

УДК 579.66

DOI: 10.15372/ChUR2021273

Физико-химические свойства биосурфактантов, продуцируемых микроорганизмами-нефтедеструкторами

Л. А. БЕЛОВЕЖЕЦ¹, М. С. ТРЕТЬЯКОВА², Ю. А. МАРКОВА², Л. П. ОЗНОБИХИНА¹¹Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН,
Иркутск (Россия)

E-mail: lyu-sya@yandex.ru

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск (Россия)

(Поступила 05.03.20; после доработки 24.06.20)

Аннотация

Исследованы физико-химические свойства и структуры биосурфактантов, продуцируемых микроорганизмами-нефтедеструкторами, представленными тремя штаммами: *Rhodococcus* 108, *Acinetobacter* 112, *Acinetobacter* 114. Показано, что исследуемые культуры способны синтезировать как клеточно-связанные, так и внеклеточные биологические поверхностно-активные вещества. При этом количество свободных биосурфактантов у штамма *Rhodococcus* 108 существенно выше, чем у бактерий, принадлежащих к роду *Acinetobacter*. Во всех исследованных соединениях присутствуют углеводные и липидные компоненты. Согласно данным ИК-спектроскопии, биосурфактант, выделенный из штамма *Rhodococcus* 108, представляет собой соединение, содержащее длинноцепочечные алифатические углеводороды, эфирные и сложноэфирные связи, карбонильные и гидроксильные группы, а выделенный из штамма *Acinetobacter* 114 – липополисахарид, состоящий из трисахаридной основы, к которой присоединены остатки жирных кислот (C₁₀–C₂₂) через сложноэфирную и амидную связь.

Ключевые слова: микроорганизмы-нефтедеструкторы, биосурфактанты, эмульгирующие свойства

ВВЕДЕНИЕ

Биосурфактанты – структурно разносторонняя группа поверхностно-активных веществ (ПАВ), синтезируемых различными микроорганизмами. По эффективности к эмульгированию они не уступают синтетическим ПАВ, но обладают рядом преимуществ: способностью легко разлагаться в окружающей среде, отсутствием токсичности, экологической безопасностью, устойчивой активностью в экстремальных условиях [1, 2], эффективностью при низких концентрациях [3].

Биогенные ПАВ широко применяются в биоремедиации окружающей среды от ксенобиотиков и для повышения нефтеотдачи почвенных пластов. Показано увеличение нефтеотдачи под-

земных песчаников при использовании трегалолипидов *Nocardia rhodochrous* до 30 % [4]. При опытно-промышленном испытании этого метода на одном из участков Бондюжского нефтяного месторождения (ОАО “Татнефть”) за 5 лет с начала испытаний получено дополнительно 47 тыс. т нефти, что составило около 30 % общей добычи нефти на этом участке за указанный период времени [5]. При проведении анализа эффективности применения методов увеличения нефтеотдачи пластов на Манчаровском месторождении наибольшую продуктивность показали методы микробиологического воздействия. В течение 1990–1998 гг. за счет внедрения сухого ила дополнительно добыто 43 515 т нефти. В среднем на одну обработку по ООО «НГДУ

“Чекмагушнефть” было получено 640 т нефти. Удельный эффект составил 296 т на 1 т реагента [6]. Важное направление использования микроорганизмов, образующих биосурфактанты, – технология биоремедиации почв, загрязненных компонентами нефти [7, 8]. Так, рамнолипид, продуцируемый *Pseudomonas aeruginosa*, способен удалять до 25–70 и 40–80 % углеводородов из загрязненных супеси и суглинков соответственно [9]. Кроме того, высокую эффективность биосурфактанты проявляют и в биоремедиации почв от тяжелых металлов [10, 11], включая уран, кадмий, никель [12] и свинец [13].

Все вышеперечисленные достоинства делают биосурфактанты перспективными объектами для изучения и разработки новых экологически безопасных технологий, касающихся нефтедобычи или ликвидации последствий разливов нефти и нефтепродуктов [14–16].

Цель работы – изучение состава и свойств биосурфактантов, продуцируемых микроорганизмами-нефтедеструкторами, для оценки возможности их использования в промышленности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Микроорганизмы были выделены из ризосферы пырея (*Elytrigia repens*), произрастающего на нефтезагрязненной территории Иркутской области. Для накопления биосурфактантов микроорганизмы культивировались на качалке в темноте при 22 °С и рН 7 на жидкой питательной среде 8Е следующего состава, г/л: NaNO_3 – 3.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 1.0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, KCl – 0.5, с использованием 2 % *n*-гексадекана в виде единственного источника углерода и энергии. Полученную бактериальную суспензию разделяли на биомассу клеток и супернатант путем центрифугирования при 6000g с помощью центрифуги СМ-6М (ELMY, Латвия). Экстракцию биосурфактантов проводили после 6 сут культивирования из супернатанта смесью хлороформ/метанол в объемном соотношении 3 : 1, предварительно подкислив каждую из проб соляной кислотой до рН 2.

Эмульгирующую активность биосурфактантов определяли методом Купера [17]. Смесью 4 мл бактериальной суспензии и 3 мл дизельного топлива встряхивали на орбитальной качалке при 200 об/мин с последующим отстаиванием в вертикальном положении в течение 1 ч для разделения водной и углеводородной фаз. Наличие или отсутствие эмульсии на границе раздела

фаз определяли визуально. При наличии эмульсии через 24 ч отстаивания рассчитывали индекс эмульгирования (E_{24} , %) по формуле:

$$E_{24} = (V_3/V) 100$$

где V – общий объем среды (7 мл); V_3 – объем плотной эмульсии, образуемой при перемешивании бактериальной суспензии с дизельным топливом, мл.

Способность бактерий к снижению поверхностного натяжения нефти определяли в чашках Петри диаметром 15 см, в которые помещали 20 мл дистиллированной воды, затем вносили 1 мкл сырой нефти. В центр поверхности нефти добавляли 100 мкл супернатанта культуры микроорганизма и через 30 с измеряли диаметр образовавшейся чистой зоны [18].

Показатель гидрофобности бактериальных клеток определяли по методу, описанному в работе [19].

Для определения клеточно-связанных сурфактантов биомассу клеток суспендировали в фосфатном буфере (0.1 М, рН 6.75). К 3 мл суспензии добавляли 0.5 мл *n*-гексадекана, встряхивали в течение 3 мин и оставляли на 10 мин при температуре 37 °С. Затем отбирали нижний водный слой и измеряли оптическую плотность с помощью спектрофотометра П-5400УФ (ООО “ЭКРОСХИМ”, Россия) при длине волны 585 нм в кювете шириной 1 см. Содержание клеточно-связанных сурфактантов определяли по формуле:

$$H = (1 - (D_1/D_0)) 100$$

где H – количество клеточно-связанных сурфактантов, %; D_0 – исходная оптическая плотность бактериальной суспензии; D_1 – оптическая плотность бактериальной суспензии после сорбции клеток микроорганизма на *n*-гексадекан.

Для определения компонентного состава биосурфактантов был проведен ряд качественных реакций согласно [20]. Присутствие белка фиксировали реакцией с нингидрином, наличие углеводов – реакцией Троммера, липидов – реакцией Гольдмана, крахмала – йодкрахмальной реакцией. Пептидные связи обнаруживали с помощью биуретовой реакции. Элементный состав биосурфактантов, мас. %: С – 70.72, N – следы, H – 12.81, зола – 5.4 (*Rhodococcus* 108); С – 76.31, N – 0.94, H – 14.2 (*Acinetobacter* 114).

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) биосурфактантов выполняли на пластине “Силуфол” в системе хлороформ/метанол/вода (65 : 15 : 2). Проявитель – нафтольный реагент (0.5 г α -нафтола в 100 мл смеси метанол/вода (1 : 1 по объему) с последующей обработкой 10 % серной

кислотой при нагревании до максимального проявления окраски.

ИК спектры биосурфактантов в тонкой пленке соединений в тонком слое регистрировали с помощью ИК-Фурье спектрометра Varian 3100 (Varian Inc., США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для эффективного применения биогенных ПАВ необходимо изучение их структуры, физико-химических и физиологических свойств. Ранее нами было показано, что *Rhodococcus* 108 эмульгирует нефтяную пленку с корней растения, что обусловлено наличием в культуральной жидкости биосурфактантов [21]. В данной работе исследованы три штамма микроорганизмов – *Rhodococcus* 108, *Acinetobacter* 112, *Acinetobacter* 114. Первичная оценка их способности выделять ПАВ оценивалась по индексу эмульгирования. Выяснилось, что все штаммы образуют стойкую эмульсию, но с разной эффективностью. Индекс эмульгирования варьируется от 13 до 73 %. При добавлении на поверхность нефти супернатанта формировалась чистая зона, диаметр которой зависел от штамма бактерии (табл. 1). Для увеличения количества синтезируемых биосурфактантов все микроорганизмы выращивались на питательной среде с *n*-гексадеканом в качестве единственного источника углерода. Количество клеточно-связанных биосурфактантов было примерно оди-

наково для всех штаммов, тогда как *Rhodococcus* 108 образовывал существенно больше внеклеточных форм (содержание свободных биосурфактантов на 1 л питательной среды – 1.523 г), что соответствует литературным данным [1, 22].

Проведенные качественные реакции выявили в составе биосурфактантов углеводные и липидные компоненты, а также отсутствие пептидов и высокомолекулярных углеводов (табл. 2).

На тонкослойной хроматограмме выделенных из супернатанта экстракцией сурфактантов *Rhodococcus* 108 детектируется одно компактное пятно (подвижность $R_f = 0.78$). Это свидетельствует о наличии лишь одного биосурфактанта, либо нескольких очень близких по структуре, что не позволяет разделить их методом ТСХ. Пятна, полученные для *Acinetobacter* 112 и *Acinetobacter* 114, сливались в одну слабо окрашенную полосу, что не позволило выделить индивидуальные соединения, находящиеся в экстракте.

Для биосурфактантов, продуцируемых *Rhodococcus* 108 и *Acinetobacter* 114, получены ИК-спектры в тонкой пленке (рис. 1, 2). Наиболее интенсивными в спектрах обоих соединений являются полосы поглощения (п. п.) валентных колебаний групп CH_2 , наблюдаемые в интервале 2950–2855 cm^{-1} , и деформационных колебаний этих групп при 1460 и 722 cm^{-1} . В ИК-спектре биосурфактанта, продуцируемого штаммом *Rhodococcus* 108 (см. рис. 1), широкая п. п. в интервале 3400–2600 cm^{-1} характеризует колебания ассоциированных гидроксильных групп – $\nu(\text{OH})$. Полоса поглощения ассоциированной карбо-

ТАБЛИЦА 1

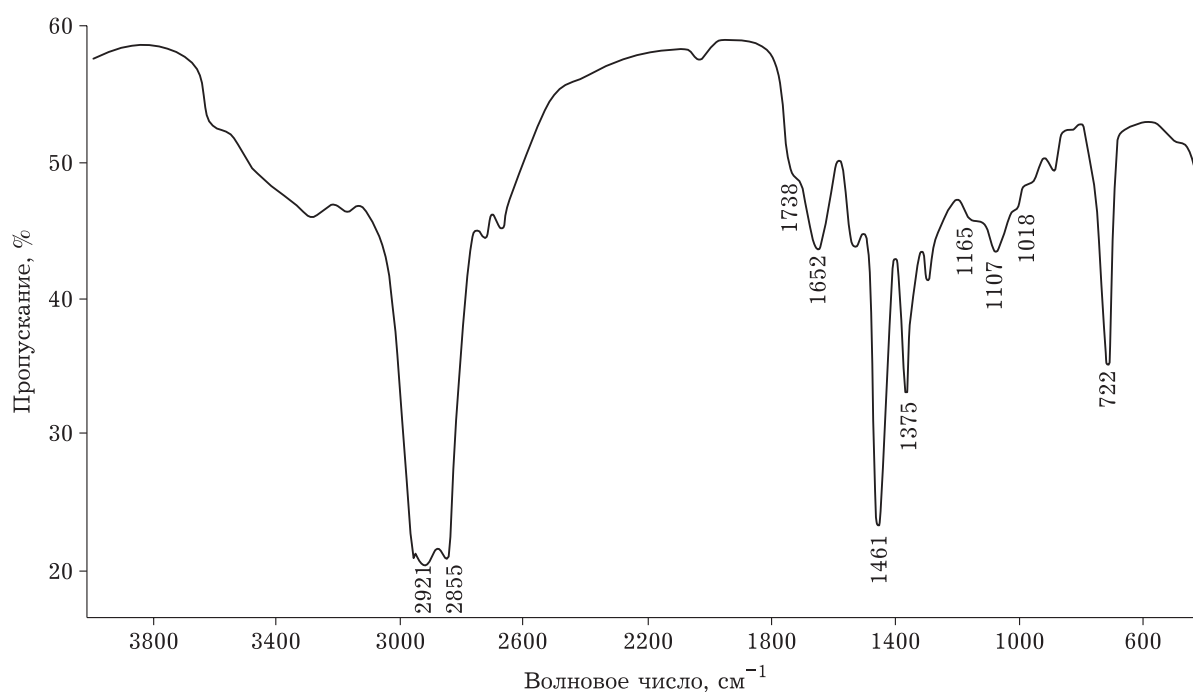
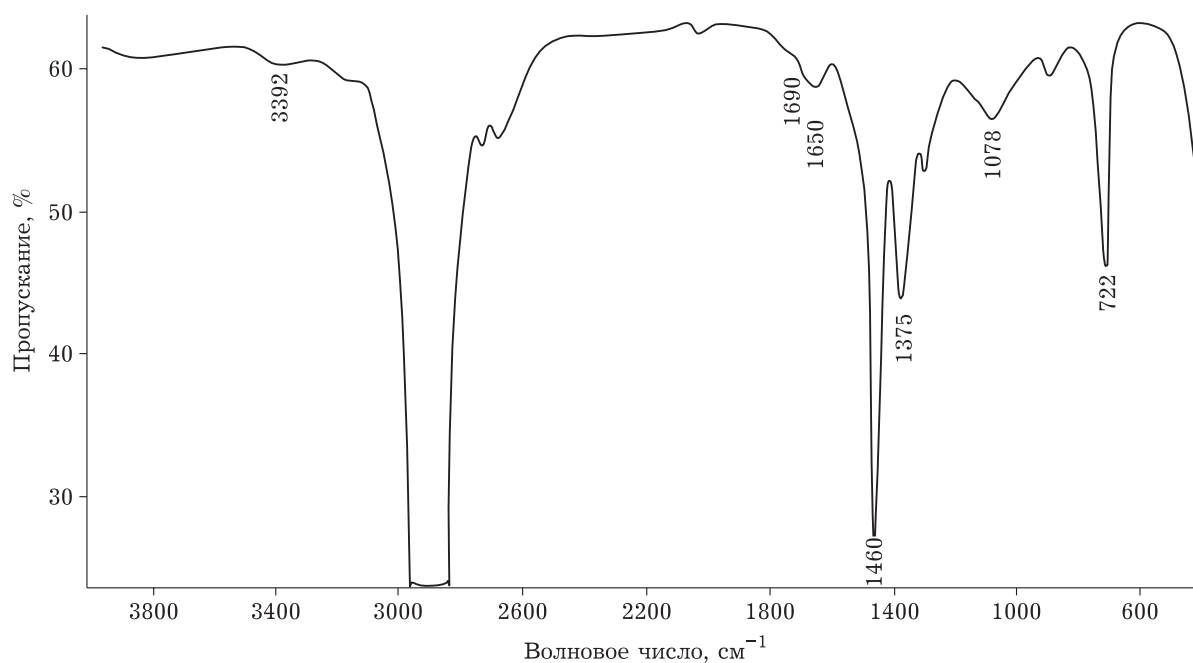
Показатели способности бактерий-нефтедеструкторов выделять поверхностно-активные вещества

Штамм	Диаметр образовавшихся чистых зон, см	Эмульгирующая активность жидких культур	Индекс эмульгирования, %	Содержание биосурфактантов	
				клеточно-связанных, %	внеклеточных, г/л
<i>Rhodococcus</i> 108	4.0±0.2	++	73	37.0	1.523
<i>Acinetobacter</i> 112	3.2±0.4	+	57	31.5	0.177
<i>Acinetobacter</i> 114	1.5±0.2	+	13	31.2	0.166

ТАБЛИЦА 2

Компонентный состав биосурфактантов (качественные реакции)

Качественная реакция	Штамм микроорганизма		
	<i>Rhodococcus</i> 108	<i>Acinetobacter</i> 112	<i>Acinetobacter</i> 114
Нингидриновая	–	–	–
Биуретовая	–	–	–
Иодная	–	–	–
Реакция Троммера	+	+	+
Реакция Гольдмана	+	+	+

Рис. 1. ИК-спектр биосурфактанта, продуцируемого *Rhodococcus* 108.Рис. 2. ИК-спектр биосурфактанта, продуцируемого *Acinetobacter* 114.

нильной группы $\nu(\text{C}=\text{O})$ наблюдается при 1652 см^{-1} . Простые эфирные и сложноэфирные группы характеризуются п. п. с максимумами в интервале $1165\text{--}1018 \text{ см}^{-1}$, которые могут быть обусловлены наличием фрагментов $\text{CH}-\text{O}-\text{CH}$ и $\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2$. Колебанию свободной карбонильной группы $\nu(\text{C}=\text{O})$ соответствует слабое плечо при 1738 см^{-1} на высокочастотном крыле п. п.

при 1652 см^{-1} . Дублетная полоса колебаний $\delta(\text{CH}_3)$ при 1375 см^{-1} свидетельствует о возможном наличии разветвленных групп $\text{C}(\text{CH}_3)_2$. Следовательно, биосурфактант, продуцируемый *Rhodococcus* 108, обладает сложной структурой, включающей длинноцепочечные алифатические углеводороды, эфирные, карбонильные и гидроксильные группы. Полученные данные позволяют

предположить, что он представляет собой сложный эфир трегалозы и миколовых кислот.

В ИК-спектре биосурфактанта, продуцируемого штаммом *Acinetobacter* 114 (см. рис. 2), наряду с интенсивными п. п. $\nu(\text{CH}_2)$, $\delta(\text{CH}_2)$ и $\delta(\text{CH}_3)$, наблюдаются характеризующие его полосы, аналогичные наблюдаемым в спектре биосурфактанта, продуцируемого *Rhodococcus* 108, но менее интенсивные. Так, слабая широкая п. п. ассоциированных гидроксильных групп $\nu(\text{OH})$ находится в интервале $3500\text{--}3200\text{ см}^{-1}$ и имеет слабо выраженный максимум при 3390 см^{-1} . Колебания ассоциированных и свободных карбонильных групп $\nu(\text{C}=\text{O})$ характеризуются слабой п. п. при 1650 см^{-1} и плечом на ее крыле при 1690 см^{-1} соответственно. Полоса с максимумом при 1078 см^{-1} обусловлена колебаниями эфирного фрагмента.

Наличие в элементном составе азота (0.94 %) позволяет предположить, что биосурфактант представляет собой липополисахарид, состоящий из трисахаридной основы (*D*-галактозамин + *D*-галактозаминуриновая кислота + диоксиаминогексоза), к которой через сложноэфирную и амидную связь присоединены остатки жирных кислот ($\text{C}_{10}\text{--}\text{C}_{22}$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлено наличие как внеклеточных, так и клеточно-связанных биосурфактантов во всех исследованных штаммах микроорганизмов *Rhodococcus* 108, *Acinetobacter* 112, *Acinetobacter* 114. Установлено, что в состав биосурфактантов входят углеводный и липидный компоненты. С помощью методов ТСХ и ИК-спектроскопии выявлены группировки, соответствующие длинноцепочечным алифатическим углеводородам, эфирным, карбонильным и гидроксильным группам. На этом основании сделано заключение о вероятной структуре выделенных веществ: *Rhodococcus* 108 – трегалолипид, *Acinetobacter* 114 – липополисахарид. Полученные результаты позволяют отнести *Rhodococcus* 108 к продуцентам биосурфактантов, перспективным для дальнейшего использования в промышленной добыче высоковязких нефтей.

Авторы благодарят к. х. н. Н. Н. Чипанину за ценные консультации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-016-00114 А).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Куюкина М. С. Биосурфактанты актинобактерий рода *Rhodococcus*: индуцированный биосинтез, свойства, применение: дисс. ... д-ра биол. наук. Пермь, 2006. 295 с.
- 2 Петриков К. В. Биологические поверхностно-активные вещества, продуцируемые микроорганизмами-нефтедеструкторами родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*: автореф. дис. ... канд. хим. наук. Москва, 2011. 24 с.
- 3 Гусева Ю. З. Метод увеличения нефтеотдачи высоковязких нефтей с применением ферментативно генерируемой нефтевытесняющей композиции и ее влияние на состав и свойства нефтей: автореф. дис. ... канд. хим. наук. Томск, 2016. 24 с.
- 4 Чжан Данянь. Новые биотехнологические продукты для процессов бурения и добычи нефти: дис. ... канд. технических наук. Москва, 2011. 167 с.
- 5 Ибатуллин Р. Р., Хисамов Р. С., Кандаурова Г. Ф., Беляев С. С., Борзенков И. А., Назина Т. Н. Применение современных микробиологических технологий увеличения нефтеотдачи на объектах НГДУ “Ленингорскнефть” // Нефтяное хозяйство. 2005. № 7. С. 42–45.
- 6 Шарапова А. Б., Нуршаханова Л. К., Тулешева Г. Применение микробиологических методов для повышения нефтеотдачи и интенсификации нефтедобычи // Молодой ученый. 2014. № 8 (67). С. 307–309.
- 7 Reddy M. S., Naresh B., Leela T., Prashanthi M., Madhusudhan N. C., Dhanasri G., Devi P. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. // Bioresource Technol. 2010. Vol. 101. P. 7980–7983.
- 8 Коршунова Т. Ю., Четвериков С. П., Бакаева М. Д., Кузина Е. В., Рафикова Г. Ф., Четверикова Д. В., Логинов О. Н. Микроорганизмы в ликвидации последствий нефтяного загрязнения (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2019. Т. 55, № 4. С. 338–349.
- 9 Гоготов И. Н., Белоножкин С. В., Ходаков Р. С., Шкидченко А. Н. Биосурфактанты: продуценты, свойства и практическое использование // Материалы 3-й Международной конференции “Международное сотрудничество в биотехнологии: ожидания и реальность”. Пушино: Биоресурсы и экология, 2006. С. 104–111.
- 10 Костина Л. В., Куюкина М. С., Ившина И. Б. Методы очистки загрязненных тяжелыми металлами почв с использованием (био)сурфактантов (обзор) // Вестн. Перм. ун-та. Биология. 2009. Вып. 10 (36). С. 95–110.
- 11 Miller R. M. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils // Environ. Health Perspectives. 1995. Vol. 103, No. 1. P. 59–62.
- 12 Mulligan C. N., Yong R. N., Gibbs B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review // Engineering Geology. 2001. Vol. 60. P. 371–380.
- 13 Литвиненко Л. В., Тищенко А. Т. Влияние *Rhodococcus*-биосурфактантов на фитотоксичность ионов свинца // Вестн. Перм. ун-та. Серия: Биология. 2017. № 1. С. 80–87.
- 14 Сарсенова А. С., Гуссейнов И. Ш., Нагметова Г. Ж., Аюпова А. Ж., Аипова Р., Кудайбергенов С. Е., Курманбаев А. А. Изучение влияния штамма *Bacillus subtilis* Ж105-11, способного к синтезу биоПАВ, на вытеснение нефти // Межд. журн. прикл. и фундамент. 2017. № 10-2. С. 270–273.
- 15 Логинова О. О., Данг Т. Т., Белоусова Е. В., Грабович М. Ю. Использование штаммов рода *Acinetobacter* для биоремедиации нефтезагрязненных почв на территории Ворожежской области // Вестн. ВГУ. 2011. № 2. С. 127–133.

- 16 Ившина И. Б., Криворучко А. В., Куюкина М. С., Костина Л. В., Пешкур Т. А., Каннингхэм К. Д. Биоремедиация нарушенных углеводородами и тяжелыми металлами почв с использованием *Rhodococcus*-биосурфактантов и иммобилизованных родококков // Аграр. вестн. Урала. 2012. № 8. С. 65–68.
- 17 Cooper D. G., Goldenberg B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species // Appl. and Environ. Microbiol. 1987. Vol. 53. No. 2. P. 224–229.
- 18 Ягофарова А. Я., Молдагулова Н. Б., Муканова К. Т., Канаев Д. Б., Курманбаева А. Б., Хасенова Э. Ж. Выделение биосурфактантов из супернатанта штаммов микроорганизмов *Bacillus thuringiensis* A1, *Dietzia maris* U.2.5 // Биотехнол. теория и практика. 2012. № 4. С. 30–33.
- 19 Серебрякова Е. В., Дармов И. В., Медведев Н. П., Алексеев С. А., Рыбак С. И. Оценка гидрофобных свойств бактериальных клеток по адсорбции на поверхности капель хлороформа // Микробиология. 2002. Т. 71, № 2. С. 237–239.
- 20 Ягофарова А. Я., Бердимуратова К. Т., Хасенова Э. Ж., Молдагулова Н. Б. Изучение состава и свойств микробных ПАВ // Актуал. проблемы гуманитар. и естеств. наук. 2014. № 9. С. 39–42.
- 21 Третьякова М. С., Беловежец Л. А., Маркова Ю. А., Макарова Л. Е. Возможные пути деструкции полиароматических углеводородов нефти некоторыми видами бактерий-нефтедеструкторов, выделенными из эндо- и ризосферы растений // Агрехимия. 2017. № 12. С. 46–51.
- 22 Льюнг Т. М., Нечаева И. А., Петриков К. В., Пунтус И. Ф., Понаморева О. Н. Бактерии-нефтедеструкторы рода *Rhodococcus* – потенциальные продуценты биосурфактантов // Физико-хим. и общая биология. 2016. № 1 (16). С. 50–60.