

Министерство образования и науки Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

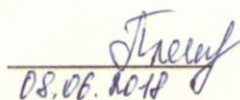
Кафедра биохимии и биофизики

**БАКТЕРИИ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ БУРОВЫХ ШЛАМОВ, –
ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОДУЦЕНТЫ БИОПАВ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 - Биология
биологического факультета
Колесник Сергея Дмитриевича

Научный руководитель:
профессор кафедры биохимии
и биофизики, д.б.н.


08.06.2018

Е.В. Плешакова

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


08.06.2018

С.А. Коннова

Саратов, 2018

Введение. У всех поверхностно-активных веществ (ПАВ) есть особые свойства, приводящие к снижению поверхностного и межфазного натяжения. БиоПАВ (биосурфактанты и биоэмульгаторы) – это амфифильные молекулы, которые вырабатываются преимущественно микроорганизмами, а также дрожжами и грибами. Они могут выполнять много разных функций, связанных с поверхностью, среди которых есть функция солубилизации (растворения) гидрофобных субстратов.

Биосурфактанты – это низкомолекулярные соединения, главным образом, гликолипиды или короткоцепочечные липопептиды, биоэмульгаторы – высокомолекулярные соединения. Хорошо изучены рамнолипиды и сурфактин, продуцируемый *Bacillus* sp. Разнообразные функциональные свойства, а именно: эмульгирование, смачивание, пенообразование, разделение фаз, поверхностная активность и снижение вязкости нефти делает их применимыми для решения многих прикладных задач.

Интерес к исследованию и применению биоПАВ растет в связи с тем, что эти соединения имеют природное происхождение, а также в связи с их меньшей токсичностью по сравнению с синтетическими сурфактантами. Ожидается, что в будущем они будут широко применяться в промышленности и экологии. Поэтому изучение потенциальных продуцентов биоПАВ и подбор оптимальных условий культивирования для максимального синтеза сурфактантов являются актуальными научно-практическими задачами.

В связи с этим, целью наших исследований являлась оценка способности микроорганизмов, выделенных из буровых шламов, к синтезу биоПАВ при культивировании продуцентов в различных условиях.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Оценить способность микробных штаммов, выделенных из буровых шламов, к синтезу биоПАВ, с использованием OST-метода.

2. Изучить влияние гидрофобных и гидрофильных субстратов на способность микроорганизмов к снижению поверхностного натяжения культуральной среды и супернатантов.

3. Исследовать способность микробных штаммов, выделенных из буровых шламов, к снижению поверхностного натяжения культуральной среды и супернатантов при выращивании их в среде с различным содержанием NaCl.

Объектами исследований являлись 6 бактериальных штаммов, выделенных Беляковым А.Ю. [1] из двух образцов буровых шламов с высоким значением pH (pH 9) и высокой степенью минерализации (15%). Это микробные штаммы: *Halomonas* sp. ОБР 1; *Bacillus circulans* НШ; *B. firmus* ОБР 1.1; *B. firmus* ОБР 3.1; *Solibacillus silvestris* 3.2 и *B. circulans* ОБР 3.3.

Качественная оценка способности бактерий к биосинтезу ПАВ осуществлялась в соответствии с OST-методом (Oil Spread Technique – метод распространения нефти [2]). Учитывали диаметр свободных от нефти зон, который коррелирует с активностью поверхностно-активного вещества. Культуры, формирующие чистые зоны, считали производителями биосурфактантов.

Для решения следующих задач бактерии культивировали в 20 мл жидкой минеральной среды М9 с различными источниками углерода, а также в среде с глицерином (2% по весу) в качестве единственного источника углерода и энергии при различных концентрациях NaCl (0,05; 3,5 и 6,5 % по объему). В качестве абиотического контроля использовали минеральную среду с субстратом без микроорганизмов. В качестве посевного материала использовали смыв суточной культуры бактерий (в случае контрольного нефтеокисляющего микроорганизма *Dietzia maris* АМЗ – трехсуточной) с

МПА стерильным физиологическим раствором. Оптическая плотность посевной дозы составляла 0,2-0,5 ед. при длине волны 540 нм. Каждый вариант изучали в трех повторностях.

Для оценки способности микроорганизмов к снижению поверхностного натяжения культуральной среды и супернатантов при выращивании их в различных условиях использовали метод отрыва платинового кольца, который основан на измерении максимального усилия для отрыва кольца с известной геометрией, сделанного из хорошо смачиваемого материала [3]. Также рассчитывали показатель $\Delta\sigma$ – разницу между величиной поверхностного натяжения опытного образца и контрольного (среда без бактерий) по формуле:

$$\Delta\sigma = \sigma_{x'} - \sigma_{x''}$$

где $\sigma_{x'}$ – величина поверхностного натяжения в контрольном образце;

$\sigma_{x''}$ – величина поверхностного натяжения в опытном образце.

Бакалаврская работа состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка использованных источников, включающего пятьдесят девять источников.

Основное содержание работы. Проведенный эксперимент по оценке качественной способности бактерий к биосинтезу ПАВ, осуществленный в соответствии с OST-методом, продемонстрировал, что все 6 исследованных бактериальных штаммов, выделенных из буровых шлам, являются продуцентами биосурфактантов. Установлено, что диаметр образовавшихся чистых зон для *S. silvestris* ОБР 3.2 составляет 40 мм, для *Halomonas* sp. ОБР 1 – 30 мм, для *B. firmus* ОБР 1.1 – 25 мм. Также следует отметить, что чистые зоны, формируемые тремя вышеперечисленными культурами, больше, чем чистая зона контрольного нефтеокисляющего микроорганизма *D. maris* АМЗ. Таким образом, по степени активности биоПАВ микробные штаммы, выделенные из буровых шлам, можно расположить в следующем порядке:

B. circulans ОБР 3.3=*B. firmus* ОБР 3.1=*B. circulans* НШ<*B. firmus* ОБР 1.1=*Halomonas sp.* ОБР 1<*S. silvestris* ОБР 3.2.

Следующей задачей экспериментальной работы была оценка способности микроорганизмов – потенциальных продуцентов биоПАВ к снижению поверхностного натяжения культуральной среды и супернатантов при выращивании их на различных субстратах: гидрофобных и гидрофильных. Результаты данного эксперимента представлены в таблице 1. Согласно литературным данным [4, 5], микроорганизмы, снижающие поверхностное натяжение более чем на 10 мН/м, могут являться перспективными продуцентами ПАВ.

В качестве гидрофильного субстрата использовали глюкозу. При расчете $\Delta\sigma$ было обнаружено, что этот показатель незначительно варьировал в культуральной среде исследованных бактерий, находясь в диапазоне от 2,1 до 8,8 мН/м. Максимальные значения зафиксированы в культуральной среде: *B. firmus* ОБР 3.1, *S. silvestris* ОБР 3.2 и *B. circulans* ОБР 3.3. Для определения типа биоПАВ регистрировали поверхностное натяжение не только в культуральной среде с клетками, но и в супернатантах культур, для этого культуральную жидкость центрифугировали, осадок клеток отбрасывали. Было обнаружено, что у микроорганизмов *B. firmus* ОБР 1.1, *B. firmus* ОБР 3.1, *B. circulans* НШ значение $\Delta\sigma$, измеренное в супернатанте, выше, чем значение $\Delta\sigma$, определенное в культуральной среде. Таким образом, у данных микроорганизмов образование экзоПАВ при культивировании в среде с глюкозой превышает продукцию эндогенных ПАВ. В целом, по показателям снижения поверхностного натяжения при росте на глюкозе изученные микроорганизмы нельзя охарактеризовать как микроорганизмы с высокой продукцией ПАВ.

Известно, что закономерности образования биоПАВ одними и теми же микроорганизмами на водорастворимых и нерастворимых субстратах

существенно различаются. В качестве одного из гидрофобных субстратов мы использовали глицерин.

Таблица 1 – Показатели при культивировании бактерий в среде, содержащей гидрофобные и гидрофильные субстраты

Культура	Рост на среде, содержащей:					
	Глицерин		Вазелиновое масло		Глюкоза	
	Поверхн. натяжение, мН/м	$\Delta\sigma$, мН/м	Поверхн. натяжение, мН/м	$\Delta\sigma$, мН/м	Поверхн. натяжение, мН/м	$\Delta\sigma$, мН/м
<i>Halomonas</i> sp. ОБР 1	49,87±2,15	19,37	58,53±1,27	7,64	50,51±0,98	3,74
Супернатант ОБР 1	52,60±1,24	16,64	61,31±0,63	4,86	50,67±0,74	3,58
<i>B. firmus</i> ОБР 1.1	49,44±0,86	19,80	56,86±0,63	9,31	52,13±1,84	2,12
Супернатант ОБР 1.1	52,21±0,65	17,03	59,50±1,50	6,67	50,83±1,23	3,42
<i>B. firmus</i> ОБР 3.1	58,08±0,43	11,16	58,22±1,17	7,95	47,09±1,29	7,16
Супернатант ОБР 3.1	58,26±2,05	10,98	57,56±1,27	8,61	45,62±1,47	8,63
<i>S. silvestris</i> ОБР 3.2	55,47±0,86	13,77	58,39±1,45	7,78	46,76±1,85	7,49
Супернатант ОБР 3.2	57,62±1,55	11,62	60,67±0,83	5,50	47,3±1,12	6,95
<i>B. circulans</i> ОБР 3.3	54,03±2,16	15,21	55,2±2,40	10,97	45,45±2,26	8,80
Супернатант ОБР 3.3.	56,47±1,50	12,77	52,83±0,72	10,34	47,79±1,12	6,46
<i>B. circulans</i> НШ	51,59±2,15	17,65	53,67±1,10	12,50	49,63±1,12	4,62
Супернатант НШ	54,75±0,99	14,49	55,73±0,86	10,44	48,88±1,56	5,37
<i>D. maris</i> АМЗ	55,18±1,93	14,06	58,53±0,86	7,64	52,46±1,29	1,79
Супернатант АМЗ	55,90±1,72	13,34	61,31±1,20	4,86	51,97±1,29	2,28
Контроль	69,24±0,60	0	66,17±0,83	0	54,25±1,25	0

Было выявлено, что показатель снижения поверхностного натяжения культуральной среды составлял от 14 до 19,8 мН/м (таблица 1). Максимальные значения наблюдались у бактериальных штаммов: *Halomonas* sp. ОБР 1 (19,37 мН/м), *B. firmus* ОБР 1.1 (19,80 мН/м) и *B. circulans* НШ (17,65 мН/м). И эти значения были заметно выше, чем при культивировании бактерий в среде с глюкозой. Все изученные бактерии при культивировании на гидрофобном субстрате (глицерин) снижали поверхностное натяжение более чем на 10 мН/м как культуральной среды, так и супернатантов, что позволяет отнести их перспективным продуцентам эндо- и экзоПАВ.

При культивировании микроорганизмов в жидкой среде с другим гидрофобным субстратом – вазелиновым маслом, нами установлено, что показатель снижения поверхностного натяжения варьировал от 7,6 до 12,5 мН/м в культуральной среде и от 4,9 до 10,4 мН/м в супернатантах (таблица 1). Максимальные значения, которые позволяют отнести бактерии к перспективным продуцентам биоПАВ (выше 10 мН/м), наблюдались у штаммов: *B. circulans* ОБР 3.3 и *B. circulans* НШ. В целом, значения $\Delta\sigma$ как в культуральной среде, так и в супернатантах бактерий, выращенных в среде с вазелиновым маслом, были ниже, чем у бактерий, выращенных в среде с глицерином. Поэтому проведенные нами эксперименты позволяют сделать заключение, что глицерин является оптимальным субстратом для продукции эндо- и экзоПАВ изученными бактериями.

Ранее Беляковым А.Ю. с соавторами [6] было показано, что бактерии, выбранные нами для исследований, обладают галотолерантностью, все они отличались заметным ростом при 3,5 и 6,5%-ной концентрации NaCl в среде. Поэтому мы изучили влияние концентрации NaCl в среде культивирования на способность бактерий снижать поверхностное натяжение культуральной среды и супернатантов. В качестве единственного источника углерода и энергии при культивировании бактерий использовали глицерин. При концентрации NaCl в среде, равной 3,5%, показатели снижения

поверхностного натяжения в культуральной среде бактерий были выше 10 мН/м (рисунок 1). При концентрации NaCl в среде, равной 6,5%, показатели снижения поверхностного натяжения в культуральной среде бактерий находились в диапазоне от 8,5 до 31 мН/м). Исключением явился микробный штамм *Halomonas* sp. ОБР 1, у которого значения $\Delta\sigma$ были невысокими при росте в среде с повышенной концентрацией NaCl. Максимальными значениями $\Delta\sigma$ при культивировании бактерий в среде с 3,5%-ной концентрацией NaCl отличались штаммы *B. firmus* ОБР 3.1 и *B. circulans* 3.3; с концентрацией NaCl 6,5% – *B. circulans* НШ и *B. firmus* ОБР 1.1.

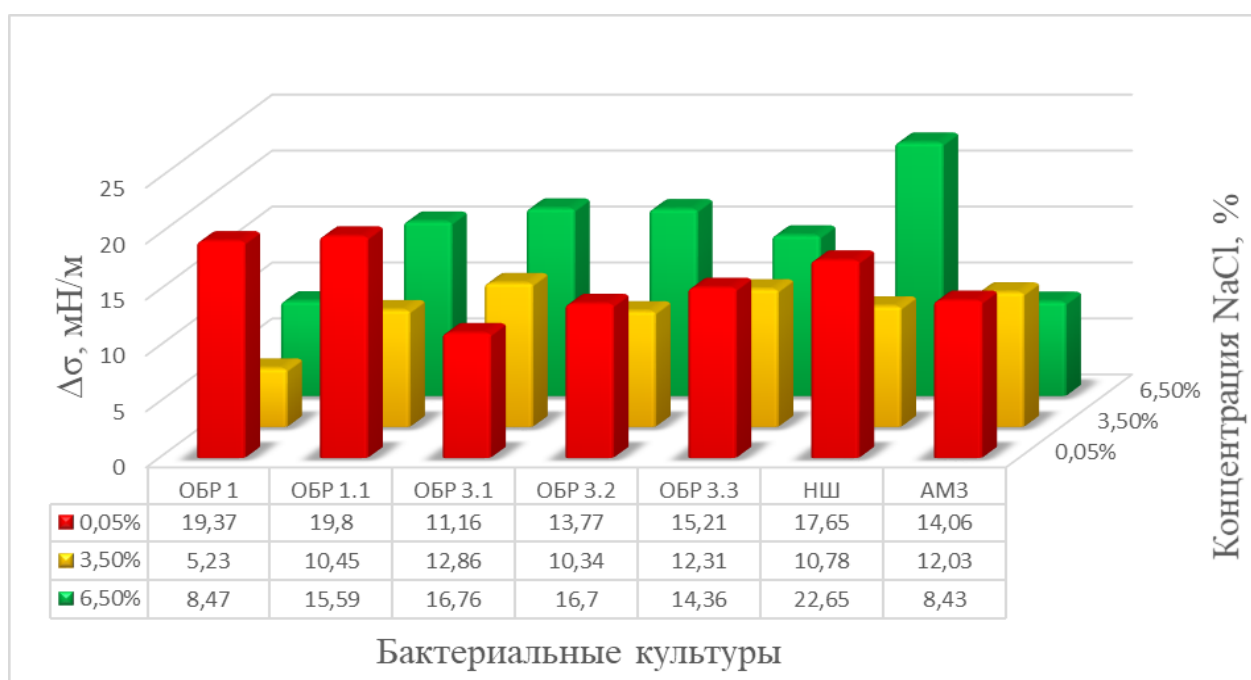


Рисунок 1 – Снижение поверхностного натяжения культуральной среды при выращивании бактерий в присутствии NaCl (0,05; 3,5 и 6,5%).

При выращивании бактерий в среде с 3,5%-ной концентрацией NaCl в супернатантах всех исследованных бактерий показатели снижения поверхностного натяжения были выше, чем в культуральной жидкости, свидетельствуя о синтезе экзоПАВ (рисунок 2). При культивировании бактерий с 6,5%-ным содержанием NaCl продукцией экзоПАВ характеризовались ряд штаммов: *B. circulans* ОБР 3.1, *B. circulans* 3.3 и *B.*

circulans НШ. При культивировании в минеральной среде с глицерином без дополнительного внесения соли изученные бактерии не продуцировали экзоПАВ.



Рисунок 2 – Снижение поверхностного натяжения в супернатантах при выращивании бактерий в присутствии NaCl (0,05; 3,5 и 6,5%).

Таким образом, нами получены доказательства продукции эндо- и экзоПАВ исследованными бактериями (за исключением микробного штамма *Halomonas* sp. ОБР 1) при повышенной солености среды. Выявленные особенности, как мы полагаем, обусловлены различиями в молекулярных механизмах осмоадаптации у изученных бактерий, связанных или несвязанных с синтезом соединений, обладающих свойствами ПАВ.

Заключение. В ходе настоящего экспериментального исследования было показано, что все изученные микроорганизмы синтезируют поверхностно-активные вещества разного типа. Также было наглядно продемонстрировано, что все исследованные бактерии в разной степени снижают поверхностное натяжение. В ходе экспериментов был выявлен оптимальный субстрат, который использовался данными микроорганизмами в качестве

единственного источника углерода и энергии, и позволял им с максимальной эффективностью продуцировать биоПАВ. Было показано, что для исследованных микробных штаммов, выделенных из буровых шламов, можно расположить источники углерода по их предпочтительности для продукции биосурфактантов следующим образом: глицерин > вазелиновое масло > глюкоза. В связи с этим, обнаруженные нами изменения у исследованных микроорганизмов при смене источника углерода в среде культивирования могут свидетельствовать о возможном направленном синтезе биоПАВ.

Знания функциональных и структурных особенностей биосурфактантов и биоэмульгаторов помогают формировать эти поверхностные активные комплексы для возможного применения в различных отраслях промышленности. Однако требования к биосурфактантам постоянно растут, поэтому необходимо искать новые улучшенные методы производства, обнаружения и очистки поверхностно-активных веществ.

Обнаруженная нами способность бактерий к продукции биоПАВ при росте в экстремальных условиях (в условиях повышенной минерализации), является важной характеристикой изученных микробных штаммов. Эти особенности бактерий позволят их использовать в различных биотехнологиях.

Выводы:

1. С помощью OST-метода установлено, что по степени активности биоПАВ исследованные микробные штаммы располагаются в следующем порядке: *B. circulans* ОБР 3.3=*B. firmus* ОБР 3.1=*B. circulans* НШ<*B. firmus* ОБР 1.1=*Halomonas sp.* ОБР 1<*S. silvestris* ОБР 3.2.

2. Показано, что все изученные бактерии снижают поверхностное натяжение культуральной среды и супернатанта при выращивании их в среде с глицерином более чем на 10 мН/м, являясь продуцентами эндо- и экзоПАВ,

среди которых наиболее перспективные – это бактерии *Halomonas* sp. ОБР 1, *B. firmus* ОБР 1.1 и *B. circulans* НШ.

3. Обнаружено, что для оптимального получения биосурфактантов при культивировании изученных микроорганизмов необходимо использовать гидрофобные субстраты.

4. Получены доказательства, что в условиях повышенной солености среды (3,5 и 6,5%) исследованные бактерии продуцируют биоПАВ с превалированием экзоПАВ над эндоПАВ и максимальным выходом при 6,5%-ном содержании NaCl в среде культивирования.

Список использованных источников

1. Беляков, А. Ю. Скрининг микроорганизмов-деструкторов компонентов буровых растворов / А. Ю. Беляков, Е. В. Плешакова // Известия СГУ. Серия Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13, №. 4. С. 37–43.
2. Morikawa, M. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants / M. Morikawa, Y. Hirata, T. Imanaka // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1488. P. 211–218.
3. Миронова, И. К. Методическое пособие к малому практикуму по биофизике. 6-е изд. / И. К. Миронова, М. В. Каневский. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2016. 44 с.
4. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria / D. S. Francy [et al.] // J. Ind. Microbiol. 1991. N 8. P. 237–246.
5. Образование нефтевытесняющих соединений микроорганизмами из нефтяного месторождения Дацин (КНР) / Т. Н. Назина [и др.] // Микробиология. 2003. Т. 72, № 2. С. 206–211.
6. Беляков, А. Ю. Эколого-функциональные особенности бактерий, выделенных из буровых шламов / А. Ю. Беляков, Е. В. Плешакова, В. А. Амангалиева // Известия Самарского научного центра РАН. 2014. № 1. С. 294–298.

Результаты данной работы опубликованы:

Колесник С.Д., Плешакова Е.В. Влияние источников углерода на способность бактерий, выделенных из буровых шламов, снижать поверхностное натяжение // Молодой исследователь: вызовы и перспективы: Сб. статей по материалам LXVII Международной научно-практической конференции «Молодой исследователь: вызовы и перспективы». № 14(67). М.: Изд. «Интернаука», 2018. С. 89–91.



