



Биол. журн. Армении, 1 (71), 2019

КОМБИНИРОВАНИЕ ИОНОВ Mg(II) И Fe(II) КАК ПОДХОД К ПОВЫШЕНИЮ ВЫХОДА ВОДОРОДА В *RHODOBACTER SPHAEROIDES*

Л.С. ГАБРИЕЛЯН

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

Исследовано влияние ионов металлов (Mg и Fe) в различных концентрациях и сочетаниях на фотоферментативное выделение водорода (H_2) пурпурной бактерией *Rhodobacter sphaeroides* MDC6522. Железо и магний относятся к микроэлементам, необходимым для роста и метаболизма пурпурных бактерий. Комбинированное действие 5 мМ Mg(II) и 80 мкМ Fe(II) повышало рост бактерии в 1.5 раза по сравнению с контрольным образцом. При этом, выход H_2 в *Rh. sphaeroides* возрастал в 2.3 раза, вероятно, за счет активации соответствующего фермента – нитрогеназы. Для определения роли протонной АТФазы в этом процессе было исследовано комбинированное действие данных ионов на АТФазную активность мембранных везикул *Rh. sphaeroides*. В присутствии 5 мМ Mg(II) и 80 мкМ Fe(II) АТФазная активность возрастала на 67 %, свидетельствуя о взаимосвязи между выходом H_2 и АТФазной активностью. Таким образом, комбинирование ионов железа и магния способствует фотовыделению H_2 *Rh. sphaeroides*. Полученные результаты важны для выявления регуляторных путей метаболизма H_2 в пурпурных бактериях.

Ионы металлов – фотовыделение водорода – параметры роста –
Rhodobacter sphaeroides

Ուսումնասիրվել է մետաղների (Mg և Fe) իոնների տարբեր կոնցենտրացիաների համակցված ազդեցությունը *Rhodobacter sphaeroides* MDC6522 ծիրանագույն բակտերիաներում ֆոտոսինթեզի ընթացքում ջրածնի (H_2) արտադրության վրա: Երկաթը և մագնեզիումը միկրոտարրեր են, որոնք անհրաժեշտ են ծիրանագույն բակտերիաների աճի և կյանքափոխանակության համար: 5 մՄ Mg(II) և 80 մկՄ Fe(II) համակցումը խթանում էր բակտերիայի աճման արագությունը 1.5 անգամ ստուգիչի համեմատությամբ: Ավելին, H_2 -ի ելքը *Rh. sphaeroides*-ում աճել է 2.3 անգամ, ինչը կարող է պայմանավորված լինել համապատասխան ֆերմենտի՝ նիտրոգենազի ակտիվացման հետ: Այս գործընթացում պրոտոնային ԱՖՖազի դերի պարզաբանման համար ուսումնասիրվել է տվյալ իոնների համակցված ազդեցությունը *Rh. sphaeroides*-ի թաղանթային բշտիկների ԱՖՖազային ակտիվության վրա: 5 մՄ Mg(II) և 80 մկՄ Fe(II) առկայությամբ ԱՖՖազային ակտիվությունը աճել է 67 %-ով, վկայելով H_2 -ի ելքի և ԱՖՖազային ակտիվության փոխկապակցվածության մասին: Այսպիսով, երկաթի և մագնեզիումի իոնների համակցումը խթանում է *Rh. sphaeroides*-ում H_2 -ի ֆոտոարտադրությունը: Ստացված տվյալները կարևոր են ծիրանագույն բակտերիաներում H_2 -ի կյանքափոխանակության կարգավորման ուղիների պարզաբանման համար:

Մետաղների իոններ – ջրածնի ֆոտոարտադրություն – աճման չափանիշներ –
Rhodobacter sphaeroides

The effect of metal (Mg and Fe) ions in different concentrations and combinations on photo-fermentative H_2 production by purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides* MDC6522 has been determined. Iron and magnesium are microelements, which are necessary for the growth and metabolism of purple bacteria. The simultaneous addition of 5 mM Mg(II) and 80 μ M Fe(II)

enhanced bacterial growth rate by ~1.5-fold, in comparison to control sample. Moreover, the H₂ yield in *Rh. sphaeroides* was enhanced by ~2.3-fold, which can be connected with activation of the corresponding enzyme, nitrogenase. For revealing the role of proton ATPase the effect of these metal ions combination on ATPase activity of *Rh. sphaeroides* membrane vesicles has been studied. In the presence of 5 mM Mg(II) and 80 μM Fe(II) stimulation of ATPase activity by 67 % was observed, testifying a relationship between the yield of H₂ and ATPase activity. Thus, the combination of iron and magnesium ions stimulates the H₂ photoproduction by *Rh. sphaeroides*. The obtained results are significant for revealing the regulatory pathways of H₂ metabolism in purple bacteria.

Metal ions – hydrogen photoproduction – growth properties – Rhodobacter sphaeroides

Молекулярный водород (H₂) является перспективным источником экологически чистой энергии и может сыграть важную роль в энерготехнологиях будущего. Первые работы о биологическом выделении молекулярного водорода (H₂) посвящены пурпурным бактериям, представители которых способны выделять H₂ в фотогетеротрофных условиях, а также при азотфиксации [1,2,10,14]. Впервые Гест и Камен описали процесс светозависимого выделения H₂ пурпурной бактерией *Rhodospirillum rubrum*, получивший название “фотовыделения водорода” [1]. В процессе бескислородного фотосинтеза, осуществляемого пурпурными бактериями, различные органические кислоты (янтарная, яблочная и др.) могут расщепляться до протонов, CO₂ и H₂ [2,5,14]. После поглощения кванта света светособирающим комплексом энергия возбуждения достигает реакционного центра и электрон переносится к убихинону и комплексу цитохром bc₁. Циклический перенос электрона завершается восстановлением фотоокисленного РЦ цитохромом c₂ и генерацией протонного градиента, который используется для переноса электронов к ферредоксину, а также для синтеза АТФ протонной АТФазой. Затем ферредоксин и АТФ участвуют в производстве H₂ при участии нитрогеназы. Это так называемый “фотоферментативный” путь выделения водорода [5,10,14].

Ионы металлов, таких как железо (Fe), магний (Mg), молибден (Mo) и другие, необходимы для роста и метаболизма большинства микроорганизмов [3, 4, 7, 13, 15]. Fe и Mg являются компонентами питательной среды пурпурных бактерий [3, 6, 8, 9]. Fe входит в состав ферментов, участвующих в метаболизме H₂ в пурпурных бактериях, нитрогеназы и мембраносвязанной гидрогеназы, а также в состав переносчиков фотосинтетической электронтранспортной цепи – ферредоксина и цитохромов [2, 3, 8, 9]. Ион магния является активатором разных ферментов, а также входит в состав клеточных стенок, плазматических мембран и фотосинтетических пигментов – хлорофиллов и бактериохлорофиллов [6,9].

В ряде работ исследовано действие ионов разных металлов на параметры роста и жизнедеятельность различных бактерий [7-9,14]. Трчуняном и соавторами [12] показано стимулирующее действие ионов разных металлов и их сочетаний на процессы темнового выделения H₂ *Escherichia coli*. Однако данные о комбинированном действии ионов металлов на фотоферментативное выделение H₂ отсутствуют.

Целью настоящей работы является изучение влияния Mg(II) и Fe(II) в различных концентрациях и сочетаниях на фотоферментативное выделение H₂ *Rhodobacter sphaeroides* MDC6522, выделенной из минеральных источников Армении. Данное исследование поможет найти оптимальные комбинации ионов железа и магния для увеличения эффективности производства H₂. Полученные результаты важны для выявления регуляторных путей метаболизма H₂ в пурпурных бактериях.

Материал и методика. В работе использовалась пурпурная несерная бактерия *Rh. sphaeroides*, шт. MDC6522 (Центр депонирования микроорганизмов НАН Армении, Ереван, Армения, WDCM803). *Rh. sphaeroides* выращивались в анаэробных условиях на питательной среде Ормерода, содержащей сукцинат (30 мМ) в качестве источника углерода и дрожжевый экстракт (2 г/л) в качестве источника азота и витаминов, в термостате типа ТПС-3 при pH 7.5±0.2, температуре 30±0.2 °C и освещении 2000 люкс [4,5]. Удельную скорость роста (μ) определяли как частное от деления $0.693 (\ln 2)$ на время удвоения ОП в интервале, когда изменение ОП во времени носило линейный характер: $\mu = 0.693/\tau$, где τ – время удвоения ОП суспензии бактерий [4,5]. Для освещения использовали галогеновые лампы (мощность – 60 Вт). Интенсивность света измеряли люксметром LM37 (Carl Roth, Germany). Рост *Rh. sphaeroides* контролировали путем измерения оптической плотности (ОП) суспензии на спектрофотометре Spectro UV-Vis Auto (Labomed, США) при длине волны 660 [4,5]. Ионы металлов добавляли непосредственно в питательную среду в виде солей ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): Mg(II) в концентрации 1, 5 и 10 мМ; Fe(II) – 40 и 80 мкМ.

Для определения величины окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) использовали цифровые иономеры И-160 МП (Гомельский завод измерительных приборов, г. Гомель, Беларусь) с платиновым (ЭПВ-01) и титан-силикатным (ЭО-21) электродами, как описано ранее [4,5]. Выход H_2 рассчитывали по изменению величины ОВП и выражали в ммоль H_2 /л культуры [4,6]. АТФазную активность определяли по высвобождению неорганического фосфора ($\text{P}_\text{н}$) после реакции суспензии мембранных везикул с АТФ и выражали в количестве $\text{P}_\text{н}$, высвобождаемого в единицу времени на мг белка. Количество $\text{P}_\text{н}$ определяли колориметрически по методу Тауски и Шора [4, 5].

В работе использовали реактивы аналитической чистоты (Carl Roth GmbH, Германия, Sigma Aldrich, США). Приводятся средние данные из 3-5 независимых экспериментов со стандартной ошибкой [4].

Результаты и обсуждение. В данной работе исследовали комбинированное действие различных концентраций ионов Mg(II) и Fe(II) на параметры роста (оптическая плотность, удельная скорость роста и ОВП среды) пурпурной бактерии *Rh. sphaeroides* MDC6522. Fe(II) и Mg(II) являются компонентами питательной среды Ормерод пурпурных бактерий (в концентрации 1 мМ Mg(II) и 40 мкМ Fe(II)).

Все комбинации ионов стимулировали рост *Rh. sphaeroides*, что указывает на то, что Mg(II) и Fe(II) способствуют росту фототрофных бактерий (рис. 1А). Интересным является тот факт, что данный штамм *Rh. sphaeroides* не способен к росту в отсутствие ионов Mg(II) , подтверждая необходимость данного иона для фотосинтезирующих бактерий [6]. Как известно, магний входит в состав основного фотосинтетического пигмента пурпурных бактерий – бактериохлорофилла.

Также было исследовано действие ионов металлов на удельную скорость роста *Rh. sphaeroides*. В присутствии 80 мкМ Fe(II) и разных концентраций Mg(II) удельная скорость роста была выше, чем у контрольного образца (40 мкМ Fe(II) и 1 мМ Mg(II)) (рис. 1Б). Наиболее интенсивный рост наблюдался в присутствии 80 мкМ Fe(II) и 5 мМ Mg(II) : удельная скорость роста превышала скорость роста контроля в ~1.5 раза (рис. 1Б). В *E. coli* Fe(II) может переноситься неспецифической системой переноса магния *CorA* наряду с Mg(II) [11]. Наличие таких систем важно для бактерий, живущих в анаэробных условиях [11].

Как известно, в процессе фототрофного роста *Rh. sphaeroides* наблюдается синтез фотосинтетического аппарата, который представлен двумя светособирающими комплексами (B800-850 and B875), окружающими реакционный центр [12].

В состав светособирающих комплексов входят белки и фотосинтетические пигменты (бактериохлорофилл (Бхл) *a* и каротиноиды). Для исследования действия ионов металлов на формирование фотосинтетического аппарата были получены спектры поглощения клеток *Rh. sphaeroides*, выращенных в присутствии Fe(II) и Mg(II) .

Как показано на рис. 2, во всех спектрах поглощения в диапазоне длин волн 400–1000 нм наблюдаются несколько максимумов, типичных для пурпурных бактерий [6,12].

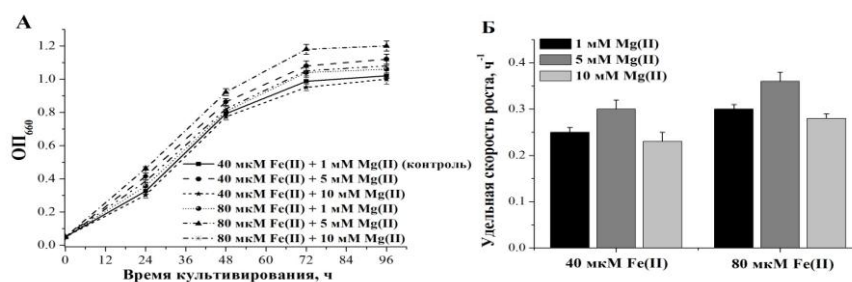


Рис. 1. Изменение оптической плотности (А) и удельной скорости роста (Б) *Rh. sphaeroides* MDC6522 при комбинированном действии Fe(II) и Mg(II)

Эти максимумы указывают на наличие каротиноидов (450, 478 и 510 нм) и Бхл *a* (590, 800, 850 и 875 нм), соответственно.

Как показано на рис. 2, разные концентрации Fe(II) и Mg(II) влияют на формирование фотосинтетических пигментов *Rh. sphaeroides*. При добавлении 80 мкМ Fe(II) и 5 мМ Mg(II) наблюдается рост максимумов поглощения, типичных для каротиноидов, и уровня комплекса В800-850 (рис. 2). Известно, что комплекс В800-850 участвует в аккумуляции и передаче световой энергии реакционному центру.

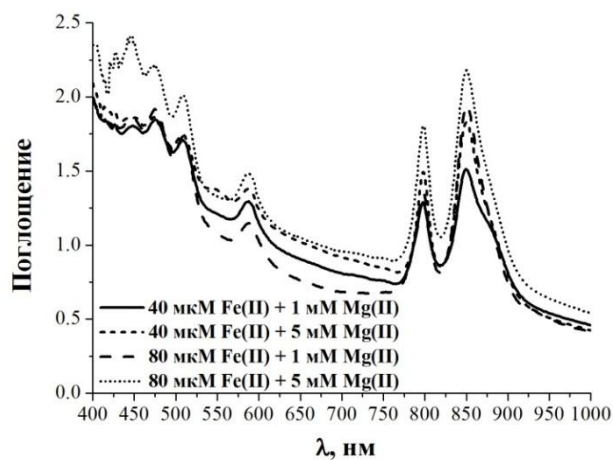


Рис. 2. Спектры поглощения суспензии *Rh. sphaeroides* MDC6522, выращенной в анаэробных условиях при освещении в присутствии Fe(II) и Mg(II)

Окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) среды – важный параметр, определяющий анаэробный рост бактерий [5,13,15]. ОВП суспензии *Rh. sphaeroides*, измеряемый платиновым электродом, постепенно снижался при наличии в среде ионов металлов. Падение ОВП было наиболее интенсивным (-725 ± 20 мВ) в присутствии 80 мкМ Fe(II) и 5 мМ Mg(II) (рис. 3А).

Падение ОВП указывает на повышение восстановительных процессов, связанных с формированием конечных продуктов брожения, а также может свидетельствовать о производстве H₂ [5, 13].

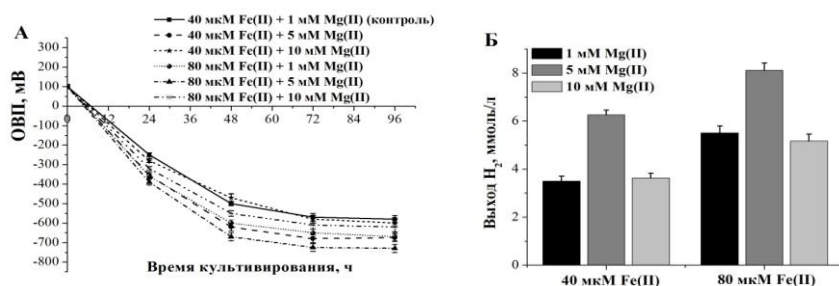


Рис. 3. Комбинированное действие Fe(II) и Mg(II) на ОВП среды и выход H_2 в *Rh. sphaeroides* MDC6522 в процессе анаэробного роста при освещении

Обнаружено, что выход H_2 в среде с 80 мкМ Fe(II) и 5 мМ Mg(II) в 2.3 раза превышает выход водорода в контрольном образце (40 мкМ Fe(II) и 1 мМ Mg(II)) (рис. 3Б). Выход H_2 в среде с 40 мкМ Fe(II) и 10 мМ Mg(II) совпал с выделением H_2 в контрольном образце (рис. 3Б). Увеличение выхода H_2 возможно за счет активации соответствующего фермента – нитрогеназы. Интересным является тот факт, что в отсутствие в среде Fe(II) выделения H_2 не происходило (не показано). Таким образом, увеличение концентрации ионов железа и магния и их комбинирование заметно повышают выход H_2 в *Rh. sphaeroides* в процессе анаэробного роста при освещении.

Для определения механизмов выделения H_2 и роли протонной F_0F_1 -АТФазы в этом процессе было исследовано комбинированное действие ионов Fe(II) и Mg(II) на N,N' -дициклогексилкарбодиимид (ДЦКД)-чувствительную АТФазную активность мембранных везикул *Rh. sphaeroides*. При добавлении 80 мкМ Fe(II) и 1-5 мМ Mg(II) АТФазная активность возрастала на 33 и 67 %, соответственно (рис. 4). Полученные данные свидетельствуют о взаимосвязи между выходом водорода и АТФазной активностью. Кроме того, отмеченные ионы металлов могут взаимодействовать непосредственно с протонной АТФазой, повышая выход H_2 .

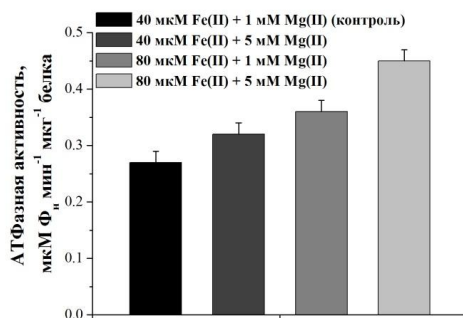


Рис 4. АТФазная активность мембранных везикул *Rh. sphaeroides* при комбинированном действии Fe(II) и Mg(II)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что Fe(II) и Mg(II) влияют на фототрофный рост бактерии *Rh. sphaeroides*. Комбинированное действие ионов металлов выражается в повышении выделения H_2 *Rh. Sphaeroides*. В отсутствие Fe(II) выделения H_2 не происходит, что подтверждает важную роль данного иона в производстве водорода. Более того, при комбинированном действии наблюдается рост максимумов поглощения, типичных для каротиноидов, и уровня светособирающих комплексов B800-850. Эти комплексы участвуют в аккумуляции и передаче световой энергии реакционному центру, тем самым повышая выход H_2 . Кроме того, данные ионы влияют на ДЦКД-чувствительную АТФазную активность мембранных везикул *Rh. sphaeroides*, свидетельствуя о взаимосвязи между выходом водорода и мембраносвязанной протонной АТФазой.

Пути повышения выхода H_2 пурпурными бактериями включают исследования новых аспектов в метаболизме водорода путем регулирования активности мембраносвязанных ферментов. Полученные данные помогут найти новые пути регуляции фотовыделения H_2 .

ЛИТЕРАТУРА

1. Кондратьева Е.Н., Гоготов И.Н. Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. М., Наука, 344 с., 1981.
2. Цыганков А.А., Хуснутдинова А.Н. Участие H_2 в метаболизме пурпурных бактерий и перспективы практического использования. Микробиол., 84, 3-26, 2015.
3. E., Gündüz U., Yücel M., Eroglu I. Effect of iron and molybdenum addition on photofermentative hydrogen production from olive mill wastewater. Int. J. Hydrogen Energy, 36, 5895-5903, 2011.
4. 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.
5. Gabrielyan L., Sargsyan H., Trchounian A. Novel properties of photofermentative biohydrogen production by purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides*: effects of protonophores and inhibitors of responsible enzymes. Microb. Cell Fact., 14, 131-140, 2015.
6. Hakobyan L., Gabrielyan L., Trchounian A. Ni (II) and Mg (II) ions as factors enhancing biohydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* from mineral springs. Int. J. Hydrogen Energy, 37, 7486-7491, 2012.
7. Gou Ch., Guo J., Lian J., Guo Y., Jiang Z., Yue L., Yang J. Characteristics and kinetics of biohydrogen production with Ni^{2+} using hydrogen-producing bacteria. Int. J. Hydrogen Energy, 40, 161-167, 2015.
8. Kars G., Gündüz U., Yücel M., Türker L., Eroglu I. Hydrogen production and transcriptional analysis of *nifD*, *nifK* and *hupS* genes in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 grown in media with different concentrations of molybdenum and iron. Int. J. Hydrogen Energy, 31, 1536-1544, 2006.
9. Liu B.F., Ren N.Qi., Ding J., Xie G.J., Guo W.Q. The effect of Ni^{2+} , Fe^{2+} and Mg^{2+} concentration on photo-hydrogen production by *Rhodospseudomonas faecalis* RLD-53. Int. J. Hydrogen Energy, 34, 721-726, 2009.
10. Mishra P., Krishnan S., Rana S., Singh L., Sakinah M., Ab Wahid Z. Outlook of fermentative hydrogen production techniques: An overview of dark, photo and integrated dark-photo fermentative approach to biomass. Energy Strategy Rev., 24, 27-37, 2019.
11. Nies D.H. Microbial heavy-metal resistance. Appl. Microbiol. Biotechnol., 51, 730-750, 1999.
12. Tavano C.L., Donohue T.J. Development of the bacterial photosynthetic apparatus. Curr. Opin. Microbiol., 9, 625-631, 2006.

13. Trchounian K., Poladyan A., Trchounian A. Optimizing strategy for *Escherichia coli* growth and hydrogen production during glycerol fermentation in batch culture: Effect of some heavy metals and their mixture. *Appl. Energy*, 177, 335-340, 2016.
14. Trchounian K., Sawers R.G., Trchounian A. Improving biohydrogen productivity by microbial dark-and photo-fermentations: Novel data and future approaches. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 80, 1201-1216, 2017.
15. Vardanyan Z., Trchounian A. Cu(II), Fe(III) and Mn(II) combinations as environmental stress factors have distinguishing effects on *Enterococcus hirae*. *J. Environ. Sci.*, 28, 95-100, 2015.

Поступила 24.12.2018