

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т. Г. Волова
«__» _____ 2022 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Влияние хлорида натрия на рост бактерий *Cupriavidus necator* В-10646, синтез
полигидроксиалканоатов и жирнокислотный состав липидов

Руководитель	_____	<u>к.б.н., доцент</u>	<u>Н. О. Жила</u>
	Подпись, дата	Должность, ученая степень	Инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>М. С. Котова</u>
	Подпись, дата		Инициалы, фамилия

Красноярск 2023

РЕФЕРАТ

Дипломная работа по теме «Влияние хлорида натрия на рост бактерий *Cupriavidus necator* B-10646, синтез полигидроксиалканоатов и жирнокислотный состав липидов» содержит 41 страницу текстового документа, 56 использованных источников, 3 таблицы и 11 рисунков.

Ключевые слова: *CUPRIAVIDUS NECATOR*, ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ, ЛИПИДЫ, ПОЛИМЕР, ПОЛИ(3-ГИДРОКСИБУТИРАТ), ХЛОРИД НАТРИЯ.

Целью данной работы являлось исследование влияния на рост бактерий *Cupriavidus necator* B-10646, синтез полигидроксиалканоатов и жирнокислотный состав липидов в среде, содержащей хлорид натрия.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать рост бактерий *Cupriavidus necator* B-10646, накопление полимера и липидов при различных концентрациях хлорида натрия в среде.
2. Изучить изменения в жирнокислотном составе липидов цитоплазматической мембраны в ходе роста культуры *Cupriavidus necator* B-10646 при различных концентрациях хлорида натрия в среде.

Актуальность данной работы заключается в следующем:

В будущем использование вместо синтетических, полученных из нефтехимии, полигидроксиалканоатов может иметь важное промышленное значение, поскольку ПГА обладает рядом уникальных свойств. Например, полимеры имеют высокую прочность, устойчивость к теплу и химическим веществам, а также разлагаются в природе естественным путем, без вреда для нее. Исследование штаммов, которые способны производить ПГА, и условий культивирования является важным шагом в разработке новых материалов.

Основные выводы и результаты исследования:

1. Исследовано влияние концентрации NaCl при 0, 5, 10 г/л на рост бактерий *Cupriavidus necator* B-10646, синтез полимера, накопление липидов и жирнокислотный состав. Показано, что концентрация 5 г/л не влияет на рост бактерий, концентрация биомассы составляет 6,63 г/л. При добавлении NaCl содержание полимера на всех концентрациях было одинаковым, и концентрация хлорида натрия не влияла на содержание полимера. Добавление NaCl привело к увеличению средневесовой молекулярной массы (995кДа) и полидисперсности полимера (4,2).
2. При исследовании жирнокислотного состава показано, что в независимости от концентрации NaCl к концу культивирования происходило снижение моноеновых, увеличение насыщенных и циклопропановых кислот, особенно наиболее яркая картина отмечена при концентрации 10 г/л.

СОДЕРЖАНИЕ

_Тос138371125

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Раздел 1. Обзор литературы.....	8
1.1. Общее описание ПГА.....	8
1.2. Свойства ПГА	8
1.3. Биоразрушаемые ПГА.....	9
1.4. Классификация и структура ПГА	11
1.5. Микроорганизмы – продуценты ПГА	12
1.6. Галофильные микроорганизмы.....	13
1.7. Поли(3-гидроксibuтират).....	14
1.8. Синтез П(ЗГБ) галофильными микроорганизмами	15
1.9. Липиды бактерий.....	16
Раздел 2. Материалы и методы.....	17
2.1. Бактериальный штамм	17
2.2. Культивирование	18
2.3. Измерение и определение оптической плотности	18
2.4. Измерение и определение концентрации биомассы бактерий	19
2.5. Измерение концентрации углеродного субстрата	19
2.6. Экстракция полимера и внутриклеточных липидов.....	20
2.7. Статистическая обработка результатов	21
Раздел 3. Результаты.....	22
3.1. Накопление биомассы, полимера и липидов у бактерий <i>Cupriavidus necator B-10646</i> , выращиваемых на среде с добавлением NaCl.....	22
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	34
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	35
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	36

ВВЕДЕНИЕ

Полимеры стали неотъемлемой частью нашей жизни и являются самым распространенным материалом в мире из-за своих многообразных свойств, например прочность, легкость, гибкость, устойчивость к деградации и т.д. [1]. Так же пластмассы популярны вследствие своей дешевизны и простоты производства, удобства использования. Каждый год используется около 150 миллионов тонн пластика, и спрос продолжает расти из-за модернизации и роста населения. Такое нерациональное использование приводит к загрязнению окружающей среды, включая Мировой океан. Во всем мире перерабатывается только 14% пластмасс, остальные отходы размещаются на полигонах, где хранятся и разлагаются в течение многих десятилетий. Процесс разложения чрезвычайно медленный и затруднен из-за специфических свойств и состава пластмасс.

Полимеры, полученные из нефти, либо не поддаются разложению, либо деградация происходит очень медленно. Их безопасная утилизация становится все более сложной задачей. Биологически произведенные и легко разлагаемые полимеры часто рассматриваются в качестве практически осуществимых альтернатив; они в основном производятся из возобновляемых источников энергии, в отличие от полимеров на основе нефти [2-3].

Переход на новые биоразлагаемые материалы, которые разрушаются в среде до углекислого газа и воды и не наносят вреда биосфере является актуальным направлением в биотехнологии.

Существуют разнообразные виды полимеров, например, полилактиды, полигликолиды, полиэтиленгликоль, поликапролактон, полиуретаны и др. Однако на сегодняшний день самыми известными являются полигидроксиалканоаты (ПГА). Их относят к числу биоразлагаемых полимеров, полученных путем микробиологической ферментации [4-5]. ПГА относятся к классу полиэфиров, обладают биосовместимостью и

биоразлагаемостью, а также их можно получить из восстанавливаемых (возобновляемых) источников [6].

ПГА обладают сопоставимыми физическими характеристиками (включая молекулярную массу, кристалличность, температуру плавления и стеклования и т.д.) с синтетическими полимерами нефтехимического происхождения, такими как полипропилен [7]. Благодаря своим свойствам ПГА нашли ряд применений: от медицинских имплантатов, носителей для доставки лекарств, печати, фотоматериалов, синтеза некоторых антибиотиков, производства биотоплива и т.д. [8]. ПГА могут накапливаться в виде отдельных гранул различными микроорганизмами при избыточной концентрации углеродного субстрата и дефиците источника азота или фосфора.

Самыми подходящими продуцентами для биотехнологического синтеза биodeградируемых пластиков на данный момент являются водородокисляющие бактерии *Cupriavidus necator* (ранее *Hydrogenomonas eutrophus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha*) – это грамотрицательные факультативные аэробные бактерии, которые способны запасать полимер до 80-90% от сухого вещества. Самым явным плюсом данного штамма является их высокий органотрофный потенциал.

К сожалению, производство ПГА по-прежнему не сопоставимо с пластиками, полученными из нефти, так как себестоимость продукции в 5-10 раз выше [11]. Во-первых, источниками углерода являются глюкоза, фруктоза, сахароза, мальтоза и т.д. и именно на них расходуется большая часть средств, а именно 50%. Варьируя источники углеродного сырья, можно увеличить коммерческую привлекательность ПГА. А именно используя отходы различных производств, например рыбных.

Во-вторых, биотехнологический синтез ПГА требует большое количество пресной воды, данный факт еще больше усугубляет нехватку пресной воды.

В-третьих, подавляющее большинство биотехнологических процессов в процессе ферментации требует дополнительного внесения каких-либо компонентов, например углеродного субстрата. Эти манипуляции могут полечь

за собой микробную контаминацию. Так группа ученых под руководством Johnson et al. (2009) смогли культивировать галофильную бактериальную культуру на протяжении 3 лет, при условии внесения ацетата. Другая группа ученых под руководством Tan et al. (2011) [54] культивировали *Halomonas strain termed TD01* в течение двух недель в нестерильных условиях и с концентрацией соли 5-6 г/л, культура выросла до 80 г/л и более чем 80%-ным внутриклеточным содержанием П(ЗГБ).

В-четвертых, стерилизация ферментеров, дополнительного оборудования и сред (сами по себе дорогостоящие) – это дорогой процесс.

В-пятых, сама покупка ферментеров и дополнительного оборудования для него, например СИП-мойка тоже являются большими затратами для биотехнологического процесса.

В-шестых, если сравнивать скорости и эффективность непрерывного и периодического культивирования, можно сказать, что в результате непрерывного культивирования результаты намного лучше.

В-седьмых, чтобы лизировать клетку необходимо огромное количество растворителей, которые сами по себе довольно дорогие. Некоторые галофилы можно лизировать с помощью гипоосмотической шоковой обработки.

Поэтому чтобы биотехнологический синтез ПГА стал таким же конкурентоспособным, как и синтез пластика из нефтехимии необходимо разработать недорогую технологию культивирования.

Синтез ПГА галофильными штаммами бактерий может значительно снизить стоимость микробного пластика из-за отсутствия потребности пресной воды, снижения уровня стерильности, а также более экономичный расход углеродного субстрата. Кроме того, в 2014 году, группа ученых под руководством Passanha изучила влияние NaCl на выработку ПГА *Cupriavidus necator* [10]. Добавление 0,09 % NaCl в среду увеличивало выработку ПГА до 30 % [10].

Поэтому целью данной работы являлось исследование влияния на рост бактерий *Cupriavidus necator B-10646*, синтез полигидроксиалканоатов и жирнокислотный состав липидов в среде, содержащей хлорид натрия.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать рост бактерий *Cupriavidus necator B-10646*, накопление полимера и липидов при различных концентрациях хлорида натрия в среде.
2. Изучить изменения в жирнокислотном составе липидов цитоплазматической мембраны в ходе роста культуры *Cupriavidus necator B-10646* при различных концентрациях хлорида натрия в среде.

Раздел 1. Обзор литературы

1.1. Общее описание ПГА

Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются семейством нерастворимых в воде полимеров, синтезируемых внутриклеточно различными видами эубактерий и галоархей в условиях недостатка питательных веществ для пролиферации клеток [13]. ПГА считаются идеальным заменителем пластмасс, произведенных из нефти, благодаря их многомерным физическим свойствам, таким как биоразлагаемость, биосовместимость, нетоксичность и термопластичность [13-14]. Эти свойства ПГА также способствуют их применению в таких областях медицины и здравоохранения, как замена кости, искусственные кровеносные сосуды и материалы каркаса [14-15]. Из-за предела высокой коммерческой стоимости производство недорогих ПГА стало предметом текущих исследований с целью расширения их широкого применения.

В первый раз полигидроксиалканоаты были выявлены Бейеринком в 1889 г. Но лишь в 1925 году Лемонг нашел и охарактеризовал ПГА, синтезированные *Bacillus megaterium* [16]. На сегодняшний день существуют компании, которые уже занимаются микробиологическим производством ПГА: Biopol™, Nodax™, DegraPol/btc®, Mirel® [17].

1.2. Свойства ПГА

Физико-химические свойства ПГА напрямую связаны со строением мономеров, условий, которые созданы для роста культуры, вида бактерий, и количеством атомов углерода в мономере. Говоря о растворимости ПГА, следует сказать, что полимеры не растворяются в воде. Данное свойство помогает выдерживать гидролитическое воздействие. Следующее свойство - это способность тонуть в воде, что ускоряет биodeградацию в отсутствие

кислорода [23]. Следует отметить, что ПГА растворимы в химических растворителях, которые содержат атомы галогена. Такими растворителями являются: хлороформ, дихлорметан, дихлорэтан. Также, полигидроксиалканоаты биосовместимы, то есть не вызывают сильного иммунного ответа. Данное свойство ПГА значительно повлияло на использование ПГА в реконструктивной инженерии [24].

1.3. Биоразрушаемые ПГА

В настоящее время синтетические полимеры (пластмассы) используются практически во всех сферах нашей повседневной жизни, например сельское хозяйство, пищевая промышленность, автомобильная промышленность, медицина и т.д. Постоянное использование этих материалов уже привело к огромному накоплению пластиковых отходов на суше и в водоемах. Также еще одной из причин накопления синтетических полимеров является ненадлежащая утилизация пластмасс потребителями или промышленными предприятиями. Это происходит из-за недостаточной осведомленности последствий, неэффективной инфраструктуры сбора отходов и высокой химической стабильности пластмасс. Основная масса пластиковых отходов сжигается или закапывается в землю, нанося неисправимый урон окружающей среде. Поэтому на данный момент необходимо разработать новаторскую методику к полимерным материалам. Например, необходим подход к созданию полимеров, которые сохраняют важные для использования свойства, но только во время использования. Затем полимеры должны подвергаться воздействию факторов окружающей среды, изменяться физико-химически и биологически и легко включаться в метаболические процессы природных систем.

Биоразлагаемые полимеры относятся к группе соединений, полученных в результате метаболизма живых организмов. К таким продуктам относятся целлюлоза, белки, крахмал, нуклеиновые кислоты и природные смолы. Эти соединения могут разлагаться в соответствующих условиях, превращаясь в

вещества, нейтральные для окружающей среды. Биоразлагаемость полимеров напрямую зависит от химической природы вещества и состава входящих в них мономеров, микроорганизма, а также экологических условий [24,25,26]. Биоразлагаемые полимеры были предложены в качестве экологически чистой альтернативы, поскольку они подвержены гидролитическому или ферментативному расщеплению. Уже сейчас разработано и коммерчески производимо множество биоразлагаемых биополимеров.

Биодеградируемые пластмассы создают с помощью активных добавок, которые содержат функциональные группы, разлагающиеся под действием различных ферментов, например бактериальных. Сложность создания таких пластмасс заключается в том, что встраивание добавки должно происходить в цепь полимера во время синтеза или утилизации, а деградация должна происходить уже после употребления, но никак не во время переработки. Соответственно, возникает потребность в создании активаторов деградации, которые могут обеспечивать определенное «время жизни» изделий из пластмассы. Данный процесс тоже является довольно сложным и трудоемким из-за дороговизны и токсичности [9,10].

Биоразлагаемые полимеры – это образовавшиеся путем химического синтеза, природные или микробиологически синтезированные полимеры. Рассмотрим подробнее каждую категорию.

1. Химически синтезированные полимеры. Эта категория полимеров включает в себя полигликолевую кислоту, полилактид, поли(ϵ -капролактон) и т.д. Данные химические соединения склонны к ферментной или бактериальной атаке. Эти соединения не могут быть заменой обычным пластмассам т.к. не отвечают требованиям по необходимым свойствам [11].

2. Биоразрушаемые пластики с содержанием добавок. К данной категории относятся полимеры, которые содержат активные добавки, например крахмал, целлюлозу, хитозан и т.д. Самым распространенным из перечисленных добавок является крахмал. Процесс получения водорастворимого пластика из крахмала и пектина заключается в том, чтобы

внести в смесь пластификаторы, например глицерин или полиоксиэтиленгликоль. Отмечено, что включения крахмала влияют на хрупкость полученной пленки. Она увеличивается. Чтобы снизить стоимость полученного материала необходимо использовать неочищенный крахмал в смеси с тальком и поливиниловым спиртом. Неочищенный крахмал является промежуточным продуктом в производстве спирта. Пластики, которые содержат в составе неочищенный крахмал, очень экологичны и разлагаются при 30 °С в течение 2-3 месяцев [10].

3. ПГА - это единственные на 100% биоразрушаемые полимеры. Это сложные полиэфиры, которые могут быть синтезированы многими микроорганизмами в специфических условиях несбалансированного роста, когда в среде наблюдается дефицит азота, фосфора и других элементов, и избыток углерода. Они могут стать заменой синтетическим пластмассам, поскольку обладают похожими свойствами. ПГА деградируют до H_2O и CO_2 в аэробных условиях и до простейшего по своему составу углеводорода - метана в анаэробных условиях [11,12].

1.4. Классификация и структура ПГА

Полигидроксиалканоаты – полимеры гидроксипроизводных жирных кислот (биопластики), которые обладают спектром полезных свойств, включая биосовместимость и биоразрушаемость [15,16]. На сегодняшний день известно более 150 различных по структуре полимеров, которые синтезируются природными и генетическими модифицированными штаммами. ПГА состоят из мономеров гидроксикислот. Общая формула структуры полигидроксиалканоатов изображена на рисунке 1:

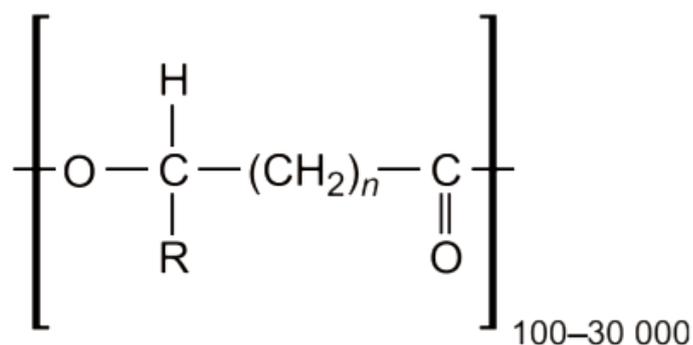


Рис. 1 – Общая формула структуры полигидроксиалканоатов [8].

Основные структуры:

$n = 1$ R = водород - поли (3-гидроксипропионат),

R = метил - поли (3-гидроксибутират),

R = этил - поли (3-гидроксивалерат),

R = пропил - поли (3-гидроксигексаноат),

R = пентил - поли (3-гидроксиоктаноат),

R = нонил - поли (3-гидроксидодеканоат),

$n = 2$ R = водород - поли (4-гидроксибутират),

$n = 3$ R = водород - поли (5-гидроксивалерат) [8].

Существует классификация по размеру C-цепи:

1. Short-chain-length, SCL. Состоят из кислот, у которых размер углеродной цепи варьируется от 3-х до 5-ти атомов. Данные ПГА являются природными термопластиками;

2. Medium-chain-length, MCL. Состоят из 6 - 14 атомов углерода. Данные ПГА являются природными эластомерами;

3. Long-chain-length, LCL. Состоят из 17 и 18 атомов углерода [18-22].

1.5. Микроорганизмы – продуценты ПГА

На данный момент список микроорганизмов, способных синтезировать ПГА быстро пополняется. На данный момент он включает в себя более 300 микроорганизмов. Несмотря на немалое число исследованных

микроорганизмов, в промышленности применяются бактерии родов *Methylophilus*, *Methylobacterium* и *Pseudomonas*, азотфиксаторы *Azotobacter*, представители рода *Cupriavidus* (ранее *Hydrogenomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Wautersia*,). Последний из перечисленных микроорганизмов способен запасать большое количество ПГА (до 90% от сухой биомассы) [27-31]. В таблице 1 отражены микроорганизмы и содержание ПГА.

Таблица 1 - Список отобранных микроорганизмов, продуцирующих ПГА.

Микроорганизм	ПГА, %	Источник
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48.6	[32]
<i>Azotobacter vinelandii</i> UWD	59-71	[33]
<i>Cupriavidus necator</i>	80	[34]
<i>Rec. E. coli</i> (<i>C. necator genes</i>)	80	[35]

При выборе микроорганизма учитываются такие показатели как внутриклеточное содержание ПГА, выход биомассы, расход углеродного субстрата и химический состав полимера.

1.6. Галофильные микроорганизмы

Галофилы представляют собой универсальную группу микроорганизмов, характеризующихся их потребностью в гиперсоленых средах, где преобладающим солевым компонентом является NaCl.

Адаптация к жизни в условиях высоких концентраций солей может осуществляться по-разному. Наиболее изученная стратегия заключается в

накоплении осмотических растворов, которые органически совместимы, а также без нужды особой адаптации белков внутри клетки к значительной концентрации соли [40,41,42]. Галофилы используют большое количество стратегий для приспособления или борьбы с сильной засоленностью окружающей среды. Наиболее известным примером является модификация пигментного рисунка у микроводорослей, которые, кроме освещенности, также зависят от содержания соли [43].

подавляющая часть авторов различает 3 вида галофильных бактерий:

1. Галотолерантные – способны выдерживать 0–15%-ное содержание соли;
2. Умеренные галофилы – выдерживают и требуют 1–15%-ное содержание соли;
3. Экстремальные галофилы – выдерживают и требуют 15–30%-ное содержание соли [44].

Микроорганизмы, относящиеся к последней из перечисленных групп, продемонстрировали высокую возможность для биотехнологического производства ПГА. Так, например, синтез ПГА штаммами *Halomonas boliviensis* [45] и *Haloferax mediterranei* [46,47,48] уже исследованы группами ученых. Также следует сказать, что бактерии рода *Bacillus* относятся к галотолерантным [49] и являются потенциальными кандидатами для биотехнологического производства ПГА. Штамм *Bacillus megaterium uyuni* S29 был получен из боливийских образцов соленой воды и грязи соленого озера Yuni. Его изучили на способность синтеза П(ЗГБ) в простых промышленных средах [50,51].

При культивировании бактерий в соленых средах проявляются как положительные, так и отрицательные стороны. К положительным можно отнести то, что соленость позволяет снижать меры предосторожности в отношении стерильности и, как следствие, обработки культуры [52,53].

1.7. Поли(3-гидроксибутират)

3-Гидроксибутират (3-ГБ) представляет собой органический мономер с гидроксильными и карбоксильными группами, который считается важным химическим предшественником или промежуточным продуктом для синтеза других мономеров, сополимеров и гомополимеров с хорошими характеристиками в химической промышленности [33,34]. Кроме того, 3-ГБ может широко использоваться в химической и фармацевтической промышленности благодаря своей уникальной хиральной структуре в качестве важного прекурсора для производства антибиотиков, витаминов и других родственных продуктов [35].

Поли(3-гидроксибутират) [П(3ГБ)] является гомополимером, который относится к классу сложных полиэфиров. П(3ГБ) является самым распространенным и изученным биополимером из семейства ПГА. По своей природе является высококристаллическим и относительно хрупким термопластом. Он не растворим в воде и довольно устойчив к гидролитическому разложению. [36,37]. По сравнению с полимерами на нефтяной основе ПГБ обладает биоразлагаемостью и уникальными физическими характеристиками, которые могут быть использованы в качестве эффективной замены традиционным пластикам [38]. В фармацевтической промышленности ПГБ стал передовым высокоэффективным медицинским материалом благодаря своим хорошим химическим свойствам и биосовместимости [36]. По оценкам, производство различных ПГА достигло 57000000 долларов США в 2019 году, а общий объем рынка ПГА, по прогнозам, достигнет 98000000 долларов США к 2024 году [39].

1.8. Синтез П(3ГБ) галофильными микроорганизмами

В литературе имеется довольно много информации о влиянии концентрации NaCl как на рост клеток, так и на продукцию П(3ГБ). Имеющиеся результаты исследований демонстрируют то, что микроорганизмы по-разному ведут себя в зависимости от количества соли, присутствующей в

среде. Salgaonkar изучили кинетику роста и полимер аккумулирующую способность штамма *Bacillus megaterium strain H16* при высоком содержании NaCl и без нее. Так при отсутствии NaCl в среде происходило накопление ПГА до 40% сухой биомассы клеток на 42 час. При внесении NaCl в среду (5%) культура показала более длительную lag-фазу и аккумулировала до 39% ПГА от сухой биомассы клеток. Увеличение длительности lag-фазы связано с тем, что клетки столкнулись со стрессовым фактором, а именно повышенная соленость именно поэтому произошло замедление роста и синтеза П(ЗГБ). [54]

Противоположные результаты получили Obruca.S et al. (2010). При культивировании *Cupriavidus necator H16* наблюдалось увеличение внутриклеточного содержания П(ЗГБ), скорость роста бактерий оставалась на уровне с контролем. Также группа ученых, которая занималась культивированием *Bacillus megaterium uyuni S29* в средах с различным содержанием NaCl показали, что в экспериментах с суммарной концентрацией NaCl в среде 45 г/л были лучшие результаты по скорости роста клеток и внутриклеточному содержанию полимера – 2,09 г/л и 41% соответственно. [55] При повышении концентрации NaCl в среде до 100 г/л происходило снижение полимераккумулирующих свойств. Это может быть связано с активацией других метаболических путей в ответ на осмотический стресс *Bacillus megaterium uyuni S29*. Самой высокой концентрацией NaCl в среде было 250 г/л. При данной концентрации роста не было зафиксировано даже на 21 час. Из этого можно сделать вывод что, концентрация NaCl в среде 250 г/л подавляла рост бактерий. [56]

1.9. Липиды бактерий

Анализ литературы показал, что липиды являются необходимыми и незаменимыми в жизни клетки. Одна из важнейших функций липидов это то, что они выступают в качестве структурных компонентов клеточных мембран. Также липиды, которые находятся в цитоплазме, являются запасными

питательными веществами. Однако следует сказать, что другие функции, которые они выполняют в клетке, до сих пор не изучены.

Преобладающая часть липидов содержится в ЦПМ и в наружной мембране клеточной стенки. Поэтому можно сделать вывод о том, что липиды напрямую связаны со структурными элементами клетки и, скорее всего, на этом уровне регулируют жизнедеятельность микроорганизмов.

Также жирные кислоты и липиды играют значительную роль в адаптации бактерий к высокой концентрации солей. Их роль в солеустойчивости обусловлена тем фактором, что мембранные липиды оказывают большое влияние на функции мембран либо путем изменения текучести мембраны, либо путем прямого взаимодействия с транспортными системами. Кроме того, некоторые мембранные липиды действуют как липидные медиаторы, такие как фосфатидная кислота, свободные жирные кислоты и лизофосфолипиды, которые участвуют в передаче сигналов и тд.

Также было показано, что для отдельных бактерий, которые синтезируют ПГА промежуточные метаболиты синтеза или окисления ЖК могут быть источниками мономерных единиц для полимера.

Говоря об общем содержании липидов в клетке, следует сказать, что у разных бактерий содержание сильно варьируется.

Раздел 2. Материалы и методы.

2.1. Бактериальный штамм

В данном исследовании использованы водородокисляющие бактерии *Cupriavidus necator* В-10646. Штамм из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ).

Культуру выращивали в жидкой солевой среде Шлегеля, состоящей из: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9,0 г/л; KH_2PO_4 - 1,5 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2 г/л; $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Fe} \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,025 г/л. Микроэлементы добавляли из расчета 3 мл стандартного раствора

на 1 литр среды. Раствор микроэлементов содержал: H_3BO_3 - 0,288 г/л; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,008 г/л; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 0,008 г/л; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,176 г/л; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,05 г/л; NiCl_2 - 0,008 г/л, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,03 г/л.

Посевной материал получили с помощью ресуспендирования музейной культуры, которая хранится в холодильнике на агаризованной среде. Вначале был приготовлен фосфатный буфер, 200 мл которого было добавлено в коническую колбу емкостью 500 мл, которая затем была стерилизована и охлаждена до комнатной температуры. В ламинаре в стерильных условиях в колбу вносили ресуспендированный посевной материал и добавляли: необходимые соли и фруктозу в концентрации 10-15 г/л. Колбу установили в термостатируемый шейкер-инкубатор «Incubator Shaker Innova®» серии 44 на 24 часа, при 30°C и 200 об/мин.

2.2. Культивирование

Полученный посевной материал асептически вносили в среду Шлегеля, и добавляли стерильный раствор фруктозы в начальной концентрации 20-30 г/л. В колбы также добавляли NaCl в концентрациях 5 г/л и 10 г/л. Бактерий *Cupriavidus necator B-10646* культивировали в стеклянных колбах объемом 1 л с 400 мл фосфатного буфера. Для лучшей аэрации и перемешивания использовался термостатируемый шейкер-инкубатор «Incubator Shaker Innova®» серии 44 («New Brunswick Scientific», США), инкубацию проводили при 30 °C и 200 об/мин. Общее время ферментации составило 72 часа. Источником азота служил хлорид аммония в концентрации 1 г/л. Пробы для анализа отбирались регулярно на 0, 24, 48 и 72 часа.

2.3. Измерение и определение оптической плотности

Оптическая плотность культур измерялась на спектрофотометре UNICO-2100 при $\lambda=440$ нм (длина оптического пути 1 мм). Необходимо было

приготовить разведения образцов: к бактериальной культуре добавляли дистиллированную воду в соотношении 1:5.

2.4. Измерение и определение концентрации биомассы бактерий

Концентрацию бактериальной биомассы определяли гравиметрическим методом: 50 мл бактериальной культуры центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) при 6500 об/мин в течение 8 минут. Затем клетки промывали дистиллированной водой, снова центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) и еще три раза центрифугировали. Полученную промытую биомассу переносили без потерь в предварительно взвешенный бюкс. Затем бюкс с биомассой был помещен в сушильный шкаф Sanyo («Sanyo Electric Co., Ltd.», Япония) при температуре 95 °С на 24 часа. Через 24 часа бюкс вынимали, охлаждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах Adventurer, «ОНАУС», США. Биомассу бактерий рассчитывали следующим образом: из веса бюкса с биомассой вычитали вес бюксы без неё и умножали на 20 для перевода в граммы на литр.

2.5. Измерение концентрации углеродного субстрата

Основным углеродным субстратом была фруктоза, концентрацию которой определяли резорциновым методом. Для этого брали 2 мл бактериальной суспензии и центрифугировали (Centrifuge 5417 R, «Eppendorf», Германия). 0,5 мл надосадочной жидкости разбавляли в 25 мл дистиллированной воды. Один мл приготовленного образца смешивали с 1 мл спиртового раствора резорцина (50 мг резорцина разводили в 50 мл 95 %-ного этилового спирта) и 3 мл раствора соляной кислоты:вода в соотношении 5:1. Контролем служила дистиллированная вода. Далее образцы с контролем помещали в водяную баню и инкубировали при $t=80$ °С в течение 20 минут, затем охлаждали до комнатной температуры. Оптическую плотность измеряли

по сравнению с контролем при 540 нм (длина оптического пути 5 мм) на спектрофотометре UNICO-2100. Концентрацию фруктозы определяли с помощью калибровочного графика.

2.6. Экстракция полимера и внутриклеточных липидов

Анализ жирнокислотного состава липидов *Cupriavidus necator B-10646* выполняли из проб, отобранных на 24, 48 и 72 часы.

Экстракция липидов происходила из неосушенной биомассы с помощью смеси хлороформа и этанола (2:1). 40 мл бактериальной культуры центрифугировали (Centrifuge 5810 R, «Eppendorf», Германия) при 6500-7000 об/мин в течение 6-8 минут. К полученному осадку клеток добавляли этанол и хлороформ (10 мл и 20 мл) и переносили в конические колбы объемом 50 мл. Затем экстракт, содержащий растворенные полимеры и липиды, отделяли от биомассы с помощью бумажных фильтров в колбы с круглым дном. Растворители – этанол и хлороформ были удалены, с помощью роторного испарителя Rotavapor R-210 (BUCHI).

Затем полимер отделяли от липидов. Для этого к экстракту добавили 15-20 мл гексана. Полимер выпадал в осадок и отделялся через бумажный фильтр, а экстракт с липидами был перенесен в сердцевидную колбу. Затем гексан выпаривали из колбы с помощью роторного испарителя Rotavapor R-210 (BUCHI).

После выпаривания их трижды промывали 1 мл гексана, фильтровали через фильтр, содержащий сульфат натрия (Na_2SO_4 безводный), и помещали в предварительно взвешенные сердцевидные колбы (на 25-50 мл). Гексан выпаривали с помощью роторного испарителя Rotavapor R-210 (BUCHI) и хранили в эксикаторе один-два дня. Затем производили взвешивание на аналитических весах Adventurer, «OHAUS», США. Содержание внутриклеточных липидов рассчитывали как разницу между пустой колбой и колбой с липидами.

Идентификацию жирных кислот проводили метанолизом липидов. Для этого к липидам добавляли смесь метанола, серной кислоты (1:19) и каплю бензола. Ставили на 2 часа при температуре 80 °С с использованием обратного холодильника. Затем производили фильтрацию через делительную воронку для извлечения серной кислоты: содержимое сердцевидной колбы после метанолиза переносили в делительную воронку, затем промывали сердцевидную колбу 3 мл гексана и 3 раза дистиллированной водой воронку. Проверяли лакмусовой бумагой pH на наличие кислоты. Затем сливали из разделительной воронки через фильтр с сульфатом натрия (Na_2SO_4 безводный) в сердцевидную колбу, трижды промывали гексаном и добавляли еще 1 мл гексана для промывки фильтра с сульфатом натрия (Na_2SO_4 безводный). Затем гексан удалили, используя роторный испаритель Rotavapor R-210 (BUCHI).

Проводили хроматографию на хромато-масс-спектрометре с масс-детектором Agilent Technologies 7890A/5975C Agilent Technologies (США). Условия хроматографирования: газ-носитель – гелий, скорость 1 мл/мин. Капиллярная колонка DB-35MS, длина – 30 м, диаметр – 0.25 мм. Температура ввода пробы – 220 °С; начальная температура хроматографирования – 120 °С; подъем температуры до 230 °С со скоростью 5°С/мин, изотермальный режим – 5 мин; температура детектора – 150 °С; температура источника ионов - 230°С; электронный удар при 70 eV; определение фрагментов с атомными массами от 30 до 550 amu при 0,5 сек/скан. Идентификацию мономеров, образующих ПГА, проводили по масс-спектрам и временам удерживания.

2.7. Статистическая обработка результатов

Полученные результаты были статистически обработаны при помощи программы Microsoft Excel.

Раздел 3. Результаты

3.1. Накопление биомассы, полимера и липидов у бактерий *Cupriavidus necator* В-10646, выращиваемых на среде с добавлением NaCl

Страницы 22-33 изъяты в связи с авторским правом

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Исследовано влияние концентрации NaCl при 0, 5, 10 г/л на рост бактерий *Cupriavidus necator* В-10646, синтез полимера, накопление липидов и жирнокислотный состав. Показано, что концентрация 5 г/л не влияет на рост бактерий, концентрация биомассы составляет 6,63 г/л. При добавлении NaCl содержание полимера на всех концентрациях было одинаковым, и концентрация хлорида натрия не влияла на содержание полимера. Добавление NaCl привело к увеличению средневесовой молекулярной массы (995кДа) и полидисперсности полимера (4,2).

2. При исследовании жирнокислотного состава показано, что в независимости от концентрации NaCl к концу культивирования происходило снижение моноеновых, увеличение насыщенных и циклопропановых кислот, особенно наиболее яркая картина отмечена при концентрации 10 г/л.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

3-ГБ – 3-гидроксибутират

ВКПМ – всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов

ЖК – жирные кислоты

П(3ГБ) – поли-3-гидроксибутират

ПГА – полигидроксиалканоаты

ЦПМ – цитоплазматическая мембрана

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Polymers for Packaging Applications / Alavi, S., Thomas, S., Sandeep, K.P., Kalarikkal, N., Varghese, J., Yaragalla, S. (Eds.). // CRC Press. - 2014.
2. Comparative study on the production of PHA by three different *Pseudomonas sp.* / Ajay R.Sav, Amit K. Mittal, Alpana A. Thorat, Sachin Dubey, U.C.Banerjee. A // international journal of current microbiology and applied sciences. – 2014. - V. 3. – P. 940–954.
3. Biodegradable plastics from renewable sources / M. Flieger, M. Kantorová, A. Prell, T. Řezanka, J. Votruba. // Folia Microbiologica. – 2003.– P. 27–44.
4. PHA Biodegradable Blow-Molded Bottles: Compounding and Performance / Joseph Greene// Plastics Engineering -Connecticut. – 2013. - V. 69(1). – P. 16–21.
5. Optimization and Characterization of PHA (SCL-SCL) Copolymer by Indigenous *Bacillus thuringiensis* A102 Strain for Biomedical Applications/ Ponnusamy P. Suguna, Viswanathan V. Saranya, Periasamy P. Abirami // Current Microbiology. – 2020. - V. 77. – P. 3978–3989.
6. Polyhydroxyalkanoates: An overview// C S K Reddy, Rohit Ghai, Rashmi, Vipin Chandra Kalia/ Bioresource Technology. – 2003. - V. 87(2). – P. 137–146.
7. Techno-economic feasibility of large-scale production of bio-based polymers in Europe (PRO-BIP) / Crank, M., Patel, M., Marscheider-Weidemann, F., Schleich, J., Hüsing, B., & Angerer, G. // Utrecht University & Fraunhofer ISI. – 2004
8. . Lee S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates (review) // Biotechnol. and Bioengin. – 1996a. – V. 49. – P. 1–14.
9. Anjum, A., Zuber, M., Zia, K.M., Noreen, A., Anjum, M.N., Tabasum, S., 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements. Int. J. Biol. Macromol. 89, 161-174.

10. NaCl addition for increased polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator* / Sandra Esteves // *New Biotechnology*. - 2014. - V. 31. – P. 142–143.
11. Production of poly(3-hydroxybutirate) from inexpensive substrates / Kim, B.S // *Enzyme Microb. Technol.* – 2000. - V. 21. – P. 45–52.
12. Biohydrogen and polyhydroxyalkanoate co-production by *Enterobacter aerogenes* and *Rhodobacter sphaeroides* from *Calophyllum inophyllum* oil cake / Arumugam Aru, M Sandhya, Venkatachalam Ponnusami// *Bioresource Technology*. – 2014. - V. 164. – P. 170–176.
13. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India / Shrivastav, S. K. Mishra and S. Mishra// *Int. J. Biol. Macromol.* - 2010. - V. 46. – P. 255–260
14. Polyhydroxyalkanoates – what are the uses? Current challenges and perspectives / F. Masood, T. Yasin and A. Hameed // *Crit. Rev. Biotechnol.* - 2015. - V. 35. – P. 514–521.
15. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates) / J. Lu, R. C. Tappel and C. T. Nomura // *Polym. Rev.* – 2009. - V. 49. – P. 226–248.
16. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates / S. Khanna, K. Ashok // *Proc. Biochem.* - 2004. – P. 607 – 619.
17. Биодegradация полигидроксиалканоатов почвенными микробиоценозами различной структуры и выявление микроорганизмов-деструкторов / Бояндин А. Н. и др. // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2012. – Т. 48. – №. 1. – С. 35-35
18. Физико-химические свойства одно-[поли(ЗГБ)], двух-[поли(ЗГБ/ЗГВ)], и трехкомпонентных [поли(ЗГБ/ЗГВ/ЗГГ)] полигидроксиалканоатов / Т. Г. Волова [и др.] // *Перспективные материалы*. – 2004. – №. 3. – С. 42-48
19. Polyhydroxyalkanoate copolymers from forest biomass / Keenan T. M., Nakas J. P., Tanenbaum S. W. // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. – 2006. – V. 33. – №. 7. – С. 616.

20. Optimizing the biosynthesis of renewable polyhydroxyalkanoate copolymer containing 3-hydroxyvalerate by *Massilia haematophila* using statistical modeling / Kiun J. T. et al. // *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*. – 2019. – V. 100. – №. 4.
21. Structural insights into polyhydroxyalkanoates biosynthesis / Sagong H. Y. et al. // *Trends in biochemical sciences*. – 2018. – V. 43. – №. 10. – P. 790-805.
22. Polyhydroxyalkanoates: recent advances in their synthesis and applications / Winnacker M. // *European Journal of Lipid Science and Technology*. – 2019. – V. 121. – №. 11. – P. 1900101.
23. Biological degradation of plastics: a comprehensive review / Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S. // *Biotechnol. Adv.* - 2008. – V. 26. – P. 246 – 265.
24. Comparative oxo-biodegradation study of poly- 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate/polypropylene blend in controlled environments / Masood, F., Yasin, T., Hameed, A. // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* - 2014. – V. 87. – P. 1-8.
25. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils / Boyandin, A.N., Prudnikova, S.V., Karpov, V.A., Ivonin, V.N., Đỗ, N.L., Nguyễn, T.H., Le, T.M.H., Filichev, N.L., Levin, A.L., Filipenko, M.L., Volova, T.G. // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* - 2013. – V. 83. – P. 77-84.
26. Разрушаемые биополимеры: получение, свойства, применение / Волова, Т. Г., Е. И. Шишацкая // *Красноярский писатель*. – 2011. – С. 392.
27. A glucose-utilizing strain, *Cupriavidus euthrophus* B-10646: growth kinetics, characterization and synthesis of multicomponent PHAs / Volova, T. et al. // *PLoS One*. – 2014. – V. 9. – №. 2. – P.87-551.
28. PHA biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show difference on moment specificities / S.R. Silva-Queiroz, L.F.Silva, J.G.C. Pradella, E.M. Pereira, J.G.G. Gomes. // *Journal of Biotechnology*. – 2009. – V. 143. - №2. – P. 111-118.
29. Optimization of Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Azotobacter vinelandii* using experimental design / El-Shanshoury, A.E.R.R., Kenawy, E.R.,

Amara, A.A., Salama, A.F., Kishk, S.S. // Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. - 2013. – V. 2. – P. 227 - 241.

30. The use of NaCl addition for the improvement of polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator*. / Passanha, P., Kedia, G., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J., Esteves, S.R. // Biores. Technol. - 2014. – V.163. – P. 287-294.

31. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4- hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. / Valentin, H.E., Dennis, D. 1997. // J. Biotechnol. – V. 58. - P.33-38.

32. Production of (R)-3-hydroxybutyric acid by *Burkholderia cepacia* from wood extract hydrolysates/ Wang Y, Liu S // AMB Express. – 2014. – V. 4(1):1.

33. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements. / Anjum A, Zuber M, Zia KM, Noreen A, Anjum MN, Tabasum S // Int J Biol Macromol. – 2016. – V. 89. – P. 161–174.

34. Enantiomerically pure hydroxycarboxylic acids: current approaches and future perspectives / Ren Q, Ruth K, Thöny-Meyer L, Zinn M // Appl Microbiol Biotechnol. – 2010. – V. 87(1). – P. 41–52.

35. A review on established and emerging fermentation schemes for microbial production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters / Koller M // Fermentation. – 2018. V.4(2). – P.30.

36. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. / Kessler B, Witholt B // J Biotechnol. – 2001. – V. 86(2). – P. 97–104.

37. Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*. / Aramvash A, Moazzeni Zavareh F, Gholami Banadkuki N // Eng Life Sci. – 2018. V. 18(1). - P. 20–28.

38. Harnessing fruit waste for poly-3-hydroxybutyrate production: a review. / Sirohi R, Gaur VK, Pandey AK, Sim SJ, Kumar S // Biores Technol. - 2021.

39. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. / Wood JM, Bremer E, Csonka LN, Kraemer R, Poolman B, van der Heide T, et al. // Comp Biochem Phys. – 2001. – V. 130. – P. 437–60.

40. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. / Kogej T, Stein M, Volkmann M, Gorbushina AA, Galinski EA, Gunde-Cimerman N. // Microbiology. – 2007. – V. 153. – P. 4261–4273.
41. Osmotic adaptation in halophilic and halotolerant microorganisms. In: Vreeland RH, Hochstein LI, editors. The biology of halophilic bacteria. / Imhoff JF. // CRC Press. - 1992. - P. 211–253.
42. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*. / Borowitzka MA, Borowitzka LJ, Kessly D. // J Appl Phycol. – 1990. - V.2. – P. 111–9
43. Poly(b-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. / Quillaguana'n J, Delgado O, Mattiasson B, Hatti-Kaul R. // Enzyme Microb Tech. – 2006. – V. 38. – P. 148–54.
44. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. / Quillaguana'n J, Guzman'n H, Van-Thuoc D, Hatti-Kaul R. // Appl Microbiol Biot. – 2010. – V. 85. – P. 1687–1696.
45. Production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei* using rice-based ethanol stillage with simultaneous recovery and re-use of medium salts. / Bhattacharyya A, Saha J, Haldar S, Bhowmic A, Mukhopadhyay UK, Mukherjee J. // Extremophiles. – 2014. – V.18. – P. 463–470.
46. Recycling of waste streams of the biotechnological poly(hydroxyalkanoate) production by *Haloferax mediterranei* on whey. / Koller M. // Int J Polym Sci. - 2015.
47. Study on the production and re-use of poly(3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and extracellular polysaccharide by the archaeon *Haloferax mediterranei* strain DSM 1411. / Koller M, Chiellini E, Braunegg G. // Chem Biochem Eng. – 2015. - V. 29. – P. 87–98.
48. Diversity of aerobic and facultative alkalitolerant and halotolerant endospore formers in soil from the Alvord Basin / Smith SA, Benardini JN, Strap JL, Crawford RL. // Syst Appl Microbiol. – 2009. – V. 32. – P.233–44.

49. Novel Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]-producing bacterium isolated from a Bolivian, hypersaline lake. / Rodríguez-Contreras A, Koller M, Miranda-de Sousa Dias M, Calafell-Monfort M, Braunegg G, Marque's-Calvo MS.// Food Technol Biotech. – 2013. - V. 51. - P.123–30.
50. High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain / Rodríguez-Contreras A, Koller M, Miranda-de Sousa Dias M, Calafell-Monfort M, Braunegg G, Marque's-Calvo MS.// J Appl Microbiol. – 2013. - V. 114. – P. 1378–1387.
51. Polymer production by two newly isolated extremely halophilic archaea: application of a novel corrosion resistant bioreactor. / Hezayen FF, Rehm BH, Eberhardt R, Steinbüchel A. // Appl Microbiol Biotechnol. – 2000. - V. 54. – P. 319–325.
52. Potential of various archae- and eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoate producers from whey. / Koller M, Hesse P, Bona R, Kutschera C, Atlic' A, Braunegg G. // Macromol Biosci. – 2007. – V.7. – P. 218–226.
53. Characterization of polyhydroxyalkanoates accumulated by a moderately halophilic salt pan isolate *Bacillus megaterium* strain H16. / Salgaonkar BB, Mani K, Braganca JM.// J Appl Microbiol. – 2013. – V.114. – P. 1347–1356.
54. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*/ S. Obruca, I. Marova, Z. Svoboda, R. Mikulikova //Folia Microbiologica. – 2010. - V.55. – P. 17–22.
55. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology. / Yin J, Chen JC, Wu Q, Chen GQ // Biotechnology Advances. - 2015. – V.33(7). – P. 1433–1442.
56. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria / Janet M. Wood, Erhard Bremer, Laszlo N. Csonka, Reinhard Kraemer, Bert Poolman, Tiemen van der Heide, Linda T. Smith // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. - 2001. – V.130. – P. 437–460.

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«**СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова

« 26 » июня 2022 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Влияние хлорида натрия на рост бактерий *Cupriavidus necator* В-10646, синтез
полигидроксиалканоатов и жирнокислотный состав липидов

Руководитель



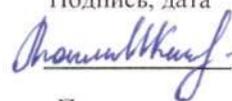
к.б.н., доцент

Н. О. Жила

Должность, ученая степень

Инициалы, фамилия

Выпускник



Подпись, дата

М. С. Котова

Инициалы, фамилия

Красноярск 2023