ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ БИОЛОГИИ РАН -
обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Федеральный исследовательский центр
«Пущинский научный центр биологических исследований РАН»

На правах рукописи

Гречаник Вера Игоревна

Адаптация микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* к недостатку элементов питания в аэробных и анаэробных условиях.

Специальность 1.5.21. – Физиология и биохимия растений

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель – доктор биологических наук

Цыганков Анатолий Анатольевич

Пущино - 2025

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 6

ВВЕДЕНИЕ 7

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 14

1.1. Общая характеристика зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii.* 14

1.2. Выделение водорода микроводорослями 15

1.2.1. Светозависимое выделение водорода 15

1.2.2. Темновое выделение водорода. 19

1.3. Гидрогеназы 19

1.4. Выделение водорода в стрессовых условиях 22

1.4.1. Культуры, лишенные серы 22

1.4.2. Культуры, лишенные фосфора 26

1.4.3. Культуры, лишенные азота 27

1.4.4. Ограничение/лишение углерода и других элементов 28

1.4.5. Применение световых импульсов 29

1.5. Активность ФС2 и выделение водорода. 29

1.5.1. Нефотохимическое тушение (NPQ) 30

1.5.1. Фотоингибирование 33

1.5.2. Кислород-независимые механизмы подавления ФС2 33

1.6. Понижающая регуляция ФС2 при выделении водорода в условиях недостатка питательных веществ 34

1.7. Практическая значимость фотообразования водорода микроводорослями. ... 39

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. 46

2.1. Объект исследования и способы культивирования. 46

2.2. Оптимизация состава среды HSM для культивирования микроводорослей. .. 46

2.3. Подбор условий для создания недостатка отдельных элементов питания. 48
2.3.1. Недостаток серы. 48
2.3.2. Недостаток азота. 49
2.3.3. Недостаток углекислоты. 50
2.4. OJIP-тест 50
2.5. Измерение концентрации аскорбата. 52
2.6. Анализ каротиноидов 53
2.7. Другие методы. 53
2.8. Статистический анализ. 54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. 54
3.1. Культивирование микроводорослей в ФБР, сопряженном с PAM-флуориметром. 54
3.2. Фотоавтотрофный рост *C. reinhardtii* без лимитирования элементами питания в аэробных и анаэробных условиях. 57
3.2.1. Культивирование *C. reinhardtii* в присутствии воздуха. 58
3.2.2. Культивирование *C. reinhardtii* в присутствии аргона. 61
3.3. Фотоавтотрофный рост *C. reinhardtii* при недостке серы. 64
3.3.1. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке серы в атмосфере воздуха + CO_2. 65
3.3.2. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке серы в атмосфере аргона + CO_2. 67
3.4. Фотоавтотрофный рост *C. reinhardtii* при недостатке азота. 72
3.4.1. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке азота в атмосфере воздуха + CO_2. 72
3.4.2. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке азота в атмосфере аргона + CO_2. 74

3.4.3. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке азота в атмосфере аргона + CO_2 и при различной интенсивности света. 76

3.5. Фотоавтотрофный рост *C. reinhardtii* при недостке углерода..... 82

3.5.1. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке углерода в атмосфере воздуха + CO_2..... 83

3.5.2. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке углерода в атмосфере аргона + CO_2. 85

3.5.3. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке углерода в атмосфере аргона + CO_2 и при различной интенсивности света. 88

3.6. Использование особых световых режимов во время фотоавтотрофного роста *C. reinhardtii* при недостатке азота или серы. 91

3.6.1. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке азота в атмосфере аргона + CO_2 с применением двухстадийного светового протокола. Уменьшение интенсивности света с 169 до 30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. 92

3.6.2. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке азота в атмосфере аргона + CO_2 с применением двухстадийного светового протокола. Увеличение интенсивности света с 169 до 300 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. 95

3.6.3. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке серы в атмосфере аргона + CO_2 . Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$..... 98

3.6.4. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке серы в атмосфере аргона + CO_2 с применением двухстадийного светового протокола. Уменьшение интенсивности света с 169 до 30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. 100

3.6.5. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке серы в атмосфере аргона + CO_2 с применением трехстадийного светового протокола. Увеличение интенсивности света с 169 до 300 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. 102

3.7. Выделение водорода как механизм адаптации *C. reinhardtii* к световым условиям и роль пластохинона. 106

Заключение 109

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 113

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ФС2 – фотосистема 2

Y(II) – эффективный квантовый выход ФС2

H_2 – водород

*C. reinhardtii – Chlamydomonas reinhardtii (*зеленая водоросль)

ВОК - водоокисляющий комплекс ФС2

ФБР – фотобиореактор

Хл (a+b) – хлорофилл (a+b)

PAM-флуориметр – флуориметр на основе амплитудно-модулированной флуоресценции

ПХ – пластохинон

РЦ –реакционный центр

eH –окислительно-восстановительный потенциал

ВВЕДЕНИЕ

Поиск возобновляемых и экологически чистых источников энергии является требованием современности, и молекулярный водород рассматривается как один из наиболее перспективных кандидатов. Микроводоросли, благодаря своему эффективному фотосинтетическому аппарату, представляют собой привлекательную платформу для биовыделения водорода. Среди них *Chlamydomonas reinhardtii (C. reinhardtii)* выделяется своей хорошо изученной физиологией и генетикой, а также способностью к выделению водорода под действием света (Kosourov, Tsygankov et al. 2002). Однако, широкое практическое внедрение этого процесса тормозится рядом фундаментальных и технологических проблем.

Существует несколько подходов к стимулированию выделения водорода у микроводорослей, одним из которых является ограничение элементов питания (дефицит серы, азота, фосфора и др.). В большинстве исследований, посвящённых выделению водорода при дефиците элементов питания, наблюдается характерное падение активности фотосистемы 2 (ФС2). В литературе сообщается, что для снижения активности ФС2 могут быть задействованы несколько регуляторных механизмов: накопление «закрытых» центров Q_B (Wykoff, Davies et al. 1998, Melis, Zhang et al. 2000), перевосстановление пула ПХ (Antal, Krendeleva et al. 2003), появление стабильно восстановленных форм Q_A (Volgusheva, Zagidullin et al. 2007), переходы состояния (State transitions) (Wykoff, Davies et al. 1998), ксантафилловый цикл (Wykoff, Davies et al. 1998, Antal, Krendeleva et al. 2007), деградация D1 (Zhang, Happe et al. 2002, Nagy, Podmaniczki et al. 2018), деградация RbcL и CP43 (Nagy, Podmaniczki et al. 2018), разобщение водоокисляющего комплекса (ВОК) и РЦ ФС2 (Antal, Volgusheva et al. 2006, Grechanik, Romanova et al. 2020), фотоингибирование (окислительный стресс) (Nagy, Podmaniczki et al. 2018). Разные авторы выделяют один или несколько из перечисленных механизмов, однако комплексное понимание того, как эти механизмы взаимодействуют в процессе регуляции

активности ФС2 при выделении водорода, остаётся недостаточно разработанным (Grechanik and Tsygankov 2022).

Исключением из описанных случаев являются условия дефицита углерода. Nagy с соавторами (Nagy, Podmaniczki et al. 2018) предложили инактивировать цикл Кальвина–Бенсона–Бассама путем ограничения субстратом (углекислотой) фотоавтотрофной культуры *C. reinhardtii*. Это должно привести к падению фотосинтетического потока электронов на восстановление углекислоты и направить его на выделение водорода. При этом авторы наблюдали выделение водорода с высокой скоростью и предположили, что этот метод не приводит к падению активности ФС2, и выделение водорода происходит за счет электронного донора – воды.

Эти данные свидетельствуют о том, что характер регуляции ФС2 и реализуемые механизмы зависят от типа недостатка элемента питания, световых условий и физиологического состояния культуры, однако конкретные закономерности этого взаимодействия до настоящего времени остаются недостаточно изученными.

Особую значимость данная проблема приобретает при анализе процессов именно в фотоавтотрофных условиях культивирования, поскольку только они обеспечивают прямое преобразование энергии света в химическую энергию водорода за счёт фотосинтетического электронного транспорта. В отличие от гетеротрофных или миксотрофных режимов, где водород образуется за счёт переработки органических субстратов, фотоавтотрофные системы позволяют исследовать фундаментальные механизмы светозависимой регуляции фотосинтеза и электронного транспорта, лежащие в основе биофотолиза воды и образования водорода как вторичного метаболита.

Таким образом, остаётся неясным, каков относительный вклад различные механизмы понижающей регуляции ФС2 вносят в светозависимое выделение водорода при различных видах недостатка элементов питания и от каких условий

— световых и физиолого-биохимических — зависит запуск светозависимого выделения водорода у фотоавтотрофных микроводорослей. Уточнение этих вопросов является принципиально важным как для понимания адаптационных стратегий фотосинтетических организмов в стрессовых условиях, так и для разработки научно обоснованных подходов к управлению процессами биологического получения молекулярного водорода.

Цель и задачи исследования.

Целью работы являлось выявление условий, приводящих к аноксии и выделению водорода фотоавтотрофными культурами *C. reinhardtii* в условиях недостатка серы, азота или углерода. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1) Провести комплексное физиолого-биохимическое изучение фотоавтотрофных культур *C. reinhardtii* при недостатке серы, азота и углерода как факторов минерального питания, с целью выявления адаптивных реакций фотосинтетического аппарата и способности клеток к образованию водорода как вторичного метаболита.

2) Исследовать динамику фотосинтетических параметров и функционального состояния ФС2 у *C. reinhardtii* при различных вариантах минерального стресса с использованием системы сопряжения фотобиореактора с PAM-флуориметром, обеспечивающей непрерывный мониторинг флуоресценции хлорофилла.

3) Оценить влияние недостатка элементов минерального питания и световых условий на активность ФС2 и формирование стресс-индуцированных физиологических состояний, сопровождающихся переходом культур к аноксии и выделение водорода.

4) Провести сравнительный анализ механизмов регуляции активности ФС2, вовлечённых в адаптацию *C. reinhardtii* к стрессу минерального питания, включая соотношение антенны и реакционных центров фотосинтеза (по соотношению Хл a/Хл b), перевосстановление пула ПХ, разобщение ФС2, функционирование виолаксантинового цикла и формирование анаэробного состояния.

Научная новизна работы.

Впервые экспериментально показано, что при недостатке азота фотоавтотрофные культуры микроводорослей *C. reinhardtii* способны к выделению водорода при использовании специально подобранного светового режима.

Проведено комплексное физиолого-биохимическое исследование, позволившее выявить новые аспекты адаптации фотоавтотрофных культур *C. reinhardtii* к недостатку элементов минерального питания.

Установлено, что снижение активности ФС2 является необходимым условием для выделения водорода как при недостатке серы, так и при недостатке азота. Показано также, что при недостатке углерода микроводоросли способны к выделению водорода только при условии снижения активности ФС2.

Показано, что выделение водорода наблюдается исключительно в тех культурах, в которых происходит выраженное перевосстановление пула пластохинонов. Данный эффект выявлен как при недостатке серы, так и при недостатке азота. В случаях, когда быстрое перевосстановление пула пластохинонов, сопряжённое с переходом культур в анаэробное состояние, не происходило, выделение водорода не наблюдалось, несмотря на снижение фотосинтетической активности.

Установлено, что другие исследованные механизмы регуляции активности ФС2, включая функционирование виолаксантинового цикла, изменение соотношения антенны и реакционных центров ФС2 (по соотношению Хл a/Хл b), а также накопление аскорбата, носят вторичный характер и не оказывают определяющего влияния на выделение водорода.

Научно-практическое значение работы.

Работа направлена на изучение “узких мест” в использовании фотосинтеза для получения энергоносителей, включая накопление энергетически ценной биомассы и фотобиологическое выделение водорода фотоавтотрофными микроводорослями. Полученные результаты вносят вклад в понимание физиолого-биохимических ограничений и регуляторных механизмов, определяющих

эффективность преобразования энергии света в химическую энергию вторичных метаболитов.

Разработана система аппаратного и программного сопряжения ФБР с PAM-флуориметром, что обеспечивает непрерывный мониторинг физиологического состояния микроводорослей в режиме реального времени. Использованная методология может быть использована при разработке отечественных ФБР, применяемых в разных научных и производственных процессах.

Результаты, характеризующие функционирование фотосинтетического аппарата *C. reinhardtii,* являются фундаментальной основой для разработки методов диагностики состояния культуры в биореакторе, а также для разработки биотехнологических приемов увеличения выхода H_2 микроводорослями.

Полученные данные можно использовать при построении моделей, прогнозирующих фотоиндуцированное образование водорода микроводорослями.

Разработанные подходы и методы культивирования микроводорослей могут быть эффективно применены в случае появления более продуктивных штаммов с резким повышением скорости и эффективности выделения водорода.

Основные положения, выносимые на защиту.

1) Фотоавтотрофные культуры *C. reinhardtii* способны к образованию водорода как вторичного метаболита не только при недостатке серы или углерода, но и при недостатке азота, что расширяет представления о физиолого-биохимических механизмах адаптации микроводорослей к условиям минерального стресса.

2) Функциональное состояние ФС2 у фотоавтотрофных культур *C. reinhardtii* существенно изменяется при недостатке элементов минерального питания, при этом реализация процесса выделения водорода, в ряде случаев требует применения специально подобранных световых режимов.

3) Все изученные типы минерального стресса, приводящие к выделению водорода, включая углеродный, сопровождаются снижением активности ФС2, что отражает универсальный характер регуляторных изменений фотосинтетического аппарата в стрессовых условиях.

4) Понижающая регуляция активности ФС2, реализуемая через перевосстановление пула ПХ, является ключевым механизмом, определяющим возможность выделения водорода у *C. reinhardtii* при недостатке серы или азота; вклад других регуляторных механизмов носит вспомогательный характер.

Апробация работы.

Результаты работы были представлены на: VIII Съезде Российского фотобиологического общества (пос. Шепси, 2017), 5-ой Пущинской школе-конференции «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (г. Пущино, 2018), 28-ой конференции «*Математика*. *Компьютер*. *Образование*» (Москва, 2021), IX Съезде Российского Фотобиологического Общества, конференция «Актуальные проблемы фотобиологии» (пос. Шепси, 2022), XXII Пущинских чтениях по фотосинтезу, Всероссийской конференциии с международным участием «От первичных процессов фотосинтеза до альтернативной энергетики» (Пущино, 2022), VII Конгрессе биофизиков России (Краснодар, 2023), X Съезде российского фотобиологического общества и конференции «Современные проблемы фотобиологии» (пос. Шепси, 2023), Международной научно-практической конференция «Изучение водных и наземных экосистем: история и современность» (Севастополь, 2024), I Региональном собрании РФО и Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы фотобиологии и биофотоники» (Нижний Новгород, 2024), XXIII Пущинских чтениях по фотосинтезу и Всероссийской конференции с международным участием «Фотосинтез: современное понимание ключевого процесса биосферы» (Пущино, 2025).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 5 статей в ведущих рецензируемых журналах, 1 обзор в сборнике, а также глава в книге. Опубликовано 10 докладов на Российских и международных конференциях.

Структура диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, а также разделов, где изложены результаты и их обсуждение. Работа включает в себя главу с выводами и список использованной литературы. Объем работы составляет 127 страницу, в ней содержится 21 рисунков и 10 таблиц. Список литературы включает 138 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinharatii - это одноклеточная зеленая водоросль, относящаяся к отделу Зеленые водоросли *Chlorophyta*, классу Вольвоксовые *Volvocophyceae*, порядку Хламидомонадовые *Chlamydomonadaceae*, роду *Chlamydomonas*.

Chlamydomonas — это широко распространенный род одноклеточных микроводорослей, встречающийся в самых разнообразных экологических нишах, включая пресные воды, морские среды и почву из умеренных, тропических и полярных регионов (Pröschold, Harris et al. 2005, Harris, Stern et al. 2009, Nakada, Shinkawa et al. 2010, Sasso, Stibor et al. 2018). *C. reinhardtii* в основном встречается в обработанных полях. Способность эффективно усваивать макроэлементы, переносить значительные колебания влажности или температуры, а также использовать различные источники неорганического углерода могут давать этим водорослям адаптивные преимущества в меняющихся условиях окружающей среды (Pivato, Costa et al. 2025).

C. reinhardtii представляет собой общепринятую модель для изучения различных физиологических и метаболических процессов, включая биогенез хлоропластов, подвижность жгутиков, таксис, фотосинтез, сигнальные пути и регуляторные механизмы (Harris 2001). Выбор данной водоросли в качестве модельного организма обусловлен простотой жизненного цикла, относительной легкостью получения мутантов и высокой способностью адаптироваться к неблагоприятным внешним воздействиям. Жизненный цикл хламидомонады включает вегетативный и генеративный процессы, при этом диплоидная фаза цикла развития клеток наблюдается только на стадии зиготы, остальные стадии, включая зооспоры, взрослые клетки и гаметы, являются гаплоидными (Петрова, Кукарских et al. 2020). Гаплоидное состояние клеток *C. reinhardtii* удобно для изучения генетических мутаций, поскольку рецессивные мутации проявляются фенотипически. К настоящему времени хорошо изучен генетический аппарат *C.*

reinhardtii, а проведенные комплексные исследования метаболизма с использованием методов протеомики, транскриптомики и метаболомики (Zhang, Gu et al. 2021, Chen, Chen et al. 2024, Zhao, Liu et al. 2024, Zhao, Li et al. 2025) делают эту водоросль привлекательным объектом для изучения наиболее актуальных проблем, в том числе принципов и механизмов адаптации фототрофных организмов к изменяющимся условиям среды (Thanigaivel, Vinayagam et al. 2024, Vasilieva, Petrova et al. 2024, Петрова, Кукарских et al. 2020).

1.2. Выделение водорода микроводорослями

1.2.1. Светозависимое выделение водорода

Светозависимое выделение водорода требует анаэробной инкубации (адаптации) микроводорослей, что необходимо для индукции синтеза гидрогеназы. Гидрогеназная активность проявляется через 15 мин анаэробной инкубации и достигает максимума через 2 часа (Yanyushin 1983). При освещении адаптированные клетки выделяют водород со скоростью, близкой к скорости фотосинтеза (Boichenko, Satina et al. 1989). Поглощение света активирует фотосинтетическую электрон-транспортную цепь (ЭТЦ), и электроны переходят от воды к ферредоксину (Фд) через две фотосистемы (ФС2 и ФС1), пул пластохинона (ПХ), комплекс цитохрома b6f и пластоцианин (Пц) с одновременным образованием трансмембранного протонного градиента в мембранах тилакоидов (рис. 1). Фд направляет электроны на гидрогеназы или ферредоксин-(НАДФ) оксидоредуктазу (ФНР). Последнее происходит в обычных аэробных условиях и приводит к восстановлению НАДФ до НАДФН (Петрова, Кукарских et al. 2020).

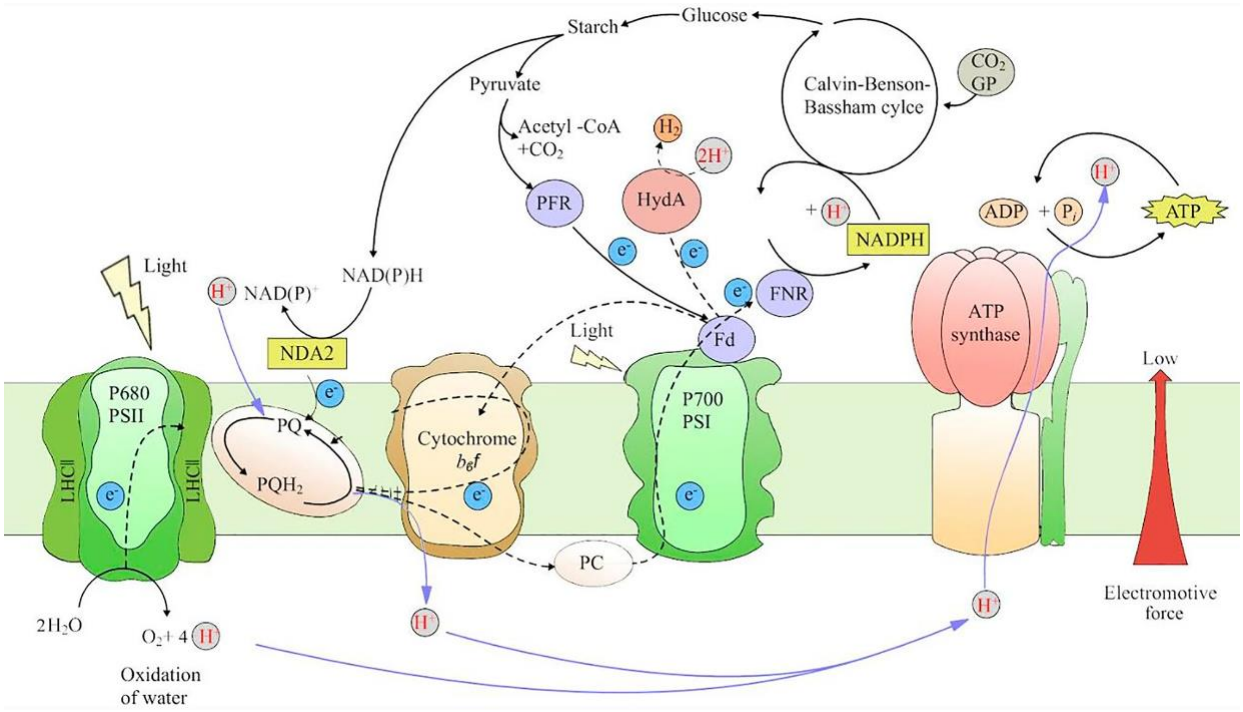


Рисунок 1. Взаимосвязь между регуляцией фотосистемы 2 и светозависимого выделения водорода микроводорослями. Схематическое изображение фотосинтетической цепи переноса электронов у микроводорослей. Fd, ферредоксин; FNR, ферредоксин НАДФ + редуктаза; NADP, никотинамидадениндинуклеотидфосфат; PC, пластоцианин; PQ, пластохинон; PSI, фотосистема 1; ФСII, фотосистема 2; LHCII, светособирающий комплекс II; NDA2, НАДФН-дегидрогеназа; ATP, аденозинтрифосфат (Grechanik and Tsygankov 2022).

Таким образом, Фд является точкой разветвления ЭТЦ между обычным фотосинтезом и образованием водорода (Eroglu and Melis 2011, Tsygankov and Abdullatypov 2015). Кроме того, Фд, по-видимому, является единственным донором электронов для гидрогеназы микроводорослей (Happe and Naber 1993). Однако многие микроводоросли имеют несколько генов Фд и синтезируют несколько типов Фд. Например, у *C. reinhardtii* идентифицировано тринадцать генов ферредоксина; однако только шесть (PETF и FDX2-6) были подробно охарактеризованы (Sawyer and Winkler 2017). PETF может передавать электроны большому количеству ферментов. Одним из важных акцепторов электронов PETF, обнаруженных в зеленых микроводорослях, являются биологически и

биотехнологически важные [FeFe]-гидрогеназы HYDA1 и HYDA2, которые катализируют образование молекулярного водорода (H_2) из протонов и электронов (Sawyer and Winkler 2017).

Как видно из рис. 1, фотосинтез (восстановление НАДФ+) и образование водорода — параллельные процессы. Однако выделение водорода происходит только в анаэробных условиях (Boichenko, Greenbaum et al. 2004). Присутствие кислорода репрессирует синтез гидрогеназы и подавляет ее активность (Yanyushin 1983).

Предполагается, что выделение водорода очень важно для удаления избыточных восстановителей, образующихся при анаэробиозе (Appel and Schulz 1998). На самом деле микроводоросли, адаптированные к анаэробным условиям в темноте, имеют преимущественно ферментативный тип метаболизма с характерным перевосстановлением пулов ПХ и НАДФН/НАДФ. Кроме того, при брожении клетки производят, но не поглощают CO_2. Как следствие, при освещении у микроводорослей, адаптированных к темноте, скорость фотосинтеза ограничивается перевосстановленным пулом всех компонентов ЭТЦ. Трансмембранный градиент pH не восстанавливается фотосинтезом, и клетки испытывают энергетическое голодание. Выделение водорода направлено на уменьшение пула чрезмерно восстановленных ПХ и НАДФН с сопутствующим переносом протона. Таким образом, этот процесс ускоряет переход от режима брожения к оксигенному фотосинтезу и поддерживает трансмембранный градиент протонов, необходимый для синтеза АТФ. Одновременно с выделением водорода микроводоросли образуют кислород. Выделяющийся кислород сначала позволяет окислять НАДФН, затем, по мере накопления, постепенно инактивирует гидрогеназу, поэтому часть электронов перенаправляется с гидрогеназы на ферредоксин-НАДФ-оксидоредуктазу. Наконец, гидрогеназа инактивируется практически полностью, и все электроны от Фд направляются на ферредоксин-НАДФ редуктазу для восстановления НАДФ, который к этому моменту образовался за счет окисления НАДФН и начала работы цикла Кальвина-Бассама-Бенсона (Tsygankov and Abdullatypov 2015).

Приведенные выше рассуждения выглядят логично, но не могут объяснить, как микроводоросли, не синтезирующие гидрогеназу, способны ежедневно переходить от брожения ночью к фотосинтезу днем.

В дополнение к синтезу гидрогеназы у зеленой водоросли *C. reinhardtii* есть еще один механизм адаптации: процесс перехода состояний (state transition). Этот процесс позволяет клеткам перемещать фотосинтетические антенны с ФС2 на ФС1 и способствует увеличению синтеза АТФ (посредством трансмембранного градиента) за счет синтеза восстановителей. Данный процесс будет подробно описан ниже.

Ранее была доказана важность как гидрогеназы, так и механизма перехода состояний для индукции фотосинтеза в анаэробных условиях (Ghysels, Godaux et al. 2013). Изучая *C. reinhardtii* и используя мутанты, заблокированные в состоянии 1, мутанты без гидрогеназы и мутанты с дефицитом как перехода состояний, так и активности гидрогеназы, авторы показали, что переходы состояний и индукция хлоропластной гидрогеназы независимо ускоряют активацию фотосинтеза в бескислородных условиях. Хотя ни один из этих механизмов не является критическим по отдельности, сочетание обоих дефектов сильно снижает способность *C. reinhardtii* возобновлять фотосинтез в бескислородных условиях.

Таким образом, эти два процесса совместно важны для выживания клеток в анаэробных условиях на свету. Возможно, нативные микроводоросли без гидрогеназы имеют достаточно мощную систему перестройки фотосинтетического аппарата для эффективного перехода из анаэробных условий в аэробные. Однако это должно быть подтверждено дальнейшими исследованиями. Интересно, что у *C. reinhardtii* есть две гидрогеназы, HydA1 и HydA2, и любая из них может участвовать в светозависимом и ферментативном выделении водорода хотя HydA1 более эффективна в обоих процессах (Meuser, D'Adamo et al. 2012). Особенности гидрогеназ и токсическое действие кислорода будут подробно рассмотрены далее в разделе 1.3.

1.2.2. Темновое выделение водорода

Микроводоросли могут выделять водород и в темных анаэробных условиях за счет ферментации запасенного крахмала. Как указывалось ранее, HydA1 является основной гидрогеназой у *C. reinhardtii*. Кроме того, PetF является основным ФД, участвующим в ферментативном выделении водорода (Hemschemeier and Happe 2011). Различные микроводоросли имеют неодинаковые продукты ферментации. Например, *C. reinhardtii* синтезирует формиат, ацетат и этанол с очень небольшим количеством водорода (Melis, Zhang et al. 2000), тогда как *C. moewisii* выделяют водород с максимальной скоростью (Meuser, Ananyev et al. 2009, Meuser, D'Adamo et al. 2012).

1.3. Гидрогеназы

Гидрогеназы – это ферменты, активирующие молекулу водорода, H_2. В настоящее время известно около полутора тысяч генов, ответственных за синтез гидрогеназы. Гидрогеназы различаются по количеству субъединиц, составу каталитического центра и специфичности к донорам и акцепторам электрона. В зависимости от вида металла в каталитическом центре гидрогеназы можно разделить на три класса. [NiFe] гидрогеназы содержат никель и железо; [FeFe] гидрогеназы содержат железо; [Fe]-гидрогеназы содержат железо в каталитическом центре, локализованном в области кофактора, но не внутри белковой глобулы. Показано, что гидрогеназы из разных классов имеют разные функциональные белковые домены, консервативные для каждого класса (Vignais and Billoud 2007). Таким образом, классификация гидрогеназ на основе наличия металлов подтверждается их структурными особенностями.

Все известные гидрогеназы микроводорослей относятся к [FeFe] гидрогеназам, основной функцией которых является образование водорода. Вот почему в этой главе мы рассматриваем только [FeFe] гидрогеназы.

[FeFe] гидрогеназы зеленой водоросли *C. reinhardtii* синтезируются в цитоплазме, но локализованы в хлоропластах (Winkler, Hemschemeier et al. 2002, Forestier, King et al. 2003). Для биосинтеза [FeFe] гидрогеназ необходимы

структурные (hydA1 или hydA2), а также дополнительные гены (hydE, hydF и hydG) (Posewitz, King et al. 2005, King, Posewitz et al. 2006, Pilet, Nicolet et al. 2009, Nicolet, Fontecilla-Camps et al. 2010).

Активный центр гидрогеназы HydA1 (H-кластер) представляет собой металлоорганический комплекс, состоящий из двух частей: кубана [4Fe-4S] и [2Fe] кластера(Adamska-Venkatesh, Roy et al. 2015). Кубан [4Fe-4S] прикреплен к белку четырьмя цистеиновыми остатками, один из которых действует как линкер для [2Fe] кластера. Два атома Fe в [2Fe] кластере координированы каждый группой CO и группой CN и соединены мостиком с третьим CO и аза-дитиолатным фрагментом (Schilter and Rauchfuss 2013). Фактически, разделение H-кластера на два подкластера также отражается их различными путями синтеза: [4Fe-4S] собирается и вставляется в гидрогеназу с помощью общего механизма сборки железо-серных кластеров на первом этапе, тогда как [2Fe] кластер собран тремя специфическими белками при матурации: HydF, HydE, HydG (Nicolet and Fontecilla-Camps 2012, Wittkamp, Senger et al. 2018).

HydF играет центральную роль в пути созревания. Он имеет гомодимерную структуру и содержит три домена на мономер (Bortolus, Costantini et al. 2018), а именно: домен GTP, расположенный на N-конце, центральный домен, ответственный за димеризацию мономеров HydF, и C-концевой домен, содержащий предполагаемый активный сайт фермента, в котором предполагается, что [4Fe-4S] кластер действует как якорь для сборки и доставки [2Fe]. Двойная роль этого белка как каркаса, на котором собирается [2Fe] кластер, и переносчика кластера в апо-HydA широко признана (Bortolus, Costantini et al. 2018).

HydE является наименее охарактеризованным из трех ферментов созревания. Он был отнесен к надсемейству ферментов радикальной S-аденозилметионинсинтетазы (SAM), но его субстраты и продукты все еще неизвестны. Хотя точная роль HydE в процессе созревания четко не определена, было высказано предположение, что он обеспечивает мостиковый ди (тиометил) аминовый лиганд H кластера (Betz, Boswell et al. 2015). Белок содержит [4Fe4S] кластер в N-концевой части, который является высококонсервативным и

идентифицирован как активный центр. Присутствует вторичный сайт связывания [FeS] кластера (с неопределенной стехиометрией), но этот сайт, по-видимому, не важен для процесса созревания (Bortolus, Costantini et al. 2018).

HydG был хорошо охарактеризован, и его кристаллическая структура была решена для различных организмов, а его функция недавно была подробно установлена (Betz, Boswell et al. 2015, Bortolus, Costantini et al. 2018). HydG (как и HydE) относится к суперсемейству SAM радикалов и представляет собой бифункциональный фермент, осуществляющий синтез Fe-содержащего комплекса с лигандами CO и CN.

По сравнению с [NiFe] гидрогеназами созревание [FeFe] гидрогеназ происходит довольно просто. Вот почему были описаны гетерологичные системы для экспрессии [FeFe] гидрогеназ (Girbal, von Abendroth et al. 2005, Sybirna, Antoine et al. 2008, Kuchenreuther, Grady-Smith et al. 2010, Yacoby, Tegler et al. 2012). Кроме того, было успешно реализовано созревание апо-HydA1 in vitro (Boyer, Stapleton et al. 2008, Stapleton and Swartz 2010).

Стоит отметить, что среди всех гидрогеназ [FeFe] гидрогеназы (HydA) демонстрируют непревзойденную активность по скорости выделения H_2 (Happe and Naber 1993, Stripp and Happe 2009). Эта эффективность основана на уникальной и своеобразной конструкции активного центра. Однако эта своеобразная конструкция делает этот активный центр особенно чувствительным к кислороду: даже небольшое количество кислорода необратимо разрушает активность фермента (Ghirardi, Togasaki et al. 1997). Недавнее исследование показало, что кратковременный контакт [FeFe] гидрогеназы с кислородом может частично обратимо инактивировать гидрогеназу (Christophe, Laure et al. 2015), но для доказательства этого необходимы дальнейшие исследования. Поскольку [FeFe] гидрогеназа функционирует в микроводорослях с оксигенным фотосинтезом, токсичность кислорода для этого фермента является ключевым фактором, ограничивающим скорость образования водорода и длительность процесса.

1.4. Выделение водорода в стрессовых условиях

Исследователи прошлого века уже знали о токсическом действии кислорода на выделение водорода микроводорослями и разработали различные методы решения этой проблемы в частности, используя дитионит для удаления кислорода (Pow and Krasna 1979, Urbig, Schulz et al. 1993). В краткосрочных экспериментах максимальные скорости образования водорода были получены, когда авторы помещали монослой микроводорослей на платиновый электрод и измеряли силу тока как скорость образования водорода при одновременном потреблении платиной кислорода (Boichenko, Arkhipov et al. 1983). Для длительных экспериментов использовали активную продувку суспензии микроводорослей инертными газами (Greenbaum 1980). В некоторых случаях исследователи ингибировали активность ФС2 с помощью DCMU (Boichenko, Greenbaum et al. 2004). Однако эти методы не давали исследователям возможности исследовать стационарные (или квазистационарные) культуры. В конце двадцатого века Мелис с соавторами разработали новый подход к получению анаэробных культур микроводорослей при освещении: лишение серы (Melis, Zhang et al. 2000). Далее мы опишем этот и другие родственные подходы к преодолению кислородной токсичности при получении водорода.

1.4.1. Культуры, лишенные серы

Микроводоросли, помимо воды, CO_2 и света, для своего роста нуждаются в минеральных элементах, при отсутствии которых приходят в стрессовое состояние. Мелис и соавторы показали, что при отсутствии в среде серы гетеротрофные культуры зеленой водоросли *C. reinhardtii* постепенно снижают активность фотосинтеза по выделению кислорода (Melis, Zhang et al. 2000, Winkler, Hemschemeier et al. 2002, Eroglu and Melis 2011) Когда скорость образования кислорода становится меньше скорости дыхания, микроводоросли потребляют весь кислород среды и переходят в анаэробные условия. В этих условиях происходит экспрессия гидрогеназ, начинается образование водорода, которое

продолжается в течение нескольких дней. Авторы назвали это двухстадийным непрямым биофотолизным процессом выделения водорода.

Более поздние детальные исследования показали, что процесс можно разделить на 5 стадий (Kosourov, Tsygankov et al. 2002).

1. Аэробный этап (выделение кислорода). На этой стадии культуры активно вырабатывают кислород. pH в большинстве случаев повышается, а окислительно-восстановительный потенциал среды высокий. Дефицит серы вызывает преимущественное накопление крахмала при небольшом росте биомассы и содержания хлорофилла (Хл), т. е. культуры демонстрируют несбалансированный рост. Скорость потенциального фотосинтеза близка к максимальной и определенно превышает скорость дыхания. Происходит потребление ацетата.

2. Стадия потребления кислорода. В эту стадию скорость фотосинтеза ниже скорости дыхания и содержание кислорода в среде снижается. Окислительно-восстановительный потенциал среды снижается, но все еще показывает окислительное состояние. Эффективный квантовый выход ФС2, измеренный методом импульсно-амплитудно-модулированной фуориметрии, постепенно снижается (Antal, Krendeleva et al. 2001). Потенциальная активность ФС2 также снижается (Melis, Zhang et al. 2000). Содержание крахмала обычно снижается, и происходит потребление ацетата. В зависимости от освещенности, температуры, продолжительности первой стадии и ряда других факторов содержание Хл (a + b) может быть стабильным или снижаться.

3. Анаэробная стадия. Она начинается при содержании кислорода в среде ниже 1 мкМ. Именно в этот момент с культурой происходят кардинальные изменения. Эффективный квантовый выход ФС2 (Y(II)) снижается до очень низкого значения в течение 5–15 мин (Antal, Krendeleva et al. 2001, Antal, Krendeleva et al. 2003), активируется анаэробный метаболизм. Окислительно-восстановительный потенциал может снизиться на 300–500 мВ за 30–90 мин. В анаэробных условиях этот параметр определяется наличием восстановленных соединений, полученных в результате ферментации, таких как формиат (Tsygankov, Kosourov et al. 2002). Экспрессируется гидрогеназа. В конце этого

этапа Y(II) немного повышается. Продолжительность этой стадии зависит от разницы между фотосинтетической активностью и дыханием, pH, концентрации клеток, освещенности и некоторых других факторов.

4. Стадия выделения водорода. Кислород в среде отсутствует, окислительно-восстановительный потенциал и pH стабильны или снижаются за счет накопления продуктов брожения. Содержание крахмала, как основного источника ферментации, также снижается. По-видимому, на этой стадии в культуре одновременно реализуются три разных типа питания: а) фотосинтез, поскольку Y заведомо не равен нулю; б) дыхание, которое, очевидно, потребляет следы кислорода, образующегося при фотосинтезе; в) брожение, так как повышается содержание ацетата, а вместе с разложением крахмала происходит также накопление этанола и формиата. Важно отметить, что скорость дыхания выше чем скорость фотосинтеза, так как на этой стадии кислород не накапливался. Ферментация является основным способом метаболизма на этой стадии, так как продукты ферментации не окисляются, а накапливаются.

5. Этап завершения. На этом этапе водород не выделяется, но существует как дыхательная, так и фотосинтетическая активность.

Продолжительность каждой стадии варьирует в широких пределах и зависит от интенсивности света, концентрации клеток, предыстории культуры, концентрации ацетата, метода депривации серы, концентрации серы в начале депривации, pH и многих других факторов. Например, стадия выделения кислорода может варьироваться от 17 до 53 часов в зависимости от фазы синхронной культуры в начале эксперимента (Tsygankov, Kosourov et al. 2002).

После первой публикации о культурах, лишенных серы, многие исследовательские группы провели подробные исследования этого процесса. Например, анализ отдельных фотосинтетических белков показал резкое снижение количества рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазооксигеназы со временем S-депривации, более постепенное снижение уровня белков ФС2 и ФС1 и изменение в составе светособирающего комплекса ФС2 (Zhang, Happe et al. 2002). Поскольку

содержание кислорода в среде не измерялось, трудно отнести эти данные к тем или иным стадиям S-депривации.

Первые публикации об образовании водорода культурами, лишенными S (Melis, Zhang et al. 2000), и предыдущие исследования (Wykoff, Davies et al. 1998) уже показали, что активность ФС2 снижается более значительно, чем активность ФС 1. Однако механизмы, лежащие в основе этого, не были ясны. Более поздний анализ Y с помощью импульсно-амплитудно-модулированной флуориметрии показал, что даже на стадии потребления кислорода пул ПХ становится перевосстановленным с последующим увеличением «закрытых» реакционных центров (Antal, Krendeleva et al. 2003). После этого флуоресцентный JIP тест был использован для изучения культур микроводорослей, лишенных S (Antal, Krendeleva et al. 2007). Показано, что доля центров ФС2, характеризующиеся энергетическим разобщением, меньшими размерами антенн, повышенной постоянной скоростью первичной фотохимии и неспособностью поддерживать ΔpH-зависимую диссипацию энергии, существенно увеличились уже после 12 ч инкубации в обедненной серой среде. Количество центров ФС2 со сниженным QA (закрытое состояние) и центров, связанных с пулом ПХ с низкой скоростью цикла, резко увеличилось через 24 часа депривации. Исследователи также предположили, что появилась часть Q_B-невосстанавливающих центров с нарушенной активностью расщепления воды, но данных недостаточно.

Последующий тщательный анализ показал, что ограничение содержания серы вызывает окислительный стресс на ранней стадии, что, скорее всего, связано с образованием синглетного кислорода в ФС2, что приводит к увеличению экспрессии GDP-L-галактозофосфорилазы, играющей существенную роль в биосинтезе аскорбата. При накоплении до миллимолярных концентраций аскорбат инактивирует комплекс, выделяющий кислород, и донирует электроны ФС2, хотя и с низкой скоростью. В отсутствие функциональной донорной стороны и достаточного транспорта электронов реакционные центры ФС2 инактивируются и разрушаются (Nagy, Vidal-Meireles et al. 2016, Nagy, Podmaniczki et al. 2018).

Все описанные здесь данные были получены с использованием фотогетеротрофных культур. Использование ацетата в питательных средах увеличивает затраты на обслуживание системы и, как следствие, стоимость получаемого газа H_2 (Tsygankov, Kosourov et al. 2006, Tsygankov 2012).

Более 15 лет назад была описана устойчивое выделение водорода фотоавтотрофными культурами (Tsygankov, Kosourov et al. 2006). Авторы показали, что фотоавтотрофная S-дефицитная культура проходит те же стадии, что и фотогетеротрофные. Кинетика изменения содержания крахмала, Хл(а+б) также была сходной. Однако поведение ФС2 и механизмы её инактивации не изучались. Содержание аскорбата не измеряли, и было неясно, играет ли он ту же роль, что и в фотогетеротрофной культуре. Итак, на все эти вопросы еще предстоит ответить.

После обнаружения способности культур, лишенных S, выделять водород, возникает вопрос: могли ли микроводоросли, лишенные других элементов питания, выделять водород в фотоавтотрофных условиях? Предпосылкой для этого стали публикации о снижении активности ФС2 у микроводорослей и цианобактерий в условиях лишения азота и фосфора (Wykoff, Davies et al. 1998, Serebryakova, Novichkova et al. 2002). Обсудим эти условия далее.

1.4.2. Культуры, лишенные фосфора

Батырова и ее коллеги изучали выделение водорода культурами Chlorella, лишенными фосфора (Batyrova, Tsygankov et al. 2012). Во-первых, они выяснили, что простое удаление P из среды не приводит к депривации P, поскольку концентрация Хл (а+б) в таких культурах не снижалась. Вот почему они использовали метод разбавления, описанный для лишенной S культуры (Laurinavichene, Tolstygina et al. 2002). Для получения разных исходных концентраций Хл в культурах в бесфосфорную среду вносили разные объемы инокулята, с которым поступало ограниченное количество фосфора. Однако, в отличие от водорослей, лишенных серы, инокулят отмывали от фосфора и выращивали на среде TAP без фосфора. В результате авторы обнаружили условия, при которых культуры были лишены фосфора, и показали, что при адаптации к

лишению фосфора культуры проходят те же стадии, что и в случае недостатка серы, и так же выделяют водород. Изменения в содержании крахмала и хлорофилла (a + b) показали сходную кинетику с культурами, лишенными S. Этот подход был в дальнейшем оптимизирован и использован для образования газа H_2 морскими штаммами в морской воде, где лишение серы невозможно из-за присутствия высокой концентрации сульфатов (Batyrova, Gavrisheva et al. 2015). Морской штамм Chlorella прошел те же этапы адаптации к P-депривации.

1.4.3. Культуры, лишенные азота

Известно, что ограничение азота вызывает накопление крахмала и липидов в микроводорослях (Chen, Yeh et al. 2011). В 2012 году исследователи из Рурского университета в Бохуме, Германия, сообщили, что, подобно серному голоданию, адаптация микроводорослей *C. reinhardtii* к недостатку азота приводит к накоплению крахмала и липидов, снижению активности ФС2, переходу в анаэробные условия и выделению водорода (Philipps, Happe et al. 2012). В отличие от депривации серы снижение активности ФС2 происходило значительно медленнее.

Кроме того, при лишении азота комплекс цитохрома b6f деградировал. В результате перенос электрона на ФС1 уменьшался, а образование H_2 было значительно ниже.

Другая группа показала, что в условиях недостатка азота выделение водорода *Chlorella protothecoides* было очень низким (даже меньше, чем в культурах с полной средой) (He, Li et al. 2012). Позже было показано, что при ограничении азота (10% NHCl по сравнению со средой TAP) эта культура продуцировала значительные (около 110 мл на 1 л культуры) количества водорода (Zhang, He et al. 2014). При низком уровне азота (10%) и исключении серы производство водорода было выше, чем при ограничении азота, примерно на 20%. Принимая во внимание, что в условиях S-депривации эта микроводоросль продуцировала H_2 с очень низкой скоростью, можно предположить, что она имела необычный ответ на S-депривацию, или, наоборот, условия S-депривации по каким-то причинам не могли

быть достигнуты. Таким образом, весьма вероятно, что для этой культуры условия с низким содержанием азота и исключением серы можно рассматривать как условия с недостатком азота (He, Li et al. 2012).

Выше представленные результаты были получены на фотогетеротрофных культурах. Таким образом, сравнение фотоавтотрофных и фотогетеротрофных культур в условиях азотного голодания еще предстоит изучить. Сравнивая выделение водорода в условиях недостатка S, P и N, можно увидеть, что для образования водорода в условиях недостатка фосфора исключение P из среды недостаточно для образования водорода из-за внутреннего пула P в клетки. Для фосфорного голодания необходима дополнительная инкубация/культивирование микроводорослей в среде без фосфора. И наоборот, полное исключение азота из среды приводит к низкому (или нулевому) образованию водорода. Для успешного выделения водорода в среде должно присутствовать некоторое количество азота (ограничение по азоту). Вероятно, в этом основное отличие клеток, лишенных S, P и N. Более подробные различия должны быть проверены в будущих экспериментах.

1.4.4. Ограничение/лишение углерода и других элементов

Nagy и соавторы (Nagy, Podmaniczki et al. 2018) предложили другой метод преодоления кислородной токсичности - исключение CO_2 из среды при инкубации фотоавтотрофных культур, что снизило скорость образования кислорода. После темновой анаэробной адаптации *C. reinhardtii* действительно выделяли водород. Для устойчивого процесса авторы ввели коммерческий поглотитель кислорода на основе порошка железа. Таким образом, культуры производили значительное количество водорода. Максимальный выход составил приблизительно 200 мкл H_2/мл культуры за 96 ч. Важно отметить, что этот метод применим только для фотоавтотрофных культур, так как фотогетеротрофные культуры продуцируют CO_2 и исключить CO_2 невозможно. Разные исследователи пытались получить водород при лишении Mg, K, Mn, Fe и других элементов, а также при ограничении двух субстратов. Однако в большинстве случаев (особенно при двойном

ограничении двух элементов) фактическое голодание не проверялась авторами. Вероятно, это и было основной причиной низкого выделения водорода культурами.

1.4.5. Применение световых импульсов

Исследователи из Университета Турку предложили новый протокол выделения водорода путем переключения суспензий водорослей с непрерывного света на серию коротких сильных световых импульсов, на фоне темноты, либо на постоянного слабого освещения (Kosourov, Jokel et al. 2018). В любом случае кислород вырабатывается только при освещении, но потребляется как при свете, так и в темноте. Поэтому соотношение периодов света и темноты должно быть меньше соотношения скоростей дыхания и фотосинтеза, а длительность световых импульсов должна быть достаточно небольшой, чтобы предотвратить накопление кислорода. Фактически, при низком уровне кислорода такие световые импульсы позволяют водорослям самостоятельно установить анаэробиоз, переключить культуру на ферментационный режим и производить водород на свету более эффективно, чем клетки с недостатком серы (0,5% *против* 0,24%, (Ghirardi 2006) соответственно). Очевидно, что данный протокол открывает возможности для повышения эффективности выделения водорода за счёт устранения активности по потреблению водорода у микроводорослей. Для полного изучения этой возможности необходимо ответить на множество фундаментальных вопросов, среди которых важным является природа окисленных веществ в фотоавтотрофных и фотогетеротрофных культурах.

1.5. Активность ФС2 и выделение водорода

При анаэробной адаптации и последующем освещении к темноте микроводоросли обычно выделяют водород, как описано выше. Поскольку стабильное выделение водорода микроводорослями при недостатке питательных веществ во многих описанных случаях требует снижения активности ФС2, мы кратко опишем механизмы регуляции активности ФС2.

Понижение активности ФС2 происходит на разных уровнях, включая фотосинтетические антенны, реакционные центры фотосинтеза, модификации

ЭТЦ, метаболические изменения, вызванные дополнительным синтезом белка, и перемещение хлоропластов (Grechanik and Tsygankov 2022).

1.5.1. Нефотохимическое тушение (NPQ)

Световая энергия, захваченная молекулами хлорофилла, может иметь несколько путей: флуоресценция, внутренняя конверсия, фотохимическая реакция, передача энергии соседним молекулам, межсистемный переход и тушение возбуждения молекулярными частицами (Goltsev, Kalaji et al. 2016). На выход флуоресценции влияют изменения в любом из этих путей. Это объясняет снижение выхода флуоресценции хлорофилла, которое не вызвано фотосинтетической активностью и поэтому называется нефотохимическим тушением (NPQ), которое объясняется несколькими механизмами. Эта сеть регуляторных путей необходима для адаптации микроводорослей к изменяющейся среде (Grechanik and Tsygankov 2022).

NPQ, работающее в диапазоне от секунд до минут, обычно связывают с диссипацией энергии (qE). Сообщалось, что у *C. reinhardtii* белки LHCSR1 и LHCSR3 необходимы для индукции qE (Peers, Truong et al. 2009, Bonente, Ballottari et al. 2011). Оба белка расположены внутри тилакоидной мембраны и имеют кислотные остатки, выставленные на люминальной стороне, которые ответственны за pH и запуск рассеивания тепла (Ballottari, Truong et al. 2016, Camargo, Perozeni et al. 2021). LHCSR в водорослях представляют собой белки, связывающие пигмент, содержащие 6–7 хлорофиллов и 2–3 каротиноида, экспрессия которых в значительной степени зависит от окружающей среды (Peers, Truong et al. 2009, Bonente, Ballottari et al. 2011). LHCSR3 экспрессируется в присутствии синего света высокой интенсивности (Petroutsos, Tokutsu et al. 2016), низкого содержания CO2 (Miura, Yamano et al. 2004) и в различных стрессовых условиях. LHCSR1 также экспрессируется при УФ-В излучении (Allorent, Lefebvre-Legendre et al. 2016). pH-зависимая активация механизмов тушения, опосредованная LHCSR3, зависит от кислотных остатков E221, E224 и D117, участвующих в pH-зависимой активации qE посредством образования катион-радикала лютеина (Ballottari, Truong et al.

2016), в то время как кислотные остатки на С-конце петли (E231, E233, E237, D239, D240, E242, D244 и D254) опосредуют pH-зависимую активацию других механизмов тушения LHCSR3, которые не зависят от взаимодействий между хлорофиллом и каротиноидами и могут включать взаимодействия Хл-Хл (Camargo, Perozeni et al. 2021, Grechanik and Tsygankov 2022)).

Более медленные компоненты NPQ связаны с повышенным рассеиванием энергии из-за накопления зеаксантина (qZ) в ходе ксантофиллового цикла (Goldschmidt-Clermont and Bassi 2015). Деэпоксидация виолаксантина в зеаксантин через антераксантин происходит на свету и приводит к повышенному рассеиванию энергии возбуждения в антенной системе ФС2 , предотвращая инактивацию и повреждение фотосинтетического аппарата (Goss and Jakob 2010). Избыточная энергия возбуждения рассеивается в виде тепла, которое может быть зарегистрировано через NPQ флуоресценции хлорофилла. Обратное превращение зеаксантина в виолаксантин происходит в темноте. У сосудистых растений и зеленых водорослей усиленное тепловое рассеяние избыточной световой энергии требует наличия как транс-тилакоидного протонного градиента, так и высоких концентраций зеаксантина (Goss and Jakob 2010).

Компонент перехода состояния NPQ действует в течение нескольких минут и отражает динамическое распределение светособирающих антенн LHCII (рис.2) по фотосистемам (qT) (Goldschmidt-Clermont and Bassi 2015). Переходы состояний («state transitions») регулируются окислительно-восстановительным состоянием пула ПХ. Он активируется, когда пластохинол занимает сайт окисления хинола комплекса Cyt b6f (Vener, Van Kan et al. 1997). В состоянии 1 при окислении пула ПХ антенна LHCII подключена к ФС2. Перевосстановление пула ПХ вызывает переход в состояние 2: подвижный компонент LHCII отсоединяется от ФС2 и, по крайней мере, частично связывается с ФС1. Поперечные сечения ФС2 и ФС1 уменьшаются и увеличиваются соответственно, что приводит к перебалансировке окислительно-восстановительного состояния пула ПХ. И наоборот, чрезмерно окисленный пул ПХ вызывает переход к состоянию 1, при этом мобильная антенна от ФС1 отделяется и далее прикрепляется к ФС2. Экспериментальные условия

могут манипулировать переходом системы между состояниями 1 или 2. В природных условиях вряд ли встречаются состояния, когда реализуется состояние 1 или состояние 2. Чаще всего наблюдается динамическое равновесие, определяемое условиями внешней среды, при этом LHCII лишь частично связан с ФС2 и ФС1 (Goldschmidt-Clermont and Bassi 2015).

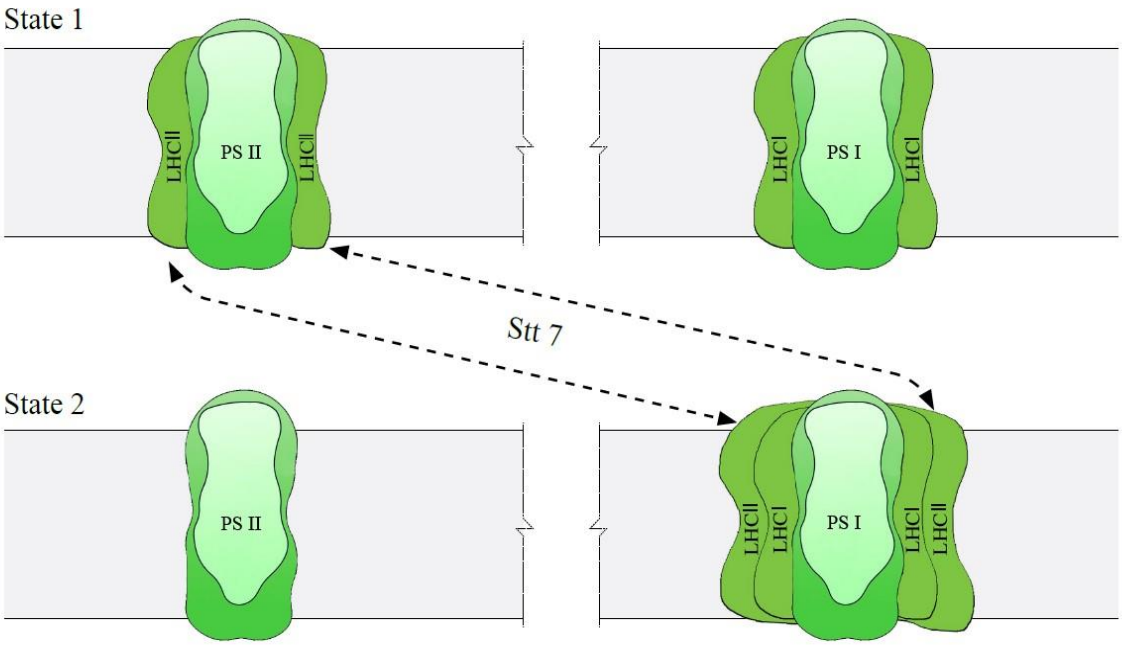


Рисунок 2. Схема протекания перехода state 1 – state 2 и state 2 – state 1, обусловленного активацией фермента Stt7 киназы.

Ключевым компонентом в переходах состояний у *C. reinhardtii* является протеинкиназа хлоропластов Stt7 (Stn7 у Arabidopsis), которая определяет окислительно-восстановительное состояние пула пластохинонов (Lemeille, Turkina et al. 2010). При чрезмерном возбуждении фотосистемы 2 эта киназа активируется через комплекс цитохрома b6f. Это необходимо для фосфорилирования светособирающей системы фотосистемы 2, которая частично мигрирует в фотосистему 1 (состояние 2). Чрезмерное возбуждение фотосистемы 1 инактивирует Stt7, вызывая дефосфорилирование LHCII и его транслокацию обратно в фотосистему 2 (состояние 1). Следовательно, переходы между состояниями можно рассматривать как регуляторный механизм, обеспечивающий

гомеостатическую регуляцию окислительно-восстановительного баланса в фотосинтетической цепи переноса электрона (Grechanik and Tsygankov 2022).

Линейный поток электронов зависит от обеих фотосистем и генерирует НАДФН, а также АТФ, в то время как циклический поток электронов вокруг ФС1 производит только АТФ. Состояние 2, которое способствует возбуждению ФС1, может увеличить скорость циклического потока электронов. Помимо воздействия на Stn7-зависимое поперечное сечение ФС1, состояние 2 индуцирует регуляторное переключение с линейного потока электронов на циклический поток электронов у *C. reinhardtii* (Finazzi, Rappaport et al. 2002).

1.5.1. Фотоингибирование

Фотоингибирование ФС2 — это индуцированная светом утрата способности к выделению кислорода и транспортной активности электронов ФС2. С момента открытия считалось, что фотоингибирование происходит только при сильном освещении. Оно разрушает белок D1 ФС2, чего не происходит при низкой интенсивности света. Однако последующие исследования показали, что деградация белка D1 происходит при любой интенсивности света и коррелирует с потерей активности ФС2 (Tyystjärvi and Aro 1996). Согласно механизму фотоингибирования, предложенному в работе в (Nishiyama and Murata 2014), избыточная световая энергия приводит к образованию активных форм кислорода, таких как перекись водорода (H_2O_2) и синглетный кислород. Мониторинг фотоповреждения и восстановления ФС2 показало, что процесс восстановления подавляется факторами, которые также регулируют фотоингибирование. Активные формы кислорода влияют на ФС2, ингибируя синтез белка, а не непосредственно необходимы для репарации ФС2. Солевой, температурный и окислительный стресс снижают максимальную скорость восстановления, тем самым способствуя фотоингибированию (Allakhverdiev and Murata 2004).

1.5.2. Кислород-независимые механизмы подавления ФС2

Изучение кинетики распада флуоресценции хлорофилла с пикосекундным временным разрешением выявило наличие кислород-независимого механизма

инактивации ФС2 у *C. reinhardtii* при недостатке серы(Volgusheva, Zagidullin et al. 2007). Авторы пришли к выводу, что снижение фотохимической активности ФС2 в клетках с недостатком серы является следствием стабильно восстановленных форм Q_A, которые, в свою очередь, запускают электростатическое отталкивающее действие на первичную радикальную пару. Стабильно восстановленные состояния Q_A могут быть протонированы и диссоциированы от D1-белка, индуцируя протеазозависимую разборку ФС2. Этот процесс не требует кислорода и может играть важную роль в последующей анаэробной фазе серного голодания (рассмотрено в (Antal, Krendeleva et al. 2011). Без сомнения, его вызывает перевосстановление пула пластохинонов (ПХ), что объясняет возможность протекания этого процесса даже в присутствии кислорода. Другой механизм снижения активности выделения кислорода был предложен в (Nagy, Vidal-Meireles et al. 2016, Nagy, Podmaniczki et al. 2018). У *C. reinhardtii* белок D1 (PsbA) имеет интенсивный обмен при недостатке серы. Однако другие субъединицы ФС2, RbcL и CP43, расщепляются быстрее, чем белок D1. GDP-L-галактозофосфорилаза, вносящая значительный вклад в биосинтез аскорбата, также активируется. В миллимолярных концентрациях аскорбат может инактивировать водокисляющий комплекс, и отдавать электроны ФС2 вместо комплекса, выделяющего кислород. В отсутствие функционального донора и достаточного транспорта электронов реакционные центры ФС2 инактивируются и деградируют (Grechanik and Tsygankov 2022).

1.6. Понижающая регуляция ФС2 при выделении водорода в условиях недостатка питательных веществ

Ранее сообщалось, что активность ФС2 в микроводорослях снижается при недостатке серы, азота или фосфора (Wykoff, Davies et al. 1998, Melis, Zhang et al. 2000, Batyrova, Tsygankov et al. 2012, Philipps, Happe et al. 2012, Shastik, Li et al. 2020). Были предложены различные механизмы, опосредующие деградацию ФС2 (таблица 1).

Таблица 1. Механизмы понижающей регуляции ФС2 у микроводорослей *C. reinhardtii* при недостатке питательных веществ (Grechanik and Tsygankov 2022).

	Механизмы понижающей регуляции ФС2	Условия культивирования, штамм	Эффект	Ссылка на литературный источник
1	Накопление нередуцирующих центров Q_B	Недостаток S и P в фотогетеротрофных аэробных условиях	Да	(Wykoff, Davies et al. 1998, Melis, Zhang et al. 2000, Batyrova, Tsygankov et al. 2012, Philipps, Happe et al. 2012, Shastik, Li et al. 2020)
2	Перевосстановление пула ПХ	Недостаток S в фотогетеротрофных анаэробных условиях	Да	(Antal, Krendeleva et al. 2003)
3	Появление восстановленных форм Q_A	Недостаток S и P в фотогетеротрофных анаэробных условиях	Да	(Volgusheva, Zagidullin et al. 2007)
4	Переход состояний (State transitions)	Недостаток S и P в фотогетеротрофных аэробных условиях	Да	(Wykoff, Davies et al. 1998)
5	Ксантофилловый цикл	Недостаток S и P в фотогетеротрофных аэробных условиях	Да	(Wykoff, Davies et al. 1998)

		Недостаток S и P в фотогетеротрофных аэробных условиях	Нет	(Antal, Krendeleva et al. 2003)
6	Деградация D1	Недостаток S в фотогетеротрофных анаэробных условиях	Да	(Zhang, Happe et al. 2002)
		Недостаток S в фотогетеротрофных анаэробных условиях	Нет	(Nagy, Podmaniczki et al. 2018)
7	Деградация RbcL и CP43	Недостаток S в фотогетеротрофных анаэробных условиях	Да	(Nagy, Podmaniczki et al. 2018)
8	Фотоингибирование	Раняя стадия недостатка S в фотогетеротрофных условиях	Да	(Nagy, Podmaniczki et al. 2018)
9	Нарушение со стороны донора	Недостаток S в фотогетеротрофных анаэробных условиях	Да	(Antal, Volgusheva et al. 2006)
10	Накопление аскорбата, инактивация кислород-выделяющего комплекса, и замена комплекса для донорства электронов на ФС2.	Недостаток S в фотогетеротрофных анаэробных условиях	Да	(Nagy, Podmaniczki et al. 2018)

Сравнение вариантов подавления ФС2 указывает на несколько перекрывающихся механизмов. Например, перевосстановление пула ПХ (позиция 2 в табл. 1) часто приводит к накоплению восстановленных QB, что приводит к накоплению перевосстановленных Q_A на свету (позиция 3 в табл. 1) и, наконец, к повышению нередуцирующих центров Q_B (позиция 1). Стабильно восстановленный Q_A индуцирует электростатическое отталкивающее действие на первичную радикальную пару с последующим отсоединением Q_A от белка D1 (Volgusheva, Zagidullin et al. 2007, Antal, Krendeleva et al. 2011).

Итак, позиция 3 описывает несколько последовательных стадий от чрезмерной восстановленности ПХ до функциональной инактивации ФС2 в результате неспособности белка D1 взаимодействовать с QB.

Другим примером является фотоингибирование (позиция 8, табл. 1), т. е. вызванное светом снижение фотосинтетической активности у организмов с оксигенным фотосинтезом. ФС2 более чувствительна к свету, чем остальные фотосинтетические механизмы. Это объясняет, почему обычно считается, что фотоингибирование индуцируется световым повреждением ФС2. В живых организмах фотоингибированные центры ФС2 непрерывно восстанавливаются посредством расщепления ключевого белка D1 с последующим его синтезом de novo и повторной сборкой фотосинтетического реакционного центра ФС2 (Nishiyama and Murata 2014). Таким образом, позиция 6 в таблице 1 дает подробное описание позиции 8 (фотоингибирование). Кроме того, все вызванные светом явления, снижающие эффективность фотосинтеза, часто расцениваются как фотоингибирование (Tyystjärvi and Aro 1996). В этом смысле деградация компонентов RbcL и CP43 ФС2 (позиция 7, табл. 1) также может рассматриваться как фотоингибирование (Grechanik and Tsygankov 2022).

Следует отметить, что в данных о механизмах регуляции ФС2 имеются определенные противоречия. Самые ранние наблюдения выявили деградацию белка D1 (позиция 6, таблица 1) вместе с основными компонентами rubisco у *C. reinhardtii*,при недостатке серы (Zhang, Happe et al. 2002). Напротив, в более

позднем исследовании сообщалось о деградации RbcL и CP43 без значительной потери белка D1 (Nagy, Podmaniczki et al. 2018).

В таблице 1 перечислены практически все известные механизмы подавления ФС2, которые иногда действуют одновременно. Например, в культурах микроводорослей, адаптированных к низкой интенсивности света, NPQ qE, qZ и qT повышаются сразу после воздействия сильного света в условиях недостатка питательных веществ, так и при отсутствии недостатка. В то же время фотоингибирование происходит в результате избытка света и кислорода, а также увеличения количества активных форм кислорода. Это часто наблюдается в культурах, адаптированных к слабому свету, а затем подвергающихся сильному свету (Nishiyama and Murata 2014).

С другой стороны, существует вероятность того, что разные механизмы подавления ФС2 действуют последовательно и могут активироваться на разных стадиях недостатка S. Это предположение основано на ряде наблюдений о том, что избыточное восстановление пула ПХ варьируется на разных стадиях недостатка S, и подтверждается тем фактом, что ФС2 претерпевает значительные изменения сразу после перехода в анаэробиоз (Antal, Krendeleva et al. 2003). Количество закрытых реакционных центров различно на аэробной и анаэробной стадиях (Volgusheva, Zagidullin et al. 2007).

Серное голодание — наиболее изученный тип стрессового воздействия у микроводорослей. Светозависимое выделение водорода в живых фотосинтезирующих микроводорослях ускоряет переход культур из анаэробных в аэробные условия. В условиях дефицита серы культуры микроводорослей снижают активность ФС2. Обзор литературы показывает, что разные авторы наблюдали включение различных механизмов подавления ФС2 (см. таблицу 1 или работы таких авторов, как (Wykoff, Davies et al. 1998, Melis, Zhang et al. 2000, Antal, Krendeleva et al. 2003, Volgusheva, Zagidullin et al. 2007, Batyrova, Tsygankov et al. 2012, Nagy, Podmaniczki et al. 2018, Shastik, Li et al. 2020)

Мы предполагаем, что все описанные механизмы могут быть реализованы, а конкретный сценарий подавления зависит от факторов окружающей среды,

включая интенсивность света, температуру, pH среды культивирования, солевой состав, концентрацию хлорофилла, геометрию ФБР, а также предысторию культуры микроводорослей. Более того, при недостатке серы, после начального подавления ФС2, запуск светозависимой выработки водорода способен активировать ФС2 (Antal, Krendeleva et al. 2001), обеспечивая клетки энергией для анаболических процессов и усиливая трансмембранный протонный градиент, даже если большая часть световой энергии при этом расходуется впустую. Однако данное предположение требует дальнейшей экспериментальной проверки.(Антал, Кренделева et al. 2001)

Таким образом, интенсивные исследования выделения водорода микроводорослями в течение последних двух десятилетий стали полезными для понимания механизма процесса и поиска путей его интенсификации, а также для разработки новых подходов к созданию искусственного фотосинтеза (Grechanik and Tsygankov 2022).

1.7. Практическая значимость фотообразования водорода микроводорослями

Фотовыделение водорода (H_2) микроводорослями, процесс биофотолиза воды под действием света и катализа гидрогеназой, представляет собой экологически чистый и перспективный путь получения энергии. Этот процесс основан на использовании возобновляемых ресурсов – воды и солнечного света, с образованием в качестве побочного продукта также воды, что делает его привлекательной альтернативой традиционным углеводородным топливам.

Практическая значимость фотовыделения водорода многогранна. Во-первых, получаемый таким образом водород является чистым источником энергии, потенциально бесконечным и экологически безопасным носителем, способным значительно снизить выбросы парниковых газов, что подтверждается исследованиями (Bayro-Kaiser and Nelson 2017, Wang, Khoo et al. 2021). Во-вторых, микроводоросли используют солнечную энергию и воду, не конкурируя с сельхозкультурами за пахотные земли, и могут успешно культивироваться на сточных водах или солоноватой воде (Wang, Khoo et al. 2021). В-третьих,

биофотолиз осуществляется при умеренных условиях (температура, давление) и не требует использования дорогостоящих катализаторов, что значительно упрощает операционные требования (Eroglu and Melis 2016). Наконец, существует возможность интеграции данного процесса в биорефайнинг, позволяя одновременно генерировать биомассу, биотопливо и осуществлять биологическую очистку воды, тем самым повышая общую экономическую эффективность (Zarei, Malekshahi et al. 2024).

Несмотря на явные преимущества, биотехнические ограничения остаются существенными препятствиями для широкомасштабного применения. Главным из них является токсичность кислорода: H_2-гидрогеназа чрезвычайно чувствительна к O_2, который образуется в процессе фотосинтеза, что приводит к ингибированию фермента. Еще одним ограничением является низкая эффективность преобразования солнечной энергии в водород, составляющая менее 0,01%, что требует серьезной оптимизации (Bayro-Kaiser and Nelson 2017). Кроме того, для запуска фотовыделения часто применяют стрессовые условия, такие как недостаток серы, фосфора или других питательных веществ. Хотя это индуцирует процесс, такие условия угнетают рост культуры и снижают стабильность всего процесса (Skjånes, Rebours et al. 2013, Batyrova, Gavrisheva et al. 2015). Наконец, трудности масштабирования остаются актуальными, поскольку большинство исследований проводилось в малых фотобиореакторах (< 500 мл), что затрудняет прямую трансляцию результатов на промышленные масштабы (Zarei, Malekshahi et al. 2024).

Тем не менее, существует ряд перспектив и решений для преодоления этих ограничений. Использование методов иммобилизации клеток и специальных конфигураций фотобиореакторов способствует увеличению эффективности, устойчивости и продлению выделения H_2 (Zarei, Malekshahi et al. 2024). Генетические подходы, включая создание трансгенных штаммов, манипуляции регуляцией фотосистем и применение пульсирующего освещения, позволяют снижать концентрацию O_2 и продлевать активность гидрогеназы (Touloupakis,

Faraloni et al. 2021, Grechanik and Tsygankov 2022). Исследования фотовыделения H_2 у морских штаммов, например, *Chlorella sp.* при недостатке фосфора, демонстрируют возможность использования морской воды как среды культивирования (Batyrova, Gavrisheva et al. 2015). Наконец, разработка интегрированных систем, объединяющих производство биогаза, биотоплива и фотобиологического водорода, может обеспечить экономическую устойчивость всего процесса (Wang, Khoo et al. 2021).

В таблице 2 обобщены данные о различных штаммах микроводорослей, условиях их культивирования и соответствующих скоростях выделения водорода, полученные из разных научных публикаций.

Таблица 2: Сравнительные данные по выделению водорода микроводорослями.

Вид / штамм	Условия (автотрофия)	Скорость, мл $H_2 \cdot л^{-1} \cdot ч^{-1}$	Источник
C. reinhardtii (дик. тип)	-S; CO_2-аэрация; свет по протоколу(25-110-20 $\mu E \cdot м^{-2} \cdot с^{-1}$)	1,3	(Tsygankov, Kosourov et al. 2006)
C. reinhardtii	-S; Outdoor 50 л; трубчатый ФБР	0,25	(Scoma, Giannelli et al. 2012)
Chlorella spp. (YSL01/YSL16)	Фотоавтотрофия при контролируемых режимах; атмосферный O_2	н/д (демонстрация выделения H_2 в аэробных условиях	(Hwang, Kim et al. 2014)

Вид / штамм	Условия (фотогетеротрофия/иммоб.)	Скорость, мл·л$^{-1}$·ч$^{-1}$	Проверенный источник
C. reinhardtii hpm91 (ΔPGR5)	-S; масштабирование до 10 л; ≤230 μE·м$^{-2}$·с$^{-1}$	≈1,17 (среднее за 26 суток: 7287 мл / 10 л)	(Liu, Ye et al. 2022)
Scenedesmus obliquus (иммоб.)	Искусств. сточная вода + 10 г·л$^{-1}$ глюкозы; -S; 140 μE·м$^{-2}$·с$^{-1}$; N_2; pH 8	8,53	(Ruiz-Marin, Canedo-López et al. 2020)
Chlorella vulgaris (иммоб.)	Те же условия, что выше	1,63	(Ruiz-Marin, Canedo-López et al. 2020)
Chlorella vulgaris BEIJ G-120	Без дефицита питат.; иммоб.; оптимиз. свет; фото-H_2 макс.	12,0	(Touloupakis, Faraloni et al. 2021)
Chlorella sorokiniana KU204	-S; Ar; 25 °C; 35 μE·м$^{-2}$·с$^{-1}$; 650 мл реактор	1,30	(Pongpadung, Liu et al. 2015)

В фотоавтотрофных условиях (Табл. 2) недостаток серы (- S) является распространенным методом стимуляции выделения H_2. Это связано с тем, что недостаток серы подавляет синтез белков, необходимых для фотосинтеза, и перенаправляет электронный поток на гидрогеназу, фермент, ответственный за выделение H_2. Однако, как видно из данных, абсолютные значения скорости выделения водорода варьируются. На это влияют такие параметры, как интенсивность света, конструкция ФБР, а также конкретные особенности штамма.

Важно отметить, что результаты, полученные в лабораторных условиях, не всегда воспроизводятся при масштабировании процесса, как показано в работе (Scoma, Giannelli et al. 2012), где культивирование проводилось в outdoor условиях.

В гетеротрофных условиях (Табл. 2) добавление органических соединений, таких как глюкоза или ацетат, может значительно увеличить скорость выделения H_2. Иммобилизация клеток микроводорослей также является перспективным подходом, поскольку она позволяет повысить концентрацию биомассы и упростить процесс сбора H_2. Однако, следует учитывать, что иммобилизация может ограничивать доступ питательных веществ и света к клеткам, что влияет на общую эффективность процесса. Например, иммобилизованные *Scenedesmus obliquus* показали значительно более высокую скорость выделения H_2, чем иммобилизованные *Chlorella vulgaris* в одинаковых условиях. Оптимизация условий освещения и подачи питательных веществ является важной задачей при использовании иммобилизованных клеток.

Анализ таблицы показывает, что фотогетеротрофные условия и иммобилизация позволяют достичь более высоких скоростей выделения водорода, чем чистая фотоавтотрофия. Однако, стоит учитывать, что фотогетеротрофия требует добавления органических субстратов, что может увеличить стоимость процесса.

В последнее время опубликовано множество лабораторных результатов по фотообразованию биоводорода из микроводорослей. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в лабораторных условиях, масштабирование этого процесса для коммерческого применения остается сложной задачей. Переход от лабораторных колб к пилотным и промышленным установкам требует решения ряда инженерных и биологических проблем, включая оптимизацию условий культивирования, повышение устойчивости организмов, эффективное управление газообменом и интеграцию с возобновляемыми источниками энергии.

Таблица 3 обобщает ключевые результаты различных исследовательских проектов и подходов, направленных на преодоление этих барьеров и

демонстрацию потенциала микроводорослей и цианобактерий для эффективного и устойчивого выделения H_2 в условиях, приближенных к реальным. Представленные данные охватывают разные масштабы – от лабораторных до пилотных установок объемом десятки литров, и демонстрируют прогресс в решении критических аспектов, таких как прямое солнечное освещение, иммобилизация клеток, оптимизация конструкций ФБР и генетические модификации организмов.

Таблица 3. Перспективные подходы к масштабированию производства водорода микроводорослями: анализ исследовательских проектов.

Проект/группа	**Организм/подход**	**Ключевой результат**
CNR-ISE (Италия)	*C.reinhardtii*, -S, прямой солнечный свет; горизонтальный трубчатый ФБР	Первое убедительное полевое (outdoor) подтверждение H_2-выделения микроводорослями при солнечном освещении в реальном климате (Scoma, Giannelli et al. 2012).
Конструкторские решения PBR для H_2	Обзор по дизайну и масштабированию ФБР (специальные газообменники, световые пути)	Инженерные принципы для перехода от колб к пилотам; сопоставление indoor/outdoor 50 л испытаний (Skjånes, Andersen et al. 2016)
Масштабирование мутантов с повышенной плотностью потока H_2	*Chlamydomonas* hpm91/pgr5-подобные линии	«Продление» фотовыделения H_2 за счёт регуляции циклического транспорта электронов;

		шаг к стабильности процесса (Liu, Ye et al. 2022)
Полумасштабные тесты	Интегрированные трубчатые ФБР; **50–100 л**	Заявлены улучшенные выходы и рассчитана соответствующая приведенная стоимость водорода (LCOH). (Elman, Isaac et al. 2025)

Представленная таблица наглядно демонстрирует развитие исследований в области фотобиологического выделения водорода с использованием микроводорослей, в частности *C. reinhardtii*. От первых успешных полевых испытаний, подтвердивших возможность получения H_2 под прямым солнечным светом в реальных климатических условиях (Scoma, Giannelli et al. 2012), до детальной разработки инженерных решений для ФБР (Skjånes, Andersen et al. 2016) и выбора штаммов с улучшенной производительностью (Liu, Ye et al. 2022).

Последние результаты, в том числе данные из препринта Elman (Elman, Isaac et al. 2025), показывают переход к полумасштабным тестам и расчету приведенной стоимости водорода (LCOH), что свидетельствует о смещении акцента исследований в сторону практической применимости и экономической целесообразности. Эти работы подчеркивают не только значительный прогресс в преодолении технических барьеров масштабирования, но и стремление к созданию устойчивых и конкурентоспособных процессов выделения чистого водорода.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования и способы культивирования

Исходные культуры *C. reinhardtii Dang*, штамм CC-124, поддерживали на чашках Петри с агаризованной стандартной Трис-ацетатфосфатной (TAP) средой (pH 6,9) (Gorman and Levine 1965) при 28 °C и освещении 36 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. Единичные колонии переносили в 10 мл жидкой среды TAP и инкубировали 2 дня в тех же условиях. Затем культуры выращивали фотоавтотрофно на среде High-Salt (HSM) (Sueoka, Chiang et al. 1967) в колбах Эрленмейера на 500 мл, которые барботировали смесью воздуха с 2% CO_2, которую пропускали через мембранные фильтры с размером пор 0,2 мкм (Acro 37 TF, «Gelman Sciences, Inc.», США). Культивирование продолжали до поздней экспоненциальной фазы (в наших условиях обычно трое суток). Для опытов культуры выращивали в фотоавтотрофных условиях в ФБР и затем использовали в качестве инокулята в том же реакторе, что снижало стресс, вызванный пересевом культуры. При этом в качестве контроля использовали культуры, выросшие при оптимальном освещении без лимитирования элементами питания.

2.2. Оптимизация состава среды HSM для культивирования микроводорослей

Поскольку наши исследования связаны с культурами, выросшими при недостатке элементов питания, было важно определить, до какой концентрации клеток культуры растут без лимитирования элементами питания. В этом случае если при удалении какого-либо элемента питания культуры достигают меньшей концентрации клеток, можно определенно утверждать, что они испытывают недостаток именно изучаемого элемента питания.

При предварительном культивировании *C. reinhardtii* в ФБР мы обнаружили, что при использовании среды HSM скорость роста культур снижается после 30 ч (рис. 3).

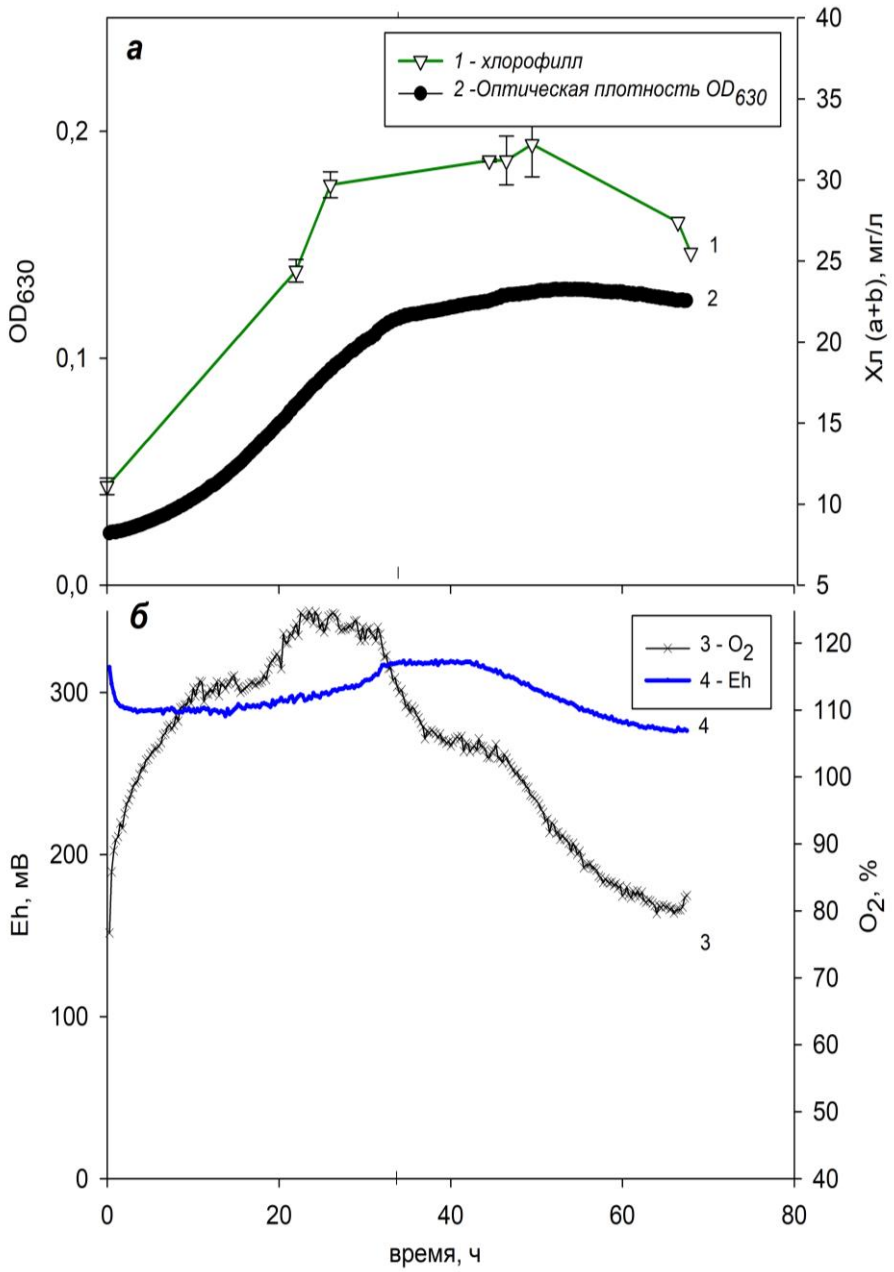
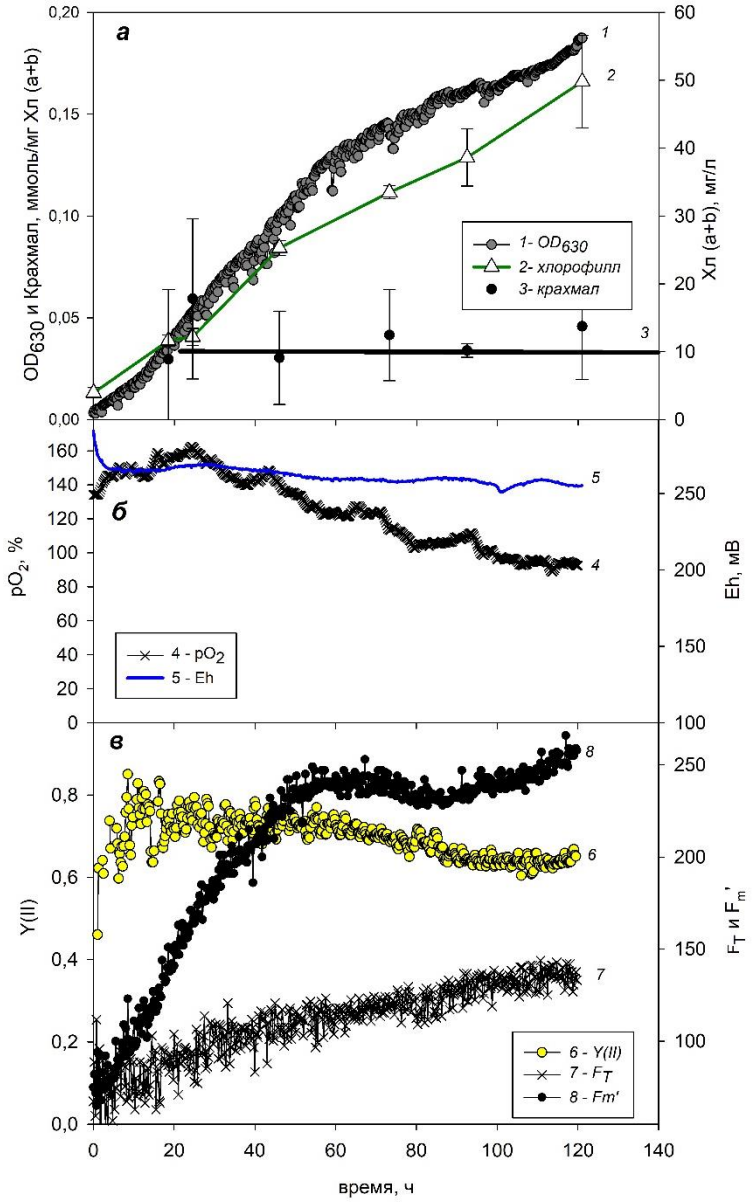


Рисунок 3. Культивирование *C. reinhardtii* в ФБР с использованием среды HSM в газовой фазе воздух + 2% CO_2 . Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. **а** Хл (a + b) (1); Оптическая плотность культуры (2); **б** pO_2 (3); eH (4)

После 50 ч культивирования культуры накапливали 32 мг/л Хл (a + b) и прекращали рост, а после 54 ч культивирования оптическая плотность культуры, а также содержание Хл (a + b) уменьшались. Таким образом, после 50 ч культуры переходили в стационарную фазу. Мы предположили, что это вызвано истощением какого-то компонента питания в среде HSM. Для проверки этого предположения мы использовали среду HSM, концентрированную в два раза (2*HSM)



В этих условиях, культуры накапливали 50 мг/л Хл (a+b) и не прекращали рост (рис. 4А). Таким образом наше предположение подтвердилось, причем среда 2*HSM не ингибировала рост микроводорослей. Поэтому мы использовали 2*HSM, во всех экспериментах и проводили эксперименты с недостатком какого-либо элемента питания в условиях, когда концентрация клеток была определенно ниже 50 мг/л Хл (a+b).

Рисунок 4. Культивирование *C. reinhardtii* в ФБР с использованием 2* HSM в газовой фазе воздух + 2% CO_2. Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. **а** Оптическая плотность культуры (1); Хл (a + b) (2); крахмал (3); **б** pO_2 (4); eH (5); **в** Y(II) (6); F_T (7); Fm′ (8).

2.3. Подбор условий для создания недостатка отдельных элементов питания

2.3.1. Недостаток серы

Для получения голодающих по сере культур *C. reinhardtii* использовали метод разбавления: культурам добавляли среду без серы, в процессе роста потреблялась остаточная сера, и культуры плавно переходили в условия голодания по сере (Laurinavichene, Tolstygina et al. 2002).Чтобы свести к минимуму стресс во время инокуляции при переносе из стеклянного сосуда в ФБР, *C. reinhardtii* для инокулята культивировали в ФБР с использованием среды HSM с удвоенной

концентрацией солей (2*HSM), чтобы избежать неконтролируемого лимитирования какой-либо солью. Ранее было показано, что такая среда не ингибировала рост микроводорослей и позволяла достигать более высоких концентраций хлорофилла. При накоплении в культуре 50 мг/л хлорофилла a и b (Хл (a+b)) часть суспензии отбирали из ФБР, а оставшиеся 300 мл суспензии разбавляли 700 мл среды 2*HSM без серы (2*HSM − S).

2.3.2. Недостаток азота

В этом исследовании для достижения недостатка азота в культурах *C. reinhardtii* был применен модифицированный метод разбавления, основанный на ранее разработанном методе, который использовался для серного голодания (Laurinavichene, Tolstygina et al. 2002). Аналогичный метод разбавления был недавно применен для голодающих по азоту микроводорослей (Shastik, Li et al. 2019).

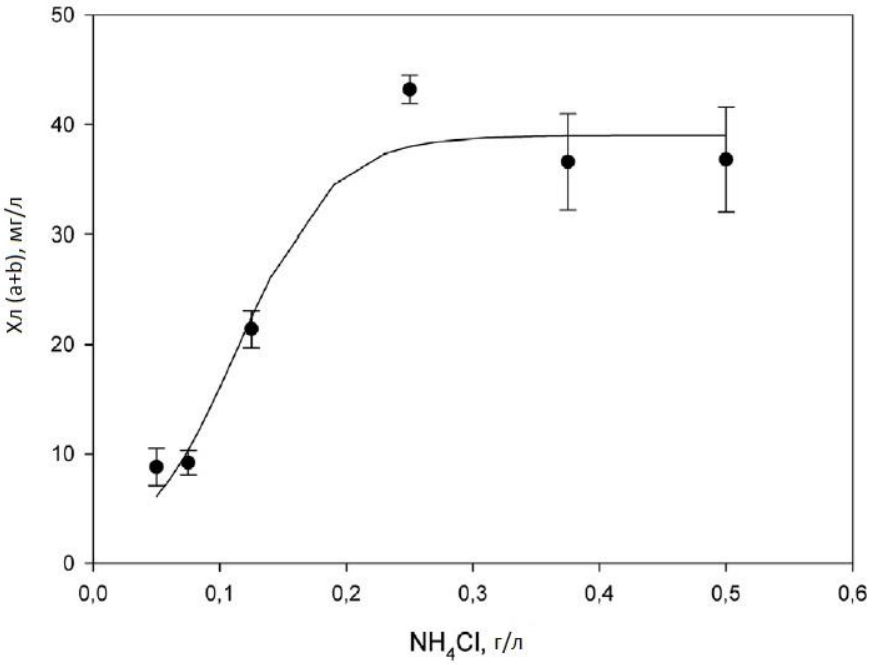


Рисунок 5. Зависимость конечной концентрации Хл (a+b) от начальной концентрации NH_4Cl.

Азот является жизненно важным компонентом белков и нуклеиновых кислот, поэтому обеспечение точного контроля дефицита азота во время выращивания микроводорослей имеет решающее значение для предотвращения гибели клеток.

Для подбора подходящей начальной концентрации азота в среде (рис. 5) изучали зависимость конечной концентрации Хл (a+b) в культурах от исходной концентрации NH_4Cl в среде 2*HSM, как описано ранее (Laurinavichene, Tolstygina et al. 2002). Конечная концентрация Хл (a+b) увеличивалась с повышением начальной концентрации NH_4Cl до 0,25 г/л и оставалась постоянной (40 мг/л) при дальнейших увеличениях концентрации NH_4Cl. Это означает, что NH_4Cl ≥0,25 г/л не приводят к переходу культур в стационарную фазу. При концентрации NH_4Cl 0,125 г/л конечная концентрация Хл (a+b) достигала 21,5 мг/л, то есть именно исчерпание азота приводило к переходу культур в стационарную фазу. Такая концентрация NH_4Cl в среде была выбрана для последующих экспериментов. В этих условиях культуры начинали рост в условиях полного обеспечения азотом, а по мере его потребления плавно переходили к голоданию по азоту.

2.3.3. Недостаток углекислоты

В отличие от стандартных аэробных условий роста (воздух+2%CO_2), для создания недостатка углерода к воздуху или аргону не добавляли CO_2. Кроме того при продувке культур воздух дополнительно очищался от углекислоты пропусканием через ловушку, расположенную перед фильтром и содержащую 5 М раствор NaOH с установленным распылителем воздуха. Следует отметить, что при удалении углекислоты из культуральной среды pH в ФБР возрастал. Чтобы не вносить дополнительного стрессового фактора, pH среды поддерживался на уровне 7,4 путём автоматической добавки 0,2 М серной кислоты.

В анаэробных условиях культуры продували 100% аргоном без добавления CO_2.

2.4. OJIP-тест

Тест OJIP адаптированной к темноте культуры является надежным и очень информативным методом, отражающим все этапы переноса электрона от РЦ к ФС1 (Goltsev, Kalaji et al. 2016, Kalaji, Jajoo et al. 2016). В соответствии с целью настоящей работы учитывались параметры, указанные в табл. 4. Первично измерения OJIP теста проводились с использованием флуориметра HandyPEA

(Hansatech). Для повышения чувствительности измерений образцы концентрировали. Для этого из ФБР отбирали 10 мл культуры в закрытую пробирку и центрифугировали (Biosan LMC-4200R; 2000 об/мин, 2 мин). Отбирали 8 мл супернатанта, а остаток осторожно ресуспендировали. В предварительных экспериментах было показано, что эта процедура не повреждает клетки. После этого культуру адаптировали к темноте в течение 15 мин. Более поздние эксперименты проводились с использованием флуориметра AquaPen 110-C (Photon Systems Instruments, Чехия). Использование данного флуориметра не требовало концентрирования клеток для повышения чувствительности. При анаэробной (бескислородной) культуре в ФБР пробирки для отбора проб заполнялись аргоном и культура не контактировала с воздухом при отборе проб. Световой импульс имел длительность 1 с и интенсивность 3000 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$.

Таблица 4. Параметры и результаты OJIP тестов для культур *C. reinhardtii* в разных условиях выращивания.

Fv/Fm or (Fm − F0)/Fm	максимальный фотохимический квантовый выход ФС2
Vj = (Fj − F0)/Fm − F0)	нормированная переменная флуоресценция на стадии J (2 мс после включения света);
dV/dt0 = 4(F300 − F50)/(Fm − F0)	Усредненный начальный наклон относительной переменной флуоресценции, измеренный от 50 до 300 мкс.
ABS/RC	поток энергии, поглощаемой одним активным РЦ ФС II, пропорциональный видимому размеру антенны активных РЦ ФС2, способных восстанавливать Q_A

PIabs	индекс производительности, показатель функциональной активности ФС2, отнесенный к поглощаемой энергии
Sm	Нормированная общая площадь над кривой OJIP
N	Количество оборотов при индукции флуоресценции от старта до tFm

2.5. Измерение концентрации аскорбата

Для измерения концентрации аскорбата использовали протокол подготовки образцов и подвижных фаз для элюирования аскорбата, как описано ранее (Kovács, Vidal-Meireles et al. 2016). Для измерений применяли систему ВЭЖХ Agilent 1100, оснащенную колонкой 4,6 × 250 мм (Waters spherisorb ODS2, 5 мкм, Supelco Inc., Беллефонт, Пенсильвания, США). На колонку наносили 20 мкл образца. При элюировании аскорбата изократический подвижной фазой А был 50 мМ KH_2PO_4 (pH 2,5, подкислен ортофосфорной кислотой), который использовали в течение 5 мин со скоростью потока 1 мл/мин, затем использовали градиент ацетонитрила (подвижная фаза В) от 0% до 30% в интервале от 3,5 до 6 мин для элюирования менее полярных компонентов с колонки. В интервале от 8 до 9 мин процент подвижной фазы В снижали до 0%, и колонку уравновешивали подвижной фазой А в течение дополнительных 9 мин. Общее время анализа составляло 18 мин. Анализ проводили при комнатной температуре. Сигнал регистрировали в диапазоне от 190 до 500 нм. Пик аскорбата появлялся примерно на 5,1 мин с максимумом поглощения при ~244 нм. В качестве стандарта использовали последовательное разведение аскорбата от 50 до 0,2 мкМ в экстракционном буфере. Площади пиков аскорбата в хроматограммах ВЭЖХ определяли с помощью программного обеспечения, используя линейную аппроксимацию для построения калибровочной кривой. Каждый образец измеряли в трех биологических повторностях.

2.6. Анализ каротиноидов

Пигментный анализ образцов проводили с помощью ВЭЖХ Shimadzu (Shimadzu, Киото, Япония) на обращенно-фазовой колонке Agilent Zorbax SB-C18 (4,6 × 250 мм, размер частиц 5 мкм, Agilent, Санта-Клара, Калифорния, США). Для разделения смеси пигментов использовали раствор «А» (23% этилацетата, 69% ацетонитрила и 8% воды) и раствор «В» (100% этилацетат). Применяли следующий градиент растворителей: в течение первых 5 минут через колонку прокачивали раствор «А». Затем, в течение 5–25 минут, раствор «А» замещали линейным градиентом раствора «В» (0–25%). Далее, с 25 до 40 минут, долю раствора «В» постепенно увеличивали с 25 до 100%. В конце анализа в течение 3 минут через колонку пропускали 100% раствора «В». Скорость потока всех растворителей составляла 1 мл/мин, температура 25^0C. Каротиноиды идентифицировали на основе их спектров поглощения и времени удерживания на колонке (Moskalenko, Toropygina et al. 1997).

В результатах представлены данные о процентном содержании виолаксантина и зеаксантина, где 100% - это количество всех каротиноидов (неоксантин, виолаксантин, лютеин, зеаксантин, неолютеин В, бета-каротин, альфа-каротин).

2.7. Другие методы

Содержание хл (a+b) и соотношение хл a/b определяли спектрофотометрически (U-VIS 1240 Mini, Shimadzu, Япония) после его экстракции в 95%-ном растворе этанола (Harris 1989).Экстракцию проводили в темноте, при комнатной температуре 5 минут. Количество крахмала в клетках измеряли как эквивалент глюкозы после ферментативного гидролиза, используя Glucose GOD FS kit (DiaSys, Germany), согласно Gfeller and Gibbs (Gfeller and Gibbs 1984). Парциальное давление кислорода измеряли и выражали в процентах от насыщения среды воздухом при 28 °C. eH (окислительно-восстановительный потенциал среды) измерялся как потенциал платинового электрода по сравнению с Ag/AgCl электродом (Mettler toledo, США). Процентное содержание H_2 в газе из

ФБР анализировали с помощью газовой хроматографии, как описано ранее (Tsygankov, Kosourov et al. 2006). Все опыты по культивированию *C. reinhardtii* повторяли 2–4 раза, а на рисунках представлены данные типичных кривых роста. Количество выделившегося H_2 мл/час/л рассчитывали с учетом расхода газа (100 мл/мин) и процентного содержания H_2 на выходе по следующей формуле $V\ H_2 = H_2\% * V_{газа}$(мл/мин)*60/ 100%*$V_{культуры\ в\ л}$. Общий объем H_2 рассчитывали как сумму порций водорода, выделенных в последовательные временные интервалы с соответствующими скоростями выделения H_2. Интенсивность освещения измеряли с использованием квантового сенсора, подключённого к фотометру LI-250 (Li-COR, США), регистрирующего фотосинтетически активную радиацию в единицах мкмоль фотонов·$м^{-2}$·$с^{-1}$. Погрешность измерений составляла около 4%, что обеспечивало надёжную настройку и воспроизводимость световых условий в ходе экспериментов.

2.8. Статистический анализ

Каждое измерение проводили в трехкратной повторности. Использовали Excel 2016 для статистической обработки данных и SigmaPlot 12 для графиков. На графиках представлены типичные кривые, которые повторялись при повторных выращиваниях. Данные представлены как средние значения с 95% доверительным интервалом.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Культивирование микроводорослей в ФБР, сопряженном с PAM-флуориметром

Для детального изучения влияния различных условий культивирования на фотосинтетическую активность *C. reinhardtii*, в частности, на эффективность ФС 2, было крайне важно обеспечить точный и непрерывный мониторинг физиологического состояния культуры.

C. reinhardtii культивировали в ФБР объемом 1,5 л, состоящем из стеклянных коаксиальных цилиндров (Tsygankov, Laurinavichene et al. 1994). Световой путь

(толщина освещаемого слоя суспензии) составлял 22 мм. Культуру перемешивали реверсивными магнитными лопастями, рециркуляционным контуром и потоком газовой смеси. Температуру (28 °C) контролировали с помощью компьютера, водопроводная вода служила охлаждающим агентом. Значение pH 7,4 регулировали путем автоматического добавления 0,1 M NaOH. В ФБР подавали фильтростерилизованную газовую смесь (98% воздуха + 2% CO_2 или 98% аргона + 2% CO_2, 100 мл/мин, или же без добавления CO_2, если указано). Для освещения культур на оси стеклянных цилиндров размещали люминесцентные лампы холодного белого цвета (Навигатор НКЛ-4У 30 Вт, 4000°К, Китай). Интенсивность света на поверхности культур составляла 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ фотосинтетически активной радиации (ФАР) (LI-250 (LiCOR, США)), оснащённого датчиком квантов света (Grechanik, Romanova et al. 2020).

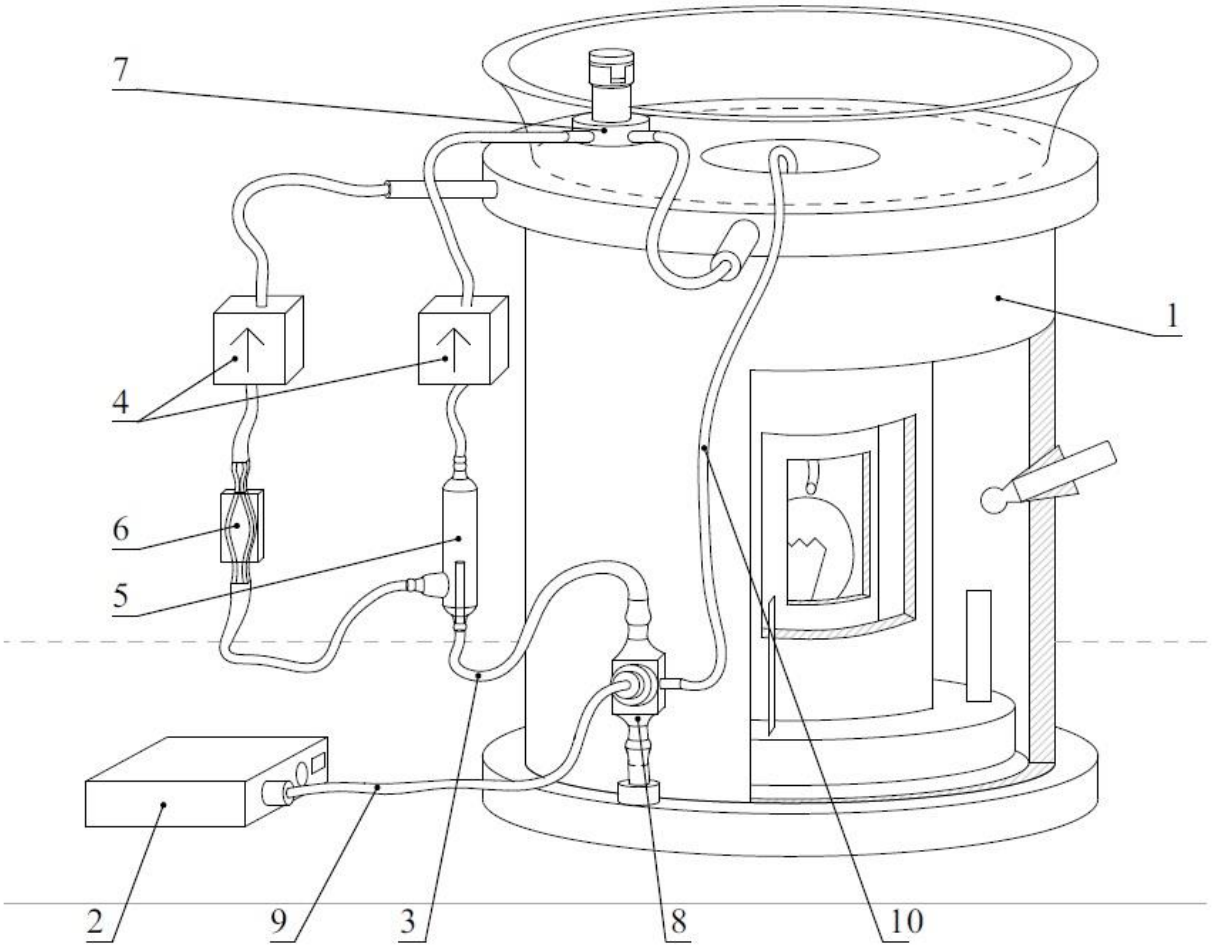


Рисунок 6. Схема интеграции флуориметра PAM и ФБР.

1- фотобиореактор; 2- флуориметр PAM Junior (WALTZ); 3- контур рециркуляции культуры; 4- насосы с пневматической импульсной подачей жидкости; 5- сосуд для разделения жидкости; 6- кювета для измерения оптической плотности; 7- пробоотборник; 8- кювета для PAM-флюориметра; 9- 10- оптическое волокно (Grechanik, Romanova et al. 2020).

ФБР (рис. 6), (1) соединен с флуориметром PAM Junior (WALTZ, Германия) (2) по следующей схеме. Реактор имеет контур рециркуляции культуры (3), содержащий насосы с пневматической импульсной подачей жидкости (4), сосуд для разделения жидкости (5), кювету со световым путем 1 мм для измерения оптической плотности (6), пробоотборник (7) и кювету (8) для PAM-флюориметра со световым путем 15 мм с присоединенным PAM-флюориметром (9). Оптическое волокно (10) служило для направления света от люминесцентной лампы в кювету (перпендикулярно направляющей флуриметра 9). Таким образом, измеряемая культура находилась в тех же условиях, что и в ФБР. За две секунды до измерения программа, управляющая биореактором, останавливала поток культуры через петлю (путем отключения пневматических импульсов на насосы), что было необходимо для предотвращения протекания культуры через кювету во время измерения, затем программа, управляющая ФБР, запускала программу измерения флуоресценции, которая измеряла F_T под светом во время роста и Fm' под импульсом насыщающего света (синий светодиод, 450 нм, 10 000 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$) на расстоянии 1 мм от кончика 400-мм световода JUNIOR-PAM в дополнение к стационарному освещению . Фактический квантовый выход рассчитывали с помощью программного обеспечения для PAM Junior по следующему уравнению: $Y = (Fm' - F_T)/Fm'$, где Fm' — максимальная флуоресценция хлорофилла *a в светоадаптированных образцах, а F_T — стационарная флуоресценция хлорофилла a в светоадаптированных образцах. Следует отметить, что модификацию программного обеспечения проводил ее разработчик, Мамыкин В. Г. Программа запускала поток суспензии в контуре циркуляции через 1 с после измерения. Программа управления ФБР позволяет регулировать временной интервал между измерениями. Предварительные

эксперименты показали, что для детального анализа эффективности ФС 2 достаточно 15-минутного интервала. Более частые измерения приводили к зарастанию кюветы, а менее частые недостаточно информативны.

Следует отметить, что впервые мониторинг параметров флуоресценции непосредственно в ФБР при изучении выделения водорода применяли более 20 лет назад (Антал и др, 2001). Для этого световод, подающий насыщающий свет и принимающий флуоресцентный свет, просто подводили к прозрачной стенке ФБР. При этом внутри реактора непрерывно происходило перемешивание культур. За счет перемешивания в момент подачи насыщающей вспышки света освещались клетки, находящиеся в лучах света, исходящих из световода. Длительность вспышки составляла 1 сек. За это время часть клеток вследствие перемешивания уходила из зоны освещения и мониторинга и приходили другие клетки, которые начинали освещаться позже, чем начало освещения. Это неизбежно искажало кинетику флуоресценции. В нашем ФБР мы специально останавливаем поток через петлю, чтобы не происходило таких искажений кинетики флуоресценции.

Следует отметить, что к настоящему времени ряд фирм выпускает ФБР. Часть из них оснащена PAM-флуориметром, например, PSI – Photon System Instruments. Однако этот ФБР также измеряет и анализирует движущуюся культуральную суспензию. Таким образом, наша система фотобиореактор- PAM флуориметр свободна от указанного недостатка, что выгодно отличает ее от других аналогичных систем.

3.2. Фотоавтотрофный рост *C. reinhardtii* без лимитирования элементами питания в аэробных и анаэробных условиях

При проведении экспериментов по влиянию недостатка того или иного элемента питания необходимо знать, как изменяются параметры культуры в обычных условиях в процессе культивирования.

Для этого проводили исследование ростовых характеристик и особенностей ФС2 в стандартных аэробных условиях на 2*HSM в нашем ФБР. Анализировались такие параметры, как содержание пигментов (хлорофилл a+b, виолаксантин, зеаксантин), энергетических субстратов (крахмал, аскорбат), pO_2, H_2, eH, ключевые

показатели фотосинтеза (Y(II), FT, Fm' и параметры JIP-теста). При продувке аргоном особое внимание было уделено газовой фазе: поскольку система была открыта, для предотвращения неконтролируемого попадания атмосферного воздуха использовалась продувка аргоном с 2% CO_2 с невысокой скоростью (100 мл/мин).

3.2.1. Культивирование *C. reinhardtii* в присутствии воздуха

В качестве контроля использовали фотоавтотрофные культуры *C. reinhardtii* в ФБР с использованием среды (2*HSM), продуваемые смесью воздух + 2% CO_2. При культивировании *C. reinhardtii* в этих условиях концентрация Хл (a +b) возрастала в течение первых 66 ч с последующим снижением (рис. 7А). При этом максимальная концентрация хлорофилла составила 40 мг/л. Можно констатировать, что после 66 ч культура переходила в стационарную фазу в связи с исчерпанием какого-то минерального компонента (Grechanik, Romanova et al. 2020). В начале культивирования pO_2 возрастало в течение первых 20 ч. После 40–60 ч культивирования pO_2 постепенно снижалось, что свидетельствует о замедлении скорости фотосинтетического выделения кислорода культурой, которое происходило раньше перехода в стационарную фазу. Содержание крахмала в клетках и eH (рис. 7АБ) не изменялись в течение всего периода культивирования. Содержание аскорбата в клетках изменялось незначительно и было минимальным в конце экспоненциальной фазы. При этом реальный квантовый выход ФС2 Y(II) у культур в начале составлял 0,73–0,77, постепенно снижаясь, причём это снижение ускорялось при наступлении стационарной фазы и достигало 0,5 в конце выращивания. Эти изменения типичны для фотоавтотрофных культур и в общем соответствуют описанным ранее(Grechanik, Romanova et al. 2020, Grechanik, Naidov et al. 2021, Grechanik, Bol’shakov et al. 2022).

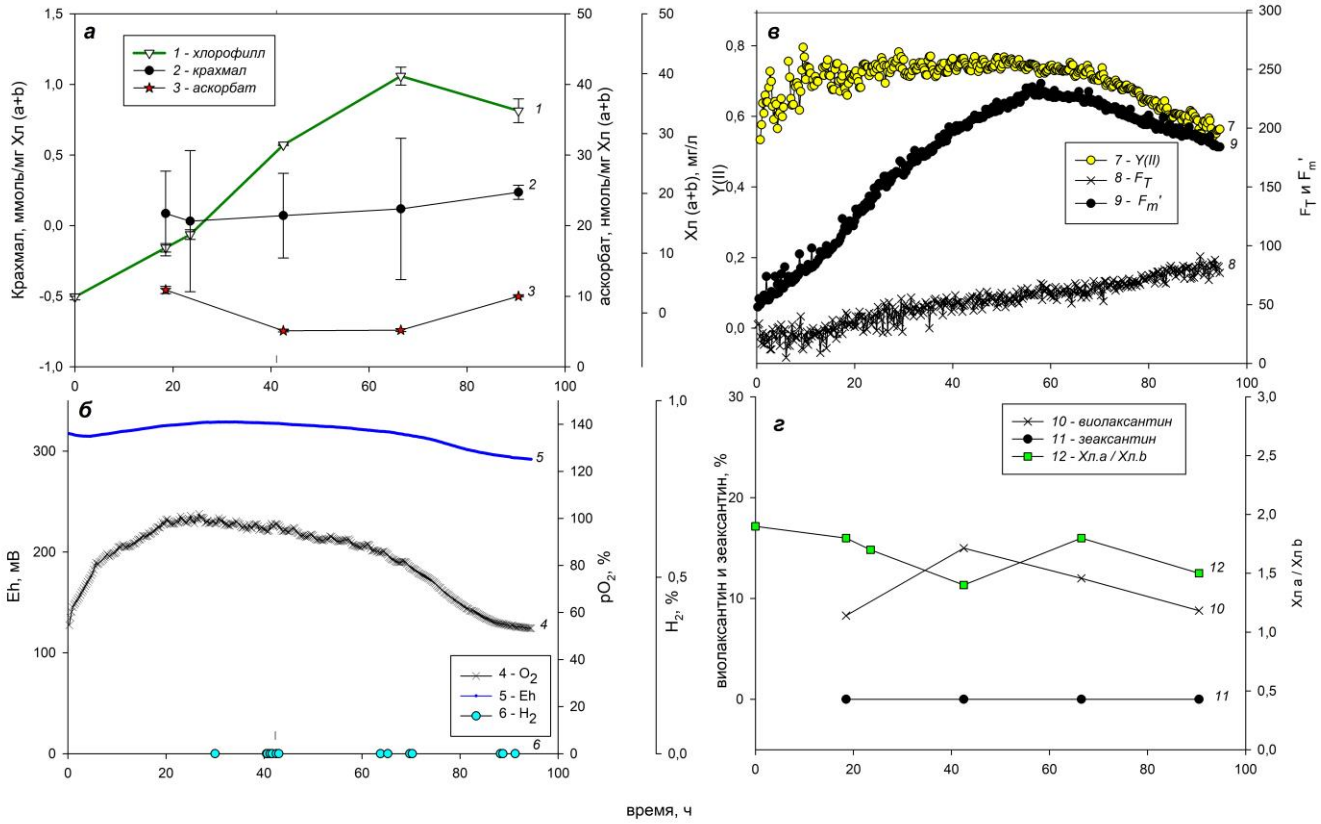


Рисунок 7. Культивирование *C. reinhardtii* без лимитирования элементами питания в газовой фазе воздух + 2% CO_2 (контроль). Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. **а** Хл (a + b) (1); крахмал (2), аскорбат (3); **б** pO_2 (4); eH (5); содержание H_2 в газовой фазе (6) **в** Y(II) (7); F_T (8); Fm′ (9); **г** Отношение Хл.a/Хл.b (12) и процентное содержание виолаксантина (10) и зеаксантина (11) (100% - количество всех каротиноидов) (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

Для более детального анализа ФС2 в процессе роста культуры отбирали образцы из ФБР, адаптировали к темноте, как описано в разделе «Материалы и методы» и измеряли OJIP кинетику. Максимальная фотохимическая эффективность (Fv/Fm) оказалась близкой к Y(II), измеренной непосредственно в ФБР (Табл. 5). Vj, нормированная вариабельная флуоресценция на стадии J, снижалась в экспоненциальной фазе культивирования, а затем несколько возрастала. Основные изменения Vj происходили в стационарной фазе роста. Этот параметр указывает количество закрытых РЦ по отношению к общему количеству РЦ, которые могут быть закрыты в момент времени J (Гольцев, Каладжи et al. 2016).

Индекс продуктивности PIabs достигал максимума через 45 ч культивирования и снижался на более поздних стадиях роста. Остальные параметры в процессе культивирования существенно не изменялись (табл. 5).

Был проведен анализ содержания каротиноидов и отношения Хл.a/Хл.b. (рис. 7Г) Полученные данные подтверждают, у контрольных культур не происходит включение виолаксантинового цикла, и не происходит дополнительный синтез антенных комплексов на протяжении всего периода культивирования, включая позднюю экспоненциальную фазу, где культуры испытывали светолимитирование (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

Таблица 5. Изменение параметров JIP теста при выращивании культур в обычных условиях в атмосфере воздух/аргон+CO_2.

Условия и время культивирования (ч)	Y(II)	Fv/Fm	Vj	dV/dt0	ABS/RC	PIabs
Air+CO_2						
23,5	0,74	0,779	0,272	0,205	0,967	9,77
47,5	0,74	0,802	0,185	0,145	0,978	18,2
67	0,726	0,766	0,19	0,162	1,11	12,5
90,5	0,551	0,703	0,233	0,216	1,3	5,9
Ar+CO_2						
23	0,75	0,75	0,35	0,45	1,68	3,2
47	0,73	0,67	0,55	0,84	2,14	0,98
71	0,71	0,59	0,75	1,29	2,98	0,14
95	0,55	0,43	0,70	1,17	3,91	0,09

В целом рост *C. reinhardtii* в аэробных условиях представляет собой типичную картину фотоавтотрофного культивирования микроводорослей без стрессов, но с переходом от нелимитированного роста к светолимитированию с последующим исчерпанием какого-то компонента питания в стационарной фазе (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

Обсуждение второй части таблицы (аргон) см в разделе 3.2.2.

3.2.2. Культивирование *C. reinhardtii* в присутствии аргона

Чтобы исключить одновременное действие продувания аргона с углекислотой через культуру и стрессовые условия, вызванные недостатком какого-либо элемента питания, мы проводили анализ культур, росших на полной среде, но в условиях продувки аргона. Во время культивирования *C. reinhardtii* в атмосфере аргона + 2% CO_2 D630 линейно росла до 60 ч (рис. 8). Скорость роста культуры по OD630 между 20-м и 30-м ч составила 0,040 $ч^{-1}$ и снизилась до 0,024 $ч^{-1}$ в течение следующих 10 ч с последующим снижением (рассчитано по данным OD630 из рис. 8). После 65 ч культивирования рост прекратился, а через 95 ч началось снижение содержания Хл (a + b), когда pO_2 снизилось почти до нуля. Динамика Хл (a + b) была аналогична оптической плотности.

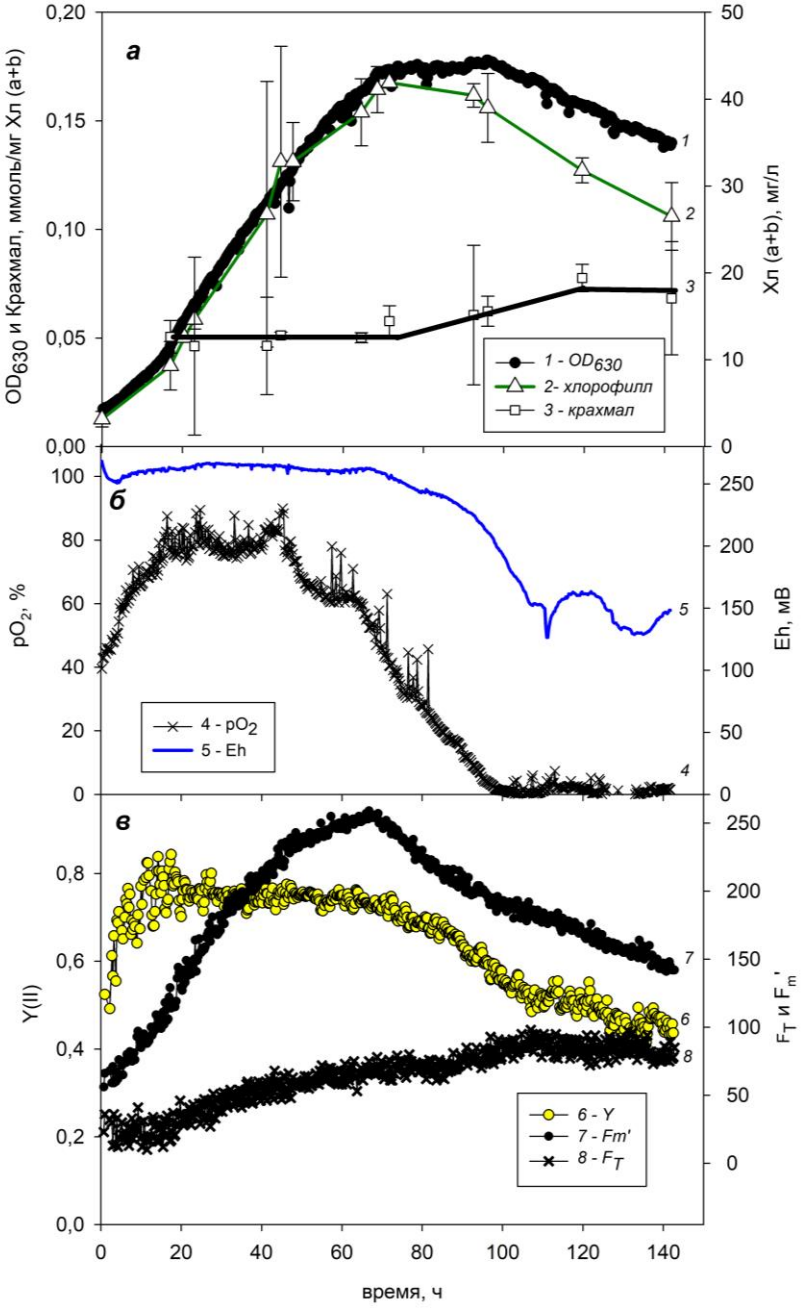


Рисунок 8. Культивирование *C. reinhardtii* без лимитирования элементами питания в газовой фазе аргон + 2% CO_2. Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. **а** Оптическая плотность культуры (1); Хл (a + b) (2);

крахмал (3); **б** pO_2 (4); eH (5); **в** Y(II) (6); Fm′ (7); F_T (8) (Grechanik, Romanova et al. 2020).

Содержание крахмала в клетках не менялось в течение 15-60 ч и медленно увеличивалось после этого. pO_2 и eH были стабильны с 15 до 45 ч и далее уменьшались (рис. 8). Поскольку pO_2 в растворе является результатом выделения кислорода микроводорослями и его удаления потоком аргона, снижение pO_2 означает, что скорость фотосинтетического выделения кислорода снизилась. После 60 ч культивирования фактический квантовый выход ФС2, Y(II), уменьшился в основном за счет снижения Fm′ (рис. 7 В). Начало снижения Fm′ происходило в то же время, когда культура переставала расти. Следует отметить, что даже после 140 ч культивирования, когда культура значительно снизила оптическую плотность и содержание Хл (a + b), Y(II) составлял 0,44, что не является драматичным для фотосинтетического аппарата. Максимальная фотохимическая эффективность (Fv/Fm) в течение первых 48 ч культивирования в атмосфере Ar + CO_2 была близка к таковой для культур в атмосфере воздух + CO_2 (рис. 7). Данные OJIP теста представлены в табл.5. Индекс производительности PIabs снизился через 47 ч. Vj увеличивалась даже через 47 ч. После 47 ч культивирования появились наиболее значительные изменения в функционировании ФС2. Fv/Fm значительно снизился одновременно с PIabs (табл. 5). Это сопровождалось увеличением Vj. Образцы культуры через 47 ч демонстрировали увеличение dV/dt0 (табл. 5). Поток энергии поглощения на активный РЦ, ABS/RC, значительно уменьшился.

Сравнивая рост культур в двух разных атмосферах: воздух + 2% CO_2 (контроль) и аргон + 2% CO_2, можно отметить следующее:

1. Ранние стадии роста (до ~30 ч): В обеих атмосферах начальные параметры роста и работы фотосинтетического аппарата (Y(II), Fv/Fm, PIabs) были схожи. Это подтверждает, что на начальном этапе аргон сам по себе не создавал существенного стресса.

2. Середина экспоненциальной фазы (около 47-50 ч):

Контроль (воздух): параметры Y(II) и Fv/Fm оставались высокими, а PIabs достигал своего максимума (18,2). Это указывает на оптимальное функционирование фотосинтеза.

Аргон: наблюдались первые признаки стресса:

- Y(II) оставался высоким, но Fv/Fm уже начал снижаться.

- Vj и dV/dt0 заметно увеличились, что указывает на возможное нарушение переноса электронов и увеличение числа закрытых реакционных центров.

- PIabs резко упал (до 0,98), сигнализируя о значительном снижении общей эффективности фотосинтеза.

3. Поздние стадии роста (после 70-90 ч):

Контроль (воздух): рост замедлился, вероятно, из-за лимитирования питательными веществами и светом. Y(II) и Fv/Fm начали снижаться, но оставались на относительно высоком уровне (0,551 и 0,703 соответственно). PIabs также снизился.

Аргон:

- Y(II) также снизился, но Fv/Fm упал значительно (до 0,43).

- Vj и dV/dt0 достигли пиковых значений, а ABS/RC многократно вырос, указывая на серьезное повреждение ФС2 и накопление энергии.

- PIabs приблизился к нулю (0,09), показывая практически полную остановку фотосинтетической активности.

- рост прекратился.

Таким образом, аргоновая атмосфера, создающая условия пониженного содержания кислорода (до 103 мкМ, или 43% насыщения воздухом), явно вызывала стресс у *C. reinhardtii*. Это подтверждается ранним и выраженным ухудшением параметров фотосинтетического аппарата, особенно Fv/Fm, Vj, ABS/RC и PIabs, а также прекращением роста.

Основная причина стресса, вероятно, кроется в пониженном содержании кислорода. Известно, что анаэробные условия нарушают баланс пластохинонового пула (ПХ) из-за хлородыхания и отсутствия нормального окислительного пути

(Tóth, Schansker et al. 2007). Это может приводить к накоплению восстановительных эквивалентов и повреждению ФС2.

В контрольных условиях (воздух + CO_2) стресс, связанный с лимитированием светом и питательными веществами, был гораздо менее выражен и проявлялся только на очень поздних стадиях роста, не вызывая критических нарушений в работе ФС2.

Таким образом, культивирование в аргоновой атмосфере, приводящее к постепенному снижению концентрации кислорода, является стрессовым состоянием, существенно отличающимся от естественного светового лимитирования в аэробных условиях.

3.3. Фотоавтотрофный рост *C. reinhardtii* при недостке серы.

Фотобиологическое выделение водорода микроводорослями – перспективный путь получения экологически чистого топлива, который привлекает внимание исследователей с момента открытия этого процесса более 80 лет назад (Gaffron and Rubin 1942). Несмотря на значительный потенциал, широкое практическое применение этого подхода по-прежнему ограничено низкой эффективностью и кратковременностью выделения H_2 (Tsygankov and Abdullatypov 2015).

25 лет назад Melis с соавт (Melis, Zhang et al. 2000) показали, что микроводоросли в условиях серного голодания способны к переходу в анаэробные условия на свету с последующим выделением водорода в течение нескольких дней. Активные исследования, проводимые многими лабораториями мира, в значительной степени продвинули понимание данного процесса. Более того, в 2012 г независимыми лабораториями показано, что недостаток фосфора (Batyrova, Tsygankov et al. 2012) и азота (He, Li et al. 2012, Philipps, Happe et al. 2012) также приводит к переходу культур в анаэробные условия с последующим выделением водорода. В 2015 г появилось сообщение, что адаптация культур к недостатку магния также приводит к выделению водорода (Volgusheva, Kukarskikh et al. 2015).

Большая часть исследований в данной области сосредоточена на фотогетеротрофных культурах, культивируемых в присутствии органических субстратов, таких как ацетат (Laurinavichene, Tolstygina et al. 2004, KIM, KANG et al. 2005, Kim, Kang et al. 2006, Laurinavichene, Fedorov et al. 2006, Tsygankov, Kosourov et al. 2006). Хотя эти исследования выявили ключевые факторы, влияющие на скорость выделения водорода, использование органических субстратов снижает общую эффективность процесса.

Показано что и в фотоавтотрофных условиях *C. reinhardtii* также выделяла водород (Tsygankov, Kosourov et al. 2006). Но таких исследований очень мало, а фотоавтотрофные культуры в условиях недостатка азота вообще не исследовались.

Учитывая вышесказанное, проведенные нами эксперименты были направлены на изучение выделения водорода у фотоавтотрофных культур микроводорослей при недостатке серы или азота. Целью работы является определение влияния дефицита этих элементов на скорость выделения водорода, а также на механизмы, лежащие в основе данного процесса.

3.3.1. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке серы в атмосфере воздуха + CO_2

При культивировании *C. reinhardtii* в атмосфере воздух + 2% CO_2, когда культура была инокулирована в среду без S, оптическая плотность (D630) росла до 20-го ч (рис. 9А). Она оставалась неизменной с 20-го по 30-й ч, а затем начала снижаться, вследствие недостатка серы. Содержание Хл (a + b) увеличивалось до 20 ч, а затем начало снижаться. Соотношение Хл a/Хл b оставалось неизменным в течение всего эксперимента. Содержание крахмала в клетках (рис. 9А) увеличивалось до 28 ч, а затем снижалось. pO_2 увеличивалось, а после 5 ч культивирования снизилось (рис. 9Б). Окислительно-восстановительный потенциал оставался стабильным после 20 ч культивирования. Фактический квантовый выход Y(II) ФС2 начал снижаться после 10 ч культивирования из-за увеличения Fv и уменьшения Fm′ (рис. 9В) (Grechanik, Romanova et al. 2020).

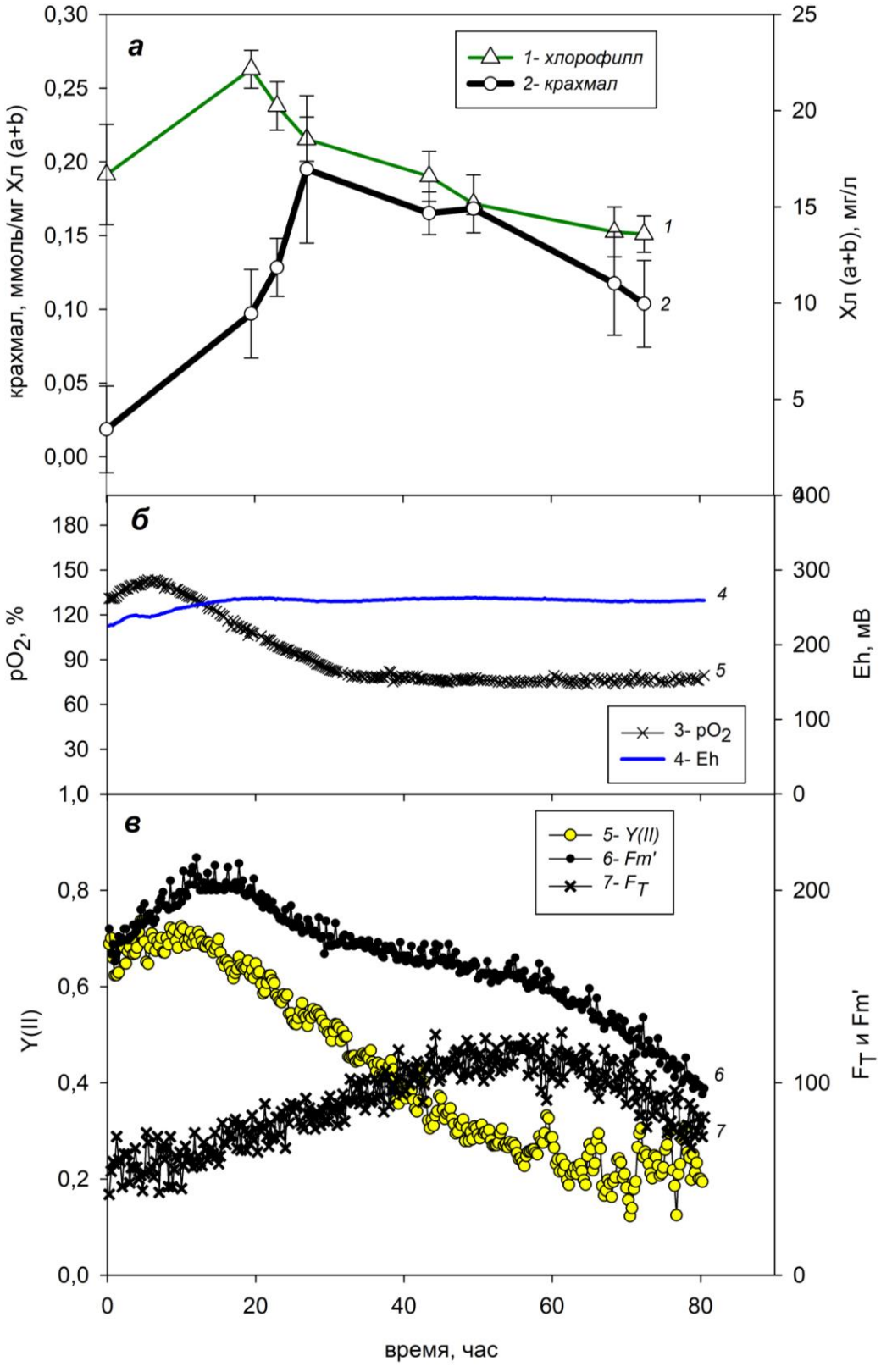


Рисунок 9. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке серы в газовой фазе воздух + 2% CO_2 при недостатке серы. Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. **а** Хл (a + b) (1); крахмал (2); **б** pO_2 (3); eH (4); **в** Y(II) (5); Fm′ (6); F_T (7) (Grechanik, Romanova et al. 2020).

Максимальная фотохимическая эффективность (Fv/Fm), фактический квантовый выход Y(II) и индекс эффективности PIabs через 1,5 ч после инокуляции в атмосфере воздуха + CO2 без S были очень близки к таковым для контрольной культуры (табл. 6). В это время культура не испытывала недостатка серы. В 25,5 ч Fv/Fm, Y(II) и Pabs снизились, тогда как Vj, Sm и N существенно не изменились. В точке 49,5 ч Fv/Fm, Y(II) и Pabs значительно снизились, Vj не изменился, тогда как Sm и N увеличились. Эти изменения указывают на то, что культуры имеют значительный межсистемный пул для реокисления Qa, но уменьшенное количество открытых РЦ. После 73,5 ч культивирования эти изменения были более выраженными. Более того, доля закрытых РЦ в момент времени J ко всему пулу открытых РЦ увеличилась. dV/dt0 увеличивалась в течение культивирования (Grechanik, Romanova et al. 2020).

3.3.2. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке серы в атмосфере аргона + CO_2

При культивировании *C. reinhardtii* в условиях продувки аргон + 2% CO_2, когда культуру инокулировали в среду без S, оптическая плотность (D630) росла до 45 ч, а затем начала снижаться (рис. 10). Динамика Хл (a + b) была аналогична оптической плотности. Соотношение Хл a/Хл b уменьшалось до 40-го ч и увеличивалось после этого. Содержание крахмала в клетках (рис. 10А) начало увеличиваться через 28 ч после инокуляции, что указывает на то, что культура пришла к недостатку серы на стадии продуцирования кислорода (Kosourov, Tsygankov et al. 2002). pO_2 оставался стабильным до 35 ч, а затем снижался (кислородопотребляющая стадия), достигая нуля (анаэробная и водород-продуцирующая стадии) на 60-й ч (рис. 10Б). Окислительно-восстановительный потенциал был стабилен, когда pO_2 был стабилен, затем снижался одновременно с pO_2 и резко снижался, когда pO_2 достигал нуля с последующим увеличением на поздней стадии производства водорода. Водород был обнаружен в газовой фазе, когда pO_2 достигал 5% от насыщения (рис. 10Б). Содержание H_2 в газовой фазе увеличивалось до 85-го ч, а затем снижалось. H_2 в газовой фазе обнаруживался

даже после 130 ч культивирования. Фактический квантовый выход ФС2 Y(II) начал уменьшаться после 40 ч культивирования в основном из-за снижения Fm′ (рис. 10B). После 110 ч культивирования этот параметр был ненадежным из-за очень низких сигналов Fv′ и Fm′ (Grechanik, Romanova et al. 2020).

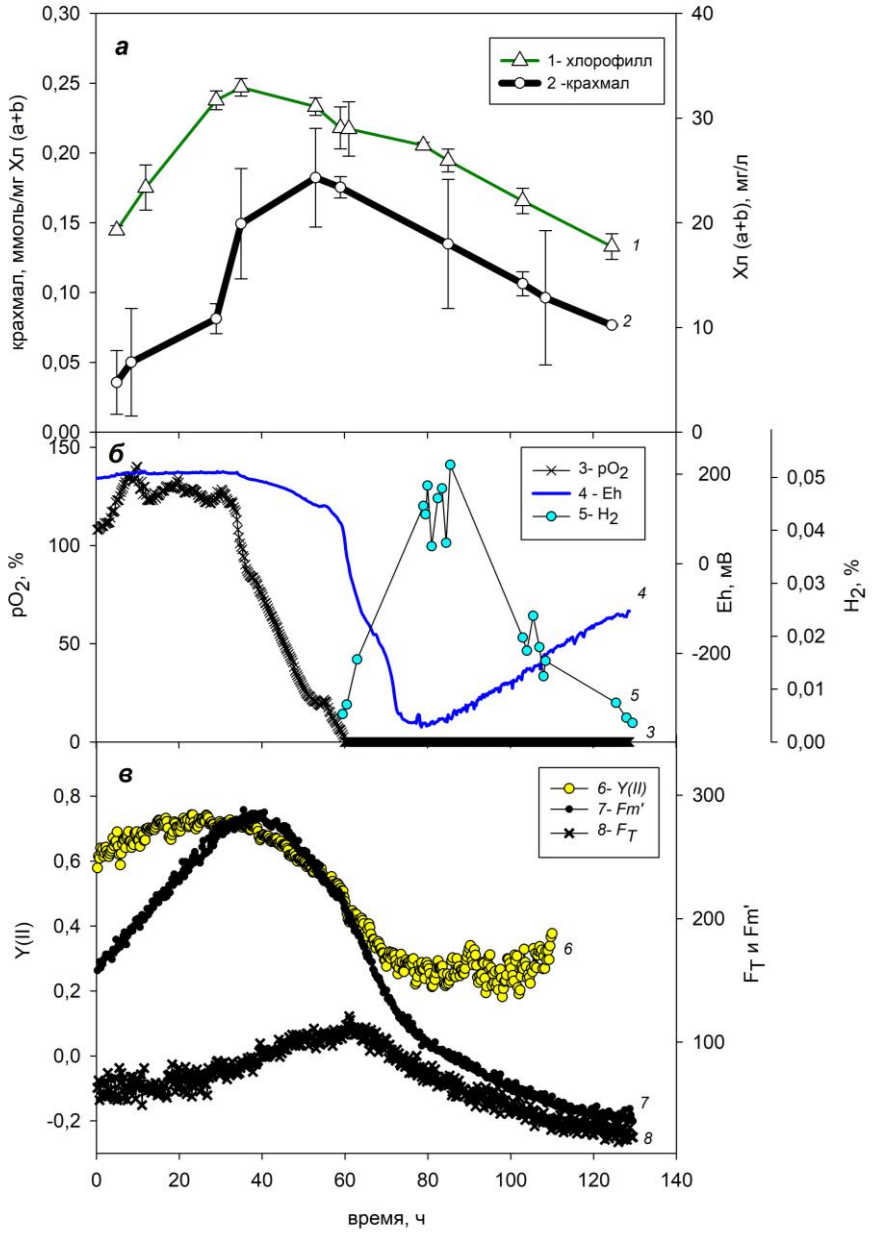


Рисунок 10. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке серы в газовой фазе аргон + 2% CO_2. Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. **а** Хл (a + b) (1); крахмал (2); **б** Парциальное давление кислорода, выраженное в процентах от насыщения среды воздухом при 28 °C (3); eH против Ag/AgCl электрода (4);

содержание H_2 в газовой фазе (5) **в** Y(II) (6); Fm′ (7); F_T (8) (Grechanik, Romanova et al. 2020).

Все параметры, полученные в результате OJIP-теста через 11 ч после инокуляции в атмосфере Ar + CO2 без S, были близки к таковым для контрольной культуры при аналогичной концентрации Хл(a + b), т.е. через 24,5 ч после инокуляции (табл. 6). Таким образом, в это время культура не испытывала недостатка серы. В точке 35 ч Y(II), Fv/Fm, Vj, Sm, N не изменились, тогда как Pabs значительно снизился. Скорее всего, учитывая изменения концентрации крахмала, это время S-лимитирования. После 59 ч роста, в момент появления H_2 в газовой фазе Y(II), Fv/Fm, Fm/F0, Pabs уменьшились, тогда как Vj, Sm и N существенно не изменились. dV/dt0 через 35 ч значительно увеличилась (Grechanik, Romanova et al. 2020).

Таблица 6. Изменение параметров JIP теста при выращивании культур при недостатке серы в атмосфере воздух/аргон+CO_2.

Условия и время культивирования (ч)	Y(II)	Fv/Fm	Vj	dV/dt0	ABS/RC	PIabs	Sm	N
Air-S								
1,5	0,63	0,66	0,38	0,53	2,08	1,45	28,0	38,5
25,5	0,56	0,59	0,45	0,69	2,58	0,68	28,7	44,3
49,5	0,28	0,45	0,44	0,75	3,75	0,28	40,1	69,0
73,5	0,20	0,29	0,57	0,98	5,85	0,05	46,3	81,5
Ar-S								
11	0,69	0,73	0,38	0,49	1,83	2,5	35,0	45,9
35	0,68	0,66	0,42	0,61	2,57	1,2	32,8	45,0
59	0,42	0,56	0,45	0,66	2,87	0,5	32,5	52,5
83	0,26	0,32	0,52	0,83	4,95	0,1	33,7	53,5
107	0,25	0,11	0,92	1,64	16,38	0	0,7	1,3

Комбинация двух подходов, культивирование в атмосфере аргона и при недостатке серы, позволили нам сравнить культуры на одинаковых стадиях адаптации к различным стрессам. Мы могли наблюдать культуры, насыщенные серой (S-repleted), ограниченные по сере (S-limited), а также с недостатком серой (S-deprived) в одном процессе культивирования, и сравнивать их с аэробными культурами, культурами с пониженным содержанием кислорода и культурами в микроаэробных/анаэробных условиях, а также с культурами при постепенном развитии двойного стресса – недостатка серы и недостатка кислорода.

Фотогетеротрофные культуры *C. reinhardtii* при недостатке серы в анаэробных условиях были подробно изучены (Melis, Zhang et al. 2000, Kosourov, Tsygankov et al. 2002). Позже было обнаружено резкое снижение Fv'/Fm' для фотогетеротрофных культур в момент установления анаэробиоза (Antal, Krendeleva et al. 2003). Наши эксперименты с фотоавтотрофными культурами при недостатке серы, предполагают, что в целом эти культуры имеют много сходств с фотогетеротрофными (различные стадии процесса серного голодания; кинетика крахмала; выделение водорода). Однако мы не обнаружили резкого снижения Fv'/Fm' в момент установления анаэробиоза. Оно снижалось, но постепенно. Более того, этот параметр снижался аналогичным образом при недостатке серы на воздухе или аргоне, или на удвоенной HSM среде, но в аргоне (в аргоне и при недостатке серы этот параметр снижался до более низкого значения). Можно предположить, что это различие является результатом снижения скорости дыхания фотоавтотрофных культур из-за отсутствия органических веществ в среде. В фотогетеротрофных культурах в момент установления анаэробиоза скорость дыхания определенно выше скорости фотоокисления кислорода. Следовательно, клетки становятся более восстановленными, чем в фотоавтотрофных культурах, что приводит к очень быстрому переокислению пула ПХ и "выключению" фактического квантового выхода. В фотоавтотрофных культурах в момент установления анаэробиоза скорость фотоокисления кислорода может быть выше скорости дыхания, но в наших экспериментах это компенсируется потоком аргона.

В результате, когда содержание кислорода в среде близко к нулю, кислород внутри клеток все еще вырабатывается со значительной скоростью. Это позволяет клеткам поддерживать пул ПХ при более низком восстановлении, и поэтому эффект "выключения" не наблюдается. Однако необходимо дальнейшее исследование, подтверждающее это предположение.

Другой общей чертой фотоавтотрофных культур +S (Ar) или -S (воздух или Ar) было увеличение начального подъема флуоресценции (dV/dt). Аналогичные наблюдения ранее описывались для фотогетеротрофных культур при дефиците серы (Antal, Krendeleva et al. 2007) и для культур *C. reinhardtii* в восстановительных условиях (Antal, Kolacheva et al. 2013). Авторы предположили, что увеличение dV/dt может быть связано с накоплением стабильных восстановленных форм Qa (Antal, Kolacheva et al. 2013). Этот параметр зависит от скорости возбуждения ФС2, которая пропорциональна интенсивности света и поглощающей способности ФС2. Последняя характеристика сильно варьируется в зависимости от условий освещения. Помимо точек J, I и P, на кинетических кривых после воздействия, вызывающего дезинтеграцию кислород-выделяющего комплекса в ФС2 (Schreiber and Neubauer 1987), появляется быстрая дополнительная ступень K с максимумом примерно при 300 мкс. Позднее Nagy с соавторами (Nagy, Vidal-Meireles et al. 2016, Nagy, Podmaniczki et al. 2018) описали механизм отделения кислород-выделяющего комплекса от ФС2 для фотогетеротрофных культур. При недостатке серы в фотогетеротрофных клетках накапливался аскорбат, который действовал как донор электронов для ФС2 вместо воды. Это вызывало дезинтеграцию кислород-выделяющего комплекса с последующей деградацией ФС2. Возможно, фотоавтотрофные клетки снижали активность ФС2, используя аналогичный механизм. Однако для проверки этой гипотезы необходимы дополнительные эксперименты.

Таким образом, используя ФБР, соединенный с PAM-флуориметром, мы сравнили рост и параметры фотосинтеза фотоавтотрофных культур при стрессе отанаэробиоза, стрессе от недостатка серы и при одновременном стрессе от анаэробиоза и недостатка серы. Фотоавтотрофные культуры при недостатке серы

проявляли схожее поведение с фотогетеротрофными, с одним существенным отличием: при установлении анаэробиоза фактический квантовый выход не показывал резкого эффекта "выключения". Кроме того, нами впервые была изучена OJIP кинетика, позволившая рассмотреть более тонкие детали адаптации культур к данным условиям.

3.4. Фотоавтотрофный рост *C. reinhardtii* при недостатке азота

3.4.1. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке азота в атмосфере воздуха + CO_2

Для экспериментов с недостатком азота культуры, растущие в ФБР с использованием HSM*2 среды, разбавляли средой с содержанием азота 0,125 г $л^{-1}$ NH_4Cl, как описано в разделе "Материалы и методы". При культивировании в атмосфере воздух + CO_2 содержание Хл (a+b) увеличивалось до 45 ч с последующим снижением (рис. 11A). Можно сделать вывод, что до 45 ч культура не была ограничена азотом. Содержание крахмала в клетках было стабильным до 18 ч с последующим увеличением до 184 ч. Концентрация растворенного кислорода (pO_2) увеличивалась в начале культивирования и снижалась после 25 ч культивирования. Окислительно-восстановительный потенциал среды постепенно увеличивался с 280 до 350 мВ в конце культивирования (рис. 11A) (Grechanik, Naidov et al. 2021).

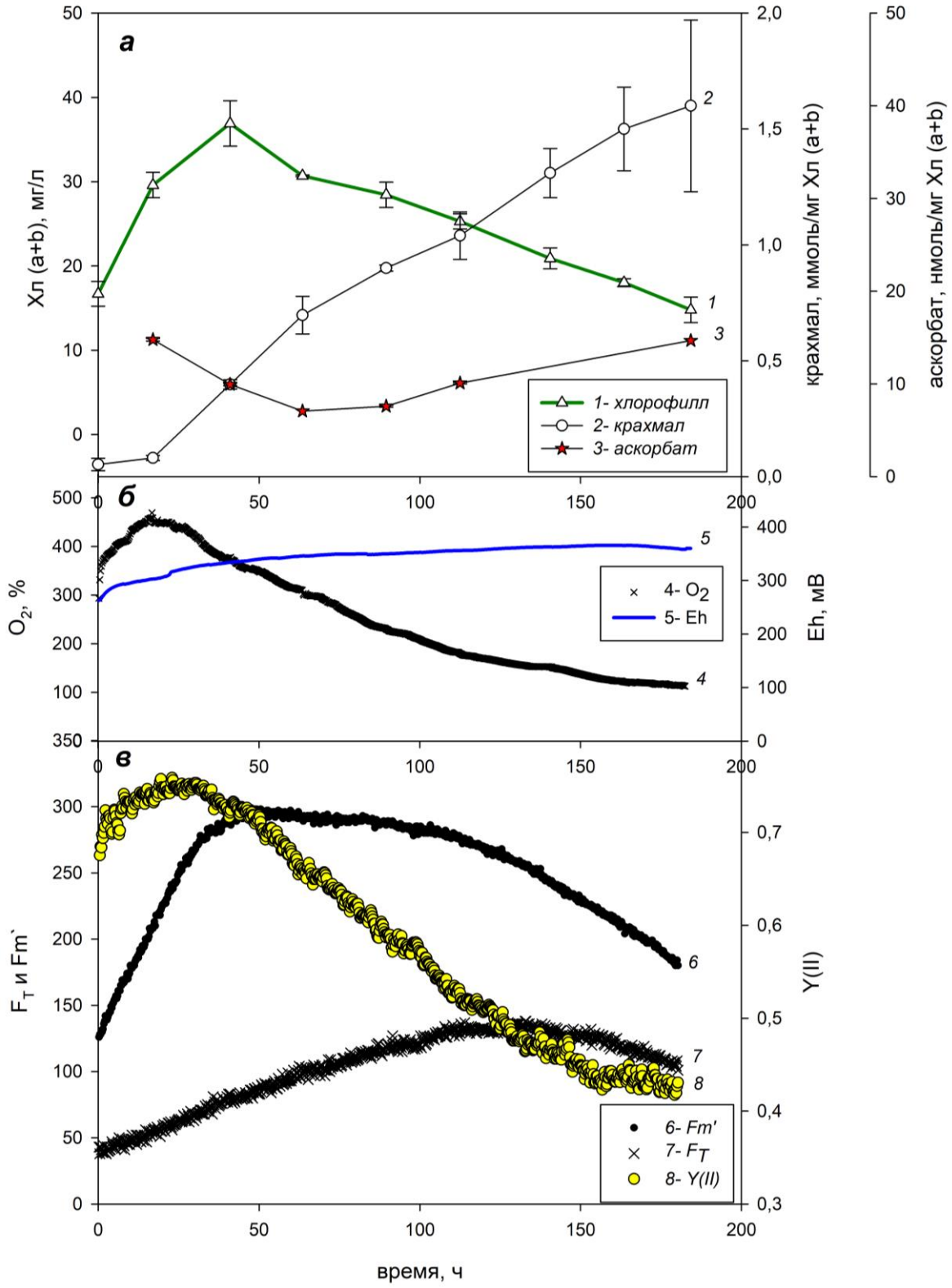


Рисунок 11. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке азота в газовой фазе воздух+ 2% CO_2. Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. **а** Хл (a + b) (1); крахмал (2); аскорбат (3) **б** pO_2 (4); eH (5); **в** Fm′ (6); F_T (7); Y(II) (8) (Grechanik, Naidov et al. 2021).

Фактический квантовый выход Y(II) (рис. 11В), максимальная фотохимическая эффективность (Fv/Fm), Vj, dV/dt, ABS/RC, Sm, PIabs и N были близки к этим параметрам контрольной культуры до 41 ч культивирования (табл. 7), что свидетельствует об отсутствии азотного лимитирования в культуре. Стабильность Y(II) сопровождалась одновременным увеличением Fm' и F_T. После 41 ч Y и Fv/Fm постепенно снижались. Этот факт, наряду со стабилизацией Fm', снижением содержания Хл (a+b) и увеличением содержания крахмала, указывает на то, что культура израсходовала весь азот среды и стала испытывать азотное голодание. Через 41 ч Vj и dV/dt оставались стабильными до 112,5 ч с незначительным увеличением после этого. ABS/RC увеличился с 41 до 112,5 ч и стабилизировался после этого. Sm снизился с 41 до 63,5 ч с последующей стабилизацией после этого. N увеличился с 41 до 112,5 ч и стабилизировался после этого. PIabs снижался в течение всего эксперимента. Соотношение между количеством молекул Хл a в антенных комплексах и в активных реакционных центрах увеличивалось с большей скоростью, чем в контрольной культуре (Grechanik, Naidov et al. 2021).

3.4.2. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке азота в атмосфере аргона + CO_2

Содержание Хл (a+b) увеличивалось до 23 ч (рис. 12А). Динамика содержания крахмала (рис. 12А), pO_2 , eH (рис. 12Б), Y(II) (рис. 12В), а также параметры JIP теста (табл. 7) свидетельствуют о том, что до 23 ч культура не испытывала недостатка азота. С 23 до 65 ч содержание Хл (a+b) и eH оставались стабильными, тогда как содержание крахмала увеличилось.

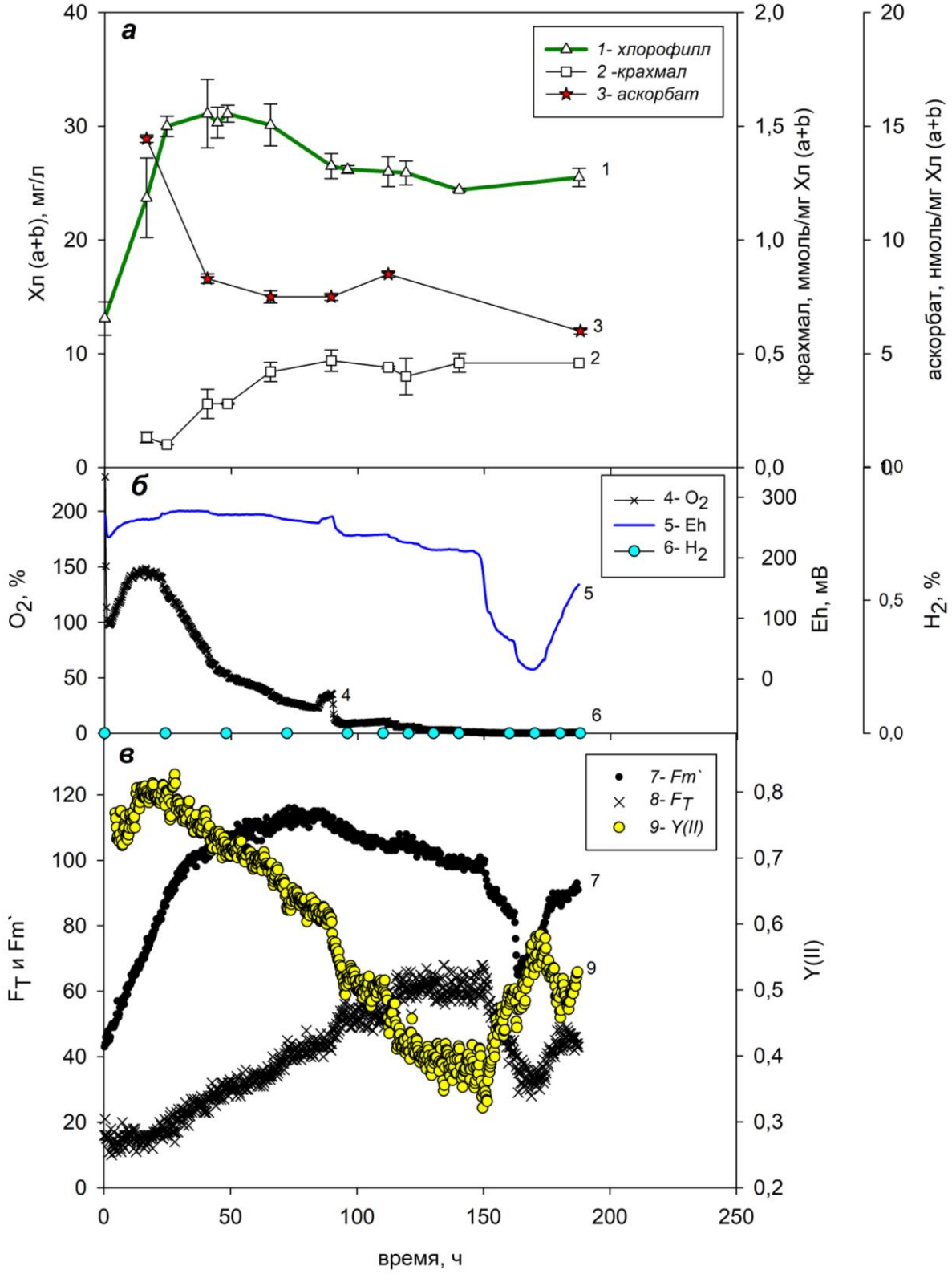


Рисунок 12. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке азота в газовой фазе аргон+ 2% CO_2. Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. **а** Хл (a + b) (1); крахмал (2); аскорбат (3) **б** pO_2 (4); eH (5); **в** Fm′ (6); F_T (7); Y(II) (8) (Grechanik, Naidov et al. 2021).

Можно предположить, что в это время культура испытывала недостаток азота, и фотосинтез был перенаправлен на накопление крахмала. При этом pO_2 снижалось, фактический квантовый выход (Y(II)) и Fv/Fm постепенно уменьшались, что указывает на снижение активности ФС2. Это сопровождается увеличением ABS/RC (поток энергии поглощения на активный реакционный центр (РЦ)), N (число оборотов) и снижением PIabs (индекс производительности) при стабильности других параметров JIP (табл. 7). Отметим, что все эти изменения были более выражены, чем в аналогичных культурах в атмосфере воздух+CO_2. Через 65 ч содержание Хл (a+b) постепенно снижалось, крахмал оставался неизменным, в то время как pO_2 продолжал снижаться с 15% до нуля в конце эксперимента, eH также постепенно снижался в этот период времени. Это сопровождалось увеличением ABS/RC, N и уменьшением PIabs. dV/dt 0 немного увеличился до 114 ч и оставался стабильным после этого. Другие параметры JIP оставались стабильными до конца эксперимента. Важно отметить, что содержание аскорбата снизилось с 6 до 1 нмоль мг $^{-1}$ Хл (a+b) на 41 ч и оставалось неизменным до конца эксперимента (рис. 12A). Мы не смогли обнаружить водород в газе из ФБР в течение всего эксперимента. Обобщая данные по росту *C. reinhardtii* в условиях Ar+CO_2 с недостатком азота, можно сделать вывод, что фактический квантовый выход и максимальная квантовая эффективность ФС2 постепенно уменьшались, а начальные этапы индукции флуоресценции не имели существенных изменений. Все изменения параметров JIP теста были более выраженными, чем в культурах при недостатке азота, в атмосфере воздуха+CO_2 атмосфере (Grechanik, Naidov et al. 2021).

3.4.3. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке азота в атмосфере аргона + CO_2 и при различной интенсивности света

Как показано выше, фотоавтотрофные культуры *C. reinhardtii* не выделяли водород в условиях недостатка азота в наших опытах (рис. 13). Для сравнения, фотоавтотрофные культуры той же микроводоросли, голодающие по сере, производят очень небольшое количество водорода при постоянной интенсивности

света 110 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$, если инокулят предварительно культивировали при 120 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ (Tsygankov, Kosourov et al. 2006) . Однако, если на ранней стадии потребления кислорода интенсивность света переключить с 110 на 20 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$, выделение водорода значительно увеличивалось. Поэтому мы применили этот двухстадийный световой протокол для культур с недостатком азота. Для этого культуру *C. reinhardtii* инокулировали, как описано выше, на среду 2*HSM с 0,125 г $л^{-1}$ NH_4Cl. Через 42 ч, когда pO_2 в культуре начинало снижаться (стадия раннего потребления кислорода), интенсивность света снижали с 169 до 30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. Через 60 мин pO_2 уменьшилось до нуля. Когда pO_2 достигало нуля, eH снижался с 300 мВ и через 30 мин достигал -60 мВ (рис. 13Б). Через 2 ч после изменения интенсивности света начинал снижаться Хл(а+б), а также содержание крахмала. Y(II) уменьшался с 0,74 до 0,45 (рис. 13В, табл. 7), Fv/Fm уменьшался с 0,72 до 0,61. Важно отметить, что в течение этих 2 ч значительно снизилось содержание аскорбата. Эти изменения сопровождались значительным увеличением Sm, N и снижением PIabs. ABS/RC увеличился умеренно, в то время как другие параметры JIP-теста были стабильны (табл. 7). H_2 не был обнаружен в 43,0 и 43,25 ч, но появился в 43,5 ч (рис. 13Б). Это означает, что анаэробная стадия адаптации к недостатку азота очень короткая (Grechanik, Naidov et al. 2021).

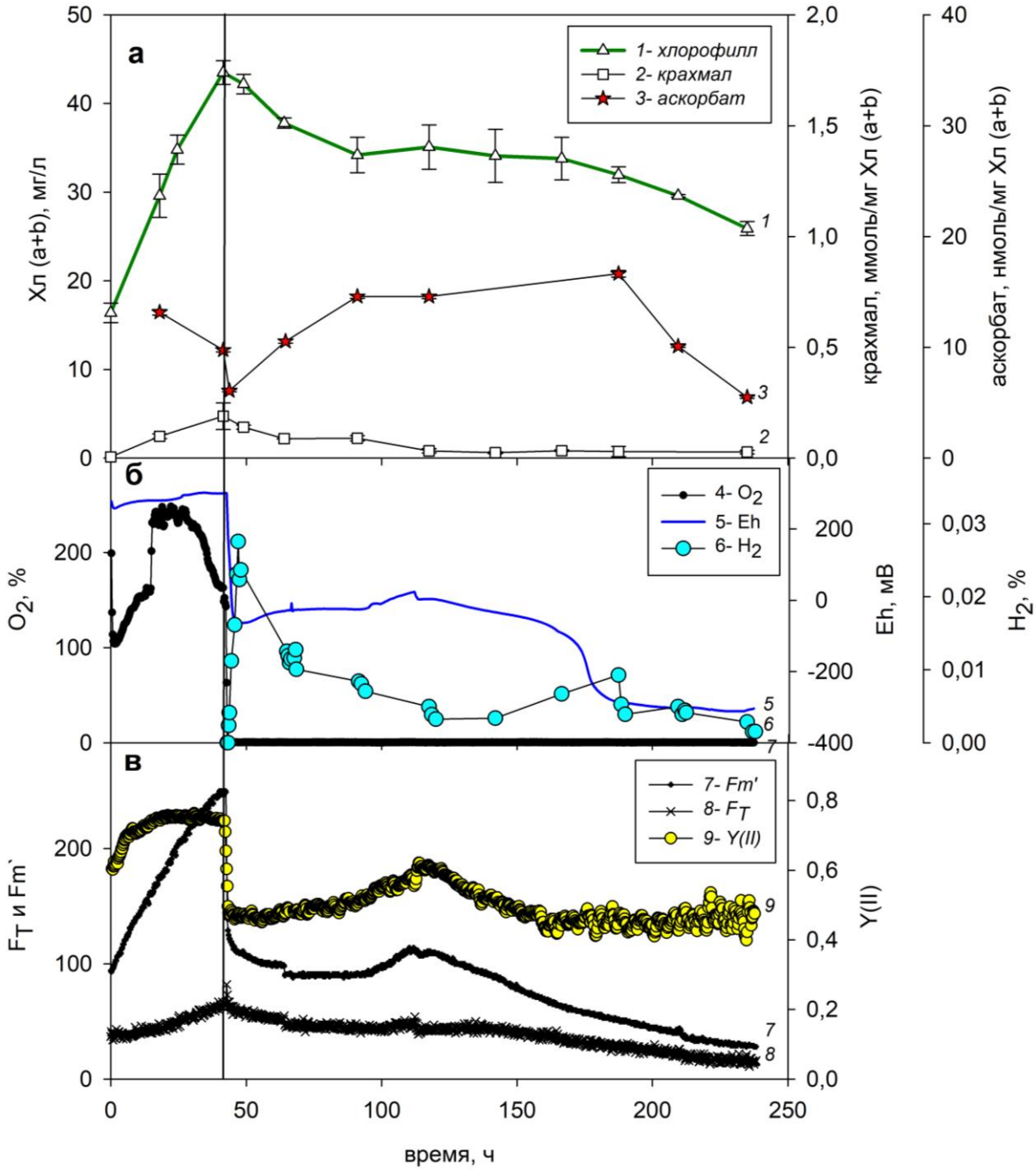


Рисунок 13. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке азота в газовой фазе аргон + 2% CO_2 с применением двухстадийного светового протокола. Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ до 41,75 ч, далее 30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ (вертикальный линия – изменение интенсивности света). **а** Хл (a + b) (1); крахмал (2), аскорбат (3); **б** pO_2 (4); eH (5); содержание H_2 в газовой фазе (6) **в** Fm′ (7); F_T (8); Y(II) (9) (Grechanik, Naidov et al. 2021).

При последующей инкубации культуры при пониженной интенсивности света содержание Хл (a+b) и крахмала постепенно снижалось (рис. 13А). Содержание аскорбата увеличивалось до 187,5 ч с последующим снижением. Содержание H_2 в газовой фазе достигло максимума в 47,5 ч, причем скорость выделения H_2 постепенно снижалась до конца эксперимента (рис. 13Б). Общее количество выделенного H_2 за весь эксперимент составило 86 мл на 1 л культуры. Y(II) и Fv/Fm после значительного снижения вследствие переключения светового облучения и установления анаэробиоза постепенно увеличивались с 43 ч до 115 ч (117,5 для случая Fv/Fm). После этого оба параметра постепенно снижались вплоть до конца эксперимента. Y(II) всегда был ниже, чем Fv/Fm. Vj, dV/dt_0, и ABS/RC постепенно уменьшались с 43,5 до 117,5 ч с последующим умеренным увеличением до конца эксперимента. Sm в течение этого периода был стабильным, N и PIabs снижался до конца эксперимента, исключая конкретную точку 117,5 ч (Grechanik, Naidov et al. 2021).

Таблица 7. Изменение параметров JIP теста при выращивании культур при недостатке азота в атмосфере воздух/аргон+CO_2.

Условия и время культивирования (ч)	Y	Fv/Fm	Vj	dV/dt_0	ABS/RC	Sm	N	PIabs
Air-N								
17	0,74	0,75	0,39	0,55	1,87	26,1	36,5	2,55
41	0,73	0,74	0,39	0,66	2,26	25,2	42,5	2,00
63,5	0,66	0,72	0,43	0,49	2,51	24,0	43,5	1,39
89	0,59	0,70	0,40	0,78	2,75	29,8	57,4	1,25
112,5	0,53	0,65	0,39	0,68	2,98	32,4	63,4	0,96
140,5	0,46	0,60	0,45	0,86	3,35	30,7	61,9	0,51

162	0,43	0,55	0,46	0,88	3,43	30,6	58,3	0,43
184,25	0,42	0,55	0,46	0,88	3,46	32,5	61,7	0,40
Ar-N								
18	0,79	0,74	0,39	0,58	1,95	26,2	38,3	2,35
42	0,73	0,70	0,42	0,71	2,42	27,4	46,5	1,36
65	0,68	0,69	0,41	0,87	3,01	26,3	54,8	1,06
89,5	0,61	0,60	0,44	0,92	3,50	38,9	82,9	0,55
114	0,47	0,59	0,38	0,95	3,68	n.r.	n.r.	0,50
140	0,40	0,52	0,43	0,96	4,28	n.r.	n.r.	0,34
187	0,52	0,49	0,44	0,91	4,14	n.r.	n.r.	0,29
Ar-N с применением двухстадийного светового протокола. Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ до 41,75 ч, далее 30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$								
18	0,75	0,761	0,38	0,53	1,83	27,7	38,7	2,80
41,5	0,74	0,72	0,42	0,68	2,26	26,5	43,1	1,59
43,5	0,45	0,61	0,44	0,67	2,44	33,1	49,7	0,86
64,5	0,48	0,60	0,47	0,71	2,52	34,1	51,8	0,69
91,0	0,51	0,62	0,43	0,68	2,56	33,0	52,2	0,84
117,5	0,61	0,67	0,41	0,58	2,13	30,7	43,9	1,40
187,5	0,46	0,48	0,42	0,60	3,02	34,6	49,9	0,42
209,5	n.r.	0,39	0,48	0,65	3,49	30,3	41,1	0,20
235	n.r.	0,24	0,60	0,71	5,10	22,3	27,3	

Из литературы известно, что фотогетеротрофные культуры *C. reinhardtii* при дефиците азота испытывают серьезный стресс, проявляющийся в изменениях метаболизма, индукции гаметогенеза (Miller, Wu et al. 2010) и программируемой клеточной гибели (Sathe, Orellana et al. 2019), что сопровождается накоплением липидов (Miller, Wu et al. 2010, Sathe, Orellana et al. 2019) и крахмала (Philipps, Happe et al. 2012, Shastik, Li et al. 2019, Shastik, Li et al. 2020). Устойчивое выделение водорода в этих культурах наблюдается при применении двухэтапного протокола освещения, который включает высокую интенсивность для производства кислорода и пониженную (20-25 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$) для выделения водорода. В ходе этого процесса снижается квантовый выход (Y) и отношение Fv'/Fm', что связано с перевосстановлением ПХ (Kalaji, Jajoo et al. 2016), а не с разрушением фотосинтетического аппарата. Эти изменения сопровождаются увеличением ABS/RC, Sm, N, PIabs, отражая снижение уровня восстановления ПХ, и клетки при этом ассимилируют накопленный крахмал.

Фотоавтотрофные культуры *C. reinhardtii* также реагируют на недостаток азота. При выращивании в атмосфере Ar + CO_2 после 24,5 ч культивирования начинается стадия потребления кислорода, а переход к анаэробиозу через 153 ч приводит к снижению eH и Y(II) (до 0.37). В таких условиях выделение водорода не наблюдается, вероятно, из-за следовых количеств кислорода, инактивирующих гидрогеназу, хотя снижение Y и Fv/Fm менее выражено, чем в фотогетеротрофных культурах (Philipps, Happe et al. 2012, Shastik, Li et al. 2020). Однако, при использовании того же двухэтапного протокола освещения, что и для фотогетеротрофных культур, фотоавтотрофные культуры демонстрируют устойчивое выделение водорода. Наблюдается перевосстановление ПХ вызывающее снижение Y и Fv/Fm, но при этом накапливается и ассимилируется умеренное количество крахмала, а активность ФС2 остается высокой. Таким образом, ключевым фактором для успешного выделения водорода в фотоавтотрофных условиях является применение специфического протокола освещения, который позволяет снизить активность ФС2 ниже уровня дыхания, создавая благоприятные условия для синтеза гидрогеназы.

3.5. Фотоавтотрофный рост *C. reinhardtii* при недостке углерода

Настоящее исследование было инициировано с целью подтвердить и детализировать условия для выделения водорода фотоавтотрофными культурами *C. reinhardtii* в условиях недостатка углерода.

Параллельно с решением проблемы токсичности кислорода для гидрогеназы, мы также изучали альтернативные пути транспорта электронов, которые могут конкурировать с выделением водорода. Наиболее активным среди них является поток электронов, направленный на восстановление НАДФ с последующей фиксацией углекислоты в цикле Кальвина–Бенсона–Бассама.

Венгерские авторы Nagy et al. (Nagy, Podmaniczki et al. 2018) предложили для получения H_2 использовать подход, основанный на инактивации цикла Кальвина–Бенсона–Бассама путем ограничения его субстратом (CO_2). Они культивировали фотоавтотрофные культуры *C. reinhardtii*, затем удаляли из культуры углекислоту и инкубировали ее в темноте в анаэробных условиях. При включении света эти культуры демонстрировали выделение водорода с высокой скоростью. По мнению этих исследователей, такое ограничение потока электронов, используемых для фиксации углекислоты, не приводит к снижению активности ФС2, и выделение водорода происходит за счет функционирования ФС2, получающей электроны от воды.

Однако, для преодоления ингибирующего действия кислорода на активность гидрогеназы авторы использовали поглотитель кислорода на основе железного порошка.

В связи с этим, основной целью нашей работы стало изучение возможности выделения водорода фотоавтотрофными культурами *C. reinhardtii* при лимитировании углекислотой без использования поглотителя O_2. Одновременно мы проверяли, насколько верны утверждения о сохранении активности ФС2 в этих условиях (Nagy, Podmaniczki et al. 2018), поскольку это единственное свидетельство о выделении водорода без снижения активности ФС2 (Grechanik, Bol’shakov et al. 2022).

3.5.1. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке углерода в атмосфере воздуха + CO_2

С начала выращивания в данном режиме *C. reinhardtii* снабжали воздухом с углекислотой как указано в методах. На 81 ч культивирования из подаваемой газовой смеси удаляли углекислоту (Рис. 14). Уже через 15 мин после этого pO_2 в среде начинало снижаться. Одновременно с этим начинало снижаться Y(II) за счет некоторого возрастания F_T и значительного снижения Fm'. Через 7 ч после отключения CO_2, содержание кислорода стабилизировалось. Этот момент можно определить, как переход культур в стационарную фазу, вызванную недостатком углерода. Снижение Fm' и возрастание F_T' свидетельствует о перевосстановленности пула ПХ уже через 7 ч после удаления углекислоты, т.е. с наступлением стационарной фазы. После удаления углекислоты содержание Хл (a+b) снижалось все время культивирования (Grechanik, Bol'shakov et al. 2022).

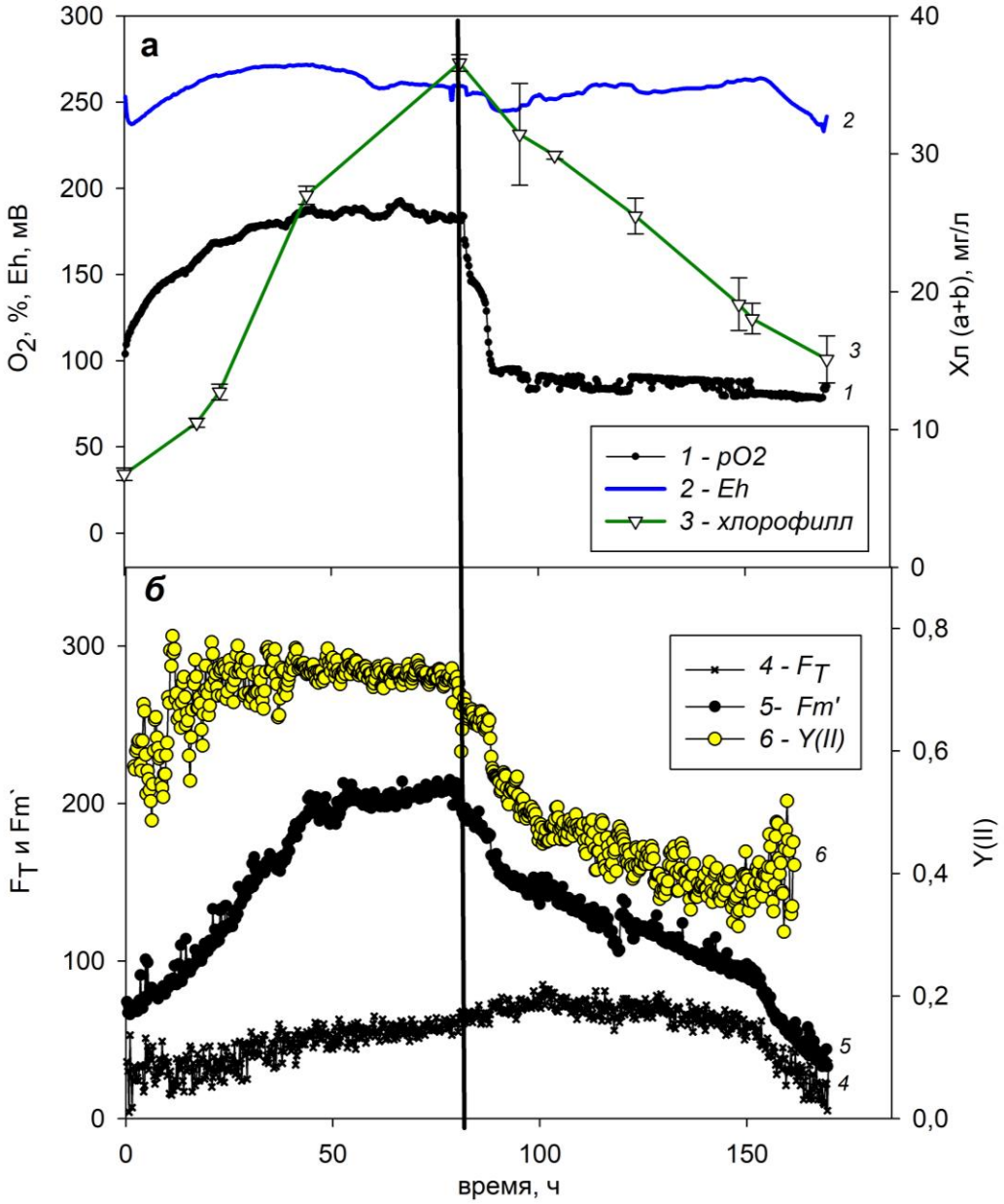


Рисунок 14. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке углерода в газовой фазе воздух+ 2% CO_2. Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. На 81 ч из подаваемой газовой смеси удалили углекислоту (отмечено вертикальной линией). **а** pO_2 (1); eH (2); Хл (a + b) (3); **б** F_T (4); Fm′ (5); Y(II) (6) (Grechanik, Bol'shakov et al. 2022).

Таким образом, даже в аэробных условиях удаление углекислоты из подаваемой газовой фазы приводило к быстрому снижению Y(II) за счет перевосстановления пула ПХ. При этом это снижение было более выражено, чем при переходе контрольных культур в стационарную фазу (Рис. 7). Учитывая

значительное падение содержания Хл (a+b), следует отметить и общую деградацию фотосинтетического аппарата (Grechanik, Bol'shakov et al. 2022).

3.5.2. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке углерода в атмосфере аргона + CO_2

С начала выращивания в данном режиме *C. reinhardtii* снабжали аргоном с углекислотой, как указано в методах. На 42,5 ч углекислоту удаляли из газовой фазы (Рис. 15). После этого момента содержание Хл (a+b) в ФБР снижалось, как и в условиях подачи воздуха (Рис. 14). Через 3 ч парциальное давление кислорода, растворенного в культуральной жидкости, начинало снижаться одновременно с началом снижения eH (Рис. 15А). Одновременно снижалось Fm' (Рис. 15Б), что свидетельствует о перевосстановленности пула ПХ. Параллельно снижалось и Y(II). Через 7 чпосле удаления углекислоты из газовой фазы pO_2 стабилизировалось, и в газовой фазе обнаруживали водород (Рис. 15В). Важно отметить, что после исчерпания углекислоты pO_2 не падало до нуля, а было около 2,5%, поднимаясь в отдельные моменты до 5,5%, хотя культуры продували аргоном со скоростью 100 мл/мин (см. Методы). Количество выделившегося водорода составило 4,9 мл/л культуры за 24 ч (Grechanik, Bol'shakov et al. 2022).

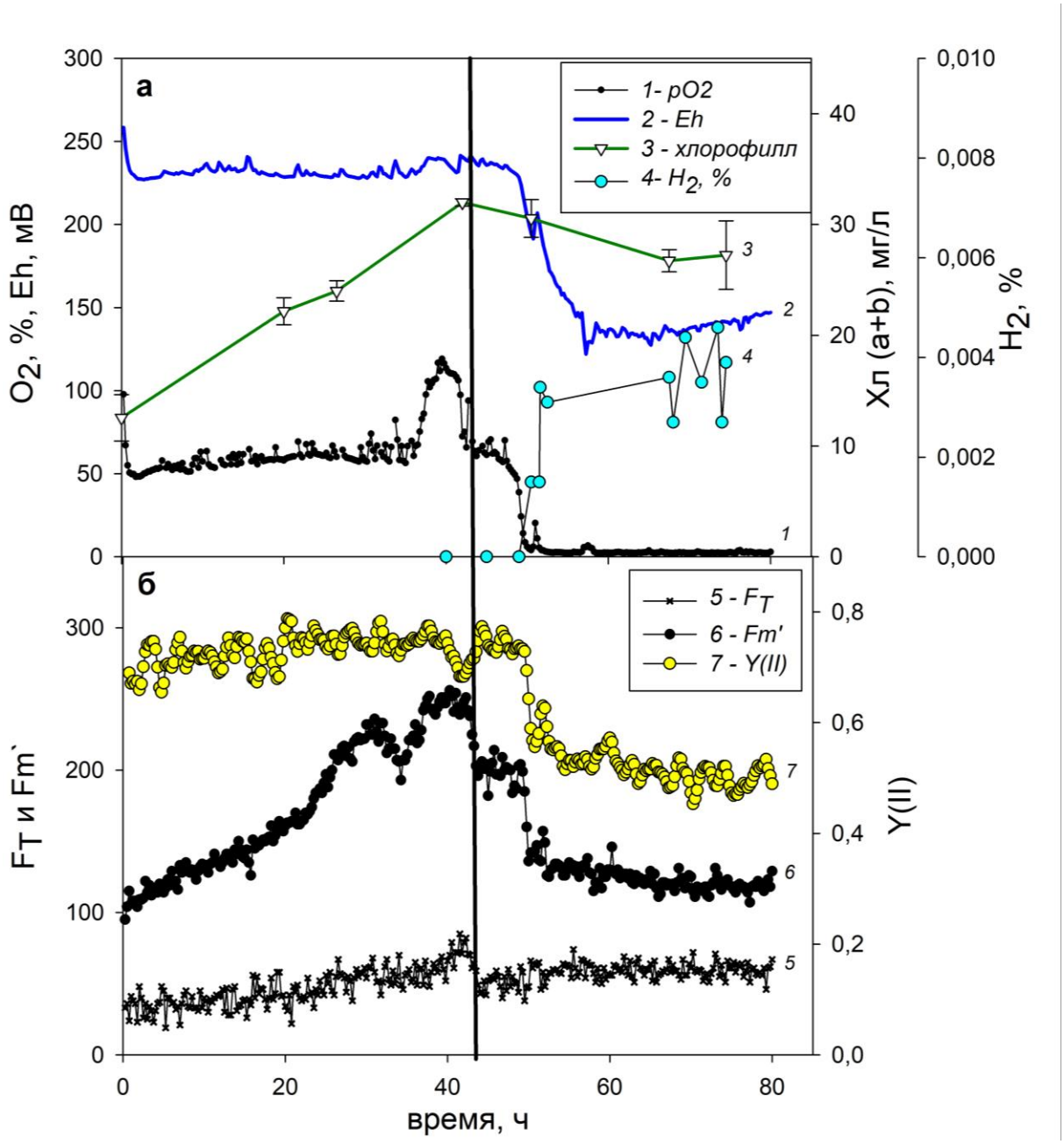


Рисунок 15. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке углерода в газовой фазе аргон+ 2% CO_2. Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. На 42,5 ч из подаваемой газовой смеси удалили углекислоту (отмечено вертикальной линией). **а** pO_2 (1); eH (2); Хл (a + b) (3); содержание H_2 в газовой фазе (4) **б** F_T (5); Fm′ (6); Y(II) (7) (Grechanik, Bol'shakov et al. 2022).

Если предположить, что в наших экспериментах, как и в статье Nagy с соавт. (Nagy, Podmaniczki et al. 2018), выделение водорода происходило за счет прямого биофотолиза воды, то скорость выделения кислорода должна быть вдвое меньше, чем скорость выделения водорода, т.е. 0,05-0,12 мл/ч (Рис. 15В). Если также

предположить, что концентрация кислорода в культуральной жидкости находилась в равновесии с концентрацией в газовой фазе, то, учитывая скорость потока аргона (100 мл/мин), парциальное давление кислорода в культуральной жидкости не должно превышать (0,12 мл/ч)/(100 мл/мин) = (0,12 мл/ч)/(6000 мл/ч) = 0,002%, что на три порядка ниже наблюдаемого нами в экспериментах. Очевидно, что в условиях образования кислорода в жидкости и при потоке газа 100 мл/мин в ФБР с объемом культуры 1 л даже при интенсивном перемешивании нельзя ожидать равновесной концентрации кислорода в жидкой и газовой фазах, т.е. приведенная расчетная оценка концентрации кислорода в жидкости является заниженной. Тем не менее нельзя исключить, что фотоавтотрофные культуры микроводорослей в микроаэробных условиях способны, как и фотоавтотрофные культуры в анаэробных условиях, к деградации крахмала с образованием ацетата (Kosourov, Patrusheva et al. 2007) и, соответственно, углекислоты, которая ре-ассимилируется при фотосинтезе с образованием кислорода. С другой стороны, для фотоавтотрофных культур ранее показано, что у них, как и у фотогетеротрофных культур, наряду с фотосинтетической активностью происходит брожение с образованием ацетата, а также и дыхание, что существенно усложняет сравнительный анализ скоростей выделения водорода и кислорода. Подробный анализ стехиометрии требует дополнительных экспериментов (Grechanik, Bol’shakov et al. 2022).

Известно, что концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) гидрогеназной активности кислородом составляет 0,3-0,4% (Ghirardi, Togasaki et al. 1997). Это значение примерно в 6-8 раз ниже содержания кислорода в культуральной жидкости в наших экспериментах. Таким образом, скорость выделения водорода определялась в нашем случае ингибированием гидрогеназной активности остаточным кислородом в среде.

В наших экспериментах количество выделившегося водорода было значительно ниже, чем в аналогичных экспериментах Nagy с соавт (Nagy, Podmaniczki et al. 2018). Основным отличием этих экспериментов было наличие темнового инкубационного периода в анаэробных условиях. Известно также, что

фотоавтотрофные культуры микроводорослей при серном голодании выделяли водород с наибольшей скоростью при пониженной интенсивности света в анаэробной и последующей фазах (Tsygankov, Kosourov et al. 2006). Поэтому следующие эксперименты были проведены для выявления важности темновой анаэробной инкубации для выделения H_2 (Grechanik, Bol'shakov et al. 2022).

3.5.3. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке углерода в атмосфере аргона + CO_2 и при различной интенсивности света

В начале культивирования (когда активность ФС2 максимальна, и в среде есть CO_2) интенсивность света была 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. Через 47,5 ч культивирования из подаваемой газовой смеси убирали CO_2 (Рис. 16). После начала снижения концентрации кислорода (51,8 ч) культуры переводили на 2,5 ч в темновые условия, затем включали свет с пониженной интенсивностью (30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$). В этих условиях содержание суммарного хлорофилла возрастало в течение первых 47 ч, достигая 64 мг Хл (a+b)/л, а в дальнейшем снижалось до 20 мг Хл (a+b)/л к 167 ч (Рис. 16А). Концентрация кислорода вначале росла и к 25 ч стабилизировалась. В момент отключения CO_2 (47,5 ч) происходили изменения всех параметров культуры (Рис. 16). Уже через час после исключения углекислоты из газовой фазы концентрация кислорода начинала снижаться. Одновременно с этим редокс-потенциал среды снижался и к моменту выключения света достигал +15 мВ. При снижении pO_2 до ~50% начиналось снижение Y(II) до 0.35 за счет одновременного падения Fm' и роста F_T. При падении pO_2 до нуля происходило дополнительное падение Y(II) в основном за счет роста F_T. Через ~30 мин после выключения света Y(II) начинал возрастать до 0,45. Через час после включения света Y(II) продолжал возрастать и достигал 0,65 через 4 ч. Это свидетельствует о том, что снижение Y(II) после удаления углекислоты обусловлено перевосстановленностью пула ПХ и не затрагивает структуру ФС2, поскольку является обратимым. Содержание аскорбата с момента удаления углекислоты до момента выключения света не изменялось, а при инкубации в темноте снижалось с последующим небольшим ростом после включения света. Это подтверждает

отсутствие его конкуренции с водой за донирование электронов в ФС2, в отличие от микроводорослей при серном голодании в фотоавтотрофных условиях (Nagy, Podmaniczki et al. 2018). Содержание крахмала в клетках практически не изменялось (Grechanik, Bol'shakov et al. 2022).

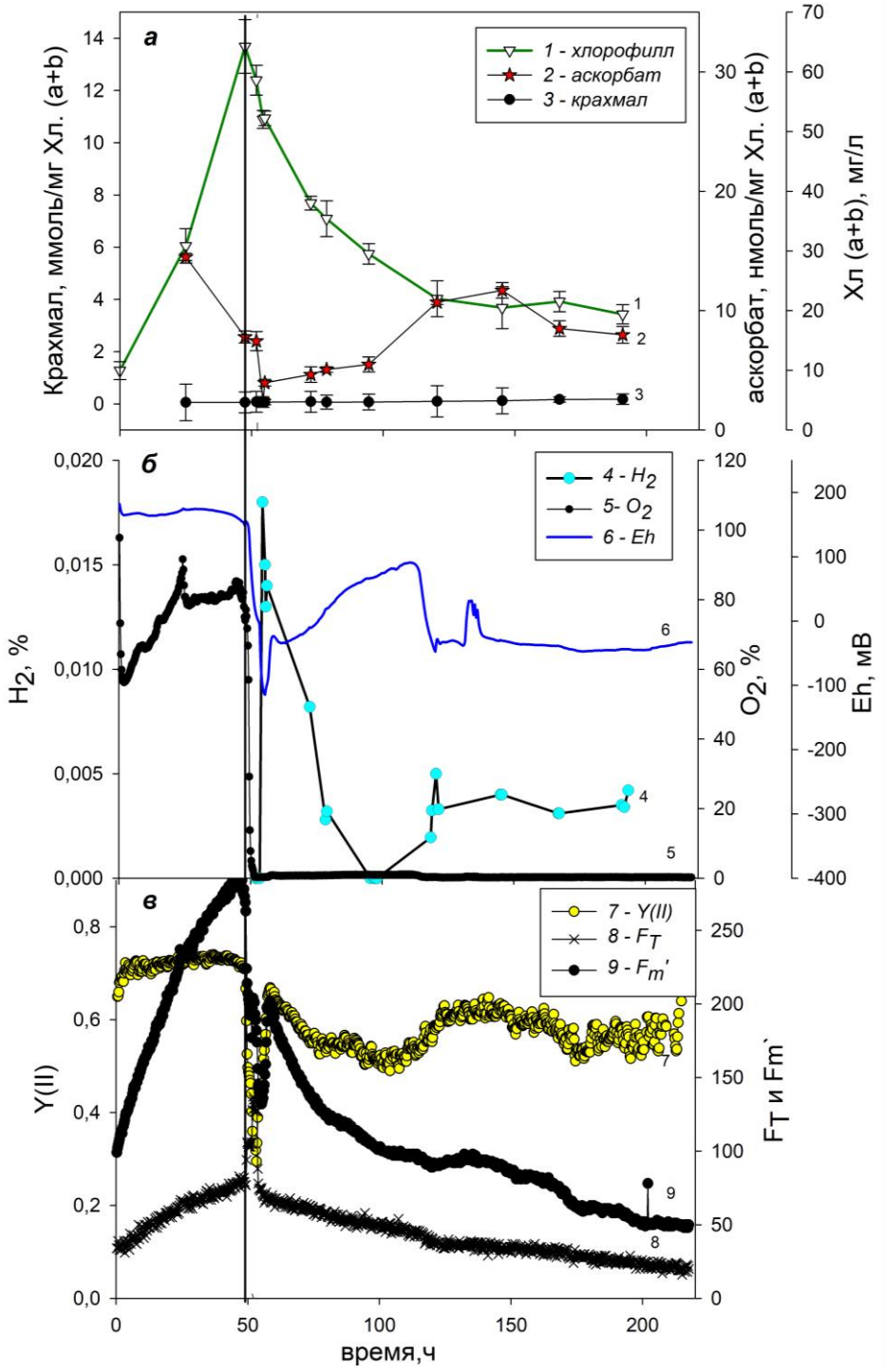


Рисунок 16. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке углерода в газовой фазе аргон + 2% CO_2 с применением двухстадийного светового протокола. Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ до 51,8 ч, далее 30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. На 47,5 ч из подаваемой газовой смеси удалили углекислоту. **а** Хл (a + b) (1); аскорбат (2); крахмал (3), **б** содержание H_2 в газовой фазе (4) pO_2 (5); eH (6); **в** Y(II) (7); F_T (8); Fm′ (9) (Grechanik, Bol'shakov et al. 2022).

Через 10 мин после включения света в выходящем из ФБР газе обнаруживалось 0,018% H_2 (Рис. 16). Это соответствует 1,1 мл H_2 в час на 1 л культуры. Далее скорость выделения водорода существенно снижалась и даже падала до 0 на 95-98 ч, с возобновлением выделения на 118 ч. Всего за 138 ч (с 54,5 до 193,5 ч) выделилось 56 мл H_2/л культуры. Это несколько ниже, чем у фотоавтотрофных культур в условиях недостатка серы (Grechanik, Bol'shakov et al. 2022).

Можно заключить, что все параметры до исключения углекислоты (47,5 ч) практически совпадали с таковыми для контрольной культуры в стационарной фазе роста (Табл. 8) (Grechanik, Bol'shakov et al. 2022). В период изменений условий (47,5-54,3 ч) сравнение Y(II) и Fv/Fm затруднено вследствие быстрых и существенных изменений Y(II) и недостаточно частых проведений JIP теста. Vj и ABS/RC постепенно снижались в диапазоне времени между 47,5 и 78 ч с последующим умеренным увеличением до конца эксперимента. Индекс производительности PIabs снижался до конца эксперимента, за исключением незначительного возрастания в диапазоне времени от78 до 120 ч.

Таблица 8. Изменение параметров JIP теста при выращивании культур при недостатке углерода в атмосфере аргон+CO_2.

Условия и время культивирования (ч)	Y(II)	Fv/Fm	Vj	dV/dt_0	ABS/RC	PIabs
25	0,72	0,727	0,192	0,172	1,236	9,05
47,5	0,722	0,656	0,295	0,294	1,52	3
54,33	0,459	0,606	0,291	0,254	1,44	2,59
55,5	0,462	0,56	0,216	0,205	1,69	2,73
72,5	0,564	0,432	0,347	0,346	2,331	0,614

78,5	0,55	0,596	0,193	0,157	1,36	4,52
94,5	0,503	0,579	0,199	0,162	1,41	3,93
120,5	0,579	0,541	0,277	0,283	1,88	1,63
145,25	0,626	0,502	0,359	0,443	2,46	0,73
167	0,579	0,482	0,393	0,476	2,52	0,57
191	0,556	0,399	0,384	0,470	3,07	0,347

3.6. Использование особых световых режимов во время фотоавтотрофного роста *C. reinhardtii* при недостатке азота или серы

Нами показано, что в условиях азотного голодания фотоавтотрофные культуры *C. reinhardtii* не выделяли водород при освещении неизменным светом более 100 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$, хотя снижали реальный квантовый выход ФС 2 (Y(II)). Для выделения водорода необходимо было применять специальный световой режим (в стадии поглощения кислорода интенсивность света снижали), при котором в момент наступления анаэробиоза происходило перевосстановление пула пластохинонов. При недостатке серы в момент наступления анаэробиоза снижался реальный квантовый выход, происходило перевосстановление пула пластохинонов с увеличением доли «закрытых» реакционных центров (РЦ) (Grechanik, Romanova et al. 2020). Следует отметить, что во всех экспериментах, описывающих выделение водорода, происходило падение активности ФС2. В литературе сообщается, что для снижения активности ФС2 могут быть задействованы несколько регуляторных механизмов: накопление «закрытых» центров Q_B (Wykoff, Davies et al. 1998, Melis, Zhang et al. 2000), перевосстановление пула ПХ (Antal, Krendeleva et al. 2003), появление стабильно восстановленных форм Q_A (Volgusheva, Zagidullin et al. 2007), переходы состояния (State transitions) (Wykoff, Davies et al. 1998), ксантафилловый цикл (Wykoff, Davies et al. 1998, Antal, Krendeleva et al. 2007), деградация D1 (Zhang, Happe et al. 2002, Nagy, Podmaniczki

et al. 2018), деградация RbcL и CP43 (Nagy, Podmaniczki et al. 2018), разобщение ВОК и РЦ ФС2 (Antal, Volgusheva et al. 2006, Grechanik, Romanova et al. 2020), фотоингибирование (окислительный стресс) (Nagy, Podmaniczki et al. 2018). В то же время разные авторы указывают на один или два механизма ингибирования ФС2 (Grechanik and Tsygankov 2022). Можно предположить, что все эти механизмы одновременно вовлечены в подавление активности ФС2 и важны для выделения водорода, а авторы изучали разные механизмы по отдельности. Возможно также, что в условиях недостатка серы или азота (как, впрочем, и при недостатке других элементов питания, кроме углерода) падение активности ФС2 может регулироваться различными механизмами, обусловленными дополнительными факторами внешней среды, определяющими разность скоростей фотосинтеза и дыхания в момент перехода культур в анаэробные условия. В качестве косвенного подтверждения последнего предположения может служить тот факт, что фотоавтотрофные культуры при недостатке серы тоже не всегда выделяли водород, причём в момент наступления анаэробиоза могло наблюдаться и сохранение потенциальной активности ФС2 при резком падении реального квантового выхода (Tsygankov, Kosourov et al. 2006, Kosourov, Patrusheva et al. 2007). Целью данной серии экспериментов являлось обнаружение связи между выделением водорода и механизмами регуляции ФС2 при недостатке азота или серы у фотоавтотрофных культур *C. reinhardtii*. Для этого, в отличие от вышеописанных экспериментов, использовали двухстадийные световые протоколы (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

3.6.1. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке азота в атмосфере аргона + CO_2 с применением двухстадийного светового протокола. Уменьшение интенсивности света с 169 до 30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$

Фотоавтотрофные культуры *C. reinhardtii* не выделяли водород в условиях недостатка азота в наших опытах (Grechanik, Naidov et al. 2021). Для сравнения, фотоавтотрофные культуры голодающие по сере той же микроводоросли производят очень небольшое количество водорода при постоянной интенсивности

света 110 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$, если инокулят предварительно культивировали при 120 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ (Tsygankov, Kosourov et al. 2006) . Однако, если на ранней стадии потребления кислорода интенсивность света переключить с 110 на 20 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$, выделение водорода значительно увеличивалось. Поэтому мы применили двухстадийный световой протокол для культур с недостатком азота. Для этого культуру *C. reinhardtii* инокулировали, как описано ранее (Grechanik, Naidov et al. 2021), на среду HSM*2 с 0,125 г $л^{-1}$ NH_4Cl (рис.5). Культура плавно переходила от нелимитированного роста до 43 ч с последующим лимитированием и переходом в глодающую культуру по азоту, что в общем соответствует данным описанным ранее (Grechanik, Naidov et al. 2021). Через 43 ч, когда pO_2 в культуре начинало снижаться (стадия раннего потребления кислорода в адаптации к недостатку азота), интенсивность света снижали с 169 до 30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. pO_2 уменьшилось до нуля через 60 мин после смены интенсивности света. Когда pO_2 достигало нуля, eH снижался с 300 мВ и через 30 мин достигал -60 мВ (рис. 17Б). Через 2 ч после изменения интенсивности света начинал снижаться Хл(а+б), а также содержание крахмала. Y(II) уменьшался с 0,74 до 0,4 (рис. 17В, дополнительные данные приведены в табл. 9), Fv/Fm уменьшался с 0,72 до 0,39. Важно отметить, что в течение этих 2 ч значительно снизилось содержание аскорбата. Эти изменения сопровождались снижением PIabs. ABS/RC увеличился умеренно, в то время как другие параметры JIP-теста были стабильны (табл. 9). H_2 не был обнаружен в 43,0 и 43,25 ч, но появился в 44 ч в газовой фазе (рис. 17Б). Это означает, что анаэробная стадия адаптации к недостатку азота существует, но очень короткая (Grechanik, Bol’shakov et al. 2025).

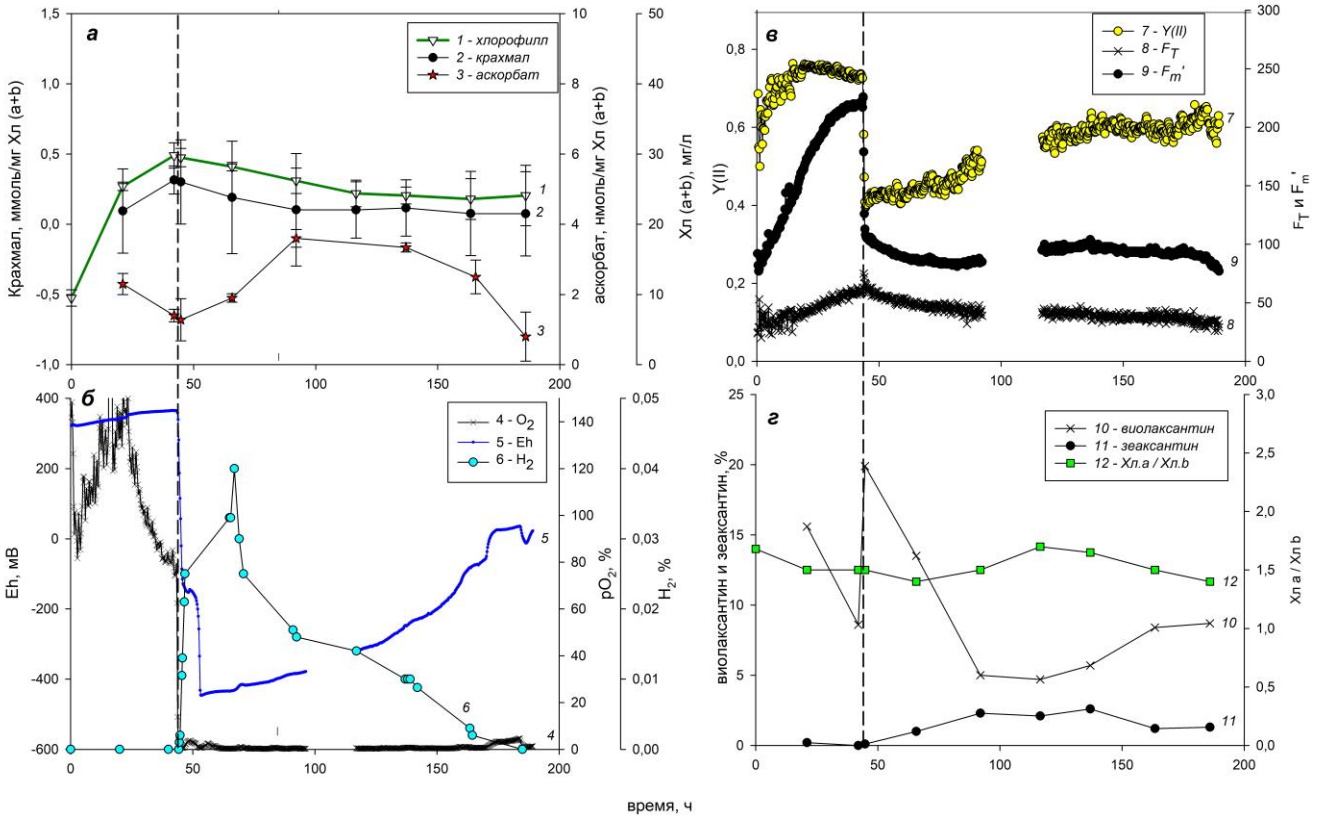


Рисунок 17. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке азота в газовой фазе аргон + 2% CO_2 с применением двухстадийного светового протокола. Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ до 43,6 ч, далее 30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ (вертикальный пунктир – изменение интенсивности света). **а** Хл (a + b) (1); крахмал (2), аскорбат (3); **б** pO_2 (4); eH (5); содержание H_2 в газовой фазе (6) **в** Y(II) (7); F_T (8); Fm′ (9); **г** Отношение Хл.a/Хл.b (12) и процентное содержание виолаксантина (10) и зеаксантина (11) (100% -количество всех каротиноидов). Разрыв в измерениях F_v''и F_m''связан с технической неисправностью (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

При последующей инкубации культуры при пониженной интенсивности света содержание Хл (a+b) и крахмала постепенно снижалось (рис. 17А). Содержание аскорбата увеличивалось до 116 ч с последующим снижением. Содержание H_2 в газовой фазе достигло максимума в 67 ч. H_2 выделялся с постепенно снижающейся скоростью до конца эксперимента (рис. 17Б). Общее количество выделенного H_2 за весь эксперимент составило 122 мл на 1 л культуры. Y(II) и Fv/Fm после значительного снижения вследствие переключения светового

облучения и установления анаэробиоза постепенно увеличивались с 43 ч до конца эксперимента. Vj, dV/dt_0, и ABS/RC после уменьшения интенсивности света резко увеличивались в 2 раза. PIabs достигал минимального значения к 66 ч. После 137 ч наблюдается восстановление всех параметров JIP теста (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

Был проведен анализ содержания каротиноидов и отношения Хл.a/Хл.b. (рис. 17Г). Полученные данные подтверждают, у культур не происходит включение виолаксантинового цикла и не происходит дополнительный синтез антенных комплексов на протяжении всего периода культивирования.

3.6.2. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке азота в атмосфере аргона + CO_2 с применением двухстадийного светового протокола. Увеличение интенсивности света с 169 до 300 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$

В данном эксперименте изучалось влияние высокой интенсивности света на активность ФС2 у культур *C. reinhardtii* при недостатке азота (рис. 18). Нам не удалось установить интенсивность света 300 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ с самого начала эксперимента, поскольку при такой интенсивности света культура в момент посева даже при концентрации хлорофилла (a+b) около 12 мг/л не росла. Поэтому была применена двухстадийная схема освещения культур: первые 46 ч культивирования интенсивность света составляла 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$, а после 46 ч культивирования (период азотного голодания) увеличивали до 300 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

Культура плавно переходила от нелимитированного роста до 23 ч с последующим лимитированием и переходом в глодающую культуру по азоту. На 46 ч культивирования интенсивность света увеличили до 300 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$, к этому моменту уже наблюдалось лимитирование азотом. Хл. (a+b), pO_2, аскорбат и фактический квантовый выход (Y) уменьшались. Происходило накопление крахмала, которое длилось до конца эксперимента и достигало максимальных значений из всех проведенных ранее экспериментов. Увеличение интенсивности света приводило к увеличению количества аскорбата,

с дальнейшим уменьшением после 60 ч. Максимальное значение аскорбата составило 5,5 нмоль/ мг Хл. (a+b). eH оставалось стабильным все время культивирования, а pO_2 хоть и снижалось, но не было меньше 10 % от насыщения, то есть перехода в анаэробные условия не происходило. Поэтому нам не удалось обнаружить водород в газовой фазе ФБР а ни на каких этапах эксперимента (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

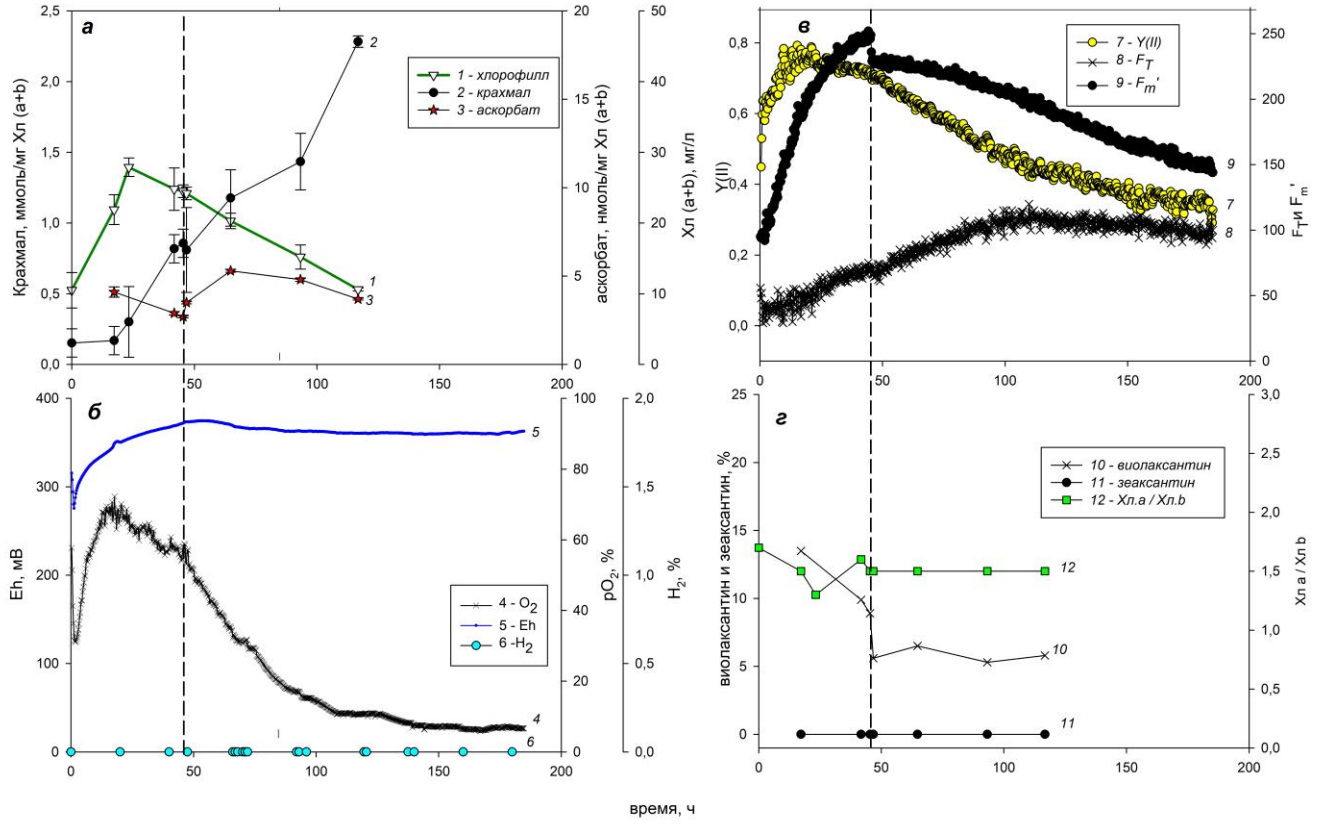


Рисунок 18. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке азота в газовой фазе аргон + 2% CO_2 с применением двухстадийного светового протокола. Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ до 46 ч, далее 300 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ (вертикальный пунктир – изменение интенсивности света). **а** Хл (a + b) (1); крахмал (2), аскорбат (3); **б** pO_2 (4); eH (5); содержание H_2 в газовой фазе (6) **в** Y(II) (7); F_T (8); Fm′ (9); **г** Отношение Хл.a/Хл.b (12) и процентное содержание виолаксантина (10) и зеаксантина (11) (100% -количество всех каротиноидов) (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

Все параметры, полученные из JIP теста (табл. 9) не отличаются от параметров, полученных для культур, выросших на постоянной интенсивности света, за исключением начального наклона флуоресценции (d_V/d_{t0} (M_0)), этот параметр показывал увеличение после 65 ч и коррелировал с поведением количества аскорбата. Эти изменения указывают на разобщение ВОК и РЦ ФС2 (Nagy, Vidal-Meireles et al. 2016, Grechanik, Bol'shakov et al. 2022).

Был проведен анализ содержания каротиноидов и отношения Хл.a/Хл.b. (рис. 18Г). Полученные данные подтверждают, у культур не происходит включение виолаксантинового цикла и не происходит дополнительный синтез антенных комплексов на протяжении всего периода культивирования (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

Таблица 9. Изменение параметров JIP теста при выращивании культур при недостатке азота и различном освещении.

Условия и время культивирования (ч)	Y(II)	F_v/F_m	V_j	d_V/d_{t0}	ABS/RC	PIabs
Ar-N переход с интенсивности света 169 на 300 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$						
19,25	0,75	0,793	0,202	0,158	0,985	15,2
22,75	0,768	0,784	0,211	0,172	1,04	13
41,75	0,726	0,741	0,273	0,28	1,4	5,5
46,75	0,709	0,73	0,259	0,283	1,5	5,2
64,75	0,62	0,623	0,416	0,583	2,25	1
93,25	0,525	0,444	0,53	0,781	3,3	0,21
Ar-N переход с интенсивности света 169 на 30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$						

23,5	0,753	0,782	0,215	0,179	1,06	12,3
43	0,727	0,766	0,208	0,204	1,3	9,7
43,86	0,581	0,62	0,498	0,52	1,7	0,97
44,66	0,398	0,443	0,324	0,314	2,2	0,75
65,75	0,429	0,15	0,459	0,436	6,3	0,033
69	0,451	0,137	0,518	0,474	6,7	0,022
92	0,511	0,16	0,542	0,521	6	0,027
116,5	0,574	0,232	0,536	0,534	4,2	0,06
137,5	0,603	0,33	0,553	0,534	2,9	0,13
163,5	0,581	0,453	0,454	0,452	2,2	0,45
186	0,583	0,524	0,493	0,426	1,6	0,68

3.6.3. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке серы в атмосфере аргона + CO_2 . Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$

При культивировании *C. reinhardtii* в атмосфере аргона + 2% CO_2, когда культура была инокулирована в среду без S, Хл (a + b) возрастал до 23 ч (начало серного голодания) и был стабилен до 41ч, а затем начинал снижаться (Рис. 19) (Grechanik, Bol’shakov et al. 2025).

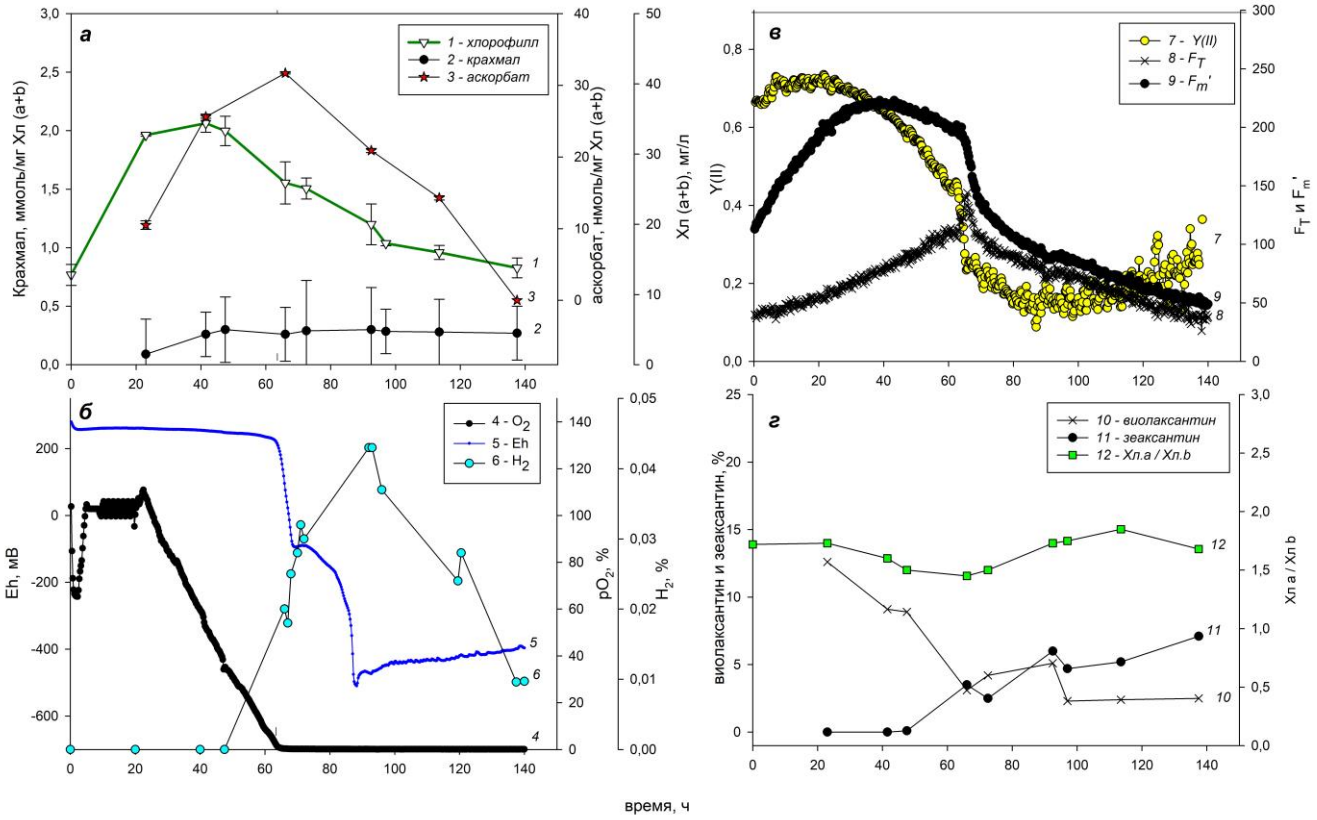


Рисунок 19. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке серы в газовой фазе аргон + 2% CO_2. Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. **а** Хл (a + b) (1); крахмал (2), аскорбат (3); **б** pO_2 (4); eH (5); содержание H_2 в газовой фазе (6) **в** Y(II) (7); F_T (8); Fm′ (9); **Г** Отношение Хл.a/Хл.b (12) и процентное содержание виолаксантина (10) и зеаксантина (11) (100% -количество всех каротиноидов) (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

Культура плавно переходила от нелимитированного роста до 23 ч с последующим лимитированием и переходом в глодающую культуру по сере, что в общем соответствует данным описанным ранее (Grechanik, Romanova et al. 2020). pO_2 оставалось стабильным до 23 ч, а затем снижалось (стадия потребления кислорода), достигая нуля (анаэробная и стадия выделения водорода) к 65-му ч. Окислительно-восстановительный потенциал был стабильным, когда pO_2 был стабильным, затем уменьшался одновременно с pO_2 и резко снижался, когда pO_2 достигало нуля с последующим увеличением на поздней стадии выделения водорода водорода, т.е. в анаэробных условиях редокс-потенциал культуральной жидкости был восстановительным. Количество аскорбата на протяжении всего

эксперимента увеличивалось с 10,5 до 31,7 нмоль/ мг Chl(a+b). Водород был обнаружен в газовой фазе к 66 ч. Содержание H_2 в газовой фазе увеличивалось до 93 ч, а затем снижалось. H_2 в газовой фазе обнаруживался даже после 130 ч культивирования. За весь период инкубации выделение водорода составляло 170 мл/л. Фактический квантовый выход ФС2 Y начинал снижаться после 60 ч культивирования, главным образом, из-за уменьшения Fm ' (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

Все параметры, полученные из теста OJIP (табл. 10) через 23 ч после инокуляции в атмосфере Ar + CO_2 без S, были очень близки к таковым для контрольной культуры при аналогичной концентрации Chl (a + b). Таким образом, в это время культура не испытывала недостатка S. В точке 41,5 ч Y, Fv / Fm, Vj, Sm, N не изменились, тогда как Pabs значительно снизились (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

После 68 ч роста, когда H_2 появился в газовой фазе Y, Fv / Fm, Pabs уменьшились, тогда как Vj, Sm и N существенно не изменились.

При анализе пигментного состава (рис. 19Г), видно, что в этом эксперименте при адаптации к высоким интенсивностям света, происходит ферментативное взаимопревращение между виолаксантином и зеаксантином (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

3.6.4. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке серы в атмосфере аргона + CO_2 с применением двухстадийного светового протокола. Уменьшение интенсивности света с 169 до 30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$

При культивировании *C. reinhardtii* в среде без S в атмосфере Ar + 2% CO2? Хл (a + b) возрастал до 40 ч, а затем начинал снижаться (Рис. 20). Культура плавно переходила от нелимитированного роста (до 40 ч) к последующему лимитированию и переходу к голоданию по сере. После 40 ч была уменьшена интенсивность света до 30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. pO_2 и eH в момент уменьшения интенсивности света резко падали. Резкое падение наблюдалось и у фактического

квантового выхода ФС 2, главным образом из-за скачкообразного уменьшения Fm '. Крахмал, аскорбат и отношение Хл.a/Хл.b оставались стабильными в течение всего культивирования. Содержание H_2 в газовой фазе увеличивалось до 89 ч, а затем снижалось. За весь период инкубации выделение водорода составило 84 мл/л (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

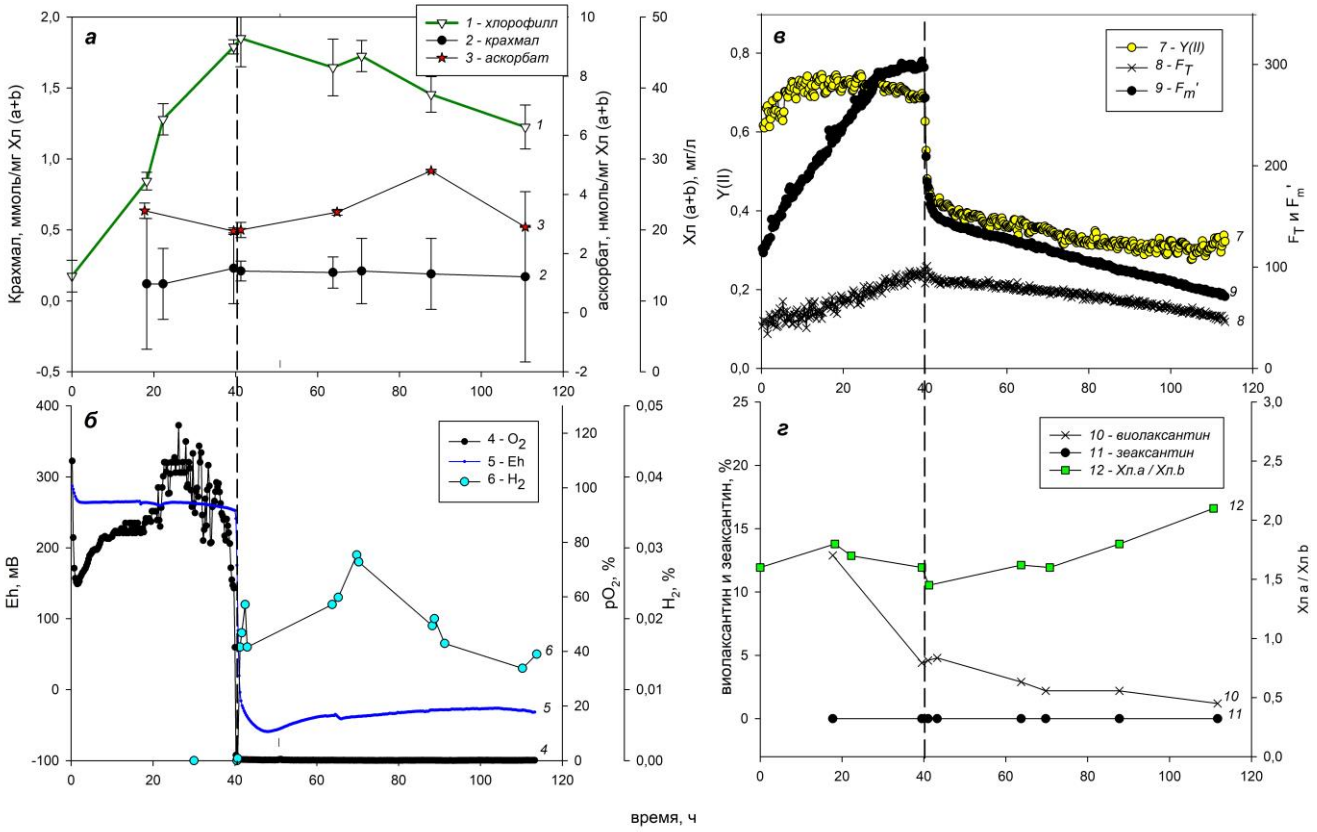


Рисунок 20. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке серы в газовой фазе аргон+ 2% CO_2 с применением двухстадийного светового протокола. Интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ до 40 ч, далее 30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ (вертикальный пунктир – изменение интенсивности света). **а** Хл (a + b) (1); крахмал (2), аскорбат (3); **б** pO_2 (4); eH (5); содержание H_2 в газовой фазе (6); **в** Y(II) (7); F_T (8); Fm′ (9); **г** Отношение Хл.a/Хл.b (12) и процентное содержание виолаксантина (10) и зеаксантина (11) (100% -количество всех каротиноидов) (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

Дополнительно был проведен пигментный анализ для оценки работы виолаксантинового цикла. В данном эксперименте (рис. 20Г) зеаксантин

отсутствовал на протяжении всего культивирования. Процентное содержание виолаксантина уменьшалось (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

Все параметры, полученные из теста JIP (табл. 20) через 40 были очень близки к таковым для культур, выращенных на полной среде, что подтверждает вывод, что в это время культура не испытывала недостатка S. После уменьшения интенсивности света, наблюдалось падение Fv/Fm и PIabs, и увеличение Vj, dV/dt0, ABS/RC. После 66 ч Vj, dV/dt0, ABS/RC увеличивались в 2 раз, тогда как PIabs снизилась практически до нулевого значения (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

3.6.5. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке серы в атмосфере аргона + CO_2 с применением трехстадийного светового протокола. Увеличение интенсивности света с 169 до 300 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$

В данном эксперименте изучалось влияние высокой интенсивности света на активность ФС2 у адаптированных к низкой интенсивности света культур (рис. 21). Для этого был применен трехстадийный переход, поскольку культуры при применении высокой интенсивности света сразу к инокуляту в низкой концентрации погибали. В первые сутки после инокулирования интенсивность света была 40 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$, после 20 ч интенсивность света увеличивали до 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$, а после 46 ч культивирования (период серного голодания) увеличивали до 300 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

В первые сутки культивирования Хл(a + b) не увеличивался, роста культуры не наблюдалось. При этом фактический квантовый выход ФС 2 был 0,750. После увеличения интенсивности света до 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ (21 ч) наблюдалось резкое падение фактического квантового выхода, с быстрым восстановлением до прежних значений. pO2 и Хл (a+b) увеличивались до 40 ч. Наблюдалось увеличение количества аскорбата до 5 нмоль/мг Хл(a+b). Отношение Хл.a/Хл.b не изменялось, а крахмал оставался стабильно низким в течение всего эксперимента (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

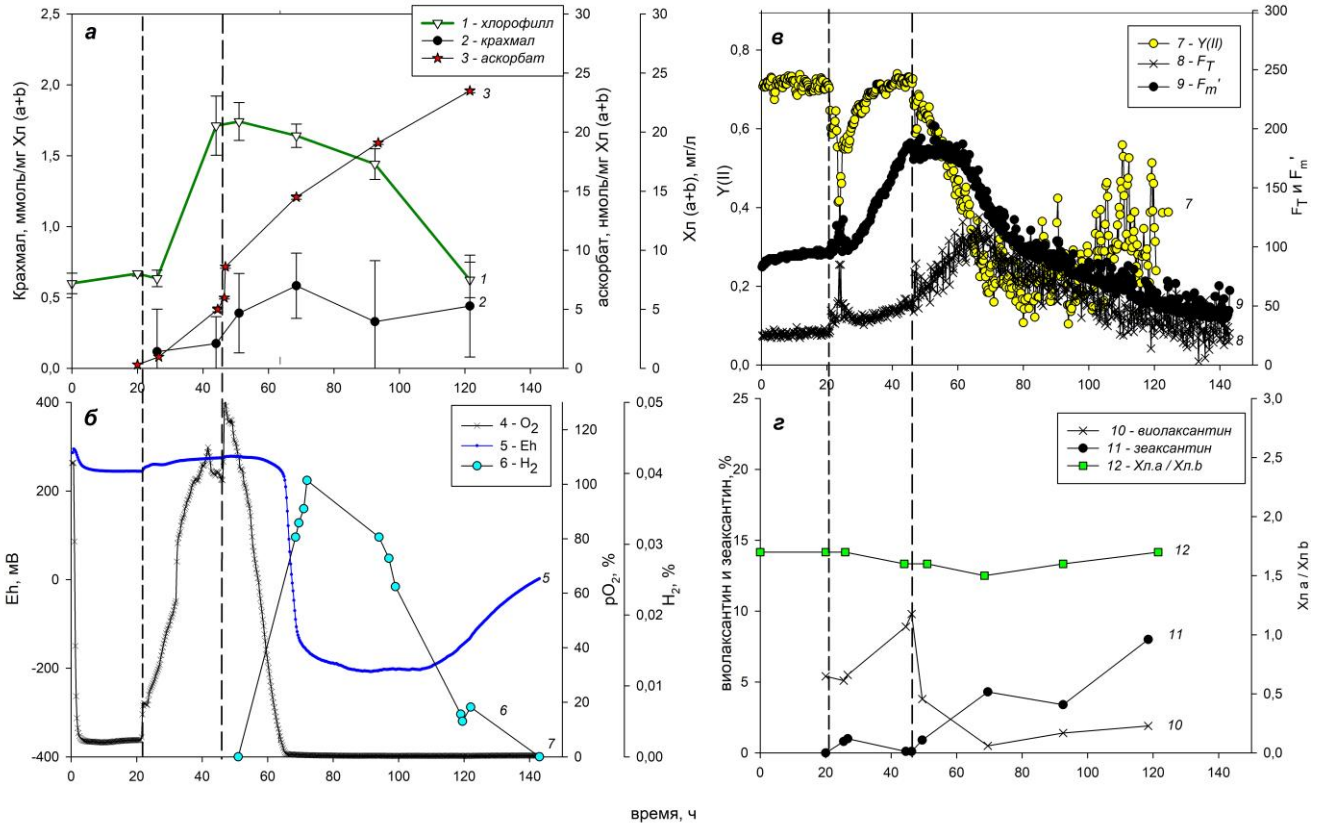


Рисунок 21. Культивирование *C. reinhardtii* при недостатке серы в газовой фазе аргон + 2% CO_2 с применением трехстадийного светового протокола. Интенсивность света 40 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ до 20 ч, 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ до 46 ч, далее 300 (вертикальный пунктир – изменение интенсивности света). **а** Хл (a + b) (1); крахмал (2), аскорбат (3); **б** pO_2 (4); eH (5); содержание H_2 в газовой фазе (6) **в** Y(II) (7); F_T (8); Fm′ (9); **г** Отношение Хл.a/Хл.b (12) и процентное содержание виолаксантина (10) и зеаксантина (11) (100% -количество всех каротиноидов) (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

На 46 ч культивирования интенсивность света увеличили до 300 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$, в этот момент наблюдалось резкое увеличение pO2, с последующим резким его уменьшением до 0. Количество аскорбата через 20 мин после увеличения интенсивности света увеличивалось в 2 раза, и далее продолжало увеличиваться. После исчерпания в среде кислорода eH резко снижался, свидетельствуя о синтезе редокс активных восстановленных соединений. Содержание H_2 в газовой фазе увеличивалось до 72 ч, а затем снижалось. За весь

период инкубации выделение водорода составило 101,6 мл/л (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

Все параметры, полученные из теста JIP (табл.10) не изменялись после увеличения интенсивности света и до 46 ч были очень близки к таковым для культур, выращенных на полной среде, что подтверждает вывод, что в это время культура не испытывала недостатка S. Через 70 ч культивирования, в момент наступления анаэробиоза Vj, dV/dt0, ABS/RC увеличивались в 2 раза, а PIabs снизилась практически до нулевого значения (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

При анализе пигментного состава (рис. 21 Г), видно, что в этом эксперименте при адаптации к высоким интенсивностям света, происходит ферментативное взаимопревращение между виолаксантином и зеаксантином.

Таким образом, культуры, адаптированные к низким интенсивностям света и переведенные при серном голодании в режим очень высоких интенсивностей света, регулируют активность ФС2 как минимум тремя механизмами: перевосстановленностью пула пластохинонов, разобщением ВОК и РЦ ФС2, а также виолаксантиновым циклом (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

Таблица 10. Изменение параметров JIP теста при выращивании культур при недостатке серы и различном освещении.

Условия и время культивирования (ч)	Y(II)	F_v/F_m	V_j	d_V/d_{t0}	ABS/RC	PIabs
Ar-S интенсивность света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$						
23	0,719	0,77	0,145	0,103	0,915	21,54
41,5	0,629	0,745	0,193	0,147	1	12,1
68	0,254	0,493	0,378	0,421	1,7	0,95
97,5	0,18	0,208	0,285	0,318	5,3	0,13
113,5	0,14	0,175	0,307	0,322	5,9	0,08

137,5	-	0,214	0,215	0,201	4,3	0,23
Ar-S переход с интенсивности света 30 на 300 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$						
20	0,716	0,798	0,201	0,132	0,821	19,11
28	0,610	0,757	0,165	0,121	0,973	16,2
45	0,731	0,794	0,152	0,103	0,853	25,1
46,25	0,726	0,779	0,194	0,139	0,919	15,8
70,5	0,207	0,356	0,385	0,479	3,5	0,25
99	-	0,197	0,247	0,256	5,2	0,14
121,1	-	0,231	0,261	0,296	4,9	0,17
Ar-S переход с интенсивности света 169 на 30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$						
22,25	0,715	0,759	0,128	0,096	0,984	21,8
39,5	0,395	0,623	0,217	0,18	1,33	4,77
40,75	0,355	0,418	0,324	0,314	2,3	0,65
43	0,328	0,418	0,415	0,373	2,1	0,47
66,5	0,322	0,082	0,75	0,667	10,9	0,0003
70,25	0,318	0,111	0,621	0,646	9,33	0,008
93,25	-	0,111	0,621	0,655	9,5	0,008
113,75	-	0,159	0,493	0,529	6,66	0,029

3.7. Выделение водорода как механизм адаптации *C. reinhardtii* к световым условиям и роль пластохинона

Мы исследовали механизмы регуляции активности ФС2 у фотоавтотрофных культур *C. reinhardtii* при недостатке азота и серы в различных световых условиях и их связь с выделением водорода.

Контрольные культуры, выращенные в полной среде 2*HSM при интенсивности света 169 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$, демонстрировали типичный фотоавтотрофный рост без признаков стресса. Параметры JIP-теста указывали на высокую эффективность работы ФС2, а уровень восстановленности пула пластохинонов оставался низким, о чём свидетельствует высокое отношение площади над кривой OJIP к общей площади и стабильный уровень F_0 (Kalaji, Jajoo et al. 2016). В этих условиях водород не выделялся (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

При культивировании в среде без азота со снижением интенсивности света со 169 до 30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ в период потребления кислорода мы наблюдали значительное увеличение восстановленности пула пластохинонов (рис. 17), как и для культур, голодающих по сере (Tsygankov, Kosourov et al. 2006). Это сопровождалось снижением фотосинтетической активности (Y(II), Fv/Fm) за счёт падения F_m` и возрастания F_T и выделением водорода (до 122 мл/л). При этом, как было отмечено ранее (Антал, Кренделева et al. 2001, Antal, Krendeleva et al. 2003), возрастание F_T обусловлено резким возрастанием количества активных центров с восстановленным Q_A, обусловленным резким перевосстановлением пула пластохинонов. Напротив, при повышении интенсивности света до 300 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ перевосстановления пула пластохинонов не происходило, несмотря на падение Fv/Fm, и водород не выделялся. Эти результаты согласуются с данными, полученными на фотогетеротрофных культурах (Laurinavichene, Tolstygina et al. 2002, Zhang, Happe et al. 2002, Grechanik, Bol'shakov et al. 2025)).

Сходные закономерности наблюдались и при выращивании в среде без серы. При постоянной интенсивности света 169 мкмоль/$м^2$/с (рис. 19) и её при повышении до 300 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ (рис.21) происходило умеренное

перевосстановление пула пластохинонов, наблюдаемое по возрастанию F_T, и выделение водорода (170 и 101,6 мл/л). В обоих случаях происходило ферментативное взаимопревращение между виолаксантином и зеаксантином, разобщение ВОК и РЦ ФС2 наблюдали для культур только при постоянной интенсивности света. Снижение интенсивности до 30 мкмоль фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$ приводило только к перевосстановлению пула пластохинонов и, как следствие, к выделению водорода. При резком снижении интенсивности света скорость фотосинтеза была ниже скорости дыхания и очень быстро культуры переходили в анаэробные условия (там, где это происходило). Анаэробные условия приводили к невозможности потребления NADPH (особенно в условиях, когда NADPH не потреблялся в цикле Кальвина из-за голодания по сере или азоту). В результате вся фотосинтетическая электронтранспортная цепь (ЭТЦ) перевосстанавливалась, в том числе и пул пластохинонов. Это явление впервые было обнаружено в 2001 г. (Антал, Кренделева et al. 2001, Grechanik, Bol'shakov et al. 2025)).

Сравнение полученных результатов с литературными данными показывает, что поведение фотоавтотрофных и фотогетеротрофных культур *C. reinhardtii* при голодании по сере и азоту во многом схоже (Laurinavichene, Tolstygina et al. 2002, Zhang, Happe et al. 2002). В обоих случаях наблюдается снижение активности ФС2, измеряемое параметрами JIP-теста – максимальным (Fv/Fm) и эффективным (Y(II)) квантовым выходом, что сопровождается накоплением восстановленных форм пула пластохинонов (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

Ключевым наблюдением нашей работы является то, что продукция водорода наблюдалась только в тех культурах, где происходило значительное перевосстановление пула пластохинонов, наблюдаемое по резкому возрастанию F_T. Это наблюдалось как при недостатке серы, так и при недостатке азота. В тех случаях, где не происходило быстрого перевосстановления пула пластохинонов, сопряжённого с быстрым переходом культур в анаэробные условия, водород не выделялся, несмотря на падение фотосинтетической активности (Grechanik, Bol'shakov et al. 2025).

Другие исследованные нами механизмы регуляции ФС2, такие как виолаксантиновый цикл или увеличение доли антенных комплексов ФС2 (снижение отношения Хла/Хлb), по-видимому, играют вторичную роль и не оказывают определяющего влияния на выделение водорода. Накопление аскорбата при голодании также не коррелировало однозначно с продукцией водорода.

Таким образом, наши данные позволяют заключить, что ключевым механизмом, определяющим выделение водорода при недостатке серы или азота у *C. reinhardtii*, является перевосстановление пула пластохинонов, которое достигается при определённых условиях освещения на фоне подавления фотосинтеза. Другие исследованные механизмы играют меньшую роль. Полученные результаты расширяют понимание регуляции фотосинтетического аппарата в условиях стресса и могут быть использованы для оптимизации процессов получения водорода с помощью микроводорослей (Grechanik, Bol’shakov et al. 2025).

Заключение

Целью настоящей работы являлось выявление специфических условий, приводящих к аноксии и последующему фотобиологическому выделению водорода фотоавтотрофными культурами *C. reinhardtii* в условиях недостатка серы, азота или углерода. В первую очередь, для реализации поставленных задач был усовершенствован лабораторный ФБР путем интеграции PAM-флуориметра, что обеспечило возможность квазинепрерывного мониторинга параметров флуоресценции хлорофилла и, соответственно, динамики состояния ФС2 в режиме реального времени на протяжении всего эксперимента. Полученные технические решения существенно повысили информативность анализируемых процессов и заложили основу для комплексного исследования метаболической активности микроводорослей при различных видах стрессового воздействия.

Проведённые исследования показали, что при недостатке серы фотоавтотрофные культуры *C. reinhardtii* способны к длительному выделению водорода в условиях постоянного светового режима. Показано, что ограничение поступления серы приводит к подавлению фотосинтетической активности ФС2, перевосстановлению пула пластохинонов, а также запускает метаболические перестройки, в том числе накопление запасных соединений и снижение содержания хлорофилла. Эти изменения отражают адаптационный характер реакции клеток на нарушение минерального питания.

Установлено, что при недостатке азота фотоавтотрофные культуры *C. reinhardtii* также способны к выделению водорода как вторичного метаболита. Однако в данном случае реализация данного процесса требует специально подобранного светового режима, включающего снижение интенсивности освещения. Такой режим обеспечивает снижение активности ФС2 до уровня, при котором формируются условия для аноксии и последующего включения механизмов выделения водорода. Эти процессы сопровождаются выраженными изменениями параметров флуоресценции хлорофилла, указывающими на перевосстановление пула пластохинонов и постепенной адаптации клеток к новым условиям среды. Существенной особенностью азотного стресса является быстрое

истощение запасов органики и формирование характерного биохимического профиля фотосинтетического аппарата, что отличает этот механизм от реагирования на дефицит серы.

Особое внимание в работе уделялось исследованию процессов метаболической перестройки микроводорослей при углеродном голодании. Полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что эффективное фотобиологическое выделение водорода в этих условиях возможно только при направленном снижении активности ФС2 за счет снижения интенсивности света. Как показали анализы динамики флуоресцентных параметров, при отсутствии достаточного ограничения ФС2 длительного выделения водорода не наблюдается, даже если другие стрессоры присутствуют. Следовательно, главным регуляторным фактором в данном случае становится уровень фотосинтетической активности. Эти результаты подтверждают гипотезу о ключевой роли световой регуляции процессов энергообеспечения и электронного транспорта в индукции выделения водорода у фотоавтотрофных микроводорослей.

Проведенное сравнение особенностей индукции фотобиологического выделения водорода при недостатке серы или азота при разных режимах освещенности показало, что единого универсального протокола светового воздействия не существует. В условиях недостатка серы достаточно поддерживать постоянную интенсивность света. В условиях недостатка азота и углерода требуется целенаправленное снижение интенсивности света для реализации необходимых изменений в состоянии ФС2 и создания условий для запуска выделения водорода. Критически важным общим механизмом, определяющим возможность осуществления этого процесса, является перевосстановление пула пластохинонов на фоне подавления фотосинтетической активности, тогда как роль других механизмов оказывается второстепенной.

Новизна полученных результатов заключается в экспериментальном подтверждении возможности фотобиологического выделения водорода у фотоавтотрофных культур *C. reinhardtii* не только при серном, но и при азотном и углеродном голодании, а также в установлении регуляторной роли светового

режима и активности ФС2. Усовершенствованная методология анализа культуры в реальном времени позволила детально охарактеризовать ключевые физиолого-биохимические изменения в условиях стресса и выявить динамику основных показателей клеточного состояния, служащих молекулярными маркерами начала выделения водорода.

Практическая значимость работы определяется возможностью дальнейшей оптимизации условий культивирования микроводорослей для увеличения фотобиологического выделения водорода, а также внедрения разработанных подходов к мониторингу физиологического состояния культур в масштабах лабораторной и промышленной биотехнологии. Полученные данные могут быть использованы для создания инновационных решений в области устойчивой энергетики и замещения ископаемых ресурсов.

В целом, поставленные в диссертационной работе задачи были успешно решены. Определены и экспериментально обоснованы основные механизмы и условия, необходимые для фотобиологического выделения водорода у *C. reinhardtii* в условиях серного, азотного и углеродного голодания. Установлена решающая роль контроля светового режима и состояния ФС2 в запуске этого процесса, что существенно расширяет горизонты исследований и применения микроводорослей для получения возобновляемой энергии на базе биотехнологий будущего.

Выводы

1) Впервые показано, что фотоавтотрофные культуры *C. reinhardtii* в условиях минерального стресса способны к образованию водорода как вторичного метаболита не только при недостатке серы или углерода, но и при недостатке азота.

2) Установлено, что функциональное состояние ФС2 у *C. reinhardtii* существенно зависит от условий минерального питания и светового режима, что было выявлено с использованием системы сопряжения фотобиореактора с ПАМ-флуориметром, обеспечивающей непрерывный контроль параметров флуоресценции хлорофилла.

3) Показано, что все исследованные варианты минерального стресса, приводящие к выделению водорода, включая углеродный, приводят к существенному снижению активности ФС2 как элементу общей стресс-адаптивной реакции фотосинтетического аппарата.

4) Впервые проведён комплексный анализ механизмов регуляции ФС2 при недостатке элементов минерального питания, включая изменение соотношения антенны и реакционных центров фотосинтеза, перевосстановление пула ПХ, разобщение ФС2, функционирование виолаксантинового цикла и формирование анаэробного состояния.

5) Установлено что ключевым механизмом, определяющим возможность выделения водорода у *C. reinhardtii* при недостатке серы или азота является перевосстановление пула ПХ, возникающее при определённых световых условиях на фоне подавления фотосинтетической активности; другие исследованные механизмы выполняют вторичную регуляторную функцию.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Adamska-Venkatesh, A., S. Roy, J. F. Siebel, T. R. Simmons, M. Fontecave, V. Artero, E. Reijerse and W. Lubitz (2015). "Spectroscopic characterization of the bridging amine in the active site of [FeFe] hydrogenase using isotopologues of the H-cluster." Journal of the American Chemical Society **137**(40): 12744-12747.
2. Allakhverdiev, S. I. and N. Murata (2004). "Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage–repair cycle of photosystem II in Synechocystis sp. PCC 6803." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics **1657**(1): 23-32.
3. Allorent, G., L. Lefebvre-Legendre, R. Chappuis, M. Kuntz, T. B. Truong, K. K. Niyogi, R. Ulm and M. Goldschmidt-Clermont (2016). "UV-B photoreceptor-mediated protection of the photosynthetic machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*." Proceedings of the National Academy of Sciences **113**(51): 14864-14869.
4. Antal, T., A. Kolacheva, A. Maslakov, G. Y. Riznichenko, T. Krendeleva and A. Rubin (2013). "Study of the effect of reducing conditions on the initial chlorophyll fluorescence rise in the green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*." Photosynthesis research **114**(3): 143-154.
5. Antal, T., T. Krendeleva, T. Laurinavichene, V. Makarova, A. Tsygankov, M. Seibert and A. Rubin (2001). The relationship between the photosystem 2 activity and hydrogen production in sulfur deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. Doklady Biochemistry and Biophysics, Moscow, Russia: International Academic Pub. Co." Nauka/Interperiodica", c2001-.
6. Antal, T. K., T. E. Krendeleva, T. V. Laurinavichene, V. V. Makarova, M. L. Ghirardi, A. B. Rubin, A. A. Tsygankov and M. Seibert (2003). "The dependence of algal H2 production on Photosystem II and O2 consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells." Biochim Biophys Acta **1607**(2-3): 153-160.
7. Antal, T. K., T. E. Krendeleva and A. B. Rubin (2007). "- Study of photosystem 2 heterogeneity in the sulfur-deficient green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." **- 94**(-1): - 22.

8. Antal, T. K., T. E. Krendeleva and A. B. Rubin (2011). "Acclimation of green algae to sulfur deficiency: underlying mechanisms and application for hydrogen production." Applied microbiology and biotechnology **89**: 3-15.
9. Antal, T. K., A. A. Volgusheva, G. P. Kukarskih, A. A. Bulychev, T. E. Krendeleva and A. B. Rubin (2006). "Effects of sulfur limitation on photosystem II functioning in *Chlamydomonas reinhardtii* as probed by chlorophyll a fluorescence." Physiologia Plantarum **128**(2): 360-367.
10. Appel, J. and R. Schulz (1998). "Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis: hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poising?" Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **47**(1): 1-11.
11. Ballottari, M., T. B. Truong, E. De Re, E. Erickson, G. R. Stella, G. R. Fleming, R. Bassi and K. K. Niyogi (2016). "Identification of pH-sensing sites in the light harvesting complex stress-related 3 protein essential for triggering non-photochemical quenching in *Chlamydomonas reinhardtii*." Journal of Biological Chemistry **291**(14): 7334-7346.
12. Batyrova, K., A. Gavrisheva, E. Ivanova, J. Liu and A. Tsygankov (2015). "Sustainable hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived marine green microalgae Chlorella sp." International journal of molecular sciences **16**(2): 2705-2716.
13. Batyrova, K. A., A. A. Tsygankov and S. N. Kosourov (2012). "Sustained hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures." international journal of hydrogen energy **37**(10): 8834-8839.
14. Bayro-Kaiser, V. and N. Nelson (2017). "Microalgal hydrogen production: prospects of an essential technology for a clean and sustainable energy economy." Photosynthesis Research **133**(1): 49-62.
15. Betz, J. N., N. W. Boswell, C. J. Fugate, G. L. Holliday, E. Akiva, A. G. Scott, P. C. Babbitt, J. W. Peters, E. M. Shepard and J. B. Broderick (2015). "[FeFe]-hydrogenase maturation: insights into the role HydE plays in dithiomethylamine biosynthesis." Biochemistry **54**(9): 1807-1818.

16. Boichenko, V., V. Arkhipov and F. Litvin (1983). "Simultaneous measurements of fluorescence induction and hydrogen evolution of chlorella under anaerobic conditions." Biophysics (Russ) **28**: 976-979.
17. Boichenko, V., L. Y. Satina and F. Litvin (1989). "Efficiency of hydrogen photoproduction by algae and cyanobacteria." SOVIET PLANT PHYSIOLOGY **36**(2): 188-195.
18. Boichenko, V. A., E. Greenbaum and M. Seibert (2004). "Hydrogen production by photosynthetic microorganisms." Photoconversion of solar energy, molecular to global photosynthesis **2**: 397-452.
19. Bonente, G., M. Ballottari, T. B. Truong, T. Morosinotto, T. K. Ahn, G. R. Fleming, K. K. Niyogi and R. Bassi (2011). "Analysis of LhcSR3, a protein essential for feedback de-excitation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." PLoS biology **9**(1): e1000577.
20. Bortolus, M., P. Costantini, D. Doni and D. Carbonera (2018). "Overview of the maturation machinery of the H-cluster of [FeFe]-hydrogenases with a focus on HydF." International Journal of Molecular Sciences **19**(10): 3118.
21. Boyer, M. E., J. A. Stapleton, J. M. Kuchenreuther, C. w. Wang and J. R. Swartz (2008). "Cell-free synthesis and maturation of [FeFe] hydrogenases." Biotechnology and bioengineering **99**(1): 59-67.
22. Camargo, F. V., F. Perozeni, G. d. l. C. Valbuena, L. Zuliani, S. Sardar, G. Cerullo, C. D'Andrea and M. Ballottari (2021). "The role of acidic residues in the C terminal tail of the LHCSR3 protein of *Chlamydomonas reinhardtii* in non-photochemical quenching." The Journal of Physical Chemistry Letters **12**(29): 6895-6900.
23. Chen, C.-Y., K.-L. Yeh, R. Aisyah, D.-J. Lee and J.-S. Chang (2011). "Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review." Bioresource technology **102**(1): 71-81.
24. Chen, J., Y. Chen, W. He, H. Liang, T. Hong, T. Li and H. Du (2024). "Transcriptome analysis reveals the molecular mechanism of differences in growth between photoautotrophy and heterotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii*." Frontiers in Plant Science **15**: 1407915.

25. Christophe, O., S. Laure, G. Charles, S. Philippe, M.-S. Isabelle, B. Carole, F. Vincent, B. Hervé and L. g. Christophe (2015). "Electrochemical Measurements of the Kinetics of Inhibition of Two FeFe Hydrogenases by O2 Demonstrate That the Reaction Is Partly Reversible."
26. Elman, T., S. Isaac and I. Yacoby (2025). "Photobiological Hydrogen Production at Scale: Integrating Bioprocess Optimization and Techno-Economic Modeling." bioRxiv: 2025.2004. 2027.650233.
27. Eroglu, E. and A. Melis (2011). "Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art." Bioresource Technology **102**(18): 8403-8413.
28. Eroglu, E. and A. Melis (2016). "Microalgal hydrogen production research." International Journal of Hydrogen Energy **41**(30): 12772-12798.
29. Finazzi, G., F. Rappaport, A. Furia, M. Fleischmann, J.-D. Rochaix, F. Zito and G. Forti (2002). "Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*." EMBO reports **3**(3): 280-285.
30. Forestier, M., P. King, L. Zhang, M. Posewitz, S. Schwarzer, T. Happe, M. L. Ghirardi and M. Seibert (2003). "Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions." European Journal of Biochemistry **270**(13): 2750-2758.
31. Gaffron, H. and J. Rubin (1942). "Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae." The Journal of General Physiology **26**(2): 219-240.
32. Gfeller, R. P. and M. Gibbs (1984). "Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*: I. Analysis of fermentative products from starch in dark and light." Plant Physiology **75**(1): 212-218.
33. Ghirardi, M. L. (2006). "Hydrogen production by photosynthetic green algae." Indian journal of biochemistry & biophysics **43**(4): 201-210.
34. Ghirardi, M. L., R. K. Togasaki and M. Seibert (1997). "Oxygen sensitivity of algal H 2-production." Applied biochemistry and biotechnology **63**: 141-151.
35. Ghysels, B., D. Godaux, R. F. Matagne, P. Cardol and F. Franck (2013). "Function of the chloroplast hydrogenase in the microalga Chlamydomonas: the role of hydrogenase and state transitions during photosynthetic activation in anaerobiosis." PloS one **8**(5): e64161.

36. Girbal, L., G. von Abendroth, M. Winkler, P. M. Benton, I. Meynial-Salles, C. Croux, J. W. Peters, T. Happe and P. Soucaille (2005). "Homologous and heterologous overexpression in Clostridium acetobutylicum and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities." Applied and environmental microbiology **71**(5): 2777-2781.
37. Goldschmidt-Clermont, M. and R. Bassi (2015). "Sharing light between two photosystems: mechanism of state transitions." Current opinion in plant biology **25**: 71-78.
38. Goltsev, V., H. Kalaji, M. Paunov, W. Bąba, T. Horaczek, J. Mojski, H. Kociel and S. Allakhverdiev (2016). "Variable chlorophyll fluorescence and its use for assessing physiological condition of plant photosynthetic apparatus." Russian journal of plant physiology **63**: 869-893.
39. Gorman, D. S. and R. Levine (1965). "Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardi*." Proceedings of the National Academy of Sciences **54**(6): 1665-1669.
40. Goss, R. and T. Jakob (2010). "Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae." Photosynthesis research **106**: 103-122.
41. Grechanik, V., I. Naidov, M. Bolshakov and A. Tsygankov (2021). "Photoautotrophic hydrogen production by nitrogen-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures." International Journal of Hydrogen Energy **46**(5): 3565-3575.
42. Grechanik, V., A. Romanova, I. Naydov and A. Tsygankov (2020). "Photoautotrophic cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*: sulfur deficiency, anoxia, and hydrogen production." Photosynth Res **143**(3): 275-286.
43. Grechanik, V. and A. Tsygankov (2022). "The relationship between photosystem II regulation and light-dependent hydrogen production by microalgae." Biophysical Reviews **14**(4): 893-904.
44. Grechanik, V. I., M. A. Bol'shakov and A. A. Tsygankov (2022). "Hydrogen production by CO2 deprived photoautotrophic *Chlamydomonas reinhardtii* cultures." Biochemistry (Moscow) **87**(10): 1098-1108.
45. Grechanik, V. I., M. A. Bol'shakov and A. A. Tsygankov (2025). "Relationship between the Photosystem II Regulation Mechanisms and Hydrogen Production in

Chlamydomonas reinhardtii under Nitrogen or Sulfur Deprivation." Biochemistry (Moscow) **90**(7): 921-933.

46. Greenbaum, E. (1980). "SIMULTANEOUS PHOTOPRODUCTION OF HYDROGEN AND OXYGEN BY PHOTOSYNTHESIS." Biotechnology and Bioengineering **22**: 1-13.
47. Happe, T. and J. D. Naber (1993). "Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." European journal of biochemistry **214**(2): 475-481.
48. Harris, E. H. (1989). Chlamydomonas sourcebook, Academic Press San Diego.
49. Harris, E. H. (2001). "Chlamydomonas as a model organism." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **52**: 363-406.
50. Harris, E. H., D. B. Stern and G. Witman (2009). The chlamydomonas sourcebook, Elsevier San Diego, CA.
51. He, M., L. Li, L. Zhang and J. Liu (2012). "The enhancement of hydrogen photoproduction in Chlorella protothecoides exposed to nitrogen limitation and sulfur deprivation." international journal of hydrogen energy **37**(22): 16903-16915.
52. Hemschemeier, A. and T. Happe (2011). "Alternative photosynthetic electron transport pathways during anaerobiosis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics **1807**(8): 919-926.
53. Hwang, J.-H., H.-C. Kim, J.-A. Choi, R. Abou-Shanab, B. A. Dempsey, J. M. Regan, J. R. Kim, H. Song, I.-H. Nam and S.-N. Kim (2014). "Photoautotrophic hydrogen production by eukaryotic microalgae under aerobic conditions." Nature communications **5**(1): 3234.
54. Kalaji, H. M., A. Jajoo, A. Oukarroum, M. Brestic, M. Zivcak, I. A. Samborska, M. D. Cetner, I. Łukasik, V. Goltsev and R. J. Ladle (2016). "Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions." Acta physiologiae plantarum **38**: 1-11.
55. KIM, J.-P., C.-D. KANG, S.-J. SIM, M.-S. KIM, T.-H. PARK, D.-H. LEE, D.-J. KIM, J.-H. KIM, Y.-K. LEE and D.-W. PAK (2005). "Cell age optimization for hydrogen production induced by sulfur deprivation using a green alga *Chlamydomonas reinhardtii* UTEX 90." Journal of microbiology and biotechnology **15**(1): 131-135.

56. Kim, J. P., C. D. Kang, T. H. Park, M. S. Kim and S. J. Sim (2006). "Enhanced hydrogen production by controlling light intensity in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* culture." International Journal of Hydrogen Energy **31**(11): 1585-1590.
57. King, P. W., M. C. Posewitz, M. L. Ghirardi and M. Seibert (2006). "Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an Escherichia coli biosynthetic system." Journal of bacteriology **188**(6): 2163-2172.
58. Kosourov, S., M. Jokel, E.-M. Aro and Y. Allahverdiyeva (2018). "A new approach for sustained and efficient H 2 photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*." Energy & Environmental Science **11**(6): 1431-1436.
59. Kosourov, S., E. Patrusheva, M. L. Ghirardi, M. Seibert and A. Tsygankov (2007). "A comparison of hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions." Journal of Biotechnology **128**(4): 776-787.
60. Kosourov, S., A. Tsygankov, M. Seibert and M. Ghirardi (2002). **- 78**: - 40.
61. Kosourov, S., A. Tsygankov, M. Seibert and M. L. Ghirardi (2002). "Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of culture parameters." Biotechnology and bioengineering **78**(7): 731-740.
62. Kovács, L., A. Vidal-Meireles, V. Nagy and S. Z. Tóth (2016). "Quantitative determination of ascorbate from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by HPLC." Bio-protocol **6**(24): e2067-e2067.
63. Kuchenreuther, J. M., C. S. Grady-Smith, A. S. Bingham, S. J. George, S. P. Cramer and J. R. Swartz (2010). "High-yield expression of heterologous [FeFe] hydrogenases in Escherichia coli." PloS one **5**(11): e15491.
64. Laurinavichene, T., I. Tolstygina and A. Tsygankov (2004). "The effect of light intensity on hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*." Journal of biotechnology **114**(1-2): 143-151.
65. Laurinavichene, T. V., A. S. Fedorov, M. L. Ghirardi, M. Seibert and A. A. Tsygankov (2006). "Demonstration of sustained hydrogen photoproduction by immobilized, sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells." International Journal of Hydrogen Energy **31**(5): 659-667.

66. Laurinavichene, T. V., I. V. Tolstygina, R. R. Galiulina, M. L. Ghirardi, M. Seibert and A. A. Tsygankov (2002). "Dilution methods to deprive *Chlamydomonas reinhardtii* cultures of sulfur for subsequent hydrogen photoproduction." International journal of hydrogen energy **27**(11-12): 1245-1249.
67. Lemeille, S., M. V. Turkina, A. V. Vener and J.-D. Rochaix (2010). "Stt7-dependent phosphorylation during state transitions in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Molecular & Cellular Proteomics **9**(6): 1281-1295.
68. Liu, P., D.-M. Ye, M. Chen, J. Zhang, X.-H. Huang, L.-L. Shen, K.-K. Xia, X.-J. Xu, Y.-C. Xu and Y.-L. Guo (2022). "Scaling-up and proteomic analysis reveals photosynthetic and metabolic insights toward prolonged H2 photoproduction in Chlamydomonas hpm91 mutant lacking proton gradient regulation 5 (PGR5)." Photosynthesis Research **154**(3): 397-411.
69. Melis, A., L. P. Zhang, M. Forestier, M. L. Ghirardi and M. Seibert (2000). "Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant Physiology **122**(1): 127-135.
70. Meuser, J. E., G. Ananyev, L. E. Wittig, S. Kosourov, M. L. Ghirardi, M. Seibert, G. C. Dismukes and M. C. Posewitz (2009). "Phenotypic diversity of hydrogen production in chlorophycean algae reflects distinct anaerobic metabolisms." Journal of Biotechnology **142**(1): 21-30.
71. Meuser, J. E., S. D'Adamo, R. E. Jinkerson, F. Mus, W. Yang, M. L. Ghirardi, M. Seibert, A. R. Grossman and M. C. Posewitz (2012). "Genetic disruption of both *Chlamydomonas reinhardtii* [FeFe]-hydrogenases: insight into the role of HYDA2 in H2 production." Biochemical and biophysical research communications **417**(2): 704-709.
72. Miller, R., G. Wu, R. R. Deshpande, A. Vieler, K. Gärtner, X. Li, E. R. Moellering, S. Zäuner, A. J. Cornish and B. Liu (2010). "Changes in transcript abundance in *Chlamydomonas reinhardtii* following nitrogen deprivation predict diversion of metabolism." Plant physiology **154**(4): 1737-1752.
73. Miura, K., T. Yamano, S. Yoshioka, T. Kohinata, Y. Inoue, F. Taniguchi, E. Asamizu, Y. Nakamura, S. Tabata and K. T. Yamato (2004). "Expression profiling-based

identification of CO2-responsive genes regulated by CCM1 controlling a carbon-concentrating mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant physiology **135**(3): 1595-1607.

74. Moskalenko, A., O. Toropygina and Z. Makhneva (1997). Behavior of carotenoids in Rhodospirillum rubrum cells under cultivation with diphenylamine. Dokl Akad Nauk.
75. Nagy, V., A. Podmaniczki, A. Vidal-Meireles, R. Tengölics, L. Kovács, G. Rákhely, A. Scoma and S. Z. Tóth (2018). "Water-splitting-based, sustainable and efficient H2 production in green algae as achieved by substrate limitation of the Calvin–Benson–Bassham cycle." Biotechnology for biofuels **11**(1): 1-16.
76. Nagy, V., A. Vidal-Meireles, R. Tengölics, G. Rákhely, G. Garab, L. Kovács and S. Z. Tóth (2016). "Ascorbate accumulation during sulphur deprivation and its effects on photosystem II activity and H2 production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant, Cell & Environment **39**(7): 1460-1472.
77. Nakada, T., H. Shinkawa, T. Ito and M. Tomita (2010). "Recharacterization of *Chlamydomonas reinhardtii* and its relatives with new isolates from Japan." Journal of Plant Research **123**: 67-78.
78. Nicolet, Y. and J. C. Fontecilla-Camps (2012). "Structure-function relationships in [FeFe]-hydrogenase active site maturation." Journal of Biological Chemistry **287**(17): 13532-13540.
79. Nicolet, Y., J. C. Fontecilla-Camps and M. Fontecave (2010). "Maturation of [FeFe]-hydrogenases: Structures and mechanisms." International journal of Hydrogen energy **35**(19): 10750-10760.
80. Nishiyama, Y. and N. Murata (2014). "Revised scheme for the mechanism of photoinhibition and its application to enhance the abiotic stress tolerance of the photosynthetic machinery." Applied microbiology and biotechnology **98**: 8777-8796.
81. Peers, G., T. B. Truong, E. Ostendorf, A. Busch, D. Elrad, A. R. Grossman, M. Hippler and K. K. Niyogi (2009). "An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis." Nature **462**(7272): 518-521.
82. Petroutsos, D., R. Tokutsu, S. Maruyama, S. Flori, A. Greiner, L. Magneschi, L. Cusant, T. Kottke, M. Mittag and P. Hegemann (2016). "A blue-light photoreceptor mediates the feedback regulation of photosynthesis." Nature **537**(7621): 563-566.

83. Philipps, G., T. Happe and A. Hemschemeier (2012). "Nitrogen deprivation results in photosynthetic hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*." Planta **235**(4): 729-745.
84. Pilet, E., Y. Nicolet, C. Mathevon, T. Douki, J. C. Fontecilla-Camps and M. Fontecave (2009). "The role of the maturase HydG in [FeFe]-hydrogenase active site synthesis and assembly." FEBS letters **583**(3): 506-511.
85. Pivato, M., A. Costa, G. Wheeler and M. Ballottari (2025). "Abiotic Stress-Induced Chloroplast and Cytosolic Ca2+ Dynamics in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant, Cell & Environment.
86. Pongpadung, P., J. Liu, K. Yokthongwattana, S. Techapinyawat and N. Juntawong (2015). "Screening for hydrogen-producing strains of green microalgae in phosphorus or sulphur deprived medium under nitrogen limitation." Sci Asia **41**: 97-107.
87. Posewitz, M., P. King, S. Smolinski, R. D. Smith, A. Ginley, M. Ghirardi and M. Seibert (2005). Identification of genes required for hydrogenase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*, Portland Press Ltd.
88. Pow, T. and A. I. Krasna (1979). "Photoproduction of hydrogen from water in hydrogenase-containing algae." Archives of Biochemistry and Biophysics **194**(2): 413-421.
89. Pröschold, T., E. H. Harris and A. W. Coleman (2005). "Portrait of a species: *Chlamydomonas reinhardtii*." Genetics **170**(4): 1601-1610.
90. Ruiz-Marin, A., Y. Canedo-López and P. Chávez-Fuentes (2020). "Biohydrogen production by Chlorella vulgaris and Scenedesmus obliquus immobilized cultivated in artificial wastewater under different light quality." Amb Express **10**(1): 191.
91. Sasso, S., H. Stibor, M. Mittag and A. R. Grossman (2018). "From molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature." elife **7**: e39233.
92. Sathe, S., M. V. Orellana, N. S. Baliga and P. M. Durand (2019). "Temporal and metabolic overlap between lipid accumulation and programmed cell death due to nitrogen starvation in the unicellular chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii*." Phycological Research **67**(3): 173-183.

93. Sawyer, A. and M. Winkler (2017). "Evolution of *Chlamydomonas reinhardtii* ferredoxins and their interactions with [FeFe]-hydrogenases." Photosynthesis research **134**: 307-316.
94. Schilter, D. and T. B. Rauchfuss (2013). "And the Winner is… Azadithiolate: An Amine Proton Relay in the [FeFe] Hydrogenases." Angewandte Chemie International Edition **52**(51): 13518-13520.
95. Schreiber, U. and C. Neubauer (1987). "The polyphasic rise of chlorophyll fluorescence upon onset of strong continuous illumination: II. Partial control by the photosystem II donor side and possible ways of interpretation." Zeitschrift für Naturforschung C **42**(11-12): 1255-1264.
96. Scoma, A., L. Giannelli, C. Faraloni and G. Torzillo (2012). "Outdoor H2 production in a 50-L tubular photobioreactor by means of a sulfur-deprived culture of the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*." Journal of Biotechnology **157**(4): 620-627.
97. Serebryakova, L., N. Novichkova and I. Gogotov (2002). "Facultative H2-dependent anoxygenic photosynthesis in the unicellular cyanobacterium Gloeocapsa alpicola CALU 743." International Journal of Photoenergy **4**(4): 169-173.
98. Shastik, E., L. Li and J. Liu (2019). "New methods for hydrogen production by marine microalga Chlorella pyrenoidosa in natural seawater." International Journal of Hydrogen Energy **44**(29): 14707-14714.
99. Shastik, E., L. Li, L. Zhang, R. Qin, W. Yu and J. Liu (2020). "Some molecular aspects of hydrogen production by marine Chlorella pyrenoidosa under nitrogen deprivation condition in natural seawater." International Journal of Hydrogen Energy **45**(27): 13876-13883.
100. Skjånes, K., U. Andersen, T. Heidorn and S. A. Borgvang (2016). "Design and construction of a photobioreactor for hydrogen production, including status in the field." Journal of applied phycology **28**(4): 2205-2223.
101. Skjånes, K., C. Rebours and P. Lindblad (2013). "Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process." Critical reviews in biotechnology **33**(2): 172-215.
102. Stapleton, J. A. and J. R. Swartz (2010). "A cell-free microtiter plate screen for improved [FeFe] hydrogenases." PloS one **5**(5): e10554.

103. Stripp, S. T. and T. Happe (2009). "How algae produce hydrogen—news from the photosynthetic hydrogenase." Dalton transactions(45): 9960-9969.

104. Sueoka, N., K. Chiang and J. Kates (1967). "Deoxyribonucleic acid replication in meiosis of Chlamydomonas reinhardi: I. Isotopic transfer experiments with a strain producing eight zoospores." Journal of molecular biology **25**(1): 47-66.

105. Sybirna, K., T. Antoine, P. Lindberg, V. Fourmond, M. Rousset, V. Méjean and H. Bottin (2008). "Shewanella oneidensis: a new and efficient system for expression and maturation of heterologous [Fe-Fe] hydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*." BMC biotechnology **8**: 1-8.

106. Thanigaivel, S., S. Vinayagam, L. Gnanasekaran, R. Suresh, M. Soto-Moscoso and W.-H. Chen (2024). "Environmental fate of aquatic pollutants and their mitigation by phycoremediation for the clean and sustainable environment: A review." Environmental Research **240**: 117460.

107. Tóth, S. Z., G. Schansker and R. J. Strasser (2007). "A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient." Photosynthesis research **93**(1): 193-203.

108. Touloupakis, E., C. Faraloni, A. M. S. Benavides, J. Masojídek and G. Torzillo (2021). "Sustained photobiological hydrogen production by Chlorella vulgaris without nutrient starvation." international journal of hydrogen energy **46**(5): 3684-3694.

109. Touloupakis, E., C. Faraloni, A. M. Silva Benavides and G. Torzillo (2021). "Recent achievements in microalgal photobiological hydrogen production." Energies **14**(21): 7170.

110. Tsygankov, A. and A. Abdullatypov (2015). "Hydrogen metabolism in microalgae." Photosynthesis: new approaches to the molecular, cellular, and organismal levels: 133-161.

111. Tsygankov, A. and A. Abdullatypov (2015). "Hydrogen metabolism in microalgae." Photosynthesis: New Approaches to the Molecular, Cellular, and Organismal Levels, Wiley-Scrivener, Beverly: 133-162.

112. Tsygankov, A., S. Kosourov, M. Seibert and M. L. Ghirardi (2002). "Hydrogen photoproduction under continuous illumination by sulfur-deprived, synchronous

Chlamydomonas reinhardtii cultures." International Journal of Hydrogen Energy **27**(11-12): 1239-1244.

113. Tsygankov, A. A. (2012). "Hydrogen production: Light-driven processes–Green algae." Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production: 29-51.

114. Tsygankov, A. A., S. N. Kosourov, I. V. Tolstygina, M. L. Ghirardi and M. Seibert (2006). "Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions." International Journal of Hydrogen Energy **31**(11): 1574-1584.

115. Tsygankov, A. A., T. V. Laurinavichene and I. N. Gogotov (1994). "Laboratory scale photobioreactor." Biotechnology techniques **8**: 575-578.

116. Tyystjärvi, E. and E. Aro (1996). "The rate constant of photoinhibition, measured in lincomycin-treated leaves, is directly proportional to light intensity." Proceedings of the National Academy of Sciences **93**(5): 2213-2218.

117. Urbig, T., R. Schulz and H. Senger (1993). "Inactivation and reactivation of the hydrogenases of the green algae Scenedesmus obliquus and *Chlamydomonas reinhardtii*." Zeitschrift für Naturforschung C **48**(1-2): 41-45.

118. Vasilieva, S., E. Petrova, E. Lobakova, A. Solovchenko, T. Antal and O. Gorelova (2024). "Effect of Hydrogenase Deficiency on Accumulation of Phosphorus-Rich Inclusions in *Chlamydomonas reinhardtii*." Russian Journal of Plant Physiology **71**(1): 48.

119. Vener, A. V., P. J. Van Kan, P. R. Rich, I. Ohad and B. Andersson (1997). "Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome bf mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(4): 1585-1590.

120. Vignais, P. M. and B. Billoud (2007). "Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview." Chemical reviews **107**(10): 4206-4272.

121. Volgusheva, A., G. Kukarskikh, T. Krendeleva, A. Rubin and F. Mamedov (2015). "Hydrogen photoproduction in green algae *Chlamydomonas reinhardtii* under magnesium deprivation." Rsc Advances **5**(8): 5633-5637.

122. Volgusheva, A., V. Zagidullin, T. Antal, B. Korvatovsky, T. Krendeleva, V. Paschenko and A. Rubin (2007). "Examination of chlorophyll fluorescence decay kinetics in sulfur deprived algae *Chlamydomonas reinhardtii*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics **1767**(6): 559-564.

123. Wang, K., K. S. Khoo, K. W. Chew, A. Selvarajoo, W.-H. Chen, J.-S. Chang and P. L. Show (2021). "Microalgae: the future supply house of biohydrogen and biogas." Frontiers in Energy Research **9**: 158.

124. Winkler, M., A. Hemschemeier, C. Gotor, A. Melis and T. Happe (2002). "Fe -hydrogenases in green algae: photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation." International Journal of Hydrogen Energy **27**(11-12): 1431-1439.

125. Wittkamp, F., M. Senger, S. Stripp and U.-P. Apfel (2018). "[FeFe]-Hydrogenases: recent developments and future perspectives." Chemical Communications **54**(47): 5934-5942.

126. Wykoff, D. D., J. P. Davies, A. Melis and A. R. Grossman (1998). "The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*." Plant Physiology **117**(1): 129-139.

127. Yacoby, I., L. T. Tegler, S. Pochekailov, S. Zhang and P. W. King (2012). "Optimized expression and purification for high-activity preparations of algal [FeFe]-hydrogenase." PLoS One **7**(4): e35886.

128. Yanyushin, M. (1983). "Hydrogenase activation and hydrogen photoevolution in a synchronous culture of Chlamydomonas reinhardii during anaerobic adaptation under light." Soviet plant physiology.

129. Zarei, Z., P. Malekshahi, M. H. Morowvat and A. P. Trzcinski (2024). "A review of bioreactor configurations for hydrogen production by cyanobacteria and microalgae." International Journal of Hydrogen Energy **49**: 472-495.

130. Zhang, L., T. Happe and A. Melis (2002). "Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H 2-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga)." Planta **214**: 552-561.

131. Zhang, L., M. He and J. Liu (2014). "The enhancement mechanism of hydrogen photoproduction in Chlorella protothecoides under nitrogen limitation and sulfur deprivation." International journal of hydrogen energy **39**(17): 8969-8976.

132. Zhang, L. P., T. Happe and A. Melis (2002). "Biochemical and morphological characterization of sulfur- deprived and H-2-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga)." Planta **214**(4): 552-561.

133. Zhang, Y., Z. Gu, Y. Ren, L. Wang, J. Zhang, C. Liang, S. Tong, Y. Wang, D. Xu and X. Zhang (2021). "Integrating transcriptomics and metabolomics to characterize metabolic regulation to elevated CO 2 in *Chlamydomonas reinhardtii*." Marine Biotechnology **23**: 255-275.

134. Zhao, N., F. Liu, W. Dong, J. Yu, L. J. Halverson and B. Xie (2024). "Quantitative proteomics insights into *Chlamydomonas reinhardtii* thermal tolerance enhancement by a mutualistic interaction with Sinorhizobium meliloti." Microbiology Spectrum **12**(8): e00219-00224.

135. Zhao, Y., H. Li, Y. Yao, Q. Wei, T. Hu, X. Li, B. Zhu and H. Ma (2025). "Combined analysis of proteomics and metabolism reveals critical roles of oxidoreductase activity in mushrooms stimulated by wolfberry and sea buckthorn substrates." Frontiers in Nutrition **12**: 1543240.

136. Антал, Т., Т. Кренделева, Т. Лауринавичене, В. Макарова, А. Цыганков, М. Сейберт and А. Рубин (2001). Связь активности фотосистемы 2 микроводорослей *Chlamydomonas reinhardtii* с выделением водорода при серном голодании. Доклады Академии наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение" Российская академия наук".

137. Гольцев, В., Х. Каладжи, М. Паунов, В. Баба, Т. Хорачек, Я. Мойски, Х. Коцел and С. Аллахвердиев (2016). "Использование переменной флуоресценции хлорофилла для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений." Физиология растений **63**(6): 881-907.

138. Петрова, Е. В., Г. П. Кукарских, Т. Е. Кренделева and Т. К. Антал (2020). "О механизмах и роли фотосинтетического образования водорода у зеленых микроводорослей." Микробиология **89**(3): 259-275.