

СЕЛЕКЦИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ БИОВОДОРОД

М. С. Вечерек

Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск, Беларусь, vecherekmaksim@gmail.com
Научный руководитель — В. В. Демидчик, член-корреспондент НАН Беларуси,
доктор биологических наук

Важной задачей современной биотехнологии является поиск альтернатив ископаемому топливу, таких как биоводород. Одним из способов промышленного получения биоводорода является его синтез микроводорослями, такими как представители семейства *Chlorellaceae*. Целью настоящей работы была оценка эффективности использования техники клеточной селекции в циклах субкультивирования в условиях анаэробноза при продукции H_2 штаммом RA-002 микроводоросли *Parachlorella kessleri*.

Ключевые слова: микроводоросли; биоводород; селекция.

Микроводоросли, благодаря наличию фермента гидрогеназы, способны продуцировать молекулярный водород в ходе «биофотоллиза». Однако индукция гидрогеназы осуществляется только в условиях длительного анаэробноза. Для скорейшего наступления, которого, в основном, применяется метод культивирования клеток микроводорослей на средах лишённых основных элементов минерального питания. Чувствительность гидрогеназы к кислороду является ключевым недостатком метода, требуя, использования закрытых систем для получения биоводорода (фотобиореакторов) и центрифугирования для замены среды, что приводит к его высокой стоимости. Для преодоления данного ограничения требуются дополнительные исследования по методам увеличения продукции биоводорода. В настоящей работе изложена попытка селекции зелёной водоросли с целью получения штаммов способных продуцировать большие количества биоводорода.

Микроводоросль *Parachlorella kessleri* RA-002 подвергалась селекции посредством поочерёдной пересадки из аэробных в анаэробные условия каждую неделю на протяжении 6 недель (3 цикла по 2 недели). Предполагалось, что потомки изначальных клеток выработают адаптации, позволяющие им ещё лучше приспособиться к анаэробным условиям.

Культивирование микроводоросли в аэробных условиях осуществлялось на среде ТАР с добавлением 1 мл уксусной кислоты на литр, а в анаэробных условиях на подобной среде, но депривированной по сере. Микроводоросль культивировались в стеклянных ёмкостях при

температуре 26°C, барботирование на аэробном этапе осуществлялось воздухом с долей CO₂ 1%, освещённость была равна 3100 люкс (кроме первых суток анаэробного этапа) при круглосуточном освещении. Продукция биоводорода измерялась на анаэробном этапе культивирования на 2, 3, 6 сутки методом измерения ОВП и пересчёта на концентрацию водород по калибровочной кривой. Также на анаэробном этапе производился анализ скорости роста путём спектрофотометрического измерения плотности культур в те же дни, что и измерение водорода, при длине волны 560 нм и пересчёта оптической плотности на количество клеток. Кроме того, определялась удельная скорость роста культур и для её сравнения проводился ANOVA тест.

Анализ данных по зависимости плотности суспензии культур микроводоросли от времени культивирования в анаэробных условиях на всех трёх циклах, проведённой селекции (рис. 1) показал, что во время первого цикла наблюдался рост количества клеток до 229,7% от изначального значения по состоянию на 6 сутки и наибольшее количество клеток составило 10,7±0,7 млн. кл./мл., во время второго цикла наблюдался рост количества клеток до 243,04% от изначального значения по состоянию на 6 сутки и наибольшее количество клеток составило 11,7±0,3 млн. кл./мл., во время третьего цикла наблюдался рост количества клеток до 137,1% от изначального значения по состоянию на 3 сутки и наибольшее количество клеток составило 6,7±1,5 млн. кл./мл., но затем наблюдалось падение количества клеток и по состоянию на 6 сутки, оно составило 93,5% от изначального значения и 68,2% от значения на 3 сутки.

Анализ данных по удельной скорости роста культур во всех трёх циклах селекции показал, что удельная скорость роста культур уменьшалась в ряду 2 цикл, 1 цикл, 3 цикл.

Удельная скорость роста культур на различных циклах селекции

Удельная скорость роста, сут ⁻¹		
1 цикл (n=4)	2 цикл (n=4)	3 цикл (n=3)
0,14±0,013	0,15±0,01	0,08±0,025 ^{*a}

Примечание. Достоверность различий определялась по отношению к 1 циклу (ANOVA тест): * – p≤0,05, ** – p≤0,01, *** – p≤0,001; достоверность различий определялась по отношению к 2 циклу (ANOVA тест): *a – p≤0,05, **a – p≤0,01, ***a – p≤0,001.

Анализ кривых изменения ОВП сред при культивировании *P. kessleri* в анаэробных условиях для трех циклов селекции (рис. 2) показал, что наименьшее значение ОВП для первого цикла составило -364,7±136,7 мВ и пришлось на 6 сутки, для 2 цикла наименьший ОВП составил -130,7±65,2

мВ и пришёлся на 6 сутки, для 3 цикла наименьший ОВП составил - $230,3 \pm 25,4$ и пришёлся на 2 сутки. Только для одной ёмкости первого цикла из всех 12 в 3 циклах удалось произвести пересчёт ОВП на водород. Количество водорода в ней составило 2,5 ммоль/г сухой массы.

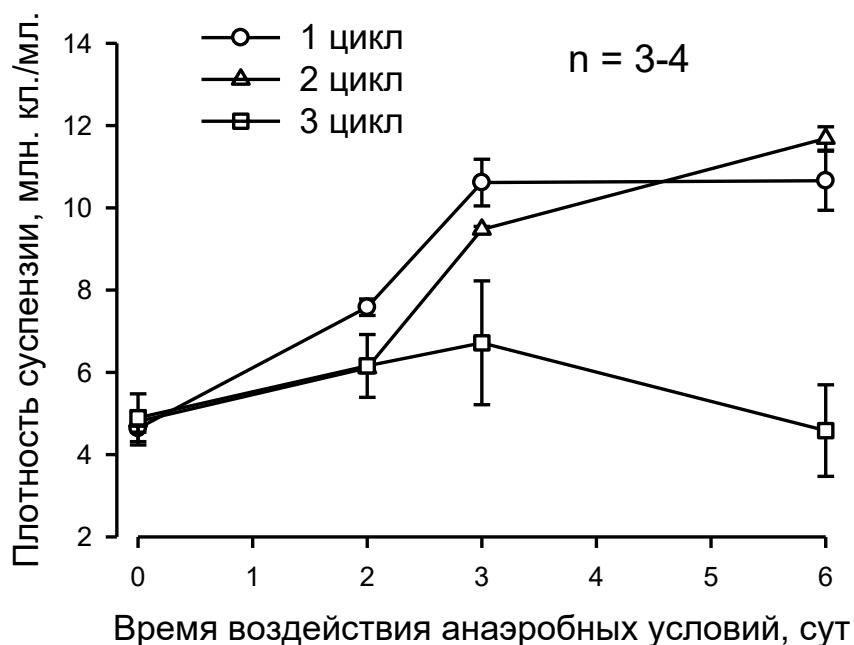


Рис. 1. Изменение плотности суспензии при культивировании *Parachlorella kessleri* RA-002 в анаэробных условиях для трёх циклов селекции

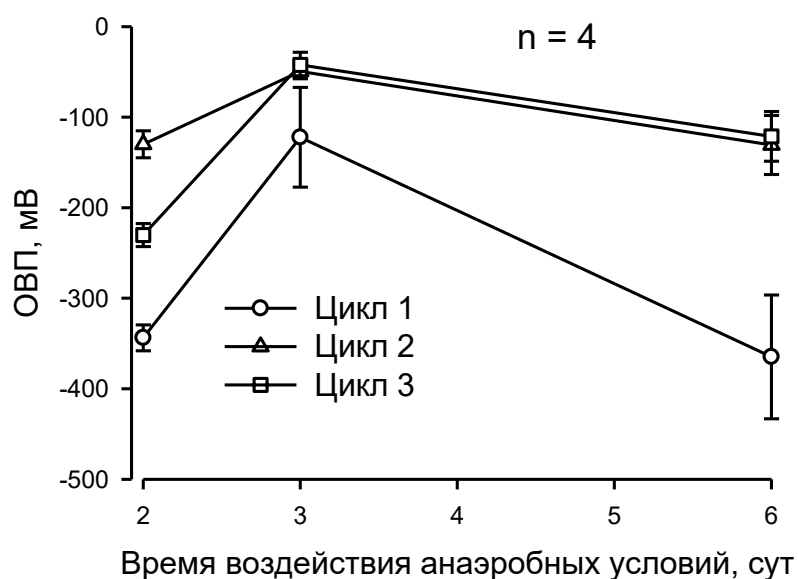


Рис. 2. Изменение ОВП среды при культивировании *Parachlorella kessleri* RA- 002 в анаэробных условиях для всех циклов селекции

Согласно данным, приведенным на рисунке 2, наблюдалось смещение кривых зависимости ОВП от времени пребывания клеток в анаэробных условиях для 2 и 3 циклов в область более положительных значений ОВП. Таким образом, можно сделать вывод, что циклическое анаэробное культивирование было неэффективным в качестве фактора селекции клеток, обладающих более значительной продукцией биоводорода *Parachlorella kessleri* RA-002 (рис. 2). Была также продемонстрирована тенденция снижения плотности суспензии клеток *Parachlorella kessleri* RA-002 в анаэробных условиях (93,46% контроля - изначального значения) во время 3 цикла селекции (рис. 1). Из полученных данных можно сделать вывод о том, что в системах промышленного получения биоводорода не следует использовать клетки изученной микроводоросли повторно, т.е. субкультивировать клетки, уже продуцировавшие биоводород.