

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМА ОСВЕЩЕНИЯ НА ВЫДЕЛЕНИЕ ВОДОРОДА ФОТОТРОФНЫМИ ОРГАНИЗМАМИ

Л.С. ГАБРИЕЛЯН

Ереванский гос. университет, кафедра биохимии, микробиологии и биотехнологии
lgabrielyan@ysu.am

Исследовано действие режима освещения на выделение водорода (H_2) зеленой микроводорослью *Parachlorella kessleri* PA-002 и пурпурной бактерией *Rhodobacter sphaeroides* MDC6521. Выявлено, что *P. kessleri* и *R. sphaeroides* не способны к выделению H_2 в темноте. Когда культуры *R. sphaeroides* освещались через 24 ч темного периода, выход H_2 возрастал в 2.5 раза, по сравнению с контрольным образцом; тогда как выделение H_2 *P. kessleri* увеличивалось в 1.5 раза при темновой инкубации микроводорослей после предварительного освещения в течение 24 ч. Это увеличение выхода H_2 возможно за счет активации соответствующих ферментов и создания анаэробных условий. Полученные результаты важны для выявления механизмов выделения H_2 у фототрофов, а также для дальнейшего совершенствования водородной биотехнологии.

Режим освещения – выделение водорода – Rhodobacter sphaeroides – Parachlorella kessleri

Ուսումնասիրվել է լուսավորության ռեժիմների ազդեցությունը *Parachlorella kessleri* PA-002 կանաչ միկրոզոդիմոնում և *Rhodobacter sphaeroides* MDC6521 ծիրանագույն բակտերիայում ջրածնի (H_2) արտադրության վրա: Ցույց է տրվել, որ *P. kessleri* և *R. sphaeroides* չեն արտադրում H_2 մթնային պայմաններում: Երբ *R. sphaeroides*-ը լուսավորվել է 24 ժ մթնային փուլից հետո, H_2 -ի ելքը աճել է 2.5 անգամ, ստուգիչի համեմատությամբ: Սակայն *P. kessleri*-ում H_2 -ի արտադրությունը խթանվել է 1.5 անգամ, երբ կոնտրոլան 24 ժ լուսավորությունից հետո տեղափոխվել է մթնային պայմաններ: H_2 -ի արտադրության խթանումը կարող է պայմանավորված լինել համապատասխան ֆերմենտների ակտիվացմամբ և անաէրոբ պայմանների ստեղծմամբ: Ստացված տվյալները կարևոր են ֆոտոտրոֆներում H_2 -ի արտադրության մեխանիզմների պարզաբանման, ինչպես նաև ջրածնային կենսատեխնոլոգիայի բարելավման համար:

Լուսավորությունը ռեժիմ – ջրածնի արտադրություն – Rhodobacter sphaeroides – Parachlorella kessleri

The effect of the lighting regime on the hydrogen (H_2) production by green microalgae *Parachlorella kessleri* PA-002 and purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* MDC6521 has been investigated. It has been shown that *P. kessleri* and *R. sphaeroides* don't produce H_2 at the darkness. When *R. sphaeroides* culture was illuminated after 24 h of dark period, the H_2 yield was increased 2.5 fold in comparison with the control sample; whereas the H_2 production by *P. kessleri* was enhanced by 1.5 fold during the dark incubation of microalgae after pre-illumination during 24 h. H_2 yield increase is possible due to activation of the corresponding enzymes and the creation of anaerobic conditions. The results obtained are important for understanding of H_2 production mechanisms in phototrophs, as well as for further improvement of hydrogen biotechnology.

Lighting regime – hydrogen production – Rhodobacter sphaeroides – Parachlorella kessleri

В настоящее время одним из актуальных направлений водородной биотехнологии и биоэнергетики является поиск микроорганизмов, способных к эффективному выделению молекулярного водорода (H_2), и создание оптимальных условий, обеспечивающих высокие выход и скорость продуцирования H_2 [2, 3, 11]. Как известно, H_2 является одним из наиболее перспективных альтернативных источников экологически чистой энергии, и может сыграть значительную роль в энергетических технологиях будущего.

Биологическое выделение H_2 имеет ряд преимуществ по сравнению с другими способами получения водорода, одно из которых – низкие энергетические затраты, особенно при производстве H_2 организмами, использующими солнечный свет в качестве источника энергии. Светозависимое выделение H_2 осуществляется тремя группами фотосинтезирующих организмов – зелеными водорослями и цианобактериями в процессе прямого и непрямого биофотолиза, и пурпурными бактериями – в процессе фотоброжения органических соединений [2-4, 9, 11].

В основе светозависимого выделения H_2 фототрофными организмами лежит процесс фотосинтеза. В ходе фотофизических и фотохимических процессов в фототрофах за счет солнечной энергии при определенных условиях выделяется H_2 [2-4, 11]. Данный процесс у пурпурных бактерий катализируется ферментом нитрогеназой с использованием АТФ, тогда как у зеленых микроводорослей выделение H_2 обусловлено деятельностью другого фермента – гидрогеназы [4, 9].

Выход H_2 зависит от ряда факторов: вида и возраста культуры, от природы использованных субстратов, а также от анаэробных условий роста и температуры, рН, и наличия макро- и микроэлементов [2-4, 9-12].

Большое влияние на выделение биоводорода оказывают условия освещения. Интенсивность света – важный фактор среды, влияющий на рост, выход и скорость выделения H_2 фотосинтезирующими организмами [7, 10, 12]. Умеренная интенсивность света обеспечивает фототрофов восстановленными эквивалентами и АТФ посредством мембранно-связанного электронного транспорта, который участвует в выделении H_2 , а также активирует водород-производящие ферменты – нитрогеназу и гидрогеназу [4, 7, 12]. С этой точки зрения актуальным является оптимизация условий культивирования микроорганизмов, в частности, выбор режима освещения для увеличения выхода H_2 .

Целью настоящей работы было исследование влияния режима освещения на окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) и выделение H_2 зеленой микроводорослью *Paraclorella kessleri* PA-002 и пурпурной бактерией *R. sphaeroides* MDC6521.

Материалы и методы

В работе использовались пурпурная несерная бактерия *R. sphaeroides*, шт. MDC6521, выделенная из минерального источника Арзни в Армении, и зеленая микроводоросль *P. kessleri* PA-002 (Центр депонирования микроорганизмов НАН Армении, Ереван, Армения, WDCM803). *R. sphaeroides* выращивали в анаэробных условиях на среде Ормерода, а *P. kessleri* – в аэробных условиях на среде Тамия, в термостате при рН 7.5 ± 0.2 , температуре 30 ± 0.2 °С и освещении 2000 люкс [1, 5, 6]. Для освещения использовали галогеновые лампы (мощность – 60 Вт). Интенсивность света измеряли люксметром LM37 (Carl Roth, Germany). Для исследования выделения H_2 *P. kessleri* суспензию микроводоросли в стационарной фазе роста выделяли центрифугированием и суспендировали в среде ТАР (рН 7.5).

Рост *R. sphaeroides* и *P. kessleri* контролировали путем измерения оптической плотности (ОП) суспензии на спектрофотометре Spectro UV-Vis Auto (Labomed, США) при длине волны 660 и 680 нм, соответственно [1, 5, 6]. рН среды определяли с помощью чувствительного рН-метра с соответствующим селективным электродом типа HJ1131B (Hanna Instruments, Португалия) и регулировали с помощью 0.1 М NaOH и HCl [5, 6].

Величину окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) определяли с помощью цифровых иономеров И-160 МП (Гомельский завод измерительных приборов, г. Гомель, Беларусь) с использованием платинового (ЭПВ-01) и титан-силикатного (ЭО-21) электродов, как описано ранее [5, 6].

Выход H_2 рассчитывали по изменению величины ОВП и выражали в ммоль H_2 /л культуры как описано ранее [5, 6]. Выделение H_2 также подтверждали химическим методом как описано [5, 8].

В работе использовали реактивы аналитической чистоты (Carl Roth GmbH, Германия, Sigma Aldrich, США). Приводятся средние данные из 3 независимых экспериментов со стандартной ошибкой [5, 6].

Результаты и обсуждение

Применялись четыре режима культивирования: первая культура подвергалась непрерывному освещению в течение 72 ч и служила в качестве контроля; вторая культура находилась в темновых условиях в течение 72 ч; третья культура освещалась в течение 24 ч, затем помещалась в темновые условия; и наконец четвертая – освещалась через 24 ч темнового периода.

Для выяснения механизмов действия режима освещения на *P. kessleri* и *R. sphaeroides* исследовали изменения ОВП и рН среды при росте организмов в различных условиях освещения. Как известно, ОВП является важным фактором, определяющим анаэробный рост микроорганизмов, сопровождающийся падением ОВП от положительных величин до отрицательных [6]. Падение ОВП указывает на восстановительные процессы, связанные с формированием конечных продуктов брожения, что является типичным для метаболических процессов во время роста клеток в анаэробных условиях [6, 11]. Связь между изменением ОВП и выделением H_2 была показана ранее для *R. sphaeroides* [5, 6].

Рост *P. kessleri* в течение 72 ч непрерывного освещения сопровождался падением величины ОВП от положительных (235 ± 10 мВ) до отрицательных значений (-480 ± 20 мВ) (Рис. 1А). Такое падение ОВП может свидетельствовать не только о повышении восстановительных процессов, но и о фотовыделении H_2 [5, 6]. ОВП культуры, находящейся в темновых условиях, не подвергался резким изменениям (не показано). ОВП *P. kessleri*, которая находилась в темноте после 24 ч освещения, понижался до -535 ± 20 мВ (Рис. 1А). Падение ОВП может быть связано с постепенным уменьшением в темновых условиях интенсивности фотосинтеза и скорости продуцирования O_2 , а также с поглощением в процессе дыхания всего O_2 , что привело к созданию анаэробных условий и к синтезу H_2 . Однако при освещении культуры *P. kessleri* после 24 ч темновой инкубации величина ОВП составляла -415 ± 10 мВ (Рис. 1А). Такое изменение ОВП может быть связано с включением фотосинтеза и выделением O_2 при освещении.

Рост контрольных клеток *R. sphaeroides* сопровождался падением величины ОВП от положительных (120 ± 10 мВ) в начале лаг-фазы роста до низких отрицательных значений (-550 ± 20 мВ) при переходе в стационарную фазу (Рис. 1А). Такое падение ОВП свидетельствует об усилении восстановительных процессов, что характерно для бактериального метаболизма в анаэробных условиях, а также о выделении H_2 [5, 6]. ОВП бактерии, находящейся в темновых условиях, изменялся незначительно (не показано). При освещении культуры в течение 24 ч и применении темновых условий, величина ОВП составляла -400 ± 20 мВ, тогда как освещение культуры *R. sphaeroides* через 24 ч темновой инкубации приводило к резкому падению ОВП до -610 ± 20 мВ (Рис. 1А).

Как известно, ОВП зависит от рН среды, который является одним из важных показателей роста микроорганизмов в разных условиях среды [5, 6]. При различных режимах освещения наблюдался рост рН, при этом рН среды *P. kessleri* не подвергался резким изменениям, тогда как рН среды *R. sphaeroides* возрастал от 7.5 (начальное значение рН) до 9.0-9.2 при непрерывном освещении и при режиме 24 ч в

темноте/48 ч освещения, соответственно (рис. 1Б). Изменение рН связано с образованием различных продуктов метаболизма, в том числе и H_2 [5, 6].

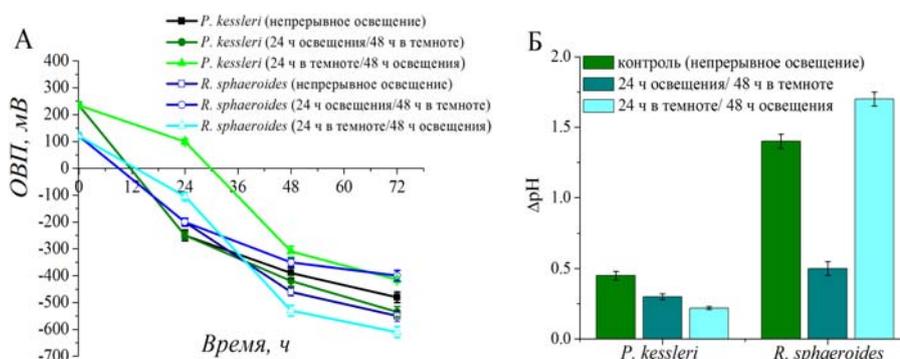


Рис. 1. Изменение ОВП (А) и рН (Б) среды *P. kessleri* PA-002 и *R. sphaeroides* MDC6521 при различных режимах освещения (ΔpH определяли как разницу между начальным и конечным значениями рН).

Как видно из табл. 1, при непрерывном освещении культуры как зеленой микроводоросли, так и пурпурной бактерии, выделяли H_2 , при этом выход H_2 у *R. sphaeroides* в 1.6 раз превышал выделение H_2 *P. kessleri*. Как оказалось, *P. kessleri* и *R. sphaeroides* не способны к выделению H_2 в темноте (табл. 1). Выделение водорода *P. kessleri* возрастало в 1.5 раза, по сравнению с контролем, в темновых условиях после предварительного освещения в течение 24 ч. Это увеличение выхода H_2 возможно за счет темновой анаэробной адаптации микроводорослей, при которой активируется гидрогеназа – фермент, обеспечивающий образование H_2 [9, 10]. Однако когда *P. kessleri* освещалась через 24 ч темновой инкубации, то выход H_2 подавлялся приблизительно в 2 раза, по сравнению с контролем (табл. 1). Снижение выхода H_2 может быть связано с включением процесса фотосинтеза и продуцированием O_2 , подавляющего активность гидрогеназы.

Когда культура *R. sphaeroides* освещалась через 24 ч темновой инкубации, выход H_2 возрастал в 2.5 раза, по сравнению с контрольным образцом (табл. 1). Это увеличение выхода H_2 возможно за счет активации нитрогеназы и синтеза АТФ, необходимого для выделения H_2 в процессе фотоброжения. Катализируемое нитрогеназой выделение H_2 требует поступление электронов от восстановленного ферредоксина, а также больших количеств АТФ, т.е. является энергозависимым процессом. При освещении культуры в течение 24 ч и переносе в темновые условия, выделение H_2 бактерией *R. sphaeroides* подавлялось в 3 раза, по сравнению с контрольным образцом (табл. 1). Это может быть обусловлено тем, что при росте в темновых условиях наблюдается недостаток световой энергии, необходимой для синтеза АТФ и выделения H_2 [12].

Табл. 1. Влияние режима освещения на выделение H_2 зеленой микроводорослью *P. kessleri* PA-002 и пурпурной бактерией *R. sphaeroides* MDC6521.

Культура	Контроль (непрерывное)	Выход H_2^* , ммоль/л		
		72 ч в темноте	24 ч освещения/ 48 ч в темноте	24 ч в темноте/ 48 ч освещения

	освещении)			
<i>P. kessleri</i>	1.40±0.06	–	2.14±0.10	0.75±0.05
<i>R. sphaeroides</i>	2.20 ± 0.06	–	0.73±0.05	5.50±0.10

*Выход H₂ определяли по изменению ОВП.

Минус (–) указывает на отсутствие выделения H₂.

Таким образом, оптимизация режима освещения может привести к увеличению выделения H₂ фототрофными организмами. Полученные результаты важны для выявления механизмов выделения H₂ у фототрофов, а также для дальнейшего совершенствования водородной биотехнологии.

Автор выражает благодарность член-кор. НАН РА, д.б.н., проф. А. Трчуняну за помощь в интерпретации полученных результатов. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного комитета по науке Министерства образования и науки РА, грант №15Т-1F123.

Литература

1. Сиренко Л.А., Сакевич А.И., Осипов Л.Ф., Лукина Л.Ф., Кузьменко М.И. и др. Методы физиолого-биохимического исследования микроводорослей в гидробиологической практике. Киев: Изд-во “Наукова Думка”, 247 с., 1975.
2. Цыганков А.А., Хуснутдинова А.Н. Участие H₂ в метаболизме пурпурных бактерий и перспективы практического использования. Микробиол., 84, 3–26, 2015.
3. Allakhverdiev S.I., Thavasi V., Kreslavski V.D., Zharmukhamedov S.K., Klimov V.V. et al. Photosynthetic hydrogen production. J. Photochem. Photobiol., 11, 101–113, 2010.
4. Gabrielyan L., Trchounian A. Purple bacteria and cyanobacteria as potential producers of molecular hydrogen: An electrochemical and bioenergetic approach, in: Trchounian A. (Ed.) *Bacterial Membranes*. Kerala (India): Research Signpost, p. 233–273, 2009.
5. Gabrielyan L., Hakobyan L., Trchounian A. Comparative effects of Ni(II) and Cu(II) ions and their combinations on redox potential and hydrogen photoproduction by *Rhodobacter sphaeroides*. J. Photochem. Photobiol., 164, 271–275, 2016.
6. Gabrielyan L., Sargsyan H., Hakobyan L., Trchounian A. Regulation of hydrogen photoproduction in *Rhodobacter sphaeroides* batch culture by external oxidizers and reducers. Appl. Energy, 131, 20–25, 2014.
7. Lazaro C.Z., Varesche M.B.A., Silva E.L. Effect of inoculums concentration, pH, light intensity and lighting regime on hydrogen production by phototrophic microbial consortium. Ren. Energy 75, 1–7, 2015.
8. Maeda T., Wood T.K. Formate detection by potassium permanganate for enhanced hydrogen production in *Escherichia coli*. Int. J. Hydrogen Energy 33, 2409–2412, 2008.
9. McKinlay J.B., Harwood C.S. Photobiological production of hydrogen as a biofuel. Curr. Opin. Biotechnol., 21, 244–251, 2010.
10. Rashid N., Lee K., Han J-in., Gross M. Hydrogen production by immobilized *Chlorella vulgaris*: optimizing pH, carbon source and light. Bioprocess Biosyst. Eng., 36, 867–872, 2013.
11. Trchounian A. Mechanisms for hydrogen production by different bacteria during mixed-acid and photo-fermentation and perspectives of hydrogen production biotechnology. Crit. Rev. Biotechnol. 35, 103–113, 2015.
12. Uyar B., Eroglu I., Yücel M., Gündüz U., Türker L. Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors. Int. J. Hydrogen Energy 32, 4670–4677, 2007.