

**Є.І. ШНЮКОВА, О.В. ПОЛИЩУК, К.П. ДОВБИШ,
В.В. ПОДОРВАНОВ, П.О. МУШАК, О.К. ЗОЛОТАРЬОВА**

Інститут ботаніки ім. М.Г.Холодного НАН України
вул.Терещенківська, 2, Київ, 01601
membrana@ukr.net

ТРАНСФОРМАЦІЯ СОНЯЧНОЇ ЕНЕРГІЇ МІКРОВОДОРСТЯМИ З УТВОРЕННЯМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДНЮ

К л ю ч о в і с л о в а: продуценти водню, біохімія водоростей, синьозелені, зелені мікрowodорості, фотосинтез, біоенергетика

*E. I. SHNYUKOVA, O. V. POLISHCHUCK, K. P. DOVBYSH, V. V. PODORVANOV,
P. O. MUSHAK, O. K. ZOLOTAREVA*

M. G. Kholodny Institute of Botany,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

SUN ENERGY TRANSFORMATION BY MICROALGA WITH MOLECULAR HYDROGEN PRODUCTION

A modern state of investigations devoted to hydrogen photoproduction by microalga as alternative source of energy is reviewed. The results of own investigations of 19 strains of blue-green and green cultures are presented. It was identified the factors, influenced the photosynthetic process and favourable for hydrogen production, among them: different illumination conditions, addition of organic substrata, reducing agents, electron transport inhibitors (glucose, methylviologen, diuron and others). It was shown that all studied microalga were capable to hydrogen production with different rates depending on experimental conditions. The blue-green heterocystic microalgae *Nostoc linckia*, 86, hormogonic nonheterocystic *Spirulina platensis* 26 and also green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*, 119 were characterized as the most active hydrogen producers.

К е y w o r d s: producers of hydrogen, biochemistry of algae, blue-green alga, green algae, photosynthesis, bioenergetics

*Е. І. ШНЮКОВА, А. В. ПОЛИЩУК, К. П. ДОВБЫШ, В. В. ПОДОРВАНОВ,
П. А. МУШАК, Е. К. ЗОЛОТАРЕВА*

Інститут ботаніки ім. Н.Г.Холодного НАН України, г. Київ

ТРАНСФОРМАЦІЯ СОЛНЕЧНОЇ ЕНЕРГІЇ МІКРОВОДОРОСЛЯМИ С ОБРАЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРОДА

Представлены обзор современного состояния исследований фотосинтетического выделения водорода микроводорослями как альтернативного источника энергии, а также результаты собственных исследований культур 19-ти штаммов синезеленых и зеленых микроводорослей. Изучены факторы, влияющие на фотосинтетический процесс в направлении, благоприятном для выделения водорода, в частности, изучено влияние условий освещения, добавления органических субстратов, восстановителей, ингибиторов электронного транспорта (глюкозы, метилвиологена, диурона и др.). Показана способность всех исследованных водорослей в различном объеме продуцировать водород в стрессовых условиях. Наиболее активными оказались синезеленые водоросли: гормогониевый гетероцистный *Nostoc linckia* шт. 86 и безгетероцистная *Spirulina platensis* шт. 26, а также зеленая микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii* шт. 119.

К л ю ч е в ы е с л о в а: продуценты водорода, биохимия водорослей, синезеленые и зеленые микроводоросли, фотосинтез, биоенергетика

© Є.І. ШНЮКОВА, О.В. ПОЛИЩУК, К.П. ДОВБИШ, В.В. ПОДОРВАНОВ, П.О. МУШАК,
О.К. ЗОЛОТАРЬОВА, 2007

Вступ

Вичерпання викопних джерел енергії, розвиток парникового ефекту і загроза необоротного забруднення навколишнього середовища спонукають до термінових пошуків альтернативних джерел енергії. Таким екологічно безпечним для довгостроковим поновлюваним носієм енергії є молекулярний водень [34, 35, 41, 42].

Водень — це екологічно чисте паливо. Він має високу енергоємність, яка в 3–5 разів перевищує аналогічний показник бензину й нафти. В енергетичному плані йому притаманні універсальні властивості: він відновник, енергоносіє і паливо. Потреба у високоенергетичному і екологічно чистому паливі призвела до виникнення водневої енергетики, швидкий розвиток якої дозволяє стверджувати, що водень є паливом майбутнього [11, 12].

Останнім часом значний інтерес викликають біологічні способи отримання водню. В цьому відношенні на особливу увагу заслуговують фотосинтезуючі організми, серед яких найперспективнішими є мікрободорості [43]. Здатність мікрободоростей продукувати молекулярний водень за рахунок фотосинтетичного перетворення енергії обумовлена: наявністю нелімітованого джерела енергії — сонячного світла, надлишку субстрату фотолізу — води, високої теплотворної здатності водню (29 ккал/г порівняно з 3,5 ккал/г для вуглеводнів), можливістю відновлення процесу і, нарешті, тим, що фотохімічне перетворення води до водню відбувається за нормальної температури без утворення токсичних проміжних сполук. Тому одним з найперспективніших наукових напрямків вирішення ряду глобальних проблем, в тому числі енергетичної, є біотехнологія мікрободоростей.

Мікрободорості за сприятливих умов швидко ростуть, використовуючи енергію сонячної радіації. В умовах штучного вирощування обсяг врожаю може становити від 70 до 120 кг/м² сирої маси водоростей на рік залежно від вмісту поживних речовин у воді та інших умов. Раціональність їх вирощування ґрунтується на тому, що продуктивність водоростей на одиницю площі у 2–5 разів вища за традиційні агрокультури і види, які швидко ростуть, зокрема *Salix* або *Miscanthus* — витривалий багаторічний тропічний злак. Для свого росту і розвитку водорості використовують CO₂, який акумулюється і фіксується у формі біомаси та похідних продуктів. Вони здатні також поглинати CO₂ і NO₂ з промислових газів, більше того, ці газові відходи можна використовувати для їх вирощування. Тому культивування мікрободоростей пропонується як спосіб біосорбції промислових викидів з високим вмістом CO₂. Одночасно досягається ефект зниження рівня CO₂ в атмосфері. Для їх вирощування придатна вода низької якості, з якої вони активно поглинають розчинні сполуки азоту та фосфат, що скорочує витрати на регенерацію води. Після сепарації водоростей та кінцевої доочистки воду знову можна використовувати для промислових цілей.

Культивування водоростей має блискучі перспективи в плані створення відновлюваних джерел енергії. Виходячи з того, що мікрободорості в наш час вважають «зеленим джерелом відновлюваного водню» [26], одним із актуальних завдань сучасної альгобіотехнології є вивчення генетичного потенціалу мікрободоростей як можливих продуцентів водню і пошук технологічних умов підвищення його виходу.

Водорості — об'єкти біологічного способу отримання молекулярного водню

Утворення молекулярного водню є одним з факторів регуляції анаеробного метаболізму клітин, воно широко розповсюджене в природі. Продукування H_2 на світлі констатоване у низки бактерій, деяких зелених і синьозелених водоростей (ціанобактерій) [4, 12, 17, 38, 44].

Вперше здатність деяких одноклітинних зелених водоростей продукувати вільний молекулярний водень за умов освітлення продемонстрували понад 60 років тому Гаффон і Рубін [23–25].

З'ясовано, що фотовиділення молекулярного водню каталізують три типи ферментів: нітрогеназа і дві гідрогенази, відмінні за механізмом дії, — поглинаюча і обернена, або двоспрямована гідрогеназа.

Нітрогеназа є ключовим ферментом системи азотфіксації. Це двокомпонентна ферментна система, яка каталізує нуклеотидзалежне відновлення N_2 з утворенням NH_3 . Поряд з відновленням N_2 нітрогеназа здатна утворювати молекулярний H_2 [34, 36]. Реакція його фотопродукування вимагає значних витрат енергії, крім того, цей процес дуже чутливий до впливу молекулярного кисню, тому утворений нітрогеназами водень майже цілком споживається.

Окрім нітрогенази, у ціанобактерій функціонує гідрогеназна система, здатна уловлювати водень, який у них утворюється [21, 31]. Гідрогенази — це одна з груп Fe-S-вмісних ферментів, які каталізують реакції поглинання і виділення молекулярного водню. У багатьох ціанобактерій виявлено два типи гідрогеназ: поглинаючий (генний кластер *hup*) і двоспрямований (*hox*). Вивчення розподілу генів гідрогеназ та їх активності у 15-ти азотфіксуючих ціанобактерій показало, що всі вони містять кластер *hup*, а в 12 із них — також і *hox*. Хоча *Nostoc PCC7422* має *hox*-кластер, його активність в клітинних екстрактах дуже низька [48]. У гетероцистної водорості *Anabaena variabilis* IAM M58 гідрогеназа кодується геном *hupSL* [20].

Поглинаюча гідрогеназа, яка кодується генами *hupS* і *hupL*, здатна окиснювати водень, щойно продукований за участю нітрогеназ [19]. Ця гідрогеназа знайдена в усіх азотфіксуючих і в деяких неазотфіксуючих синьозелених водоростей, наприклад *Synechococcus* штам 6301 [45]. Мономерна форма гідрогенази належить до класу Fe-гідрогеназ і кодується в ядрі одноклітинних зелених водоростей [4].

Поглинання світла є необхідним етапом процесу виділення водню клітинами мікрowodоростей, оскільки енергія світла забезпечує розкладання молекул води, вивільнення електронів і протонів, а також ендергонічний транспорт цих електронів до ферредоксину — переносника фотосинтетичного електронтранспортного ланцюга. Він є фізіологічним донором електронів для Fe-гідрогенази і таким чином зв'язує гідрогеназну реакцію з фотосинтетичним транспортом електронів у хлоропластах зелених водоростей [22].

Ціанобактерії, які містять так звану обернену гідрогеназу, що каталізує як утворення, так і поглинання водню, за оптимальних умов виділяють до 4 мкмоль водню на 1 мг хлорофілу за годину. Гідрогенази досить чутливі до кисню, тому їх активність можна виявити лише в анаеробних умовах. Вони здатні продукувати водень у ході метаболічних реакцій не тільки у синьозелених водоростей, а й еукаріотичних

організмів, зокрема зелених водоростей. Захоплені молекули водню зв'язуються в ході редокс-реакції, в результаті чого в присутності O_2 виділення водоростями водню знижується або припиняється зовсім [47].

Обов'язковою фізіологічною умовою активації гідрогенази у більшості організмів, які містять цей фермент, є різнотривала інкубація в безкисневому середовищі. Це пов'язано з тим, що виділення водню індукується в умовах анаеробного існування клітин у темряві, оскільки активність гідрогенази ефективно пригнічується в разі активації фотосинтетичного утворення кисню внаслідок конкурентних взаємовідношень процесів виділення кисню і водню. Отже, за умов аноксії розпочинається експресія гідрогенази — ферменту, який з високою питомою активністю каталізує утворення H_2 при освітленні [6, 7, 27, 28].

Кінетика інгібування виділення кисню після створення в середовищі умов аноксії здебільшого немонотонна. У *Chlorella vulgaris*, наприклад, протягом перших 3–7 хв різко зменшується квантовий вихід виділення кисню до рівня, який в подальшому якщо і змінюється, то значно повільніше. Ці повільні зміни можуть включати стадії як підвищення, так і зменшення виділення кисню, співвідношення яких залежить від інтенсивності світла і гідрогеназної активності. Вважається, що дія аноксії на фотосинтетичний апарат — це комплексний процес, який включає зміни не тільки аеробного стану системи, але і перехід на якісно новий режим функціонування. Припускається, що адаптивна роль гідрогенази у водоростей полягає в тому, що вона дозволяє їм більш гнучко реагувати на зміни локальної концентрації кисню в природних водно-ґрунтових екосистемах [3].

Ґрунтуючись на кінетиці змін швидкості виділення кисню і водню в умовах аноксії, висловлюється думка, згідно з якою відновлення пулів переносників електронів між фотосистемами і фотоутворення водню — відносно незалежні функції гідрогеназної системи. Перша функція проявляється зразу ж після переходу до умов аноксії, можливо, вона частково зберігається в аеробних умовах і спричинює швидко інактивацію центрів ФС II. Функція фотоутворення водню гідрогеназою розвивається відносно повільно і, напевно, відображає кінетику змін одного з факторів, які регулюють активність гідрогенази, наприклад, концентрації субстратів або інших факторів метаболічного контролю ферментативної активності [3].

У Каліфорнійському університеті вдалося одержати водень за допомогою прісноводної зеленої водорості *Chlamydomonas reinhardtii* [44]. Вважається, що з біомаси цієї водорості стабільно можна отримувати водень, інкубуючи її за умов відсутності сірки. Максимальний вихід водню при голодуванні за сіркою можна отримати за рН 7,7 з наступним його підвищенням до 8,2 або зниженням до 6,5. Профілі рН фотопродукції водню корелюють із залишковою активністю ФС II (оптимум — рН 7,3–7,9), з рН-профілями фотосинтетичного транспорту електронів у ФС-I або гідролізу крохмалю і білка [32].

Є дані, що фотовиділення водню в різних обсягах властиве не тільки зеленим, а й ціанобактеріям і деяким іншим водоростям. Нитчасті гетероцистні ціанобактерії мають унікальну здатність здійснювати основні процеси біосфери: оксигенний фотосинтез і фіксацію молекулярного азоту, при цьому вони можуть утворювати молекулярний водень за участю гідрогенази і/або нітрогенази [2, 10, 30, 31]. Генеруючи водень, плівки фотосинтезуючих ціанобактерій суттєво впливають на еволюцію земної атмосфери. Протягом доби інтенсивне продукування кисню

одноміліметровим шаром призводить до перенасичення киснем і утворення газових пухирців. Аналіз складу газів у пухирцях, проведений вдень і вночі, показав, що в плівках, утворених *Lyngbia*, концентрація H_2 була в 10 тис. разів вищою пізно вночі порівняно з днем. У плівках *Microcoleus* рівень H_2 також був найвищим вночі, проте варіювання «день–ніч» було значно меншим, можливо, тому, що *Microcoleus*, на відміну від *Lyngbia*, не утворює газових пухирців. Утворення H_2 автори пов'язують з активністю нітрогенази, яка спрямовує потік електронів до протонів з утворенням H_2 . Цей процес відомий у планктонних ціанобактерій морів і озер. Вважається, що в атмосфері Землі в минулому майже повністю був відсутній O_2 і продукований H_2 потрапляв у космос, тим самим суттєво збіднюючи відновлюваний потенціал Землі [29]. Фотовиділення H_2 констатовано також у водоростей *Anabaena*, *Calothrix*, *Mastigocladus* [30].

Завдяки посиленій увазі до процесу фотовиділення молекулярного водню накопичено значний масив даних, які визначають умови, сприятливі для його інтенсифікації у різних мікрородоростей. Здійснені окремі спроби аналізу механізмів цього процесу у деяких таксонів.

Синтез нітрогенази у фототрофних культур *Anabaena variabilis* визначається внутрішньоклітинним відношенням C/N. Іони амонію пригнічують не тільки синтез нітрогенази у ціанобактерій, але й інгібують активність ферменту при фізіологічних значеннях рН на світлі і в темряві. Синтез нітрогенази і гідрогенази, яка поглинає водень у *Anabaena variabilis*, наявність зворотної гідрогенази не є обов'язковими для гетероцистних ціанобактерій [14].

Виявлено фізіологічні фактори, які впливають на гідрогеназну активність клітин ціанобактерій *Gloeocapsa alpicola* і *Chroococcidiopsis thermalis*. Л. Т. Серебрякова зі співавт. [11, 12] характеризують умови продукування водню на прикладі одноклітинної синьозеленої водорості *Gloeocapsa alpicola*. При автотрофному рості в її біомасі накопичується ендогенний полісахарид глікоген, в результаті бродіння якого за гомоацетатним циклом поряд з ацетатом і вуглекислим газом головним продуктом є водень. При цьому з одного глюкозного залишку утворюються по 2 моля ацетату та CO_2 і 4 моля H_2 . Найактивнішими продуцентами H_2 були клітини *G. alpicola*, які вирощували за дефіциту нітрату. За цих умов запаси глікогену в клітинах досягали 50% сухої маси і активувалась гідрогеназа. Оптимізація виходу водню значною мірою визначалась співвідношенням тривалості світлового (фотогетеротрофний ріст — синтез глікогену) і темного (бродіння глікогену) періодів. Ідентифіковані та охарактеризовані гени, які кодують гідрогенази цих водоростей, а також вивчена регуляція синтезу гідрогенази *G. alpicola* на рівні транскрипції в умовах, сприятливих для розвитку гідрогеназної активності, а також вивчені каталітичні властивості очищеної гідрогенази *G. alpicola* [15, 16].

Ряд ціанобактерій продукують водень як побічний продукт фіксації азоту. Одержано три гідрогеназні мутанти *Anabaena* PCC-7120, один із яких, *hupL*, продукував водень зі швидкістю у 4–7 разів більшою за дикий штам. Ефективність перетворення світлової енергії у H_2 становила 1,0–1,6 %, проте період найбільшої активності тривав лише 10 год. Акумуляція загального азоту в клітинах знижувала активність нітрогенази і продукцію водню. Активний сайт нітрогенази містив $MoFe_7S_9$ з координацією на гомоцитрат, що синтезується *Nifv* [38].

Варті уваги дослідження, присвячені з'ясуванню особливостей метаболізму гетероцист ціанобактерій пор. *Nostocales*, які обумовлюють здатність цих водоростей виділяти газоподібний H_2 за умов освітлення. H_2 є побічним продуктом ферментного відновлення N_2 до NH_3 , яке здійснюється нітрогеназою в присутності АТФ — донора електронів і H^+ . Молекулярний H_2 частково утилізується в гетероцистах гідрогеназою, яка відіграє роль донора електронів для нітрогенази, і дихального ланцюга для синтезу АТФ, забезпечує відновлення O_2 до води і попереджує O_2 -залежну інактивацію нітрогенази. Залежність виділення H_2 від дії світла визначається тим, що на світлі збільшується рівень відновлених продуктів, вміст АТФ або інших високоенергетичних інтермедіатів. На думку авторів, способами, які можна застосувати для підвищення фотопродукування водню, є обробка клітин діуроном, аноксія, додавання в середовище ацетилену і сульфідів [30]. Активність нітрогенази зростає в гетероцистах синьозелених водоростей за умов недостатньої кількості азоту.

Для виділення біомолекулярного водню використано різні азотфіксуючі ціанобактерії (*Anabaena*, *Calothrix*, *Nostoc*, *Scytonema* і *Synechococcus*). Морфологічно вони поділені на три основні групи: гетероцистні нитчасті, негетероцистні нитчасті й одноклітинні. Встановлено, що механізм продукування водню в кожній групі дещо відмінний. Досліджуючи водночас молекулярну філогенію морських ціанобактерій, фіксуючих N_2 , та продуктивність H_2 кожного штаму, було показано, що продукування H_2 водоростями може визначатися генетично [40].

Синьозелена водорість *Gloecapsa alpicola*, яка не фіксує молекулярний азот, здатна збільшувати вихід водню в разі дефіциту сірки [17]. Аналогічно нестача азоту в середовищі стимулює вихід водню азотфіксуючою синьозеленою водорістю *Anabaena cylindrica*. Швидкість виділення водоростями кисню суттєво гальмують сполуки сірки, пірват. Припускається, що дія пірвату пов'язана з його донорством електронів у фотосинтетичний електронтранспортний ланцюг на рівні між першою і другою фотосистемами [6]. Зростання продукування водню відзначено у дефіцитного на гідрогеназу мутанта гормогонієвої синьозеленої водорості *Nostoc punctiforme* штам NHM5 [33].

Для того, щоб на світлі виділявся водень, створювали умови для видалення з середовища атмосферного O_2 та запобігання появі в ньому O_2 фотосинтетичного походження. З цією метою на кафедрі генетики МДУ з нитчастої гетероцистної ціанобактерії *Anabaena variabilis* ATCC29413 отримано мутант *Anabaena variabilis* PK84, якому властива надзвичайно низька здатність до поглинання водню. Завдяки цьому водень, який виробляє цей мутант у процесі азотфіксації, надходить в навколишнє середовище навіть у присутності атмосферного повітря [37, 39].

В.Б. Бородін зі співавторами [4] досліджували фотоутворення молекулярного водню мутантною ціанобактерією *Anabaena variabilis* PK84, у якої була зруйнована система поглинання H_2 . Мутант вирощували на живильному середовищі, яке включало ванадій, в умовах, що забезпечували автотрофний ріст і азотфіксацію. Показано, що, на відміну від дикого штаму *A. variabilis* ATCC29413, виділення H_2 клітинами мутанту *A. variabilis* PK84 мало залежало від вмісту в середовищі O_2 і відбувалось навіть в атмосфері аргону зі швидкістю, яка перевищувала темпи продукування H_2 диким штамом. Автори вважають, що порівняно невисока швидкість продукування H_2 диким штамом в умовах чистого аргону є наслідком активної діяльності гідрогенази, яка „перехоплювала» і „спалювала» водень киснем фотосинтетичного походження.

За періодичних умов вирощування мутанту в атмосфері аргону швидкість продукування H_2 молодією культурою досягала 90-100 мкмоль/(мг хлорофілу $a \cdot$ год), що відповідає 5,4-6,0 мкмоль/(мг сухої маси \cdot год). Крім того, мутант був здатний безперервно утворювати H_2 в разі періодичного росту у фотобіореакторі спірально-трубчастого типу (4,5 л). Найбільша швидкість утворення H_2 культурою *A. variabilis* PK84 у фотобіореакторі при продуванні аргонем становила 130–140 мл/год, або 0,03 мл/(мл суспензії \cdot год). На думку авторів, найпривабливішим є те, що *A. variabilis* PK84 здатна безперервно продукувати H_2 при продуванні повітрям, яке містить 2% CO_2 , температурі 36 °C і світловому потоці 332 мкЕ/м² \cdot с. Найбільша швидкість утворення H_2 за таких умов становила 43 мл/год на фотобіореактор, або 0,01 мл/(мл суспензії \cdot год). Автори стверджують, що на період виконання даної роботи мутант *A. variabilis* PK84 мав найкращі показники серед відомих представників ціанобактерій для використання в системах з перетворення сонячної енергії в енергію H_2 . Крім того, для отримання водневого палива за допомогою ціанобактерій з'являлась можливість використання не інертних газів, що мають високу вартість, а значно доступніших — атмосферного повітря і двоокису вуглецю.

Для з'ясування можливих розбіжностей у гідрогеназній активності мікро- і макроскопічних водоростей проведено порівняльне дослідження одночасного виділення водню і кисню десятьма видами морських водоростей. З метою індукції гідрогеназної активності водорості протягом різних проміжків часу зберігали в умовах анаеробіозу в морській воді, яка не містила CO_2 . В той час як кожна з досліджених водоростей мала здатність виділяти кисень, продукування водню при цьому не спостерігалось. Один із висновків цієї роботи полягає в тому, що, на відміну від мікроскопічних водоростей, не виявлено жодного макрофіта, який би продукував водень на світлі. Це не суперечить відомому факту, згідно з яким щонайменше дев'ять макроскопічних водоростей відзначаються гідрогеназною активністю. Остання проявляється в їхній здатності виділяти водень в темряві й поглинати його на світлі. З іншого боку, отримані дані не узгоджуються з традиційною точкою зору відносно того, що гідрогеназа водоростей може каталізувати цілий ряд реакцій, одна з яких супроводжується утворенням молекулярного водню. Автори наводять два можливі пояснення вказаних спостережень. Одне з них постулює, що, крім CO_2 , існують інші акцептори електронів, здатні приймати відновні еквіваленти від ФС I і тим самим блокувати реакції, які призводять до утворення водню на світлі. З іншого боку, можливо, що гідрогеназна активність морських макроскопічних водоростей пов'язана тільки з системою поглинання водню. Проте перше пояснення має рацію лише в тому разі, якщо дію можливих електронних акцепторів за кінетикою можна порівняти з такою CO_2 . На думку авторів, цей простий кінетичний аргумент свідчить на користь другої можливості.

Оскільки коло організмів, здатних продукувати водень, точно не визначено, а умови інтенсифікації цього процесу потребують детальних з'ясувань і уточнень, з метою пошуків нових нетрадиційних відновлюваних джерел водню було поставлене завдання дослідити можливість продукування молекулярного водню культурами гормогонієвих і хроококових синьозелених (Cyanophyta) і зелених (Chlorophyta) водоростей і визначити умови підвищення його ефективності. Передусім увагу було потрібно зосередити на застосуванні факторів, які впливають на перебіг фотосинтетичного процесу в клітинах мікрowodоростей в напрямку, сприятливому для виділення водню.

Об'єкти і методи досліджень

Об'єктами служили культури мікроводоростей з колекції відділу мембранології і фітохімії Інституту ботаніки ім М.Г. Холодного НАН України (IBASU-B). Досліджували продукування водню 19 штамми 16 видів, з них 13 видів Cyanophyta (*Anabaena cylindrica* Lemm., 37; *A. flos-aquae* (Lyngb.) Breb., 144; *A. sp.*, 120; *Anacystis nidulans* Dreut., 38; *Microcystis aeruginosa* (Кьтз.) emend. Elenk., 51; *N. commune* Vauch. sensu Elenk., 143; *N. linckia* Vauch sensu Elenk., 86, 94, 127; *N. muscorum* Ag., 23; *N. punctiforme* (Кьтз.) Hariot., 39; *Oscillatoria formosa* Bory, 24; *Phormidium setchellianum* Gom., 72; *Synechocystis minuscula* Voronich., 82, 83; *Spirulina platensis* (Nordts.) Geitl., 26) і три види Chlorophyta (*Ankistrodesmus braunii* (Ндг.) Brunth., 49; *Chlamydomonas reinhardtii* Dang., 119; *Chlorella vulgaris* Beijer., 52).

Застосовували різні режими вирощування водоростей в культуральних приміщеннях з контрольованими умовами освітлення і температурного режиму в колбах ємністю 250 мл з відповідними для кожного штаму живильними мінеральними середовищами [5, 8, 9, 13, 49] та в мікробіологічних матрацах обсягом 2 л, обладнаних системою постійного уловлювання виділеного водоростями водню.

Колби освітлювали люмінесцентними лампами денного світла ДС-40 протягом 12 год при температурі 25–27 °С (інтенсивність освітлення на поверхні культур становила 2,2–2,3 клк; щільність потоку квантів фотосинтетично активної радіації — 70–75 мкмоль·м⁻²·с⁻¹). Використовували біомасу водоростей, сформовану на 12–18-ту добу культивування, коли завершувалася фаза лінійного росту культури. При цьому виходили з існуючої інформації про те, що з віком культури активність утворення Н₂ змінюється і стає максимальною — наприклад, у *Nostoc muscorum* саме на 12–14-ту добу росту [46].

Суспензії водоростей, які досягали вказаного терміну вирощування, центрифугували протягом 30 хв при 2000 г. Осад двічі промивали дистильованою водою і ресуспендували в 0,05 М фосфатному буфері з рН 6,8. Гомогенати використовували для постановки дослідів з продукування ними водню.

З метою вимірювання розчинного водню автори сконструювали амперметричний датчик (електрод кларківського типу).

Створено систему приладів, яка дозволяє забезпечити умови для інгібування виділення кисню в інкубаційній камері шляхом продування суспензії водоростей інертним газом, застосовувати активатори та інгібітори цього процесу і регулювати режим освітлення. Концентрацію продукованого водню вимірювали за допомогою амперметричного датчика у прозорій скляній ємності за допомогою аналого-цифрового перетворювача. Дані фіксували на комп'ютері з використанням спеціальних програм.

Результати досліджень та їх обговорення

Виходячи з існуючої точки зору на інтенсивне продукування водню гетероцистними гормогонієвими синьозеленими водоростями, з метою ініціації активності нітрогенази, локалізованої в гетероцистах, культури синьозелених водоростей родів *Nostoc* і *Anabaena* вирощували на безазотних живильних середовищах, що створює умови для підвищення активності нітрогенази.

Досліджуючи стимулювання фотовиділення водоростями водню застосовували численні засоби: створення анаеробних умов інкубації, варіювання режимів

освітлення, використання органічних і неорганічних субстратів, відновників (метилвіологену), інгібітору фотосинтетичного виділення кисню діурону, в присутності якого клітини здатні виділяти водень з постійною швидкістю.

Аналіз отриманих результатів стосовно продукування водню мікрободоростями свідчить про те, що важливим фактором індукції цього процесу є освітлення. Так, в експериментах з *Nostoc linckia*, 86, який попередньо протягом двох годин витримували в темряві, а в подальшому інкубували в лабораторних умовах в кюветі в присутності 0,1 мМ метилвіологену без додаткового освітлення, водень не виділявся. Проте цей процес починав поступово ступінчасто зростати відразу ж після збільшення освітлення інкубаційної суміші (щільність потоку фотонів — 400 мкмоль/м²·сек). Протягом 10 хвилин констатували продукування водню на рівні 2,454 мкмоль, що відповідає 2,103 нмоль/мг сухої біомаси за год, або 0,034 нмоль/мг хлорофілу *a* за цей же період. Припинення додаткового освітлення призводить до зворотної динаміки, тобто до поступового, також ступінчастого падіння продукування водню (табл. 1). Залежність виділення Н₂ від дії світла визначається тим, що на світлі збільшуються рівень відновлених продуктів, а також вміст АТФ або інших високоенергетичних інтермедіатів.

Таблиця 1. Фотовиділення водню культурою *Nostoc linckia*, 86 (Cyanophyta, Hormogoniales)

Умови інкубації	Водень		
	мкМ	нмоль/мг сухої біомаси·год	нмоль/мг хлорофілу <i>a</i> ·год
Темрява 2 год, 2 мМ метилвіологен	0	0	0
Темрява 2 год, 2 мМ метилвіологен, щільність потоку фотонів 200 мкмоль/м ² ·сек	2,454	2,103	0,034

Біомаса цього ж штаму, *N. linckia*, 86, за умов низької щільності потоку фотонів (100 мкмоль/м²·сек) та інкубації в присутності 50 мкМ глюкози виділяла лише 1,89 нмоль водню в розрахунку на мг біомаси за год. Додаткове застосування 20-хвилинної барботації суспензії водоростей азотом, яке сприяло видаленню з інкубаційної суміші кисню, і в результаті створення умов активації оберненої гідрогенази, а також використання 10 мкМ діурону та 0,1 мМ метилвіологену призводило до незначного збільшення продукування водню — до 2,27 нмоль/мг сухої маси за год. Найефективнішим для цього штаму виявилось використання подвоєної кількості діурону та поступове збільшення щільності потоку фотонів до 300 і 400 мкмоль/м²·сек. Ці умови сприяли поетапній інтенсифікації продукування водню до 10,51 та 10,69 нмоль/мг сухої маси за год або 0,171 та 0,174 нмоль/мг хлорофілу за год (табл. 2).

Необхідність створення анаеробних умов у процесі виділення водню пояснюється тим, що ціанобактерії містять оборотну гідрогеназу, здатну як продукувати, так і виділяти водень. Цей фермент надзвичайно чутливий до вмісту в середовищі кисню, тому ініціація виходу Н₂ вимагає забезпечення певних умов культивування водоростей. Гідрогенази можна виявити лише за анаеробних умов. Так, продукування Н₂ ціанобактерією *Spirulina platensis* зростало до 244 і 287% в разі

Таблиця 2. **Продуктування молекулярного водню культурами *Nostoc linckia*, 86 (Cyanophyta, Hormogoniales)**

Умови інкубації	Суха біомаса, г в кюветі (5 мл)	Водень		
		мкМ	нмоль/мг сухої біо- маси • год	нмоль/мг хлорофілу а • год
20 мМ глюкоза, щільність потоку фотонів 100 мкмоль/м ² • сек	0.039	1,23	1,89	0,031
Продуктування азотом 5 хв., 10 мкМ діурон, 0,1 мМ метилвіологен	0,028	2,05	2,27	0,037
Продуктування азотом 5 хв., 20 мкМ діурон, 0,1 мМ метилвіологен, щільність потоку фотонів 300 мкмоль/м ² • сек	0,021	3.68	10,51	0,171
Продуктування азотом 5 хв., 20 мкМ діурон, 0,1 мМ метилвіологен, щільність потоку фотонів 400 мкмоль/м ² • сек	0,039	6.95	10,69	0,174

інкубації клітин під N₂ і Ar, відповідно, порівняно з варіантами, де був присутній O₂, що підтверджує його інгібуючий вплив на виділення H₂. Найнижча інтенсивність цього процесу констатована в області 650 нм, тобто при максимальному поглинанні другої фотосистеми. На інгібуючий вплив кисню вказують також дані про посилення виділення H₂ до 244 і 287% під N₂ і Ar, відповідно, порівняно з варіантом, де був присутній O₂ [46]. Аналогічні результати стосовно підвищення продуктування водню цим же видом отримано при культивуванні водоростей в анаеробних умовах в темряві [18].

Роль інкубації суспензії водоростей в потоці інертного газу з метою створення безкисневого середовища у процесі фотовиділення водню показана на прикладі двох штамів *N. linckia* — 94 і 127. Так, без аерації азотом, навіть використовуючи відновник — метилвіологен, а також інгібітор фотосинтетичного виділення кисню діурон при високій щільності потоку фотонів — 400 мкмоль/м² • сек експерименти з фотопродукування водню біомасою цих двох штамів виявилися мало результативними. За даних умов штами *N. linckia* продукували однакову кількість водню — по 3,94 нмоль на мг біомаси за год, або 0,064 нмоль/мг хлорофілу а за год. Проте третій штам, *N. linckia*, 94, який досліджували, неодноразово варіюючи інтенсивність освітлення, з інкубацією суспензії водоростей в потоці азоту і використанням діурону та метилвіологену, виявився ефективнішим продуцентом водню. В результаті позитивного впливу використаних в експериментах процедур виділення водню зросло до 4,74 нмоль, а при підвищенні рівня освітленості зі 100 до 400 мкмоль — до 6,32 нмоль на г біомаси за год (табл. 3).

Враховуючи наведені вище результати дослідження фотовиділення водню клітинами *N. linckia*, 86, здійснено аналогічний аналіз біомаси ряду інших видів гормогонієвих азотфіксуючих Cyanophyta.

Умови інкубації, застосовані для *N. linckia*, 86, подібним чином впливали на виділення водню *N. punctiforme*, 39. Показано, що використання невисокої дози діурону — 10 мкМ та щільності потоку фотонів 200 мкмоль/м² • сек навіть при барботації азотом не сприяло активному виходу водню *N. punctiforme*. Проте застосування метилвіологену, поступове підвищення вдвічі кількості діурону та збільшення потоку фотонів до 400 мкмоль/м² • сек спричинило поетапне зростання інтен-

Таблиця 3. Фотовиділення водню *Nostoc linckia*, штами 94, 96 і 127
(Cyanophyta, Hormogoniales)

Вид, штам	Умови інкубації	Суха біомаса, г в кюветі (5 мл)	Водень		
			мкМ	нмоль/мг сухої біо- маси • год	нмоль/мг хлорофілу а • год
<i>Nostoc linckia</i> , 94	продування азотом 5 хв, діурон 10 мкМ, 0,1 мМ метилвіологен, щільність поточу фотонів 100 мкмоль/м ² • сек	0,031	2,45	4,74	0,077
»	продування азотом 5 хв, діурон 20 мкМ, 0,1 мМ метилвіологен, щільність поточу фотонів 400 мкмоль/м ² • сек	0,031	2,45	6,32	1,103
<i>Nostoc linckia</i> , 96	діурон 10 мкМ, 0,1 мМ метилвіологен, щільність поточу фотонів 400 мкмоль/м ² • сек	0,025	1,64	3,94	0,064
<i>Nostoc linckia</i> , 127	»	0,025	1,64	3,94	0,064

Таблиця 4. Продукування водню культурою *Nostoc punctiforme*, 39
(Cyanophyta, Hormogoniales)

Умови інкубації	Суха біомаса, г в кюветі (5 мл)	Водень		
		мкМ	нмоль/мг сухої біо- маси • год	нмоль/мг хлорофілу а • год
Продування азотом 20 хв., 10 мкМ діурон, щільність поточу фотонів 200 мкмоль/м ² • сек	0,028	0	0	0
Продування азотом 20 хв., 10 мкМ діурон – 10 мкл, 0,1 мМ метилвіологен, щільність поточу фотонів 400 мкмоль/м ² • сек	0,028	3,27	4,13	0,067
Продування азотом 20 хв., 10 мкМ діурон, 0,1 мМ метилвіологен, щільність поточу фотонів 400 мкмоль/м ² • сек	0,032	4,29	4,38	0,072

сивності цього процесу до 4,13 та 4,38 нмоль/мг сухої біомаси за год (табл. 4). Отже, за інтенсивністю виділення водню *N. punctiforme*, 39 поступався *N. linckia*, 86, якому властива висока здатність до його продукування. В той же час два інші види *Nostoc* — *N. commune*, 143 і *N. muscorum*, 23 за рівнем виділення водню за таких же умов значно поступалися *N. linckia*, 86: *N. commune* продукував 2,53, а *N. muscorum* лише 1,92 нмоль водню на мг біомаси за год (табл. 5).

Отримані результати щодо можливості виходу молекулярного водню з біомаси *Nostoc muscorum*, 23 узгоджуються з аналогічними показниками культури іншого штаму цього ж виду — *Nostoc muscorum*, штам ВКМ-16. За подібних умов дослідів, зокрема в присутності відновленого метилвіологену дихлориду, фотоутворення H₂ відбувалося відразу після потрапляння в анаеробні умови. Проте з ча-

Таблиця 5. Фотовиділення водню культурами *Nostoc muscorum*, 23 і *N. commune*, 143 (Cyanophyta, Hormogoniales)

Вид	Умови інкубації	Суха біомаса, г в кюветі (5 мл)	Водень		
			мкМ	нмоль/мг сухої біомаси • год	нмоль/мг хлорофілу а • год
<i>Nostoc muscorum</i>	продування азотом 5 хв., діурон 10 мкМ, 0,1 мМ метилвіологен, щільність потоку фотонів 400 мкмоль/м ² • сек	0,032	2,05	1,92	0,031
<i>Nostoc commune</i>	продування азотом 5 хв., діурон 20 мкМ, 0,1 мМ метилвіологен, щільність потоку фотонів 400 мкмоль/м ² • сек	0,029	2,45	2,53	0,041

Таблиця 6. Фотовиділення водню видами *Anabaena Bory* (Cyanophyta, Hormogoniales)

Вид, штам	Умови інкубації	Суха біомаса, г в кюветі (5 мл)	Водень		
			мкМ	нмоль/мг сухої біомаси • год	нмоль/мг хлорофілу а • год
<i>Anabaena cylindrica</i> , 37	продування азотом 2-3 хв, 20 мкМ, 0,1 мМ метилвіологен, щільність потоку фотонів 300 мкмоль/м ² • сек	0,038	4,09	6,46	0,105
<i>Anabaena</i> sp., 120	»	0,032	3,27	6,13	0,100
<i>Anabaena flos-aquae</i> , 144	»	0,017	1,64	2,89	0,047

сом реакція уповільнювалася, що засвідчує уповільнення фотоутворення Н₂ з 2,7 до 1,2 нмоль Н₂/(мг білка за год) за 20 год спостережень [1].

Фотоутворення водню культурами *Anabaena cylindrica*, 37 і *A. sp.*, 120 виявилось менш інтенсивним, ніж *Nostoc linckia*, 86 і становило 6,46 і 6,13 нмоль на мг біомаси відповідно, проте ці види також вважають досить активними його продуцентами. Водночас *A. flos-aquae*, 144 за аналогічних умов виділяла водень в менших обсягах (табл. 6).

Поряд з дослідженням фотоутворення водню штамми гетероцистних гормогонієвих синьозелених водоростей цей процес вивчали у гормогонієвих безгетероцистних синьозелених водоростей *Spirulina platensis*, 26, *Oscillatoria formosa*, 24 і *Phormidium setchellianum*, 72. З'ясовано вплив умов інкубації водоростей в потоці азоту на виділення ними водню. Інкубація *Spirulina platensis*, 26 в потоці азоту з метою видалення кисню із середовища здійснювали двічі протягом 20 хв перед тригодинною експозицією водоростей в темряві та безпосередньо перед внесенням в інкубаційну суміш органічного субстрату — глюкози (50 мкМ), а також інгібітора фотосинтетичного виділення кисню — діурону (10 мкМ). Проте за даних умов експерименту після освітлення кювети протягом 20 хв (щільність потоку фо-

Таблиця 7. Фотовиділення водню *Spirulina platensis*, 26, *Oscillatoria formosa*, 24 і *Phormidium setchellianum*, 72 (Cyanophyta, Hormogoniales)

Вид	Умови інкубації	Суха біомаса, г в кюветі (5 мл)	Водень		
			мкМ	нмоль/мг сухої біомаси • год	нмоль/мг хлорофілу а • год
<i>Spirulina platensis</i>	продування азотом 2-3 хв, темрява 3 год, глюкоза 20 мМ, щільність потоку фотонів 200 мкмоль/м ² • сек, 20 хв.	0,019	0	0	0
<i>Spirulina platensis</i>	продування азотом 2-3 хв, темрява 3 год, глюкоза 20 мкМ, діурон 10 мкМ, 0,1 мМ метилвіологен, щільність потоку фотонів 800 мкмоль/м ² • сек, 20 хв.	0,019	8,99	9,46	0,163
<i>Oscillatoria formosa</i>	продування азотом 2-3 хв, діурон 10 мкМ, 0,1 мМ метилвіологен, щільність потоку фотонів 300 мкмоль/м ² • сек, 20 хв.	0,100	0,164	4,92	0,80
<i>Phormidium setchellianum</i>	»	0,025	2,450	5,88	0,082

тонів 200 мкмоль/м² • сек) продукування водню біомасою *S. platensis* не відбувалось, тобто за цих умов діурон в межах застосованої невисокої концентрації не впливав на фотоутворення водню, а наступне освітлення також не сприяло активізації цього процесу. В той же час додаткове застосування 0,1 мМ метилвіологену, суттєве підвищення інтенсивності освітлення до 800 мкмоль/м² • сек спричинило активний вихід водню *S. platensis* — 9,46 нмоль Н₂ на мг біомаси за год, або 0,163 нмоль Н₂ на мг хлорофілу за цей же період. Таким чином, зростання щільності потоку фотонів з 200 мкмоль/м² • сек, коли спіруліна зовсім не виділяла водень, до 800 мкмоль/м² • сек і використання метилвіологену на фоні інших однакових в обох випадках засобів інтенсифікації цього процесу стало визначальним у збільшенні виходу водню майже удвічі. Це підтверджує вирішальний вплив рівня інтенсивності світлового потоку, а також метилвіологену на процес продукування водню водоростями, зокрема культурою *S. platensis*.

Активним продуцентом водню виявився також *Phormidium setchellianum*, біомаса якого виділяла 5,88 водню з мг сухої біомаси за год, а в досліді з *Oscillatoria formosa* за цих же умов ефект був суттєво меншим — 4,92 нмоль (табл. 7).

Стимулювання фотоутворення водню за стресових умов виявили досліді з хроококовими одноклітинними синьозеленими мікродоростями *Synechocystis minuscula*, 82 та 83, *Anacystis nidulans*, 38 і *Microcystis aeruginosa*, 51. Проте за тих умов, які стимулювали фотовиділення водню штамми гормогонієвих синьозелених водоростей, хроококові водорості не продемонстрували суттєвих позитивних результатів (табл. 8).

Тестування зелених мікродоростей *Chlorella vulgaris*, 52 і *Ankistrodesmus braunii*, *Chlamydomonas reinhardtii*, 49 засвідчило їх здатність продукувати молекулярний водень за стресових умов. Особливо ефективним було фотоутворення

Таблиця 8. Вихід молекулярного водню у культур *Synechocystis minuscula*, 82 і 83, *Anacystis nidulans*, 38 і *Microcystis aeruginosa*, 51 (Цянофіта, Croococcales)

Вид, штамм	Умови інкубації	Суша біомаса, г в кюветі (5 мл)	Водень		
			мкМ	нмоль/мг сухої біомаси • год	нмоль/мг хлорофілу а • год
<i>Synechocystis minuscula</i> , шт. 82	подування азотом 20 хв, діурон 20 мкМ, 0,1 мМ метилвіологен, щільність потоку фотонів 400 мкмоль/м ² •сек	0,018	2,04	3,41	0,051
<i>Synechocystis minuscula</i> , шт. 83	»	0,020	1,64	1,76	0,026
<i>Anacystis nidulans</i>	»	0,014	1,64	3,51	0,053
<i>Microcystis aeruginosa</i>	»	0,024	1,64	2,05	0,029

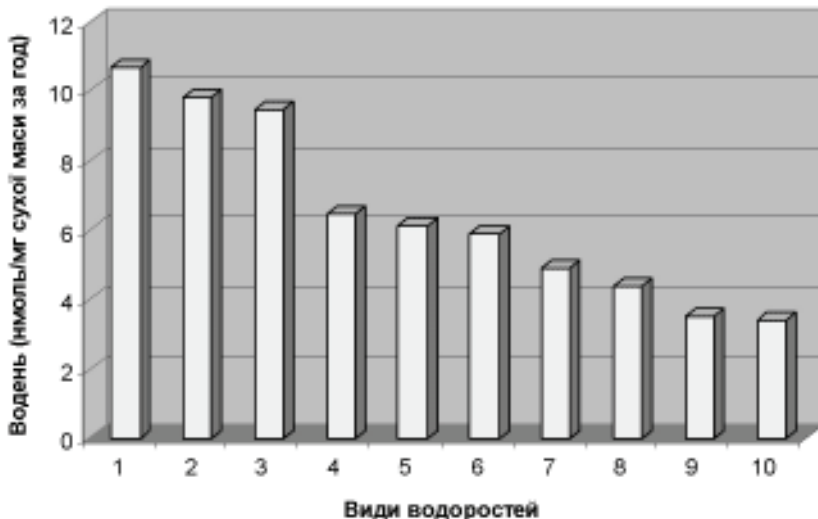
Таблиця 9. Продукування водню культурами мікроскопічних водоростей *Chlorella vulgaris*, 52, *Ankistrodesmus Braunii*, 49 і *Chlamydomonas reinhardtii*, 119 (Chlorophyta)

Вид, штамм	Умови інкубації	Суша біомаса, г в кюветі (5 мл)	Водень		
			мкМ	нмоль/мг сухої біомаси • год	нмоль/мг хлорофілу а • год
<i>Chlorella vulgaris</i>	продування азотом 2-3 хв., діурон 10 мкМ, 0,1 мМ метилвіологен, щільність потоку фотонів 50 мкмоль/м ² •сек	0,030	0	0	0
»	продування азотом 2-3 хв., діурон 10 мкМ, 0,1 мМ метилвіологен, щільність потоку фотонів 100 мкмоль/м ² •сек	0,030	0,164	1,64	0,025
<i>Ankistrodesmus braunii</i>	продування азотом 2-3 хв., 10 мкМ діурон, 0,1 мМ метилвіологен, щільність потоку фотонів 100 мкмоль/м ² •сек	0,025	2,05	2,46	0,037
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	продування азотом двічі – 20 хв., темрява 3 год, 20 мМ глюкоза, 20 мкМ діурон, 0,1 мМ метилвіологен, щільність потоку фотонів 800 мкмоль/м ² •сек	0,015	7,36	9,81	0,166

водню *Chlamydomonas reinhardtii* – 9,81 нмоль на 1 г сухої маси за год порівняно з *Ch. vulgaris*, у якій цей показник становив лише 2,46 нмоль. Це було досягнуто використанням таких стимулюючих стресових факторів, як анаеробні умови (витримання водоростей в потоці азоту), інкубація у темряві з використанням глюкози як екзогенної відновленої сполуки), застосування діурону як інгібітора, який діє на акцепторному боці ФС II. (табл. 9).

Отримані результати засвідчують, що всі досліджені 19 штамів 16-ти видів синьозелених і зелених мікроводоростей за певних стресових умов здатні до фотопродукування водню, проте їх спроможність неоднакова у різних таксонів.

Досліджуючи найефективніші способи досягнення стресових умов, які забезпечували активне фотоутворення водню, виявлено, що це — лімітування процесу фотосинтезу шляхом інкубації в темряві, застосування освітлення різної інтенсивності, створення умов анексії шляхом аерації в потоці інертного газу, використання органічних субстратів, відновників і інгібіторів електронного транспорту — глюкози, метилвіологену, різних концентрацій діурону. Узагальнені результати найкращих показників фотопродукування водню серед досліджених синьозелених і зелених мікроводоростей представлені на рисунку. Вони засвідчують, що серед синьозелених водоростей найпродуктивнішими є гормогонієвий гетероцистний *Nostoc linckia*, 86 та безгетероцистна гормогонієва *Spirulina platensis*, 26. До їх числа за рівнем виходу водню відноситься і зелена водорість *Chlamydomonas reinhardtii*, 119. Діапазон виділення ними водню за умов стимулювання цього процесу становить 9,46–10,69 нмоль/мг сухої біомаси за год, або 0,163–0,174 нмоль/мг хлорофілу *a* за год.



Фотопродукування водню культурами Cyanophyta і Chlorophyta: 1 – *Nostoc linckia*, 86; 2 – *Chlamydomonas reinhardtii*, 119; 3 – *Spirulina platensis*, 26; 4 – *Anabaena cylindrica*, 37; 5 – *A. sp.*, 120; 6 – *Phormidium setchellianum*, 72; 7 – *Oscillatoria formosa*, 24; 8 – *N. punctiforme*, 39; 9 – *Anacystis nidulans*, 38; 10 – *Synechocystis minuscula*, 82

Синьозелені водорості *Anabaena cylindrica*, 37, *A. sp.*, 120, *N. punctiforme*, 3, *Oscillatoria formosa*, 24, *Phormidium setchellianum*, 72 за рівнем виходу водню дещо поступаються перед вказаними вище видами. Їх здатність утворювати водень становить 4,38–6,46 нмоль/мг сухої біомаси за год, а в розрахунку на мг хлорофілу *a* за год – 0,072–0,105 нмоль. Інші види і штами за умов проведених дослідів виявились менш активними фотопродуцентами молекулярного водню.

Висновки

Проаналізована здатність ряду культур синьозелених і зелених мікродоростей колекції IBASU-B до виділення водню за рахунок фотосинтетичного перетворення енергії і визначені умови, за яких досягається індукція його продукування. Для реєстрації молекулярного водню безпосередньо у суспензії мікродоростей спеціально створені технічні засоби та сконструйована амперметрична установка.

Фотовихід водню дослідженими штамми стимулюється такими стресовими умовами, як темнова інкубація культури, аноксія шляхом витримування водоростей у потоці інертного газу. Цьому процесу сприяє комплексне використання екзогенних органічних субстратів, зокрема глюкози, інгібітору електронного транспорту діурону, субстрату з високим окисно-відновним потенціалом — метилвіологену, освітлення високої інтенсивності — щільність потоку фотонів $400\text{--}800\text{ мкмоль/м}^2\cdot\text{сек}$.

Встановлено, що всі 19 досліджених штамів 16-ти видів гормогонієвих і хроококових синьозелених, а також зелених мікродоростей в різній мірі виявили здатність до фотовиділення молекулярного водню за умов стимулювання цього процесу.

Найактивнішими продуцентами водню серед досліджених штамів виявилися представник гормогонієвих гетероцистних синьозелених водоростей *Nostoc linsckia*, 86, продукційна здатність якого досягала 10,69 нмоль водню на мг сухої маси за год, безгетероцистна гомогонієва синьозелена *Spirulina platensis* з виходом 9,46 нмоль водню і зелена мікродорість *Chlamydomonas reinhardtii*, яка виділяла 9,81 нмоль водню на мг сухої біомаси за год. Можна вважати, що ці об'єкти за здатністю продукувати водень в умовах пригнічення активності фотосистеми II є пріоритетними серед вивчених штамів. Досліджуючи дані штамми можна сподіватися на їх використання у системах з перетворення енергії сонячного світла в енергію водневого палива.

Два з чотирьох досліджених видів *Anabena* — *A. cylindrica* і *A. sp.* характеризувались меншою воденьвірною спроможністю — 6,46 і 6,16 нмоль на мг сухої біомаси за год відповідно.

1. Бекасова О.Д., Красновский А.А. Образование молекулярного водорода клетками цианобактерии *Nostoc muscorum*, иммобилизованными двуокисью титана // Физиол. раст. – 1993. – **40**, №6. – С. 835–840.
2. Биохимия синезеленых водорослей / Судьина Е.Г., Шнюкова Е.И., Костлан Н.В., П.А. Мущак, Н.Д. Тупик / Ред. К.М. Сытник. – Киев: Наук. думка, 1978. – 261 с.
3. Бойченко В.А. Действие аноксии на активность фотосистемы II у хлореллы: роль гидрогеназной системы // Физиол. раст. – 1980. – **27**, вып. 1. – С. 42–51.
4. Бородин В.Б., Цыганков А.А., Рао К.К., Холл Д.О. Фотообразование водорода культурой *Anabaena variabilis* PK84 // Физиол. раст. – 2000. – **47**, № 5. – С. 768–773.
5. Владимирова М.Г., Семененко В.Е. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. – М.: Изд-во АН СССР, 1962. – 58 с.
6. Готов И.Н., Косяк А.В., Крупенко А.Н. Образование водорода цианобактериями *Anabaena variabilis* в присутствии света // Микробиология. – 1976. – **45**, вып. 6. – С. 941–945.
7. Ефимцев Е.И., Бойченко В.А., Литвин Ф.Ф. Фотоиндуцирование выделения водорода бактериями, водорослями и высшими растениями // ДАН СССР. – 1975. – **224**, № 4. – С. 986–989.
8. Паламар-Мордвинцева Г.М., Костлан Н.В. Вплив різних джерел азоту на розвиток і утворення білка у *Ankistrodesmus braunii* Brunth // Укр. ботан. журн. – 1965. – **22**, № 4. – С. 67–73.

9. Пиневиц В.В., Березин М.Н., Михайлов А.А. Изучение *Spirulina platensis* — нового объекта для высокоинтенсивного культивирования // Физиол. раст. — 1970. — **17**, № 5. — С. 1037–1045.
10. Полесская О.Г., Красновский А.А. Метаболизм водорода у цианобактерий // Биол. науки. — 1990. — № 5. — С. 5–9.
11. Серебрякова Л.Т., Трошина О.Ю., Гоготов И.Н. Биотехнологический потенциал одноклеточной цианобактерии *Gloeocapsa alpicola* как продуцента молекулярного водорода // Мат-лы междунар. науч. конф. «Биологические ресурсы и устойчивое развитие» (Пушино Моск. обл., 29 окт. — 2 нояб. 2001 г.) — М., 2001. — С. 197–198.
12. Серебрякова Л.Т., Трошина О.Ю., Шереметьева М.Е. Продукция молекулярного водорода одноклеточной цианобактерией *Gloeocapsa alpicola* // От современной фундаментальной биологии к новым наукоемким технологиям: Тр. конф. (Пушино Моск. обл., 24–26 октября 2001 г.) — Пушино, 2001. — С. 98–99.
13. Судьина Е.Г., Шнюкова Е.И. IBASU-V — коллекция культур микроводорослей отдела биохимии Института ботаники им. Н.Г.Холодного НАН Украины. В: Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. — М.: Ин-т физиол. раст. РАН, 1991. — С. 145–151.
14. Трошина О.Ю. Метаболизм азота и водорода у гетероцистных цианобактерий: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пушино (Московская обл.): Ин-т биохим. и физиол. микроорганизмов РАН, 2000. — 21 с.
15. Шереметьева М.Е. Метаболизм молекулярного водорода у одноклеточных цианобактерий: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М.: МГУ, 2003. — 17 с.
16. Шереметьева М.Е., Серебрякова Л.Т. Метаболизм водорода у одноклеточной цианобактерии *Gloeocapsa alpicola* // Мат. междунар. научн. конф. «Автотрофные микроорганизмы, посвященной 75-летию со дня рождения Е.Н.Кондратьевой» (Москва, 13–15 декабря, 2000). — С. 193–194.
17. Antal T.K, Lindblad P. Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH // Journ. of Applied Microbiology. — 2005. — **98**. — P. 114–120.
18. Aoyama K., Uemura I., Miyake J, Asada Y. Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis* // J. of Fermentation and Bioengineering. — 1997. — **83**. — P. 17–20.
19. Boison G., Schmitz O., Mikheeva L., Shestacov S., Bothe H. Cloning, molecular analysis and insertional mutagenesis of the bidirectional hydrogenase genus from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* // FEBS Lett. — 1996. — **394**, N 2. — P. 153–158.
20. Dawar Sangeeta, Masukawa Hajime, Sakuari Hidehiro. Cloning and sequencing of uptake hydrogenase structural genes hup SL in *Anabaena variabilis* IAM M58: Annual Meeting and Symposia of the 2003 Annual Meeting (Nara) of the Japanese Society of Plant Physiologist (JSPF), Osaka, March 27–29 2003 // Plant and Cell Physiol. — 2003. — **44**, suppl. — P. 44.
21. Eisbrenner G., Distler E., Floener L., Bothe H. The occurrence of the hydrogenase in some blue-green algae // Arch. Microbiol. — 1978. — **118**. — P. 177–184.
22. Florin L., Tsokoglou A., Happe T. A novel type of Fe-hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* linked to the photosynthetic electron transport chain // J. Biol. Chem. — 2001. — **276**. — P. 6125–6132.
23. Gaffron H. Reduction of CO₂ with H₂ in green plants // Nature. — 1939. — **143**. — P. 204–205.
24. Gaffron H. Photosynthesis, photoreduction and dark reduction of carbon dioxide in certain algae // Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. — 1944. — **19**. — P.1–20.
25. Gaffron H., Rubin J. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae // J. Gen. Physiol. — 1942. — **26**. — P. 219–240.
26. Ghirardi Maria L., Liping Zhang, James W. Lee et al. Microalgae: a green source of renewable H₂ // Trends Biotechnol. — 2000. — **18**, N 12. — P. 506–511.
27. Happe R. P., Roseboom W., Pierik A. J. et al. Biological activation of hydrogen // Nature. — 1997. — **385**. — P. 126.
28. Happe T., Schütz T. K., Buhme H. Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 // J. Bacteriol. — 2000. — **182**. — P. 1624–1631.
29. Jorgensen B. Barker. Space for hydrogen // Nature (Gg. Brit.). — 2001. — **402**, № 6844. — P. 286–289.

30. Kerfin W., Buger P. Light-induced hydrogen evolution by blue-green algae (Cyanobacteria) // *Physiol. Plant.* – 1982. – **54**, №1. – P. 93–98.
31. Kerfin W., Spiller H, Ernst A., Buger P. Hydrogenases: Their catalytic activity, structure and function / Eds. Schlegel H., Schneider K. – Göttingen: Goltze, 1978. – P. 381–387.
32. Kosourov S., Seibert M., Ghirardi M.L. Effect of extracellular pH of the metabolic pathways in sulfur-deprived, H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures // *Plant and Cell Physiol.* – 2003. – **44**, N 2. – P. 146–155.
33. Lindberg P., Lindblad P., Cournac L. Gas exchange in the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133 and its hydrogenase-deficient mutant strain NHM5 // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – **70**. – P. 2137–2145.
34. Lindblad P. Cyanobacterial H₂ metabolism: knowledge and potential strategies for a photobiotechnological production of H₂ // *Biotecnologia Aplicada.* – 1999. – **16**. – P. 141–144.
35. Lindblad P., Sellstedt A. Occurrence and localization of an uptake hydrogenase in the filamentous heterocystous cyanobacterium *Nostoc PCC 73102* // *Protoplasma.* – 1990. – **159**. – P. 9–15.
36. Lukoyanov D., Barney B.M., Dean D.R. et al. Connecting nitrogenase intermediates with the kinetic scheme for N₂ reduction by a relaxation protocol and identification of the N₂ binding state // *PNAS.* – 2007. – **104**, N 5. – P. 1451–1455.
37. Markov S.A., Weaver P.F., Seibert M. Spiral tubular bioreactor for hydrogen production by photosynthetic microorganisms. Design and operation // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 1997. – № 63–65. – P. 577–584
38. Masukawa Hajime, Sakurai Hidehiro. Genetic engineering of *Anabaena* PCC 7120 toward improvement of photobiological H₂ production and disruption of homocitrate synthase genes: Annual Meeting and Symposia of the 2003 Annual Meeting (Nara) of the Japanese Society of Plant Physiologist (JSPP) Osaka, March 27-29 2003 // *Plant and Cell Physiol.* – 2003. – **44**. – P. 116.
39. Mikheeva L.E., Schmitz O., Shestakov S.V., Bothe H. Mutants of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* altered in hydrogenase activities // *Z. Naturforsch.* – 1995. – **50**. – P. 505–510.
40. Miyashita Hideoki, Takejama Haruco, Matsunogu Tadashi. Relationships between molecular phylogeny and hydrogen productivity of hydrogen-producing marine cyanobacteria (45 Annual Meeting of the Japanese Society of Plant Physiologist (JSPP), Tokyo, March 27-29 2004) // *Plant and Cell Physiol.* – 2004. – **45** – P. 22.
41. Peschek G.A. Aerobic hydrogenase activity in *Anacystis nidulans*. The oxyhydrogen reaction // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1979. – **548**. – P. 203–215.
42. Peschek G.A. Evidence for two functionally distinct hydrogenases in *Anacystis nidulans* // *Arch. Microbiol.* – 1979. – **123**. – P. 81–92.
43. Rao K.K., Hall D.O. Hydrogen production by cyanobacteria: potential, problems and prospects // *J. Mar. Biotechnol.* – 1996. – **4**. – P. 10–15.
44. Stancel Christina. Green algal could someday yield green energy // *ASM News.* – 2000. – **66**, № 7. – P. 389–390.
45. Tamagnini P., Axelsson R., Lindberg P. et al. Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2002. – **66**. – P. 1–20.
46. Tian-ching Gu, Fa-zhu Wang. Studies on H₂ evolution by *Spirulina platensis* // *Hydrobiologia.* – 1984. – N 114-117. – P. 467–470.
47. Tsygankov A.A., Serebryakova L.T., Rao K.K., Hall D.O. Acetylene reduction and hydrogen photoproduction by Wild-Type and Mutant Strains of *Anabaena* at different CO₂ and O₂ concentrations // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1998. – **167** – P. 13–17.
48. Yoshiro Fuminori, Masukawa Hajime, Sakurai Hidehiro. Cloning and sequencing of hydrogenase genes nitrogen-fixing cyanobacterium *Nostoc PCC 7422*: Annual Meeting and Symposia of the 2003 Annual Meeting (Nara) of the Japanese Society of Plant Physiologist (JSPP), Osaka, March 27–29 2003 // *Plant and Cell Physiol.* – 2003. – **44**. – P. 116.
49. Zender A., Gorchem P.R. Factors influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* (Kütz.) emend. Elenk // *Can. J. Microbiol.* – 1960. – **6**, № 6. – P. 645.