

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

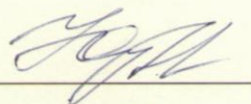
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА
ИЗ ГАЛОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ *SALINIVIBRIO* SP. EG6S8QL**

Автореферат бакалаврской работы
студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета
Доливец Юлии Павловны

Научный руководитель
доцент кафедры
биохимии и биофизики, к.б.н.



подпись, дата

Ю. П. Федоненко

Зав. кафедрой биохимии и
биофизики, профессор, д.б.н.



подпись, дата

10.06.2021г.

С. А. Коннова

Саратов 2021

Список сокращений

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

ИК-Фурье-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия с фурье-преобразованием

МС – масс-спектрометрия

ПГА – полигидроксиалканоаты

ПГБ – полигидроксибутират

ТГА – термогравиметрический анализ

ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

Введение. Пластмассы используются в быту и практически во всех отраслях промышленности, поскольку их стоимость, легкость производства и эффективность использования составляют неоспоримое преимущество по сравнению с другими материалами. Однако устойчивость изделий из пластмасс к биоразложению постепенно привела к проблеме накопления большого количества неразлагающегося пластика в окружающей среде. Одно из перспективных направлений решения данной проблемы – использование биопластика, который при сохранении всех преимуществ синтетических полимеров способен к разложению ферментативными системами микроорганизмов.

В группу биопластиков входят полимерные соединения различной природы: полигидроксиалканоаты (ПГА), такие как полигидроксивалерат, полигидроксибутират (ПГБ), полигидроксигексаноаты, а также полимолочные кислоты, полисахариды (целлюлоза, крахмал и их производные), полиамиды, белковые, липидные биопластики и т.д. ПГА представляют собой термопластичные полимеры, которые вырабатываются микроорганизмами и некоторыми растениями, и используются в различных сферах деятельности человека: медицине, фармации, сельском хозяйстве, пищевой промышленности, лакокрасочной промышленности и т.д. В

настоящее время известно достаточно большое число грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, синтезирующих ПГА.

Наиболее используемым представителем биопластиков группы ПГА является ПГБ. Промышленное получение ПГБ основано на экстракции полимера из биомассы микробных культур, культивируемых на возобновляемых материалах в стерилизованных средах. Для оптимизации производства ПГБ необходим подбор условий, увеличивающих скорость производства и выход целевого продукта. Также актуальность сохраняет поиск новых штаммов продуцентов ПГБ. В связи с этим, целью работы явилась оценка способности к накоплению ПГБ галофильными бактериями *Salinivibrio* sp. EG6S8QL, изолированными из озера Карун (Египет), и исследование биodeградации пленочных форм гомополимера ПГБ в двух образцах агрогеннопреобразованных почв, различающихся по микробиологическому составу.

Для реализации целей решали следующие задачи:

1. подобрать методы микроскопического определения внутриклеточного накопления ПГБ, позволяющие проводить скрининг бактерий-продуцентов полимера;
2. оптимизировать метод количественного выделения ПГБ из биомассы бактерий и охарактеризовать полученный полимер;
3. исследовать динамику накопления ПГБ у отобранного по результатам скрининга штамма галофильных бактерий *Salinivibrio* sp. EG6S8QL;
4. оценить степень деградации ПГБ в лабораторных условиях в лесной и огородной почвах с различной структурой микробиоценозов.

Структура и объем работы. Работа изложена на 63 страницах машинописного текста и включает 7 разделов: список сокращений и условных обозначений, введение, обзор литературы, материалы и методы,

результаты исследований и их обсуждение, заключение, список использованных источников, содержащий 77 наименований.

Основное содержание работы: ПГБ – стереорегулярный гомополигидроксиалканонат, обладающий оптической активностью, относится к классу сложных полиэфиров. ПГБ характеризуется линейной изотактической структурой (все повторяющиеся единицы имеют одинаковую стереохимическую конфигурацию) с абсолютной D-конфигурацией хиральных центров. Наличие метильной функциональной группы (CH_3) и группы сложноэфирных связей ($-\text{COOR}$) в ПГБ обеспечивает его термопластичные, гидрофобные, высокие кристаллические характеристики. ПГБ встречается в виде единичного полимера или как часть сополимеров и смесей. ПГБ растворяется в хлороформе, трихлорэтилене, этилацетате, диметилформальдегиде, феноле, ледяной уксусной кислоте; не растворяется в метаноле, этаноле, ацетоне, воде, разбавленных минеральных кислотах. Молекулярная масса ПГБ (колеблется от 10 кДа до 3 МДа) зависит от его источника, условий роста и метода экстракции.

Ассимилированные источники углерода биохимически трансформируются в гидроксиалканонатные звенья, полимеризуются и содержатся в виде нерастворимых в воде включений в цитоплазме клетки. Способность осуществлять этот процесс полимеризации зависит от наличия ключевого фермента, известного как ПГА-синтаза.

ПГБ является биodeградируемым ферментами микроорганизмов в биологически активных средах, таких как почва, пресная вода, а также при аэробном и анаэробном компостировании, что делает его востребованной экологически чистой альтернативой синтетическим полимерам.

Работа проводилась на базе ИБФРМ РАН в 2020-2021 гг. Штамм *Salinivibrio* sp. EG6S8QL (IBPPM515), выделенный из образца соли солёного озера Карун (провинция Эль-Файюм, Египет), был любезно предоставлен

Коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (WDCM 1021; <http://collection.ibppm.ru>).

Галофилы считаются перспективными агентами для биотехнологического производства ПГА, поскольку они продуцируют полимер от 65 % и выше от своей биомассы, часто продуцируемые ПГА характеризуются высокой молекулярной массой. Мы использовали галофильные бактерии для тестирования способности продуцировать и накапливать ПГА/ПГБ. По результатам скрининга – световой и флуоресцентной микроскопией – был отобран штамм *Salinivibrio* sp. EG6S8QL, который характеризовался наиболее выраженным накоплением красителей при микроскопическом исследовании.

Представители рода *Salinivibrio* были изолированы из различных мест обитания, таких как водные гиперсоленые системы, растворы и засоленные почвы, и представляли собой умеренно галофильные бактерии, населяющие широкий спектр экологических сред обитания, включая гиперсоленые среды. Род *Salinivibrio* относится к семейству *Vibrionaceae*, классу *Gammaproteobacteria*. *Salinivibrio* sp. EG6S8QL – граммотрицательная бактерия, не образующая спор, не патогенная, является факультативным анаэробом, которая может жить как в аэробной, так и в анаэробной среде, имеет палочковидную форму.

Представители рода *Salinivibrio* обладают большим биосинтетическим потенциалом для получения ПГБ.

Динамику накопления гранул ПГА/ПГБ клетками исследуемого штамма после 1, 3, 5 и 7 суток культивирования осуществляли методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ).

Для выделения и характеристики структурных особенностей ПГА бактерии штамма EG6S8QL культивировали в течение 3 сут в жидкой среде S-G, затем бактериальные клетки осаждали центрифугированием (3000 g, 30 мин). Сырую биомассу бактерий (2 г) обрабатывали 25 мл 5 % NaOCl

(коммерческий препарат «Белизна»), инкубируя в конических центрифужных пробирках (50 мл) на водяной бане в течение 2 ч при 60 °С, при этом каждые 30 мин суспензию биомассы интенсивно перемешивали на вортексе.

Осаждение модифицированных клеток осуществляли центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин при 4 °С. Осадок промывали дважды дистиллированной водой, вновь пересаждали центрифугированием при тех же условиях и промывали этанолом.

Экстракцию полимерных гранул ПГА проводили в хлороформе (в соотношении 1:1), фильтровали и высушивали на часовых стеклах при комнатной температуре с последующим определением выхода полимера.

Характеристику структуры выделенного полимера осуществляли методом ИК-Фурье-спектроскопии. Тонкую пленку образца (2 мг) помещали в кюветное отделение прибора и регистрировали спектры пропускания в диапазоне 4000–400 см⁻¹ с разрешением 4 см⁻¹ для интерпретации наличия специфических функциональных групп в экстракте.

Химическую структуру экстрагированного ПГБ из *Salinivibrio* sp. EG6S8QL определяли методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Экстрагированный полимер суспендировали в CDCl₃ в концентрации 10 мг/мл. В качестве внутреннего калибровочного стандарта использовался тетраметилсилан.

Для ТГА-ДСК-МС измельченный образец (5,89 мг) ПГБ помещали в платиновые лотки и анализировали в атмосфере аргона. Нагрев осуществляли в диапазоне температур от 35 до 1050 °С с шагом 20 °С/мин.

Дальнейшая работа заключалась в проведении исследования биодegradации пленочных образцов ПГБ, синтезированных культурой бактерий *Salinivibrio* sp. EG6S8QL. Сравнительное исследование биодegradации пленок ПГБ проводили в лабораторных условиях в почвенных микросистемах. В пластиковые контейнеры объемом 450 см³ помещали почвы двух агрогеннопреобразованных образцов – лесной и

огородной (Саратовская область, г. Саратов, природный парк Кумысная поляна) и выдерживали до окончательного сухого веса по 210 г. Параллельно с оценкой биodeградации пленок ПГБ осуществлялась характеристика микробиологического состава почвы. Длительность эксперимента составляла 35 сут. В динамике определяли уменьшение массы образцов с периодичностью в 7 сут. Образцы после изъятия из почвы отмывали дистиллированной водой и взвешивали. Показателями биodeградации ПГБ были: убыль массы образцов; морфология и свойства поверхности пленок ПГБ.

В клетках *Salinivibrio* sp. EG6S8QL через 72 ч культивирования на среде S-G были выявлены крупные гранулы ПГА/ПГБ. Синтез биополимера был подтвержден окрашиванием микробиологического мазка исследуемой культуры суданским черным, ПГБ проявлялся в виде черных гранул. Все клетки бактериальной популяции интенсивно накапливали краситель по всему объему клеток, что свидетельствовало о продукции ПГА/ПГБ. После инкубации суспензии бактерий *Salinivibrio* sp. с красителем нильским красным и его последующей декантации, клетки анализировали методом флуоресцентной микроскопии. Краситель активно связывался с гранулами ПГА/ПГБ, о чем свидетельствует интенсивная флуоресценция клеток (ярко красный, оранжевый цвет).

Динамику накопления гранул ПГБ клетками исследуемого штамма после 1, 3, 5 и 7 суток культивирования осуществляли методом ТЭМ. Увеличение как числа, так и размера гранул ПГБ в цитоплазме клеток, отобранных из культуры на разных сроках выращивания, согласуется с количественными данными клеточного содержания ПГБ.

Нами было установлено, что выход полимера, экстрагированного из биомассы хлороформом после предварительной обработки NaOCl (что позволило повысить выход полимера примерно на 20 %.), составил 93 % сухой массы бактериальных клеток, что соответствовало 9,3 г/л.

ИК-спектр полимера, выделенного из клеток *Salinivibrio* sp. EG6S8QL соответствовал описанным ранее спектрам ПГБ.

Полученные сигналы при ЯМР-спектроскопии практически идентичны таковым, полученным для ПГБ, выделенного из *Cupriavidus necator*, который считается одним из наиболее исследуемых видов бактерий среди ПГА-продуцирующих микроорганизмов. Отсутствие в спектре посторонних сигналов свидетельствует о высокой степени очистки выделенного полимера.

Анализ термической стабильности выделенного образца полимера подтвердил его высокую чистоту. Наибольшая потеря массы – 99,29 % – наблюдалась при температуре около 300 °С, что объясняется процессом разложения полимера. Кривая ДСК выявила два четко разрешенных эндотермических пика при температуре ниже 200 °С, при этом процессы, согласно кривой ТГА, не сопровождаются потерями массы образца. Первый из них соответствовал фазовому переходу, начинающемуся примерно при 142 °С, что может быть объяснено перегруппировкой полимерной цепи ПГБ с последующим большим расходом тепла, начинающимся примерно при 162 °С с максимумом при 172 °С (T_m), который соответствует процессу плавления. Степень кристалличности образца ПГБ соответствует 60,11 %.

Согласно данным масс-спектрометрии (МС), основным газообразным продуктом разложения является мономер поли-3-гидроксипропановой кислоты.

Одним из важных критериев экологичности использования продуктов из ПГБ является их способность к биodeградации в различных экосистемах.

Исследование образцов почв выявило следующие отличия: лесная почва характеризовалась реакцией, близкой к нейтральной (рН 7,2), электропроводностью равной 40, в то время как огородная почва сильно агрогеннопреобразованная – слабощелочной реакцией среды (рН 7,5), электропроводностью равной > 50.

Были показаны различия в составе эколого-трофических групп микроорганизмов в ходе микробиологического анализа исходных образцов лесной и огородной почв. После экспозиции в почве пленок ПГБ количественный состав микробного сообщества изменился.

Биодеградация полимера в лесной и огородной почве происходила с различной интенсивностью. В течение первых 7 суток отмечена убыль массы всех пленочных образцов, далее наступила фаза интенсивной деструкции, когда масса образцов убывала более активно, и к 25 суткам полностью разложился образец в огородной почве, к 35 суткам – в лесной почве.

Была подсчитана скорость биодеградации. Для полудиска из огородной почвы она составила - 6 %, - 32 %, - 66 %, а для полудиска из лесной почвы – - 4 %, - 21%, - 52%, соответственно.

По мере деструкции пленок и убыли их массы поверхность становилось всё более шероховатой и неровной, толщина пленок уменьшалась. Наблюдалось образование пор, которых не было в исходных образцах. Количество и размеры этих пор возрастали в ходе эксперимента. С увеличением количества перфораций целостность пленок нарушалась, и далее они распадались на мелкие отдельные фрагменты до полного исчезновения последних. Для пленок, экспонированных в лесной почве, характерно более длительное сохранение массы и формы. Разрушение ПГБ в огородной почве происходило несколько быстрее, чем в лесной.

Заключение: В нашей работе была продемонстрирована для штамма галофильной бактерии *Salinivibrio* sp. EG6S8QL с использованием микроскопических методов с селективными красителями и метода электронной микроскопии способность к высокому уровню продукции ПГБ.

Целесообразность биотехнологического использования ПГБ из штамма *Salinivibrio* sp. обусловлена высоким уровнем выхода полимера и сокращением времени экстракции, который удалось достичь, оптимизировав методику выделения из бактериальной массы предварительной обработкой

клеток NaOCl с последующей инкубацией в хлороформе. Структура выделенного полимера из клеток *Salinivibrio* sp. EG6S8QL и его гомогенность доказана на основании данных ТГА-ДСК с МС-детекцией продуктов распада, ИК-фурье- и ЯМР-спектроскопии.

Полученные нами результаты по оценке скорости деградации выделенного нами полимера в агрогеннопреобразованных почвах свидетельствуют, что выявленные отличия обусловлены различиями микробных сообществ исследуемых образцов почвы.

Анализ полученных нами в данной работе результатов позволяет сделать следующие выводы:

1) методами световой, флуоресцентной и электронной микроскопии была подтверждена способность исследуемой культуры *Salinivibrio* sp. EG6S8QL к продукции ПГБ;

2) определены условия культивирования *Salinivibrio* sp. EG6S8QL в среде S-G при pH 7,5 в течение 72 часов при 30 °C для максимального накопления ПГБ;

3) методами ИК-фурье- и ЯМР-спектроскопии установлено, что выделенный полимер из *Salinivibrio* sp. EG6S8QL является ПГБ высокой степени чистоты. Анализ полимера методом ТГА-ДСК-МС показал, что основным газообразным продуктом разложения является мономер поли-3-гидроксипропановой кислоты;

4) полимерные пленки из ПГБ *Salinivibrio* sp. EG6S8QL подвергались полной деградации в агрогеннопреобразованных почвах с различной интенсивностью.