

ЕЛЬЦОВА ЗИНАИДА АЛЕКСАНДРОВНА

Особенности роста и выделения водорода у штаммов пурпурной несерной
бактерии *Rhodobacter sphaeroides* с редуцированным фотосинтетическим
аппаратом

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте фундаментальных проблем биологии Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук **Цыганков Анатолий Анатольевич**

Официальные оппоненты: **Стадничук Игорь Николаевич**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, ведущий научный сотрудник.

Кеппен Ольга Игоревна, кандидат биологических наук, лаборатория физиологии и биохимии микробов, кафедра микробиологии, биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, старший научный сотрудник.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН)

Защита состоится «22» ноября 2016 г. в 15.30 на заседании диссертационного совета Д 501.001.21, созданного на базе биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, аудитория М-1.

Тел.8(495)939 54 83, эл.почта: npiskunkova@rambler.ru

Автореферат разослан « » сентября 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.б.н.

Пискункова Нина Федоровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Без энергии жизнь человечества немыслима. Все мы привыкли использовать в качестве источников энергии органическое топливо – уголь, газ, нефть. Однако их запасы в природе, как известно, ограничены. В современном мире с растущими показателями потребления и, как следствие, ограниченными энергоресурсами, стремительные обороты набирает развитие технологий получения энергии из альтернативных, возобновляемых источников.

Водород представляет собой экологически безопасный источник энергии. Он может быть получен из воды, и основным продуктом его сгорания также является вода. Основной проблемой является экологически безвредное его получение.

Фотосинтезирующие микроорганизмы способны к светозависимому выделению водорода. По сути это процесс запасаания солнечной энергии в энергии химических связей водорода. Пурпурные несерные бактерии (ПНСБ) способны к светозависимому выделению водорода за счет действия ферментного комплекса нитрогеназы в процессе анаэробного фотосинтеза, используя более восстановленный, чем вода, донор электронов. Скорости выделения водорода пурпурными бактериями выше, чем у других фотосинтезирующих микроорганизмов, однако, они всё еще недостаточны для практического использования. Существуют разные подходы увеличения скорости выделения водорода пурпурными несерными бактериями, и одним из них является использование мутантов с пониженным содержанием пигментов. Предполагается, что за счет снижения содержания пигментов возможно увеличение концентрации бактерий в единице объема фотобиореактора без проявления эффекта самозатенения, приводящего к падению скоростей выделения водорода. Снижение содержания пигментов у пурпурных бактерий возможно за счет удаления периферийной светособирающей антенны (LH2), содержащей наибольшее количество пигментов и не имеющей фотохимической активности.

Целью данной работы было сравнительное изучение роста и выделения водорода у штаммов *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* с полным и редуцированным фотосинтетическим аппаратом (РФСА-штаммов). Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1) Сравнить скорость роста в турбидостатном режиме у штаммов *Rba. sphaeroides* с полным фотосинтетическим аппаратом и РФСА-штаммов при различных значениях интенсивности света с использованием разных органических доноров электронов.

2) Изучить выделение водорода лимитированными по аммоний хемостатными культурами указанных штаммов при разных концентрациях клеток в фотобиореакторе.

3) Сравнить выделение водорода суспензиями указанных штаммов в широком диапазоне интенсивностей света при разных концентрациях клеток.

Научная новизна работы. В работе показано, что РФСА-штамм DBCΩ без LH2 требует для роста более высоких интенсивностей света, чем родительский штамм с полным набором светособирающих комплексов. Данный эффект наблюдался вне зависимости от вида используемого субстрата. В турбидостатных культурах штаммов DBCΩ и родительского $\mu_{\max}$ была максимальна при использовании сукцината, причем при увеличении интенсивности света культуры переходили с лимитирования светом на нелимитированный рост. Напротив, при использовании смеси ацетата и лактата $\mu_{\max}$ была значительно ниже. В этом случае лимитирование культур светом сменялось на лимитирование другим фактором, что показано впервые. В ходе экспериментов было выяснено, что в условиях непрерывного культивирования в режиме хемостат с лимитированием аммонием все использованные в работе штаммы *Rba. sphaeroides* выделяли водород с достаточно высокими скоростями. Максимальная объемная скорость выделения водорода ($52 \text{ мл час}^{-1} \text{ л}^{-1}$) получена для РФСА-штамма pRK puf DD13 при концентрации клеток $0,9 \text{ г л}^{-1}$. При высокой концентрации клеток способность клеточных суспензий к выделению водорода была максимальна у штаммов с редуцированным фотосинтетическим аппаратом. В то же время

суспензии клеток родительских штаммов с низкой концентрацией биомассы способны выделять водород со скоростями, сравнимыми с таковыми для РФСА-штаммов. Кроме того, показано, что суспензии клеток мутантных штаммов выделяют водород при экстремально высоких интенсивностях света, что для суспензий родительских штаммов не наблюдалось.

Практическая значимость. Показана перспективность применения непрерывных культур мутантных штаммов *Rba. sphaeroides* с редуцированным количеством пигментов для выделения водорода. Результаты проведенных исследований могут стать основой для создания технического задания на дальнейшие опытно-конструкторские работы по масштабированию процесса.

Показано, что наиболее эффективным субстратом для выращивания мутантных штаммов является сукцинат, который обеспечивает наибольшую скорость роста. Установлено, что для эффективного роста мутантных штаммов необходимы более высокие интенсивности света, чем для родительских штаммов. Обнаружено, что мутантные штаммы способны выделять водород с более высокой скоростью в расчете на единицу объема реактора, чем родительские, при этом процесс выделения водорода эффективно проходит при высоких интенсивностях света.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, Россия, 2009), 14-й и 16-й международных Пушкинских школах-конференциях молодых ученых «Биология наука XXI века» (Пушино, Россия, 2010; 2012), 9-й Международной Гидрогеназной конференции (Упсала, Швеция, 2010), Международной конференции «Изучение фотосинтеза для устойчивого развития» (Баку, Азербайджан, 2011; Пушино, Россия, 2014; Крит, Греция, 2015; Пушино, Россия, 2016), на Школе-конференции молодых ученых на базе Института фундаментальных проблем биологии РАН «Биосистема: от теории к практике» (Пушино, Россия, 2012).

Публикации. В рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, опубликованы 3 статьи по материалам диссертации. Опубликовано 11 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, а также разделов, где изложены результаты и их обсуждение. Работа включает в себя главу с выводами и список использованной литературы. Объем работы составляет 126 страниц, в ней содержится 10 рисунков и 10 таблиц. Список литературы включает 231 источник.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы штаммы пурпурной несерной бактерии *Rba. sphaeroides* с редуцированным фотосинтетическим аппаратом DBC Ω и pRK puf DD13 (без LH2), а также штамм дикого типа 2.4.1, являющийся родительским для DBC Ω , и рекомбинантный штамм pRK puf Δ LM1, синтезирующий полный фотосинтетический аппарат.

Инокулят культур использованных штаммов выращивался анаэробно на свету при 30°C на среде Ормеруда или на среде Хатнера. Для контроля микробиологической чистоты культуры использовали агаризованную среду PYS. Культивирование производилось аэробно, в темноте, при температуре 30°C.

Все использованные штаммы культивировали в фотобиореакторе (ФБР) на основе коаксиальных цилиндров объемом 1,5 л (Tsygankov et al., 1994). Рабочий объем составлял 0,50 и 0,75 л для разных штаммов в зависимости от условий эксперимента. Толщина слоя культуральной суспензии составляла 13 мм. Культивирование в ФБР происходило с использованием питательной среды Ормеруда, состав которой варьировался относительно источников углерода и концентрации (NH₄)₂SO₄ в зависимости от условий каждого эксперимента. Перемешивание осуществлялось посредством магнитной мешалки с лопастями, вращавшейся со скоростью 85-100 об мин⁻¹. Газовая фаза внутри ФБР была замещена аргоном, который подавался со скоростью 20 мл мин⁻¹. Культура освещалась лампами накаливания разной мощности в

зависимости от условий эксперимента. Температура (30°C), а также значение pH (7.0) поддерживались автоматически с помощью блока управления и компьютера со специально разработанным программным обеспечением. Необходимые титранты и питательная среда автоматически подавались в ФБР при помощи перистальтических насосов, согласно заданным параметрам.

Скорость выделения H_2 непрерывными культурами рассчитывали с учетом скорости подачи аргона и концентрации H_2 , которую измеряли методом газовой хроматографии, отбирая газовую фазу непосредственно из фотобиореактора. В суспензионных культурах скорость выделения водорода измеряли с использованием электрода Кларка.

Концентрацию бактериохлорофилла (БХл) *а* определяли спектрофотометрически в ацетон-метанольном экстракте (Clayton, 1966). Вес сухой биомассы определялся после отмывания и высушивания клеток при 80°C . Оптическую плотность культуральной суспензии определяли спектрофотометрически при длине волны 650 нм с использованием стеклянной кюветы с длиной оптического пути 1 мм. Концентрацию остаточного ацетата определяли методом газо-жидкостной хроматографии. Концентрацию лактата определяли ферментативно по восстановлению НАД лактатдегидрогеназой (Асатиани, 1969). Концентрацию NH_4^+ определяли микродиффузионным методом с реактивом Несслера (Любимов и др., 1968). Спектры оптического поглощения клеток пурпурных бактерий, а также выделенных пигментсодержащих мембран (ПСМ) и пигмент-белковых комплексов (ПБК) регистрировали спектрофотометрически.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Спектры поглощения экстрактов разрушенных клеток *Rhodobacter sphaeroides*

Интегрирование спектров хромофоров в диапазоне 410–900 нм показало (Рис.1), что при одинаковой концентрации клеток в суспензии ($\sim 0,5$ г л⁻¹ для пары pRKpuf Δ LM1: pRK puf DD13; $\sim 1,0$ г л⁻¹ для пары 2.4.1: DBC Ω) штаммы с полным фотосинтетическим аппаратом имели среднее значение оптической плотности в 1.5 и в 1.4 (Рис. 1) раза больше, чем штаммы без периферийной антенны. Это означает, что при одинаковой толщине освещаемого слоя интенсивность света, прошедшего через образец, будет больше в $\sim 1,5$ раза для суспензии обоих РФСА-штаммов по сравнению с родительскими штаммами.

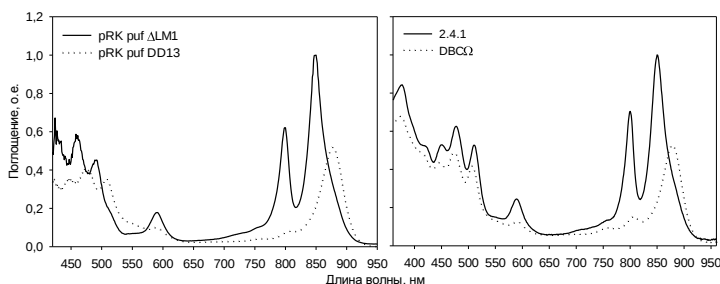


Рис. 1. Нормированные по БХл *a* (850 нм) спектры поглощения хромофоров штаммов *Rhodobacter sphaeroides*, использованных в работе.

Содержание БХЛ *a* в 1 г сухой биомассы в штаммах без периферийной антенны было меньше, чем в штаммах с полным фотосинтетическим аппаратом, в 6 раз (для пары pRKpuf Δ LM1: pRK puf DD13) и в 3 раза (для пары 2.4.1: DBC Ω , чем и обусловлено меньшее поглощение света штаммами без периферийной антенны.

Таким образом, даже на максимальном удалении от источника света культуры РФСА-штаммов будут освещаться более высокой интенсивностью света, что может позволить использование суспензий РФСА-штамма, в $\sim 1,5$

раза более концентрированных, по сравнению с суспензиями родительского штамма.

Влияние интенсивности света на скорость роста штаммов *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 и DBCΩ при использовании разных источников углерода

Скорость роста культур измеряли в режиме непрерывного культивирования турбидостат, где этот параметр измеряется по скорости подачи среды в ФБР при постоянной концентрации клеток. Для удобного сравнительного анализа полученные данные по скорости роста аппроксимировали с использованием классического уравнения Моно и уравнения Гомпертца, которое позволяет учитывать резкие изменения на графике зависимости.

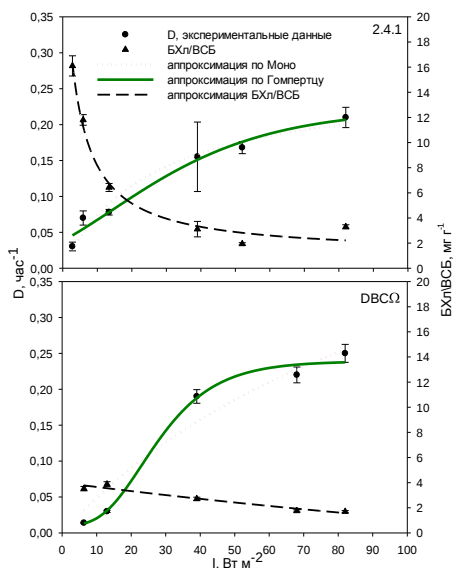


Рис. 2. Влияние интенсивности света на скорость роста и содержание БХЛ *a* в клетках штаммов 2.4.1 и DBCΩ, росших с использованием сукцината. Аппроксимация содержания БХЛ *a* в клетках производилась на основе уравнения затухающей гиперболы.

Максимальная скорость роста ($\mu_{\max}$) для обоих штаммов была получена при росте с использованием сукцината (Рис. 2). Аппроксимация экспериментальных данных по Моно имеет высокие коэффициенты корреляции для обоих штаммов. При этом как экспериментальные данные, так и параметры аппроксимации свидетельствуют

о том, что даже при 82 Вт м^{-2} скорости роста не достигают насыщения, т.е. в данном случае происходит переключение с лимитирования светом на нелимитированный рост.

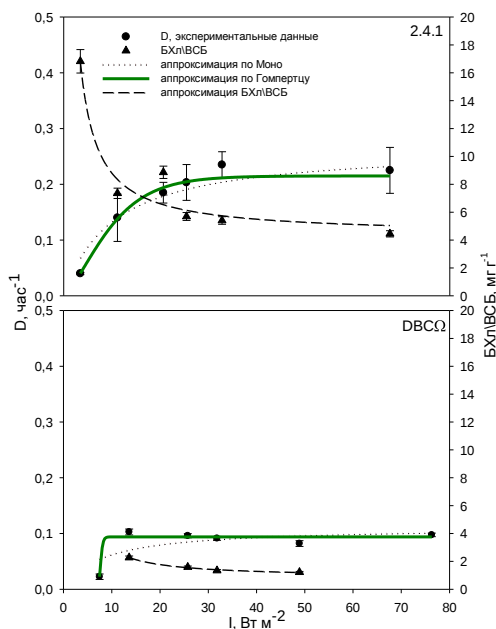


Рис. 3. Влияние интенсивности света на скорость роста и содержание БХл *a* в клетках штаммов 2.4.1 и DBCΩ, росших с использованием лактата. Аппроксимация содержания БХл *a* в клетках производилась на основе уравнения затухающей гиперболы.

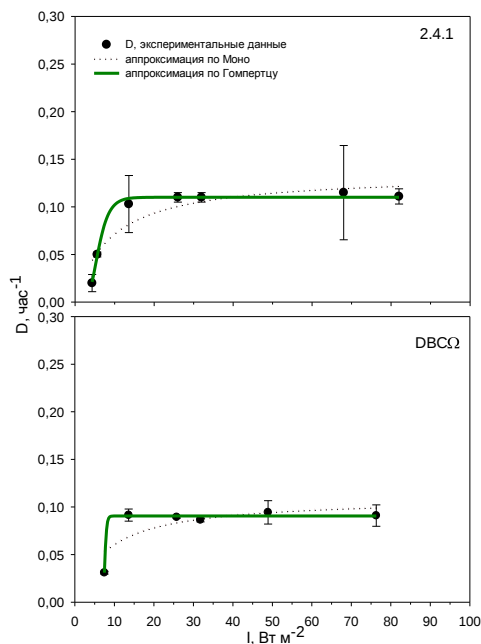
При росте родительского штамма 2.4.1 и РФСА-штамма DBCΩ на других органических кислотах, в частности, на лактате (Рис. 3) и смеси лактата и ацетата (Рис. 4), скорости роста были ниже, и составляли около $0,10 \text{ час}^{-1}$. Родительский штамм 2.4.1 рос на лактате со скоростью $0,22 \text{ час}^{-1}$ (Рис. 3).

В случаях, когда скорость роста исследуемых штаммов была невысокой, (рост на смеси лактата и ацетата, а также рост РФСА-штамма на лактате) наблюдались резкие перегибы графика зависимости скорости роста от интенсивности света в зоне низких значений интенсивности. Это объясняется переходом культуры из состояния лимитирования светом на лимитирование другим фактором, природу которого еще предстоит изучить. Возможно, это метаболические ограничения потребления органических кислот в условиях светолимитирования. Данное явление ранее показано не было.

При росте РФСА-штамма DBCΩ с использованием лактата (Рис. 3)

данные аппроксимации по Моно недостоверно отражают экспериментальные данные, так как коэффициент корреляции очень низкий. Аппроксимация по уравнению Гомпертца ближе к экспериментальным значениям. РФСА-штамм растет на лактате медленнее, чем штамм дикого типа. При этом максимальная скорость роста достигается у РФСА-штамма раньше, чем у штамма 2.4.1, хотя и начинает возрастать позже.

Рост на смеси лактата и ацетата (Рис. 4) также характеризуется низким



коэффициентом корреляции при аппроксимации по уравнению Моно. Аппроксимация по уравнению Гомпертца ближе к экспериментальным значениям.

Рис. 4. Влияние интенсивности света на скорость роста штаммов 2.4.1 и DBCΩ при использовании лактата и ацетата.

Скорость роста РФСА-штамма DBCΩ начинает быстро возрастать при более высоких интенсивностях света, чем для родительского штамма. Максимальная скорость роста достигается у РФСА-штамма раньше, чем у 2.4.1.

Таким образом, независимо от используемого источника углерода, в области лимитирующих рост интенсивностей света РФСА-штамм с пониженным содержанием пигментов начинает значительно ускорять свой рост при более высоких интенсивностях, чем родительский штамм. Это вполне ожидаемый результат, так как клетка, имеющая меньшее количество светособирающих пигментов, способна поглотить меньше света при низкой

его интенсивности.

Выделение водорода хемостатными аммоний-лимитированными культурами исследованных штаммов *Rba. sphaeroides*.

Хемостатное культивирование характеризуется заданной скоростью подачи среды в фотобиореактор при использовании лимитирующей концентрации одного из компонентов среды (в данном случае источника азота). Источником азота для культур исследуемых штаммов *Rba. sphaeroides* служил NH_4^+ в виде $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. При увеличении концентрации подаваемого $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ увеличивалась равновесная концентрация биомассы в фотобиореакторе.

Штамм pRK *ruf* ΔLM1 с полным фотосинтетическим аппаратом выделял водород со скоростями, которые оставались на одном уровне около 30 мл л⁻¹ час⁻¹, несмотря на увеличение входящей концентрации аммония. Скорость выделения H_2 РФСА-штаммом pRK *ruf* DD13 пропорционально увеличивалась с увеличением входящей концентрации сульфата аммония и достигала максимального значения 52 мл л⁻¹ час⁻¹ при 3 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. К сожалению, нам не удалось добиться равновесных концентраций РФСА-штамма при очень высоких концентрациях клеток, когда подаваемая среда содержала больше 3 мМ сульфата аммония. Культуры или вымывались, или имели значительные колебания концентрации биомассы в фотобиореакторе. Следует отметить, что другие авторы также отмечали нестабильность непрерывных культур *Rba. sphaeroides* при лимитировании источником азота (Franchi et al., 2004).

Ввиду нестабильности вышеописанных штаммов при непрерывном культивировании, в работу были включены штаммы *Rba. sphaeroides* 2.4.1 дикого типа и полученный на его основе РФСА-штамм DBCΩ. Штамм 2.4.1 выделял водород со скоростью, в среднем равной 19 мл л⁻¹ час⁻¹, вне зависимости от увеличения входящей концентрации сульфата аммония (увеличивалась с 1 до 3 мМ). РФСА-штамм выделял H_2 с максимальной скоростью 39 мл л⁻¹ час⁻¹ при 2 мМ сульфата аммония.

Таким образом, в условиях хемостата аммоний-лимитированные

культуры исследованных штаммов *Rba. sphaeroides* выделяют водород, при этом скорость процесса выше у концентрированных суспензий РФСА-штаммов. Однако, учитывая, что насыщающая интенсивность света для их роста была значительно выше, чем для штаммов с полным фотосинтетическим аппаратом, вызывало интерес изучение влияния интенсивности света на скорость выделения водорода используемыми штаммами.

Выделение водорода суспензиями клеток, отобранными из хемотратных культур с разной равновесной концентрацией биомассы

Для сравнения скоростей выделения водорода суспензиями клеток использовали культуры, выросшие в режиме хеостата (1 и 3 мМ сульфата аммония) при скорости протока 0,04 ч⁻¹; для штамма 2.4.1 использовалась скорость протока 0,02 час⁻¹. При этом происходила полная дерепрессия синтеза нитрогеназы. При 1 мМ (NH₄)₂SO₄ равновесная концентрация клеток в фотобиореакторе составляла 0,33-0,47 г ВСБ л⁻¹ (разбавленные суспензии), а при 3 мМ - 0,91-1,28 г ВСБ л⁻¹ (концентрированные суспензии). Измерения проводились в электрохимической ячейке с электродом Кларка при разных интенсивностях света.

Суспензия контрольного штамма pRK puf ΔLM1 с низким содержанием биомассы (Рис. 5А) выделяла водород с максимальной скоростью (59 мл л⁻¹ ч⁻¹) при интенсивности света 59,4 Вт м⁻². Дальнейшее увеличение интенсивности света не приводило к увеличению скорости выделения H₂. В отличие от контрольного штамма, у РФСА-штамма pRK puf DD13 (Рис. 5Б) скорость выделения H₂ возрастала вплоть до 479 Вт м⁻², но она была ниже, чем у контрольного штамма (32 мл л⁻¹ ч⁻¹).

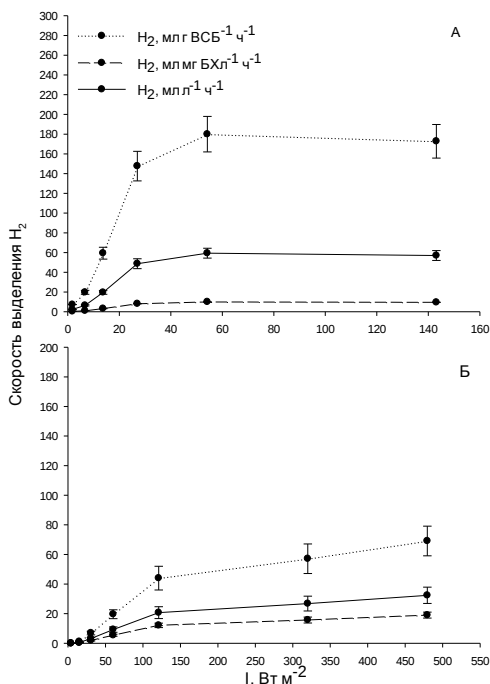


Рис. 5. Влияние интенсивности света на скорость выделения H_2 клетками штамма pRK puf Δ LM1 (А) и штамма pRK puf DD13 (Б), выросшими при 1 mM сульфата аммония в подаваемой среде.

При высокой концентрации клеток суспензии контрольного штамма проявляли максимальную скорость

выделения водорода при интенсивности света не более 20 Вт м^{-2} . Дальнейшее увеличение интенсивности света приводило к значительному снижению скорости выделения H_2 . При всех интенсивностях света скорость выделения водорода была очень низкой.

Суспензия РФСА-штамма pRK puf DD13 при высокой концентрации клеток выделяла H_2 в расчете на 1 л суспензии с наибольшей скоростью только при повышенных интенсивностях света. При 143 Вт м^{-2} скорости были сравнимы для штамма pRK puf Δ LM1 с низкой концентрацией клеток и штамма pRK puf DD13 с высокой концентрацией клеток. При максимальной изученной интенсивности света скорость выделения H_2 достигала $145 \text{ мл л}^{-1} \text{ч}^{-1}$, что превышало значения для штамма pRK puf Δ LM1 в любых изученных условиях.

У разбавленных суспензий контрольного штамма *Rba. sphaeroides* 2.4.1 увеличение скорости выделения H_2 происходило до интенсивности света примерно 300 Вт м^{-2} (насыщающая интенсивность). Скорость выделения H_2

для РФСА-штамма увеличивалась вплоть до интенсивности света, равной 360 Вт м⁻².

Скорость выделения Н₂ в расчете на 1 литр суспензии была выше для РФСА-штамма – 17 мл час⁻¹, при скорости у штамма 2.4.1, равной 9 мл час⁻¹. Таким образом, при пониженном количестве клеток в суспензии РФСА-штамм имел более высокую объемную скорость выделения Н₂ в сравнении со штаммом дикого типа.

При высокой концентрации биомассы (Рис. 6) максимальная скорость выделения Н₂ в пересчете на литр суспензии была также выше для РФСА-штамма, при этом данное утверждение справедливо как для пониженных интенсивностей света, так и для повышенных.

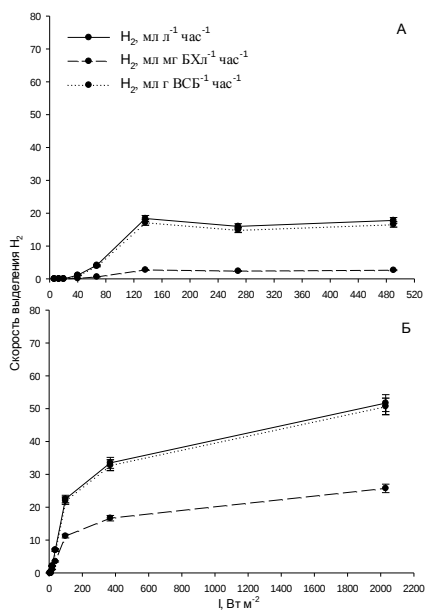


Рис. 6. Зависимость скорости выделения Н₂ от интенсивности света штамма *Rba. sphaeroides* 2.4.1 дикого типа (А) и РФСА-штамма DBCΩ (Б), выросшими при 3 мМ сульфата аммония в подаваемой среде.

Для всех исследованных штаммов скорости выделения Н₂ в электрохимической ячейке оказались выше, чем в ФБР, как минимум в 2 раза. Наибольшая разница в скоростях выделения Н₂ была получена для

РФСА-штамма pRK puf DD13 при повышенном содержании биомассы в суспензии: 52,2 мл л⁻¹ ч⁻¹ в ФБР против 144,7 мл л⁻¹ ч⁻¹, полученных в ячейке. Для другого РФСА-штамма отличие в скорости было меньшим, но также достаточно существенным: 31,4 в ФБР и 51,7 мл л⁻¹ ч⁻¹ в ячейке. Необходимо отметить, что для РФСА-штаммов разница была заметна как для

концентрированных суспензий, так и для разбавленных. Для родительских штаммов существенная разница в скорости выделения H_2 была получена только для суспензий, выросших при 1 мМ сульфата аммония.

Таким образом, нам удалось показать, что РФСА-штаммы способны выделять H_2 в расчете на 1 л суспензии с большей скоростью, чем штаммы с полным ФСА, при повышенном количестве биомассы в реакторе, а также при высоких интенсивностях света. При пониженном содержании биомассы и низких интенсивностях света преимущество РФСА-штаммов не столь очевидно, поэтому для дальнейшей оптимизации выделения H_2 такими штаммами необходим поиск более стабильных продуцентов и подбор условий для выделения H_2 .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием управляемого непрерывного культивирования в режиме турбидостата проведены сравнительные исследования влияния интенсивности света на рост штамма *Rba. sphaeroides* 2.4.1 и РФСА-штамма DBCΩ. Показано, что при использовании сукцината скорость роста увеличивается с увеличением интенсивности света в широком диапазоне интенсивностей, достигая максимальных значений у РФСА-штамма. При использовании лактата или смеси лактата с ацетатом лимитирование светом имеет место лишь в узком диапазоне интенсивностей света, после чего оно сменяется на лимитирование другим фактором, не обеспечивая высоких скоростей роста. В этих условиях РФСА-штамм не имеет преимуществ перед диким штаммом с точки зрения интенсивного культивирования. Однако, при использовании сукцината в качестве субстрата происходил переход от светолимитирования к светонасыщению, без лимитирования другим ростовым фактором. В таком случае культивирование РФСА-штамма возможно в более интенсивных условиях, чем родительского штамма, за счет увеличения интенсивности используемого света. В перспективе, учитывая значительно меньшее содержание пигментов, толщина освещаемого слоя при выращивании РФСА-штамма в фотобиореакторе с использованием сукцината может быть значительно увеличена, что приведет к интенсификации процессов

выращивания и получения полезных продуктов с использованием пурпурных бактерий.

Режим хемостатного культивирования в ФБР с лимитированием аммонием позволил исследовать выделение H_2 всеми используемыми в работе штаммами. Были получены данные по скорости выделения водорода культурами с разным содержанием биомассы: разбавленными и концентрированными. Развернутый анализ скорости выделения водорода суспензиями штаммов ПНСБ с разными концентрациями клеток в зависимости от интенсивности света был проведен впервые. В среднем, скорость выделения водорода в реакторе РФСА-штаммами была равна или несколько выше таковой для родительских штаммов, если рассматривать разбавленные культуры. При повышенном содержании биомассы РФСА-штаммы выделяли водород со скоростями, вдвое превышающими скорости родительских штаммов. В электрохимической ячейке скорость выделения H_2 концентрированной суспензией штамма pRK puf DD13 превышала таковую для родительского штамма в 2,5 раза. Приведенные данные позволяют утверждать, что применение РФСА-штаммов для интенсификации выделения водорода в ФБР является перспективным подходом, который может способствовать практическому применению данной технологии получения биоводорода.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

LN1 – коровая светособирающая антенна

LN2 – периферическая светособирающая антенна

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

ВСБ – вес сухой биомассы

БХл *a* – бактериохлорофилл *a*

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

ПБК – пигмент-белковый комплекс

ПНСБ – пурпурные несерные бактерии

ПСМ – пигментсодержащие мембраны

РФСА-штаммы – штаммы с редуцированным фотосинтетическим аппаратом

ФБР – фотобиореактор

ФСА – фотосинтетический аппарат

Rhodobacter (Rba.)

ВЫВОДЫ

1) В турбидостатных культурах *Rba. sphaeroides* (2.4.1 и DBCΩ), использующих сукцинат, с увеличением интенсивности света наблюдался переход с лимитирования светом на нелимитированный рост с высокой $\mu_{\max}$. При использовании других субстратов $\mu_{\max}$ была ниже, и лимитирование светом сменялось на лимитирование другим фактором, что показано впервые.

2) Экспериментальные данные и их кинетический анализ свидетельствуют, что в области низких интенсивностей света, независимо от используемого органического субстрата, турбидостатный рост РФСА-штамма DBCΩ ограничен по сравнению с родительским штаммом *Rba. sphaeroides*.

3) В условиях хемостата с лимитированием аммонием все использованные штаммы *Rba. sphaeroides* были способны к выделению водорода, причем максимальные скорости получены для РФСА-штаммов.

4) Суспензии РФСА-штаммов выделяют водород с максимальной скоростью при интенсивностях света, намного больших, по сравнению с родительскими штаммами.

5) Впервые проведен систематический анализ скорости выделения водорода суспензиями штаммов ПНСБ с разными концентрациями клеток в зависимости от интенсивности света. Суспензии родительских штаммов при низкой концентрации клеток выделяют водород со сравнимой или большей скоростью, чем РФСА-штаммы. При высокой концентрации клеток суспензии РФСА-штаммов выделяют водород с большей скоростью, чем родительские.

6) Максимальная скорость выделения водорода, полученная для РФСА-штамма *Rba. sphaeroides* pRK puf DD13 при максимально использованной интенсивности света 2270 Вт м⁻², превышала таковую для родительского штамма в 2,5 раза, при этом насыщения достигнуто не было. Эта разница показывает справедливость применения РФСА-штаммов для интенсификации выделения водорода пурпурными бактериями.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

1. **Ельцова З.А.**, Васильева Л.Г., Цыганков А.А. Выделение водорода рекомбинантными штаммами *Rhodobacter sphaeroides* с модифицированным фотосинтетическим аппаратом // Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т.46. № 5. С. 532-537.

2. **Ельцова З.А.** «Сравнительная характеристика штаммов с редуцированным фотосинтетическим аппаратом пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* при непрерывном культивировании»//Современные проблемы науки и образования. Издательство: Издательский Дом Академия Естествознания (Пенза) ISSN: 1817-6321. - 2014. - №3. - С. 622.

3. **Eltsova Z.**, Bolshakov M., Tsygankov A. Effect of light intensity and various organic acids on the growth of *Rhodobacter sphaeroides* LHII-deficient mutant in a turbidostat culture. Photosynth Res. First Online: 31 March 2016. doi: 10.1007/s11120-016-0254-x

Тезисы в сборниках конференций:

1. **Ельцова З.А.**, Васильева Л.Г., Цыганков А.А. «Выделение водорода рекомбинантными штаммами *Rhodobacter sphaeroides*»//Всероссийский симпозиум с международным участием Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов, Москва, МГУ им. М.В. Ломоносова, 2009, с. 59.

2. **Ельцова З.А.**, Васильева Л.Г., Цыганков А.А. «Выделение водорода рекомбинантными штаммами *Rhodobacter sphaeroides*»//14-я международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых Биология наука XXI века, Пушкино 2010, Т.2, стр. 357.

3. **Eltsova Z.**, Vasilieva L., Tsygankov A. «Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* recombinant strains with modified photosynthetic

apparatus»//The 9th International Hydrogenase Conference, Uppsala, Sweden, 2010, p.100

4. **Eltsova Z.**, Tsygankov A. «Purple bacteria mutants with low pigment content: do they have higher potential as hydrogen producers?»//The International Conference «Photosynthesis Research for Sustainability», Baku, Azerbaijan, 2011, p.145

5. **Ельцова З.А.**, Цыганков А.А «Изучение эффективности выделения водорода штаммами *Rhodobacter sphaeroides* с редуцированной светособирающей антенной»//16-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, 2012, с. 254

6. **Ельцова З.А.** «Преимущества в процессе выделения водорода штаммами *Rhodobacter sphaeroides* с редуцированной светособирающей антенной»//Школа-конференция молодых ученых на базе Института фундаментальных проблем биологии РАН «Биосистема: от теории к практике», Пущино, 2012, с.34

7. **Eltsova Z.**, Tsygankov A. Continuous cultures of *Rhodobacter sphaeroides*//International Conference Photosynthesis Research for Sustainability, Pushchino, Russia, 2014, p. 116.

8. **Eltsova Z.**, Tsygankov A. A comparative study of *Rhodobacter sphaeroides* mutants without peripheral light harvesting antenna//Photosynthesis Research for Sustainability, Greece, Crete, 2015, p. 96.

9. **Eltsova Z.**, Tsygankov A. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* mutants without LHII complex// International Conference Photosynthesis Research for Sustainability, Pushchino, Russia, 2016, p. 187.

ДЛЯ ЗАМЕТОК

