

**ВЫДЕЛЕНИЕ БИОСУРФАКТАНТОВ ИЗ СУПЕРАТАНТА ШТАММОВ
МИКРООРГАНИЗМОВ DIETZIA MARIS MB3, DIETZIA MARIS U.2.1**

**А.Я. Ягофарова¹, К.Т. Муканова¹, А.А. Наурызова¹, Н.Б. Молдагулова¹,
Ж.К. Масалимов^{1,2}, Е.М. Раманкулов¹**

¹Национальный центр биотехнологии Республики Казахстан КН МОН РК, г.Астана, ул.Валиханова 13/1, 010000, Ecolab@biocenter.kz, РК, ²Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, г.Астана, ул.Мунайтынова 5, 010000, РК

Показана способность штаммов Dietzia maris U.2.1 и Dietzia maris MB3 изменять поверхностное натяжение нефтяной пленки. Приведены результаты по выделению биосурфактантов из штаммов продуцентов, и их ИК – спектры. Количественное определение содержания биосурфактантов проводили спектрофотометрическим методом.

ВВЕДЕНИЕ

Вещества, являющиеся составной частью бактерий, способные снижать поверхностное натяжение и обладающие эмульгирующей активностью относятся к биосурфактантам. Большинство природных биосурфактантов (БиоПАВ) молекулы, содержащие несколько различных структур: липопротеиды, гликолипиды, остатки высших карбоновых и фосфолипиды[1].

Современные исследования показали, что биоПАВ обладают значительными преимуществами по сравнению с синтетическими поверхностно - активными веществами – это высокая степень биодegradации, низкая токсичность, возможность их получения из дешевого и возобновляемого источника. Поэтому в настоящее время большое внимание уделяется получению и применению биосурфактантов при бурении скважин нефтепроводов и добыче нефти, получении смазочных материалов, биоремедиации загрязненных районов, при получении пищевых продуктов, в здравоохранении.

Авторы рассматривали получение биосурфактантов из различных штаммов [2]. Было исследована способность бактериального штамма Rhodococcus ruber УКМ Ас-288 продуцировать клеточно-связанные биосурфактанты.

Выделение биосурфактантов проводили различными растворителями. Рассматривалась зависимость степени экстракции биоПАВ от различных растворителей. Количество выделенных биоПАВ рассчитывали математически.

Для получения биосурфактантов используют бактерии, выделенные из нефтезагрязненных почв. В работе [3] исследовали низкомолекулярный сурфактант, полученный из бактерии Serratia sp. НС-Р1 загрязненных нефтью почвенных образцов. Выделение биосурфактантов проводили ацетоном. Количественное содержание определяли методом тонкослойной хроматографии (ТСХ).

Исследователями [1, 4] были получены биоПАВ из штаммов Serratia marcescens NSK-1, Pseudomonas sp, выделение последних проводили экстракцией из супернатанта смесью экстрагентов. Измерен сухой вес биосурфактантов, исследована способность снижать поверхностное натяжение, исследованы различные источники углеводов для роста микроорганизмов, эмульгирующая активность, биохимические характеристики, токсичность, получены ИК спектры.

Также для получения штаммов продуцентов биосурфактантов используют нефтезагрязненную сточную и морскую

воду. Выделение биосурфактантов рамнолипидов из штамма *Renibacterium salmonarium* 27BN описано в работе [5], при этом рамнолипиды определяли ТСХ и методом ИК - спектроскопии. Авторами Maneerat S., Phetrong K. были выделены восемь продуцентов биосурфактантов из нефтезагрязненной морской воды [6]. Из них было отобрано три штамма и исследованы изменения эмульгирующей активности в зависимости от изменения температуры, влияние pH, концентрации различных солей.

В настоящей работе показаны результаты выделения биосурфактантов продуцируемые штаммами микроорганизмов *Dietzia maris* U.2.1 и *Dietzia maris* MB3.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

В качестве исходного материала использовали штаммы нефтеокисляющих микроорганизмов *Dietzia maris* U.2.1 и MB3.

Для получения экзогенных метаболитов микроорганизмы культивировали на агаризованной среде при температуре 30°C. Для получения биомассы углеводородоокисляющих микроорганизмов их выращивали на питательном бульоне при температуре 37 °C в течение пяти суток на перемешивающем устройстве Stuart S150.

Для определения наличия биосурфактантов в чашки Петри с диаметром 15 см помещали 20 мл дистиллированной воды, затем 1мкл сырой нефти на поверхность воды. На поверхность нефти (желательно в центр) добавляли 100 мкл супернатанта, выбранной культуры микроорганизмов. Диаметр образовавшейся чистой зоны измеряли через 30сек.

Непосредственно перед экстракцией культуральную жидкость с бактериями осаждали центрифугированием на центрифуге Эппендорф 5110 (Германия) при 3 тыс об/мин в течение 15 минут, при ком-

натной температуре. Выделение экзогенных метаболитов проводили двукратной экстракцией из супернатанта при pH=1,6-2. pH раствора устанавливали 1M HCl и измеряли иономером Consort C830. Органическую фазу собирали в приемники и упаривали. Наличие белого цвета указывает на присутствие сурфактантов в данном экстракте. Затем полученный экстракт разбавляли растворителем.

Регистрацию ИК – спектров проводили на ИК Фурье – спектрометре Perkin Elmer Spectrum BX

Определение количественного содержания биосурфактантов проводили с использованием метиленового синего спектрофотометрическим методом. Образец помешали в делительную воронку, устанавливали pH раствора, используя индикатор фенолфталеин, 3 % раствор H_2O_2 и фосфатно-буферный раствор, прибавляли 1 мл метиленового синего. Экстрагировали двумя порциями хлороформа по 2 мл, если при экстракции наблюдается образование эмульсии, добавляли 1 мл изопропилового спирта. Экстракт собирали в приемнике, фильтруя через воронку со стекловатой.

Растворы H_2O_2 и фосфатно-буферный раствор, раствор метиленового синего готовили на деионизованной воде, которую получали на бидистилляторе Santorius arium 611DI.

Измерение оптической плотности проводили при 652 нм на спектрофотометре APEL РД-303UV, в качестве холостого раствора использовали растворитель. Содержание сурфактантов рассчитывают по калибровочной кривой, полученной с использованием стандартов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения наличия ПАВ и биосурфактантов на поверхность нефти в различные чашки Петри добавляли по 100 мкл воды, культуральной жидкости,

синтетического ПАВ и супернатанты штаммов продуцентов экзогенных мета-

болитов U.2.1 и MB3. Общие результаты с контрольным образцом представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Определение наличие экзогенных метаболитов в супернатанте

Название	Образование зоны	Диаметр образовавшейся зоны
контроль	"_"	"_"
вода	"_"	"_"
культур.жид.	"+"	0,2см
синтетический ПАВ	"+"	3см
Dietzia maris MB3	"+"	4см
Dietzia maris U.2.1	"+"	2см

Из таблицы видно, что в контроле и в случае образца с водой чистая зона на поверхности нефтяной пленки не образовалась. Диаметр образовавшейся чистой зоны культуральной жидкости не превышает 0,2 см. При добавлении синтетического ПАВ и штамма *Dietzia maris* U.2.1 диаметр образовавшейся чистой зоны составляет 3 и 2 см соответственно, наибольший диаметр образовавшейся чистой поверхности 4 см наблюдался в случае штамма *Dietzia maris* MB3.

Методом ИК – спектроскопии были исследованы биосурфактанты, выделен-

ные из *Dietzia maris* MB3 и U2.1. (рисунок 1, 2). ИК – спектры характеризуются наличием характерных для гликолипидов функциональных групп.

На спектрах биоПАВ наблюдается наличие широкой полосы валентных колебаний функциональных групп алифатических С-Н связей в области 2956, 2927 и 2856 см⁻¹ и при 1452 и 1460 см⁻¹. Полосы валентных колебаний карбонильных групп наблюдаются в области 1706-1690 см⁻¹. В области 1000-1075 и 1251, 1252 см⁻¹ лежат валентные колебания связей сложноэфирной группы С-О-С.

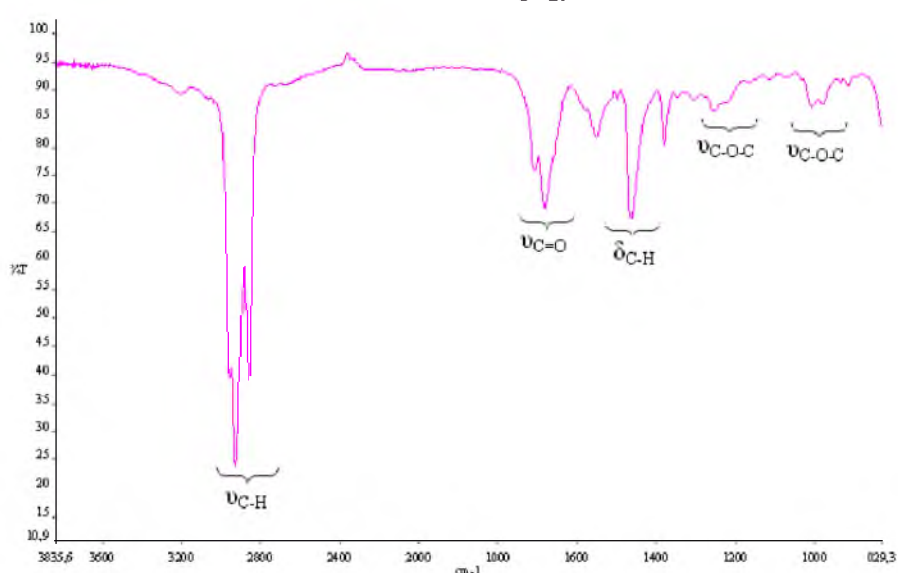


Рисунок 1 – ИК спектры гликолипидов биосурфактантов, полученных из культуры *Dietzia maris* MB3

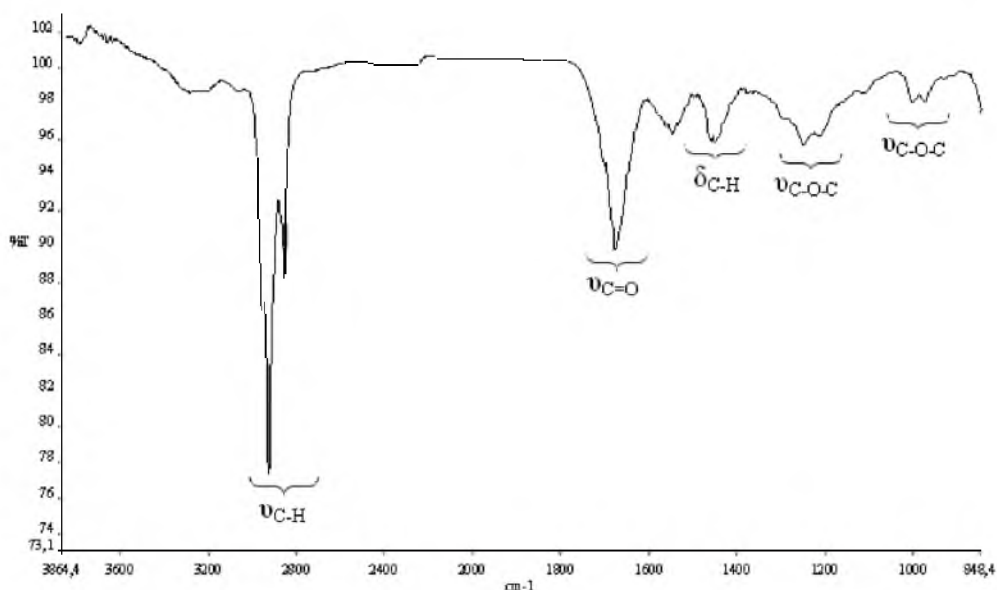


Рисунок 2 – ИК спектры гликолипидов биосурфактантов, полученных из культуры *Dietzia maris* U 2.1.

Спектрофотометрический метод с красителем метиленовым синим использовали для количественного определения биосурфактантов.

Предварительно была построена калибровочная кривая на стандартных растворах синтетического поверхностно

– активного вещества. Образцы супернатантов штаммов *Dietzia maris* U 2.1. и MB3 продуцентов биосурфактантов проводили через все стадии пробоподготовки, как и калибровочные растворы. Результаты количественного определения биосурфактантов приведены в таблице 2.

Таблица 2- Количественное определение биоПАВ методом спектрофотометрии

Название штамма	A	C, мг/л
<i>Dietzia maris</i> U 2.1	1,273	2,159±0,010
<i>Dietzia maris</i> MB3	0,378	0,533±0,012

Данные таблицы 2 свидетельствуют о том, что штамм *Dietzia maris* U2.1 продуцирует большее количество биосурфактантов, чем *Dietzia maris* Mb3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты показывают, что штаммы, получен-

ные из нефтезагрязненной почвы Западно-Казахстанской области *Dietzia maris* U 2.1 и MB3, способны продуцировать биосурфактанты, относящиеся к группе гликолипидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Anyanwu C. U., Obi S.K.C., Okolo B.N. Lipopeptide Biosurfactant Production by *Serratia marcescens* NSK Strain Isolated from Petroleum-contaminated Soil // J. Appl. Sci. Res. 2011. №3. P. 79-87.
2. Корпенко Е.В., Пристай М.В., Макитра Р.Г., Пальчикова Е.Я. Оптимизация процесса экстракции биосурфактантов, синтезированных бактериями рода *Phodococcus* // Жур. орган. химия. 2011. Т. 2. С. 124-128.
3. Комлева Е.В., Шараева А.А., Петухова Н.И. Выделение и исследование свойств низкомолекулярного сурфактанта бактерий *Serratia* sp. HC-P1 // Башкир. хим. жур. 2009. Т.16. №4. С. 65-67.
4. Anandaraj B., Thivakaran P. Isolation and production of biosurfactant producing organisms from oil spilled soil // Biosci. Tech. 2010. Vol.1. №3. P. 120-126.
5. Christova N., Tuleva B., Lalchev Z., Jordanova A., Jordanov B. Rhamnolipid biosurfactants produced by *renibacterium salmoninarum* 27 BN during growth on n-hexadecane // Zeitschrift fuer Naturforschung. Section C Biosciences. 2004. №59. P. 70-74.
6. Maneerat S., Phetrong K. Isolation of biosurfactant – producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant // Songklanakarin J. Sci. Technol. 2007. Vol.29. №3. P. 781-790.

ТҮЙІН

Dietzia maris U.2.1 и *Dietzia maris* MB3 штамдарының мұнай қабықшасының беткі тартылуын өзгертетін қабілеті көрсетілді. Өндіруші-штамдардан биосурфактанттарды бөліп алу нәтижелері және олардың ИҚ – спектрлері келтірілген. Биосурфактанттардың сандық құрамы спектрофотометрлік әдіспен анықталды.

SUMMARY

Ability of strains *Dietzia maris* U.2.1 and *Dietzia maris* MB3 for changing of oil film surface tension was shown. The results of biosurfactants isolation and their IR – spectra were shown. Quantitative determination of biosurfactants was conducted with spectrophotometric method.