

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

подпись

Т. Г. Волова
инициалы, фамилия

«_____»

июня

2017г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА
06.03.01 – Биология

Влияние NaCl на рост *Cupriavidus eutrophus*

В-10646, синтез полимера и жирнокислотный состав липидов

Руководитель

подпись, дата

к.б.н.

должность, ученая степень

Н.О. Жила

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись, дата

Н.А. Капустина

инициалы, фамилия

Красноярск 2017

Реферат

Выпускная квалификационная работа на тему: «Влияние хлорида натрия на рост штамма *Cupriavidus eutrophus* B-10646 и синтез полимера» содержит 46 страницы текстового документа, 10 иллюстраций, 1 таблицу, 81 использованных источников.

Ключевые слова: полигидроклианканоаты (ПГА), *Cupriavidus eutrophus*, галофильтность, жирные кислоты, липиды.

Целью настоящей работы было исследование способности бактерий штамма *Cupriavidus eutrophus* B-10646 расти и синтезировать полимер в присутствии хлорида натрия в среде. Для этого необходимо было решить следующие задачи: исследовать влияние хлорида натрия на рост бактерий *C. eutrophus* B-10646 и синтез полимера; исследовать влияние хлорида натрия на жирнокислотный состав внутриклеточных липидов.

Тема исследования связана с актуальным направлением как продукция полигидроксиалканоатов (ПГА) с использованием грамотрицательных бактерий *Cupriavidus necator*, которые широко исследуются, так как установлено, что данные бактерии способны накапливать полимер до 85% от сухой биомассы при стрессовых ситуациях, к одному из стрессовых условий относится добавление хлорида натрия в среду.

Исследования показали, что урожай биомассы и полимера в присутствии невысоких концентраций NaCl (5-10 г/л) не отличался от показателей культуры, выросшей в отсутствии NaCl, и составлял соответственно 8.8 -9.2 г/л и 74.1-81% от веса сухой биомассы. Более высокие концентрации NaCl, особенно 25 и 30 г/л, привели к ингибированию роста бактерий и синтезу полимера. Так же изменился жирнокислотный состав внутриклеточных

липидов за счет снижения ненасыщенных ЖК (16:1 ω 7, 18:1 ω 7) и увеличения насыщенных (16:0, 18:0).

Содержание

Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	7
1.1. Биоразрушаемые полимеры.....	7
1.2. Полигидроксиалканоаты – природные полиэфиры	10
1.2.1. Структура и классификация ПГА	15
1.3. Галофильные микроорганизмы	17
1.4. Влияние хлорида натрия на рост бактерий и синтез полимера	21
Глава 2. Объект исследования	23
2.1. Водородные бактерии <i>Cupriavidus eutrophus</i>	23
2.2. Материалы и методы исследования.....	25
2.2.1. Культивирование бактерий и методы измерения параметров культивирования	25
2.2.2. Определение концентрации фруктозы	26
2.2.3. Выделение полимера и внутриклеточных липидов	27
2.2.4. Определение содержания и состава полимера	28
2.3. Определение молекулярной массы полимера	29
Глава 3. Результаты и обсуждения	Ошибка! Закладка не определена.
Выводы	31
Список использованных источников	32

Введение

Продукция полигидроксиалканоатов (ПГА) с использованием грамотрицательных бактерий *Cupriavidus necator* широко исследуется, так как установлено, что данные бактерии способны накапливать полимер до 85% от сухой биомассы при лимитировании роста азотом, фосфором или кислородом и избытке углеродного субстрата [58]. Бактерии накапливают ПГА в качестве источника углерода и энергии. Кроме того, ПГА также играют роль в стрессоустойчивости [68].

Известно, что реакцией бактерий на внешний стресс может стать увеличение продукции ПГА, как средство преодоления стрессовых условий. К таким видам стресса относят присутствие некоторых тяжелых металлов [43] и химических веществ, таких как этанол и перекись водорода [62], а также присутствие NaCl. В литературе представлены достаточно противоречивые результаты о влиянии NaCl на рост бактерий и синтез ПГА. Значительное снижение содержания поли(3-гидроксибутират) (П(ЗГБ)) в клетках *Paracoccus denitrificans* и *Cupriavidus necator* (штамм JMP 134) происходило уже при концентрации NaCl 5 г/л, а при 20 г/л NaCl наблюдали 80%-ное ингибирование роста бактерий и синтеза полимера [61]. Однако у другого штамма *C. necator* (DSMZ 545) максимальный выход ПГА наблюдали в присутствии NaCl в концентрации 9 г/л, причем ингибирование биомассы происходило при концентрации NaCl выше 15 г/л [67]. Увеличение содержания полимера в присутствии NaCl показано и для бактерии *Zobellella denitrificans* MW1 [38].

Жирные кислоты (ЖК) бактерий входят в состав липидов цитоплазматических мембран, которые в первую очередь реагируют на меняющиеся условия окружающей среды, поддерживая взаимосвязь между структурой и функцией мембранны. Изменения в ЖК составе липидов цитоплазматических мембран *R. eutropha* H850 могут индуцироваться

загрязнителями органической природы или источником углерода у *Cupriavidus necator* JMP134.

Целью настоящей работы было исследование способности бактерий штамма *Cupriavidus eutrophus* B-10646 расти и синтезировать полимер в присутствии хлорида натрия в среде.

Для этого необходимо было решить следующие задачи:

1. Исследовать влияние хлорида натрия на рост бактерий *C. eutrophus* B-10646 и синтез полимера;
2. Исследовать влияние хлорида натрия на жирнокислотный состав внутриклеточных липидов.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Биоразрушаемые полимеры

Производство пластических масс на современном этапе развития возрастає в среднем на 5 - 6 % ежегодно и к 2010 г. достигало 250 млн. тонн. Их потребление на душу населения в индустриально развитых странах за последние 30 лет удвоилось, достигнув 85 - 90 кг. [13].

Насчитываются около 150 видов пластиков, 30 % из них – это смеси различных полимеров. Для достижения определенных свойств и лучшей переработки в полимеры вводят различные химические добавки, которых уже более 20, а ряд из них относится к токсичным материалам [11]. Такая высокая популярность пластмасс объясняется их легкостью, экономичностью и набором ценнейших служебных свойств. Пластики являются серьезными конкурентами металлу, стеклу, керамике. Но наряду с этим возникает проблема с утилизацией отходов, которых существует свыше 400 различных видов, появляющихся в результате использования продукции полимерной промышленности.

Учитывая специфические свойства полимерных материалов – они не подвергаются гниению, коррозии, проблема их утилизации носит, прежде всего, экологический характер. Однако, в настоящее время проблема переработки отходов полимерных материалов обретает актуальное значение не только с позиций охраны окружающей среды, но и связана с тем, что в условиях дефицита полимерного сырья пластмассовые отходы становятся мощным сырьевым и энергетическим ресурсом [8]. Использование отходов полимеров позволяет существенно экономить первичное сырье (прежде всего нефть) и электроэнергию [12].

Вместе с тем решение вопросов, связанных с охраной окружающей среды, требует значительных капитальных вложений. Стоимость обработки и уничтожения отходов пластмасс примерно в 8 раз превышает расходы на обработку большинства промышленных и почти в три раза – на уничтожение

бытовых отходов. Это связано со специфическими особенностями пластмасс, значительно затрудняющими или делающими непригодными известные методы уничтожения твердых отходов. Проблем, связанных с утилизацией полимерных отходов, достаточно много. Они имеют свою специфику, но их нельзя считать неразрешимыми.

На современном этапе развития общества возник новый подход к разработке полимерных материалов, диаметрально противоположный традиционному. Он имеет целью получение полимеров, которые сохраняют эксплуатационные характеристики только в течение периода потребления, а затем претерпевают физико-химические и биологические превращения под действием факторов окружающей среды и легко включаются в процессы метаболизма природных биосистем. Способность полимеров разлагаться и усваиваться микроорганизмами зависит от ряда их структурных характеристик. Наиболее важными являются химическая природа полимера, молекулярная масса, разветвленность макроцепи (наличие и природа боковых групп), надмолекулярная структура [1].

Природные и синтетические полимеры, содержащие связи, которые легко подвергаются гидролизу, обладают высокой способностью к биодеструкции. Присутствие заместителей в полимерной цепи часто способствует повышению биодеструктируемости. Последняя зависит также от степени замещения цепи и длины ее участков между функциональными группами, гибкости макромолекул. Важным фактором, который определяет стойкость полимера к биоразложению, является величина его молекул. В то время как мономеры или олигомеры могут быть поражены микроорганизмами и служат для них источником углерода, полимеры с большой молекулярной массой являются стойкими к действию микроорганизмов. Биодеструкцию большинства технических полимеров, как правило, инициируют процессами небиологического характера (термическое и фотоокисление, термолиз, механическая деградация и т.п.). Упомянутые деградационные процессы приводят к снижению молекулярной массы полимера. При этом возникают

низкомолекулярные биоассимилируемые фрагменты, имеющие на концах цепи гидроксильные, карбонильные или карбоксильные группы.

Создание биоразрушаемых пластмасс основано на введении в цепь полимера биоактивирующих добавок, которые должны содержать функциональные группы, способные разлагаться под действием бактерий. Трудность заключается в том, что добавки вводят в полимер на стадии синтеза или переработки, а разрушение его должно протекать после использования, но не во время переработки. Поэтому проблема заключается в создании активаторов разрушения, обеспечивающих определенный срок службы пластмассовых изделий без ухудшения их качества. Активаторы должны быть также нетоксичными и не повышать стоимость материала [14].

Биоразрушаемые полимеры принято делить на три группы:

1. Химически синтезированные полимеры: в эту категорию входят такие соединения, как полигликолевая кислота, полилактид, поли(ε-капролактон), поливенил алкоголь, поли(этилен оксид). Данный вид соединений подвергается энзиматической либо микробиологической атаке. Так, например, полилактид – продукт конденсации молочной кислоты, в компосте биоразлагается в течение одного месяца, усваивается он и микробами морской воды. Тем не менее, данный вид соединений не может составить сильную коммерческую конкуренцию традиционным пластикам [45].

2. Биоразрушаемые пластики содержат различные добавки: полимеры, в состав которых входят крахмал, целлюлоза, хитозан или протеин. Так, наиболее широко из ряда природных соединений в биоразлагаемых упаковочных материалах используется крахмал. Биоразлагаемые пластические массы на основе крахмала обладают высокой экологичностью и способностью разлагаться в компосте при 30°C в течение двух месяцев с образованием благоприятных для растений продуктов распада [14].

3. Полигидроксиалканоаты: единственные 100% биоразрушаемые полимеры. Это полиэфиры различных гидроксипроизводных жирных кислот,

которые синтезируются большим количеством микроорганизмов как дополнительный источник энергии в условиях, когда необходимые элементы питания, как азот или фосфор, лимитированы. Они обладают свойствами сходные с различными термопластиками, такими как полипропилен. Данный вид полимеров разрушается до конечных продуктов воды и диоксида углерода в аэробных условиях и до метана в анаэробных условиях микроорганизмами, обитающими в почве, море, озерах и сточных водах [45].

Таким образом, способность полимерных материалов к биодеструкции обусловлена их химическим составом, структурой и свойствами макромолекул.

Цель новейших разработок состоит в том, чтобы установить общие закономерности в подборе компонентов и технологических параметров при изготовлении материалов, сочетающих высокий уровень эксплуатационных характеристик (прочность, низкую газопроницаемость, экологическую безопасность и др.) со способностью к биоразложению, и научиться регулировать процессы их деструкции.

Исследования в области создания биоразрушаемых полимеров важны для решения глобальных экологических проблем, связанных с загрязнением окружающей среды отходами полимерных материалов.

1.2. Полигидроксиалканоаты – природные полиэфиры

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это класс природных макромолекул (полимеров гидроксипроизводных жирных кислот), которые синтезируют прокариотические организмы в специфических условиях несбалансированного роста в качестве эндогенного депо энергии и углерода.

В 1888 Бейжеринк первым обнаружил гранулы ПГА в бактериальных клетках. Состав ПГА был впервые описан Лемоидженом, как неизвестный ранее материал, представленный гомополиэфиром 3-гидроксимасляной кислоты, названный полигидроксибутират (ПГБ). В последующие 30 лет интерес к этим неизвестным материалам был весьма незначительным. Макре и

Уилкинсон в 1958 году в своем докладе описали некоторые функции ПГБ. Они указали на быструю биоразрушаемость ПГБ, который синтезировался в клетках бактерий *Bacillus megaterium*. С этого момента интерес к ПГБ стал возрастать. В последующие годы, исследования, проводимые на ПГБ, а также на других представителях семейства ПГА, были расширены с использованием самых различных микроорганизмов и далее было реализовано применение данного типа биополимеров [7].

На рис. 1 показан путь трансформации полимеров компостированием, хотя практически и теоретически полимеры на биологической основе могут быть переработаны и далее использованы нормальными путями без специальной переработки.



Рисунок 1 – Схема производства, потребления и утилизации полимеров, полученных из возобновляемых источников, включающая стадию компостирования: 1 – путь от сбора урожая до получения продукта; 2 – путь от сбора урожая до утилизации биополимеров; 3 – путь от сбора урожая до сбора урожая [47]

Полигидроксиалканоаты (ПГА) представляют собой семейство биодеградируемых и биосовместимых полиэфиров, накопленных многими микроорганизмами. ПГА превращаются в производственную цепочку создания ценности, начиная от биопластов, биотоплива, тонких химических веществ и заканчивая медициной [23, 24]. РНА обладают разнообразными свойствами материала благодаря более чем 150 вариациям мономера [25; 75].

Среди этих ПГА поли (3-гидроксибутират) (ПГБ) и поли (3-гидроксибутират-со-3-гидроксивалерат) (ПГБВ) являются двумя из наиболее хорошо изученных полимеров и были получены в больших масштабах [23; 75].

ПГБ является жестким и хрупким, а ПГБВ более гибким с более широкими возможностями применения в качестве медикаментозных материалов, пленок, одноразовых предметов и упаковочных материалов [23; 69]. После накопления ПГА галофилами, впервые наблюдавшимися в 1972 году [46], все больше и больше галофилов были использованы и нашли синтез ПГА [33; 36; 50; 55]. Среди этих ПГА производящих галофилы, археон *Haloferax mediterranei* производил 46 вес.% ПГА [56; 73]. Дальнейшее исследование показало, что ПГА, синтезированный *H. mediterranei*, был сополимером ПГБВ, когда в качестве субстрата использовали карбоновые кислоты, такие как глюкоза, экструдированный крахмал или гидролизованная сыворотка [26; 32; 50]. Сообщалось также о нескольких галофильных штаммах для синтеза ПГБВ из углеводов без жирной кислоты в качестве источника углерода [79; 36]. Описано четыре пути в *H. mediterranei*, приводящие к пропионил-СоА, предшественнику 3-гидроксивалерата (3HV) в PHBV, включая путь цитрамалат / 2-оксобутират, путь аспартат / 2- оксобутират, путь метилмалонил-СоА и 3 - гидроксипропионатный путь [7].

Полигидроксиалканоаты по ряду физико-химических свойств сходны с широко применяемыми и выпускаемыми в огромных количествах и не разрушаемыми в природной среде синтетическими полимерами (полипропиленом и полиэтиленом). Помимо термопластичности, ПГА обладают оптической активностью, антиоксидантными свойствами, пьезоэлектрическим эффектом и, что самое главное, они характеризуются биоразрушаемостью и биосовместимостью. Возможно получение на основе ПГА композитов с различными природными и синтетическими материалами, позволяющими направленно изменять их структуру, состав и, следовательно, базовые свойства материала – пластичность, механическую прочность, температурные и другие характеристики, еще более усиливает привлекательность ПГА и расширяет возможные сферы применения [Волова с соавт., 2003].

Полигидроксибутират (ПГБ) был первым из обнаруженных ПГА и является на сегодняшний день наиболее широко изученным и охарактеризованным среди полигидроксиалканоатов. Он аккумулируется многими бактериями и может составлять до 90 % от сухого веса клеток [45]. По своим пластическим свойствам он близок к классическим полимерам — полиэтилену и полипропилену [18; 54]. Однако, он обладает лучшими газобарьерными свойствами (например, по отношению к кислороду) и большей устойчивостью к ультрафиолету, характеризуется также хорошей водостойкостью и теплоустойчивостью, при этом его проницаемость для водяного пара втрое ниже по сравнению с полипропиленом [7].

Полигидроксиалканоаты имеют огромный потенциал использования в самых различных областях: в хирургии и фармацевтике, сельском хозяйстве, в качестве упаковочного материала в пищевой промышленности, косметологии и многих других. ПГА могут быть синтезированы из биовозобновляемых ресурсов таких, как сахара, растительные масла и даже диоксида углерода [77]. Данный тип биополимеров имеет несравненно большее преимущество перед материалами, изготовленными из нефтепродуктов, так как их способны утилизировать микроорганизмы и грибы. С ПГА связаны большие надежды, так как помимо термопластичности аналогично полипропилену и полиэтилену, эти биопластики обладают антиоксидантными и оптическими свойствами, пьезоэлектрическим эффектом и характеризуются высокой биосовместимостью.

ПГА разрушаются в биологических средах с образованием безвредных для окружающей среды продуктов: диоксида углерода и воды в аэробных условиях и метана и воды – в анаэробных. Биодеградация ПГА осуществляется специализированными ПГА-деградирующими микроорганизмами, обладающими внутри- или внеклеточными ПГА-деполимеразами [40].

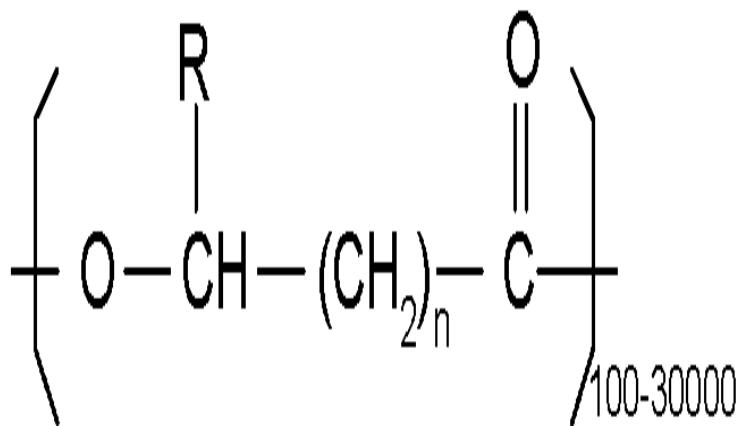
ПГА в биологических средах разрушаются в результате внутриклеточной деградации при участии эндодеполимераз. Полагают, что

внутриклеточные деполимеразы не гидролизуют полукристаллические полимеры, выделенные из биомассы, а внеклеточные деполимеразы не обладают субстратной специфичностью по отношению к внутриклеточному полимеру, ассоциированному в гранулах внутри клеток. [82].

1.2.1. Структура и классификация ПГА

На сегодняшний день известно более 150 различных по структуре полимеров, синтезируемых природными, а также генетически модифицированными микроорганизмами.

Как уже было, ранее описано, ПГА состоят из мономеров гидроксикирных кислот. Общая структурная формула полигидроксиалканоатов представлена на рис. 2.



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

R = метил - поли (3-гидроксибутират)

R = этил - поли (3-гидроксивалерат)

R = пропил - поли (3-гидроксигексаноат)

R = пентил - поли (3-гидроксиоктеноат)

R = нонил - поли (3-гидроксидодеcanoат)

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

$n=3$ R = водород - поли (5-гидроксивалерат)

Рисунок 2 – Общая структурная формула полигидроксиалканоатов [54]

Полигидроксиалканоаты подразделяют на три класса согласно их свойствам, которые в свою очередь зависят от мономерного состава:

1. Короткоцепочечные ПГА (Short-chain-length PHAs/ PHASL), в состав их мономеров входят от трех до пяти углеродных атомов и являются природными термопластиками.

2. Среднекепочечные ПГА (Medium-chain-length PHAs/PHAMCL), мономерный состав из 6-14 углеродных атомов, представляют собой природные эластомеры.

3. Длинноцепочечные ПГА (long-chain-length PHAs/PHALCL) являющиеся сополимерами коротко- и среднекепочечных ПГА и включающие в мономерный состав свыше 14 углеродных атомов. Их свойства зависят от

молярного соотношения мономеров коротко- и среднеподцепочных ПГА. Данный тип полигидроксиалканоатов имеет широкий ряд физических и термических свойств.

Данное разделение полимеров на группы базируется на существующем представлении о субстратной специфичности ПГА-синтаз, акцептирующих определенные гидроксикислоты при строительстве полимерной цепи в процессе полимеризации [18].

В данной работе использовали штамм водород окисляющих бактерий *C. eutrophus* B-10646, зарегистрированный во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ). Данный штамм обладает широким органотрофным потенциалом и может применять в качестве источников углерода различные вещества. Данный штамм устойчив к концентрациям 3-5 г/л в культуральной среде следующих органических субстратов: валериановая кислота, гексановая кислота, γ -бутиrolактон – и способен использовать их для синтеза сополимеров ПГА, содержащих коротко- и среднеподцепочные мономеры [82].

Таким образом, большое разнообразие мономеров, обнаруженных на сегодняшний день в составе ПГА, определяет широкий спектр физических свойств этих биополимеров.

1.3. Галофильные микроорганизмы

Галофилы (солёные) относятся к тем микроорганизмам, которые нуждаются в соли (NaCl) для роста, и они могут быть найдены во всех трех областях жизни - археи, бактерии и эукариоты [71]. Галофилы можно найти в гиперсоленных средах, которые широко распространены в разных географических районах на Земле, таких как соленые озера, соляные кастрюли или солончаки [74]. Согласно концентрации соли для оптимального роста, галофилы могут быть примерно разделены на две группы: умеренные и экстремальные галофилы [63]. Умеренный галофил растет при концентрации

соли 3-15% (мас. / об.) и может переносить 0-25% (мас. / Об.) [81]. Большое количество филогенетических подгрупп содержит много видов галофильных бактерий, большинство из которых принадлежит к семейству Halomonadaceae (класс Gamma proteobacteria) [64]. Чтобы развиваться в гиперсоленой среде, галофилы имеют два основных механизма адаптации, чтобы предотвратить рассеяние NaCl в клетках. Первым механизмом является накопление неорганических ионов (главным образом KCl) для балансировки осмотического давления. Этот механизм в основном используется аэробными и крайне галофильными археями и некоторыми анаэробными галофильными бактериями [64]. Напротив, большинство галофильных бактерий и эукариот накапливают водорастворимые органические соединения с низкой молекулярной массой, которые называются совместимыми растворами или осмолитами, для поддержания низкой концентрации внутриклеточной соли [65;71;72]. Совместимые растворенные вещества могут выступать в качестве стабилизаторов для биологических структур и позволяют клеткам адаптироваться не только к солям, но также к нагреванию, сушке, холоду или даже к замораживанию [28], позволяя галофилу расти примерно при pH 10 и более 50 ° С [37]. Многие галофильные бактерии накапливают эктоин или гидроксиэктоин.

Другие внутриклеточные совместимые растворенные вещества включают аминокислоты, глицин, бетаин и другие осмотические растворенные вещества, накопленные в небольших количествах [57; 80; 81].

Что касается содержания газов в океанской воде, больше всего в ней содержится растворенный кислород — несколько кубических сантиметров на литр, а также азот и углекислый газ. В глубинных слоях Черного моря, ниже 200 м, скапливается сероводород — до 100 мг/л. Предполагают, что он поступает в море из земных глубин через разломы донных пород. В сероводородных слоях воды ничто не выживает за исключением тионовых бактерий, лишь висит в воде почти неподвижно так называемый «морской

снег» — нитевидные хлопья, состоящие из остатков планктонных организмов и очень медленно оседающие на дно.

Азот, растворенный в морской воде, находится почти в полном равновесии с азотом атмосферы. Содержание свободного азота в глубинных водах связано с образованием и распадом органического вещества и деятельностью бактерий. Растворенный в воде азот, особенно в прибрежных районах, усваивается особыми бактериями, перерабатывающими его в азотистые соединения, которые затем поглощаются растениями. Большое значение для жизни растений и живых организмов, для биохимических процессов, протекающих в море, имеет азот в связанном виде, т. е. в виде нитратов — солей азотной кислоты, нитритов — солей азотистой кислоты и солей аммония.

Галофильные микроорганизмы обитают в солёных водоёмах и засоленных почвах. Высокие концентрации хлорида натрия необходимы им для поддержания структурной целостности цитоплазматической мембраны и функционирования связанных с ней ферментных систем. При удалении из солёной среды их клеточная стенка растворяется, а цитоплазматическая мембрана распадается на мелкие фрагменты.

Галофильные микроорганизмы способны расти в средах с высокой концентрацией хлорида натрия до 32 %. Экстремальные галофилы способны развиваться в средах, содержащих до 15—32 % хлорида натрия (бактерии родов *Halobacterium*, *Halococcus*), умеренные галофилы растут на средах с 5 — 20 % хлорида натрия (бактерии родов *Paracoccus*, *Halodenitricant*, *Pseudomonas*, *Vibrios* и некоторые микроводоросли), слабогалофильные микроорганизмы лучше растут в средах с 2—5 % хлорида натрия (морские микроорганизмы).

Бактерии северных морей лучше развиваются при температуре до 10° С в среде, содержащей соли, где осмотическое давление имеет определенную величину. Большинство бактерий живет в средах, имеющих концентрацию

солей до 1%. Морские бактерии требуют для своего развития концентрацию солей до 10%. В озере Гюсчун-даг в Закавказье живут бактерии, приспособившиеся к концентрации солей 36,0%. Эта группа микробов, живущая в водах с высокой концентрацией солей, называется галофилами.

Цитоплазматическая мембрана галофильных микроорганизмов имеет характерные черты строения — она состоит из около 1/3 липидов и 2/3 различных белков, включая обычные наборы флавопротеинов и цитохромов. Основная масса липидов экстремальных галофилов отличается тем, что в их молекуле глицерин связан с фитанолом, а не с остатками жирных кислот. Также клеточные мембранные экстремальных галофилов содержат много каротиноидных пигментов, основной из которых — бактериоруберин, обуславливающих окраску колоний от розового до красного цвета и красно-оранжевого цветов, что имеет для галофилов важное значение как средство защиты против избыточной радиации, так как для мест их обитания характерна высокая освещённость.

Соленые озера относятся к малоизученным в гидробиологическом отношении водным объектам. Экстремальные условия соленых озер (физико-химические условия: условия по газу, по обмену, по энергетике, по концентрациям и градиентам) порождают находки уникальных организмов. В этом аспекте актуальным является исследование биоразнообразия соленых озер, механизмов адаптации организмов к экстремальным условиям среды обитания, исследования энергопластического обмена этих организмов. Подобные исследования могут иметь необычный интерес, как вариант доступных на Земле, но экстремальных условий существования или как модели условий существования древних экосистем.

1.4. Влияние хлорида натрия на рост бактерий и синтез полимера

В работе Rodriguez-Contreras et al., 2016 исследовано влияние различных концентраций хлорида натрия (5, 45, 100 и 250 г/л) на рост бактерий *Bacillus megaterium iuuni* S29, выделенных из грязи высохшего соленого озера Уюни (Боливия). Показано, что оптимальная концентрация соли для клеточного роста составляла 45 г/л, хотя значительный рост наблюдали также при 5 и 100 г/л NaCl. Бактерии, культивируемые в присутствии NaCl в концентрации 250 г/л, показали лишь очень скромное увеличение оптической плотности до 11 ч культивирования с последующим уменьшением оптической плотности практически до нуля. Кроме того, установлено, что концентрация соли в среде влияет также и на синтез П(ЗГБ). Этот штамм ведет себя по-разному в зависимости от количества соли в среде, что требует адаптации внутриклеточного ферментативного механизма и уравновешивания осмотического давления в присутствии высоких концентраций соли. Оптимальная концентрация соли улучшает клеточный рост, а также продукцию ПГБ. Кроме того, согласно предыдущим исследованиям, штамм также демонстрирует удовлетворительные темпы роста и продуктивность ПГА даже в отсутствие соли [73].

Pearl Passanha, 2014 также исследовал влияние NaCl в целях улучшения производства ПГА с помощью бактерий *Cupriavidus necator*. В данном исследовании бактерии *Cupriavidus necator* DSMZ 545, полученные от Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Германия. NaCl добавляли в среду в концентрациях 3,5 г / л (0,058 М), 6,5 г / л (0,122 М), 9 г / л (0,154 М), 12 г / л (0,205 М) и 15 г / л (0,25 М). Ферментация 9 г / л NaCl привела к высшему содержанию ПГА и урожайности в этом исследовании. Когда NaCl в концентрации 9 г / л добавляли в среду для выращивания, была достигнута максимальная концентрация ПГА 5,33 г / л с выходом 0,41 г / г ПГА, что на 30% выше, чем для контроля, и 17% и 10% выше 3,5 г / л NaCl и 6,5 г / л NaCl брожения, соответственно. Однако, когда концентрацию соли

дополнительно повышали до 15 г / л, клетки не могли накапливать ПГА, а концентрация NaCl была ингибирующей [67].

В исследованиях Yue et al., 2014 было обнаружено, что *L. campaniensis* LS21 вырастают в искусственной морской воде и на смешанных субстратах, сходных с кухонными отходами, состоящих из целлюлозы, пропионов, жиров, жирных кислот и крахмала [84]. При культивировании в среде для промывки кухонной муки дикий тип *H. campaniensis* производил только 26 вес.% ПГБ, тогда как рекомбинантный *H. campaniensis*, с генами пути синтеза ПГБ, чрезмерно выраженный, продуцировал 70 мас.% ПГБ. Примечательно, что *H. campaniensis* рос в загрязненных условиях, без затратов каких-либо средств, в течение 65 дней при нестерильных и непрерывных условиях при 40 г / л NaCl, 37 ° С и pH 10. Штамм может быть дополнительно генетически модифицированным для производства других химических веществ из отходов и смешанных субстратов. [79; 84].

В работе Ibrahim и Steinbuchel, 2009 был выделен бактериальный штамм *Zobellella denitrificans*, который подходит для производства ПГА с использованием загрязненного глицерина и достигает максимальной концентрации ПГА в присутствии 20г/л NaCl [39]. Глицерол, полученный из биодизельной промышленности с 5,5% -ным NaCl, был обнаружен, однако, что обусловило приблизительно 30% -ное снижение продукции ПГА штаммом *C. necator* JMP 134 и *Paracoccus denitrificans* по сравнению с глицерином [61]. Основываясь на прошлой литературе, кажется, что в зависимости от типа бактерий и, возможно, также от зависимости источника углерода, были обнаружены различные чувствительности к NaCl [39].

В работе T. Palmeiro-Sánchez, 2015 был проведен ряд экспериментов для изучения влияния присутствия добавленного хлорида натрия на активность биомассы, накопления ПГА и состава сохраненного биополимера. Основной вывод, полученный в результате этого исследования, заключался в том, что введение хлорида натрия в питательную среду влияет на характеристики накопления ПГА для смешанной микробной культуры, не адаптированной к

физиологическим условиям. Количество накопленного биополимера внутри клеток уменьшалось при увеличении концентрации NaCl [66].

Глава 2. Объект исследования

2.1. Водородные бактерии *Cupriavidus eutrophus*

Царство *Procariotae*

Класс *Betaproteobacteria*

Семейство *Burkholderiaceae*

Род *Cupriavidus*

Вид *C. eutrophus*

Штамм *C. eutrophus* B-10646

Штамм *C. eutrophus* ВКПМ B-10646 - продуцент полигидроксиалканоатов (ПГА) и способ их получения. Штамм выделен из *Ralstonia eutropha* ВКПМ B-8562 в процессе длительной многоступенчатой селекции по эффективности синтеза многокомпонентных ПГА.

Культурально-морфологические особенности штамма: грамотрицателен, клетки-палочки (молодые - короткие, в стационарной фазе - разной длины, размеры $0.3\text{-}0.5 \times 1.2\text{-}2.0$ мк), подвижные (молодые - монотрихи, с возрастом - перетрихи). Слабоподвижен. Оптимум роста $30\text{-}31^{\circ}\text{C}$, pH 6,7-7,2. На агаризованной среде с пептоном (гетеротрофные условия роста) образуют морфологически однородные округлые колонии, светло-кремовые, непрозрачные со слегка волнистым краем диаметром 2-4 мм. На минеральной агаризованной среде (автотрофные условия роста) колонии мелкие (1,5-2,5 мм), светло-серые, полупрозрачные. В жидкой питательной среде представляет однородную суспензию (минеральная среда Шлегеля, содержащая в качестве источника углерода смесь монокарбоновых кислот

(или сахара, органические кислоты, аминокислоты, спирты) при гетеротрофном росте, при автотрофии - смесь диоксида углерода, водорода и кислорода. Облигатный аэроб. Факультативный хемолитоавтотроф. Оксидазоположителен. Гидролитическими ферментами не обладает. Желатину не разжижает. Крахмал не гидролизует. Обладает широким органотрофным потенциалом и способен в качестве источника углерода использовать: сахара (глюкоза, фруктоза), аминокислоты (аланин, серин, лейцин, гистидин, триптофан, глутаминовую, аспарагиновую, лизин), органические кислоты (щавелевую, лимонную, янтарную, фумаровую, уксусную, 3-и 4-масляную кислоту, пентапновую, гексановую, октановую, nonановую), спирты (этанол, глицерин), 4-бутуролактон, CO₂ и CO. В качестве источника азота использует нитраты, соли аммония, карбамид, аминокислоты. Активность ферментов цикла ПГА составляет (U/мин[×]мг белка): β-кетотиолазы 3.57-4.26, ацетоацетил-СоА-редуктазы 0.98-1.23, ПГА-синтазы 0.08-0.10 Е., (D)-гидроксибутиратдегидрогеназы 0.18-0.22. Содержание ГЦ пар нуклеотидов в ДНК равно 66%. Клонирован и охарактеризован ДНК фрагмент 1381 н.п., включающий нуклеотидную последовательность гена 16S rRNA штамма B-10646.

Ростовые характеристики: штамм растет на минеральной среде с сахарами или органическими кислотами, а также в атмосфере водорода, двуокиси углерода и кислорода, специфических факторов роста и органических добавок не требуется. Границы физиологического действия pH в диапазоне 4.4-8.6, штамм сохраняет способность к росту в диапазоне температур 20-41°C.

2.2. Материалы и методы исследования

2.2.1. Культивирование бактерий и методы измерения параметров культивирования

Бактерии выращивали в стеклянных колбах объемом 200 мл, заполненных культурой на 50-60% объема на термостатируемой качалке при температуре 30°C (рис.3). Для выращивания бактерий за основу была принята солевая среда Шлегеля следующего состава (г/л): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 9.1; KH_2PO_4 – 1.5; $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{Fe}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.25; NH_4Cl – 2.0; стандартный раствор микроэлементов по Хоагланду (из расчета 3 мл стандартного раствора на 1 л среды; стандартный раствор содержит: H_3BO_3 – 0.228; $\text{CoCe}_2^{\times}6\text{H}_2\text{O}$ – 0.030; $\text{CuSO}_4^{\times} 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.008; $\text{MnCe}_2^{\times}4\text{H}_2\text{O}$ – 0.008; $\text{ZnSO}_4^{\times}7\text{H}_2\text{O}$ – 0.176; $\text{NaMoO}_4^{\times}2\text{H}_2\text{O}$ – 0.050; NiCe_2 – 0.008 (г/л)).

В качестве источника углерода использовали фруктозу (7-10 г/л). Добавляли в колбы NaCl в концентрациях 5 г/л, 10 г/л, 15 г/л, 20 г/л, 25 г/л и 30 г/л.

Периодически отбирали пробы культуры и измеряли их оптическую плотность на фотоколориметре КФК-2МП, при разведении пробы дистиллированной водой 1:5 и $\lambda=440$ нм (длина оптического пути 1 мм).

Биомассу бактерий на сухой вес в культуре определяли весовым способом. Для этого аликовты бактериальной суспензии объемом 20 мл, центрифугировали 7 мин при 6000г. Затем дважды отмывали клетки от солей дистиллированной водой и снова центрифугировали. Отмытые клетки переносили в бюксы, предварительно доведенные до постоянного веса. Бюксы сушили при температуре 105°C в сушильном шкафу в течение суток, охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Биомассу бактерий определяли как разницу между весом бюкса с клетками и весом чистого бюкса.



Рисунок 3 - Термостатируемая качалка Innova 44R

2.2.2. Определение концентрации фруктозы

Концентрацию фруктозы определяли резорциновым методом. Для этого супернатант разводили в 100 раз. Из этого разведения 1 мл пробы наливали в пробирку и добавляли 1 мл спиртового раствора резорцина (1 г резорцина растворяли в 100 мл 95%-ного этилового спирта) и 3 мл 30% раствора соляной кислоты. В качестве контроля использовали раствор следующего состава: 1 мл дистиллированной воды, 1 мл спиртового раствора резорцина и 3 мл 30% раствора соляной кислоты. Пробирки с контролем и пробой помещали в водянную баню ($t=80^{\circ}\text{C}$) на 20 минут. По истечении этого времени контроль и пробу охлаждали до комнатной температуры. Концентрацию фруктозы измеряли на фотоколориметре КФК-2МП при длине волны 540 нм (длина

оптического пути 5 мм). Концентрацию фруктозы рассчитывали по калибровочному графику.

2.2.3. Выделение полимера и внутриклеточных липидов

Липиды экстрагировали из влажной биомассы по методу Фолча смесью хлороформ-метанол (2:1). В полученном экстракте ПГА отделяли от липидов осаждением двойным объемом гексана. Экстракт липидов (липиды в цитоплазматической мембране) сушили на роторном испарителе и подвергали метанолизу с целью получениям метиловых эфиров жирных кислот. Метанолиз жирных кислот длился в течение 2 часов в смеси метанола и серной кислоты (50:1) при температуре 90 °С. Метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) анализировали на GC-MS 7890/5975C (Agilent Technologies, США). Условия хроматографирования были следующие: скорость подачи газа гелия осуществлялась на 1 мл мин⁻¹; температура инжектора 220°C; начальная температура 120°C; повышение температуры до 230°C со скоростью 5°C мин⁻¹, 5 минут в изотермальном режиме и последующее повышение температуры 310°C со скоростью 10°C мин⁻¹ и 3 минуты изотермального режима; температура интерфейса 230°C; температура источника иона 150°C; электронный удар 70 eV; сканирование фрагментов с атомной масса от 30 до 550 ам при 0,5 с скан⁻¹. Идентификацию МЭЖК проводили, сравнивая их время удержания и масс-спектры по имеющим наборам стандартов, сравнением их времени удержания и масс-спектров.



Рисунок 4 - Осаждение полимера

2.2.4. Определение содержания и состава полимера

Внутриклеточную концентрацию и состав полимера определяли хроматографией метиловых эфиров жирных кислот после метанолиза образца (навеска 4 мг) на хромато-масс-спектрометре GCD plus (“Hewlett Packard”, USA). Метанолиз проб полимера проводили следующим образом: к навеске сухой биомассы (4 мг) добавляли 1 мл внутреннего стандарта (0.5 мг бензойной кислоты/1 мл хлороформа), 0.85 мл метанола и 0.15 мл концентрированной серной кислоты и кипятили с обратными холодильниками в течение 2 часов 40 минут. По окончании метанолиза в колбу добавляли двойной объем дистиллированной воды. При этом происходило разделение

жидкостей. Нижний хлороформенный слой использовали для анализа в хроматографии.

2.3. Определение молекулярной массы полимера

Молекулярную массу и молекулярно-массовое распределение полимера исследовали с использованием хроматографа для гельпроникающей хроматографии Agilent Technologies 1260 Infinity (США) относительно полистироловых стандартов (Fluka, Швейцария, Германия). Находили средневесовую (M_v) и среднечисловую (M_n) молекулярную массу, а также полидисперсность ($\overline{P}D = M_v/M_n$).

[изъято 6 стр.]

Выводы

1. Исследовано влияние NaCl на рост бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 и синтез полимера. Показано, что урожай биомассы и полимера в присутствии невысоких концентраций NaCl (5-10 г/л) не отличался от показателей культуры, выросшей в отсутствии NaCl, и составлял соответственно 8.8 -9.2 г/л и 74.1-81% от веса сухой биомассы. Более высокие концентрации NaCl, особенно 25 и 30 г/л, привели к ингибированию роста бактерий и синтезу полимера.
2. Исследование молекулярно-массовых характеристик полимера показало, что увеличение концентрации NaCl с 0 до 15 г/л сопровождалось увеличением среднечисловой и средневесовой молекулярной массы полимера соответственно с 217 и 770 до 276 и 997 кДа.
3. Культивирование бактерий *Cupriavidus eutrophus* B10646 в присутствии NaCl сопровождалось изменениями в жирнокислотном составе внутриклеточных липидов, заключающееся в увеличении коэффициента насыщенности липидов за счет снижения ненасыщенных ЖК (16:1 ω 7, 18:1 ω 7) и увеличения насыщенных (16:0, 18:0).

Список использованных источников

1. Васнев В.А. Биоразлагаемые полимеры. Высокомолекулярные соединения. Сер. Б. М., 1997. Т. 39. № 12. С. 2073-2086.
2. Волова, Т.Г. Влияние лимитирования роста на накопление полиоксибутират у водородокисляющих бактерий / Т.Г. Волова, Я.В. Федорова, Г.С. Калачева // В кн.: Материалы Всес. конф. Лимитирование и ингибирование роста микроорганизмов. - Пущино, 1989. – С. 16-24.
3. Волова, Т.Г. Регуляция синтеза микробного полиоксибутирата параметрами среды / Т.Г. Волова, Г.С. Калачева, Я.В. Федорова // В сб.: Микробная биоконверсия. Рига, 1990. – С. 119-129.
4. Волова, Т.Г. Влияние условий роста на накопление полиоксибутират водородными бактериями / Т.Г. Волова, Г.С. Калачева, В.М. Константинова, А.П. Пузырь // Прикладная биохимия и микробиология, 1992а. – Т. 28. – С. 221-222.
5. Волова, Т.Г. Получение и исследование физико-химических свойств микробных полиоксиалканоатов / Т.Г. Волова, С.Г. Луковенко, А.Д. Васильев // Биотехнология, 1992. - № 1. – С. 19-22.
6. Волова, Т.Г. Беляева О.Г., Плотников В.Ф. Биосинтез гетерополимерных полиоксиалканоатов хемолитотрофными бактериями / Т.Г. Волова, О.Г. Беляева, В.Ф. Плотников // Микробиология, 1998. – Т. 67. – С. 512-517.
7. Волова, Т.Г. Полиоксиалканоаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины / Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая. – Новосибирск.: СО РАН, 2003. – 330 с.
8. Вторичное использование полимерных материалов / Под ред. Е.Г. Любешкиной. - М., 1985. – 192 с.
9. Вторичные ресурсы: проблемы, перспективы, технология, экономика: Учеб. пособие / Г.К. Лобачев, В.Ф. Желтобрюхов и др. – Волгоград, 1999. - 180 с.

10. Заварзин, Г.А. Водородные бактерии и карбоксидобактерии / Г.А. Заварзин. – М.: Наука, 1978. – 240 с.
11. Лобачева Г. К. Комплексный подход к решению организационно-технических проблем предотвращения загрязнения природной среды/ Соавт.: Лобачева Г. К., Солодков С. А., Гучанова И. Ж., Желтобрюхов В. Ф., Шишенко С. В./ Журнал “Проблемы региональной экологии”, 1999 г. – №3. - С. 48-60.
12. Одесс, В.И. Вторичные ресурсы: хозяйственный механизм использования / В.И. Одесс. – М., 1988. – 15 с.
13. Пономарева, В.Т. Использование пластмассовых отходов за рубежом / В.Т. Пономарева, Н.Н. Лихачева, З.А. Ткачик // Пластические массы, 2002. - № 5. - С. 44-48.
14. Утилизация и вторичная переработка полимерных материалов: Учеб. пособие / А.С. Клинков, П.С. Беляев, М.В. Соколов. – Тамбов: ТГТУ, 2005. – 80 с.
15. Шлегель, Г.Общая микробиология / Г. Шлегель. - М.: Мир,1987.- 567 с.
16. Alejandra Rodríguez-Contreras. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel *Bacillus megaterium* strain/ Alejandra Rodríguez-Contreras, Martin Koller, Gerhart Braunegg and María Soledad Marqués-Calvo// New Biotechnology, 2016. V. 33. P. 73-77.
17. Anderson, A.J. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates / A.J. Anderson, E.A. Dawes // Microbiol. Rev., 1990. – V. 54. – P. 450-472.
18. Anderson, A.J. Biosynthesis and composition of bacterial poly(hydroxyalkanoates) / A.J. Anderson, G.W. Haywood, E.A. Dawes // Biol. Macromol, 1990. – V. 12. – P. 102–105.
19. Akiyama, M. Production of poly(3-hydroxyalkanoates) from α,ω -alkanedioic acids and hydroxylated fatty acids by *Alcaligenes* sp. / M. Akiyama, Y. Doi // Biotechnol. Lett., 1993. - V. 15. - P. 163-168.

20. Augusta, J. A rapid evaluation plate-test for the biodegradability of plastics / J. Augusta, H. Widdecke // Appl. Microbiol. Biotechnol., 1993. - V. 39. - P. 673-678.
21. Cain R.B. Microbial degradation of synthetic polymers / In: Frey J.C., Gadd G.M., Herbert R.A., Jones C.W., Watson-Craik I.A. // 48 symposium of the society for general microbiology (University of Cardiff, March 1992): Bath Press. – UK, 1992. – P. 293-338.
22. Cervantes-Uc J. M. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates produced by an extreme halophilic bacterium, Halomonas nitroreducens, isolated from hypersaline ponds/ J. M. Cervantes-Uc, J. Catzin, I. Vargas, W. Herrera-Kao, F. Moguel, E. Ramirez, S. Rincon-Arriaga and G. Lizama-Uc// Journal of Applied Microbiology, 2014. - V. 117. – P. 1056—1065.
23. Chen G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry// Chem Soc Rev., 2009. – V. 38. – P. 2434–46
24. Chen G. Q. Plastics derived from biological sources: present and future: a technical and environmental review/ Chen G. Q, Patel M. Chem Rev., 2012. - V. 112. – P. 2082–99.
25. Chen G. Q. Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates/ Chen G. Q, Wu Q. // Appl Microbiol Biotechnol., 2005. – V. 67. – P. 592–9.
26. Chen C. W. Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. Chen C. W, Don T. M, Yen H. F. // Process Biochem., 2006. – V. 41. – P. 2289–96.
27. De Koning, G.J.M. Biosynthesis of poly-(R)-3-hydroxyalkanoate: an emulsion polymerization / G.J.M. De Koning, I.A. Maxwell // Environ Polym Degrad., 1993. – V. 1. – P. 223-226.
28. Delgado-García M. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries / Delgado-García M, Valdivia-Urdiales B, Aguilar-

González C, Contreras-Esquivel J, Rodríguez-Herrera R. // J Sci Food Agric., 2012. – V. 92. – P. 2575–80.

29. Dhanya Moorkoth. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3 hydroxyvalerate) (PHBV) by a novel halotolerant mangrove isolate/ Dhanya Moorkoth, Kesavan Madhavan Nampoothiri// Bioresource Technology, 2016. – V. 201. – P. 253-260.

30. Doi, Y. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxyvalerate) / Y. Doi, M. Kunioka // Macromolecules, 1990. - V. 23. - P. 26-31.

31. Doi, Y. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by Alcaligenes eutrophus from butyric and pentanoic acids / Y. Doi, A. Tamaki, M. Kunioka, K. Soga // Appl. Microbiol. Biotechnol., 1988. - V. 28. - P. 330-334.

32. Don T. M. Preparation and characterization of 6 poly(hydroxyalkanoate) from the fermentation of *Haloferax mediterranei*. Don T. M., Chen C.W., Chan T.H. // J Biomater Sci Polym Ed., 2006. – V. 17. – P. 1425–38.

33. Fernandez-Castillo R. Accumulation of poly(beta-hydroxybutyrate) by halobacteria/ Fernandez-Castillo R, Rodriguez-Valera F, Gonzalez-Ramos J, Ruiz-Berraquero F. // Appl Environ Microbiol., 1986. – V. 51. – P. 214–6.

34. Geetanjali Manchanda. Salinity and its effects on the functional biology of legumes/ Geetanjali Manchanda, Neera Garg// Acta Physiol Plant., 2008. – V. 30. – P. 595–618.

35. Green, Ph.R. Formation of short chain|medium chain lehgth polyhydroxyalkanoate cpolymers by fatty acid β -oxidation inhibited *Ralstonia eutropha* / Ph.R. Grenn, J. Kemper, L. Schechtman, L. Guo, M. Satkowski, S. Fiedler, A. Steinbüchel, H.A. Rehm // Biomacromol., 2002. – V. 3. – P. 208-213.

36. Han J. Molecular characterization of the phaECHm genes, required for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in the extremely halophilic archaeon

Haloarcula marismortui/ Han J, Lu Q, Zhou L, Zhou J, Xiang H. // Appl Environ Microbiol., 2007. – V. 73. – P. 6058–65.

37. Hozzein WN. Characterization of a new protease produced by a thermohalo alkali tolerant *Halobacillus* strain / Hozzein WN, Reyad AM, Hameed MSA, Ali MIA. // J Pure Appl Microbiol., 2013. – V. 7. – P. 509–15

38. Ibrahim, M. H. *Zobellella denitrificans* strain MW1, a newly isolated bacterium suitable for poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol./ Ibrahim, M. H. Steinbüchel, J. Appl. Microbiol., 2010. – V. 108. – P. 214–25.

39. Ibrahim, M. H. Poly(3-hydroxybutyrate) production from glycerol by *Zobellella denitrificans* MW1 via high-cell-density fed-batch fermentation and simplified solvent extraction/ Ibrahim, M. H. a; Steinbüchel, A.// Appl. Environ. Microbiol., 2009. – V. 75. – P. 6222–31.

40. Jendrossec, D. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids / D. Jendrossec, A. Schirmer, H.G. Schlegel // Appl. Microbiol. Biotechnol., 1996. - V. 46. - P. 451-463.

41. Jin Yin. Halophiles, coming stars for industrial biotechnology/ Jin Yin, Jin-Chun Chen, Qiong Wu, Guo-Qiang Chen// Biotechnology Advances, 2014. V. 33. – P. 1433-1442.

42. Jorge Quillaguamán, Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects/ Jorge Quillaguamán, Héctor Guzmán, Doan Van-Thuoc, Rajni Hatti-Kaul// Appl Microbiol Biotechnol, 2010. V.85. – P. 1687–1696.

43. Kamnev A. A. Endophytic and epiphytic strains of *Azospirillum brasiliense* respond differently to heavy metal stress/ Kamnev A.A., Tugarova A.V., Antonyuk L.P.// Microbiology, 2007. – V. 76. – P. 809-811.

44. Karima H. A. Salama. NaCl-induced changes in plasma membrane lipids and proteins of *Zea mays* L. cultivars differing in their response to salinity/ Karima H. A. Salama, Mohamed Magdy F. Mansour, Fatma Z. M. Ali, Ayman F. Abou-hadid// Acta Physiol Plant., 2007. – V. 29. – P. 351–359.

45. Khanna, S. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates / S. Khanna, K. Ashok // Process Biochemistry, 2004. - V. 40. - P. 607-619.
46. Kirk RG. Ultrastructure of two species of Halobacterium/ Kirk RG, Ginzburg M. // J Ultrastruct Res., 1972. – V. 41. – P. 80–94.
47. Kijchavengkul T. Perspective compostability of polymers/ Kijchavengkul T., Auras R. // Polymer International, 2008. – V. 57. – P. 793–804.
48. Kim, B.S. Control of glucose feeding using exit gas data and its application to the production of PHB from tapioca hydrolysates by Alcaligenes eutrophus / B.S. Kim, H.N. Chang // Biotechnol. Tech., 1995. - V. 9. - P. 311-314.
49. Kim, J.S. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by Ralstonia eutropha / J.S. Kim, B.H. Lee, B.S. Kim // Biochemical Engineering Journal, 2005. – V. 23. - P. 169-174.
50. Koller M. Biosynthesis of high quality polyhydroxyalkanoate co-and terpolyesters for potential medical application by the archaeon Haloferax mediterranei/ Koller M, Hesse P, Bona R, Kutschera C, Atlic A, Braunegg G. // Macromol Symp., 2007. – V. 253. – P. 33–9.
51. Kunioka, M. Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by Alcaligenes eutrophus / M. Kunioka, Y. Kawaguchi, Y. Doi // Appl. Microbiol. Biotechnol., 1989a. - V. 30. - P. 569-573.
52. Kunioka, M. New bacterial copolyesters produced in Alcaligenes eutrophus from organic acids / M. Kunioka, Y. Nakamura, Y. Doi // Polym. Commun., 1989b. - V. 29. - P.174-176.
53. Lee, I.Y. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) from glucose and valerate in Alcaligenes eutrophus / I.Y. Lee, M.K. Kim, G.J. Kim, H.N. Chang, Y.H. Park // Biotechnol. Lett., 1995. - V. 17. - P. 571-574.
54. Lee, Y.H. Regulating the molar fraction of 4-hydroxybutyrate in poly(3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate) biosynthesis by Ralstonia eutropha

using propionate as a stimulator / Y.H. Lee, M.S. Kang, Y.M. Jung // Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000. - V. 89. - P. 380-383.

55. Legault B. A. Environmental genomics of “*Haloquadratum walsbyi*” in a saltern crystallizer indicates a large pool of accessory genes in an otherwise coherent species/ Legault BA, Lopez-Lopez A, Alba-Casado JC, Doolittle WF, Bolhuis H, Rodriguez-Valera F, et al. // BMC Genomics., 2006. – V. 7. – P. 171.

56. Lillo J. G. Effects of culture conditions on poly(β -hydroxybutyric) acid production by *Haloferax mediterranei* / Lillo JG, Rodriguez-Valera F. // Appl Environ Microbiol., 1990. – V. 56. – P. 2517–21.

57. Louis P. Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli* / Louis P, Galinski E. // Microbiology, 1997. – V. 143. – P. 1141–9.

58. Madison L.L. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic/ Madison LL, Huisman GW// Microbiol Mol Biol Rev MMBR, 1999. – V. 63 – P. 21-53

59. Marchessault, R.H. Chemical, enzymatic and microbial degradation of bacterial and synthetic poly-R-hydroxyalkanoates / R.H. Marchessault, C.J. Monasterios, J.J. Jesudason, B. Ramsay, I. Saracovan, B. Saito // Polym. Degrad. Stab., 1994. - V. 45. - P. 187-196.

60. Mergeart, J. Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polyesters / J. Mergeart, J. Swings // Microbiol., 1996. - V. 17. - P. 463-469.

61. Mothes, G. Production of PHB from Crude Glycerol/ Mothes, G.; Schnorpfeil, C.; Ackermann, J.-U.// Eng. Life Sci., 2007. – V. 5. – P. 475–479.

62. Obruca, S. Production of poly(3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate/ Obruca, S.; Marova, I.; Snajdar, O.; Mravcova, L.; Svoboda, Z.// Biotechnol. Lett., 2010. – V. 32. – P. 1925–32.

63. Oren A. Bioenergetic aspects of halophilism // *Microbiol Mol Biol Rev.*, 1999. – V. 63. – P. 334–8.
64. Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications // *Ind Microbiol Biotechnol.*, 2002. – V. 28. – P. 56–63.
65. Oren A. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity // *Saline Syst.*, 2008. – V. 4. – P. 2.
66. Palmeiro-Sánchez T. Transient concentrations of NaCl affect the PHA accumulation in mixed microbial culture/ T. Palmeiro-Sánchez, A. Fra-Vázquez, N. Rey-Martínez, J. L. Campos, A. Mosquera-Corral// *Journal of Hazardous Materials*, 2016. – V. 306. – P. 332-339.
67. Pearl Passanha. The use of NaCl addition for the improvement of polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator*/ Pearl Passanha , Gopal Kedia, Richard M. Dinsdale, Alan J. Guwy, Sandra R. Esteves// *Bioresource Technology*, 2014. – V. 163. – P. 287-294.
68. Pham T.H. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation/ Pham T.H., Webb, J.S., Rehm, B.H.A.// *Microbiology*, 2004. – V. 150. – P. 3405-3413.
69. Philip S. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications/ Philip S, Keshavarz T, Roy I. // *J Chem Technol Biotechnol.*, 2007. – V. 82. – P. 233–47.
70. Pratiksha Bhadauriya. NaCl induced metabolic changes in the diazotrophic cyanobacterium *Anabaena cylindrica*/ Pratiksha Bhadauriya, Radha Gupta, Surendra Singh, Prakash Singh Bisen// *World J Microbiol Biotechnol.*, 2009. V. 25. – P. 341–345.
71. Quillaguamán J. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects / Quillaguamán J, Guzmán H, Van-Thuoc D, Hatti-Kaul R. // *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2010. – V. 85. – P. 1687–96.

72. Roberts M. F. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms // Saline Syst., 2005. – V. 1. – P. 1–30.
73. Rodríguez-Valera F. Halobacteria as producers of polyhydroxyalkanoates/ Rodríguez-Valera F, Lillo JAG. // FEMS Microbiol Rev., 1992. – V. 103. – P. 181–6.
74. Setati M. E. Diversity and industrial potential of hydrolase-producing halophilic/ halotolerant eubacteria. // Afr J Biotechnol., 2010. – V. 9. – P. 1555–60.
75. Steinbuchel, A. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids / A. Steinbuchel, H.E. Valentin // FEMS Microbiol Lett., 1995. – V. 128. – P. 219-228.
76. Stubbe, J. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of PHA synthase / J. Stubbe, J. Tian // Nat. Prod. Rep., 2003. – V. 20. – P. 445–457.
77. Sudesh, K. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters / K. Sudesh, H. Abe, Y. Doi // Prog. Polym. Sci., 2000. – V. 25. – P. 1503–1555.
78. Tran Huu Phonga. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers by Yangia sp. ND199 from different carbon sources/ Tran Huu Phonga, Doan Van Thuoc, Kumar Sudesh// International Journal of Biological Macromolecules, 2016. – V. 84. – P. 361-366.
79. Van-Thuoc D. Polyester production by halophilic and halotolerant bacterial strains obtained from mangrove soil samples located in Northern Vietnam/ Van-Thuoc D, Huu-Phong T, Thi-Binh N, Thi-Tho N, Minh-Lam D, Quillaguamán J. // Microbiologyopen., 2012. – V. 1. – P. 395–406.
80. Vargas C. Unravelling the adaptation responses to osmotic and temperature stress in Chromohalobacter salexigens, a bacterium with broad salinity tolerance / Vargas C, Argandona M, Reina-Bueno M, Rodriguez-Moya J, Fernandez-Aunion C, Joaquin JN. // Saline Syst., 2008. – V. 4. – P. 14.
81. Ventosa A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria / Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. // Microbiol Mol Biol Rev., 1998. – V. 62. – P. 504–44.

82. Volova T.G. Degradable Polymers: Production, Properties and Applications / Volova T.G., Shishatskaya E.I., Sinskey A.J. // New York: Nova Science Pub., 2013. – P. 380.

83. Witt, U. Biodegradation of polyester copolymers containing aromatic compounds / U. Witt, R.J. Meller, J. Klein // J.M.S. Pure Appl. Chem., 1997. – V. 32. – P. 851-856.

84. Yue H. A seawater based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates / Yue H, Ling C, Yang T, Chen X, Chen Y, Deng H, et al. // Biotechnol Biofuels., 2014. – V. 7. – P. 108.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова

« 01 » июня 20 14 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01

Влияние NaCl на рост *Cupriavidus eutrophus* B-10646,
синтез полимера и жирнокислотный состав липидов

Руководитель



канд. био. наук

подпись, дата

Н.О. Жила

инициалы, фамилия

Выпускник



Н.А. Капустина

инициалы, фамилия

Красноярск 2017