2007). Гетероцисты развиваются в культурах только после снижения концентрации связанного азота в среде (Whitton, Potts, 2012).

Особенности метаболизма цианобактерий, их устойчивость к колебаниям внешних условий (влажность, температура, недостаток и избыток света, засоленность) определяют их широкое распространение (Андреюк и др., 1990)

Многие цианобактерии способны к быстрому переходу от активной жизни к состоянию покоя и наоборот. Они длительное время могут сохранять жизнеспособность в высушенном состоянии и быстро переходить к активной жизни при увеличении влажности субстрата или воздуха (Андреюк и др., 1990).

Большинство цианобактерий являются фотоавтотрофами. Для фототрофного роста культур требуются: минеральная питательная среда, определенная температура, источник  $\text{CO}_2$ , энергия света в области фотосинтетически активной радиации (Цоглин, Пронина, 2012). В отношении способности к другим образам жизни их делят на три группы: в первую группу (облигатные фототрофы) входят организмы, для которых основным источником углерода является  $\text{CO}_2$ , ко второй группе (фотогетеротрофы) относятся организмы, которые могут использовать

органические вещества как основной источник углерода, а солнце – основной источник энергии; к третьей группе организмов (облигатные хемогетеротрофы) относятся организмы, способные расти в темноте и использовать для роста органические соединения (Гусев, Никитина, 1979). Некоторые цианобактерии могут переходить на фотогетеротрофный тип питания, когда концентрация углекислоты в среде низкая. В таких условиях потребляются органические соединения: ацетат, глицерин, глюкоза, сахароза (Ingram et al., 1973).

### **1.3.2 Физиолого-биохимическая характеристика**

Среднее процентное содержание важнейших компонентов клетки составляет от сухого веса клеток: ДНК – 0.4-1.7; РНК – 2-4; белки – 20-45; липиды – 15-25; сахара – 30-55; пигменты – 1.5 (Holm-Hansen, 1968; Craig et al., 1969). Белки цианобактерий содержат в большом количестве основные аминокислоты аланин, лейцин, в меньшем – метионин (Пахомова, 1969; Nedensskog, Hofsten, 1970). При определенных условиях до 40% общего белка могут составлять фикобилипротеиды, обратимое исчезновение которых может быть обусловлено дефицитом азота, что свидетельствует о том, что они, возможно, могут служить источником эндогенного азота в условиях истощения (Myers, Kratz, 1955; Allen, Smith, 1969; Vasconcelos, Fay, 1974). Другой резерв белка в клетках – цианофициновые гранулы (ЦГ), состоящие на 98% из белка (Simon, 1971). Чаще всего эти гранулы содержатся в клетках старых культур и в спорах (Wildon, Mercer, 1963; Lang, Fisher, 1969). ЦГ отсутствуют в темноте, накапливаются в стационарной фазе и исчезают в фазе активного размножения, а также разрушаются при азотном голодании (что приводит к накоплению гликогена и липидов), и появляются в присутствии азота – это свидетельствует о том, что ЦГ являются резервом азота (Simon, 1973; Vasconcelos, Fay, 1974). До половины белков клеточных мембран составляют белки электронного транспорта: ферредоксин, пластоцианин, цитохромы (Гусев, Никитина, 1979).

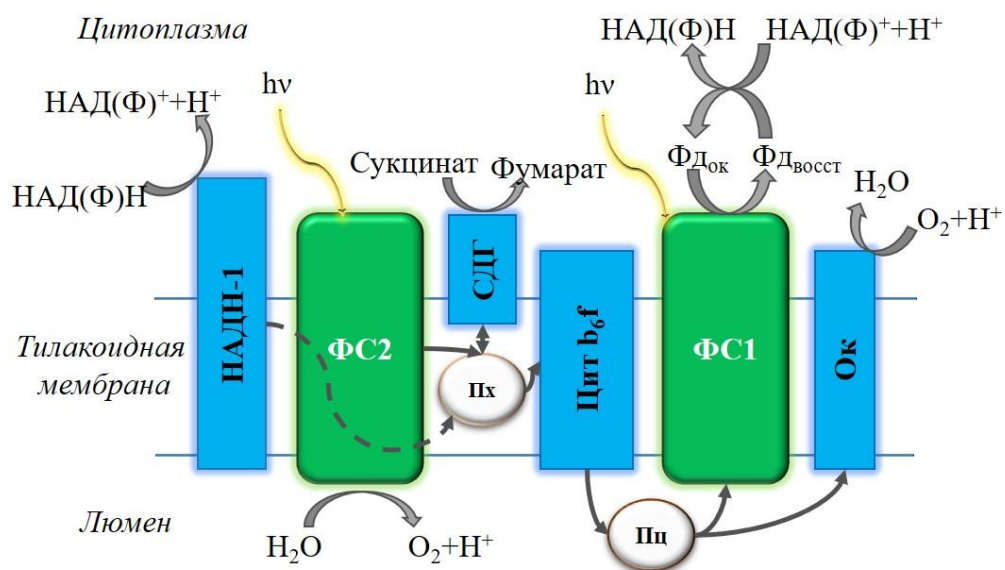
По составу жирных кислот (ЖК) цианобактерии дивергентны, что указывает на их эволюционную древность. Полиненасыщенные ЖК не найдены у некоторых

одноклеточных представителей данной группы микроорганизмов. У большинства обнаружены C18-кислоты с 2 ненасыщенными связями. Некоторые виды имеют C16-кислоты с 2 ненасыщенными связями (Kenyon et al., 1972). Также у одноклеточных и нитчатых штаммов обнаружены оба изомера линоленовой C18-кислоты с 3 ненасыщенными связями, которые иногда могут составлять до 50% суммарного состава липидов. Есть также штаммы, в которых обнаружены C18-кислоты с 4 двойными связями (Kenyon et al., 1972). Кроме того, одноклеточные цианобактерии содержат ди-, три-, 2-моно и 5-диэнольные кислоты (Kenyon, Stanier, 1970; Kenyon et al., 1972). Гетероцисты, которым не свойственно наличие ФСII, не содержат липидов, присущих для внутриклеточных мембран вегетативных клеток. В гетероцистах найдены гликолипиды в слое оболочки, прилегающем к клеточной стенке (Nichols, Wood, 1968; Walsby, Nichols, 1969).

Цианобактерии содержат структурные и запасные липиды, последние расположены в цитоплазме в виде мелких осмиефильных гранул –  $\beta$ -гранул (Pankratz, Bowen, 1963).  $\beta$ -гранулы образуются при нарушении нормального соотношения углеродного и азотного обменов, а также при превращении клеток в гетероцисты (Whitton, Peat, 1967; Гусев, Никитина, 1979).

Большинство цианобактерий обладают хорошо организованными светособирающими комплексами (ССК), включающими Хл, каротиноиды и фикобилипротеины для сбора спектра видимого света (Mandal et al., 2020). Основные ССК цианобактерий – фикобилисомы – локализованы периферически по отношению к мембранам тилакоидов. Важное различие между цианобактериями и растениями состоит в том, что соотношение ФСI/ФСII у цианобактерий превышает 1, тогда как у растений это значение равно 1 (Vermaas, 2001; Sonoike et al., 2001; Fraser et al., 2013; Stirbet et al., 2019). ФСII цианобактерий составляет относительно небольшую часть клеточного хлорофилла, что может влиять на интерпретацию сигналов флуоресценции (Campbell et al., 1998). Одной из причин относительно большого количества ФСI у цианобактерий является обилие дыхательных путей переноса электронов в пул пластохинонов (Пх), в то время как отток электронов дыхательной цепи из пула Пх может быть более ограниченным (Рисунок 1)

(Vermaas, 2001). Избыток ФСИ может свести к минимуму фотоповреждения. Более того, высокое количество ФСИ может эффективно конкурировать с цитохромоксидазой за электроны при наличии света, тем самым максимизируя количество электронов, которые могут быть использованы для фиксации CO<sub>2</sub> (Vermaas, 2001). У цианобактерий антенная система для ФСИ полностью отличается от системы для ФСИИ. Антенна для сбора света для ФСИ состоит исключительно из Хл *a*, в то время как антенна для ФСИИ состоит в основном из фикобилисом (Sonoike et al., 2001).



**Рисунок 1.** Связь фотосинтетической и дыхательной цепей у цианобактерий (Модифицировано по Vermaas, 2001)

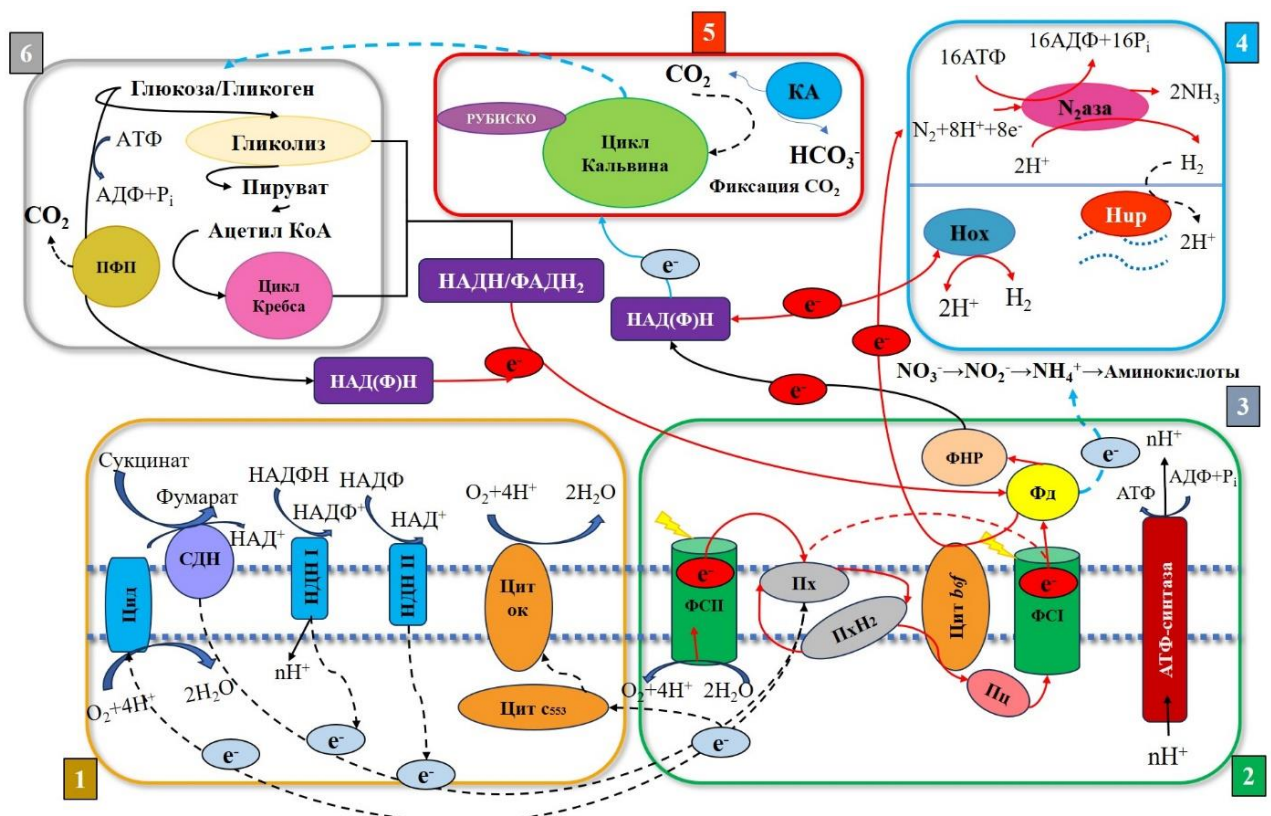
Фотосинтетическая электронтранспортная цепь цианобактерий схожа с таковой у растений (Vermaas, 2001). Считается, что хлоропласты растений произошли от цианобактерий (Vermaas, 2001; Stirbet et al., 2019). У всех эукариотных фотосинтезирующих организмов способных к дыханию имеются митохондрии, а процессы фотосинтеза протекают в хлоропластах. У цианобактерий нет обособленных мембраной органелл для дыхания и фотосинтеза. ФСИИ цианобактерий представлена комплексом белков, липидов и пигментов, и

локализована в тилакоидной мембране. В отличие от водорослей и растений, тилакоидные мембраны цианобактерий содержат белковые комплексы как для фотосинтетического, так и для дыхательного переноса электронов (Рисунок 1) (Stirbet et al., 2019; Lea-Smith et al., 2016). Основу ФСII составляют две большие субъединицы PsbA и PsbD - белки D1 и D2, которые образуют фотосинтетический реакционный центр и взаимодействуют со всеми пигментами электрон-транспортной цепи (Гусев, Никитина, 1979; Габдулхаков, Донцова, 2013).

Цикл Кребса у цианобактерий является неполным из-за отсутствия 2-оксоглутаратдегидрогеназы. В результате основная функция 2-оксоглутарата заключается в том, чтобы служить предшественником в различных реакциях биосинтеза. Этот основной углеродный каркас для включения аммония считается метаболическим соединением между балансом углерода и азота у цианобактерий (Muro-Pastor et al., 2001; Vazquez-Bermudez et al., 2003; Muro-Pastor et al., 2005; Kumar et al., 2010).

### **1.3.3 Водородный метаболизм**

С метаболизмом водорода у цианобактерий взаимосвязаны различные пути транспорта электронов (Рисунок 2) (Khetkorn et al., 2013). Центральным компонентом этих путей является восстановленный ферредоксин, который обеспечивает электронами различные биохимические процессы в клетке, а также ферредоксин: НАДФ<sup>+</sup> оксидоредуктазу, которая продуцирует никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАД(Ф)Н). НАД(Ф)Н может быть использован в качестве восстановителя для производства H<sub>2</sub> с помощью гидрогеназы или нитрогеназы. Электроны, образующиеся в результате кислородного фотосинтеза, могут быть направлены не только на метаболизм H<sub>2</sub>, но и на другие конкурирующие пути поглощения электронов, включая дыхательную цепь переноса электронов и фиксацию углекислого газа (Рисунок 2) (Khetkorn et al., 2013).



**Рисунок 2.** Электрон-транспортные пути, взаимосвязанные с водородным метаболизмом цианобактерий (1 – дыхательная ЭТЦ; 2 – фотосинтетическая ЭТЦ; 3 – ассимиляция азота; 4 – метаболизм водорода; 5 – ассимиляция углекислоты; 6 – гликолиз) ФС I, II: фотосистема I, II; Пх: пул пластохинонов; Пц: пластоцианин; Цит *b<sub>6f</sub>*: цитохром *b<sub>6f</sub>*; Фд: ферредоксин; ФНР: ферредоксин: НАДФ<sup>+</sup> оксидоредуктаза; Цид: хинолоксидаза; СДН: сукцинатдегидрогеназа; НДН-1: НАД(Ф)Н-дегидрогеназа 1-го типа; НДН-2: НАД(Р)Н-дегидрогеназа 2-го типа; Цит<sub>ок</sub>: оксидаза цитохрома с; Цит *c<sub>553</sub>*: цитохром *c<sub>553</sub>*; Нох: двунаправленная гидрогеназа; Нур: гидрогеназа поглощения; N<sub>2</sub>аза: нитрогеназа; КА: карбоангидраза; РУБИСКО: рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза оксигеназа; ФАДН<sub>2</sub>: флавиноадениндинуклеотид; НАД: никотинамидадениндинуклеотид; НАДФ: никотинамидадениндинуклеотидфосфат; ПФП: окислительный пентозофосфатный путь (Модифицировано по Vermaas, 2001; Khetkorn et al., 2013; Kufryk, 2013; Allahverdiyeva et al., 2014)

Цианобактерии выделяют  $H_2$  двумя основными путями: 1) *Нох*-гидрогеназный путь: производство водорода катализируется двунаправленной *Нох*-гидрогеназой с использованием электронов из восстановленного НАД(Ф)Н, который образуется либо при переносе электронов от воды к ФНР под действием света, либо при разложении полисахаридов или липидов, накопленных в клетках цианобактерий (Mathews, Wang, 2009); 2) нитрогеназа-зависимый путь: этот путь связан с азотфиксацией и зависит от фермента нитрогеназы. Зависимое от нитрогеназы производство водорода происходит в анаэробной среде, созданной в клетках азотфиксирующих цианобактерий. Электроны для фиксации азота могут поступать в результате окисления воды под действием света и фотосинтетического переноса электронов, а также в результате ферментативного расщепления накопленных полисахаридов (Kufryk, 2013).

Ферментами, участвующими у цианобактерий в метаболизме водорода, являются нитрогеназы и гидрогеназы. Нитрогеназа является катализатором генерации  $H_2$  в качестве побочного продукта реакции фиксации азота. Гидрогеназа поглощающего (*Hup*) типа катализирует реакцию поглощения водорода, выделяющегося в клетках с активной нитрогеназой. Обратимая (*Нох*) гидрогеназа катализирует и образование, и поглощение водорода (Tamagnini et al., 2002; Vignais, Billoud, 2007; Masirbaeva et al., 2014).

*Гидрогеназы* (КФ 1.12) – это класс ферментов, катализирующих простейшую обратимую реакцию окисления-восстановления водорода, направление которой зависит от окислительно-восстановительного потенциала компонентов, способных взаимодействовать с ферментом. Термин «гидрогеназа» был предложен Стеферсоном и Стиклендом в 1931 году для фермента, обуславливающего способность клеток *Escherichia coli* поглощать  $H_2$  (Tamagnini, 2002; Tsygankov, 2007; Vignais, Billoud, 2007).

Гидрогеназы являются металлопротеинами, большинство из которых содержат железосерные кластеры и атомы металлов в активном центре (Vignais, Colbeau, 2004). Они интегрированы в клеточную сеть таким образом, что могут



утилизировать избыток восстановителей для получения водорода (Khanna, Lindblad, 2015).

По строению активного центра принято выделять три основных класса гидрогеназ: NiFe-гидрогеназы, FeFe-гидрогеназы (синтезируются у микроводорослей), Fe-гидрогеназы. Которые подразделяются на две филогенетически невзаимосвязанные группы гидрогеназ. Первая группа, включающая NiFe- и FeFe-гидрогеназы, использует двухъядерный активный сайт для активации  $H_2$  и, как правило, цепочку кластеров FeS для доставки электронов. Другая группа – Fe-гидрогеназы, активность которых зависит от уникального кофактора – железо-гуанилилпиридона (Shima, Trauer, 2007; Salamone-Stagni et al., 2009; Бозиева и др., 2022).

NiFe-гидрогеназы по структуре представляют собой гетеродимерные комплексы, состоящие из малой и большой субъединиц (Рисунок 3). Этот класс ферментов наиболее хорошо изучен, они менее активны, но более устойчивы к содержанию кислорода в среде (Nicolet et al., 2002; Абдуллатыпов, Цыганков, 2013). NiFe-гидрогеназы обратимо ингибируются молекулярным кислородом (Khanna et al., 2015). Данный класс гидрогеназ синтезируется у цианобактерий.

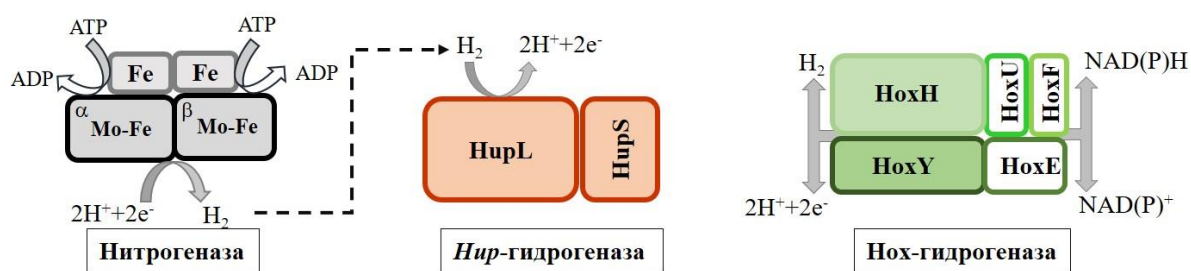
FeFe-гидрогеназы могут иметь в своем составе от 1 до 4 субъединиц. Односубъединичные FeFe-гидрогеназы являются наиболее активными в реакции выделения  $H_2$  и наиболее чувствительными к содержанию кислорода (Nicolet et al., 2002; Абдуллатыпов, Цыганков, 2013). Ферменты этого класса характерны для микроводорослей (Jimenez-Llanos et al., 2020).

Fe-гидрогеназы (Hmd) не содержат металлов внутри белковой глобулы, но включают Fe-содержащий кофактор; этот класс гидрогеназ участвует в метаногенезе (Thauer, 1998; Абдуллатыпов, Цыганков, 2013).

NiFe-гидрогеназы синтезируются конститутивно, в то время как для экспрессии генов FeFe-гидрогеназ требуется преадаптация в темновых анаэробных условиях (Цыганков, 2006; Ghirardi et al., 2015).

Цианобактерии могут обладать двумя типами NiFe-гидрогеназ: «двунаправленная»/«обратимая» и «поглощающая»/«водородпоглощающая».

Двухнаправленная гидрогеназа кодируется генами *HoxEFUEH*, это сложный гетеропентамерный комплекс, состоящий из малой (*HoxY*) и большой (*HoxH*) субъединиц гидрогеназы и субъединиц (*HoxE*, *HoxU*, *HoxF*), представляющих собой диафоразную часть (Schmitz et al., 2002; Tsygankov, 2007; Mishra et al., 2019). Мембраносвязанная водородпоглощающая гидрогеназа (*HupSL*) имеется у азотфиксирующих цианобактерий и синтезируется в условиях дефицита азота. Состоит из малой (*HupS*) и большой (*HupL*) субъединиц (Рисунок 3) (Shutz et al., 2004; Tsygankov, 2007; Tamagnini et al., 2007). Поглощающая *HupSL*-гидрогеназа тесно связана с нитрогеназной активностью (Tamagnini et al., 2002). Она может катализировать поглощение как экзогенного  $H_2$ , так и выделяемого за счет действия нитрогеназы, снижая таким образом конечный выход  $H_2$  (Tsygankov et al., 1998).



**Рисунок 3.** Структура ферментов, вовлеченных в водородный метаболизм (Модифицировано по Tamagnini et al., 2007, Бозиева и др., 2022)

*Нитрогеназы* (КФ 1.18.6.1) – это ферменты, определяющие способность микроорганизмов ассимилировать  $N_2$  (Кондратьева, Гоготов, 1981).  $N_2$ аза состоит из двух компонентов – молибден-железо-содержащего белка (компонент I, молибдоферридоксин) и железо-содержащего белка (компонент II, азоферридоксин). По выполняемым функциям MoFe-белок может быть назван, собственно, нитрогеназой, а Fe-белок – редуктазой нитрогеназы (Nageman, Burreis, 1978; Ludden, Burreis, 1979). Fe-белок ответственен за перенос электронов АТФ-зависимым путем к самой нитрогеназе (Tsygankov, 2007) (Рисунок 3). Во всех реакциях, катализируемых  $N_2$ азой, участвуют оба компонента. Для

функционирования  $N_2$ азы необходимо наличие источника энергии (АТФ), ионов магния и восстановителя с низким редокс-потенциалом (Benemann, Valentine, 1972; Brill, 1979; Dalton, 1979; Nordlund, Elkund, 1979). Донировать электроны для  $N_2$ азы могут ферредоксины, флаводоксины, дитионит, восстановленные бензил- и метилвиологены (Mortenson et al., 1962; Eady et al., 1972). В качестве исходных доноров электронов могут выступать органические и неорганические соединения, характер которых зависит от возможностей микроорганизмов окислять соединения в процессах брожения, дыхания или фотосинтеза (Захватаева и др., 1970; Benemann, Valentine, 1972; Кондратьева, Молофеева, 1972; Гоготов, Глинский, 1973; Gogotov, 1973, 1978; Yoch, 1978). Нитрогеназа может быть локализована либо в растворимой фракции клеток, либо быть связанной с мембранами.

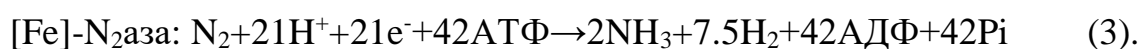
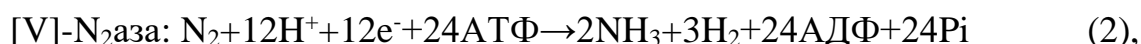
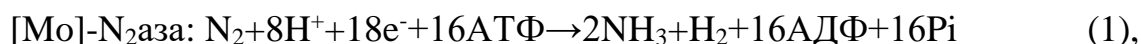
Нитрогеназы катализируют однонаправленный процесс производства  $H_2$  как побочного продукта фиксации азота в аммиак в условиях дефицита связанных форм азота в среде (Dutta et al., 2005; Sakurai et al., 2013). В оптимальных условиях фиксация 1 молекулы  $N_2$  сопровождается выделением 1 молекулы  $H_2$ , в условиях дефицита азота скорость выделения водорода увеличивается (Tsygankov, 2007).

В нормальных условиях у гетероцистных цианобактерий нитрогеназы локализуется в гетероцистах, однако в анаэробных условиях ряд цианобактерий способны синтезировать нитрогеназы также и в вегетативных клетках (Tsygankov, 2007).

Азотфиксирующие цианобактерии синтезируют несколько разных типов нитрогеназ, отличающихся по металлу входящему в активный центр (Tsygankov, 2007). Наиболее широко распространённый и хорошо изученный класс  $N_2$ аз – это Mo- $N_2$ азы. Они синтезируются при комбинировании условий азотного голодания с присутствием молибдена. Другие типы нитрогеназ – V- $N_2$ азы и Fe- $N_2$ азы – называют альтернативными. V- $N_2$ азы синтезируются в отсутствии Mo, а Fe- $N_2$ азы в отсутствии Mo и V. Альтернативные нитрогеназы менее эффективны в фиксации азота и наиболее активны в процессе производства  $H_2$ . Некоторые азотфиксирующие цианобактерии синтезируют как Mo- $N_2$ азы, так и V- $N_2$ азы

относительно штаммов, содержащих только Fe-N<sub>2</sub>азы на данный момент сведений нет (Sakurai et al., 2013).

Нитрогеназы кодируются *nifHDK*-генами. Процессы, катализируемые нитрогеназами, описываются следующими реакциями (1-3) (Tsygankov, 2007; Hoffman et al., 2009; Golding and Dong, 2010; Khetkorn et al., 2013; Бозиева и др., 2022):



Для азотфиксирующих цианобактерий характерно наличие механизмов защиты нитрогеназы от инактивации кислородом. У гетероцистных азотфиксирующих цианобактерий фотосинтез с выделением кислорода идет в вегетативных клетках, а фиксация азота и выделение водорода – в гетероцистах. Это пример пространственного разобщения данных процессов. У азотфиксирующих цианобактерий, не образующих гетероцисты фотосинтез осуществляется при наличии освещения, а азотфиксация – в темноте, таким образом процессы разделены во времени (Tsygankov, 2007).

Нитрогеназа является индуцибельным ферментом, синтез которой может быть репрессирован наличием ионов аммония (Кондратьева, 1979). Образование N<sub>2</sub>азы происходит при инкубации культур в анаэробных условиях (Гусев, Никитина, 1979). Кислород ингибирует синтез нитрогеназы. Молекулярный азот оказывает ингибирующее действие на выделение водорода при участии нитрогеназы (Кондратьева, 1979).

В темноте активность нитрогеназы снижается из-за недостаточного поступления энергии и восстановительных эквивалентов, связанного с быстрым истощением запасов углеводов. Для продления жизнеспособности и продуктивности клеток в анаэробной среде важно присутствие углекислого газа. Фотосинтетическая ассимиляция углекислого газа увеличивает запас углеводов

(например, гликогена, осмолитов и растворимых сахаров) в вегетативной клетке перед транспортировкой в гетероцисту, чтобы служить восстановителями для производства водорода, что приводит к непрямому биофотолузу воды (Цыганков, 2006; Kirtay, 2011; Ananyev et al., 2012). Концентрация углекислого газа оказывает значительное влияние на активность нитрогеназы (Tsyganhov et al., 1998). Влияние концентрации диоксида углерода в свободном пространстве на скорость производства водорода можно четко разделить на три фазы: фаза 1 – скорость производства водорода начинает экспоненциально увеличиваться при концентрациях  $\text{CO}_2$  до 5%; фаза 2 – происходит постепенное снижение скорости производства водорода с 5 до 10%  $\text{CO}_2$ ; фаза 3 – скорость производства водорода резко падает с 10 до 30%  $\text{CO}_2$ . Это объясняется тем, что восстановитель ферредоксин, поставляемый нитрогеназе для синтеза водорода, является производным от богатого энергией углевода ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), импортируемого из вегетативных клеток в гетероцисту (Smith et al., 1992; Winkenbach, Wolk., 1973; Salleh et al., 2014). На первом этапе добавление  $\text{CO}_2$  в газовую фазу позволяет вегетативным клеткам осуществлять процесс фотосинтеза и генерировать больше фиксированного углерода, который импортируется в гетероцисты для синтеза водорода (Yeager et al., 2011). Фиксированный углерод хранится в клетках в виде гликогена, затем накопленная энергия высвобождается в результате темновой ферментации. Эндогенные углеводы обеспечивают гетероцистам избыточную восстановительную способность для восстановления протонов  $\text{H}^+$  до  $\text{H}_2$  (Yu, Takahashi, 2007). На втором этапе скорость производства водорода начинает немного снижаться, что свидетельствует о конкуренции за электроны между процессами фиксации углекислого газа и производства водорода. Более того, фиксация углекислого газа с помощью цикла Кальвина требует запаса энергии (3 молекулы АТФ на 1 молекулу фиксированного углекислого газа). При высоких концентрациях углекислого газа в окружающей среде, скорость его фиксации увеличивается, следовательно, истощаются запасы энергии и восстановительные эквиваленты, доступные для восстановления протонов и выделения водорода (Schnackenberg et al., 1996). Дальнейшее увеличение концентрации диоксида

углерода оказывает пагубное воздействие на производство водорода во время 3 этапа. В основном это связано с тем, что высокое содержание диоксида углерода повышает скорость фиксации и приводит к высокой скорости выделения кислорода, концентрация кислорода в свободном пространстве быстро повышается до такого уровня, что может подавлять активность нитрогеназы. Следовательно, добавление диоксида углерода, в концентрации до 8%, оказывает благоприятное воздействие, поскольку оно обеспечивает большее количество восстановителей в результате диссимиляции фиксированного углерода. Полное удаление диоксида углерода приводит к ухудшению переноса электронов в фотосистеме II и снижает интенсивность насыщения светом для устойчивого одновременного фотопроизводства водорода и кислорода (Greenbaum, Lee, 1998). Избыточная подача диоксида углерода (более 8%) способствует фиксации диоксида углерода, а не выделению водорода, что сопровождается ингибированием активности нитрогеназы высокой концентрацией кислорода. Скорость выделения водорода снижается по мере того, как концентрация кислорода в свободном пространстве достигает 7% и выше. Помимо дезактивации ферментов кислородом наблюдается повышенное поглощение водорода, опосредованное гидрогеназой в ходе оксигородной реакции (Tsygankov et al., 1998; Volbeda et al., 2002; Tosatto et al., 2006).

#### **1.3.4 Азотный метаболизм**

Цианобактерии могут использовать в качестве источников азота: молекулярный азот, нитраты, нитриты, аммонийный азот, гидроксилламин и др. Фиксация молекулярного азота цианобактериями осуществляется преимущественно при освещении и в меньшей степени в темноте (Гусев, Никитина, 1979). Впервые способность цианобактерий фиксировать азот была установлена В. Frank. Однако доказать, что чистые культуры цианобактерий могут усваивать молекулярный азот, удалось позднее К. Drewes (Drewes, 1928; Андреюк, 1990). Энергия для процесса азотфиксации может поставляться как в процессе дыхания, так и в процессе фотосинтеза (Андреюк, 1990).

Несмотря на то, что использование аммонийного азота может быть энергетически более выгодным процессом, многие виды цианобактерий на средах с аммонийным азотом растут медленно, обесцвечиваются и погибают. Причиной этому может быть токсичность, накапливающегося в клетках, аммонийного азота, а также подкисление среды при его потреблении. Использование нитратного азота, наоборот, приводит к быстрым темпам роста и прироста биомассы у большинства цианобактерий (Гусев, Никитина, 1979).

Так как большая часть цианобактерий фиксирующих азот образуют гетероцисты, более подробно процесс азотфиксации изучен именно у них. Процесс  $N_2$ -фиксации катализируется нитрогеназой, донорами которой служат ферредоксин и фитофлавин, восстановленные от воды или пирувата; поставщиком энергии (АТФ) для нитрогеназы является свет. Декарбоксилирование пирувата с образованием восстановителя (Фд) и ацетилфосфата проходит в несколько стадий (Haustead, Stewart, 1972; Donze et al., 1974; Гусев, Никитина, 1979):

- 1) Пируват+Тиаминпирофосфат-фермент (ТПФ-фермент) $\leftrightarrow$ Лактил-ТПФ-фермент
- 2) Лактил-ТПФ-фермент $\leftrightarrow$ Оксиэтил-ТПФ-фермент + $CO_2$
- 3) Оксиэтил-ТПФ-фермент  $\leftrightarrow$ Ацетил-SКоА+ТПФ-фермент +Ф<sub>двосст</sub>
- 4) Ацетил-SКоА+Рi $\leftrightarrow$  Ацетил-Рi+НСКоА



В одних и тех же клетках цианобактерий могут функционировать несколько путей образования восстановителя (на выбор пути влияют состояние клеток и углеводного пула): углеводный обмен в темноте; углеводный обмен через фотосистему I на свету; образование из воды через ФС I и ФС II (Donze et al., 1974). В эволюционном отношении темновой путь считается более древним (Stewart, 1973).

### **1.3.5 Взаимосвязь нитрогеназы с водородпоглощающей гидрогеназой. Оксигородная реакция**

Выделяемый азотфиксирующими микроорганизмами  $H_2$ , при участии  $N_2$ азы, вторично используется этими же организмами за счет активности поглощающей

гидрогеназы, этот процесс называется рециклизацией водорода.  $H_2$ -поглощающая гидрогеназа окисляет водород, выделяемый за счет действия нитрогеназы в оксигородной реакции (реакции Knallgas). В ходе оксигородной реакции электроны поступают на  $O_2$  по дыхательной электрон-транспортной цепи. Выделение водорода у азотфиксирующих микроорганизмов можно детектировать при ингибировании гидрогеназ, которое достижимо при добавлении к культурам  $CO_2$  или  $CO_2$  с ацетиленом (Schubert, Evans, 1976; Walker, Yates, 1978; Weaver et al., 1979, 1984; Houchins, 1984; Кондратьева, Гоготов, 1981).

В зависимости от особенностей культур и внешних условий рециклизация  $H_2$  может иметь различное значение, но в основном этот процесс носит положительный характер (Кондратьева, Гоготов, 1981). Окисление  $H_2$  приводит к получению дополнительной энергии, а также предотвращает ингибирование  $N_2$ азы кислородом. Некоторыми микроорганизмами рециклизуемый  $H_2$  используется как донор электронов для  $N_2$ азы.

### **1.3.6 Переносчики электронов, взаимодействующие с ферментами, вовлеченными в водородный метаболизм**

Ферредоксины (Фд) – это переносчики электронов, взаимодействующие с гидрогеназами и нитрогеназами. Фд представляют собой группу негеминовых FeS-белков с низким окислительно-восстановительным потенциалом (Brill, 1979). В окисленной форме они имеют красную окраску и спектры поглощения с максимумами 278, 390, 420, 465 нм (Hall, Rao, 1977). Окислительно-восстановительный потенциал Фд варьирует от -310 до -490 мВ (Rao, Hall, 1977). Свойства Фд могут изменяться в зависимости от структуры хромофорной группы, которая способна меняться при нагревании и хранении Фд в присутствии кислорода. Хранение Фд предпочтительнее проводить в анаэробных условиях, во избежание потери ими биологической активности (Hall, Rao, 1977). При участии Фд происходят: фиксация азота, выделение и потребление водорода (Rao, Hall, 1977). Восстановленный Фд донирует электроны для нитрогеназы в гетероцистах. При освещении Фд восстанавливается за счет ФСІ (источник электронов



НАД(Ф)Н), в темноте Фд восстанавливается за счет НАД(Ф)Н (Родионов, Лебедева 1987; Кондратьева, Гоготов, 1981).

Флаводоксины (Флд) – еще одна группа природных переносчиков электронов, способных участвовать в качестве доноров электронов для  $H_2$ азы и  $N_2$ азы. Для Флд характерны три редокс состояния: окисленное, полувосстановленное, полностью восстановленное. В окисленной форме Флд имеют желтую окраску (Mayhew, Massey, 1973).

Известны 6 путей генерации низкопотенциальных электронов в форме Фд или Флд для передачи нитрогеназе: оксидоредуктазы Фд на уровне субстрата; гидрогеназы; фотосистема I или другие реакционные центры; комплексы фиксации, управляемые светом; комплексы RNF, управляемые протон-движущей силой, и оксидоредуктазы Фд:НАД(Ф)Н (Alleman, Peters, 2023). У цианобактерий основным путем является восстановление Фд на ФСІ. Также они могут использовать обратную реакцию на ФНР, этот механизм распространен у гетероцистных цианобактерий (Hurley et al., 1997; Alleman, Peters, 2023).

Синтез Фд и Флд зависит от содержания железа. Для Флд требуется низкое содержание железа в среде, а для Фд наоборот (Brodrick, Radinowitz, 1977). Фд и Флд взаимозаменяемы.

#### **1.4 Биологическое разнообразие цианобактерий, генерирующих водород**

Потенциал генерирования водорода у цианобактерий зависит от способности конкретного штамма синтезировать ферменты, необходимые для производства водорода, а также от условий культивирования. История исследований фототрофных микроорганизмов, способных генерировать водород, берет свое начало с работ Гаффрона с соавторами в 40-х годах прошлого века и активно ведется по сегодняшний день (Gaffron, 1939; Gaffron, Rubin, 1942). За этот интервал времени проведено большое количество исследований в данной области: изучено влияние интенсивности освещения, состава питательных сред, состава газовой фазы, плотности культуры, температуры и рН культивирования на скорость генерации водорода микроорганизмами, кроме того, исследовано влияние

ингибиторов фотосинтетической активности, внешних источников электронов на скорость процесса. Несмотря на большое количество работ в данной области, биоразнообразие цианобактерий, способных генерировать  $H_2$ , изучено недостаточно.

Метаболизм  $H_2$  лучше всего изучен у представителей следующих родов цианобактерий: *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Cyanothece*, *Oscillatoria*, *Anabaena* и *Nostoc*. Скорость выделения водорода по имеющимся в литературе данным варьирует в диапазоне от 0.001 до 465 мкмоль  $H_2$  (мг Хл  $a^*ч$ )<sup>-1</sup> (Kumazawa, Mitsu, 1981; Philips, Mitsui, 1983; Suda et al., 1992; Mitsui, Suda, 1995; Fedorov et al., 2001; Lindberg et al., 2004; Antal, Lindblad, 2005; Gutthann et al., 2007; Yoshino et al., 2007; Burrows et al., 2008; Min, Sherman, 2010; Yeager et al., 2011; Skizim et al., 2012). У гетероцистных цианобактерий скорость выделения  $H_2$  выше, чем у видов, состоящих только из вегетативных клеток (Kamshybayeva et al., 2023).

Результаты анализа литературных данных по скорости выделения  $H_2$  различными штаммами цианобактерий представлены в Таблице 1.

**Таблица 1.** Максимальная скорость производства водорода разных штаммов цианобактерий

Название культуры	Характеристика штамма	Условия инкубирования	Макс. скорость выделения H <sub>2</sub>	Источник
<i>Nostoc muscorum</i> 7119	нитчатый азотфиксирующий	26°C; 150 Вт; атразин	145 мкмоль H <sub>2</sub> (мг Хл а*ч) <sup>-1</sup>	Spiller et al., 1978
<i>Synechococcus</i> sp. Miami BG 043511	одноклеточный не фиксирующий азот	аргон; 25 Вт/м <sup>-2</sup>	140 мкмоль H <sub>2</sub> (мг Хл а*ч) <sup>-1</sup>	Suda et al., 1992
<i>Oscillatoria</i> sp. Miami BG7	нитчатый негетероцистный	аргон; 30 Вт	260 мкмоль H <sub>2</sub> (мг Хл а*ч) <sup>-1</sup>	Kumazawa et al., 1994
<i>Synechococcus</i> sp. Miami BG 043511	одноклеточный не фиксирующий азот	аргон (100%); среда без Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (рН 7.6); 150 мкмоль фотонов/м <sup>2</sup> с; 30°C	220 мкмоль H <sub>2</sub> (мг Хл а*ч) <sup>-1</sup>	Mitsui, Suda, 1995
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413 (мутант)	нитчатый гетероцистный азотфиксирующий	90 мкмоль фотонов/м <sup>2</sup> с; 93% Ar, 5% N <sub>2</sub> , 2% CO <sub>2</sub>	45.16 мкмоль H <sub>2</sub> (мг Хл а*ч) <sup>-1</sup>	Sveshnikov et al., 1997
<i>Anabaena variabilis</i> PK84 (мутант)	нитчатый гетероцистный	90 мкмоль фотонов/м <sup>2</sup> с; 93% Ar, 5% N <sub>2</sub> , 2% CO <sub>2</sub>	167.6 мкмоль H <sub>2</sub> (мг Хл а*ч) <sup>-1</sup>	Sveshnikov et al., 1997

	азотфиксирующий			
<i>Anabaena variabilis</i> PK84	нитчатый гетероцистный азотфиксирующий	аргон	32.3 нмоль H <sub>2</sub> (мг Хл a*ч) <sup>-1</sup>	Tsygankov et al., 1998
<i>Anabaena variabilis</i> IAMM-58	гетероцистный	воздух; 60 мкмоль фотонов/м <sup>2</sup> с	4.2 мкмоль H <sub>2</sub> (мг Хл a*ч) <sup>-1</sup>	Masukawa et al., 2001
<i>Gloeocapsa alpicola</i> CALU 743	одноклеточный не фиксирующий азот	серное голодание; 4% CO <sub>2</sub> ; 25 мкмоль фотонов/м <sup>2</sup> с	0.58 мкмоль H <sub>2</sub> (мг Хл a*ч) <sup>-1</sup>	Antal, Lindblad, 2005
<i>Nostoc</i> sp. PCC 7422 (мутант <i>hupL</i> )	нитчатый азотфиксирующий	Ar+5% CO <sub>2</sub> , 70 мкмоль фотонов/м <sup>2</sup> с; азотфиксация	100 мкмоль H <sub>2</sub> (мг Хл a*ч) <sup>-1</sup>	Yoshino et al., 2007
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	одноклеточный не фиксирующий азот	BG11; pH 7.8; 30°C; аргон; 90 мкмоль фотонов/м <sup>2</sup> с	18.4 мкл H <sub>2</sub> (мг Хл a*ч) <sup>-1</sup>	Burrows et al., 2008
<i>Calothrix</i> 336/3	нитчатый азотфиксирующий	Z8x; 150 мкмоль фотонов/м <sup>2</sup> с; 23°C; аргон; перемешивание	48 мкмоль H <sub>2</sub> (мг Хл a*ч) <sup>-1</sup>	Allahverdiyeva et al., 2010
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	одноклеточный азотфиксирующий	ASP2 (-NaNO <sub>3</sub> ); 12 ч свет 100 мкмоль фотонов/м <sup>2</sup> с /12 ч темнота; 30°C; аргон; 50мМ глицерола	465 мкмоль H <sub>2</sub> (мг Хл a*ч) <sup>-1</sup>	Bandyopadhyay et al., 2010

<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	одноклеточный азотфиксирующий	ASP2; темнота; 30°C; аргон; 50мМ глицерола	300 мкмоль Н <sub>2</sub> (мг Хл а*ч) <sup>-1</sup>	Min, Sherman, 2010
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	нитчатый гетероцистный азотфиксирующий	152 мкмоль фотонов/м <sup>2</sup> с; аргон+СО <sub>2</sub>	11.4 мкмоль Н <sub>2</sub> (мг Хл а*ч) <sup>-1</sup>	Marques et al., 2011
<i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 (мутант <i>hupL/hoxH</i> )	нитчатый гетероцистный азотфиксирующий	152 мкмоль фотонов/м <sup>2</sup> с; пропан+СО <sub>2</sub>	28.3 мкмоль Н <sub>2</sub> (мг Хл а*ч) <sup>-1</sup>	Marques et al., 2011
<i>Anabaena cylindrica</i> B629	нитчатый	BG11 <sub>0</sub> ; 200 ммоль фотонов/м <sup>2</sup> с; аргон; 10 мМ глюкоза	49.3 мкмоль Н <sub>2</sub> (мг Хл а*ч) <sup>-1</sup>	Yeager at al., 2011
<i>Synechocystis</i> sp. strain PCC 6803 (мутант <i>ΔnarB:ΔnirA</i> )	одноклеточный не фиксирующий азот	BG11; 40 мкмоль фотонов/м <sup>2</sup> с	186 нмоль Н <sub>2</sub> (мг Хл а*ч) <sup>-1</sup>	Baebprasert et al., 2011
<i>Anabaena siamensis</i> TISTR 8012	нитчатый азотфиксирующий	BG11 <sub>0</sub> ; 40 Э/м <sup>2</sup> с; 30°C; аргон; 20 mM KCN/50 μM DCMU	22 мкмоль Н <sub>2</sub> (мг Хл а*ч) <sup>-1</sup>	Khetkorn et al., 2012
<i>Cyanothece</i> sp. ATCC 51142	одноклеточный азотфиксирующий	ASP2 (модифиц.); рН 7.5; 30°C; непрерывный барботаж 4.08 л/мин: аргон+1.3% СО <sub>2</sub> ; 50 мкмоль фотонов/м <sup>2</sup> с	400 мкмоль Н <sub>2</sub> (мг Хл а*ч) <sup>-1</sup>	Melnicki et al., 2012

<i>Aphanothece halophytica</i>	одноклеточный галотолерантный	BG11 <sub>0</sub> (модиф.) темнота; 30°C; аргон	13.8 мкмоль H <sub>2</sub> (мг Хл а*ч) <sup>-1</sup>	Taikhao et al. 2014
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803-GT	одноклеточный не фиксирующий азот	BG11 <sub>0</sub> ; темнота; глюкоза; 30°C; азот; перемешивание	3.26 мкмоль H <sub>2</sub> мл <sup>-1</sup> ч <sup>-1</sup>	Chongsuksantik ul et al., 2014
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	одноклеточный не фиксирующий азот	BG11; 50 мкмоль фотонов/м <sup>2</sup> с	40.6 мкмоль H <sub>2</sub> мл <sup>-1</sup> ч <sup>-1</sup>	Touloupakis et al., 2016
<i>Aphanothece halophytica</i>	одноклеточный	BG11; темнота; 30°C; 0.5 μM СССР	39.5 мкмоль H <sub>2</sub> /гр сух.в/ч	Pansook et al., 2019
<i>Desertifilum</i> sp. IPPAS B-1220	нитчатый	BG11 <sub>0</sub> (модифиц.: +50mM HEPES-КОН pH 7.4, 100 mM NaHCO <sub>3</sub> ); 30 мкмоль фотонов/м <sup>2</sup> с; 23°C; аргон; DCMU 10μM; перемешивание	0.348 мкмоль H <sub>2</sub> (мг Хл а*ч) <sup>-1</sup>	Kossalbayev et al., 2020
<i>Anabaena variabilis</i> A-1	нитчатый азотфиксирующий	BG11+NaHCO <sub>3</sub> ; pH 7.4; 25°C; аргон; темнота	8.67 мкмоль H <sub>2</sub> (мг Хл а*ч) <sup>-1</sup>	Kamshybayeva et al., 2022

Лидирующее положение по скорости выделения водорода среди цианобактерий на данный момент занимают представители рода *Cyanothece*.

Bandyopadhyay с соавторами показали, что *Cyanothece* sp. ATCC 51142, одноклеточный diaзотрофный штамм может генерировать большое количество водорода в аэробных условиях. *Cyanothece* sp. ATCC 51142 выделял водород со скоростью до 465 мкмоль  $H_2$  (мг Хл а ч)<sup>-1</sup> в присутствии глицерина. Выделение водорода у этого штамма было опосредовано эффективной работой нитрогеназы, которой можно управлять для преобразования солнечной энергии в  $H_2$  со скоростью в несколько раз большей, чем у любого ранее описанного дикорастущего микроорганизма, вырабатывающего водород (Bandyopadhyay et al., 2010).

Min and Sherman исследовали выделение  $H_2$  *Cyanothece* sp. ATCC 51142 опосредованное как гидрогеназой, так и нитрогеназой активностью. Максимальные показатели генерации  $H_2$  были получены в условиях азотфиксации, когда клетки выращивали и инкубировали при постоянном освещении с/без глицерина. В таких условиях скорость выделения  $H_2$  была равна 300 мкмоль  $H_2$  (мг Хл а ч)<sup>-1</sup> в течение первых 24 часов инкубации. Выделение  $H_2$  зависело от продувки аргоном. Уровень водорода, вырабатываемого с помощью гидрогеназы, был значительно ниже, от 5 до 10 мкмоль  $H_2$  (мг Хл а ч)<sup>-1</sup>. Активность гидрогеназы зависела от переноса электронов через фотосистему II, тогда как активность нитрогеназы в большей степени зависела от ФС I, а также от дыхания (Min, Sherman, 2010).

Melnicki с соавторами удалось зарегистрировать совместное производство  $H_2$  и  $O_2$  в течение 100 ч культурой *Cyanothece* sp. ATCC 51142, лишенной азота, а также получить стабильное выделение водорода со скоростью 90 мкмоль  $H_2$  (мг Хл а ч)<sup>-1</sup> (Melnicki et al., 2012).

## **1.5 Гетероцистные цианобактерии – перспективные продуценты водорода**

Организмы, состоящие из множества дифференцированных типов клеток, обладают более разнообразными и эффективными структурами, функциями и

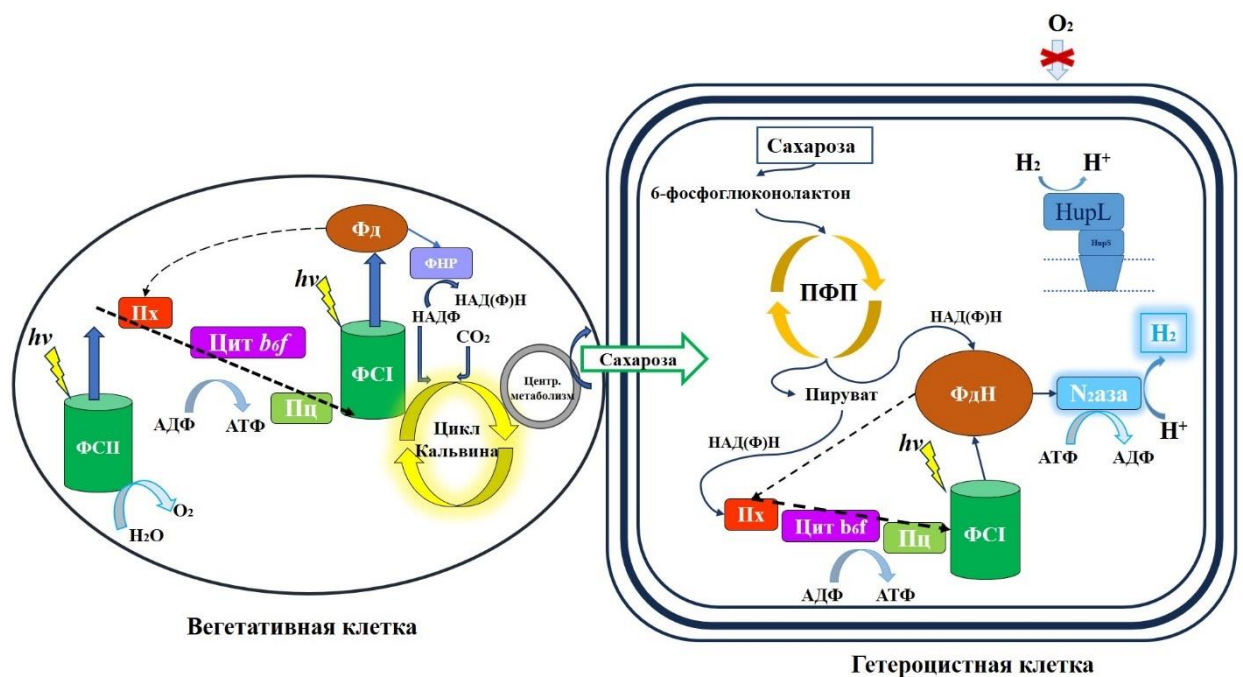
поведением, чем у одноклеточных организмов. Среди многоклеточных прокариот цианобактерии, образующие гетероцисты, представляют собой модель для изучения клеточной дифференцировки и формирования многоклеточного паттерна. Уникальный метаболизм и особенности строения гетероцистных цианобактерий позволяют осуществлять одновременно два фундаментальных процесса – кислородный фотосинтез и фиксацию азота, крайне чувствительную к  $O_2$  (Kumar et al., 2010).

Гетероцисты представляют собой дифференцированные высокоспециализированные клетки, предназначенные для обеспечения фиксированного уровня азота в вегетативных клетках филамента. В присутствии источника комбинированного азота, такого как нитрат или аммоний гетероцистные цианобактерии растут в виде длинных нитей, содержащих множество фотосинтезирующих вегетативных клеток. В отсутствие связанного азота начинают развиваться гетероцисты, образующиеся с полурегулярными интервалами (1 гетероцистная клетка через 10-20 вегетативных клеток) между вегетативными клетками (Kumar et al., 2010). Гетероцисты встречаются только у цианобактерий. По размеру они больше вегетативных клеток, имеют гомогенное содержимое, желтовато-зеленоватый цвет септы на концах, а также 1 или 2 поры (Гусев, Никитина, 1979). В гетероцистах содержится мало фикоцианина, а также отсутствуют рибосомы, другие органеллы и включения, имеющиеся в вегетативных клетках, но общее количество тилакоидов в гетероцистах больше (Гусев, Никитина, 1979).

Гетероцисты отличаются от вегетативных клеток по более крупной и округлой форме, уменьшенной пигментации, более толстым оболочкам клеток и обычно заметным гранулам цианофизина на полюсах, прилегающих к вегетативным клеткам. В гетероцистах в значительной степени локализован и экспрессируется фермент нитрогеназа, чувствительный к кислороду. Дополнительные слои оболочки, окружающие гетероцистные клетки, помогают защитить нитрогеназу от кислорода (Fay, 1992; Kumar et al., 2010).  $N_2$  катализирует процесс азотфиксации, в результате которого образуется аммиак



(NH<sub>3</sub>) и водород (Kondo, Ishiura, 2000). Внутри зрелых гетероцист создается микроаэробная среда, которая поддерживается за счет повышенной частоты дыхания, отсутствия фотосистемы II и наличия толстой клеточной стенки (Murry et al., 1983; Hallenbeck, 2012; Allahverdiyeva et al., 2014). При формировании и развитии гетероцист структуры, связанные с фотосинтетическим аппаратом, деградируют (Судьина и др., 1978). Фотосинтез с выделением кислорода протекает в вегетативных клетках, а азотфиксация и выделение водорода – в гетероцистах. Таким образом, нитрогеназа остается изолированной от кислорода (Цыганков, 2006) (Рисунок 4).



**Рисунок 4.** Пространственное разделение процессов фотосинтеза (в вегетативных клетках) и азотфиксации+выделения водорода (в гетероцистах) в гетероцистных цианобактериях (Модифицировано по Tsygankov, 2007; Allahverdiyeva et al., 2014).

Нитрогеназы у гетероцистных цианобактерий синтезируются преимущественно в гетероцистах, однако некоторые цианобактерии содержат нитрогеназы, которые синтезируются также и в вегетативных клетках в анаэробных условиях (Thiel et al., 1995; Tsygankov, 2007). Гетероцисты и вегетативные клетки взаимозависимы. Фиксированный в гетероцистах азот по

специальным каналам транспортируется в соседние вегетативные клетки. Вегетативные клетки, в свою очередь, поставляют в гетероцисты соединения углерода (сахарозы) (Рисунок 5) (Cumino et al., 2007; Marcozzi et al., 2009). Обмен метаболитами и межклеточными сигналами, которые контролируют регулируемое расстояние между гетероцистами, требуют перемещения молекул между клетками вдоль нити, возможно, через непрерывную периплазму (Flores et al., 2006; Kumar et al., 2010).

Процесс дифференцировки гетероцист включает в себя два этапа: начальный этап – превращение вегетативной клетки в прогетероцисту, второй этап – трансформация последней в гетероцисту (Tuagi, 1975). Превращение двух соседних прогетероцист в зрелые гетероцисты у нормально дифференцирующихся цианобактерий тормозится конкурентным взаимодействием между ними. Конкуренция приводит к дифференцировке только одной прогетероцисты и регрессии другой (Mitchison, Wilcox, 1973; Salleh et al., 2015).

#### **1.6. Стратегии, используемые для повышения продуктивности процесса выделения водорода**

На скорость производства водорода микроорганизмами влияет множество факторов, которые можно объединить в две большие группы: внутренние и внешние (Бозиева и др., 2022). К внутренним факторам относятся: наличие поглощающей гидрогеназы и чувствительность ферментов к присутствию кислорода. Внешние факторы включают в себя условия окружающей среды такие как свет, температура, pH среды, состав газовой фазы, доступность питательных веществ. Оптимальные условия для производства водорода видоспецифичны (Dutta et al., 2005).

Несмотря на предпочтительность использования биологического пути для получения водорода, при реализации данного подхода приходится сталкиваться с некоторыми трудностями – это высокая чувствительность ферментов, катализирующих выделение  $H_2$ , к содержанию  $O_2$  в газовой фазе, а также низкая продуктивность процесса (Nagarajan et al., 2017; Goswami et al., 2021). На данный

момент предлагается множество различных стратегий для преодоления этих трудностей, все множество подходов можно объединить в три большие группы: метаболические, генетические, технологические подходы (Sadvakasova et al., 2020; Бозиева и др., 2022).

Основным требованием к производству водорода цианобактериями является удаление кислорода из газовой фазы. Поэтому часть метаболических подходов направлена на создание анаэробных условий, что, в первую очередь, достигается путем продувки культур инертными газами (Bothe et al., 2010; Цыганков, 2006; Sadvakasova et al., 2020).

Следующим метоболическим подходом является создание условий дефицита элементов питания: азотное, серное, фосфорное голодания (Volgusheva et al., 2013; Antal et al., 2014; McNeely et al., 2014; Batyrova et al., 2015; Volgusheva et al., 2017; Vargas et al., 2020; Sadvakasova et al., 2020). Удаление незаменимых элементов среды стимулирует выделение водорода за счет изменения обмена веществ. Процессы потребления кислорода начинают доминировать над его выделением, что приводит к созданию анаэробных условий и к активации ферментов, вовлеченных в водородный метаболизм (Vargas et al., 2020).

Другим эффективным способом является применение ингибиторов транспорта электронов. Наиболее широко распространены и хорошо изучены следующие типы ингибиторов: DCMU, DBMIB, KCN, MV, CCCP, PCP (Appel et al., 2000; Burrows et al., 2008; Kossalbayev et al., 2020; Khetkorn et al., 2012; Pansook et al., 2019). Использование DCMU направлено на торможение активности фотосистемы II и создание анаэробных условий, благоприятных для производства молекулярного водорода. DCMU, действует как аналог хинона, связывается с  $Q_B$  ФСII и блокирует перенос электронов от  $Q_A$  (Cournac et al., 2004; Khetkorn et al., 2017; Kossalbayev et al., 2020). Другим широко используемым ингибитором фотосистемы II у цианобактерий и микроводорослей является CCCP, который также, как и DCMU ингибирует активность второй фотосистемы, приводит к уменьшению выделения кислорода, и в последствии к увеличению производства водорода. Кроме того, CCCP ингибирует синтез АТФ, что приводит к повышению

скорости темнового дыхания (Torimura et al., 2001; Pansook et al., 2019). KCN и PCP, блокируют хинолоксидазу, KCN может блокировать процесс поглощения  $H_2$  или перенос электронов от цитохрома *b<sub>6</sub>f* к фотосистеме I путем подавления активности пластоцианина (Berg, Krogmann, 1975; Appel et al., 2000; Peltier et al., 2010).

Добавление различных доноров электронов в среду также способствует повышению скорости выделения водорода. Так, например, усвоенная глюкоза может использоваться для синтеза гликогена, который используется для выделения водорода при темновой ферментации (Zhang et al., 2006; Bandyopadhyay et al., 2010; Min, Sherman, 2010; Yeager et al., 2011; Sakurai et al., 2013; Chongsuksantikul et al., 2014).

К группе генетических подходов относят разработку  $O_2$ -толерантной гидрогеназы, разработку усеченных антенных комплексов, переключение потока электронов на гидрогеназу, удаление *Hup*-гидрогеназы и создание искусственных микроРНК. Методы генетической инженерии направлены на устранение конкурирующих путей и обращение потока электронов в сторону синтеза  $H_2$  (Polle et al., 2002; Lindberg et al., 2004; Melis et al., 2009; Kosourov et al., 2011; Masukawa et al., 2012; Sakurai et al., 2013; Li et al., 2018). Чтобы в полной мере использовать световую энергию, предлагаются следующие генетические методы: уменьшение размера антенн и удаление специфических вспомогательных пигментов, таких как фикоцианин (Nakajima, Itayama, 2003). Применение подобных стратегий может обеспечить более высокую эффективность использования фотонов света, и свести рассеивание световой энергии к минимуму (Benemann 1989; Melis et al., 1999; Ort et al., 2011; Salleh et al., 2015).

К технологическим подходам относится улучшение характеристик биореакторов: возможность регулировки температуры культивирования, интенсивности освещения, состава газовой смеси для продувки при интенсивном культивировании и т.д. На данный момент сконструировано уже множество фотобиореакторов закрытого типа: плоскостельные, трубчатые, вертикальные колонные. Но несмотря на это создание «идеального» фотобиореактора все еще является актуальной задачей, поскольку культивирование должно проводиться в

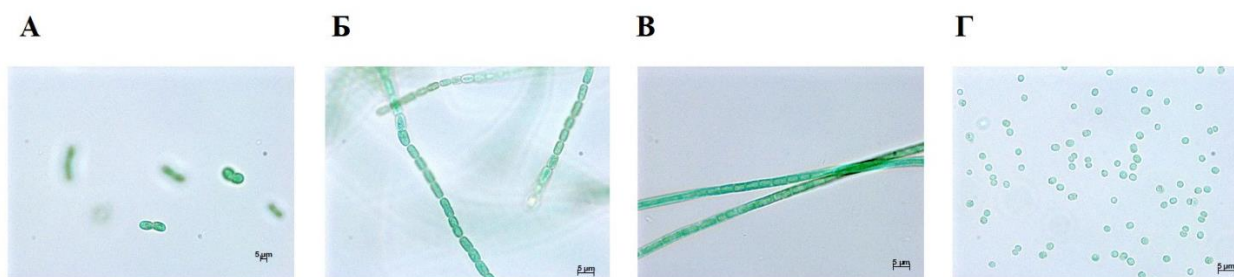
биореакторах особого типа, позволяющих снизить затраты на производство и избежать потерь произведенного  $H_2$  (Skjånes et al., 2016). При конструировании ФБР необходимо учитывать следующие требования: удобство и простота стерилизации; высокое соотношение освещаемой поверхности к объему культуры; дешевизна и простота конструкции; легкость сборки (Sevda et al., 2017; Kroumov et al., 2017; Габриелян и др., 2023).

К технологическим подходам относят также и иммобилизацию клеток на различных носителях. Данный метод дает возможность защитить микроорганизмы от неблагоприятных условий и обеспечить им постоянство условий культивирования, что важно при получении водорода в течение продолжительного времени (Touloupakis et al., 2016; Taikhao, Prunpruch, 2017).

## Глава 2. Объекты и методы исследования

### 2.1 Объекты исследования и условия культивирования

В качестве объектов исследования были выбраны разные по морфологии штаммы цианобактерий из коллекции микроводорослей и цианобактерий ИФР РАН (IPPAS), которые не были ранее изучены: *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213, *Sodalinema gerasimenkoe* IPPAS B-353 (Рисунок 5). Штамм *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT выбран в качестве контрольного варианта с описанной в литературе гидрогеназной активностью. Выбор цианобактерий в качестве объектов для производства  $H_2$  обусловлен легкостью их культивирования и устойчивостью к неблагоприятным условиям (Vermaas, 2001; Marques et al., 2011).



**Рисунок 5.** Микрофотографии объектов исследования (А – *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, Б – *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213, В – *Sodalinema gerasimenkoe* IPPAS B-353, Г – *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT)

*Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 – одноклеточная цианобактерия (Рисунок 5А), выделена из соленой части озера Балхаш Республики Казахстан. Способна быстро расти в широком диапазоне температур от 24 до 39°C (Усербаева, 2017).

*Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 – нитчатая азотфиксирующая гетероцистная цианобактерия (Рисунок 5Б), интенсивно набирает биомассу при культивировании в диапазоне температур от 34 до 39°C (Bozieva et al., 2023).

*Sodalinema gerasimenkoe* IPPAS B-353 – нитчатая негетероцистная

цианобактерия (Рисунок 5В), выделена из озера Хилганта (Забайкалье) (Samyulina et al., 2021).

*Synechocystis* sp. PCC 6803 GT – одноклеточная цианобактерия (Рисунок 5Г), выбрана в качестве положительного контроля, поскольку в литературе имеются сведения о способности данного штамма генерировать водород (Chongsuksantikul et al., 2014).

Исходные культуры поддерживали в колбах Эрленмейера в жидких средах. Интенсивное культивирование цианобактерий проводили в лабораторной системе интенсивного культивирования (ЛСИК) в сосудах с 200 мл соответствующей питательной среды, при двустороннем освещении теплым белым светом с суммарной интенсивностью 100-110 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup> (LI-COR Biosciences, США). Перемешивание и аэрацию культур, в период роста, осуществляли путем барботирования стерильной газовой смеси с концентрацией CO<sub>2</sub> до 1.5%. Питательные среды, температуру культивирования и pH подбирали в соответствии с оптимумом для каждого штамма (Таблица 2).

**Таблица 2.** Оптимальные условия культивирования исследуемых штаммов цианобактерий

Культура	Среда культивирования	Температура культивирования	pH	Источник
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 GT	BG-11	32	7.5	Stanier et al., 1971
<i>Cyanobacterium</i> sp. IPPAS B-1200	Zarrouk	30	8.5	Sarsekeyeva et al., 2014
<i>Sodalinema gerasimenkoe</i> IPPAS B-353	S	32	9.5	Samyulina et al., 2021
<i>Dolichospermum</i> sp. IPPAS B-1213	BG-11-N	35 (определена экспериментально)	7.5	Stanier et al., 1971

В начале каждого эксперимента исходные культуры преадаптировали к условиям интенсивного культивирования в течение 3 дней, далее культуры разбавляли свежими средами до оптической плотности, измеренной при длине волны 750 нм, равной 0.04-0.2 и переносили в экспериментальные сосуды в трех повторностях.

Состав питательных сред:

BG-11:  $\text{NaNO}_3$  (1.50 г),  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  (0.051 г),  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (0.075 г),  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (0.05 г),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.02 г), лимонная кислота (0.006 г), ЭДТА· $\text{Na}_2$  (0.001 г),  $\text{Fe}_3^+/\text{NH}_4^+$ -цитрат (коричневый, 16-19% Fe) (0.006 г), раствор микроэлементов (1 мл), 0,5 М раствор HEPES с pH 7,5 (40 мл), вода дистиллированная (до 1 л).

BG-11-N:  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  (0.056 г),  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (0.0825 г),  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (0.05 г),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.02 г), лимонная кислота (0.006 г), ЭДТА· $\text{Na}_2$  (0.001 г),  $\text{Fe}_3^+/\text{NH}_4^+$ -цитрат (коричневый, 16-19% Fe) (0.006 г), раствор микроэлементов (1 мл), 0,5 М раствор HEPES с pH 7,5 (40 мл), вода дистиллированная (до 1 л).

Zarrouk:  $\text{NaHCO}_3$  (16.8 г),  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  (1 г),  $\text{NaNO}_3$  (2.5 г),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (1 г),  $\text{NaCl}$  (1 г),  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (0.2 г),  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (0.04 г), Fe+EDTA (1 мл), раствор микроэлементов 1 (1 мл), раствор микроэлементов 2 (1 мл), вода дистиллированная (до 1 л).

S:  $\text{KCl}$  (1 г),  $\text{NaHCO}_3$  (16.8 г),  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$  (1.3 г),  $\text{NaNO}_3$  (2.5 г),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (1 г),  $\text{NaCl}$  (30 г),  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (0.2 г),  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  (0.053 г), Fe+EDTA (1 мл), раствор микроэлементов 1 (1 мл), раствор микроэлементов 2 (1 мл), вода дистиллированная (до 1 л).

## 2.2 Методы исследования

### 2.2.1 Подбор оптимальной температуры культивирования для штамма *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213

Для определения оптимальной температуры роста культуру *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 выращивали как описано в разделе 2.1. Исходная культура была адаптирована к условиям интенсивного культивирования в течение 3 дней. Далее



экспериментальные образцы культивировали в девяти сосудах при температурах:  $35\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $38\pm 1^\circ\text{C}$  и  $41\pm 1^\circ\text{C}$ . Рост культуры оценивали по изменению оптической плотности в течение 6 суток. Оптическую плотность культуры измеряли на спектрофотометре (Thermo Scientific Genesys 40 Vis, США) при длине волны  $\lambda = 750$  нм.

### 2.2.2 Определение скорости роста цианобактерий

Скорость роста оценивали по изменению оптической плотности ( $\text{ОП}_{750}$ ) культуры и по приросту биомассы. Для этого отбирали пробы из интенсивно растущей культуры через каждые 24 часа и измеряли плотность культуры в кюветах на спектрофотометре (Thermo Scientific Genesys 40 Vis, США) при длине волны  $\lambda = 750$  нм (Синетова и др., 2019).

Для оценки накопления биомассы отбирали пробы для измерения сухой массы, осаждали образцы центрифугированием (Eppendorf 5415 R, Германия), дважды промывали дистиллированной водой и высушивали полученный осадок в предварительно высушенных и взвешенных пробирках в сушильном шкафу в течение 24 часов при  $80^\circ\text{C}$ . Через 24 часа взвешивали пробирки с высушенной биомассой и вычисляли сухую массу проб, вычитая вес сухой пробирки (Синетова и др., 2019).

Относительную скорость роста,  $\mu$ , вычисляли по изменению оптической плотности культуры по формуле (1)

$$\mu = \frac{\ln \frac{N_2}{N_1}}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

где  $N_1$  и  $N_2$  –  $\text{ОП}_{750}$  культуры, измеренные во время  $t_1$  и  $t_2$ , соответственно. По относительной скорости роста рассчитывали также время удвоения биомассы по формуле (2):

$$t_{\text{удв}} = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

### 2.2.3 Анализ содержания фотосинтетических пигментов

Исследованные цианобактерии содержат в своем составе пигменты: хлорофилл *a*, каротиноиды и фикобилипротеины. Хлорофилл и каротиноиды экстрагировали в метаноле и анализировали, как описано в протоколе (Zavřel et al., 2015). Для этого пробы объемом 1 мл осаждали центрифугированием, удаляли супернатант, после чего к осадку добавляли 1 мл охлажденного (до 4°C) метанола, тщательно перемешивали пробы вортексированием (Heidolph Reax Top, Германия) и оставляли на 20 минут при 4°C для экстракции пигментов. Далее культуры подвергали повторному центрифугированию и измеряли спектр поглощения света полученных экстрактов на спектрофотометре при длинах волн 470, 665 и 720 нм. Расчеты проводили по формулам (3) и (4):

$$\text{Хл } a \text{ [мкг/мл]} = 12.9447 (A_{665} - A_{720}) \quad (3)$$

$$\text{Кар [мкг/мл]} = [1000 (A_{470} - A_{720}) - 2.86 (\text{Хл } a \text{ [мкг/мл]})]/221 \quad (4)$$

### 2.2.4 Определение скорости выделения кислорода

Скорость выделения кислорода определяли полярографическим методом с помощью электрода Кларка (состоящего из платинового катода и серебряного анода, погруженных в раствор электролита KCl, и отделенных от исследуемого образца мембраной) и измерительной системы Hansatech (Великобритания).

Измерительная установка состояла из контрольного измерительного блока, источника освещения, источника питания для лампы, магнитной мешалки и ячейки Кларка. Запись сигнала осуществлялась с помощью программного обеспечения PowerGraph (ДИСофт, Россия). Температура во время измерений поддерживалась за счет термостата KISS K6 (Huber, Германия).

Для измерения скорости выделения кислорода, штаммы цианобактерий во время фазы экспоненциального роста осаждали центрифугированием при 3500 g (Rotina 420 R, Hettich, Германия) в течение 3 мин при комнатной температуре и ресуспендировали в соответствующей свежей среде для контрольных измерений, а также в 25 mM растворах буферов (Good's buffers: MES, HEPES, CAPS).

Преадаптация к свежей среде длилась 30 минут, после чего оценивали влияние изменения рН на скорость выделения  $O_2$  (Bozieva et al., 2023).

После установления заданной температуры проводили калибровку дитионитом натрия. Во время измерений культура перемешивалась с помощью магнитной мешалки. Пробы инкубировали в темноте 10 минут, далее регистрировали данные в течение 2 минут, после чего образец в кювете освещали светом, прошедшим через красный оптический фильтр (R-60; Toshiba, Токио), и фильтр, поглощающий инфракрасное излучение (HA-50; Hoya Glass, Токио). Интенсивность света на поверхности кюветы составляла  $1500 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ . Измерения проводились при температуре  $32^\circ\text{C}$  (Bozieva et al., 2023).

Математическая обработка данных проводилась в программе OriginPro 9.1. Участки кривых, полученных в темноте и на свету, аппроксимировались прямыми линиями, далее высчитывались тангенсы угла наклона этих прямых к оси  $x$ . Для вычисления скорости выделения  $O_2$  использовали формулу (5):

$$d[O_2] dt = (\text{tg } \alpha_{light} - \text{tg } \alpha_{dark}) * k(T) * 3600 c \quad (5)$$

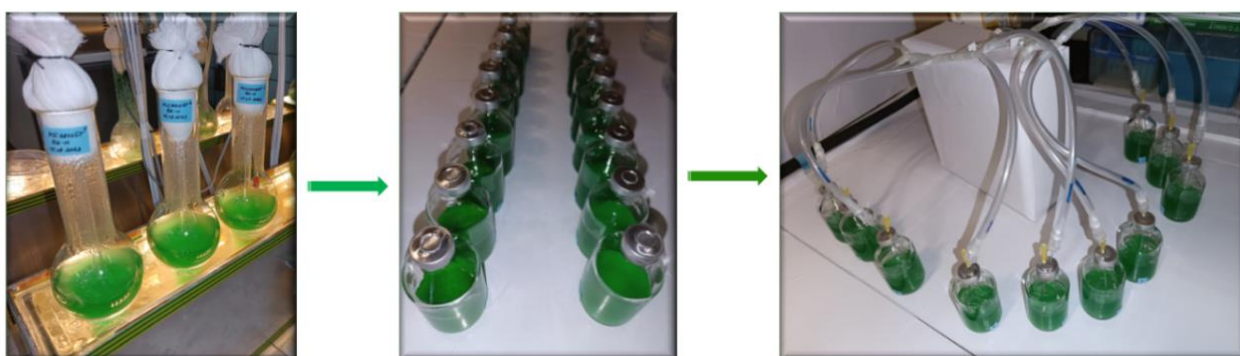
где  $c$  – концентрация хлорофилла в мг/мл.

### 2.2.5 Определение скорости выделения водорода

После выращивания культур в ЛСИК (Рисунок 6) в течение 3 суток, культуры переносили в пробирки объемом 50 мл и центрифугировали при 4800 g (Rotina 420 R, Hettich, Германия) в течение 5 минут при комнатной температуре. Далее удаляли супернатант и ресуспендировали культуры в соответствующих свежих питательных средах. После двукратной промывки свежей средой, клетки ресуспендировали в конечном объеме среды 30 мл и переносили в стеклянные бутылки объемом 50 мл (Рисунок 6), которые герметично закрывали резиновыми пробками (Тип 1-1) и алюминиевыми колпачками (Тип К-2-20), с помощью ручной обжимки.

Для создания анаэробных условий культуры барботировали аргон (99,999%) с помощью игл Квинке 19 калибра (19 G) длиной 90 мм. Дополнительные иглы 19 G (40 мм) служили для выдува во время продувки (Рисунок 6).

Далее культуры инкубировали в темновых или световых условиях на биошейкере (IKA KS 4000 I control, Россия) при температуре 32°C. Поскольку для большинства цианобактерий идеальная температура для производства водорода находится в диапазоне 30-40°C (Singh et al., 2022).



**Рисунок 6.** Схема эксперимента

Для инкубирования в световых условиях культуры помещали под постоянный теплый (2700K) белый свет интенсивностью 60 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>. Для инкубирования в темноте бутылки накрывали фольгой.

Анализ газовой фазы проводили хроматографическим методом. Для измерения концентрации водорода пробы газа объемом 1 мл отбирали каждые 24 часа и анализировали на газовом хроматографе Цвет-800 (Цвет, Россия), оснащенный детектором по теплопроводности полудиффузионного типа (ДТП-258-01) и набивной хроматографической колонкой, заполненной адсорбентом (цеолит СаА). Калибровку проводили по стандартному образцу искусственной газовой смеси с концентрацией Н<sub>2</sub> 3.06% в N<sub>2</sub> (Югра-ПГС, Россия). В качестве газ-носителя использовали аргон особой чистоты (99.999%). Скорость расхода газ-носителя составляла 30 мл/мин. Ток питания детектора был равен 85 мА. Температура колонки во время измерений была 30±0.5°C.

Полученные результаты пересчитывали на концентрацию хлорофилла *a* в клетках. Конечная скорость производства  $H_2$  была представлена в  $\text{мкмоль } H_2 (\text{мг Хл } a \text{ ч})^{-1}$ .

После первичного скрининга культур на способность генерировать водород, были применены метаболические подходы для повышения скорости производства  $H_2$ , среди которых использование ингибиторов фотосинтетической активности (DCMU, DBMIB), а также экзогенных источников углерода (глицерин, глюкоза, сахароза).

DCMU и DBMIB являются часто используемыми в исследованиях ингибиторами с хорошо изученными механизмами ингибирующего действия (Жармухамедов и др., 2022).

DCMU мощный ингибитор с центром ингибирования, ассоциированным с электронным акцептором Q. Блокирует перенос электронов между первичным акцептором хиноновых электронов  $Q_A$  и вторичным акцептором хиноновых электронов  $Q_B$  на акцепторной стороне ФСII (Досон и др., 1991; Metz et al., 1986; Pansook et al., 2019). Это приводит к прерыванию фотосинтетической цепи переноса электронов и прекращению выделения  $O_2$ .

DBMIB является специфическим ингибитором окисления пластохинона, блокирует электронный поток от фотосистемы II к фотосистеме I на участке между пластохиноном и цитохромом *b<sub>6</sub>f* (Досон и др., 1991; Skizim et al., 2012).

DCMU и DBMIB растворяли в диметилсульфоксиде (DMSO) и добавляли к культурам для поддержания анаэробных условий. Добавленный раствор перемешивали с культурой в течение 15-20 минут.

В качестве экзогенных источников углерода использовали глицерин ( $C_3H_8O_3$ ), глюкозу ( $C_6H_{12}O_6$ ) и сахарозу ( $C_{11}H_{22}O_{11}$ ).

Глицерин (1,2,3-тригидроксипропан; пропантриол-1,2,3) – бесцветная вязкая жидкость (Досон и др., 1991), широко распространенная в природе, является структурным компонентом многих липидов (Wang et al., 2001). Глицерин служит источником углерода и энергии для многих прокариотических организмов.  $C_3H_8O_3$  – это возобновляемый источник углерода, в основном получаемый как побочный

продукт при производстве биодизельного топлива, он может быть экономичным и конкурентоспособным сырьем для производства биоводорода (Zhang, 2021). В биохимии глицерин играет фундаментальную роль в стабилизации ферментов благодаря своим функциям многоатомного спирта. Что повышает структурную стабильность всего белка за счет поддержания равновесия гидрофильно–липофильного профиля, которое достигается за счет адсорбции белка (Pagliaro, Rossi, 2008).

Глюкоза является широко используемым углеводом в качестве источника метаболической энергии клеток (Kotay, Das, 2008). Окисление глюкозы дополняет потребность в энергии и/или восстановителях, обычно получаемых в результате фотосинтеза, для производства водорода, катализируемого нитрогеназой, снижая зависимость процесса от световой стимуляции (Yeager et al., 2011).

Сахароза распространенный в природе дисахарид, синтезируемый преимущественно фотосинтезирующими организмами. В чистом виде представлена в виде бесцветных кристаллов.

## **2.2.6 Определение частоты образования гетероцист**

Для определения частоты образования гетероцист, пробы объемом 1 мл отбирали из исходной культуры перед инкубированием в анаэробных условиях, а также из культур, инкубированных в анаэробных условиях в течение 96 часов без добавления DCMU и с 20 мкМ DCMU. Частоту образования гетероцист в культурах оценивали с помощью световой микроскопии (Axio Imager D1; Carl Zeiss, Германия).

Количество вегетативных клеток и гетероцист (прогетероцисты, гетероцисты, зрелые гетероцисты) подсчитывали на 13-20 случайных полях с помощью программы ImageJ. Частоту гетероцист выражали в процентах от значения отношения числа гетероцист к числу вегетативных клеток. В каждом образце подсчитывали не менее 1000 вегетативных клеток.

Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

### **2.2.7 Определение активности нитрогеназы**

Нитрогеназную активность определяли по скорости восстановления ацетилена ( $C_2H_2$ ) до этилена ( $C_2H_4$ ) методом газовой хроматографии. Культуру в фазе активного роста осаждали центрифугированием при 4800 g (Rotina 420 R, Hettich, Германия) в течение 7 минут при комнатной температуре. Далее дважды промывали свежей средой, ресуспендировали в конечном объеме среды 30 мл и переносили в стеклянные бутылки объемом 50 мл, которые герметично закрывали резиновыми пробками и алюминиевыми колпачками. Газовую фазу замещали аргоном (99,999%) путем барботирования культуры с помощью иглы Квинке 19 G длиной 90 мм, вторая игла 19 G длиной 40 мм служила в качестве выдува во время продувки. Далее в газовую фазу вносили 1 мл ацетилена и инкубировали культуру в световых условиях на биошейкере при температуре 25-30°C. Состав газовой фазы анализировали на хроматографе Кристалл 2000 (Хроматэк, Россия).

### **2.2.8 Определение способности к хемоорганогетеротрофному росту**

Для определения способности цианобактерий к хемоорганогетеротрофному росту культуры выращивали в колбах Эрленмейера с 90 мл соответствующей питательной среды, при оптимальных значениях pH и температуры. Культуры инкубировались в темноте с добавлением 350 мМ глицерина. Скорость роста оценивали по изменению оптической плотности ( $OP_{750}$ ) культуры. Для этого отбирали пробы из растущей культуры и измеряли плотность культуры в кюветах на спектрофотометре (Thermo Scientific Genesys 40 Vis, США) при длине волны  $\lambda = 750$  нм (Синетова и др., 2019).

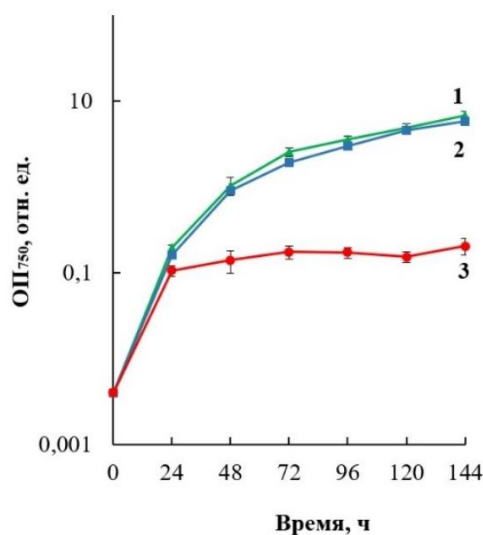
### **2.3 Точность и воспроизводимость измерений**

В таблицах, рисунках и тексте представлены данные одного типичного эксперимента, каждый эксперимент проводили 2-5 раз. Измерения проводили в 3-5 повторностях и вычисляли среднее значение полученных данных. Точность измерений составляла около 10%.

## Глава 3. Результаты и обсуждение

### 3.1 Определение оптимальной температуры культивирования для штамма *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213

Выбор оптимума температуры для штамма *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 проводили путем культивирования в диапазоне температур от 32 до 42°C. Культура, выращенная при температуре 32°C была исключена из экспериментов из-за низкой скорости роста. Наибольшие скорости роста и прироста биомассы наблюдались при температуре культивирования 35±1°C ( $\mu_{\max}=3.8$  сут<sup>-1</sup>). При температуре 38±1°C ( $\mu_{\max}=3.7$  сут<sup>-1</sup>) наблюдался более медленный рост, а при 41±1°C рост культуры прекратился через 4 дня. Значение температуры 35±1°C было выбрано как оптимальное для выращивания данной культуры. На 6-ой день культивирования при температуре 35±1°C ОП<sub>750</sub> составила 6.8, а при 38±1°C и 41±1°C показатель был равен 5.8 и 0.2 соответственно (Рисунок 7) (Bozieva et al., 2023).



**Рисунок 7.** Кривые роста штамма *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213, культивированного при разных температурах (1 – 35±1°C; 2 – 38±1°C; 3 – 41±1°C) (Bozieva et al., 2023).

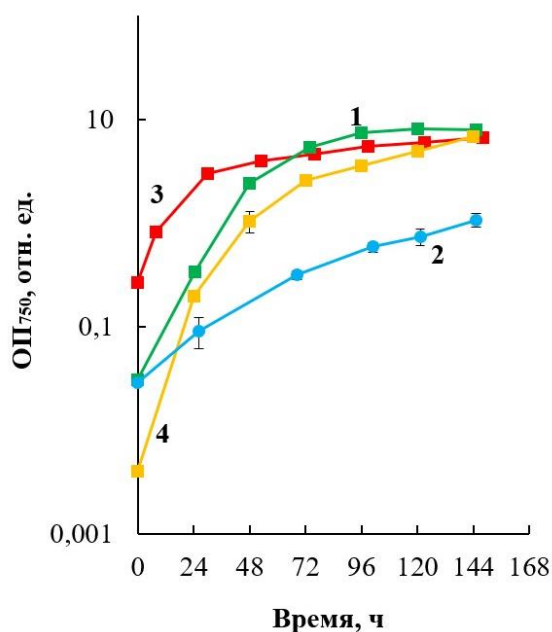


При температуре  $41\pm 1^\circ\text{C}$  рост культуры прекращался, однако это явление носило обратимый характер, при понижении температуры до оптимальных значений культура вновь начинала медленно расти.

Согласно полученным в ходе данного эксперимента данным, можно сделать вывод, что культура *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 способна быстро расти в диапазоне температур от  $34$  до  $39^\circ\text{C}$  (Bozieva et al., 2023). Этот показатель является положительным, поскольку незначительные колебания температуры не будут оказывать существенного влияния на рост и продуктивность культуры.

### **3.2 Ростовые характеристики исследуемых культур**

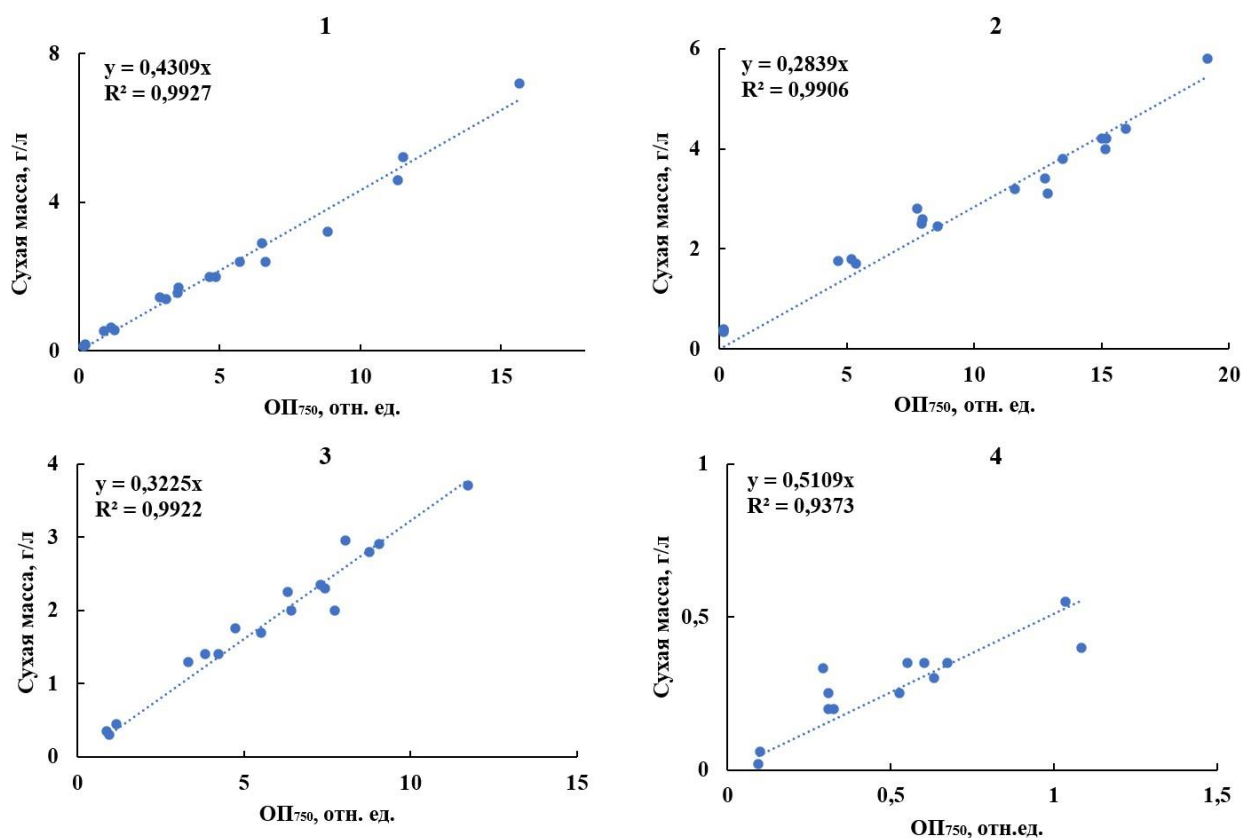
У клеточных культур выделяют 4 стадии роста: лаг-фазу, экспоненциальную (логарифмическую) фазу, линейную и стационарную фазы (Цоглин, Пронина, 2012). Лаг-фаза характеризуется отсутствием роста культур из-за адаптации к новым условиям. В начале интенсивного культивирования происходит изменение факторов среды, которое приводит к стрессу и остановке роста биомассы и деления клеток. Далее культуры переходят в фазу быстрого роста – экспоненциальную фазу, в которой наблюдается максимальная постоянная скорость роста культур и нелимитированное деление клеток. Линейная фаза начинается при достижении культурой определенной плотности. На данном этапе происходит постоянное снижение удельной скорости роста, поскольку появляется лимитирующий фактор. После наступает стационарная фаза – плато кривой роста, рост культуры прекращается (Цоглин, Пронина, 2012; Синетова и др., 2019). Кривые роста изученных штаммов цианобактерий имели S-образную форму, без лаг-фазы (Рисунок 8).



**Рисунок 8.** Кривые роста исследованных штаммов (1 – *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT; 2 – *S. gerasimenkoeae* IPPAS B-353; 3 – *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200; 4 – *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213) (Bozieva et al., 2023).

Отсутствие лаг-фазы объясняется предварительной адаптацией цианобактерий к условиям интенсивного культивирования. Снижение скорости прироста биомассы на 5-6 сутки свидетельствовало о влиянии лимитирующих факторов: исчерпании запасов питательных веществ в среде культивирования, недостатке освещения из-за высокой плотности культуры (эффект самозатенения), а также появлении различных продуктов метаболизма.

Наилучшее время удвоения биомассы было получено для *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT и *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213, которое составило 5.6 ч, 8.5 ч и 8.3 ч соответственно. Для *S. gerasimenkoeae* IPPAS B-353 время удвоения биомассы составило 12.9 ч. Конечная концентрация биомассы была в пределах 0.4-5 г/л. Значение конечного выхода биомассы зависело от плотности начального посева культуры, а также от длительности экспоненциальной фазы (Bozieva et al., 2023).



**Рисунок 9.** Корреляция ростовых характеристик (оптическая плотность и сухая масса) исследованных штаммов (**1** – *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213; **2** – *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200; **3** – *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT; **4** – *S. gerasimenkoae* IPPAS B-353) (Bozieva et al., 2023).

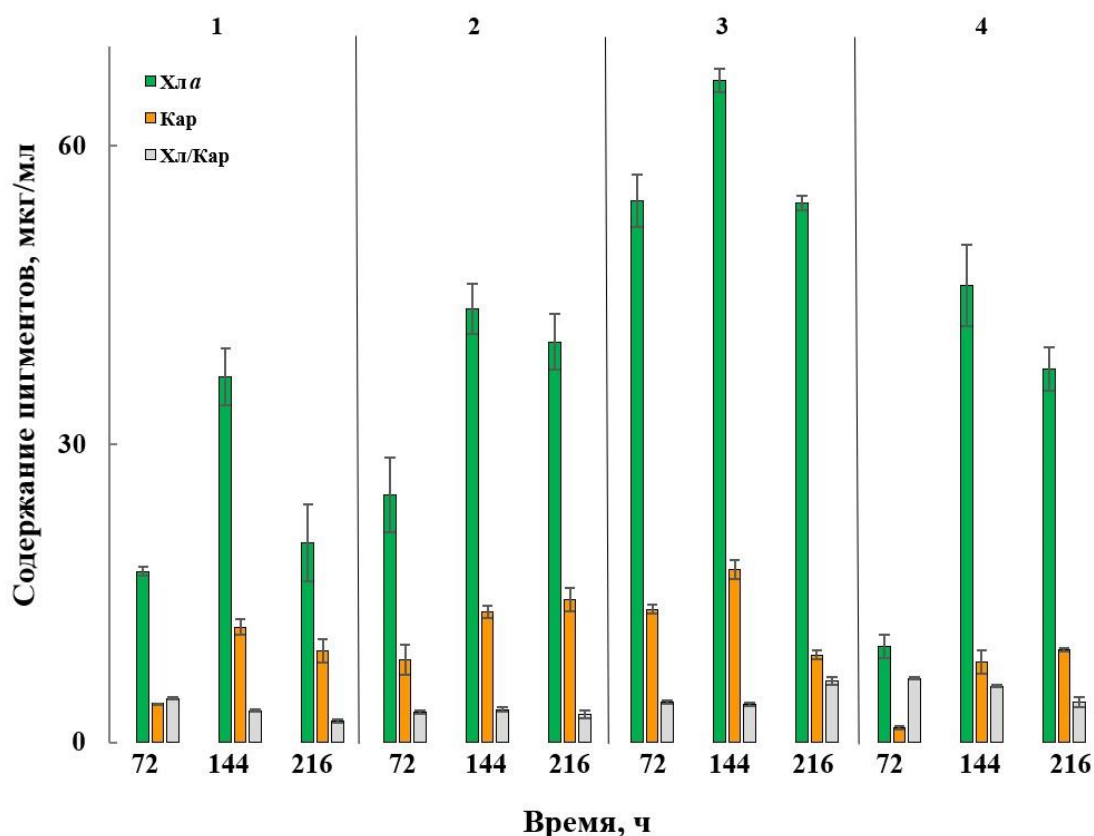
Корреляцию ростовых характеристик оценивали на основе изменения сухого веса и оптической плотности. Для всех изученных штаммов наблюдалась достоверная корреляция между ОП<sub>750</sub> и концентрацией сухой биомассы (Рисунок 9) (Bozieva et al., 2023).

Полученные результаты свидетельствуют о способности выбранных культур к быстрому росту, что позволяет рассматривать их как потенциальный источник биомассы для получения водорода.

### 3.3 Пигментный состав

В экспоненциальной фазе роста концентрация хлорофилла составляла 10-65 мкг/мл. У всех изученных штаммов содержание хлорофилла было максимальным

на 6-й день культивирования: *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT – 36.8 мкг/мл; *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 – 43 мкг/мл; *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 – 66 мкг/мл; *S. gerasimenkoae* IPPAS B-353 – 46 мкг/мл (Рисунок 10). К 9 суткам культивирования концентрация хлорофилла в культурах снижалась (Bozieva et al., 2023).



**Рисунок 10.** Динамика содержания фотосинтетических пигментов в культурах (1 – *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT; 2 – *Sodalinema gerasimenkoae* IPPAS B-353; 3 – *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213; 4 – *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200) (Bozieva et al., 2023).

Конечные показатели соотношения пигментов зависели от плотности начального посева культуры.

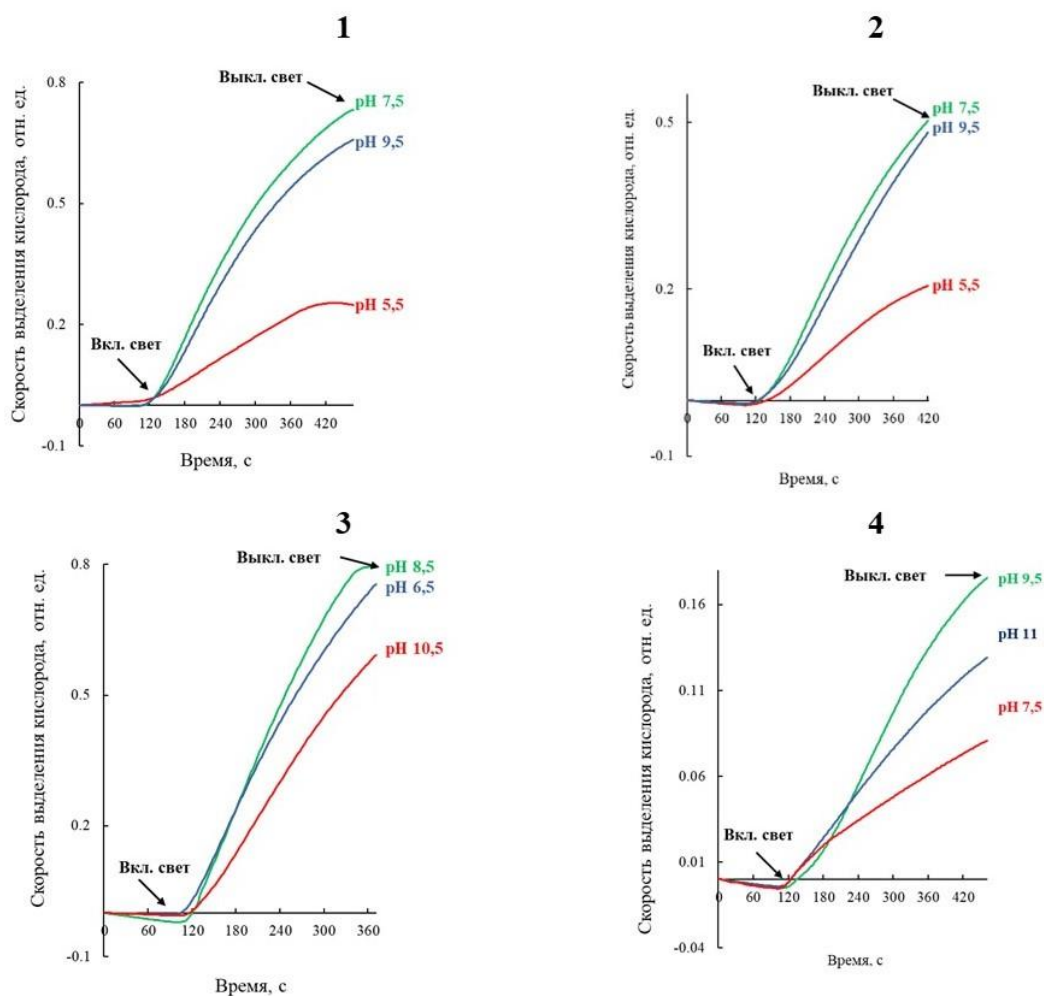
### 3.4 Скорость выделения кислорода

Фотосинтез является одним из основных энергетических процессов живых организмов. Преимущество фототрофного пути энергообеспечения заключается в том, что источником энергии является солнечный свет. Первичными стабильными продуктами фотосинтеза являются АТФ и НАДФ. Переносчиками энергии служат ферредоксин и АТФ. Световое насыщение фотосинтеза у цианобактерий происходит при значительно меньшей интенсивности фотосинтетически активной радиации, чем у водорослей и растений (Судьина и др., 1978). Они способны использовать солнечную энергию в более широком спектре, чем другие фотосинтезирующие организмы, за счет особенностей их пигментного аппарата (Андреюк и др., 1990).

Фотосинтетическую активность исследуемых культур определяли по скорости выделения кислорода, которую измеряли на 3 сутки культивирования в фазе активного роста культур при рН равном рН среды, а также при значениях рН выше и ниже оптимальных показателей (Рисунок 11).

Оптимальный рН для эффективного выделения кислорода был рН среды для всех изученных штаммов, кинетика выделения кислорода представлена на рисунке 11. Среды, используемые для культивирования, подходят для эффективного фотосинтеза. Скорость выделения кислорода *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT составляла  $185 \text{ мкмоль O}_2 \text{ мг}^{-1} \text{ Хл а ч}^{-1}$ , в то время как *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 и *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 составляла 129 и 122  $\text{мкмоль O}_2 \text{ мг}^{-1} \text{ Хл а ч}^{-1}$  соответственно. Для *S. gerasimenkoe* IPPAS B-353 скорость выделения кислорода была равна  $94 \text{ мкмоль O}_2 \text{ мг}^{-1} \text{ Хл а ч}^{-1}$  (Bozieva et al., 2023).

Полученные данные свидетельствуют о высоком фотосинтетическом потенциале клеток, что является показателем продуктивности культур и оказывает ключевое влияние на скорость накопления биомассы.



**Рисунок 11.** Кинетика выделения кислорода (1 – *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT; 2 – *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213; 3 – *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200; 4 – *S. gerasimenkoae* IPPAS B-353). Оптимальный pH обозначен зеленым цветом (Bozieva et al., 2023).

Цианобактерии могут использовать ионы гидрокарбоната в качестве источника  $\text{CO}_2$  (Судьина и др., 1978) и создавать большие концентрации углерода в клетке, благодаря наличию углерод-концентрирующего механизма (ССМ) (Кокшарова, 2008; Ogawa, Kaplan, 2003). За счет ССМ цианобактерии могут фотосинтезировать эффективнее чем  $\text{C}_3$  – и  $\text{C}_4$  – растения (Пронина, Куприянова, 2021).  $\text{CO}_2$ -концентрирующий механизм, дает возможность получать и концентрировать неорганический углерод из внеклеточной среды (Badger, Price, 2003; Пронина, Куприянова, 2021). Цианобактерии могут использовать  $\text{HCO}_3^-$  в

качестве источника углерода, превращая его в  $\text{CO}_2$  с помощью фермента карбоангидразы. Доступность неорганического углерода является ключевым фактором, который необходимо учитывать при организации культивирования цианобактерий при очень щелочном pH, поскольку при этих значениях pH неорганический углерод в основном присутствует в виде карбоната (Toulouprakís et al., 2016). Выбор предпочтительного транспорта  $\text{CO}_2$  или  $\text{HCO}_3^-$  зависит от формы экзогенного соединения неорганического углерода, связанной со значением pH. Во внешней среде: при щелочном pH превалирует  $\text{HCO}_3^-$ , а при кислых и нейтральных pH –  $\text{CO}_2$  (Пронина, Куприянова, 2021).

### **3.5 Водород-продуцирующая активность цианобактерий**

В зависимости от источников энергии и доноров электронов, используемых микроорганизмами, существуют три пути выделения  $\text{H}_2$ : светозависимое выделение  $\text{H}_2$  без выделения кислорода, светозависимое выделение  $\text{H}_2$  и кислорода, темновое анаэробное выделение  $\text{H}_2$  (Цыганков, 2006).

#### **3.5.1 Влияние DCMU и DBMIB на скорость выделения водорода**

Для определения способности выделять водород, штаммы цианобактерий были выращены в лабораторной системе интенсивного культивирования и собраны в фазе активного роста для подготовки к выделению водорода. Культуры, подготовленные к выделению водорода, инкубировались в темновых и световых условиях с добавлением DCMU или DBMIB.

DCMU является одним из наиболее широко используемых ингибиторов переноса электронов, поскольку структура его молекулы наиболее похожа на структуру восстановленного пластохинона. Это объясняет связь этих молекул с центром, связывающим хинон, в реакционном центре ФСII. Применение DCMU было направлено на подавление активности ФСII и поддержание анаэробных условий, благоприятных для производства молекулярного водорода. Таким образом, DCMU, действуя как аналог хинона, связывается с  $Q_B$  и блокирует перенос электронов от  $Q_A$  (Sadvakasova et al., 2020).

При инкубировании культур в темновых условиях с добавлением диурона, водород был детектирован в газовой фазе культур *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT (контроль) и *S. gerasimenkoae* IPPAS B-353 (Рисунок 12А). Для культуры *S. gerasimenkoae* IPPAS B-353 максимальное значение скорости выделения водорода было  $0.45 \text{ мкмоль } \text{H}_2 \text{ (мг Хл а ч)}^{-1}$  в первые 24 часа темновой инкубации в присутствии 10 мкМ DCMU, в последующие дни скорость выделения водорода снижалась. Контрольный штамм *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT генерировал водород с максимальной скоростью равной  $0.72 \text{ мкмоль } \text{H}_2 \text{ (мг Хл а ч)}^{-1}$  в первые 24 часа инкубации в темноте в присутствии 20 мкМ DCMU, далее скорость была ниже (Bozieva et al., 2023). Полученные значения скорости выделения  $\text{H}_2$  для контрольного штамма согласуются с данными, имеющимися в литературе (Chongsuksantikul et al., 2014).

DCMU добавляли приблизительно за 1 час до переноса клеток в темноту для поддержания анаэробных условий в световой период после замещения газовой фазы аргоном, это положительно влияло на скорость выделения водорода. Кроме того, увеличение скорости выделения водорода в данных условиях может свидетельствовать о возможном учащении частоты дыхания под действием DCMU, которое ведет к уменьшению концентрации кислорода в газовой фазе и одновременно к повышению активности ферментов, вовлеченных в метаболизм водорода.

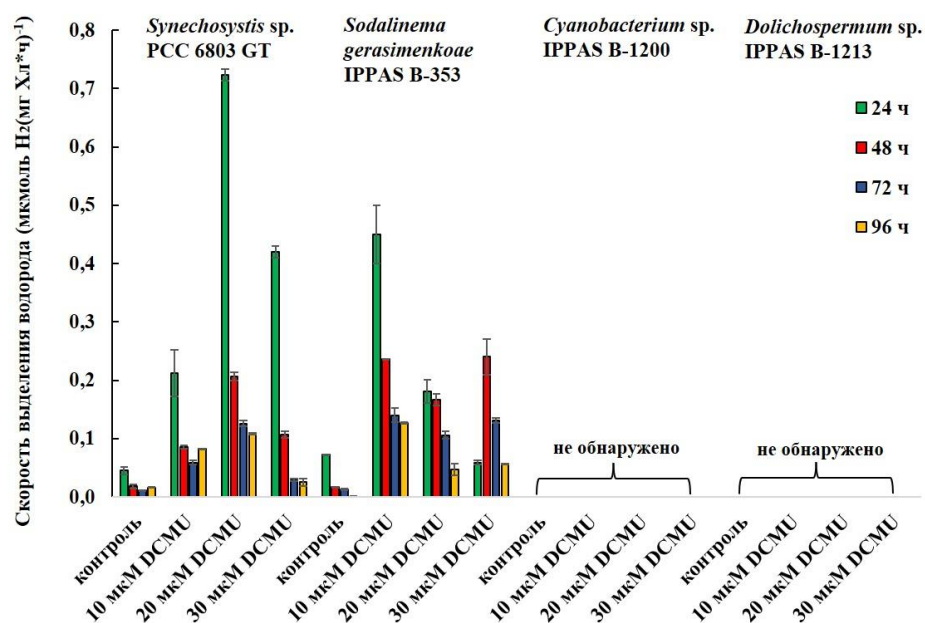
Было определено, что наиболее благоприятными концентрациями DCMU для эффективного выделения водорода штаммами *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT и *S. gerasimenkoae* IPPAS B-353 являлись 20 и 10 мкМ, соответственно. *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 и *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 в темновых условиях не генерировали детектируемых значений водорода (Bozieva et al., 2023).

Цианобактерии способны выделять водород в анаэробных условиях в темноте при ферментации как экзогенных, так и накопленных в процессе фотосинтеза сахаров (Schutz et al., 2004). Интерпретируя результаты, можно предположить, что уровень запаса гликогена и активность гидрогеназы в клетках после 24-часовой инкубации в темноте были достаточными для выработки  $\text{H}_2$ .



Далее была исследована способность цианобактерий генерировать водород в световых условиях (Рисунок 12Б). Освещение играет важную роль в процессе выделения  $H_2$ , поскольку служит источником энергии для прямого и непрямого биофотоллиза.

А



Б

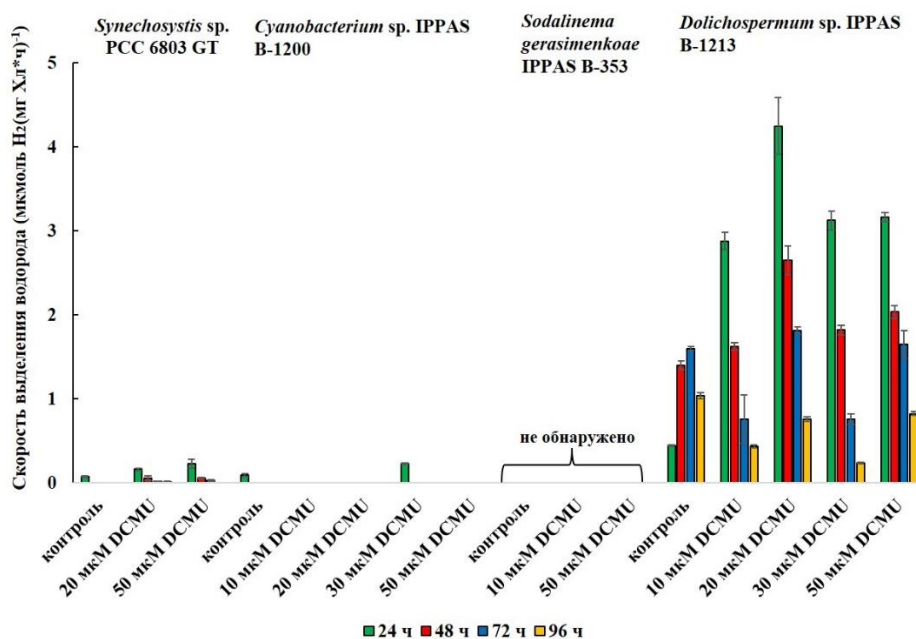


Рисунок 12. Влияние DCMU на скорость выделения водорода (А – темновые условия, Б – световые условия) (Bozieva et al., 2023).

После замещения газовой фазы аргоном, культуры были инкубированы в условиях искусственного освещения с добавлением DCMU в концентрациях 10, 20, 30 или 50 мкМ. Для культур *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT и *S. gerasimenkoe* IPPAS B-353 использовали, ранее определенные, оптимальные концентрации DCMU (20 и 10 мкМ, соответственно) и 50 мкМ DCMU. Для *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 и *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 все перечисленные выше варианты. В этих условиях водород удалось получить детектируемые значения водорода у культур *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT, *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 и *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 (Рисунок 12Б) (Bozieva et al., 2023).

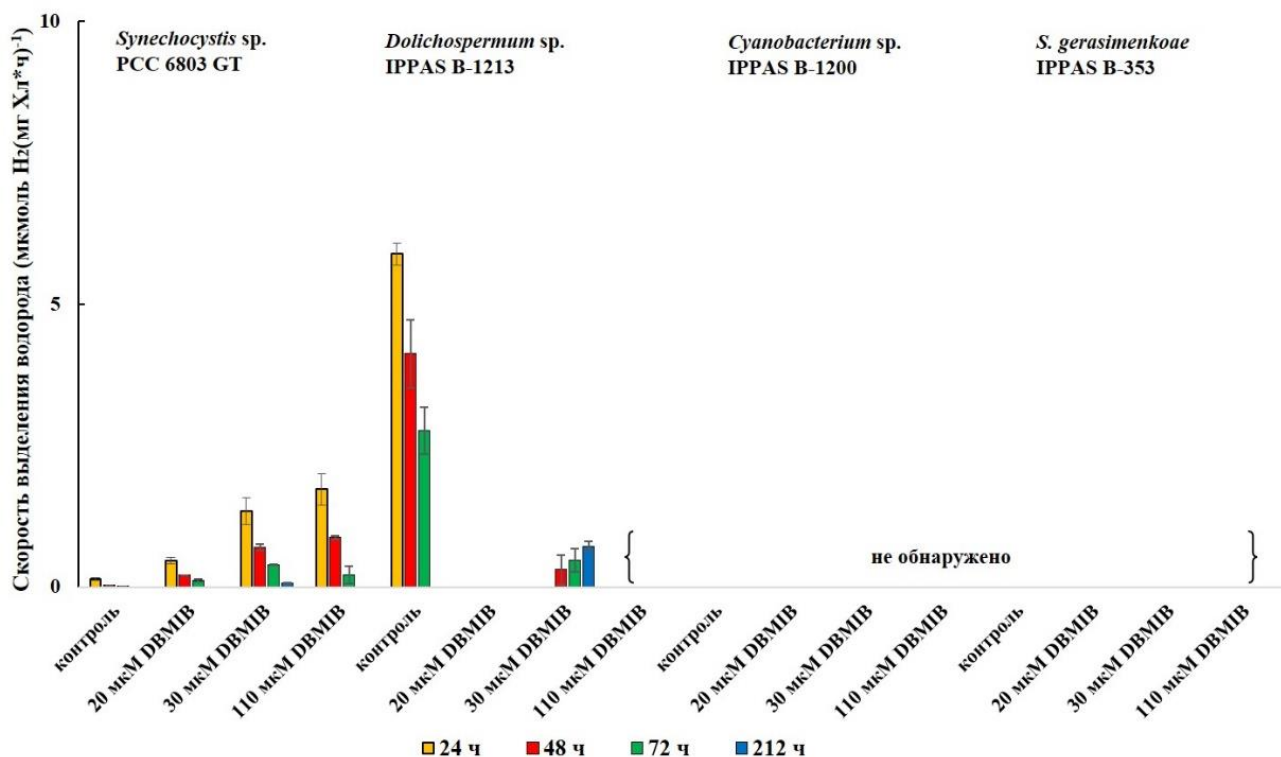
Максимальная скорость выделения водорода у штамма *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 была 4.24 мкмоль  $H_2$  (мг Хл а ч)<sup>-1</sup> в образцах с 20 мкМ DCMU после 24 часов инкубирования в условиях искусственного освещения (Рисунок 12Б). В присутствии DCMU, независимо от концентрации раствора, наблюдалось скачкообразное увеличение скорости выделения  $H_2$ , достигающее максимума через 24 часа, далее регистрировали постепенное замедление процесса. 20 мкМ DCMU, для *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213, выбрана как оптимальная концентрация ингибитора фотосинтетической активности, которая эффективно блокирует выделение кислорода и способствует активной работе водородных ферментов. В культуре, инкубированной без добавления диурина наблюдался рост скорости выделения  $H_2$ , достигающий максимума на 3 сутки, в последующие сутки скорость процесса снижалась. Скорость выделения водорода *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 была равна 0.22 мкмоль  $H_2$  (мг Хл а ч)<sup>-1</sup> в образцах с 30 мкМ DCMU, в остальных экспериментальных вариантах выделения водорода не наблюдалось (Bozieva et al., 2023).

Скорость выделения водорода у штамма *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 (4.24 мкмоль  $H_2$  (мг Хл а ч)<sup>-1</sup>) на порядок превышала максимальную скорость выделения  $H_2$  контрольного штамма 0.16 мкмоль  $H_2$  (мг Хл а ч)<sup>-1</sup>, в условиях освещения. Для *S. gerasimenkoe* IPPAS B-353 в данных условиях не было получено детектируемых значений водорода (Bozieva et al., 2023).

Важным этапом в подготовке культур к производству водорода является барботаж инертным газом для вытеснения кислорода из экспериментальных образцов (Бозиева и др., 2022). Параметры данного этапа были оптимизированы в ходе серии экспериментов. Были определены подходящие условия для барботирования культур аргоном: средняя интенсивность подачи газа и продолжительность барботирования в течение 30 минут, что позволяет создать анаэробные условия. При барботировании культур в течение 10, 15, 20 минут на хроматограммах были обнаружены пики  $O_2$  и  $N_2$ , которые оказывают ингибирующее действие на водородный метаболизм. В связи с этим, во всех дальнейших экспериментах время барботирования составляло 30 минут (Bozieva et al., 2023).

Следующий этап работы был посвящен исследованию влияния DBMIB на скорость выделения водорода. Полярографическим методом было определено, что для того, чтобы блокировать выделение кислорода необходимо использовать большие концентрации DBMIB, чем диурана. Были выбраны концентрации 20, 30 и 110 мкМ. В присутствии ингибитора DBMIB водород детектирован в газовых фазах культур *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 и *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT (Рисунок 13). *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 и *Sodalinema gerasimenkoae* IPPAS B-353 на свету по-прежнему не генерировали водород. У *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT наблюдалось ускорение выделения водорода, прямо пропорциональное повышению концентрации добавленного ингибитора (Рисунок 13). Скорость выделения водорода была максимальной в первые 24 часа, далее наблюдалась такая же картина, что и при добавлении DCMU: DBMIB ускорял реакцию выделения водорода на короткий срок, на 2-е сутки скорость выделения водорода заметно снижалась и позднее прекращалась вовсе (Bozieva et al., in press).

У культуры *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 контрольный вариант был наиболее активен, а в образцах с DBMIB не было обнаружено положительной динамики, что объясняется тем, что производство водорода гетероцистными цианобактериями зависит от восстановительных эквивалентов, получаемых из вегетативных клеток, которые не могут быть получены в присутствии DBMIB.



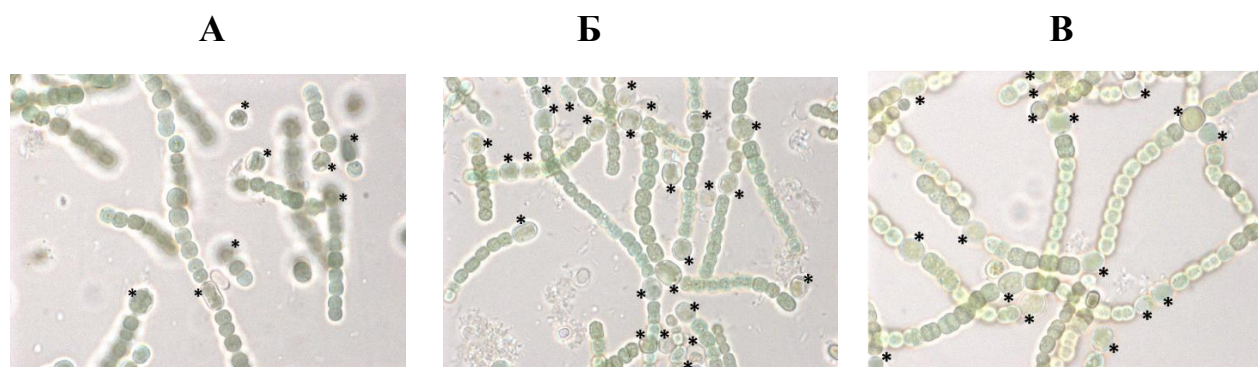
**Рисунок 13.** Влияние DBMIB на скорость выделения водорода (Bozieva et al., in press).

Резюмируя вышеизложенное, можно утверждать, что DBMIB и DCMU, ингибируя фотосинтез, приводят к ускорению процесса выделения водорода, однако это явление носит кратковременный характер. Вследствие того, что продолжительность процесса при использовании ингибиторов короткая, данный метод не следует рекомендовать для устойчивого получения водорода.

### 3.5.2 Влияние частоты образования гетероцист на скорость выделения водорода

Поскольку производство водорода у гетероцистных азотфиксирующих цианобактерий происходит преимущественно в гетероцистах, за счет нитрогеназной активности, была исследована зависимость между частотой гетероцист и скоростью выделения водорода у культуры *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213.

Для этого микроскопически определяли количество гетероцист непосредственно перед анаэробной инкубацией и через 96 часов после инкубации в анаэробной среде, в условиях с добавлением 20 мкМ DCMU и без DCMU. В исходной культуре частота гетероцист составила  $11.4 \pm 2.1\%$ ; в культурах, инкубированных в анаэробных условиях этот показатель был значительно выше в обоих вариантах с DCMU ( $20.5 \pm 5.1\%$ ) и без добавления диурона ( $17.2 \pm 4.1\%$ ) (t-критерий,  $p < 0.01$ ) (Рисунок 14).



**Рисунок 14.** Микрофотографии *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 (А – исходная культура; Б – культура, инкубированная в анаэробных условиях 96 часов; В – культура, инкубированная в анаэробных условиях 96 часов с DCMU (\* - отмечены гетероцисты)) (Bozieva et al., 2023).

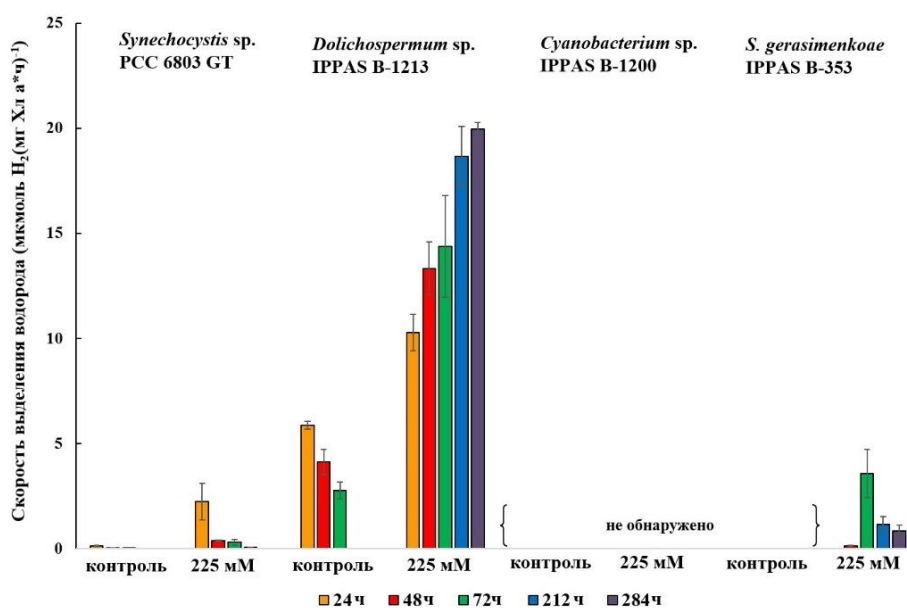
Существенной разницы между вариантами с/без DCMU обнаружено не было. Продувка аргоном способствовала удалению из газовой фазы азота, в связи с этим высокую частоту образования гетероцист в анаэробных образцах можно объяснить индукцией образования гетероцист в условиях низкой доступности  $N_2$ . Такая индукция ранее наблюдалась у одного из штаммов *Anabaena* (Silverman et al., 2019). Использование аргона увеличивает нитрогеназную активность и стимулирует образование гетероцист у цианобактерий (Dutta et al., 2005). Гетероцисты обычно образуются на нитях с частотой 1 гетероциста на 10-20 вегетативных клеток (Thiel, Pratte, 2001). Частоту образования гетероцист у *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213, полученную в данном исследовании, можно считать высокой, это является благоприятной характеристикой для продуцентов водорода (Khetkorn et al., 2013).

### 3.5.3 Влияние экзогенных источников органического углерода на скорость выделения водорода

Дальнейшая работа была направлена на изучение метаболизма водорода под действием включенных в среду экзогенных источников углерода (ЭИУ), способных донировать электроны водородным ферментам, что способствует увеличению скорости генерации водорода за счет повышения активности ферментов и обеспечения клеток дополнительными субстратами для метаболических реакций. В качестве ЭИУ были выбраны: глицерин, глюкоза и сахароза.

Для исследования действия глицерина на скорость выделения водорода культуры были выращены в ЛСИК и подготовлены как описано выше, после чего культуры инкубировались при температуре 32°C и интенсивности освещения 60 мкмоль фотонов м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup>.

Добавление глицерина привело к значительному повышению скорости и концентрации производимого водорода. В присутствии 225 мМ глицерина наблюдалось устойчивое производство водорода в течение продолжительного времени (Рисунок 15).



**Рисунок 15.** Скорость выделения водорода штаммами цианобактерий в присутствии 225 мМ глицерина (Bozieva et al., in press).

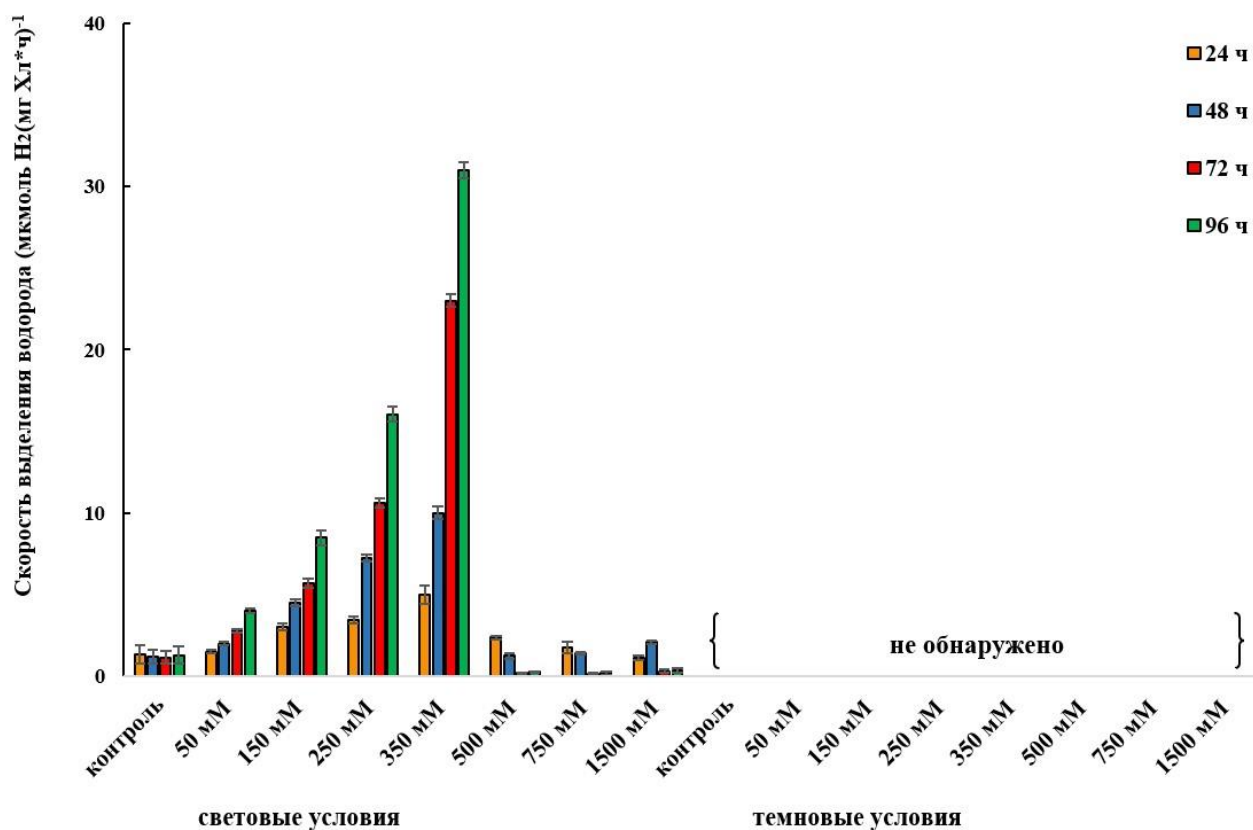
Начиная с первых суток инкубирования в световых условиях в присутствии глицерина, культуры *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT и *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 выделяли водород в два и более раза интенсивнее контрольных вариантов, причем в последующие сутки скорость выделения водорода не снижалась, а продолжала расти. Примечательно, что при добавлении глицерина *Sodalinema gerasimenkoae* IPPAS B-353 также производила водород, чего не наблюдалось ранее ни в одном из экспериментов при инкубировании на свету. Максимальная скорость выделения водорода данной культурой зафиксирована на 4 сутки (3.59 мкмоль H<sub>2</sub> (мг Хл а ч)<sup>-1</sup>). Хотя скорость производства не была столь высокой, но выделение водорода длилось до 24 суток (Bozieva et al., in press).

По скорости и продолжительности генерации водорода лидировал штамм *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 (Рисунок 15). Измерения проводились в течение 46 суток, весь охваченный период времени культура не прекращала выделять водород. Включение глицерина в среду оказало явный положительный эффект на скорость, стабильность и эффективность процесса. Добавление источника углерода, такого как глицерин обеспечивает большее количество восстановительных эквивалентов, что способствует повышению скорости генерации водорода. Наилучшие результаты получены для штамма *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 – постепенный рост скорости выделения H<sub>2</sub> от 10.2 до 31.5 мкмоль H<sub>2</sub> (мг Хл а ч)<sup>-1</sup>. В связи с этим следующие эксперименты были посвящены подробному изучению данной культуры (Bozieva et al., in press).

Было исследовано влияние различных концентраций глицерина (50-1500 мМ) на производство H<sub>2</sub> культурой *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213. В результате серии экспериментов был сделан вывод, что оптимальный диапазон концентраций глицерина для культуры *Dolichospermum* sp. составляет от 50 до 350 мМ (Рисунок 16), в этом диапазоне концентраций наблюдается активное выделение водорода (Bozieva et al., in press).

В условиях темновой инкубации с добавлением глицерина культура не производила H<sub>2</sub>. Это, объясняется, тем, что, помимо источника электронов,

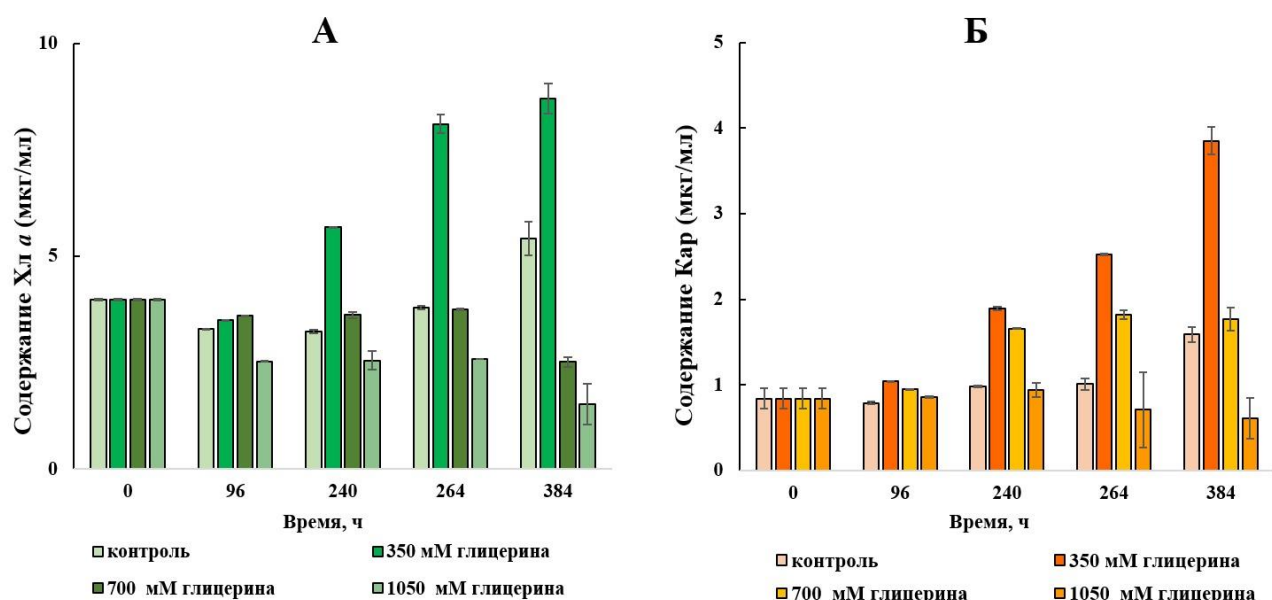
нитрогеназа нуждается в источнике энергии (АТФ), в качестве которого выступает свет.



**Рисунок 16.** Зависимость скорости выделения водорода *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 от концентрации глицерина (Bozieva et al., in press).

Увеличение концентрации глицерина до 500 мМ и более отрицательно сказывалось на общем состоянии культуры. Клетки цианобактерий начинали проявлять признаки деградации, проявляющиеся в потере яркого цвета, который характеризует их активное состояние (Рисунок 17).





**Рисунок 17.** Динамика содержания фотосинтетических пигментов (А – хлорофилл *a*, Б – каротиноиды) в клетках культуры *Dolichospermum* sp. IPPAS В-1213, инкубированной при постоянном освещении в присутствии различных концентраций глицерина.

Результаты, полученные для вариантов с глицерином, подчеркивают способность, характерную для некоторых цианобактерий, использовать в качестве источников углерода и электронов, органические молекулы (Stebegg et al., 2023). В процессе получения водорода добавление глицерина обеспечивает дополнительный источник восстановленных эквивалентов. В результате восстанавливается окислительно-восстановительный баланс, который сигнализирует об увеличении активности нитрогеназы для удовлетворения растущих потребностей клеток цианобактерий в азоте (Berman-Frank et al., 2001; Bandyopadhyay et al., 2010).

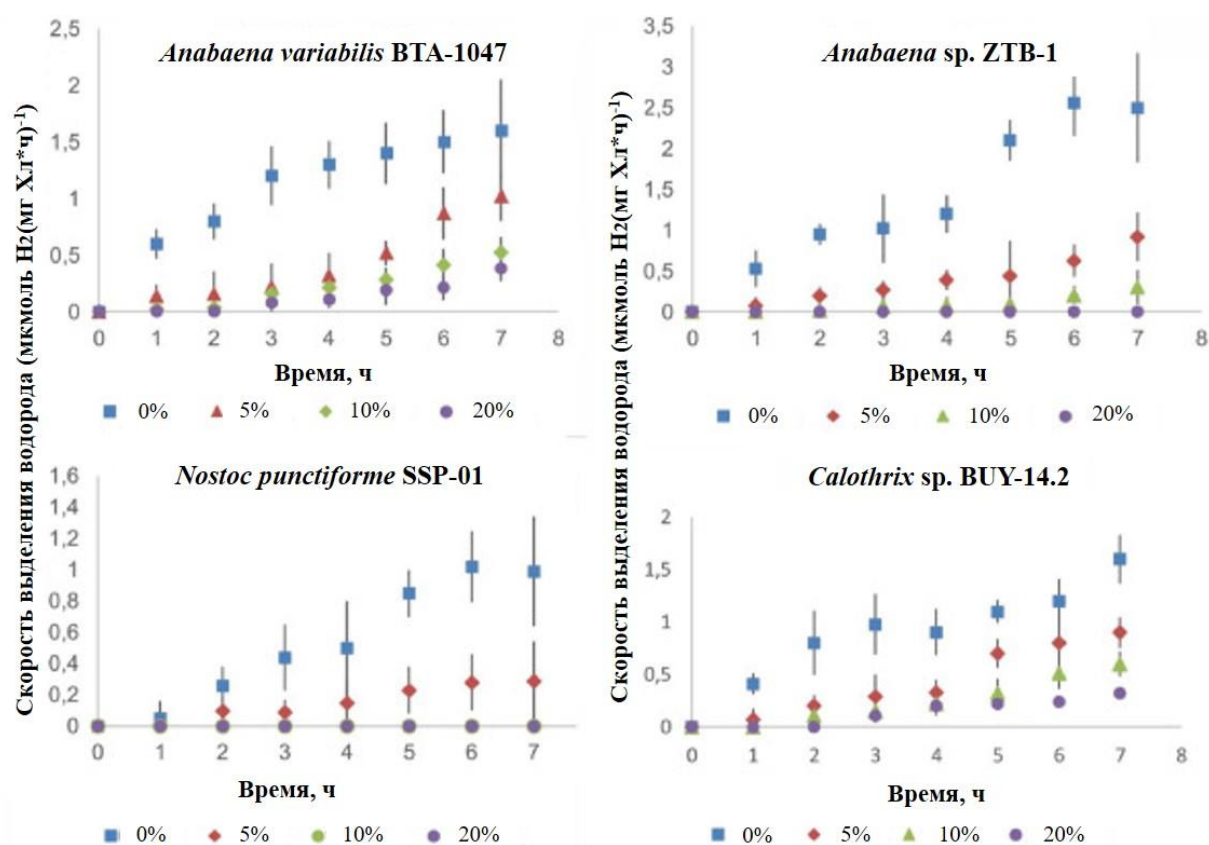
В наших исследованиях был использован очищенный глицерин; однако в литературе имеются сведения об использовании неочищенного глицерина, полученного из биодизельного топлива, что в дальнейшей перспективе может обеспечить доступность субстрата. Подобные эксперименты были проведены с

фототрофными микроорганизмами из других групп (Sabourin-Provost, Hallenbeck, 2009).

Гетероцистные цианобактерии имеют собственные механизмы защиты нитрогеназы от кислорода: пространственное разделение, осуществляемое за счет локализации нитрогеназы в гетероцистах, лишенных фотосистемы II; пониженная скорость диффузии  $O_2$  внутрь гетероцист за счет толстых клеточных стенок; повышенная скорость дыхания в самих гетероцистах (Tsygankov, 2007).

Соответственно эта группа цианобактерий характеризуется нитрогеназной активностью даже в аэробных условиях. Однако конечный выход водорода в зависимости от условий (анаэробных/аэробных) инкубирования может различаться, поскольку в аэробных условиях часть выделенного водорода расходуется в оксигенородной реакции вторично поглощаясь самой культурой. Доказательством этому служат результаты, полученные в экспериментах, где на хроматограммах были обнаружены пики кислорода. В подобных образцах водород детектировали в первые несколько суток в дальнейшем концентрация выделенного водорода начинала снижаться, а через несколько суток достигала очень низких значений, которые уже не удавалось детектировать (Bozieva et al., in press).

Отрицательное влияние  $N_2$  в свободном пространстве на выделение  $H_2$  у азотфиксирующих штаммов цианобактерий было показано нами и на культурах *Anabaena variabilis* ВТА-1047, *Anabaena* sp. ZTB-1, *Nostoc punctiforme* SSP-01, *Calothrix* sp. ВУУ-14.2 (Рисунок 18) (Kamshybayeva et al., 2023). У каждого из исследованных штаммов цианобактерий воздействие газа  $N_2$  вызывало быстрое снижение скорости образования  $H_2$ . Уровень продукции  $H_2$  был высоким у всех штаммов в отсутствии молекулярного азота. Наибольшая скорость выделения водорода наблюдалась у штамма *Anabaena* sp. ZTB-1 в образцах, лишенных молекулярного азота через 6 часов инкубации, и была равна  $2.56 \text{ мкмоль } H_2 \text{ (мг Хл } a \text{ ч)}^{-1}$ .



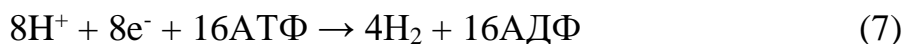
**Рисунок 18.** Выделение водорода азотфиксирующими цианобактериями в присутствии различных концентраций молекулярного азота (Kamshybayeva et al., 2023).

Следовательно, для подобных случаев справедливо утверждение, что у азотфиксирующих гетероцистных цианобактерий в аэробных условиях полученное значение концентрации  $H_2$  – это разница между выделенным водородом за счет действия нитрогеназы и поглощенным  $H_2$  за счет активности *HupSL*-гидрогеназы. Поскольку гидрогеназа участвует в поглощении водорода только в присутствии  $O_2$  (Tsygankov, 2007).

Следующим ключевым моментом является то, что для процесса азотфиксации, катализируемого нитрогеназой необходим дефицит связанных форм азота в среде. Нитрогеназа катализирует реакцию фиксации  $N_2$ , побочным продуктом которой является водород, в качестве основного продукта реакции образуется аммиак, который оказывает ингибирующее действие на нитрогеназу (Ghosh et al., 2016), реакция описывается следующим уравнением:



Однако, в условиях полного отсутствия азота скорость генерации водорода существенно выше. В наших экспериментах среда культивирования была лишена азота, в газовой фазе молекулярный азот был замещен аргоном. В таких случаях нитрогеназа функционирует как АТФ-зависимая гидрогеназа, катализируя восстановление протонов до  $\text{H}_2$ , но не фиксируя при этом азот (Skizim et al., 2012; Tsygankov, 2007; Bothe et al., 2010; McKinlay, Harwood, 2010; Seefeldt et al., 2012):

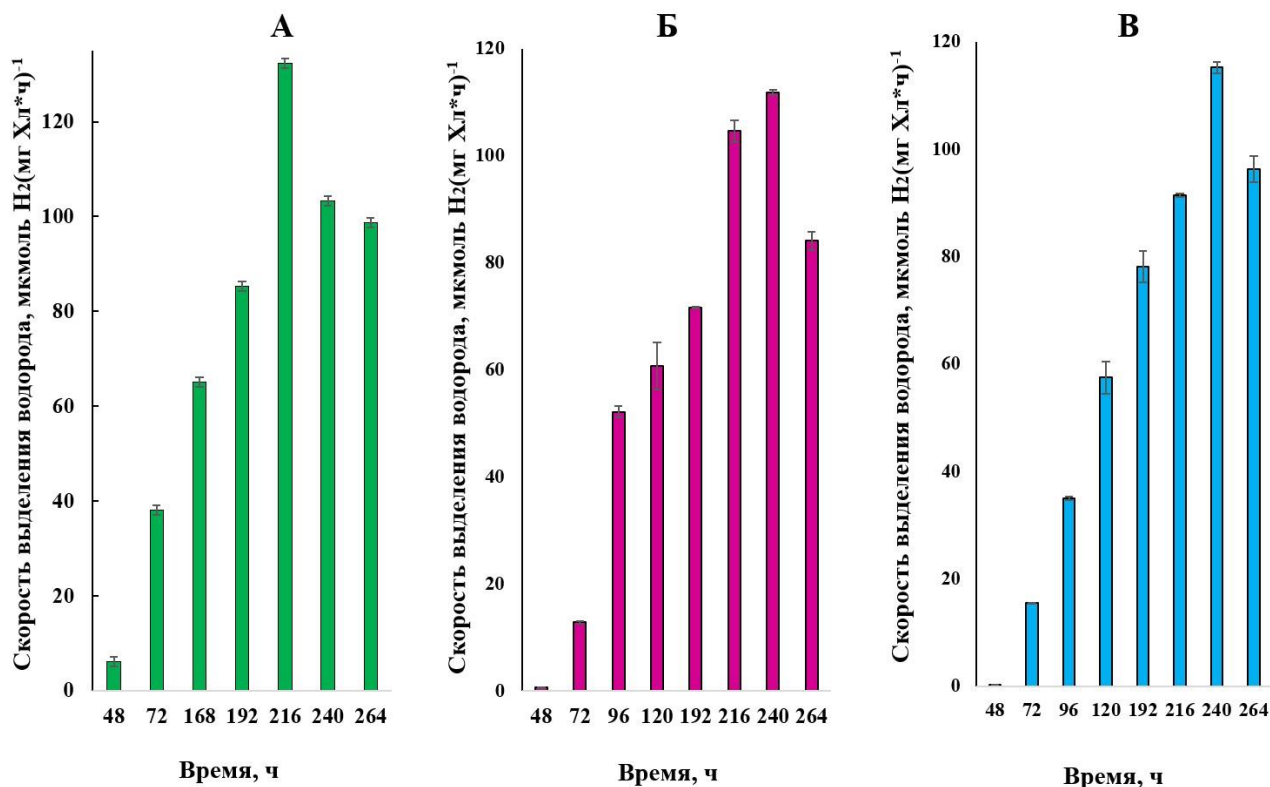


В ходе реакции выделяется 4 молекулы водорода.

Таким образом для поддержания высокой нитрогеназной активности и получения больших объемов водорода необходимо из образцов удалять  $\text{N}_2$  и  $\text{O}_2$ .

Можно наблюдать, что скорость выработки водорода постепенно снижается при увеличении плотности клеток, в то время как накопление водорода, собранного в конце периода инкубации, увеличивается с увеличением плотности клеток. Но стоит учитывать, что высокая плотность культуры может приводить к самозатенению клеток, в результате часть культуры будет получать меньше световой энергии.

Следующим этапом работы было проведение сравнительного анализа влияния глицерина, глюкозы и сахарозы в равных концентрациях (350 мМ) на водородный метаболизм культуры *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 (Рисунок 19).



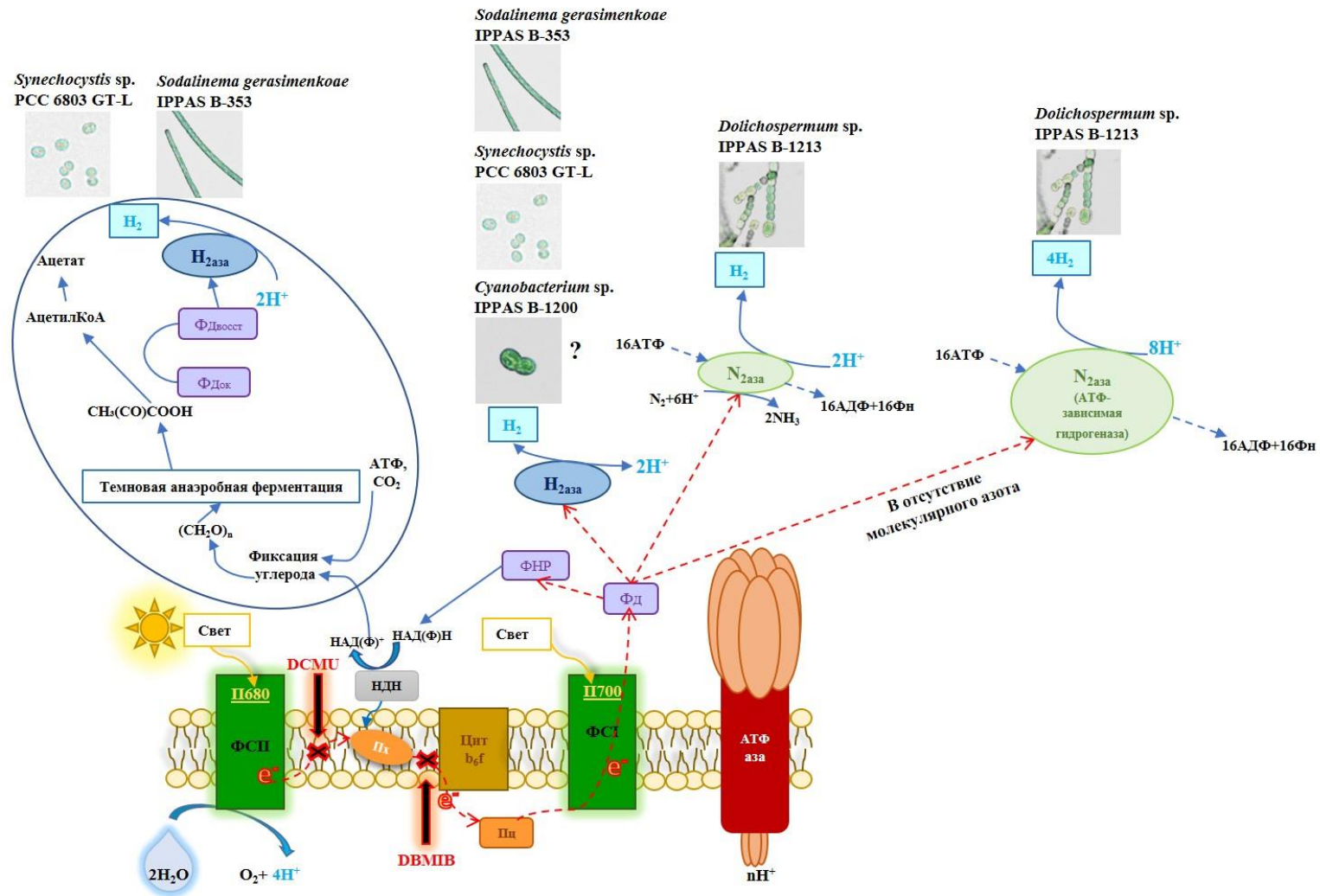
**Рисунок 19.** Динамика скорости выделения водорода штаммом *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 в присутствии источников органического углерода в концентрации 350 мМ (А – глицерин, Б – глюкоза, В – сахароза) (Bozieva et al., in press).

Были получены следующие результаты: при добавлении глицерина максимальная скорость выделения водорода была равна 132.3 мкмоль Н<sub>2</sub> (мг Хл а ч)<sup>-1</sup> (9 сутки), концентрация водорода в пробах достигала до 67.1%, в присутствии глюкозы водород выделялся с максимальной скоростью 111.8 мкмоль Н<sub>2</sub> (мг Хл а ч)<sup>-1</sup> (10 сутки), концентрация водорода в пробе – 20.6%, при добавлении сахарозы скорость была равна 115.25 мкмоль Н<sub>2</sub> (мг Хл а ч)<sup>-1</sup> (10 сутки), а концентрация водорода – 21.2% (Bozieva et al., in press).

Добавление глицерина, глюкозы, сахарозы в качестве источников электронов существенно увеличивало генерацию водорода, но их использование может привести к увеличению себестоимости производства. Поскольку себестоимость производства зависит от типа доступного сырья, в конечном итоге это может создать экономический барьер при крупномасштабном производстве биоводорода.

Решением данной проблемы может стать использование неочищенного глицерина (НГ), получаемого в качестве побочного продукта при производстве биодизельного топлива (Mitrea et al., 2017). Согласно статистическим данным, ежегодно образуется большие количества глицериновой фазы (не менее 200-300 тонн и до сотен тысяч тонн в год), в зависимости от отрасли производства биодизельного топлива в каждой стране. Это приводит к экологическим проблемам, связанным с обращением с этим побочным продуктом (Drozdzyńska et al., 2011; Hejna et al., 2016). Огромное количество глицерина, получаемого в результате производства биодизельного топлива, делает использование НГ в качестве источника углерода более дешевым по сравнению с глюкозой и сахарозой, которые, более того, напрямую используются в производстве пищевых продуктов (Garlapati et al., 2015; Kong et al., 2016).

На основе проведенных исследований предложена схема, отражающая метаболитические пути выделения водорода у исследованных штаммов цианобактерий (Рисунок 20).



**Рисунок 20.** Схема – пути выделения водорода у цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT, *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213, *Sodalinema gerasimenkoae* IPPAS B-353 (Kossalbayev et al., 2022; Bozieva et al., 2023).

Исходя из вышеизложенного, можно утверждать, что культура *Sodalinema gerasimenkoae* IPPAS B-353 способна генерировать водород в темновых анаэробных условиях и в условиях искусственного освещения в присутствии экзогенного источника электронов (водородная активность); гетероцистный азотфиксирующий штамм *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 производит водород в условиях искусственного освещения (нитрогенная активность). Культура *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 выделяет водород в световых условиях, процесс катализирует гидрогеназа. Контрольный штамм *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT производит водород и в темноте, и на свету за счет активности фермента двунаправленной гидрогеназы (Рисунок 19) (Bozieva et al., 2023).

#### **3.5.4 Обратный переход от производства водорода к нормальным физиологическим функциям**

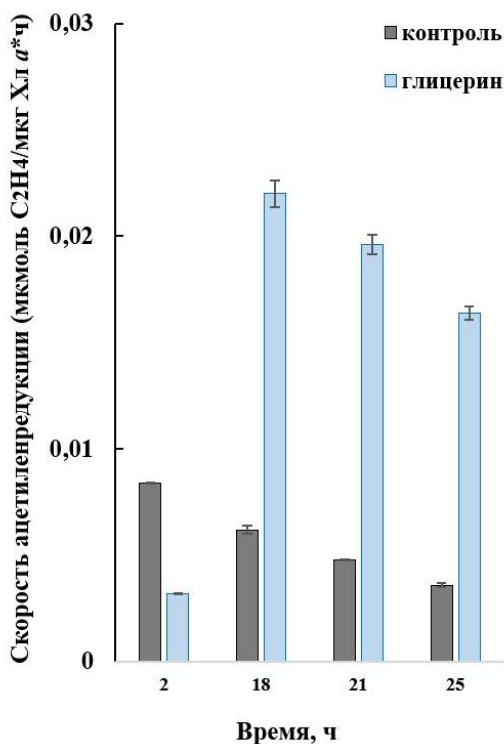
В ходе этого исследования был изучен процесс возвращения культуры, активно продуцирующей водород, к своим нормальным физиологическим функциям. Для достижения этой цели культура *Dolichospermum* sp., которая продуцировала водород в течение 18 дней, была пересажена на свежую среду BG-11-N. Далее через три дня культивирования в аэробных условиях была измерена скорость выделения кислорода. Полученные данные показали, что культура, вырабатывающая водород в анаэробных условиях, может продолжать расти и осуществлять фотосинтез при переходе к нормальным аэробным условиям. Следовательно, активное выделение водорода культуры не вызывает необратимых изменений в клеточном метаболизме и не приводит к потере жизнеспособности, а оказывает лишь некоторое влияние на состояние культуры. В частности, скорость выделения кислорода у культуры, возвращенной к обычным условиям культивирования была равна  $141.2 \text{ мкмоль O}_2 \text{ мг}^{-1} \text{ Хл а ч}^{-1}$  по сравнению с  $235.7 \text{ мкмоль O}_2 \text{ мг}^{-1} \text{ Хл а ч}^{-1}$  для контрольной культуры (Bozieva et al., in press).



### 3.6 Скорость ацетиленредукции

О способности микроорганизмов фиксировать азот и синтезировать нитрогеназу свидетельствует возможность их роста на питательных средах, не содержащих связанные формы азота (Кондратьева, Гоготов, 1981). Основными методами определения азотфиксации являются: культивирование цианобактерий на безазотистых средах с последующим учетом накопления азота; ацетиленовый метод и изотопный анализ с  $^{15}\text{N}_2$  в качестве индикатора. Восстановление ацетилена ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ) до этилена ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ) катализирует нитрогеназа (Судьина и др., 1978).

Скорость ацетиленредукции измеряли в пробах с 350 мМ глицерина и в контрольных образцах культуры *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 (Рисунок 21).



**Рисунок 21.** Скорость ацетиленредукции штамма *Dolichospermum* sp. IPPAS B – 1213

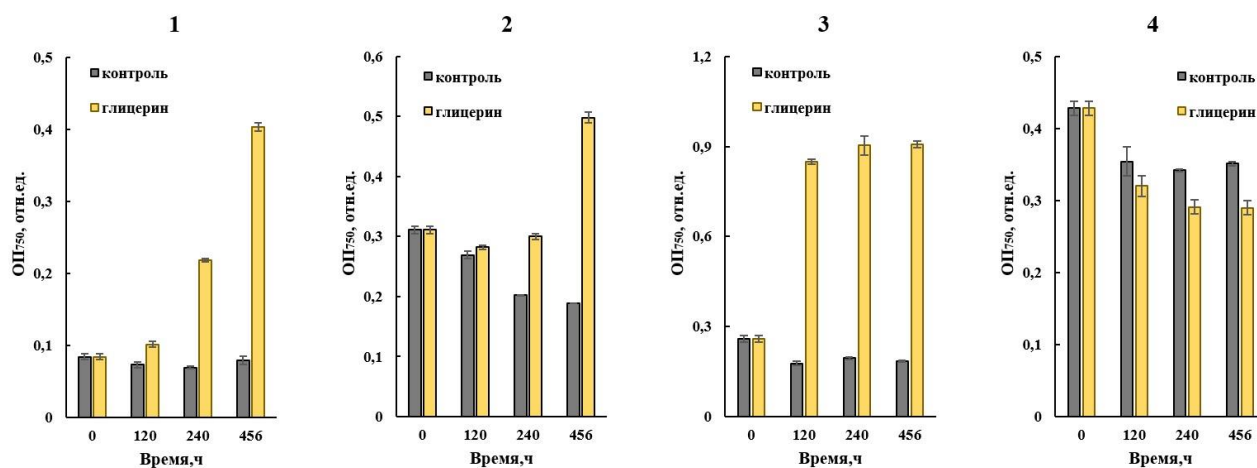
Культура обладает активной нитрогеназой, контрольные образцы восстанавливали ацетилен до этилена на свету, добавление глицерина стимулировало увеличение скорости данного процесса в два и более раза (0.22

мкмоль  $C_2H_4$   $мкг^{-1}$  Хл  $ч^{-1}$  через 18 часов) по сравнению с контрольными образцами (0.062 мкмоль  $C_2H_4$   $мкг^{-1}$  Хл  $ч^{-1}$  через 18 часов). Эти результаты стали подтверждают то, что глицерин в качестве экзогенного источника углерода способствует повышению активности нитрогеназы.

### 3.7 Хемоорганогетеротрофный рост

В настоящее время известно множество представителей различных родов цианобактерий, способных расти хемоорганогетеротрофно (Гусев, Никитина, 1979). Наиболее изучены среди них *Nostoc punctiforme* (Harder, 1917), *Phormidium foveolarum*, *Plectonema notatum*, *Nostoc muscorum* (Allison et al., 1937), *Anabaenopsis circularis* (Watanabe, Yamamoto, 1967) и др.

Для выяснения способности исследуемых культур расти в темноте за счет органических соединений контрольные образцы и образцы с добавлением 350 мМ глицерина выращивались в темноте при оптимальных температурах культивирования (Рисунок 22).



**Рисунок 22.** Кривые роста культур, выращенных хемоорганогетеротрофно (1 – *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT; 2 – *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213; 3 – *S. gerasimenkoae* IPPAS B-353; 4 – *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200)

При использовании глицерина в темноте наблюдался медленный рост культур *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT, *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 и *S. gerasimenkoae* IPPAS B-353, в контрольных образцах рост прекращался. Культура *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 переставала расти в темноте независимо от присутствия источника органического углерода (Рисунок 22).

Клетки культур *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 и *Synechocystis* sp. PCC 6803 GT имели светло зеленую окраску, что свидетельствует о том, что синтез пигментов в темноте ингибируется не полностью, это описывается в работах и других исследователей (Гусев, Никитина, 1978)

## Заключение

В ходе выполненного исследования были получены новые данные о способности ранее неизученных штаммов цианобактерий *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213, *Sodalinema gerasimenkoae* IPPAS B-353 к генерации молекулярного водорода. Проведен анализ влияния различных факторов, таких как состав газовой фазы, ингибиторы фотосинтетической активности и экзогенные источники органического углерода, на водород-продуцирующую активность штаммов. Выявлены оптимальные условия для повышения эффективности водородного метаболизма цианобактерий.

Выявлено, что DBMIB и DCMU, ингибируя фотосинтез, приводят к ускорению процесса выделения водорода, однако это явление носит кратковременный характер. Вследствие этого, по нашим оценкам, данный метод не подходит для устойчивого получения водорода.

Добавление экзогенных источников органического углерода оказывает существенное положительное действие на водородный метаболизм. Скорость выделения водорода была повышена в 30 и более раз, продолжительность процесса пролонгирована до 1000 и более часов. Наиболее эффективное выделение водорода наблюдалось у гетероцистного штамма *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 при добавлении экзогенных источников органического углерода таких как глицерин, глюкоза, сахароза в диапазоне концентраций 50-350 мМ. В их присутствии культура *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 демонстрировала устойчивое длительное стабильное выделение водорода, опосредованное активностью нитрогеназы.

В результате работы, *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 выбран как наиболее перспективный штамм с высокой водород-продуцирующей активностью, а глицерин как наиболее оптимальный источник органического углерода.

## Выводы

1) Ранее неизученные штаммы цианобактерий *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213, *Sodalinema gerasimenkoae* IPPAS B-353, способны к быстрому росту и накоплению биомассы в широком диапазоне температур, а также обладают высоким фотосинтетическим потенциалом;

2) Впервые проведенное исследование влияния внешних факторов на выделение водорода цианобактериями *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213 и *Sodalinema gerasimenkoae* IPPAS B-353 выявило: ингибиторы фотосинтетической активности DCMU и DBMIB приводят к кратковременному ускорению процесса выделения  $H_2$ , включение в среды экзогенных источников углерода (глицерин, глюкоза, сахароза) повышает скорость выделения  $H_2$  в 30 и более раз, а также пролонгирует продолжительность процесса до 46 суток;

3) Впервые изученное действие нескольких факторов на выделение водорода гетероцистными цианобактериями, на примере *Dolichospermum* sp. IPPAS B-1213, показало, что комбинация условий дефицита связанных форм азота в среде культивирования, полного замещения  $N_2$  и  $O_2$  инертным газом, включения источника органического углерода и освещения приводит к длительному выделению водорода у данной цианобактерии за счет стимуляции образования гетероцист, синтеза нитрогеназы, перехода нитрогеназы к функции АТФ-зависимой гидрогеназы, блокирования рециклизации выделенного водорода, а также за счет обеспечения нитрогеназы экзогенным донором электронов и АТФ. Азотфиксирующие гетероцистные цианобактерии способны выделять  $H_2$  за счет нитрогеназной активности, как в анаэробных, так и в аэробных условиях, причем в аэробных условиях и полном отсутствии молекулярного азота эффективность процесса выделения  $H_2$  существенно выше.

4) Разработанная на основе полученных данных схема, демонстрирует метаболические пути выделения водорода у исследованных штаммов цианобактерий. Выделение водорода у *Sodalinema gerasimenkoae* IPPAS B-353

опосредовано действием обратимой гидрогеназы и может осуществляться двумя путями: прямым или непрямым биофотолизом. Для *Dolichospermum* sp. IPPAS В-1213 характерен нитрогеназо-зависимый (нитрогеназа/нитрогеназа, действующая как АТФ-зависимая гидрогеназа) путь выделения  $H_2$  в ходе прямого биофотолиза. Выделения  $H_2$  у *Cyanobacterium* sp. IPPAS В-1200 катализирует гидрогеназа.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи в рецензируемых журналах*

1. Kossalbayev B.D., Kakimova A.B., Bolatkhan K., Zayadan B.K., Sandybayeva S.K., **Bozieva A.M.**, Sadvakasova A.K., Alwasel S., Allakhverdiev S.I. (2022). Biohydrogen production by novel cyanobacterial strains isolated from rice paddies in Kazakhstan. *International Journal of Hydrogen Energy* 47(37), 16440-16453.

2. Kamshybayeva G.K., Kossalbayev B.D., Sadvakasova A.K., Zayadan B.K., **Bozieva A.M.**, Dunikov D., Alwasel S., Allakhverdiev S.I. (2022). Strategies and economic feasibilities in cyanobacterial hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 47(69), 29661-29684.

3. **Бозиева А.М.**, Заднепровская Е.В., Аллахвердиев С.И. (2022) Получение биоводорода: последние достижения и современное состояние. *Глобальная энергия* 28(4), С. 59-78.

4. **Bozieva A.M.**, Khasimov M.Kh., Voloshin R.A., Sinetova M.A., Kupriyanova E.V., Zharmukhamedov S.K., Dunikov D.O., Tsygankov A.A., Tomo T., Allakhverdiev S.I. (2023). New cyanobacterial strains for biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* 48(21), 7569-7581.

5. Kamshybayeva G.K., Kossalbayev B.D., Sadvakasova A.K., Bauenova M.O., Zayadan B.K., **Bozieva A.M.**, Alharby H.F., Tomo T., Allakhverdiev S.I. (2023). Screening and optimization of hydrogen production by newly isolated nitrogen-fixing cyanobacterial strains. *International Journal of Hydrogen Energy* 48(44), 16649-16662.

6. Dunikov D.O., Blinov D.V., **Bozieva A.M.**, Kazakov A.N., Krapivina A.A., Romanov I.A., Zadneprovskaya E.V., Allakhverdiev S.I. (2024). Permeability of a deformable metal hydride bed during hydrogen absorption. *International Journal of Hydrogen Energy* 51, 375-387.

### *Публикации в сборниках конференций*

1. **Бозиева А.М.**, Синетова М.А., Куприянова Е.В., Габриелян Д.А., Волошин Р.А., Стариков А.Ю., Жармухамедов С.К., Аллахвердиев С.И. (2021) Исследование

физиологических особенностей малоизученных штаммов цианобактерий - потенциальных продуцентов фотоводорода. В сб: Тезисы докладов 74-й Всероссийской с международным участием школы-конференции «Биосистемы: организация, поведение, управление». Нижний Новгород, Россия, С. 36.

2. **Бозиева А.М.**, Синетова М.А., Куприянова Е.В., Жармухамедов С.К., Аллахвердиев С.И. (2021) Поиск фототрофных микроорганизмов, перспективных для получения биотоплива. В сб: Материалы IX Съезда Российского фотобиологического общества, Шепси, Россия, с. 140

3. **Бозиева А.М.**, Синетова М.А., Куприянова Е.В., Жармухамедов С.К., Аллахвердиев С.И. (2021) Перспектива применения цианобактерий для получения биотоплива. В сб: Материалы VII Съезда биохимиков, молекулярных биологов и физиологов. России, Дагомыс, с. 200-201.

4. **Бозиева А.**, Хасимов М., Волошин Р., Синетова М., Куприянова Е, Жармухамедов С., Аллахвердиев С. (2022) Исследование водород-продуцирующей способности некоторых штаммов цианобактерий. В сб.: От первичных процессов фотосинтеза до альтернативной энергетики. Пушино, С. 83.

5. **Bozieva A.M.**, Sinetova M.A., Kupriyanova E.V., Voloshin R.A., Zharmukhamedov S.K., Allakhverdiev S.I. Cyanobacteria as a feedstock for the production of biofuels. (2022) Вестник БГПУ, Россия, Уфа. с. 5-7.

6. **Бозиева А.М.**, Хасимов М.Х, Волошин Р.А., Синетова М.А., Куприянова Е.В., Жармухамедов С.К., Аллахвердиев С.И. (2022) Гетероцистные цианобактерии – перспективные продуценты фотоводорода. В сб: Водоросли: проблемы таксономии и экологии, использование в мониторинге и биотехнологии. Звенигород, 2022, С.10.

7. **Бозиева А.М.**, Хасимов М.Х, Волошин Р.А., Синетова М.А., Куприянова Е.В., Жармухамедов С.К., Аллахвердиев С.И. (2022) Цианобактерии как источник для получения водорода. В сб: Актуальные аспекты современной микробиологии. Москва, Россия, с. 38-40.

8. **Бозиева А.М.**, Хасимов М.Х, Волошин Р.А., Синетова М.А., Куприянова Е.В., Жармухамедов С.К., Аллахвердиев С.И. (2023) Исследование механизмов



выделения водорода у цианобактерий. В сб: Цианопрокариоты/цианобактерии: систематика, экология, распространение, использование в биотехнологии. Москва, Россия, С.16.

9. **Bozieva A.**, Khasimov M., Voloshin R., Sinetova M., Kupriyanova E., Zharmukhamedov S., Dunikov D., Allakhverdiev S. (2023) Hydrogen production by some new cyanobacterial strains. In: Photosynthesis and hydrogen energy research for sustainability. Istanbul, Turkey, P. 66.

10. **Bozieva A.**, Khasimov M., Voloshin R., Allakhverdiev S. (2024) Exogenous carbon substrate for sustainable hydrogen production by cyanobacteria. In: Photosynthesis and hydrogen energy research for sustainability. Istanbul, Turkey, P. 66.

#### *Прочие публикации*

1. Bolatkhan K., Sadvakasova A.K., Zayadan B.K., Kakimova A.K., Sarsekeyeva F.K., Kossalbayev B.D., **Bozieva A.M.**, Alwasel S., Allakhverdiev S.I. (2020). Prospects for the creation of a waste-free technology for wastewater treatment and utilization of carbon dioxide based on cyanobacteria for biodiesel production. Journal of Biotechnology 324, 162-170.

2. Rodionova M.V., **Bozieva A.M.**, Zharmukhamedov S.K., Leong Y.K., Lan J. C-W., Veziroglu A., Veziroglu T.N., Tomo T., Chang J-Sh., Allakhverdiev S.I. (2022). A comprehensive review on lignocellulosic biomass biorefinery for sustainable biofuel production. International Journal of Hydrogen Energy 47(3), 1481-1498.

3. Волошин Р.А., **Бозиева А.М.**, Bruce B.D., Аллахвердиев С.И. (2023) Фотосинтетические микробные топливные элементы: практическое применение электрон-транспортных цепей. Russian Chemical Reviews, 92(5) RCR5073.

*Выражаю искреннюю благодарность своему научному руководителю доктору биологических наук, члену-корреспонденту РАН, заслуженному деятелю науки РФ Аллахвердиеву Сулейману Ифхан оглы за профессиональное руководство, помощь и наставническую поддержку.*

*Особую признательность за помощь и поддержку на всех этапах работы хочу выразить кандидату биологических наук Синетовой Марии Андреевне, кандидату биологических наук Куприяновой Елене Владимировне и кандидату биологических наук Волошину Роману Александровичу, а также всем сотрудникам отдела молекулярных биосистем ИФР им. К.А. Тимирязева РАН под руководством доктора биологических наук, члена-корреспондента РАН Лося Дмитрия Анатольевича.*

*Выражаю глубокую благодарность доктору биологических наук Цыганкову Анатолию Анатольевичу и Хасимову Махмадюсуфу Хусейновичу за содействие в работе.*

*От всего сердца благодарна моим любимым Родителям Бозиеву Магомеду Аскеровичу и Бозиевой Марите Маштаевне и всей моей семье за бесценную поддержку, помощь, понимание и веру в мои начинания.*

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Adam P., Heunemann F., Bussche Ch., Engelshove S., Thiemann T.** (2020) Hydrogen infrastructure – the pillar of energy transition. The practical conversion of long-distance gas networks to hydrogen operation. *Whitepaper*, **32**.
2. **Akhlaghi N., Najafpour-Darzi G.** (2020) A comprehensive review on biological hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy*, **45**,22492-512.
3. **Allaf M.M., Peerhossaini H.** (2002) Cyanobacteria: model microorganisms and beyond. *Microorganisms*, **10**,696.
4. **Allahverdiyeva Y., Aro E.M., Kosourov S.N.** (2014) Recent developments on cyanobacteria and green algae for biohydrogen photoproduction and its importance in CO<sub>2</sub> reduction. In: Gupta VK, Tuohy MG, Kubicek CP, Saddler J, Xu F, editors. *Bioenerg. Res.: Adv. Appl.*,367-87.
5. **Allahverdiyeva Y., Leino H., Saari L., Fewer D.P., Shunmugam S., Sivonen K., Aro E.M.** (2010) Screening for biohydrogen production by cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes. *Int. J. Hydrogen Energy*, **35**:1117-27.
6. **Allakhverdiev S.I., Kreslavski V.D., Thavasi V., Zharmukhamedov S.K., Klimov V.V., Ramakrishna S., Nishihara H., Mimuro M., Carpentier R., Nagata T.** (2010) Photosynthetic energy conversion: hydrogen photoproduction by natural and biomimetic systems. Mukherjee A., (ed.) *Biomimetics, learning from nature*. Croatia: In-Tech, Vukovar. pp. 49-76.
7. **Alleman A.B., Peters J.W.** (2023) Mechanisms for generating low potential electrons across the metabolic diversity of nitrogen-fixing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 89(5):e0037823.
8. **Allen M.M., Smith A.I.** (1969) Nitrogen chlorosis in blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.*, **69**(2),114-20.
9. **Allison F.E., Hoover S.R., Morris H.I.** (1937) Physiological studies with the nitrogen-fixing alga, *Nostoc muscorum*. *Bot. Gaz.*, **98**,433-63.
10. **Ananyev G., Carrieri D., Dismukes G. Ch.** (2008) Optimization of metabolic capacity and flux through environmental cues to maximize hydrogen

production by the cyanobacterium “*Arthrospira (Spirulina) maxima*”. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**(19) 6102-13.

11. **Ananyev G.M., Skizim N.J., Dismukes G.C.** (2012) Enhancing biological hydrogen production from cyanobacteria by removal of excreted products. *J Biotechnol.*, **162**,97-104.

12. **Antal T.K., Lindblad P.** (2005) Production of H<sub>2</sub> 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. Appl. Microbiol.*, **98**,114-20.

13. **Antal T.K., Matorin D.N., Kukarskikh G.P., Lambreva M.D., Tyystjarvi E., Krendeleva T.E., Tsygankov A.A., Rubin A.B.** (2014) Pathways of hydrogen photoproduction by immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* cells deprived of sulfur. *Int. J. Hydrogen Energy*, **39**,18194-203

14. **Appel J., Phunpruch S., Steinmüller K., Schulz R.** (2000) The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Arch. Microbiol.*, **173**,333-38.

15. **Aziz M.** (2016) Integrated hydrogen production and power generation from microalgae. *Int. J. Hydrogen Energy*, **41**, 104-12.

16. **Badger M.R., Price G.D.** (2003) CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J. Exp. Bot.*, **54**,609-622.

17. **Baebprasert W., Jantaro S., Khetkorn W., Lindblad P., Incharoensakdi A.** (2011) Increased H<sub>2</sub> production in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 118 by redirecting the electron supply via genetic engineering of the nitrate assimilation pathway. *Metab. Eng.*, **13**, 610-6.

18. **Bandyopadhyay A., Stöckel J., Min H., Sherman L.A., Pakrasi H.B.** (2010) High rates of photobiological H<sub>2</sub> production by a cyanobacterium under aerobic conditions. *Nat. Commun.*, **1**,139.

19. **Batyrova K., Gavrishcheva A., Ivanova E., Liu J., Tsygankov A.** (2015) Sustainable hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived marine green microalgae *Chlorella* sp., *Int. J. Mol. Sci.*, **16**,2705-16.
20. **Benemann J.R., Valentine R.C.** (1972) The pathways of nitrogen fixation. In: *Advances in Microbial Physiology*. L.: N.Y. Academic Press, **8**,59
21. **Berg S.P., Krogmann D.W.** (1975) Mechanism of KCN inhibition of photosystem I. *J. Biol. Chem.*, **10**,8957-62.
22. **Berman-Frank I., Lundgren P., Chen Y-B., Kupper H., Kolber Z., Bergman B., Falkowski P.** (2001) Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*, *Science*, **294**,1534-37.
23. **Bothe H., Distler E., Eisbrenner G.** (1978) Hydrogen metabolism in bluegreen algae. *Biochemie*, **60**,277.
24. **Bothe H., Schmitz O., Yates M.G., Newton W.E.** (2010) Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **74** (4),529-51.
25. **Bozieva A.M., Khasimov M.Kh., Voloshin R.A., Sinetova M.A., Kupriyanova E.V., Zharmukhamedov S.K., Dunikov D.O., Tsygankov A.A., Tomo T., Allakhverdiev S.I.** (2023). New cyanobacterial strains for biohydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy*, **48**(21),7569-81.
26. **Bozieva A.M., Khasimov M.Kh., Sinetova M.A., Voloshin R.A., Rao M.S., Dunikov D.O., Tsygankov A.A., Leong Y.K., Chang J.-Sh., Bruce B., Allakhverdiev S.I.** Metabolic strategies in cyanobacteria for sustainable hydrogen production. *Journal Frontiers in Energy Research: Bioenergy and Biofuels* (in press).
27. **Brill W.J.** (1979) Nitrogen fixation. In: *The bacteria mechanisms of adaptation*. Ed. I.C. Gunsalus, J.R. Sokatch, L.N. Ornston. N.Y. etc.: Acad. Press, **7**,85.
28. **Brodrick J.W. and Radinowitz J.W.** (1977) Biosynthesis of iron-sulfur proteins. In: *Iron-sulphur protein*. Ed. W. Lovenberg. N.Y. etc.: Acad. Press, **101**.
29. **Burrows E.H., Chaplen F.W.R., Ely R.L.** (2008) Optimization of media nutrient composition for increased photofermentative hydrogen production by *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Int. J. Hydrogen Energy*, **33**,6092-9.

30. **Campbell D., Hurry V., Clarke A.K., Gustafsson P., Quist G.O.** (1998) Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 667-83.
31. **Chongsuksantikul A., Asami K., Yoshikawa S., Ohtaguchi K.** (2014) Hydrogen production by anaerobic dark metabolism in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803-GT: effect of monosaccharide in nitrate free solution. *J. Biochem. Tech.*, **5**(3),735-42
32. **Cournac L., Guedeney G., Peltier G., Vignais P.M.** (2004) Sustained photoevolution of molecular hydrogen in a mutant of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 deficient in the type I NADPH-dehydrogenase complex. *J. Bacteriol.*, **186**,1737-46.
33. **Craig I.W., Leach C.K., Carr N.G.** (1969) Studies with deoxyribonucleic acid from blue-green algae. *Arch. Microbiol.*, **65**,218-27.
34. **Cumino A.C., Marcozzi C., Barreiro R., Salerno G.L.** (2007) Carbon cycling in *Anabaena* sp. PCC 7120. Sucrose synthesis in the heterocysts and possible role in nitrogen fixation. *Plant Physiol.*, **143**,1385-97.
35. **Dalton H.** (1979) Utilization of inorganic nitrogen by microbial cells. In: *Microbial Biochemistry*. Ed. G.R. Quayle. Univ. Park Press:227.
36. **Dickson D.J., Page C.J., Ely R.L.** (2009) Photobiological hydrogen production from *Synechocystis* sp. PCC 6803 encapsulated in silica sol-gel. *Int. J. Hydrogen Energy*, **34**,204-15.
37. **Donze M., Raat A., Gorkom H.** (1974) Supply of ATP and reductant to nitrogenase in the blue-green algae *Anabaena cylindrica*. *Plant Sci. Lett.*, **3**,35
38. **Drawert H.** (1949) Beiträge zur stimulation des pflanzenwachstums. II. Mitteilung. der einfluss von heteroauxin auf die samenkeimung. *Planta*, **37**,1-5.
39. **Drewes K.** (1928) Ober die assimilation des Luftstickstoff durchBlaualgen. *Zbl. Bacteriol., Parasitenk, Infektionskrankh. Und Hyg.* **2**(76), 88-98.
40. **Drewes G.** (1973) In: *The biology of blue-green algae*. Oxford etc.; 99.
41. **Drewes G., Giesbrecht P.** (1966) *Die Zelle. Strukturen und function*. Stuttgart,1.

42. **Drews G., Nultsch W.** (1962) Spezielle Bewegungsmechanismen von Einzellern (Bakterien, Algen). *Handb. Pflanzphysiol.*, **17**, 876-919.
43. **Drożdżyńska A., Leja K., Czaczyk K.** (2011) Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol. *BioTechnologia*, **92**(1), 92-100.
44. **Dunikov D.O., Blinov D.V., Bozieva A.M., Kazakov A.N., Krapivina A.A., Romanov I.A., Zadneprovskaya E.V., Allakhverdiev S.I.** (2024). Permeability of a deformable metal hydride bed during hydrogen absorption. *Int. J. Hydrogen Energy* **51**,375-87.
45. **Dutta D., De D., Chaudhuri S., Bhattacharya S.K.** (2005) Hydrogen production by cyanobacteria. *Microb. Cell Factories*, **4**,36.
46. **Eady R.R., Smith B.E., Cook K.A., Postgate J.R.** (1972) Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. Purification and properties of the component proteins. *Biochem. J.*, **128**,665.
47. **Echlin P.** (1963) The fine structure of the cell boundary of the blue-green alga *Anacystis Montana*. *J. Cell Biol.*, **17**(1), 212.
48. **Fay P.** (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.*, **56**,340-73
49. **Fedorov A.S., Tsygankov A.A., Rao K.K., Hall D.O.** (2001) Production of hydrogen by an *Anabaena variabilis* mutant in photobioreactor under aerobic outdoor conditions. In: Miyake J, Matsunaga T, San PA, editors. *BioHydrogen II*. Oxford, United Kingdom: Elsevier, 223-8
50. **Flores E., Herrero A., Wolk C.P., Maldener I.** (2006) Is the periplasm continuous in filamentous multicellular cyanobacteria? *Trends Microbiol.*, **14**: 439-43.
51. **Fogg G.E., Stewart W.D.P., Fay P., Walsby A.E.** (1973) The blue-green algae. Academic Press, London-New York: 459 p.
52. **Frank H., Lefort M., Martin H.H.** (1962) Elektronenoptische und chemische Untersuchungen an Zellwänden der Blaualge *Plectononcha uncinatum*. *Z. Naturforsch.*, **17**, 262.
53. **Fraser J.M., Tulk S.E., Jeans J.A., Campbell D.A., Bibby T.S., et al.** (2013) Photophysiological and Photosynthetic Complex Changes during Iron Starvation

in *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *PLoS ONE* **8**(3): e59861.

54. **Frenkel A., Gaffron H., Battley E.H.** (1950) Photosynthesis photoreduction by the blue-green alga, *Synechococcus elongatus*. *Nag. Biol. Bull.*, **99**,157-62.

55. **Gaffron H.** (1939) Reduction of CO<sub>2</sub> with H<sub>2</sub> in green plants. *Nature*, **143**,204-5.

56. **Gaffron H., Rubin J.** (1942) Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *J. Gen. Physiol.*, **26**,219-40

57. **Garlapati V.K., Shankar U., Budhiraja A.** (2015) Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. *Biotechnol Rep (Amp)*, **2**(9),9-14.

58. **Gest H., Kamen M.D.** (1960) The photosynthetic bacteria. In: *Handbuch der Pflanzenphysiologie: Encyclopedia of Plant Physiology. B.*, vol. 5, p. 568.

59. **Gest H., Kamen M.D.** (1949) Studies on the metabolism of photosynthetic bacteria IV. Photochemical production of molecular hydrogen by growing cultures of photosynthetic bacteria. *J. Bacteriol*, **58**,239-45.

60. **Ghirardi M.L.** (2015) Implementation of photobiological H<sub>2</sub> production: the O<sub>2</sub> sensitivity of hydrogenases, *Photosyn. Res.*, **125**,383-93.

61. **Ghosh S., Dairkee U.K., Chowdhury R., Bhattacharya P.** (2016) Hydrogen from food processing wastes via photofermentation using Purple Non-sulfur Bacteria (PNSB) – A review. *Energy Convers. Manage*, **141**,299-314.

62. **Gogotov I.N.** (1973) Hydrogen metabolism and nitrogen fixation in phototrophic bacteria. In: *Abstracts of Symp. On procariotic photosynthetic organisms.* Freiburg, p. 118.

63. **Gogotov I.N.** (1978) Relationships in hydrogen metabolism between hydrogenase and nitrogenase in phototrophic bacteria. *Biochemie*, **60**,267.

64. **Golding A-L., Dong Zh.** (2010) Hydrogen production by nitrogenase as a potential crop rotation benefit. *Environ. Chem. Lett.*, **8**,101-21.



65. **Goswami R.K., Mehariya S., Obulisamy P.K., Verma P.** (2021) Advanced microalgae-based renewable biohydrogen production systems: A review. *Biores. Technol.*, **320**(A),124301.
66. **Greenbaum E. and Lee J.W.** (1998) Photosynthetic hydrogen and oxygen production by green algae: an overview. In: Zaborsky O, editor. *Biohydrogen*. New York: Plenum Press, p. 235-42.
67. **Gutthann F., Egert M., Marques A., Appel J.** (2007) Inhibition of respiration and nitrate assimilation enhances photohydrogen evolution under low oxygen concentrations in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *BBA-Bioenergetics*, **1767**,161-9.
68. **Hageman R.V., Burris R.H.** (1978) Changes in the EPR signal of dinitrogenase from *Azotobacter vinelandii* during the lag period before hydrogen evolution begins. *J. Biol. Chem.*, **254**,1118.
69. **Hall D.O., Rao K.K.** (1977) Ferredoxin. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, 5. Photosynthesis I. Ed. A.Trebst, M.Arnon. p.206
70. **Hallenbeck P.C.** (2012) Hydrogen production by cyanobacteria. *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production*, 15-28.
71. **Hallenbeck P.C., Lazaro C.Z., Sagir E.** (2018) Photosynthesis and hydrogen from photosynthetic microorganisms. *Microalgal Hydrogen Production: Achievements and Perspectives*. Seibert M. and Torzillo G (eds.). European Society for Photobiology. Chapter 1, 3-30
72. **Harder R.** (1917) Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Cyanophyceen, hauptsächlich dem endophytischen *Nostoc punctiforme*. *Z. Bot*, **9**,145-242.
73. **Haystead A., Stewart W.D.P.** (1972) Characteristics of the nitrogenase system of the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.*, **82**,325-36.
74. **Hedenskog G., Hofsten A.** (1970) The ultrastructure of *Spirulina platensis* a new source of microbial protein. *Physiol. Plant.*, **23**,209-16.
75. **Hejna A., Kosmela P., Formela K., Piszczyk Ł., Haponiuk J.T.** (2016) Potential applications of crude glycerol in polymer technology—current state and perspectives. *J. Ren. Sust. Energy*, **66**,449-75.

76. **Hoffman B.M., Dean D.R., Seefeldt L.C.** (2009) Climbing nitrogenase: toward a mechanism of enzymatic nitrogen fixation. *Accounts Chem. Res.* **42** (5),609-19.
77. **Holm-Hansen O.** (1968) Ecology, physiology and biochemistry of blue-green algae. *Ann. Rev. Microbiol.*, **22**,47-70.
78. **Hosseini S.E., Wahid M.A.** (2016) Hydrogen production from renewable and sustainable energy resources: Promising green energy carrier for clean development. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, **57**,85066.
79. **Houchins J.P.** (1984) The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **768**, 227-55.
80. **Hurley J.K., Weber-Main A.M., Stankovich M.T., Benning M.M., Thoden J.B., Vanhooke J.L., Holden H.M., Chae Y.K., Xia B., Cheng H., Markley J.L., Martinez-Júlvez M., Gómez-Moreno C., Schmeits J.L., Tollin G.** (1997) Structure – function relationships in Anabaena ferredoxin: correlations between X-ray crystal structures, reduction potentials, and rate constants of electron transfer to ferredoxin: NADP<sup>+</sup> reductase for site-specific ferredoxin mutants. *Biochemistry*, **36**(37),11100-7.
81. **Ingram I.O., Calder I., Baalen C. van et al.** (1973) Role of reduced exogenous organic compounds in the physiology of the blue-green bacteria (algae): photoheterotrophic growth of a “heterotrophic” blue-green bacterium. *J. Bacteriol.*, **114** (2),695-703.
82. **IRENA** (2018) Hydrogen from renewable power: Technology outlook for the energy transition, *International Renewable Energy Agency*, Abu Dhabi.
83. **Jimenez-Llanos J., Ramirez-Carmona M., Rendon-Castrillon L., Ocampo-Lopez C.** (2020) Sustainable biohydrogen production by *Chlorella* sp. microalgae: A review. *Int. J. Hydrogen Energy*, **45**, 8310-28.
84. **Kamshybayeva G.K., Kossalbayev B.D., Sadvakasova A.K., Bauenova M.O., Zayadan B.K., Bozieva A.M., Alharby H.F., Tomo T., Allakhverdiev S.I.** (2023). Screening and optimization of hydrogen production by newly isolated nitrogen-fixing cyanobacterial strains. *Int. J. Hydrogen Energy*, **48**(44),16649-62.

85. **Kamshybayeva G.K., Kossalbayev B.D., Sadvakasova A.K., Zayadan B.K., Bozieva A.M., Dunikov D., Alwasel S., Allakhverdiev S.I.** (2022). Strategies and economic feasibilities in cyanobacterial hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy*, **47**(69),29661-84.
86. **Kenyon C.N., Stanier R.Y.** (1970) Possible evolutionary significance of polyunsaturated fatty acids in blue-green algae. *Nature*, **227**,1164-66.
87. **Kenyon C.N., Rippka R., Stanier R.Y.** (1972) Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. *Arch. Microbiol.*, **83**,216.
88. **Khanna N., Lindblad P.** (2015) Cyanobacterial hydrogenases and hydrogen metabolism revisited: Recent progress and future prospects. *Int. J. Mol. Sci.*, **16**,10537-61.
89. **Khetkorn W., Baebprasert W., Lindblad P., Incharoensakdi A.** (2012) Redirecting the electron flow towards the nitrogenase and bidirectional Hox-hydrogenase by using specific inhibitors results in enhanced H<sub>2</sub> production in the cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012. *Biores. Technol.*, **118**,265-71.
90. **Khetkorn W., Khanna N., Incharoensakdi A., Lindblad P.** (2013) Metabolic and genetic engineering of cyanobacteria for enhanced hydrogen production. *Biofuels*, **4**(5), 535-61.
91. **Khetkorn W., Rastogi R.P., Incharoensakdi A., Lindblad P., Madamwar D., Pandey A., Larroche C.** (2017) Microalgal hydrogen production—a review. *Bioresour. Technol.*, **243**,1194-206.
92. **Kirtay E.** (2011) Recent advances in production of hydrogen from biomass. *Energy Convers. Manage*,**52**,1778-89.
93. **Kondo T., Ishiura M.** (2000). The circadian clock of cyanobacteria. *BioEssays*, **22**,10-15.
94. **Kong P.S., Aroua M.K., Daud W.M.A.W.** (2016) Conversion of crude and pure glycerol into derivatives: a feasibility evaluation. *J. Ren. Sust. Energy*, **63**,533-55.
95. **Kosourov S.N., Ghirardi M.L., Seibert M.A.** (2011) A truncated antenna mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* can produce more hydrogen than the parental strain. *Int. J. Hydrogen Energy*, **36**,2044-8.

96. **Kossalbayev B.D., Kakimova A.B., Bolatkhan K., Zayadan B.K., Sandybayeva S.K., Bozieva A.M., Sadvakasova A.K., Alwasel S., Allakhverdiev S.I.** (2022). Biohydrogen production by novel cyanobacterial strains isolated from rice paddies in Kazakhstan. *Int. J. Hydrogen Energy*, **47**(37),16440-53.
97. **Kossalbayev B.D., Tomo T., Zayadan B.K., Sadvakasova A.K., Bolatkhan K., Alwasel S., Allakhverdiev S.I.** (2020) Determination of the potential of cyanobacterial strains for hydrogen production. *Int. J. Hydrogen Energy*, **45**,2627-39.
98. **Kotay H., Das D.** (2008) Biohydrogen as a renewable energy resource: prospects and potentials. *Int. J. Hydrogen Energy*, **33**,258-63.
99. **Kozlov S.I., Fateyev V.N.** (2009) Hydrogen energy: current state, problems, prospects. Moscow: Gazprom BNIIGAZ, 518 p.
100. **Kroumov A.D., Scheufele F.B., Trigueros D.E.G., Modenes A.N., Zaharieva M., Najdenski, H.** (2017) Modeling and technoeconomic analysis of algae for bioenergy and coproducts. *Algal Green Chem.: Recent Progress in Biotechnol.*, 201-41.
101. **Kufryk G.** (2013) Advances in utilizing cyanobacteria for hydrogen production. *Adv. Microbiol.*, **3**,60-8.
102. **Kulova T.L., Nikolayev I.I., Fateyev V.N., Aliyev A.Sh.** (2018) Modern electrochemical systems of energy accumulation. *Kimya Problemleri - Chemical problems*,**16**(1), 9-34.
103. **Kumar K., Mella-Herrera R.A., Golden J.W.** (2010) Cyanobacterial Heterocysts. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, **2**, 000315
104. **Kumazawa S., Mitsu A.** (1981) Characterization and optimization of hydrogen photoproduction by a saltwater blue-green algae, *Oscillatoria* sp. Miami BG7. I. Enhancement through limiting the supply of nitrogen. *Int. J. Hydrogen Energy*, **6**,339-48
105. **Kumazawa T., Sato S., Kanenari D., Kunimatsu A., Hirose R., Matsuba S., Obara H., Suzuki M., Sato M., Onodera J.** (1994) Precursor of carthamin, a constituent of safflower, *Chem. Lett.*, **23** (12).

106. **Lang N.J., Fisher K.A.** (1969) Variation in the fixation image of “Structured granules” in *Anabaena*. *Arch. Microbiol.*, **67**,173-81.
107. **Leak L.V.** (1967) Studies on the organization of DNA-containing regions in a blue-green alga, a cytochemical and ultrastructural study. *J. Ultrastruct. Res.*, **20**,190.
108. **Lea-Smith D.J., Bombelli P., Vasudevan R., Howe Ch. J.** (2016) Photosynthetic, respiratory and extracellular electron transport pathways in cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg.*, 1857(3),247-55.
109. **Levin D.B., Pitt L., Love M.** (2004) Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 173-185.
110. **Li H., Liu Y., Wang Y., Chen M., Zhuang X., Wang C., Wang J., Hu Z.** (2018) Improved photobio-H<sub>2</sub> production regulated by artificial miRNA targeting *psbA* in green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol. for Biofuels*, **11**,36.
111. **Lindberg P., Lindblad P., Cournac L.** (2004) Gas Exchange in the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133 and its hydrogenase-deficient mutant strain NHM5. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**,2137-45.
112. **Ludden P.W., Burris R.H.** (1979) Purification and properties of nitrogenase from *Rhodospirillum rubrum* and evidence for phosphate, ribose and adenine like unit covalently bound to the iron protein. *Biochem. J.*, **175**,251.
113. **Mandal M.K., Chanu Ng.K., Chaurasia N.** (2020) Cyanobacterial pigments and their fluorescence characteristics: applications in research and industry. *Adv. Cyanobacter. Biol.*, 55-72.
114. **Mann N., Carr N.G.** (1974) Control of macromolecular composition and cell division in the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, **83**, 339-405.
115. **Marcozzi C., Cumino A.C., Salerno G.L.** (2009) Role of NtcA, a cyanobacterial global nitrogen regulator, in the regulation of sucrose metabolism gene expression in *Anabaena* sp. PCC 7120. *Arch. Microbiol.*, **191**, 255-63.
116. **Marques A.E., Barbosa A.T., Jotta J., Coelho M.C., Tamagnini P., Gouveia L.** (2011) Biohydrogen production by *Anabaena* sp. PCC 7120 wild-type and mutants under different conditions: Light, nickel, propane, carbon dioxide and nitrogen. *Biomass Bioenergy*, **35**,4426-34.

117. **Masirbaeva A.D., Baidyldaeva Z.A., Sadanov A.K., Baigonusova Z.A., Ultanbekova G.D.** (2014) Study of nitrogen-fixing activity and competitive ability of nodule bacteria of the genus *Rhizobium*. *Biol. Med. series*, **2**:3252-62.
118. **Masukawa H., Kitashima M., Inoue K., Sakurai H., Hausinger R.P.** (2012) Genetic engineering of cyanobacteria to enhance biohydrogen production from sunlight and water. *AMBIO: A J. Human Environ.*, **41**,169-73.
119. **Masukawa H., Mochimaru M., Sakurai H.** (2002) Disruption of the uptake hydrogenase gene, but not of the bidirectional hydrogenase gene, leads to enhanced photobiological hydrogen production by the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **58**, 618-24.
120. **Masukawa H., Nakamura K., Mochimaru M., Sakurai H.** (2001) Photobiological hydrogen production and nitrogenase activity in some heterocystous cyanobacteria. In: *Biohydrogen II An Approach to Environmentally Acceptable Technology*, 63-6
121. **Mathews J., Wang G.** (2009) Metabolic Pathway Engineering for Enhanced Hydrogen Production, *Int. J. Hydrog. Energy*, **34**(17), 7404-16.
122. **Mayhew S.G., Massey V.** (1973) Studies on the kinetics and mechanism of reduction of flavodoxin from *Peptostreptococcus elsdenii* by sodium ditionite. *Biochim. Biophys. Acta*, **315**,181-90.
123. **Mazloomi K., Gomes Ch.** (2012) Hydrogen as an energy carrier: Prospects and challenges. *Ren. Sust. Energy Rev.*, **16**, 3024-33
124. **McNeely K., Kumaraswamy G.K., Guerraa T., Bennettea N., Ananyev G., Dismukes G.Ch.** (2014) Metabolic switching of central carbon metabolism in response to nitrate: Application to autofermentative hydrogen production in cyanobacteria, *J. Biotechnol.*, **182**,83-91.
125. **Melis A.** (2009) Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science*, **177**,272-80.
126. **Melis A., Neidhardt J., Benemann J.R.** (1999) *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with small chlorophyll antenna sizes exhibit higher photosynthetic

productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells. *J. Appl. Phycol.*, **10**, 515-25.

127. **Melis A., Seibert M., Ghirardi M.L.** (2007) Hydrogen fuel production by transgenic microalgae. In: Leon R, Galvan A Fernandez E, editors. Transgenic microalgae as green cell factories. 110-21.

128. **Melnicki M.R., Pinchuk G.E., Hill E.A., Kucek L.A., Fredrickson J.K., Konopka A., Beliaev A.S.** (2012) Sustained H<sub>2</sub> production driven by photosynthetic water splitting in a unicellular cyanobacterium. *MBio*, 3(4):e00197-12.

129. **Metz J.G., Pakrasi H.B., Seibert M., Arntzer C.J.** (1986) Evidence for a dual function of the herbicide-binding D1 protein in photosystem II. *FEBS Lett.*, **205**(2),269-74

130. **Min H., Sherman L.A.** (2010) Hydrogen production by the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142 under conditions of continuous light. *Appl Environ Microbiol*, **76**,4293-301.

131. **Mishra A.K., Kaushik M.S., Tiwari D.N.** (2019) Nitrogenase and hydrogenase: enzymes for nitrogen fixation and hydrogen production in cyanobacteria. *Cyanobacteria*, **8**, 173-91.

132. **Mishra S., Kumari N., Singh V.K., Sinha R.P.** (2023) Cyanobacterial Biofuel: A Platform for Green Energy. *Adv. Environ. Eng. Res.*, **4**(3): 041

133. **Mitchison G.J., Wilcox M.** (1973) Alteration in heterocyst pattern of *Anabaena* produced by 7-Azatryptophan. *Nat. New Biol.*, **246**,229-33.

134. **Mitreă L., Trif M., Cătoi AF. et al.** (2017) Utilization of biodiesel derived-glycerol for 1,3-PD and citric acid production. *Microb. Cell Fact.*, **16**, 190.

135. **Mitsui A., Suda S.** (1995) Alternative and cyclic appearance of H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> photoproduction activities under non-growing conditions in an aerobic nitrogen-fixing unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. *Curr. Microbiol*, **30**,1-6.

136. **Mortenson L.E., Valentine R.C., Carnahan J.E.** (1962) An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **7**,448-52.

137. **Muro-Pastor M.I., Reyes J.C., Florencio F.J.** (2001) Cyanobacteria perceive nitrogen status by sensing intracellular 2-oxoglutarate levels. *J. Biol. Chem.*, **276**, 38320-8.
138. **Muro-Pastor M.I., Reyes J.C., Florencio F.J.** (2005) Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynth. Res.*, **83**, 135-50.
139. **Murry M.A., Hallenbeck P.C., Esteva D., Benemann J.R.** (1983) Nitrogenase inactivation by oxygen and enzyme turnover in *Anabaena cylindrica*. *Can. J. Microbiol.*, **29**, 1286-94.
140. **Myers J., Kratz W.A.** (1955) Relations between pigment content and photosynthetic characteristics in a blue green alga. *J. Gen. Physiol.*, **39**, 11-22.
141. **Nagarajan D., Lee D.J., Kondo A., Chang J.S.** (2017) Recent insights into biohydrogen production by microalgae – from biophotolysis to dark fermentation. *Biores. Technol.*, **227**, 373-87.
142. **Nakajima Y., Itayama T.** (2003) Analysis of photosynthesis productivity of microalgal mass cultures. *J. Appl. Phycol.*, **15**, 497
143. **Nichols B.W., Wood B.J.B.** (1968) The occurrence and biosynthesis of gamma-linolenic acid in a blue-green alga, *Spirulina platensis*. *Lipids*, **3**, 46-50.
144. **Nicolet Y., Cavazza Ch., Fontecilla-Camps J.C.** (2002) Fe-only hydrogenases: structure, function and evolution. *J. Inorganic Biochem.*, **91**, 1-8.
145. **Nordlund S., Eklund R.** (1979) Nitrogen fixation in *Rhodospseudomonas rubrum* – the “switch off” effect. In: III Intern. Symp. On Photosynthetic Prokaryotes. Abstracts. Oxford. P. 47.
146. **Ogawa T., Kaplan A.** (2003) Inorganic carbon acquisition systems in cyanobacteria. *Photosynth. Res.*, **77**(2-3), 105-15.
147. **Ort D.R., Zhu X., Melis A.** (2011) Optimizing antenna size to maximize photosynthetic efficiency. *Plant Physiol.*, **155**, 79-85.
148. **Osman A. I., Mehta N., Elgarahy A. M., Hefny M., Al-Hinai A., Al-Muhtaseb A. H., et al.** (2022). Hydrogen production, storage, utilisation and environmental impacts: a review. *Chem. Lett.*, **20**, 153-88.



149. **Padan E.** (1979) Impact of facultative anaerobic photoacetotrophic metabolism on ecology of cyanobacteria. *Adv. Microbial. Ecol.*, **3**,1.
150. **Pagliari M., Rossi M.** (2008) The future of glycerol: new uses of a versatile raw material. Chapter 1 Glycerol: properties and production. RSC Green Chemistry Book Series. 2008. p. 10-4.
151. **Pankratz H.S., Bowen C.C.** (1963) Cytology of blue-green algae. I. The cells of *Symploca muscorum*. *Amer. J. Bot.*, **50**, 387-99.
152. **Pansook S., Incharoensakdi A., Phunpruch S.** (2019) Effects of the photosystem II inhibitors CCCP and DCMU on hydrogen production by the unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Sci. World J.*, 1-10.
153. **Peltier G., Tolleter D., Billon E., Cournac L.** (2010) Auxiliary electron transport pathways in chloroplasts of microalgae. *Photosynth. Res.*, **106**,19-31.
154. **Phlips E.J., Mitsui A.** (1983) Role of light intensity and temperature in the regulation of hydrogen photoproduction by the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. strain Miami BG7. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**,1212-20.
155. **Polle J.E.W., Kanakagiri S., Jin E., Masuda T., Melis A.** (2002) Truncated chlorophyll antenna size of the photosystems – a practical method to improve microalgal productivity and hydrogen production in mass culture. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**,1257-64.
156. **Prince R.C., Kheshgi H.S.** (2005) The photobiological production of hydrogen: potential efficiency and effectiveness as a renewable fuel. *Critic. Rev. Microbiol.*, **31**,19-31.
157. **Priya P.S., Deora Y., Verma R.A., Muhal C., Singh T.** (2021) Biofuels: An alternative to conventional fuel and energy source, *Materials Today: Proceedings*.
158. **Rao K.K., Hall D.O.** (1977) Chemistry and evolution of ferredoxins and hydrogenases. In: The evolution of metalloenzymes. Ed. G.J. Leigh. L.: Symposium Press, p.39.
159. **Roelofsen P.A.** (1934) Metabolism of purple sulfur bacteria. *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. wet.*, **37**, p. 660.

160. **Roelofsen P.A.** (1935) On photosynthesis of the Thiorhodaceae. (Diss.), Utrecht.
161. **Sabourin-Provost G., Hallenbeck P.C.** (2009) High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation, *Biores. Technol.*, **100**,3513-17.
162. **Sadvakasova A.K., Kossalbayev B.D., Zayadan B.K., Bolatkhan K., Alwasel S., Najafpour M.M., Tomo T., Allakhverdiev S.I.** (2020) Bioprocesses of hydrogen production by cyanobacteria cells and possible ways to increase their productivity. *Ren. Sust. Energy Rev.*, **133**,110054
163. **Sakurai H., Masukawa H., Kitashimac M., Inoue K.** (2013) Photobiological hydrogen production: Bioenergetics and challenges for its practical application. *J. Photochem. Photobiol.*, **17**,1-25.
164. **Sakurai H., Tsygankov A.A.** (2019) Photobiological biohydrogen production. In: Basile A, Dalena F, editors. Second and Third Generation of Feedstocks, p. 437-67.
165. **Saladini F., Patrici N., Pulselli F.M., Marchettini N., Bastianoni S.** (2019) Guidelines for emergy evaluation of first, seconderation biofuels. *Ren. Energy Focus*, **28**, 127-39.
166. **Salleh S.F., Kamaruddin A., Uzir M.H., Karim K.A., Mohamed A.R.** (2015) Investigation of the links between heterocyst and biohydrogen production by diazotrophic cyanobacterium *A. variabilis* ATCC 29413. *Arch. Microbiol.*, **198**,101-13.
167. **Salleh S.F., Kamaruddin A., Uzir M.H., Mohamed A.R.** (2014) Effects of cell density, carbon dioxide and molybdenum concentration on biohydrogen production by *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *Energy Convers. Manag.*, **87**,599-605.
168. **Salomone-Stagni M., Vogt S., Shima S., Klaucke W.M.** (2009) Extended X-ray absorption fine structure of the [Fe]- hydrogenase Hmd active site. *Journal of Physics: Conference Series*, 190:012197
169. **Samylina O.S., Sinetova M.A., Kupriyanova E.V., Starikov A.Yu., Sukhacheva M.V., Dziuba M.V., Tourova T.P.** (2021) Ecology and biogeography of the 'marine Geitlerinema' cluster and a description of *Sodalinema orleanskyi* sp. nov.,

Sodalinema gerasimenkoae sp. nov., Sodalinema stali sp. nov. and Baaleninema simplex gen. et sp. nov. (Oscillatoriales, Cyanobacteria). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 97

170. **Sarsekeyeva F.K., Usserbaeva A.A., Zayadan B.K., Mironov K.S., Sidorov R.A., Kozlova A.Yu., Kupriyanova E.V., Sinetova M.A., Los D.A.** (2014) Isolation and characterization of a new cyanobacterial strain with a unique fatty acid composition. *Adv. Microbiol.*, **4**,1033-43.

171. **Savakis Ph., Hellingwerf K.J.** (2015) Engineering cyanobacteria for direct biofuel production from CO<sub>2</sub>. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **33**,8-14.

172. **Schmitz O., Boison G., Salzmann H., Bothe H., Schutz K., Wang S.H., Happe T.** (2002) HoxE-a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.*, **1554**(1-2),66-74.

173. **Schnackenberg J., Ikemoto H., Miyachi S.** (1996) Photosynthesis and hydrogen evolution under stress conditions in a CO<sub>2</sub>-tolerant marine green alga, *Chlorococcum littorale*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*, **34**(1), 59-62.

174. **Schubert K.R., Evans H.J.** (1976) Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in modulated symbionts. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73**,1207.

175. **Schutz K., Happe T., Troshina O., Lindblad P., Leitao E., Oliveira P., Tamagnini P.** (2004) Cyanobacterial H<sub>2</sub> production - a comparative analysis. *Planta*, **218**(3),350-9.

176. **Seiler W.** (1976) Conceivable perturbations of the CH<sub>4</sub> and H<sub>2</sub> production by "Microbial energy conversion" on the cycle of atmospheric trace gases. In: *Microbial Energy Conversion* Ed. H. Schlegel, J. Barnea. Gottingen: Goltze E. p. 483.

177. **Seiler W., Ziehl K.H. von., Stohl W.I., Zakosek H.** (1977) CO- und H<sub>2</sub>-abbau in boden. - *Ztschr. Pflanzenernähr. und Bodenk.*, 140, S. 257.

178. **Sevda S., Bhattacharya S., Abu Reesh I.M, Bhuvanesh S., Sreekrishnan T.R.** (2017) Challenges in the design and operation of an efficient photobioreactor for microalgae cultivation and hydrogen production. *Biohydrogen Production: Sust. Curr. Technol. Future Perspective*, 147-62.

179. **Shalid M.K., Batool A., Kashif A., Nawaz M.N., Aslam M., Iqbal N., Choig Y.** (2021) Biofuels and biorefineries: Development, application and future perspectives emphasizing the environmental and economic aspects. *J. Environ. Manag.*, 297, 113-268.
180. **Shima, S., Thauer R. K.** (2007) A third type of hydrogenase catalyzing H<sub>2</sub> activation, *Chem. Rec.*, 7, 37-46.
181. **Silverman S.N., Kopf S.H., Bebout B.M., Gordon R., Som S.M.** (2019) Morphological and isotopic changes of heterocystous cyanobacteria in response to N<sub>2</sub> partial pressure. *Geobiology*, 17(1),60-75.
182. **Simon R.D.** (1971) Cyanophycin granules from the blue-green alga *Anabaena cylindrica*: a reserve material consisting of copolymers of aspartic acid and arginine. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 68,265-7.
183. **Simon R.D.** (1973) Measurement of the cyanophycin granule polypeptide contained in the blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.*, 114,1213-6.
184. **Singh H., Das D.** (2020) Biohydrogen from microalgae. Handbook of Microalgae-Based Processes and Products, 391-418.
185. **Singh R.P., Yadav P., Gupta R.K.** (2022) Modern strategy of cyanobacterial biohydrogen production and current approaches toward its enhancement. Editor(s): Singh P.K., Fillat M.F., Sittther V., Kumar A. In: Developments in Microbiology, Expanding Horizon of Cyanobacterial Biology, Academic Press, P. 219-38.
186. **Skizim N.J., Ananyev G.M., Krishnan A., Gch Dismukes.** (2012) Metabolic pathways for photobiological hydrogen production by nitrogenase- and hydrogenase-containing unicellular cyanobacteria Cyanothece. *J. Biol. Chem.*, 287(4),2777-86.
187. **Skjånes K., Andersen U., Heidorn T., Borgvang S.A.** (2016) Design and construction of a photobioreactor for hydrogen production, including status in the field. *J. Appl. Phycol.*, 28,2205-23.
188. **Smith G.D., Ewart G.D., Tucker W.** (1992) Hydrogen production by cyanobacteria. *Int. J. Hydrogen Energy*, 17(9),695-8.

189. **Sonoike K., Hihara Y., Ikeuchi M.** (2001) Physiological significance of the regulation of photosystem stoichiometry upon high light acclimation of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant and Cell Physiology*, **42**(4),379-84.
190. **Spiller H., Ernst A., Kerfin W., Boger P.** (1978) Increase and stabilization of photoproduction of hydrogen in *Nostoc muscorum* by photosynthetic electron transport inhibitors. *Z. Naturforsch. C. Biosci.*, **33**,541-7.
191. **Stanier R.Y., Cohen-Bazire G.** (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Ann. Rev. Microbiol*, **31**,225-74.
192. **Stanier R.Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G.** (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.*, **35**,171-205.
193. **Stebegg R., Schmetterer G., Rompel A.** (2023) Heterotrophy among Cyanobacteria. *ACS Omega*, **8**; 33098-114.
194. **Stewart W.D.P.** (1973) In: The biology of green-blue algae. Ed. N.G. Carr, B.A. Whitton. Oxford: Blackwells.
195. **Stirbet A., Lazar D., Papageorgiou G.C., Govindjee** (2019) Chlorophyll a fluorescence in cyanobacteria: relation to photosynthesis. *Cyanobacteria*, chapter 5, 79-130.
196. **Suda S., Kumazawa S., Mitsui A.** (1992) Change in the H<sub>2</sub> photoproduction capability in a synchronously grown aerobic nitrogen-fixing cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Miami BG 043511. *Arch. Microbiol.*, **158**,1-4.
197. **Sveshnikov D.A., Sveshnikova N.V., Rao K.K., Hall D.O.** (1997) Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and under nutritional stress. *FEMS Microbiol. Lett.*, **147**(2), 297.
198. **Taikhao S., Incharoensakdi A., Phunpruch S.** (2014) Dark fermentative hydrogen production by the unicellular halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* grown in seawater. *J. Appl. Physiol.*, **27**,187-96.
199. **Taikhao S., Phunpruch S.** (2017) Increasing hydrogen production efficiency of N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012 by cell immobilization. *Energy Proc.*, **138**,366-71.

200. **Tamagnini P., Axelsson R., Lindberg P., Oxelfelt F., Wunschiers R., Lindblad P.** (2002) Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66**(1), 1-20.
201. **Tamagnini P., Leitao E., Oliveira P., Ferreira D., Pinto F.A.L., Harris D.J., Heidorn T., Lindblad P.** (2007) Cyanobacterial hydrogenase diversity, regulation and application. *FEMS Microbiol. Rev.*, **31**,692-720.
202. **Thauer R.K.** (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Marjory Stephenson Prize Lecture Microbiology*, **144**,2377.
203. **Thiel T., Lyons E.M., Erker J.C., Ernst A.** (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,**92**(20),9358-62.
204. **Thiel T., Pratte B.** (2001) Effect on heterocyst differentiation of nitrogen fixation in vegetative cells of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *J. Bacteriol.*, **183**(1),280-6.
205. **Torimura M., Miki A., Wadano A., Kano K., Ikeda T.** (2001) Electrochemical investigation of cyanobacteria *Synechococcus* sp. PCC 7942-catalyzed photoreduction of exogenous quinones and photoelectrochemical oxidation of water. *J. Electroanal. Chem.*, **496**,21-8.
206. **Tosatto S.C.E, Giacometti G.M, Valle G., Costantini P.** (2006) Functional insights from the structural modelling of a small Fe-hydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **339**(1),277-83.
207. **Touloupakis E., Rontogiannis G., Benavides A.M.S., Cicchi B., Ghanotakis D.F., Torzillo G.** (2016) Hydrogen production by immobilized *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Int. J. Hydrogen Energy*, **41**,15181-6.
208. **Touloupakis E., Torzillo G.** (2019) Photobiological hydrogen production. *Solar Hydrogen Production*, 511-25.
209. **Tsygankov A.A.** (2007) Nitrogen-fixing cyanobacteria: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **43**,250-9.
210. **Tsygankov A.A., Fedorov A.S., Kosourov S.N., Rao K.K.** (2002) Hydrogen production by cyanobacteria in an automated outdoor photobioreactor under aerobic conditions. *Biotechnol. Bioeng.*, **80**,777-83

211. **Tsygankov A.A., Serebryakova L.T., Rao K.K., Hall D.O.** (1998) Acetylene reduction and hydrogen photoproduction by wild-type and mutant strains of *Anabaena* at different CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations. *FEMS Microbiol. Lett.*, **167**,13-7.
212. **Tyagi V.V.S.** (1975) The heterocysts of blue-green algae (myxophyceae). *Biol. Rev.*, **50**(3),247.
213. **Vargas S.R., Zaiat M., Calijuri M.C.** (2020) Influence of culture age, ammonium and organic carbon in hydrogen production and nutrient removal by *Anabaena* sp. in nitrogen-limited cultures. *Int. J. Hydrogen Energy*, **45**,30222-31.
214. **Vasconcelos L. and Fay P.** (1974) Nitrogen metabolism and ultrastructure in *Anabaena cylindrica*. *Arch. Microbiol.*, **96**,271-9.
215. **Vazquez-Bermudez M.F., Herrero A., Flores E.** (2003) Carbon supply and 2-oxoglutarate effects on expression of nitrate reductase and nitrogen-regulated genes in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *FEMS Microbiol. Lett.*, **221**,155-9.
216. **Vermaas W.Fj.** (2001) Photosynthesis and respiration in cyanobacteria. In: John Wiley & Sons, editors. *Encyclopedia of life sciences*. p. 1-7.
217. **Vignais P.M., Billoud B.** (2007) Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview. *Chem. Rev.*, **107**(10),4206-72.
218. **Vignais P.M., Billoud B., Meyer J.** (2001) Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**,455-501.
219. **Vignais P.M., Colbeau A.** (2004) Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr Issues Mol. Biol.*, **6**,159-88.
220. **Volbeda A., Montet Y., Vernede X., Hatchikian E.C., Fontecilla-Camps J.C.** (2002) Highresolution crystallographic analysis of *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase. *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**(11),1449-61.
221. **Volgusheva A.A., Jokel M., Allahverdiyeva Y., Kukarskikh G.P., Lukashov E.P., Lambreva M.D., Krendeleva T.E., Antal T.K.** (2017) Comparative analyses of H<sub>2</sub> photoproduction in magnesium- and sulfur-starved *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *Physiol. Plant.*, **161**,124-37.

222. **Volgusheva A.A., Styring S., Mamedov F.** (2013) Increased photosystem II stability promotes H<sub>2</sub> production in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**,7223-8.
223. **Walker C.C., Yates G.M.** (1978) The hydrogen cycle in nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum*. *Biochimie*, **60**,225.
224. **Walsby A.E., Nichols B.W.** (1969) Lipid composition of heterocysts. *Nature*, **221**,673.
225. **Wang Z.X., Zhuge J., Fang H., Prior B.A.** (2001) Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnol. Adv.*, **19**, 201-23.
226. **Watanabe A., Yamamoto Y.** (1967) Heterotrophic nitrogen fixation by the blue-green alga *Anabaenopsis circularis*. *Nature*, **214**,738.
227. **Weare N.M.** (1978) The photoproduction of H<sub>2</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> fixed from N<sub>2</sub> by a derepressed mutant of *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. Biophys. Acta*, 502, p. 486.
228. **Weare N.M., Benemann J.K.** (1974) Nitrogenase activity and photosynthesis in *Plectonema boryanum*. *J. Bacteriol.*, **119**, 258-65.
229. **Weaver P., Lien S., Seibert M.** (1979) Photobiological production of hydrogen – a solar energy conversion option. *Solar Energy Res. Inst. (USA)*.
230. **Weissman J.C., Benemann J.R.** (1977) Hydrogen production by nitrogen-starved cultures of *Anabaena cylindrica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 123-31.
231. **Whitton B.A., Peat A.** (1967) Heterocyst structure in *Chlorogloea fritschii*. *Arch. Microbiol.*, **58**,324-8.
232. **Whitton B.A., Potts M.** (2012) Introduction to the cyanobacteria. In *Ecology of Cyanobacteria II*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1-13.
233. **Wildon D.C., Mercer F.V.** (1963) The ultrastructure of the vegetative cell of bluegreen algae. *Austral. J. Biol. Sci.*, **16**,585-96.
234. **Winkenbach F., Wolk C.P.** (1973) Activities of enzymes of the oxidative and reductive pentose phosphate pathways in heterocysts of blue-green alga. *Plant Physiol.*, **52**,480-3.
235. **Yeager C.M., Milliken C.E., Bagwell C.E., Staples L., Berseth P.A., Sessions H.T.** (2011) Evaluation of experimental conditions that influence hydrogen



production among heterocystous Cyanobacteria. *Int. J. Hydrogen Energy*, **36**(13), 7487-99.

236. **Yoch D.C.** (1978) Nitrogen fixation and hydrogen metabolism by photosynthetic bacteria. In: *The Photosynthetic Bacteria*. Ed. R.K. Clayton, W.R. Sistrom. N.Y.; L: Plenum Press, p.657.

237. **Yoshino F., Ikeda H., Masukawa H., Sakurai H.** (2007) High photobiological hydrogen production activity of a *Nostoc* sp. PCC 7422 uptake hydrogenase-deficient mutant with high nitrogenase activity. *Mar. Biotechnol.*, **9**(1), 101-12.

238. **Yu J., Takahashi P.** (2007) Biophotolysis-based hydrogen production by cyanobacteria and green microalgae. In: Mendez-Vilas A, editor. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*. FORMATEX.

239. **Zavřel T., Sinetova M.A., Červený J.** (2015) Measurement of chlorophyll *a* and carotenoids concentration in cyanobacteria. *Bio-protocol*, **5**(9), e1467.

240. **Zhang B., Zhang S-H., Yao R., Wu Y-H., Qiu J-Sh.** (2021) Progress and prospects of hydrogen production: Opportunities and challenges. *J Electron Sci Technology*, **19**, 100080.

241. **Zhang C.C., Laurent S., Sakr S., Peng L., Bedu S.** (2006) Heterocyst differentiation and pattern formation in cyanobacteria: A chorus of signals. *Mol. Microbiol.*, **59**, 367-75.

242. **Абдуллатыпов А.В., Цыганков А.А.** (2013) Моделирование пространственной структуры гидрогеназы HvdSL пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS. *Компьютерные исследования и моделирование*, **5**(4), 737-47.

243. **Андреюк Е.И., Коптева Ж.П., Занина В.В.** (1990) Цианобактерии. Киев: Наукова Думка, 200 с.

244. **Баулина О.И.** (2010) Ультраструктурная пластичность цианобактерий. М., Научный мир, 239 с.

245. **Бозиева А.М., Заднепровская Е.В., Аллахвердиев С.И.** (2022) Получение биоводорода: последние достижения и современное состояние. *Глобальная энергия*, **28(4)**,59-78.
246. **Бозиева А.М., Синетова М.А., Куприянова Е.В., Габриелян Д.А., Волошин Р.А., Стариков А.Ю., Жармухамедов С.К., Аллахвердиев С.И.** (2021) Исследование физиологических особенностей малоизученных штаммов цианобактерий - потенциальных продуцентов фотоводорода. В сб.: *Биосистемы: организация, поведение, управление*, с.36
247. **Габдулхаков А.Г., Донцова М.В.** (2013) Структурные исследования фотосистемы II цианобактерий. *Успехи биологической химии*, **53**,323-54.
248. **Габриелян Д.А., Синетова М.А., Габриелян А.К., Бобровникова Л.А., Бедбенов В.С., Стариков А.Ю., Зорина А.А., Габель Б.В., Лось Д.А.** (2023) Лабораторная система для интенсивного культивирования микроводорослей и цианобактерий. *Физиология растений*, **70(2)**, 202-13.
249. **Гоготов И.Н.** (1983) Метаболизм водорода у фототрофных микроорганизмов. Дисс. Докт. Биол. Наук, Москва, 347 с.
250. **Гоготов И.Н., Глинский В.П.** (1973) Сравнительное исследование азотфиксации у пурпурных бактерий. *Микробиология*, **42**,983.
251. **Горленко В.М., Дубинина Г.А., Кузнецов С.И.** (1977) Экология водных микроорганизмов. М.: Наука.
252. **Громов Б.В.** (1976) Ультраструктура сине-зеленых водорослей. Л.: Наука, 91 с.
253. **Гусев М.В., Никитина А.А.** (1979) Цианобактерии: физиология и метаболизм. М.: Наука, 228 с.
254. **Гусев М.В., Никитина К.А., Корженевская Т.Г.** (1971) *Микробиология*, **40**, 956.
255. **Дебабов В.Г.** (2008) Биотопливо. *Биотехнология*, **1**, 3-14.
256. **Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.** (1991) Справочник биохимика. М.:Мир, 554 с.

257. **Ефимцев Е.И., Бойченко В.А., Литвин Ф.Ф.** (1975) Фотоиндуцированное выделение водорода бактериями, водорослями и высшими растениями. Докл. АН СССР, **220**, 986-9.
258. **Жармухамедов С.К., Шабанова М.С., Родионова М.В., Гусейнова И.М., Карачан М.С., Карачан Н., Асйык К.Б.; Креславский В.Д., Алвасель С., Аллахвердиев С.И.** (2022) Влияние нового ингибитора фотосинтеза  $[CuL_2]Br_2$  комплекса на активность фотосистемы II в шпинате. *Cells*, **11**, 2680.
259. **Захватаева Н.В., Малофеева И.В., Кондратьева Е.Н.** (1970) Изучение способности к азотфиксации фотосинтезирующих бактерий. *Микробиология*, **39**, 761.
260. **Зуева О., Калайда М., Чичиров А.** (2014) Биотопливо и бионанотехнологии. LAP Lambert Academic Publishing, 112 с.
261. **Кокшарова О.А.** (2008) Цианобактерии: перспективные объекты научного исследования и биотехнологии. *Успехи современной биологии*, **128** (1), 3-20.
262. **Кондратьева Е.Н.** (1963) Фотосинтезирующие микроорганизмы. М.: Изд-во АН СССР.
263. **Кондратьева Е.Н.** (1974) Метаболизм углерода у фототрофных бактерий (пурпурных и зеленых). *Успехи микробиологии*, **9**, 44.
264. **Кондратьева Е.Н.** (1979) Образование микроорганизмами молекулярного водорода. В кн.: Роль микроорганизмов в круговороте газов в природе. М.: Наука, с. 131.
265. **Кондратьева Е.Н., Гоготов И.Н.** (1976) Микроорганизмы – продуценты водорода. *Изв. АН СССР. Сер. Биол.*, **1**, 69.
266. **Кондратьева Е.Н., Гоготов И.Н.** (1981) Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М.: Наука, 344 с.
267. **Кондратьева Е.Н., Молофеева И.В.** (1972) Ассимиляция неорганических источников азота фототрофными бактериями. Научн. Докл. Высш. Школы Биол. Науки, **15**, 87.

268. **Косяк А.В.** (1977) Фотовыделение водорода *Anabaena cylindrica*. Тезисы докл. II Междунар. Симп.: Рост микроорганизмов на C<sub>1</sub>-соединениях. Пущино, НЦБИ АН СССР, с.136.
269. **Лось Д.А.** (2010) Сенсорные системы цианобактерий. М.: Научный мир, 218 с.
270. **Назаренко Л.В.** (2012) Биотопливо: история и классификация его видов. *Вестник МПГУ Серия «Естественные науки»*, **2**(10), 16-32.
271. **Ощепков В.П., Красновский А.А.** (1972) Исследование выделения водорода при освещении хлореллы. *Физиология растений*, **19**, 1090.
272. **Ощепков В.П., Красновский А.А.** (1974) Фотообразование молекулярного водорода хлореллой: спектр действия. *Физиология растений*, **21**, 462.
273. **Пахомова М.В.** (1969) В кн.: Биология синезеленых водорослей. М.: Изд-во МГУ. С. 66.
274. **Пиневиц А.В., Аверина С.Г.** (2002) Оксигенная фототрофия. СПб: Изд-во С.-Петербург. ун-та. 236 с.
275. **Полянский Ю.И.** (1936) В кн. А.А. Еленкин. Синезеленые водоросли СССР. М.; Л.: Изд-во АН СССР, с. 629.
276. **Пронина Н.А., Куприянова Е.В.** (2021) CO<sub>2</sub>-концентрирующие механизмы цианобактерий и микроводорослей. М.: Научный мир, 240 с.
277. **Радченко Р.В., Мокрушин А.С., Тюльпа В.В.** (2014) Водород в энергетике. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 229 с.
278. **Родионов Ю.В., Лебедева Н.В.** (1987) Регуляция азотфиксации у свободноживущих бактерий. *Успехи микробиологии*, **21**, 151-80.
279. **Синетова М.А., Сидоров Р.А., Стариков А.Ю., Воронков А.С., Медведева А.С., Кривова З.В., Пахолкова М.С., Бачин Д.В., Бедбенов В.С., Габриелян Д.А., Заядан Б.К., Боллатхан К., Лось Д.А.** (2019) Характеристика биотехнологического потенциала штаммов цианобактерий и микроводорослей коллекции IPPAS. *Биотехнология*, **35**(3), 12-29.

280. **Стадничук И.Н., Красильников П.М., Зленко Д.В.** (2015) Фикобилисомы и фикобилипротеины цианобактерий. *Микробиология*, **84**(2),131-43.
281. **Судьина Е.Г., Шнюкова Е.И., Костлан Н.В. и др.** (1978) Биохимия сине-зеленых водорослей. К.М. Сытник. Киев: Наукова Думка, 264 с.
282. **Усербаева А., Заядан Б., Садвакасова А., Сарсекеева Ф., Талпакова А.** (2017) Сравнительный анализ методов экстракции липидов из биомассы штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS В-1200- потенциального продуцента биодизеля. *Вестник. Серия биологическая*, **3**(72).
283. **Фатеев В.Н., Алексеева О.К., Коробцев С.В., Серегина Е.А., Фатеева Т.В. Григорьева А.С., Алиев А.Ш.** (2018) Проблемы аккумуляции и хранения водорода. *Chem. Probl.*, **4**(16), 453-83.
284. **Цоглин Л.Н., Пронина Н.А.** (2012) Биотехнология микроводорослей. М.: Научный мир, 184 с.
285. **Цыганков А.А.** (2006) Получение водорода биологическим путем. *Рос. Хим. Ж.*, **1**(6), 26-33.