

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ С РЕДУЦИРОВАННЫМ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИМ АППАРАТОМ ПУРПУРНОЙ БАКТЕРИИ *RHODOBACTER SPHAEROIDES* ПРИ НЕПРЕРЫВНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Ельцова З.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук, Пуццино, Россия (142290, Пуццино, ул. Институтская, 2, e-mail: [z.eltsova@gmail.com](mailto:z.eltsova@gmail.com))

Проведено непрерывное культивирование штаммов с редуцированным фотосинтетическим аппаратом, а также штаммов дикого типа пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*. Показано, что штамм DBC $\Omega$ , лишенный периферической светособирающей антенны, способен к стабильному росту в режиме хемостата и турбидостата, в отличие от аналогичного, ранее изученного штамма, pRK puf DD13. Штамм DBC $\Omega$  рос в условиях турбидостата со скоростью 0,1 час<sup>-1</sup>, при этом 14 Вт/м<sup>2</sup> являлась насыщающей интенсивностью света. Концентрация бактериохлорофилла *a* в клетках как мутантного штамма, так и штамма дикого типа, падала при увеличении интенсивности света. Таким образом, штамм DBC $\Omega$  с редуцированным фотосинтетическим аппаратом может быть использован для дальнейших биотехнологических исследований.

Ключевые слова: пурпурные бактерии, редуцированный фотосинтетический аппарат, непрерывное культивирование

## CONTINUOUS CULTIVATION OF STRAINS WITH REDUCED PHOTOSYNTHETIC APPARATUS OF PURPLE BACTERIA *RHODOBACTER SPHAEROIDES*

Eltsova Z.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Basic Biological Problems RAS, Pushchino, Russia (142290, Pushchino, Institutskaya street, 2, e-mail: [z.eltsova@gmail.com](mailto:z.eltsova@gmail.com))

Mutants with reduced photosynthetic apparatus and wild type mutant of purple nonsulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides* was grown in the continuous culture in photobioreactor. It was shown, the DBC $\Omega$  strain without peripheral antenna complex are able to grow very stable during a long time under flowing coindition, unlike another strain with reduced photosynthetic apparatus, pRK puf DD13. The grow rate of DBC $\Omega$  was 0,1 h<sup>-1</sup>. Saturated light intensity for this strain was 14 W/m<sup>2</sup>. Total concentration of bacteriochlorophyll *a* decreased with increasing of light intensity for both strains, wild type strain and DBC $\Omega$ . During the experiments has been found that DBC $\Omega$  strain is suitable for biotechnological application, for biohydrogen production, for example.

Keywords: purple bacteria, reduced photosynthetic apparatus, continuous cultivation.

### Введение

Пурпурные бактерии являются ценными объектами биотехнологии, так как они обладают высокой скоростью роста и способны к деградации широкого спектра отходов различных производств [3]. Предполагается, что штаммы пурпурных бактерий с пониженным синтезом пигментов могут быть перспективными для получения водорода, в частности, в условиях лимитирования светом [4]. Однако не все мутантные штаммы способны к устойчивому росту. В нашей предыдущей работе показано, что штамм *Rhodobacter sphaeroides* pRK puf DD13, не имеющий периферийного светособирающего антенного комплекса, отличается низкой скоростью роста (0,02 ч<sup>-1</sup>) и нестабильностью при непрерывном фотогетеротрофном культивировании [1]. Целью представленных исследований было выяснить особенности непрерывного культивирования другого штамма *Rba. sphaeroides* DBC $\Omega$  с редуцированной периферической светособирающей антенной [2].

## Материал и методы

Штамм *Rba. sphaeroides* DBCΩ характеризуется нарушенной сборкой пигмент-белкового комплекса периферической светособирающей антенны (LH2), так как в *рис-оперон*, ответственный за синтез белков периферической светособирающей антенны, вставлена кассета устойчивости к антибиотику стрептомицину, что делает невозможной нормальную экспрессию белков периферического светособирающего комплекса. Родительским для этого мутантного штамма является штамм *Rba. sphaeroides* 2.4.1 ATCC [2], который использовался нами в качестве контрольного. Штаммы были любезно предоставлены лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии университета г. Шеффилд (Великобритания). Рекомбинантные штаммы с модифицированным фотосинтетическим аппаратом pRK *puf* DD13 и pRK *puf* ΔLM1, также использованные в этой работе, подробно описаны ранее [1].

Культивирование инокулята осуществлялось в стеклянных сосудах объемом 250 мл. Для инокулята использовалась среда Ормеруда с добавлением молочной кислоты 30 мМ, а также дрожжевого экстракта 1,0 г\л, начальный рН 6,8-7,0. Культивирование проводили фотогетеротрофно анаэробно при 28°C в присутствии антибиотиков (мкг\мл): для штамма pRK *puf* ΔLM1 – тетрациклин (5), канамицин (30); для штамма pRK *puf* DD13 – тетрациклин (1), канамицин (5) и стрептомицин (5); для штамма DBCΩ – стрептомицин (5). В некоторых экспериментах штаммы культивировали без антибиотиков, когда селективным маркером, препятствующим элиминации плазмид из клетки, являлась способность к фотогетеротрофному росту.

Непрерывное культивирование штаммов DBCΩ и 2.4.1 осуществляли на свету в фотобиореакторе (ФБР) на основе коаксиальных цилиндров [5] в режиме хемостата с лимитированием аммонием (2-4 мМ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, скорость протока 0,02 ч<sup>-1</sup>, рН 7,0). Культивирование проводили на среде Ормеруда с 50 мМ молочной кислотой и дрожжевым экстрактом (0,1 г\л). Для обеспечения анаэробных условий в реактор непрерывно подавали аргон (20,0 мл\мин). После посева инокулята в ФБР осуществлялось периодическое культивирование в течение 24 ч с поддержанием рН 7,0, затем включался режим хемостат. В результате разбавления оптическая плотность культуры начинала падать до тех пор, пока культура не достигала состояния динамического равновесия, при котором скорость роста равна скорости протока. Непрерывное культивирование в режиме турбидостата проводилось при заданной оптической плотности (ОП) 0,2 для обоих штаммов на среде Ормеруда. В каждом режиме для обеспечения анаэробных условий в реактор непрерывно подавали аргон (20 мл\мин). Рабочий объем составлял 0,75 л.

Количество бактериохлорофилла *a* (БХл *a*) в клетках определяли спектрофотометрически (спектрофотометр Shimadzu, Япония) при  $\lambda=772$  нм в ацетон-метанольном экстракте [1].

Определение абсолютно сухого веса (АСВ) клеток проводили, как описано ранее [1].

Определение оптической плотности суспензии проводилось датчиком в ФБР (длина оптического пути 3 мм), а также спектрофотометрически (спектрофотометр Shimadzu, Япония) при  $\lambda=650$  нм и длине оптического пути 1 мм.

### 3. Результаты исследования и их обсуждение

Исследования показали, что при культивировании в ФБР в режиме хемостат при скорости протока  $0,02 \text{ ч}^{-1}$  штамм *Rba. sphaeroides* DBC $\Omega$  через 8-12 дней выходит в состояние динамического равновесия, которое характеризуется постоянной концентрацией БХл *a* и клеток (АСВ и оптическая плотность культуры не изменяются) (Рис. 1). В отличие от ранее изученного штамма *Rba. sphaeroides* pRK puf DD13, штамм DBC $\Omega$  имел устойчивый рост, что позволило далее провести исследования в режиме турбидостата.

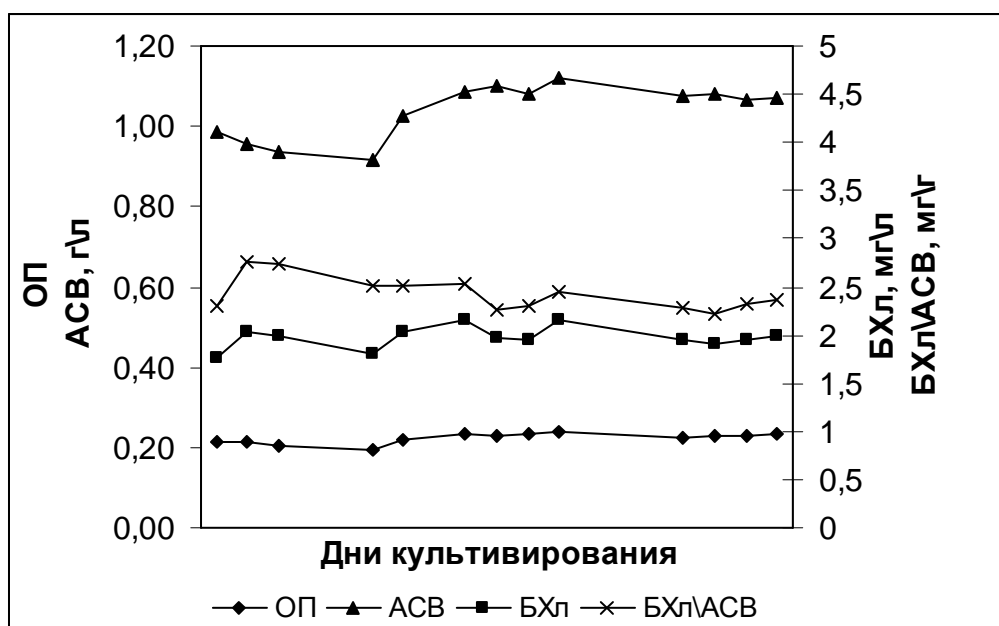


Рис. 1. Культивирование штамма *Rba. sphaeroides* DBC $\Omega$  в режиме хемостат с лимитированием аммонием ( $4 \text{ мМ NH}_4^+$ ) при скорости протока  $0,02 \text{ ч}^{-1}$ .

Культивирование в режиме турбидостат при заданной ОП=0,2 (АСВ=0,55 г/л) показало, что скорость роста возрастала до  $0,1 \text{ ч}^{-1}$  с увеличением интенсивности света от 8 до  $14 \text{ Вт/м}^2$ , не изменяясь при дальнейшем увеличении интенсивности (рис. 2). При этом снижалось содержание БХл *a*, как абсолютное, так и относительное (БХл\АСВ). Максимальное относительное содержание составило 2,3 мг/г при  $14 \text{ Вт/м}^2$ . При высоких интенсивностях света относительное содержание БХл *a* снижалось до 1,3 мг/г.

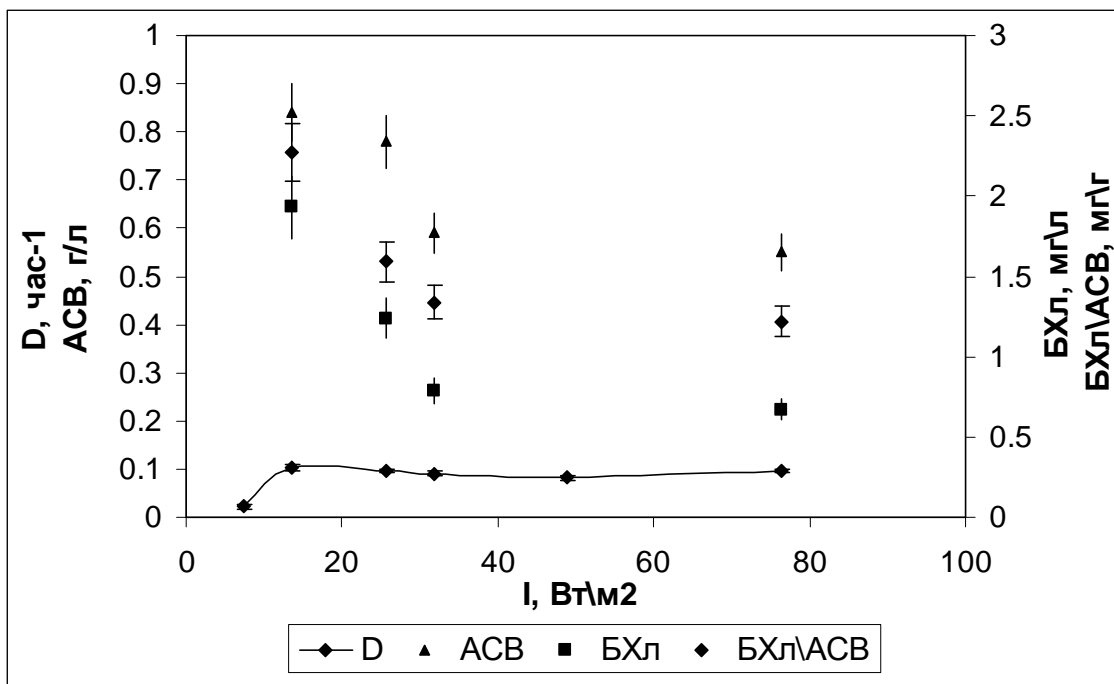


Рис. 2. Зависимость скорости роста ( $D$ ), содержания  $BХл a$  и  $АСВ$  от интенсивности падающего света для штамма *Rba. sphaeroides* DBC $\Omega$  в режиме турбидостат.

Для сравнения были проведены аналогичные эксперименты с родительским штаммом *Rba. sphaeroides* 2.4.1. В режиме хемостат (при скорости протока  $0,02 ч^{-1}$ ) культура также характеризовалась стабильным ростом. В режиме турбидостат при  $ОП=0,2$  ( $АСВ=0,43 г/л$ ) скорость роста возрастала до  $0,2 ч^{-1}$  с увеличением интенсивности света от 4 до  $32 W/m^2$  (рис. 3).

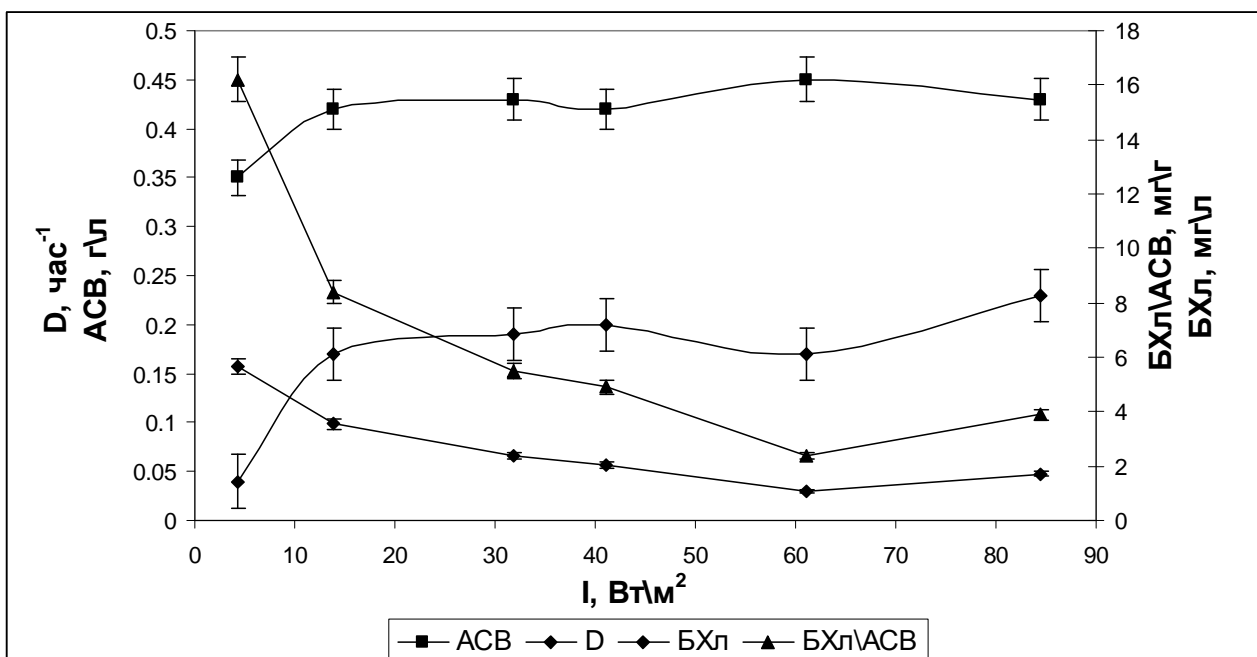


Рис. 3. Зависимость скорости роста ( $D$ ), содержания  $BХл a$  и  $АСВ$  у штамма *Rba. sphaeroides* 2.4.1 от интенсивности падающего света в режиме турбидостат.

Относительное содержание БХл *a* при этом снижалось. Однако максимальная величина этого показателя была гораздо выше (16,2 мг\г) по сравнению с мутантным штаммом при низкой интенсивности, и эта величина уменьшалась до 4 мг/г при высокой интенсивности. Таким образом, штамм с нарушенным синтезом антенны имел более низкое содержание БХл *a* в расчете на сухой вес, как при высоких, так и при низких интенсивностях света, а также более низкую скорость роста, чем родительский штамм, в условиях турбидостата. У описанного ранее рекомбинантного штамма с модифицированным фотосинтетическим аппаратом *Rba. sphaeroides* pRK puf DD13 влияние интенсивности света (в области высоких значений) на содержание БХл *a* изучали в режиме хеостат при разных концентрациях аммония. Как видно из Табл. 1, и абсолютное, и относительное содержание БХл *a* уменьшалось с увеличением интенсивности падающего света, независимо от концентрации аммония. Однако при одной и той же интенсивности падающего света относительное содержание БХл *a* было выше при меньшей концентрации клеток (2 мМ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), хотя средняя интенсивность света в ФБР, в этом случае должна быть выше.

Таблица 1. Влияние интенсивности света на содержание БХл у штамма *Rba. sphaeroides* pRK puf DD13 при росте в режиме хеостат с лимитированием аммонием. Концентрация АСВ была 0,47±0,005 и 1,05±0,07 г/л при 2 и 4 мМ аммония соответственно.

Интенсивность света, Вт/м <sup>2</sup>	Содержание БХл, мг/л		Относительное содержание БХл, мг/г АСВ	
	2 мМ NH <sub>4</sub>	4 мМ NH <sub>4</sub>	2 мМ NH <sub>4</sub>	4 мМ NH <sub>4</sub>
41,0	1,66±0,09	1,84±0,19	3,50	1,8
61,0	1,38±0,07	2,04±0,03	2,95	1,9
84,5	0,67±0,09	1,41±0,03	1,40	1,3

Для сравнения данные по изученным штаммам *Rba. sphaeroides* с нарушенным синтезом пигментов при выращивании в режиме хеостат представлены в табл. 2.

Таблица 2. Содержание АСВ, БХл, БХл/АСВ и экономический коэффициент использования аммония (Y<sub>амм</sub>) для некоторых штаммов *Rba. sphaeroides* при росте в хеостате (0,02 ч<sup>-1</sup>) с лимитированием аммонием (интенсивность света 25-41 Вт/м<sup>2</sup>).

Штамм	NH <sub>4</sub> , мМ	БХл, мг/л	АСВ, г/л	БХл/АСВ, мг/г	Y <sub>амм</sub> , г/моль
DBCΩ	4	1,94	0,85	2,28	212
2.4.1	2	1,88	0,43	4,40	215

pRK puf DD13	2	1,66	0,45	3,69	225
	4	1,84	1,05	1,75	263
pRK puf $\Delta$ LM1	2	6,14	0,31	19,8	155

Как в случае DBC $\Omega$ , так и в случае pRK puf DD13 относительное содержание БХл *a* было выше у родительских штаммов (соответственно, 2.4.1 и pRK puf  $\Delta$ LM1) по сравнению с мутантными. На основании величин АСВ был рассчитан экономический коэффициент использования аммония в режиме хеостат. Между мутантом DBC $\Omega$  и родительским штаммом 2.4.1 достоверных различий обнаружено не было. Таким образом, нарушение синтеза пигментов не сказалось на азотном обмене бактерий. У родительского штамма pRK puf  $\Delta$ LM1 обнаружен пониженный экономический коэффициент использования аммония и аномально высокие значения концентрации БХл *a*, что может косвенно указывать на компенсаторные механизмы, включающиеся при разобщении фотосинтетического аппарата, так как у этого штамма гены, кодирующие синтез реакционного центра и коровой светособирающей антенны, находятся на плазмиде.

### **Заключение**

Как показывают приведенные нами исследования, штамм DBC $\Omega$  с редуцированным фотосинтетическим аппаратом способен к устойчивому росту при непрерывном культивировании, в отличие от ранее исследованного штамма pRK puf DD13. Зависимость скорости роста от интенсивности света носит сходный характер у штамма DBC $\Omega$  и дикого типа 2.4.1, хотя скорость роста у последнего выше в 2 раза.

У штаммов с редуцированным фотосинтетическим аппаратом (DBC $\Omega$  и pRK puf DD13) накопление пигментов снижается с увеличением интенсивности света, что сходно с родительскими штаммами. При этом максимальное относительное содержание БХл *a* достигало 20 мг/г у родительского штамма pRK puf  $\Delta$ LM1.

Полученные данные позволяют рекомендовать штамм *Rba. sphaeroides* DBC $\Omega$  для дальнейших исследований с использованием непрерывного культивирования с целью получения водорода, а штамм pRK puf  $\Delta$ LM1 – в качестве продуцента БХл.

### **Список литературы**

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. Jones M.R. Mutants of *Rhodobacter sphaeroides* lacking one or more pigment-protein complexes and complementation with reaction-centre, LH1, and LH2 genes // *Molecular Microbiology*. – 1992. – Vol. 6. - № 9. – P.1173-1184.
3. Kapdan I. K., Kargi F. Bio-hydrogen production from waste materials // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2006. – Vol. 38. – P. 569–582.
4. Kondo T. Enhancement of hydrogen production by photosynthetic bacterium mutant with reduced pigment // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2002. – Vol. 93. - №2. – P.145-150.
5. Tsygankov A.A., Laurinavichene T.V., Gogotov I.N. Laboratory scale photobioreactor // *Biotechnology Techniques*. – 1994. – V. 8. - № 8. – P. 575–578.

**Рецензенты:**

Гудков С.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник, Федеральное бюджетное учреждение науки Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН (ИТЭБ РАН), г. Пущино.

Белова Н.А., д.б.н., ведущий научный сотрудник, Федеральное бюджетное учреждение науки Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН (ИТЭБ РАН), г. Пущино.