

УДК 633.74(043.2)

**УТВОРЕННЯ ВОДНЮ ФОТОТРОФНОЮ ЗЕЛЕНОЮ
МІКРОВОДОРОСТЮ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* DANG., 119 ЗА
УМОВ ДЕФІЦИТУ ЕЛЕМЕНТІВ ЖИВЛЕННЯ – СІРКИ ТА МАГНІЮ**

К.Б. ТРУШ

Національний авіаційний університет, м. Київ

*Досліджено продукування водню культурою зелених мікроводоростей *Chlamydomonas reinhardtii* Dang., 119 в умовах дефіциту магнію та сірки на тріс-ацетат-фосфатному середовищі. Встановлено, що водню синтезується більше при нестачі магнію, трохи менше за відсутністю сірки та одночасному дефіциті магнію та сірки. Виявлено, що дефіцит магнію та сірки значно погіршує стан фотосистеми і знижує рівень синтезу водню *Chlamydomonas reinhardtii* Dang., 119.*

Ключові слова: *зелені мікроводорості, *Chlamydomonas reinhardtii*, продукування водню мікроводоростями.*

Вступ. Водень – це екологічно чисте паливо, який має високу енергоємність, що в 3-5 разів перевищує аналогічний показник для бензину й нафти. Йому притаманні універсальні властивості: він є відновником, енергоносієм і паливом. Останнім часом значний інтерес викликають біологічні способи отримання водню. У цьому відношенні на особливу увагу заслуговують фотосинтезуючі організми, серед яких найперспективнішими є мікроводорості, оскільки їх вивчення дозволяє виявити взаємозв'язок фотосинтезу з процесом утворення водню [1].

Утворення молекулярного водню є одним з факторів регуляції анаеробного метаболізму клітин, воно широко розповсюджене в природі. Здатність деяких

одноклітинних зелених водоростей продукувати вільний водень показано у роботах багатьох вчених [1-7]. Фотопродукція водню мікрободоростями пов'язана з фотосинтетичним транспортним ланцюгом через специфічні переносники, ферменти – гідрогенази в анаеробних умовах та за стресових умов викликаних дефіцитом окремих елементів живлення в середовищі [3-5].

Метою роботи є – утворення водню фототрофною зеленою мікрободоростю *Chlamydomonas reinhardtii* Dang., 119 за умов дефіциту елементів живлення – сірки та магнію.

Матеріали та методи досліджень. Для проведення роботи використовували культуру зелених мікрободоростей *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. 119 з колекції відділу мембранології і фітохімії Інституту ботаніки ім М.Г. Холодного НАН України. Водорості вирощували на стерильному триацетат-фосфатному середовищі [8] (ТАР) (г/л): $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ – 2,4; NH_4Cl – 0,37; KH_2PO_4 – 0,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,10; $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; K_2HPO_4 – 0,72; Мікроелементи – 1 мл/л; CH_3COOH – 1 мл/л; pH = 6.8. За умов дефіциту сірки та магнію (в еквімолярних співвідношеннях): MgSO_4 замінювали на MgCl_2 – (позначення середовища ТАР-S); MgSO_4 замінювали на K_2SO_4 (позначення середовища ТАР-Mg); позначення середовища ТАР-MgSO₄ – виключення обох компонентів з середовища. Середовище ТАР використовували для накопичення біомаси водоростей.

Для накопичення біомаси культивування проводили на середовищі ТАР протягом 5 діб. Автотрофну культуру вирощували за $t = 25 \pm 2$ °C і цілодобовому освітленні білими флуоресцентними лампами ЛБ-40 з інтенсивністю фотосинтетичної активної радіації (ФАР) на поверхні колб $100 \text{ мкмоль фотонів} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Культивування водоростей за умов дефіциту сірки та магнію проводили з інтенсивністю ФАР $310 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Для забезпечення постійного перемішування культури фототрофних мікрободоростей використовувалася магнітна мішалка. Перемішування та освітлення на протязі всього досліду не припинялося.

Культуру мікроводоростей відмивали від середовища ТАР, щоб перенести на інші середовища без сірки та магнію. Для цього культуру центрифугували (за використання центрифуги ЦЛК-1) 20 хв при 2500 об/хв, триразово відмивали дистильованою водою і ресуспондували в середовища ТАР-без S, ТАР-без Mg, ТАР-без MgSO₄.

Після розчинення осаджених і концентрованих клітин мікроводоростей *Chlamydomonas reinhardtii* Dang., 119, їх вносили у колби Ерленмейєра ємністю 150 мл. Для забезпечення анаеробних умов під час культивування мікроводоростей та збору водню було створено установку (рис. 1), в якій водень розраховували шляхом витіснення рідини [6]. Кількість водню визначали в мл та перераховували в %. За 100 % брали – 20 мл об'єму градуйованого посуду для збору водню.

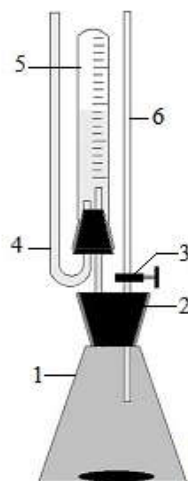


Рис. 1. Збір водню шляхом витіснення рідини при культивуванні мікроводоростей за анаеробних умов: 1 – колба Ерленмейєра; 2 – гумовий корок; 3 – штуцер; 4 – V-подібна скляна трубка; 5 – градуйований посуд для збору водню; 6 – трубка для рідини

Підрахунок кількості клітин проводили кожного дня за допомогою камери Горяєва при 200-разовому збільшенні світлового мікроскопу. Клітини на сітці камери фотографували цифровою камерою. Отримані зображення оброблювали за допомогою комп'ютерної програми Image Tool 3.0. [6].

Індукцію флуоресценції хлорофілу *a* визначали за загальноприйнятою методикою на флуориметрі ХЕ-РАМ [9]. Інтенсивність актинічного (діючого) світла відповідала інтенсивності освітлення при культивуванні водоростей ($100 \text{ мкмоль фотонів} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$). Клітини перед початком експерименту адаптували до темряви протягом 10 хв для повного окиснення Q_A всіх комплексів ФС II. Запис даних у форматі файлів Excel проводили за допомогою мультимера UT-60E (Тайвань), з'єданого з комп'ютером. За параметрами кривої індукції флуоресценції хлорофілу *a* було обчислено: максимальний квантовий вихід (F_v/F_m), ефективний квантовий вихід (F_v'/F_m'), фотохімічне гасіння флуоресценції хлорофілу (qP), не фотохімічне гасіння флуоресценції за Штерном-Вольмером (NPQ), квантовий вихід електронного транспорту у ФСII (Φ_{PSII}) [10].

Результати досліджень та їх обговорення. Для дослідження культивування мікрводостей *Chlamydomonas reinhardtii* Dang., 119 на середовищі TAP ми вносили в колбу з середовищем початкову концентрацію клітин $-18 \cdot 10^7$ кл/мл. Культивували п'ять діб, щоденно відбираючи суспензію клітин для підрахунку, для будови графіку (рис. 2).

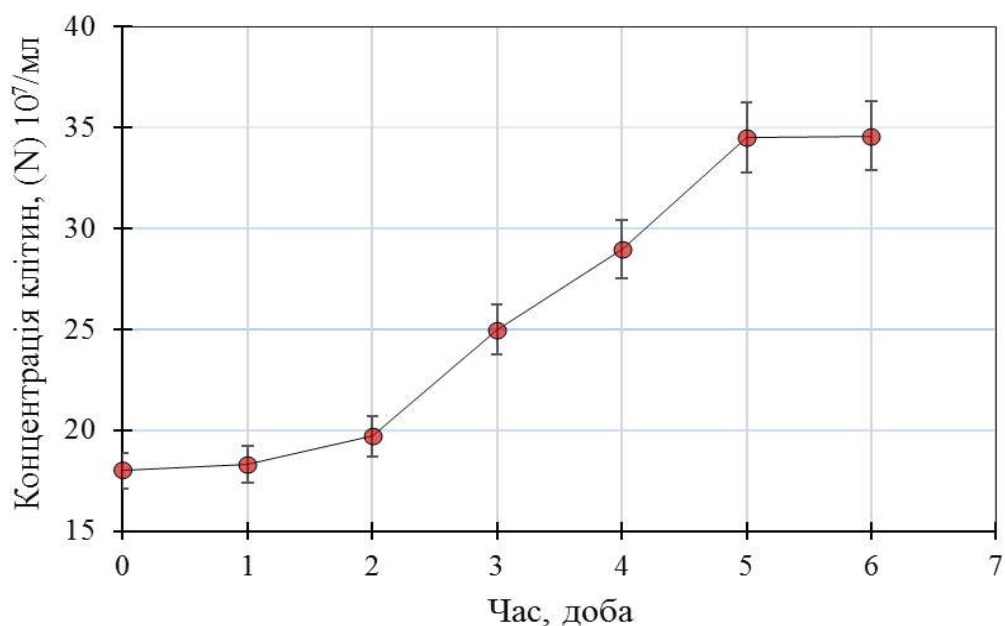


Рис. 2. Концентрація клітин (N) в культурі *Chlamydomonas reinhardtii* Dang., 119 протягом п'яти діб культивування

Накопичення біомаси культурою *Chlamydomonas reinhardtii* Dang., 119 при культивуванні на тріс-ацетат-фосфатному (ТАР) досягає максимальної щільності клітин $35 \cdot 10^7$ кл/мл на 5 добу. Інокулят для подальших дослідів відбирали в експоненційній фазі росту – на 3–4 добу.

Дослідження з виділення водню за культивування *C. reinhardtii* Dang., 119 за умов дефіциту сірки та магнію в середовищах проводили на протязі 7 діб (рис. 3).



Рис. 3. Візуальне спостереження утворення водню та біомаси *C. reinhardtii* Dang., 119 за 7 діб культивування: А) на середовищі ТАР-без Mg; Б) на середовищі ТАР-без S; В) на середовищі ТАР-MgSO₄

Було виявлено, що виділення водню починається вже після 10 годин культивування (рис. 4, таб. 1). Кількість водню на першу добу культивування на середовищах з дефіцитом сірки та магнію та на голодному середовищі без сірки та магнію досягала значень – 0,7 мл водню (3,5 %), 1,0 мл водню (5 %), на середовищі без сірки та магнію – 0,4 мл водню (2 %), відповідно. Найбільшу кількість водню спостерігали на п'яту добу культивування водоростей на середовищі ТАР-без Mg – 8,5 мл (42 %), трохи менше – 7,5 мл (37,5 %) на середовищі ТАР-без S, а найменші показники на середовищі ТАР-без MgSO₄ – 4,2 мл (21 %).

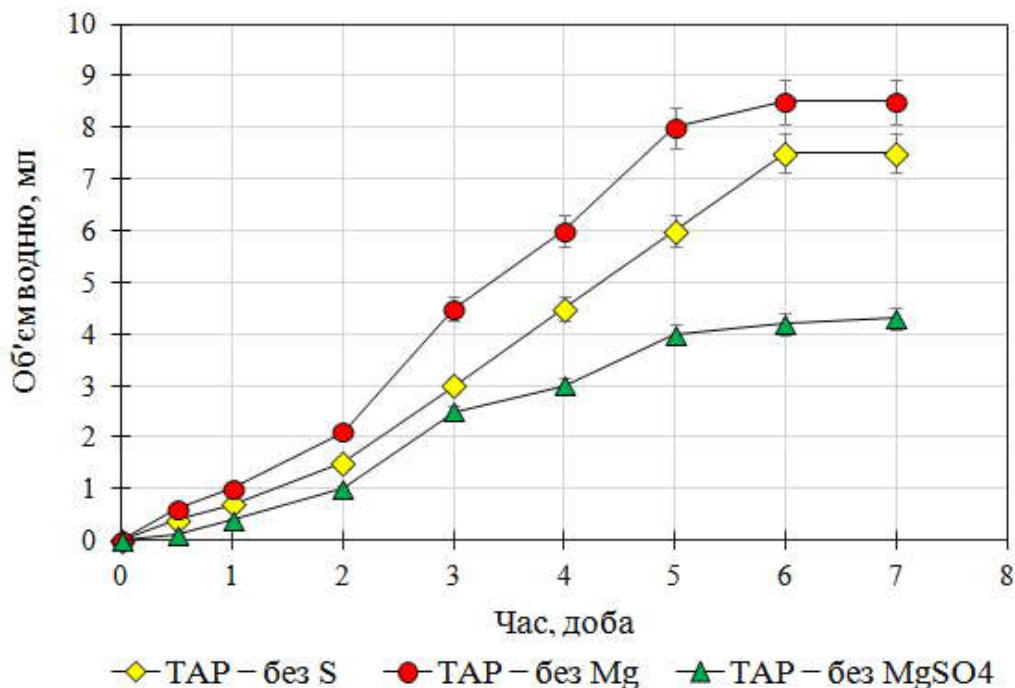


Рис. 4. Динаміка виділення водню культурою *C. reinhardtii* Dang., 119 в анаеробних умовах на середовищах без сірки та магнію

Таблиця 1

Виділення водню *C. reinhardtii* Dang., 119 в анаеробних умовах на середовищах без сірки та магнію

Час, доба	Середовища культивування					
	TAP-без S		TAP-без Mg		TAP-без MgSO ₄	
	H ₂ , мл	H ₂ , %	H ₂ , мл	H ₂ , %	H ₂ , мл	H ₂ , %
12	0,4±0,02	2,0	0,6±0,03	3,0	0,1±0,04	0,5
1	0,7±0,03	3,5	1,0±0,04	5,0	0,4±0,02	2,0
2	1,5±0,07	7,5	2,1±0,08	10,5	1,0±0,05	5,0
3	3,0±0,15	15,0	4,5±0,18	22,5	2,5±0,12	12,5
4	4,5±0,20	22,5	6,0±0,24	30,0	3,0±0,15	15,0
5	6,0±0,30	30,0	8,0±0,32	40,0	4,0±0,20	20,0
6	7,5±0,20	37,5	8,5±0,34	42,0	4,2±0,25	21,0
7	7,5±0,20	37,5	8,5±0,34	42,0	4,3±0,25	21,5

Про вплив дефіциту сірки та магнію на ефективність фотосинтетичного перетворення енергії можна судити за кривими індукції флуоресценції хлорофілу *a*. Згідно отриманих даних (таб. 2, рис. 5) було виявлено, що

ефективність фотосинтезу F_v/F_m , квантовий вихід електронного транспорту (Φ_{PSII}), ефективний квантовий вихід (F'_v/F'_m) і нефотохімічне гасіння флуоресценції – знижуються у всіх варіантах середовищ в порівнянні з контролем (ТАР).

Таблиця 2

Параметри індукції флуоресценції хлорофілу *a*
***C. reinhardtii* Dang., 119**

Середовище	F_v/F_m	qP	NPQ	Φ_{PSII}	F'_v/F'_m
ТАР (контроль)	0,72±0,001	0,62±0,02	0,18±0,014	0,39±0,01	0,63±0,008
ТАР – без S	0,29±0,015	0,77±0,02	0,1±0,001	0,23±0,02	0,31±0,015
ТАР – без Mg	0,33±0,003	0,89±0,001	0,062±0,004	0,27±0,002	0,37±0,004
ТАР – без MgSO ₄	0,18±0,012	0,69±0,02	0,08±0,006	0,16±0,014	0,23±0,02

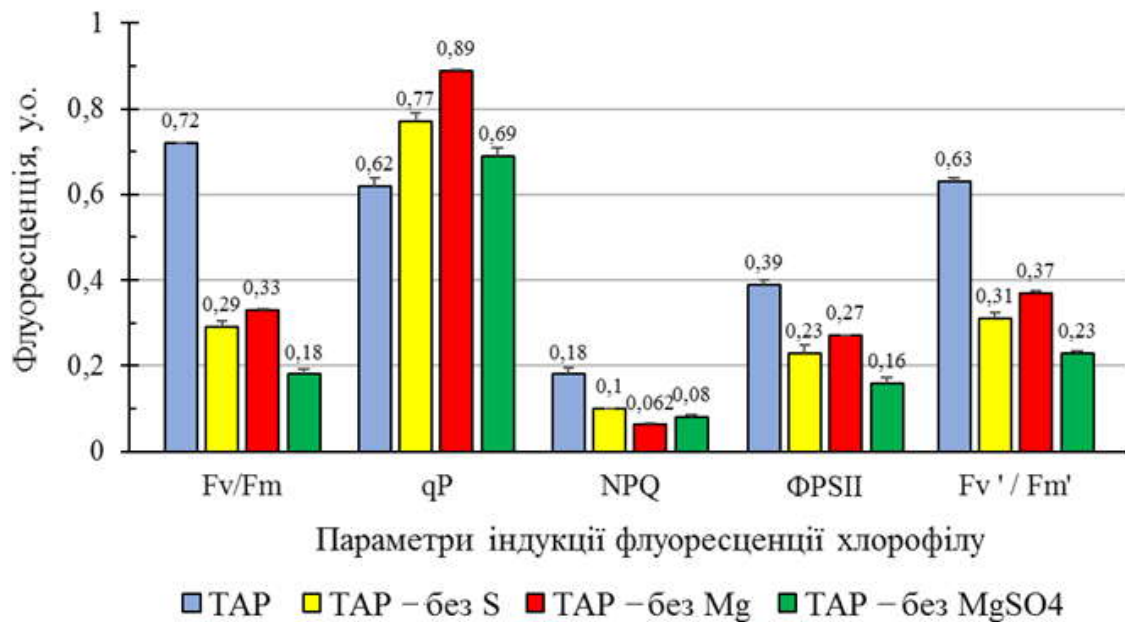


Рис. 5. Визначення індукції флуоресценції хлорофілу *Chlamydomonas reinhardtii* Dang., 119 за основними параметрами на середовищах: ТАР (контроль); ТАР-без S, ТАР- без Mg, ТАР- без MgSO₄

Збільшення спостерігаємо лише за фотохімічним гасінням флуоресценції (qP) на середовищах ТАР-без Mg та ТАР-без S, ТАР-без MgSO₄. Можна припустити, що для ефективного виділення водню, qP повинен бути більший ніж у разі звичайного фотосинтезу. З графіку (рис. 4) чітко видно, що найбільший об'єм водню утворився за умови дефіциту магнію, що відповідає високому ступеню окислення пулу Q_A, тобто в даних мікроорганізмах фотосистема зазнавала меншого негативного впливу. За дефіциту сірки показник qP становить – 0,77, а за дефіциту магнію та сірки – 0,69 і це відповідає найменшому об'єму виділеного водню.

ВИСНОВКИ

Отже, було досліджено утворення водню *C. reinhardtii* Dang., 119 за умов дефіциту сірки та магнію в середовищі ТАР–без S, ТАР–без Mg, ТАР–без MgSO₄. З'ясовано, що за відсутністю в середовищі магнію, сірки виділення водню культурою більше у 1,8-2 рази, ніж за повним голодуванням без сірки та магнію.

Визначення параметрів індукції флуоресценції хлорофілу *a* *C. reinhardtii* Dang., 119 за умов культивування на базовому середовищі ТАР та ТАР–без S, ТАР–без Mg, ТАР–без MgSO₄ коррелює з отриманими даними виділення водню на цих варіантах середовищ; основні показники (F_v/F_m, NPQ, F_v ' /F_m' Ф_{PSII}) зменшуються в порівнянні з контролем, а фотохімічне гасіння флуоресценції (qP) – збільшується. Голодування за магнієм чинить менший негативний вплив на культуру, ніж дефіцит сірки. Відсутність одночасно сірки і магнію значно погіршує стан фотосистеми культури і знижує рівень виділення водню.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Цыганков А.А. Получение водорода биологическим путем / А.А. Цыганков // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева). – 2006. – Т.50(6). – С. 26–33.

2. Марков С. А. Биоводород: возможное использование водорослей и бактерий для получения молекулярного водорода / С. А. Марков // Альтернативная энергетика и экология. – 2007. – № 1(45). – С. 30–35.

3. Трансформація сонячної енергії мікрководоростями з утворенням молекулярного водню / [Шнюкова Є.І., Поліщук О.В., Довбиш К.П. та ін.]// Український фітоценологічний збірник. – К., 2007. – Сер. С, вип. 25. – С. 79–96.

4. Markov S.A. Hydrogen photoproduction and carbon dioxide uptake by immobilized *Anabaena variabilis* in a hollow-fiber photobioreactor / S.A. Markov, M.J. Bazin, D.O. Hall // Enzyme and Microbiol. Technol. – 1995. – 17, N 4. – P. 306–310.

5. Золотарева О.К. Продукування водню мікрководоростями під дією сонячного світла / О.К. Золотарева, В.В.Подорванов, О.В.Поліщук. [Текст]: – в кн: Фундаментальні проблеми водневої енергетики [монографія] / за ред. В. Д. Походенка, В.В. Скорохода, Ю.М. Солоніна – НАНУ. – К.: КІМ, 2010. – С. 157–182.

6. Подорванов В.В. Світлозалежне продукування водню мікрководоростями (*Chlorophyta*) і фотосинтетичними бактеріями (*Rhodobacter*) / В.В. Подорванов, О.В.Поліщук, О.К. Золотарева в кн: Водень в альтернативній енергетиці та новітніх технологіях: за ред. В.В. Скорохода, Ю.М. Солоніна. – К: «КІМ», 2015. – С. 84–91.

7. Zolotareva E.K. Microalgae as Hydrogen Producers / Zolotareva E.K., Shnyukova E.I., Podorvanov V.V. // International Journal on Algae. – 2010. – Vol. 12, No. 3. – P. 199–220.

8. Ладыгин В.Г. Жизненный цикл, наследование, биогенез, биохимический состав, спектральные свойства и структурно-функциональная организация хлоропластов *Chlamydomonas reinhardtii* / В.Г. Ладыгин // Вопросы современной альгологии. – 2015. – № 2 (9). – 161 с.

9. Maxwell K. Chlorophyll fluorescence – a practical guide / K. Maxwell, G. N. Jonson // J. Exp. Bot. – 2000. – Vol. 51, N 345. – P. 659–668.

10. Степанов С.С. Влияние метанола на фотосинтетическую активность и продуктивность *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. (*Chlorophyta*) / С.С. Степанов, Е.К. Золотарева // *Algologia*. – 2011. – Т. 21, № 2. – С. 178–189.

**ОБРАЗОВАНИЕ ВОДОРОДА ФОТОТРОФНЫМИ ЗЕЛеныМИ
МИКРОВОДОРОСЛЯМИ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* DANG., 119
В УСЛОВИЯХ ДЕФИЦИТА ЭЛЕМЕНТОВ ПИТАНИЯ – СЕРЫ И
МАГНИЯ**

К.Б. ТРУШ

Национальный авиационный университет, г. Киев

*Исследовано образование водорода культурой зеленых микроводорослей *Chlamydomonas reinhardtii* Dang., 119 в условиях дефицита магния и серы на трис-ацетат-фосфатной среде. Установлено, что водорода синтезируется больше при недостатке магния, немного меньше в отсутствии серы и одновременном дефиците магния и серы. Выявлено, что дефицит магния и серы значительно ухудшает состояние фотосистемы и снижает уровень синтеза водорода *Chlamydomonas reinhardtii* Dang., 119.*

Ключевые слова: *зеленые микроводоросли, *Chlamydomonas reinhardtii*, образование водорода микроводорослями.*

**FORMATION OF HYDROGEN WITH PHOTOTROPHIC GREEN
MICROALGAE ALONGS *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* DANG., 119 IN
THE CONDITIONS OF DEFICIENCY OF ELEMENTS OF SULFUR AND
MAGNES**

K.B. TRUSH

National Aviation University, Kyiv

The formation of hydrogen by green microalgae Chlamydomonas reinhardtii Dang., 119 was studied under conditions of magnesium and sulfur deficiency on a tris-acetate-phosphate medium. It is established that hydrogen is synthesized more with a lack of magnesium, slightly less in the absence of sulfur and a simultaneous deficiency of magnesium and sulfur. It was revealed that the deficiency of magnesium and sulfur significantly worsens the state of the photosystem and reduces the level of hydrogen synthesis Chlamydomonas reinhardtii Dang., 119.

Keywords: *green microalgae, Chlamydomonas reinhardtii, the formation of hydrogen by microalgae.*