

УДК 577.12:579.841.3

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА СИНТЕЗ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ *Rhizobium phaseoli*

© 2020 г. О. В. Космачевская¹, Е. В. Осипов¹, Чан Ван Ти², Фам Тхи Туэт Май², А. Ф. Топунов^{1, *}

¹Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

²Университет сельского и лесного хозяйства, Тхайнгуен, 251210 Вьетнам

*e-mail: aftorunov@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.07.2019 г.

После доработки 20.08.2019 г.

Принята к публикации 30.08.2019 г.

Изучен синтез поли-3-гидроксимасляной кислоты (ПГБ) в клетках клубеньковых бактерий *Rhizobium phaseoli*, выращенных в глубинной культуре. Модифицирован метод Лоу для определения ПГБ, что позволило выделить и определить количество полимера непосредственно в биомассе. Только S-формы клеток *R. phaseoli* были способны к синтезу ПГБ. На богатой углеродом среде накопление ПГБ шло сильнее (примерно на 50%), а гранулы полимера были более ярко выражены. Синтез ПГБ увеличивался при понижении аэрации, а максимум содержания достигался к 35–40 ч роста. Было изучено влияние окислительного стресса, вызываемого пероксидом третбутила и бензилвиологеном на рост бактерий, синтезирующих ПГБ. Оба вещества негативно влияли на рост бактерий, при этом рост восстанавливался только у S-формы, синтезирующей ПГБ. Можно сделать вывод, что ПГБ является протектором для клубеньковых бактерий при окислительном стрессе. Максимальное содержание ПГБ в клетках *R. phaseoli* достигало 54% от сухой массы клеток, что превышает значения, ранее описанные для клубеньковых бактерий. Эта величина близка к значениям, характерным для бактериальных штаммов — продуцентов полимера, использующихся в биотехнологии. Можно сделать вывод, что клубеньковые бактерии, выращенные в глубинной культуре, могут быть потенциальными продуцентами ПГБ и других полигидроксикарбоновых кислот.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, *Rhizobium phaseoli*, поли-3-гидроксibuтират, R- и S-формы бактерий, окислительный стресс

DOI: 10.31857/S0555109920010109

Липидоподобные включения, окрашивающиеся липофильными красителями, впервые были обнаружены в бактериях *Azotobacter chroococcum* в начале прошлого столетия [1]. Состав вещества был выяснен в 1926 г. благодаря наблюдению, что в анаэробных условиях происходит подкисление суспензии *Bacillus megaterium*.

Образовавшаяся кислота была идентифицирована как 3-гидроксимасляная, а вещество — источник этой кислоты, как поли-3-гидроксibuтират (ПГБ) [2]. В конце 1950 гг. была опубликована работа, посвященная синтезу ПГБ у бактерий рода *Bacillus*, где была описана процедура выделения гранул ПГБ щелочным гипохлоритом [3]. Стало возможным выделять ПГБ из клеток, была исследована динамика роста и синтеза ПГБ для водородоокисляющей бактерии *Alcaligenes eutrophus* (современное название — *Ralstonia eutropha*).

Обнаружено увеличение содержания ПГБ в клетках в стационарной фазе, когда число клеток

оставалось постоянным [4]. В последующих работах изучался синтез полимера на разных средах, ферменты, участвующие в синтезе. К концу 60 гг. стало ясно, что синтез этого резервного полимера — широко распространенное явление среди грамотрицательных бактерий. В обзоре [5] ПГБ впервые рассматривался как бактериальное резервное вещество, функционально аналогичное крахмалу и гликогену у эукариот. ПГБ — это лишь один из возможных полимеров группы полигидроксикарбоновых (ПГА), которые могут содержать в качестве мономеров и другие подобные гидроксibuтирату соединения.

В дальнейшем было описано клонирование генов, участвующих в биосинтезе резервных полиэфиров, были клонированы гены *R. eutropha*, кодирующие ферменты биосинтеза ПГА, и полученные рекомбинантные штаммы *Escherichia coli* с функционально активным комплексом этих генов [6–8]. Детальные исследования на *R. eutropha*

показали, что только три фермента участвуют в биосинтезе ПГБ из ацетил-КоА. Ключевым является фермент, ответственный за реакцию полимеризации и названный ПГА-синтазой. К настоящему времени клонировано около 40 структурных генов ПГА-синтазы из более чем 30 видов бактерий. Успешное клонирование генов биосинтеза ПГА сделало возможным создание трансгенных растений, которые рассматриваются как возможные продуценты ПГА в будущем [9, 10].

ПГБ был обнаружен у многих азотфиксирующих бактерий, в том числе у *Azotobacter* и *Rhizobium* [11], причем у всех исследованных видов этих родов. Практически сразу обмен ПГБ стали связывать с процессом фиксации атмосферного азота, а поскольку клубеньковые бактерии (КБ) рода *Rhizobium* фиксируют азот в условиях симбиоза с бобовыми растениями, то обмен ПГБ в основном изучали в бактериоидах — симбиотической форме этих бактерий, находящейся в клубеньках. Было показано, что в бактериоидах *Rhizobium* содержится гранулы ПГБ, содержание которой может достигать 50–60% от сухой массы клетки [12, 13]. Накопление ПГБ было показано и для бактериоидов КБ, которые теперь относят к роду *Bradyrhizobium*: *B. japonicum* и *B. elkanii* [14]. Бактериоиды *R. meliloti* являются одним из видов, который не накапливает ПГБ во время симбиоза [15].

У многих бактерий ПГБ известен в качестве запасного вещества, активно участвующего в метаболизме углеводов и обмен которого тесно связан с функционированием цикла Кребса [5, 12]. Показано, как ризобийные штаммы аккумулируют ПГА в качестве аккумуляторов энергии [16]. Накопленный в бактериях ПГА способствует быстрой колонизации ризосферы, эффективной нодуляции и азотфиксации [17], при этом способность накапливать ПГБ бактериоидами в клубеньке прямо коррелирует с типом клубенька: детерминированным или недетерминированным [16].

В Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН было показано, что в процессе вегетации бобовых растений скорость распада ПГБ в бактериоидах *R. lupini* (сейчас *Bradyrhizobium lupini*) наиболее высока при максимальной азотфиксации [18], когда ферменты синтеза и распада ПГБ особенно активны [19]. На основании этих и некоторых других данных можно сделать заключение, что при азотфиксации одновременно происходит и синтез и распад ПГБ, то есть это запасное вещество находится в состоянии активного обмена. ПГБ обеспечивает метаболизм бактериоидов в микроаэробных условиях, существующих в центральной зоне клубенька, когда основная часть кислорода задерживается барьером газовой диффузии в коре, а кислород поступает к бактериоидам в связанным с леглоблином — симбиотическим гемоглобином бобового растения [20–23].

В то же время работ по изучению ПГБ в клубеньковых бактериях, находящихся в свободноживущем состоянии, крайне мало. Можно отметить работу Стама с соавт. о распаде ПГБ в бактериях рода *Rhizobium* [24], и статью о функционировании генов, отвечающих за синтез этого полимера в бактериях *Rhizobium* и *Bradyrhizobium* [25]. Поскольку в свободноживущем состоянии нитрогеназа в бактериях не экспрессируется, ПГБ работает как “утилизатор” для избытка НАД(Ф)Н при не очень активном цикле Кребса. Регулируя три разных пути окисления НАД(Ф)Н, различные штаммы *Rhizobium* способны функционировать в разных условиях [26].

Цель работы — изучение влияния условий выращивания на синтез ПГБ различными формами клубеньковыми бактериями *R. phaseoli* в глубинной культуре.

МЕТОДИКА

Использованные реактивы. В работе использовали среду LB, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, PMSF, восстановленный глутатион, глутамат натрия, ксилит — “AppliChem” (Германия); бензилвиологен — Merck” (Германия); Трис — “ICN” (США); пероксид трет-бутила, сафранин, Судан черный В — “Sigma-Aldrich” (США); Нильский красный — “Acros Organics” (Бельгия); пероксид водорода, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$; MgSO_4 ; NaCl, HCl, H_2SO_4 , NaNO_2 , H_3PO_4 , CH_3COONa , маннит, уксусная кислота, этанол, хлороформ, этиленгликоль, NaOH, KH_2PO_4 (Россия). Гороховая мука была приготовлена размолотом коммерческих сухих семян гороха посевного лушительного (*Pisum sativum* L. convar. *sativum*), выращенного в Ставропольском крае (Россия).

Условия культивирования. В работе использовали клубеньковые бактерии *R. phaseoli* (эффективный штамм 682) из коллекции ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии (Москва, Россия).

В опытах были использованы питательные среды следующего состава (г/л). Питательная среда № 1: гороховая мука — 10; маннит — 6, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ — 2.8; MgSO_4 — 0.2; KH_2PO_4 — 0.5; NaCl — 0.1. Питательная среда № 2: гороховая мука — 10; CH_3COONa — 5; глутамат натрия — 1.5; маннит — 15, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ — 2.4; MgSO_4 — 0.2; KH_2PO_4 — 0.5; NaCl — 0.1. Соотношение количества С : N составляло: для среды № 1 — 3 : 1; для среды № 2 — 20 : 1. Для поддержания культуры использовали агаризованную (3%) среду № 2. Для выращивания посевного материала смешивали равные объемы среды № 1 и № 2.

Для изучения биосинтеза ПГБ в аэробных условиях бактерии выращивали в колбах Эрленмейера со 150 мл питательной среды на качалке (200 об./мин) при 28°C. Посевную культуру выращивали в течение 24 ч до оптической плотности

$A_{600} = 0.2-0.25$. Посев проводили смывом со скошенного агара (S-форма) или 2 мл культуры, замороженной в глицерине (R-форма). В вариантах опыта в колбы вносили по 10% посевного материала, затем культивировали в течение 60 ч. При синтезе ПГБ в микроаэрофильных условиях пробки колб со средой № 2 заматывали полиэтиленовой пленкой, предотвращавшей доступ воздуха к культуральной жидкости. Отбор проб в обоих случаях производили каждые 6 ч, в пробах определяли концентрацию биомассы и содержание ПГБ.

Обработка клеток редокс-медиаторами. На 38 ч культивирования в микроаэрофильных условиях (стационарная фаза роста, пик накопления ПГБ) в колбы вносили водный раствор пероксида трет-бутила до конечной концентрации 0.1 мМ или раствор бензилвиолгенона в этаноле до конечной концентрации 1.0 мМ. После добавления редокс-медиаторов отбор проб производили каждые 2 ч в течение 10 ч, далее – каждые 6 ч, определяли концентрацию биомассы и содержание ПГБ.

Биомассу (С) определяли по оптической плотности культуральной суспензии при $\lambda = 600$ нм отнositельно среды без клеток: $C = A_{600}/0.134$ мг/мл.

Определение ПГБ. Для определения ПГБ в бактериях применяют различные методы. В работе также использовали несколько методик.

Метод Лоу. Для получения пленок ПГБ и калибровки флуоресцентного метода был использован метод Лоу [27] в предложенной в работе модификации. Бактериальную суспензию 1 мл (если $A_{600} \geq 0.2$) или 2 мл (если $A_{600} < 0.2$) помещали в микропробирки, центрифугировали 5 мин при 5 тыс. г. К осадку добавляли 1 мл 2 н HCl и инкубировали 1 ч при 100°C, после чего центрифугировали 5 мин при 5 тыс. г. Осадок подсушивали, добавляли 1 мл хлороформа и интенсивно встряхивали. Микропробирки плотно закупоривали и встряхивали в течении ночи при 200 об./мин и при температуре 28°C. В стеклянный флакон отбирали нижнюю прозрачную хлороформ-содержащую фракцию и высушивали на воздухе. На дне флакона образовывался белый осадок (ПГБ), к которому добавляли 1 мл концентрированной H_2SO_4 и нагревали при 100°C в течение 1 ч. В результате гидролиза и дегидратации образовывалась кротоновая кислота. Оптическую плотность раствора измеряли при 235 нм (максимум оптической плотности кротоновой кислоты, обусловленный двойной связью), используя в качестве контроля концентрированную серную кислоту. Количество ПГБ рассчитывали по формуле: $[ПГБ] (мг) = 0.0056 \times A_{235}$.

Флуоресценция с Нильским красным. Флуоресцентный метод начали использовать для определения ПГБ в бактериальных клетках достаточно давно и применяют до настоящего времени. Чаще

всего в качестве флуоресцентного красителя используют Нильский красный [28–30]. Именно этот краситель ранее был использован для определения ПГБ в бактериоидов клубеньков люпина [31]. Данный метод – более быстрый и менее трудоемкий, чем метод Лоу, но он не позволяет получить ПГБ в нативном состоянии. В качестве флуоресцентных красителей для определения ПГБ в ряде работ также использовали Акридиновый оранжевый [32] и липофильный краситель Lipid-Green1 (Корея) [33].

В настоящей работе использовали раствор Нильского красного в диметилсульфоксиде – 0.55 мг/мл. Клетки, отобранные на определенной стадии роста, разрушали ультразвуком. Разрушенные клетки центрифугировали и ресуспендировали в воде до $A_{600} = 0.1$. К 3 мл суспензии разрушенных клеток добавляли 41 мкл раствора Нильского красного до конечной концентрации 7.5 мкг/мл. Суспензию инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Окрашенные образцы центрифугировали и ресуспендировали в 3 мл воды.

Исследования также проводили и с целыми клетками. В этом случае раствор Нильского красного добавляли к 3 мл стандартизированной суспензии клеток. Дальнейшую процедуру проводили, как описано выше. Окрашенные клетки центрифугировали и ресуспендировали в 3 мл воды.

Для определения ПГБ записывали спектры флуоресценции образцов при $\lambda_{возб} = 550$ нм и $\lambda_{исп} = 610$ нм, при работе с целыми клетками $\lambda_{исп} = 630$ нм. Количество ПГБ рассчитывали по формуле: $[ПГБ] (\%) = 0.072 \times E_m$, где E_m – эмиссия флуоресценции (отн. ед.).

Окрашивание Суданом черным. Метод определения бактериальных жироподобных соединений с красителем Суданом черным был разработан еще в 1940 г. [34], но и в 2015 г. при сравнении различных методов для определения ПГБ в клетках *Rhizobium* была показана его эффективность [32].

Для работы использовали 0.3%-ный раствор Судана черного В в этиленгликоле (может быть использован также раствор в этаноле) и 0.5% водный раствор сафранина. Бактериальную пленку фиксировали нагреванием на предметном стекле, погружали в раствор Судана черного В и окрашивали в течение 15 мин. Краситель сливали, промывали препарат водой и высушивали, после чего промывали предметное стекло поружением в ксилол и высушивали на воздухе. Можно провести дополнительную отмычку в этаноле, в котором судан черный хорошо растворяется. Дополнительно окрашивали препарат водным раствором сафранина в течение 5–10 с. Предметное стекло промывали водой, подсушивали и проводили микроскопию с иммерсионным маслом.

Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре Cary 300Bio ("Varian", США) при комнатной температуре в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см при скорости сканирования 600 нм/мин. Спектры флуоресценции записывали на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301 PC (Япония). Для микроскопии использовали микроскоп ЛОМО (Россия), серия XS, объектив 100/1.25 OIL 160.017.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее все клубеньковые бактерии (КБ) относили к одному роду *Rhizobium*, однако в дальнейшем, с развитием микробиологии и молекулярной генетики, классификация существенно усложнилась, соответственно изменились и названия бактерий. Теперь КБ относят не только к разным родам, но даже к разным семействам протеобактерий. Первыми из рода *Rhizobium* в 1982 г. был выделен род *Bradyrhizobium* [35]. При этом реклассификация видов продолжается до настоящего времени. Так бактерия *Bradyrhizobium lupini* (ранее *Rhizobium lupini*) — микросимбионт растений люпина, один из основных объектов исследований процесса азотфиксации в Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, была реклассифицирована только в 2015 г. [36]. Бактерия *Rhizobium phaseoli* — объект данного исследования, микросимбионт растений фасоли, — сохранила свое видовое название. В то же время ко всем клубеньковым бактериям применяют обобщающее название — ризобии.

Известно, что КБ, как и многие другие, могут находиться в различных морфологических формах. Явление диссоциации бактерий на S- (от англ. smooth — гладкий) и R-формы (rough — шероховатый) впервые исследовали Вейль и Феликс в 1917 г. [37], а в 1930 г. это было показано для клубеньковых бактерий [38]. Подробное описание различий между этими формами было приведено в работе Хедли 1927 г. [39], и оно не теряет актуальности до настоящего времени.

Для грамотрицательных (в том числе для клубеньковых) бактерий основной является S-форма. Ее основные признаки: гомогенный рост в бульоне и ограниченный рост на агаре с флуоресцирующими колониями. Колонии гладкие, правильные, выпуклые, могут давать дочерние. Биохимически более активна. Основными признаками R-формы являются агглютинативный рост в бульоне, расползающийся рост на агаре с редко флуоресцирующими колониями. Колонии шероховатые, неправильные, плоские, дочерние колонии дает редко. Биохимически менее активна.

Полиалканоаты обнаруживаются только у S-форм (с гладкими колониями) большинства грамотрицательных и ряда грамположительных бакте-

рий, что принято считать одним из главных отличий истинной S-культуры от R-формы.

В работе поддержание культуры проводили в S-форме, которая является основной для грамотрицательных бактерий. R-форма была получена при выращивании культуры в неблагоприятных условиях (культивирование на бедной среде с последующим замораживанием при -70°C). Как и можно было предположить, только S-формы клеток исследованного штамма *R. phaseoli* были способны к синтезу ПГБ.

На рис. 1 показаны клетки *R. phaseoli* в S-форме на разных стадиях роста, окрашенные красителем Суданом черным. Включения поли- β -оксимасляной кислоты выглядят как черно-синие капельки, в то время как цитоплазма клеток окрашивается в розовый цвет. На фотографиях хорошо видно увеличение количества гранул ПГБ в клетках со временем выращивания.

Поскольку задачей настоящей работы было изучение накопления ПГБ клетками *R. phaseoli*, возникла необходимость использовать максимально точные методы для определения полимера. Традиционный метод Лоу [27], основанный на спектрофотометрическом определении кротоновой кислоты, образующейся при гидролизе ПГБ, был модифицирован, что позволило выделять и определять количество полимера непосредственно в биомассе, минуя длительные стадии очистки. Кроме того, метод оказался удобным для расчетов, так как зависимость между количеством ПГБ и оптическим поглощением кротоновой кислоты, в нашем случае была линейной. Кроме того, для определения содержания ПГБ непосредственно в клетке использовали метод, основанный на флуоресценции красителя Нильского красного, связывающегося с ПГБ, также дающий линейную зависимость между количеством полимера, определенного по методу Лоу и интенсивностью флуоресценции Нильского красного в ДМСО.

Изучено накопление ПГБ клетками S- и R-формы на бедной (C : N = 3 : 1) и богатой (C : N = 20 : 1) по углероду питательных средах соответственно, поскольку известно, что соотношение азота и углерода очень сильно влияет на метаболизм бактерий, а ПГБ является конечным метаболитом обмена углеводов в бактериальной клетке. При выращивании на двух средах выход биомассы различался незначительно, а накопление ПГБ на богатой по углероду среде № 2 происходило ~ на 50% активнее, при этом гранулы полимера были более ярко выражены. В клетках R-формы ПГБ не накапливался независимо от вида питательной среды, хотя в аэробных условиях биомасса у бактерий этой формы нарастала даже лучше. Различия наглядно видны на графиках (рис. 2). Для накопления ПГБ в клетках необходимо достаточное количество источников углеро-

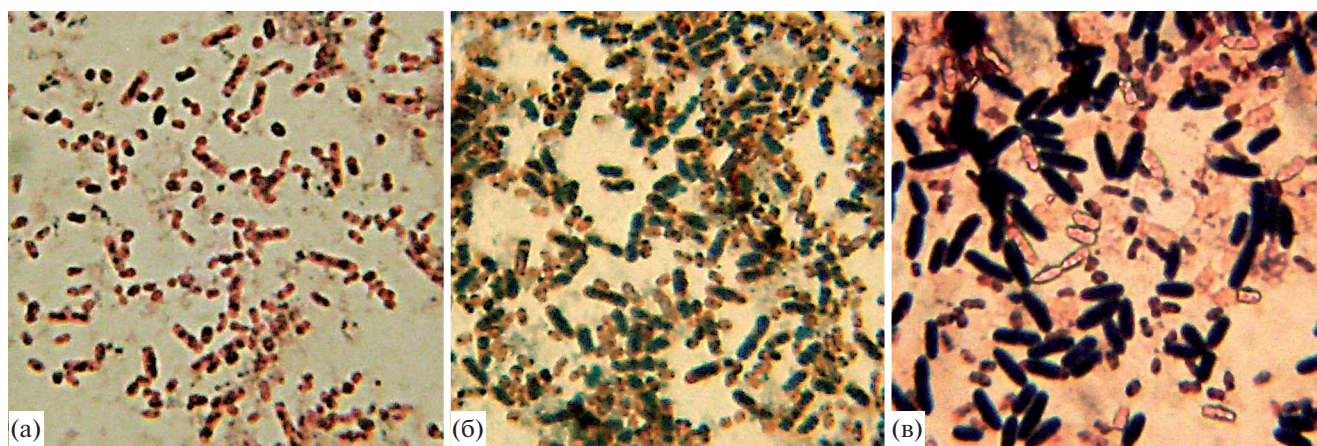


Рис. 1. Клетки *R. phaseoli* (S-форма), окрашенные суданом черным и сафранином, после— 9 (а), 33 (б) и 57 (в) ч роста на среде № 2 в микроаэрофильных условиях. Увеличение $\times 10000$.

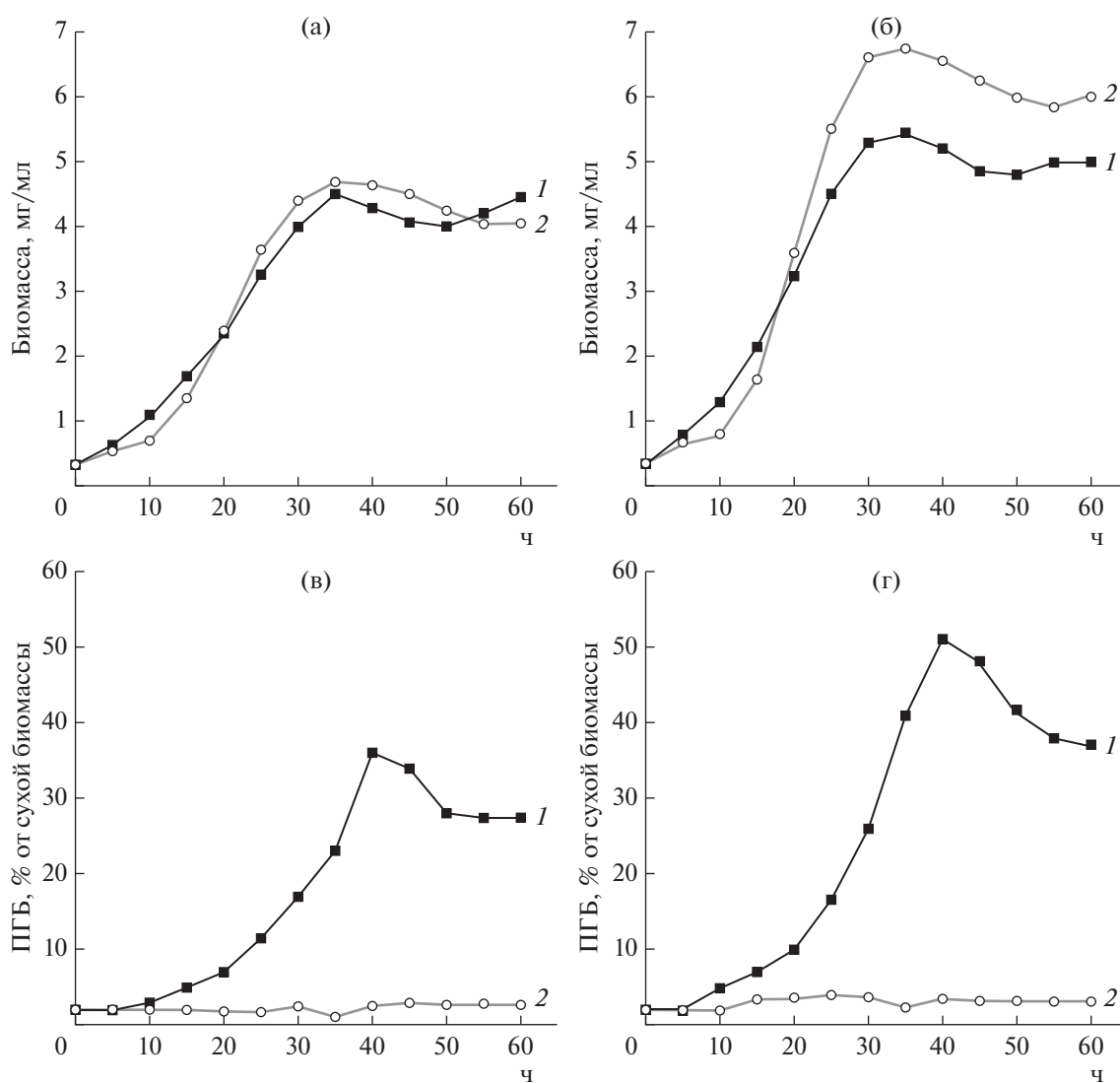


Рис. 2. Накопление биомассы (а, б) и ПГБ (в, г) клетками *R. phaseoli*, выращенными в аэробных условиях на среде № 1 (а) и № 2 (б). 1 – S-, 2 – R-форма.

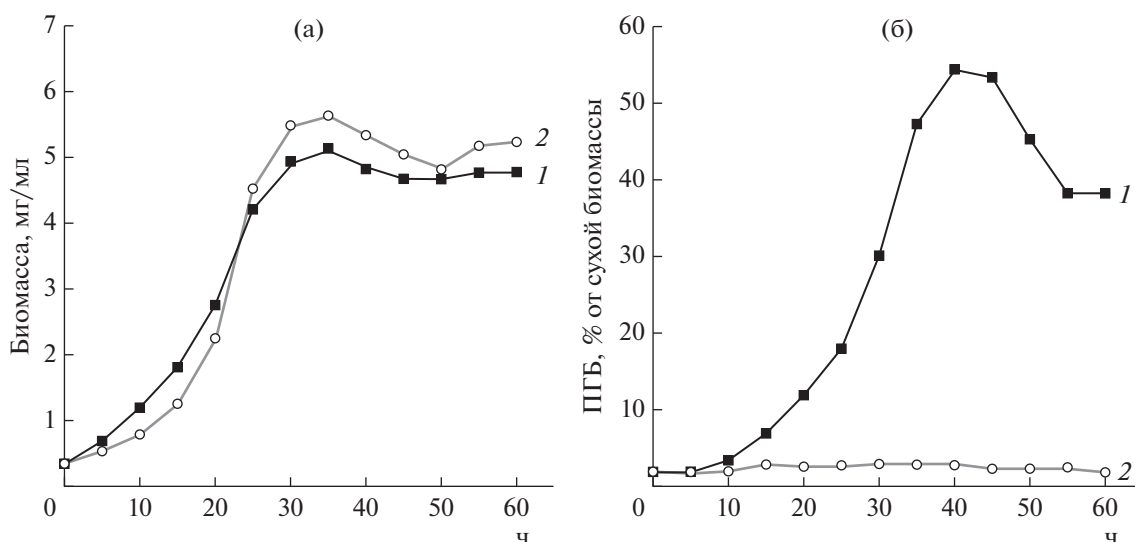


Рис. 3. Накопления биомассы (а) и ПГБ (б) клетками *R. phaseoli*, выращенными в микроаэрофильных условиях при культивировании на среде № 2. 1 – S-, 2 – R-форма.

да, а сам полимер является запасным веществом, накапливающимся при избытке углеродных субстратов.

При выращивании бактерий *R. phaseoli* были использованы аэробные и микроаэрофильные условия. Показано, что в микроаэрофильных условиях синтез ПГБ в клетках *R. phaseoli* увеличился ~ на 10% по сравнению с аэробными условиями, а содержание ПГБ могло достигать 54% от сухой биомассы (рис. 3). Во всех исследованных вариантах максимальное количество биомассы и максимум содержания ПГБ в клетках достигались к 35–40 ч роста.

Изучено влияние окислительного стресса на рост бактерий *R. phaseoli*, синтезирующих ПГБ. В качестве индукторов окислительного стресса (прооксидантов) были использованы пероксид третбутила (t-BOOH) и бензилвиологен (Bv). Оба вещества негативно влияли на рост бактерий, и рост возобновлялся только у S-форм, синтезирующих ПГБ (рис. 4а, 4б) ~ через 6 ч после действия индукторов окислительного стресса. Еще через 10–12 ч биомасса S-формы вновь достигала максимального уровня. Необходимо отметить, что содержание самого полимера в клетках после действия t-BOOH и Bv резко падало и уже больше не восстанавливалось (рис. 4в, 4г). Таким образом, можно сделать вывод, что ПГБ являлся протектором для клубеньковых бактерий при окислительном стрессе.

Известно, что при низкой концентрации кислорода и высоком содержании углеводов клетки ризобий могут оказаться в состоянии редуктивного стресса – переполнение НАД(Ф)Н. Для его снижения может происходить активация мета-

болических путей, потребляющих восстановительные эквиваленты – синтез гликогена или ПГБ. За счет сброса электронов от НАД(Ф)Н на синтез ПГБ регенерируется НАД(Ф)⁺, и, тем самым, предотвращается ингибирование ферментов цикла Кребса – НАДФ⁺-зависимой изоцитратдегидрогеназы (КФ 1.1.1.42) и цитратсинтазы (КФ 2.3.3.1) [16]. Другой протекторной функцией ПГБ для бактерий является мобилизация энергетических запасов на случай стрессовой ситуации, в том числе недостатка углеводов. Известно, что ПГБ может защищать клетку и от других стрессовых воздействий: теплового и осмотического шока, УФ-облучения, действия окислителей [12, 40].

ПГБ накапливается в клетках прокариот в условиях несбалансированного роста и выполняет функцию резервного вещества для запасаания углерода и энергии, подобно жиру, гликогену и крахмалу у животных и растений. Эти биополимеры обладают рядом специфических свойств, таких, как способность к биодеструкции и совместимость с живой тканью организма, что открывает большие возможности для их использования в практике [41–43]. Конечным продуктом биodeградации ПГБ в окружающей среде является вода и двуокись углерода, а в живом организме – 3-изомасляная кислота.

ПГБ и другие полигидроксиалканоаты могут найти и уже находят применение в медицине в качестве рассасывающихся шовных нитей, повязок, тампонов, пластин и стержней в ортопедии, а также как полимерная матрица для лекарственных средств длительного высвобождения [44–46]. Перспективным считается использование ПГА в качестве тары для хранения многих жидких и сыпучих

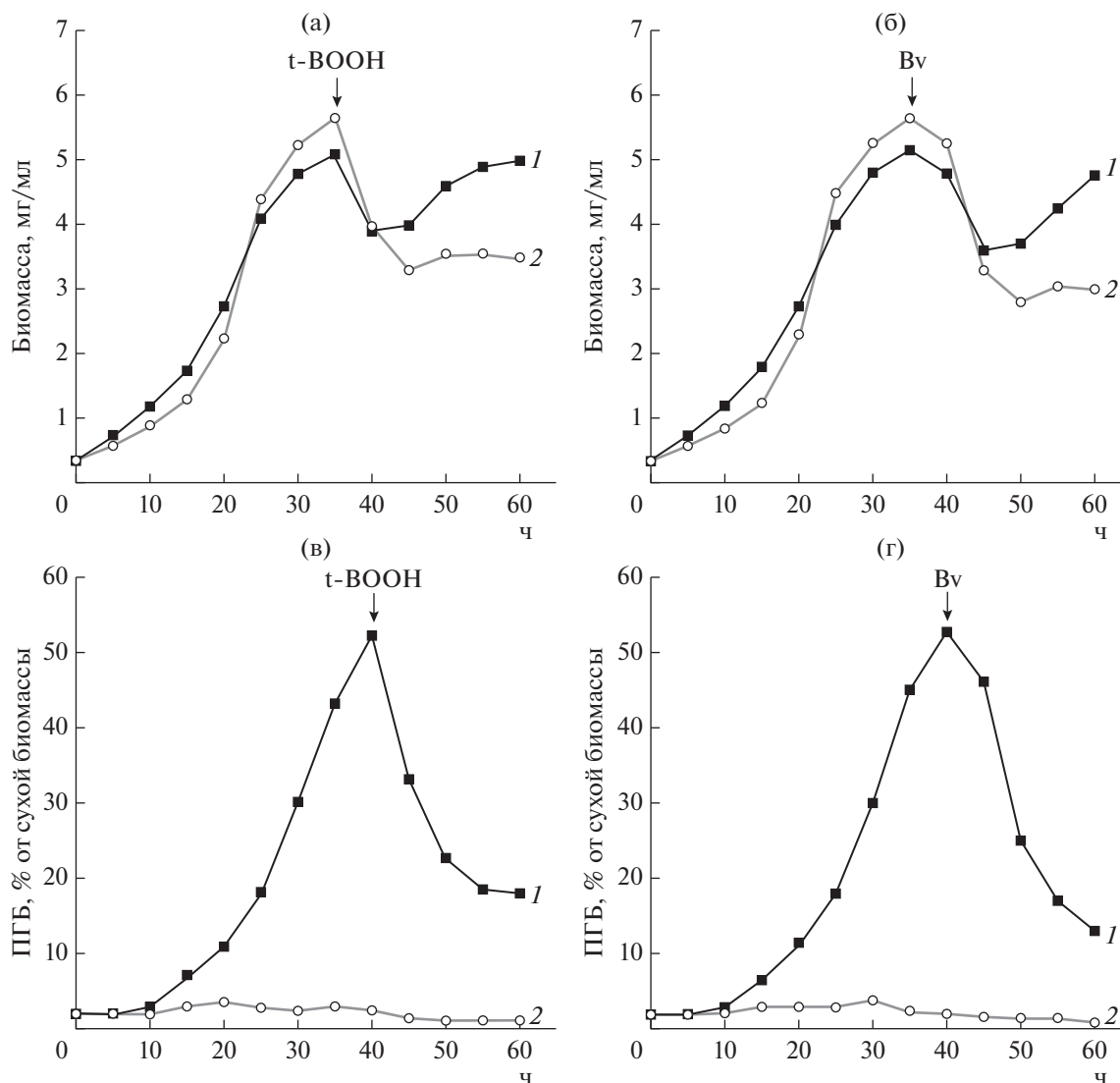


Рис. 4. Накопление биомассы (а, б) и ПГБ (в, г) клетками *R. phaseoli* при культивировании на среде № 2 в микроаэрофильных условиях при действии пероксида трет-бутила (а) и бензилвиологена (б). 1 – S-, 2 – R-форма.

чих веществ, в частности, одноразовых бутылок, банок, флаконов. Благодаря низкой проницаемости пленки из ПГА для кислорода, она может быть использована для упаковки пищевых продуктов. Одним из важнейших преимуществ производства биополимеров является возможность использования в качестве сырья постоянно воспроизводимых пищевых ресурсов, таких, как сахар и отходы его производства. Кроме того, захоронение изделий из ПГА после использования обеспечивает их полную биodeградацию и исключает загрязнение окружающей среды. Сам процесс биосинтеза также практически не дает побочных продуктов, производство ПГА является безотходным, поэтому экологический аспект этих разработок также очень важен [17].

Бактериальные ПГА рассматриваются как очень перспективные биоразлагаемые полимеры и изучаются их различные возможные продуценты [17]. В работе [47] в качестве источника мономеров для ПГА были рассмотрены виды еще одного рода клубеньковых бактерий – *Mezorhizobium*, выделенные из клубеньков *Lotus corniculatus*, причем синтез мономеров в этом случае являлся штамм-зависимым.

Как было отмечено выше, в наших опытах содержание ПГБ в клетках *R. phaseoli* в некоторых случаях могло достигать 54% от сухой массы клеток, что превышает максимальную для клубеньковых бактерий рода *Mezorhizobium* (штамм CSLC10N) величину 44%, как это описано в работе [47]. Такая величина близка значениям, харак-

терным для бактериальных штаммов-продуцентов полимера, использующихся в биотехнологии. Можно сделать заключение, что клубеньковые бактерии, выращенные в глубоинной культуре, могут быть потенциальными продуцентами ПГБ и других ПОА.

При проведении исследований использовали оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meyer A. Praktikum der botanischen bakterienkunde. Jena: G. Fischer, 1903. 157 s.
2. Lemoigne M. // Bull. Soc. Chim. Biol. 1926. V. 8. P. 770–782.
3. Macrae R.M., Wilkinson J.R. // J. Gen. Microbiol. 1958. V. 19. P. 210–222.
4. Schlegel H.G., Gottschalk G., Von Barthar R. // Nature. 1961. V. 191. № 4787. P. 463–465.
5. Dawes E.A., Senior P.J. // Adv. Microbiol. Physiol. 1973. V. 10. P. 135–266.
6. Slater S.C., Voige W.H., Dennis D.E. // J. Bacteriol. 1988. V. 170. № 10. P. 4431–4436.
7. Schubert P., Steinbüchel A., Schlegel H.G. // J. Bacteriol. 1988. V. 170. № 12. P. 5837–5847.
8. Peoples O.P., Sinskey A.J. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 26. P. 15293–15297.
9. Poirier Y., Erard N., Petetot J.M.C. // FEMS Microbiology Letters. 2002. V. 207. № 1. P. 97–102.
10. Lossil A., Eibl C., Harloff H.J., Jung C., Koop H.U. // Plant Cell Reports. 2003. V. 21. № 9. P. 891–899.
11. Forsyth W.G.C., Hayward A.C., Roberts J.B. // Nature. 1958. V. 182. № 4638. C. 800–801.
12. Романов В.И. // Успехи биологической химии. 1977. Т. 18. С. 211–230.
13. Sutton W.D., Pankhurst C.E., Craig A.S. // Intern. Rev. Cytol. 1982. Suppl. 13. P. 149–177.
14. Lodwig E., Poole P. // Cr. Rev. Plant Sci. 2003. V. 22. P. 37–78.
15. Cevallos M.A., Encarnacion S., Leija A., Mora Y., Mora J. // J. Bacteriol. 1996. V. 178. P. 1646–1654.
16. Trainer M.A., Charles T.C. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006. V. 71. P. 377–386.
17. Saharan B.S., Grewal A., Kumar P. // Chinese J. Biology. 2014. V. 2014. e802984.
18. Романов В.В., Юшкова Л.А., Кретович В.Л. // Микробиология. 1975. Т. 44. № 5. С. 820–824.
19. Федюлова Н.Г., Черменская И.Е., Романов В.И., Кретович В.Л. // Физиология растений. 1980. Т. 27. № 4. С. 544–549.
20. Topunov A.F. // Biochemistry (Moscow). 1995. V. 60. № 1. P. 45–49.
21. Topunov A.F., Petrova N.E. // Russian J. Plant Physiol. 1997. V. 44. № 5. P. 580–584.
22. Topunov A.F., Rozov F.N., Petrova N.E. // Russian J. Plant Physiol. 1998. V. 45. № 6. P. 814–819.
23. Layzell D.B., Atkins C. The Physiology and Biochemistry of Legume N₂ Fixation. // Plant Metabolism. /Ed. D.T. Dennis, D.H. Turpin, D.D. Lefebvre, D.B. Layzell. Singapore: Longman Singapore Publishers, 1997. P. 495–505.
24. Stam H., van Verseveld H.W., de Vries W., Stouthamer A.H. // FEMS Microbiology Letters. 1986. V. 35. № 2–3. P. 215–220.
25. Paganelli F.L., de Macedo Lemos E.L., Carareto Alves L.M. // World J. Microb. Biot. 2011. V. 27. № 4. P. 773–778.
26. Madison L.L., Huisman G.W. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999. V. 63. P. 21–53.
27. Law J.H., Slepecky R.A. // J. Bacteriol. 1961 V. 82. № 1. P. 33–36.
28. Spiekermann P., Rehm B.H., Kalscheuer R., Baumeister D., Steinbüchel A. // Arch. Microbiol. 1999. V. 171. № 2. P. 73–80.
29. Tyo K.E., Zhou H., Stephanopoulos G.N. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 3412–3417.
30. Pinzon N.M., Aukema K.G., Gralnick J.A., Wackett L.P. // mBio. 2011. V. 2. № 4. e00109–11.
31. Romanov V.I., Fedulova N.G., Tchermenskaya I.E., Shramko V.I., Molchanov M.I., Kretovich W.L. // Plant Soil. 1980. V. 56. № 3. P. 379–390.
32. Manju J, Prabakaran P. // International J. Engineering Science Invention. 2015. V. 4. № 11. P. 23–28.
33. Ji Eun Choi, Hye Young Na, Taek Ho Yang, Sung-Keun Rhee, Jae Kwang Song. // AMB Express. 2015. V. 5. P. e48.
34. Hartman L. // Staining Technology. 1940. V. 15. P. 23–28.
35. Jordan D.C. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1982. V. 32. № 1. P. 136–139.
36. Mateos P.F., Velázquez E., Igual J.M., Martínez-Molina E., Peix A., Trujillo M.E., Ramírez-Bahena M.H., Flores-Félix J.D., Alonso de la Vega P., Rivas R. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2015. V. 65. № 4: P. 1213–1219.
37. Weil E., Felix A. // Wien. Klin. Wochenschr. 1917. B. 30. S. 1509–1511.
38. Israilski W., Starygin L. // Zbl. Bacter. II. 1930. B. 81. S. 1–11.
39. Hadley P. // Journal of Infectious Diseases. 1927. V. 40. № 1. P. 1–312.
40. Kadouri D., Jurkevitch E., Okon Y. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 3244–3250.
41. Byrom D. // Trends in Biotechnol. 1987. V. 5. № 9. P. 246–250.
42. Piskin E. // J. Biomaterials Science, Polymer Edition. 1995. V. 6. № 9. P. 775–795.
43. Alejandra R.C., Margarita C.M., Soledad M.C.M. // Polymer Degradation and Stability. 2012. V. 97. № 11. P. 2473–2476.
44. Бонарцев А.П., Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А., Босхмджиев А.П., Заиков Г.Е. // Пластические массы. 2010. № 3. С. 6–23.
45. Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Воинова В.В., Кирпичников М.П., Шайтан К.В. // Вестник Российского государственного медицинского университета. 2018. № 6. С. 130–134.
46. Bonartsev A.P., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Bonartseva G.A. // Biochemistry (Moscow) Supplement. Series B: Biomedical Chemistry. 2011. V. 5. № 1. P. 10–21.
47. Marcos-García M., García-Fraile P., Filipová A., Menéndez E., Mateos P.F., Velázquez E., Cajthaml T., Rivas R. // Environmental Science and Pollution Research. 2017. V. 24. № 21. P. 17436–17445.

Influence of Cultivation Conditions on the Synthesis of Poly-3-hydroxybutyrate by Nodulating Bacteria *Rhizobium phaseoli*

O. V. Kosmachevskaya^a, E. V. Osipov^a, Tran Van Chi^b, Pham Thi Tuyet Mai^b, and A. F. Topunov^{a,*}

^a*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

^b*Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry, Thai Nguyen City, 251210 Vietnam*

*e-mail: aftopunov@yandex.ru

Received July 09, 2019; revised August 20, 2019; accepted August 30, 2019

The synthesis of poly-3-hydroxybutyric acid (PHB) in nodulating bacteria *Rhizobium phaseoli* in free-living culture was studied. The Law method for PHB identification was modified, what allowed to isolate and measure quantity of the polymer directly from the biomass. Only cells of *R. phaseoli* in S-form could synthesize PHB. Its accumulation on C-rich medium was ~50% more active, and the polymer granules were more clearly visible. PHB synthesis increased with decreasing aeration, and the maximum content was reached to 40–45 hours of growth. The influence of oxidative stress caused by *t*-buthyl hydroperoxide and benzylviologene on the growth of PHB-synthesizing bacteria was examined. Both compounds negatively influenced the bacterial growth, which regenerated only in S-form synthesizing PHB. It can be concluded that PHB protects nodulating bacteria at the oxidative stress conditions. The maximal PHB content in *R. phaseoli* cells reached 54% of the dry mass, what exceeds the values previously described for rhizobia. This amount is close to ones characteristic for bacterial strains – producers of the polymer, used in biotechnology. It is possible to make conclusion, that free-culture grown rhizobia can be potential producers of polyhydroxybutyrate and other polyhydroxyalkanoates.

Keywords: nodulating bacteria, *Rhizobium phaseoli*, poly-3-hydroxybutyrate, R and S bacterial forms, oxidative stress