

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА СИНТЕЗ
БИОСУРФАКТАНТОВ БАКТЕРИЯМИ-ДЕСТРУКТОРАМИ БУРОВЫХ
ШЛАМОВ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы

Направление подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Колесника Сергея Дмитриевича

Научный руководитель:

профессор кафедры биохимии и биофизики,

д.б.н., доцент

_____ Е.В. Плешакова

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

д.б.н., профессор

С.А. Коннова

Саратов 2020

Введение. Известно, что многие бактерии способны синтезировать биосурфактанты и биоэмульгаторы – амфифильные соединения, различающиеся по структуре и химическим свойствам и выполняющие разные функции, такие как: снижение поверхностного и межфазного натяжения, солюбилизация гидрофобных субстратов, разрушение эмульсии, снижение вязкости нефти и многие другие. Биосурфактанты – это низкомолекулярные соединения, главным образом, гликолипиды или короткоцепочечные липопептиды, биоэмульгаторы – высокомолекулярные соединения. Хорошо изучены рамнолипиды и сурфактин, продуцируемый *Bacillus* sp. Благодаря разнообразным функциональным свойствам, природному происхождению, низкой токсичности, биоразлагаемости и относительной простоте получения по сравнению с синтетическими сурфактантами, поверхностно-активные вещества, продуцируемые микроорганизмами (биоПАВ), находят все большее применение в различных отраслях промышленности, медицины, сельском хозяйстве, в биотехнологиях очистки окружающей среды, в технологиях утилизации отходов нефтяной индустрии.

Ранее было показано, что микроорганизмы способны продуцировать биоПАВ с различной интенсивностью в зависимости от используемых субстратов и условий культивирования. Изучение закономерностей роста микроорганизмов – потенциальных продуцентов биоПАВ – и подбор оптимальных условий культивирования для максимального синтеза биоПАВ являются актуальными научно-практическими задачами.

В связи с вышеизложенным, целью данной работы явилось изучение способности бактерий-деструкторов буровых шламов к синтезу биосурфактантов при культивировании бактерий под влиянием различных химических факторов.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. С помощью OST-метода выявить бактериальные штаммы, способные к синтезу биосурфактантов.

2. Исследовать влияние гидрофильных и гидрофобных субстратов на способность бактерий-деструкторов буровых шламов к снижению поверхностного натяжения культуральной среды и супернатантов.

3. Оценить способность бактерий-деструкторов буровых шламов к снижению поверхностного натяжения культуральной среды и супернатантов при выращивании их в среде с различным содержанием NaCl.

4. Исследовать влияние природы источника азотного питания на рост бактерий-деструкторов буровых шламов.

5. На основании сравнительного анализа результатов скрининговых методов определить бактериальные штаммы – наиболее эффективные продуценты биосурфактантов.

Объектами исследований являлись 6 микробных штаммов: *Halomonas* sp. ОБР 1, *Bacillus circulans* НШ, *B. firmus* ОБР 1.1, *B. firmus* ОБР 3.1, *Solibacillus silvestris* ОБР 3.2; *B. circulans* ОБР 3.3, выделенных А.Ю. Беляковым [1] из буровых шламов, отобранных из нефтяных скважин Восточной Сибири. Буровые шламы отличались специфическими свойствами: высоким значением рН (рН 9) и высокой степенью минерализации (15 %). Полуколичественная 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 биоПАВ. Бактерии, формирующие чистые зоны, считали производителями биосурфактантов.

В ходе экспериментов бактерии культивировали в 20 мл жидкой минеральной среды М9 с различными источниками углерода: глицерин, вазелиновое масло, глюкоза (2 % по весу). Также бактерии культивировали в среде с глицерином (2 % по весу) в качестве единственного источника углерода и энергии в одном из экспериментов при различных концентрациях NaCl (0,05; 3,5 и 6,5 % по объему), в другом эксперименте – с дополнительным внесением различных источников азота, г/л: KNO₃ – 1,4; NaNO₃ – 1,2; глутаминовая кислота – 2,35; мочевины – 2,3. Указанные концентрации источников азота

соответствовали соотношению углерода и азота в разных субстратах (40:1). В качестве абиотического контроля использовали минеральную среду с субстратом без бактерий в зависимости от эксперимента содержащую разные источники углерода или с глицерином разной степени минерализации, а также с различными дополнительными источниками азота.

Каждый вариант изучали в трех повторностях, измеряя поверхностное натяжение при температуре окружающей среды 25-27°C методом отрыва кольца [3] в культуральной среде и в супернатантах, полученных центрифугированием при 12 000 об/мин в течение 5 мин на центрифуге Eppendorf 22331 MiniSpin. По полученным результатам рассчитывали показатель снижения поверхностного натяжения ($\Delta\sigma$), как разницу между значениями поверхностного натяжения стерильной среды (контроль) и пробы исследуемой культуральной среды или супернатанта.

В эксперименте по оценке влияния различных источников азота в среде культивирования на синтез биосурфактантов анализировали абсолютный прирост биомассы через 3 и 5 сут культивирования путем измерения оптической плотности клеточной суспензии с помощью фотометрического метода [4].

Для всех полученных данных вычисляли средние значения, для сравнения которых использовали показатели стандартного отклонения и наименьшей существенной разницы. Статистическую обработку результатов проводили при $p \leq 0,05$ с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2010.

Магистерская работа состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка использованных источников, включающего шестьдесят один источник на русском и английском языках. Работа изложена на 69 страницах машинописного текста.

Научная новизна и значимость работы: в ходе проведенных исследований выявлен оптимальный субстрат – глицерин, использование которого изученными бактериями-деструкторами буровых шламов в качестве

единственного источника углерода и энергии позволяет им с максимальной эффективностью продуцировать биосурфактанты. Впервые обнаружены видовые различия в росте бактерий-деструкторов буровых шламов под влиянием источников азота различной природы.

У пяти из шести исследованных бактериальных штаммов обнаружена способность к продукции эндо- и экзоПАВ при культивировании их в среде с повышенной соленостью (3,5 и 6,5 % NaCl). Полученные в рамках настоящей работы результаты исследований имеют большую перспективу для практического использования изученных бактерий-деструкторов буровых шламов в биотехнологиях детоксикации буровых отходов.

Основное содержание работы. В соответствии с OST-методом осуществлена полуколичественная оценка способности бактериальных штаммов к биосинтезу ПАВ. Проведенный эксперимент продемонстрировал, что все 6 исследованных бактериальных штаммов, выделенных из буровых шламов, являются продуцентами биосурфактантов, максимальные показатели отмечены у бактерий *Solibacillus silvestris* ОБР 3.2; *Bfirmus* ОБР 1.1 и *Halomonas* sp. ОБР 1.

При оценке влияния гидрофильных и гидрофобных субстратов на способность бактерий снижать поверхностное натяжение культуральной среды и супернатантов были обнаружены следующие закономерности: все изученные бактерии снижали поверхностное натяжение культуральной среды и супернатантов при выращивании их в среде с глицерином более чем на 10 мН/м, что позволяет отнести их к перспективным продуцентам эндо- и экзоПАВ (таблица 1). Наиболее перспективные продуценты – это *Halomonas* sp. ОБР 1, *B. firmus* ОБР 1.1 и *B. circulans* НШ. У бактериального штамма *B. circulans* НШ обнаружена высокая продукция эндо- и экзоПАВ при культивировании на среде с обоими изученными гидрофобными источниками углерода (глицерин и вазелиновое масло). При культивировании на среде с вазелиновым маслом высокой продукцией эндо- и экзоПАВ отличался также бактериальный штамм *B. circulans* ОБР 3.3.

Таблица 1 – Сравнительная оценка результатов при культивировании бактерий в среде, содержащей гидрофобные и гидрофильные субстраты

Бактерии	Рост на среде, содержащей:					
	глицерин		вазелиновое масло		глюкозу	
	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 <i>Halomonas</i> sp. 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 <i>B. firmus</i> 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 <i>B. firmus</i> 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 <i>S. silvestris</i> 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 <i>B. circulans</i> 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 <i>B. circulans</i> 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 <i>D. maris</i> АМЗ	55,90±1,72	13,34	61,31±1,20	4,86	51,97±1,29	2,28
Контроль без бактерий	69,24±0,60	0	66,17±0,83	0	54,25±1,25	0

Сделано заключение, что для получения биосурфактантов с высоким выходом при культивировании изученных бактерий-продуцентов оптимально использование водонерастворимых субстратов, в частности, глицерина.

При оценке влияния концентрации NaCl в среде культивирования на способность бактерий снижать поверхностное натяжение культуральной среды и супернатантов было установлено, что пять из шести исследованных бактериальных штаммов способны к продукции эндо- и экзоПАВ при культивировании их в среде с повышенной соленостью (3,5 и 6,5 % NaCl). Исключение составил штамм *Halomonas* sp. ОБР 1. Результаты определения снижения поверхностного натяжения культуральной среды и супернатантов при культивировании бактерий в среде в диапазоне NaCl представлены на рисунке 1 А и Б соответственно. Максимальные значения $\Delta\sigma$ культуральной среды и супернатантов при культивировании бактерий в среде с 3,5 %-ной концентрацией NaCl определены у *B. firmus* ОБР 3.1 и *B. circulans* ОБР 3.3; с 6,5 %-ной концентрацией NaCl – у *B. circulans* НШ и *B. firmus* ОБР 1.1. Обнаруженные нами свойства выделенных из буровых шламов бактерий, способных продуцировать биоПАВ в условиях повышенной солености среды, открывают перспективу практического использования данных микроорганизмов в биотехнологиях утилизации буровых отходов.

Были изучены закономерности роста бактерий-деструкторов буровых шламов, являющихся продуцентами биосурфактантов, в зависимости от природы источников азота. Обнаружено, что под влиянием органических источников азота (мочевина, глутаминовая кислота) развитие всех исследованных бактерий происходило интенсивнее, чем под влиянием минеральных солей: нитратов калия и натрия. Максимальными показателями роста в среде с органическими источниками азота отличался штамм *B. circulans* НШ. Добавление в среду нитрата натрия способствовало стимуляции роста исследованных бактерий меньше, чем другие источники азота. Микробный штамм *B. firmus* ОБР 3.1 характеризовался сходными показателями роста под

влиянием как органических, так и неорганических источников азота.

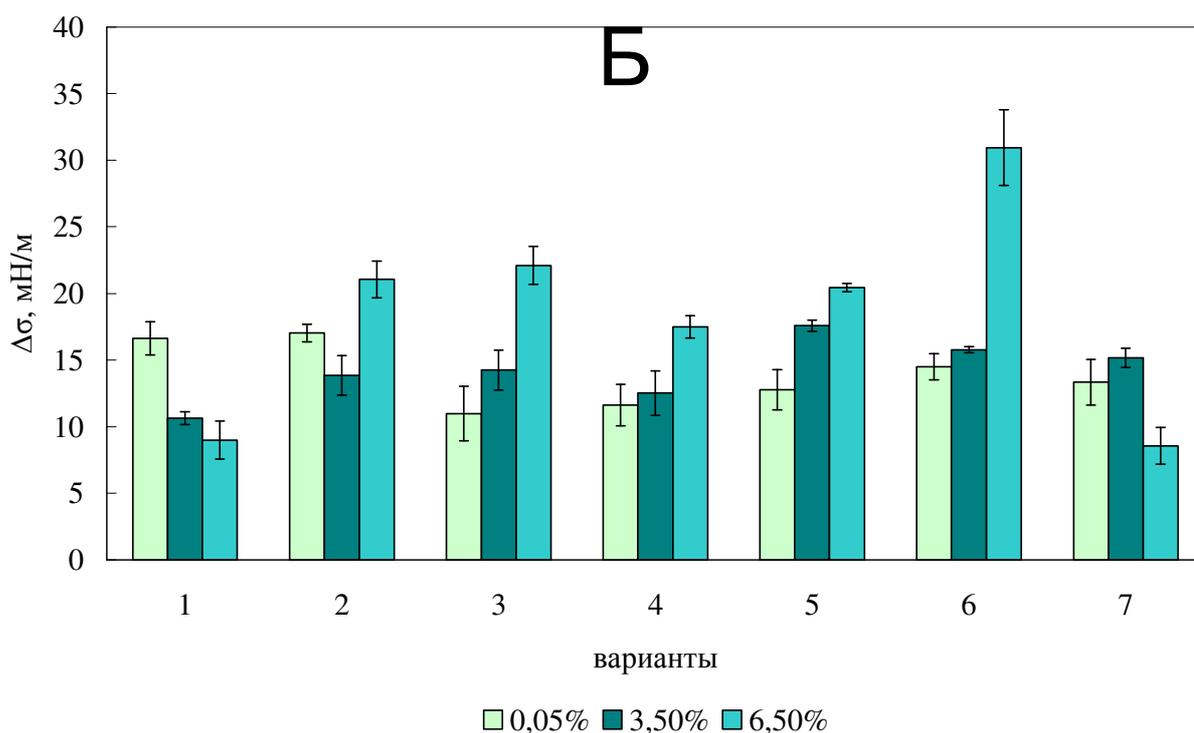
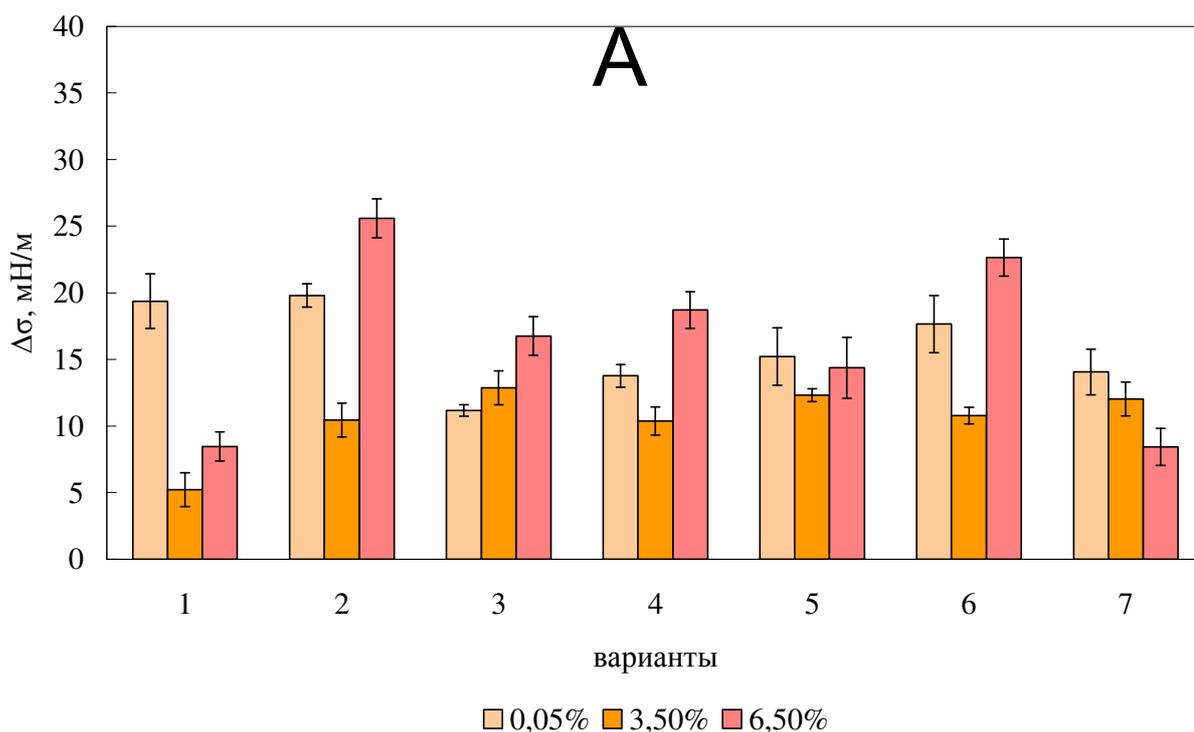


Рисунок 1 – Снижение поверхностного натяжения: А – культуральной среды; Б – супернатантов при выращивании бактерий: 1 – *Halomonas* sp. ОБР 1; 2 – *B. firmus* ОБР 1.1; 3 – *B. firmus* ОБР 3.1; 4 – *Solibacillus silvestris* ОБР 3.2; 5 – *B. circulans* ОБР 3.3; 6 – *B. circulans* НШ; 7 – *D. maris* АМЗ в среде с различным содержанием NaCl

Была осуществлена сравнительная оценка результатов скрининговых методов по выявлению бактерий – эффективных продуцентов биосурфактантов, использованных в ходе настоящей работы, а также результатов, полученных ранее А.Ю. Беляковым с соавт. [5]. В итоге этого сравнительного анализа были определены бактериальные штаммы – наиболее эффективные продуценты биосурфактантов в соответствии с каждым из диагностических методов.

1. Бактериальный штамм *Halomonas* sp. ОБР 1 проявил наибольшую активность к синтезу биоПАВ согласно OST-методу и методу оценки снижения поверхностного натяжения при культивировании в среде с глицерином (2 % по весу). Бактериальный штамм *B. firmus* ОБР 1.1 также синтезировал большое количество биоПАВ согласно OST-методу и методу определения снижения поверхностного натяжения при культивировании в среде с глицерином. Однако данные микроорганизмы продуцировали большое количество биоПАВ согласно и другим методам, таким как: оценка гидрофобно-гидрофильных свойств и эмульгирующей активности у микроорганизмов, оценка снижения поверхностного натяжения при культивировании в среде с вазелиновым маслом.

2. Бактериальный штамм *B. firmus* ОБР 3.1 является эффективным продуцентом биосурфактанта согласно методу оценки эмульгирующей активности у микроорганизмов и методу оценки снижения поверхностного натяжения при культивировании в среде с глюкозой.

3. Бактериальный штамм *S. silvestris* ОБР 3.2 лучше всего продуцировал биосурфактант в экспериментах, связанных с оценкой эмульгирующей активности, с оценкой снижения поверхностного натяжения при культивировании в среде с глюкозой и в OST-методе.

4. Бактериальный штамм *B. circulans* НШ является эффективным продуцентом биосурфактанта при культивировании в среде с глицерином, вазелиновым маслом при оценке снижения поверхностного натяжения и при оценке его гидрофобно-гидрофильных свойств.

5. Оценка гидрофобно-гидрофильных свойств, оценка снижения поверхностного натяжения при культивировании в среде с глюкозой и вазелиновым маслом позволили выяснить, что штамм *B. circulans* ОБР 3.3 синтезировал биосурфактант со средней активностью

Заключение:

В ходе проведенных исследований показана зависимость роста бактерий-деструкторов буровых шламов и синтеза биосурфактантов от трофических условий (гидрофобных и гидрофильных источников углерода, концентрации NaCl в среде культивирования и природы источников азота). В ходе наших исследований при повышенной солености среды получены убедительные доказательства продукции эндо- и экзоПАВ микроорганизмами, выделенными из буровых шламов (за исключением микробного штамма *Halomonas* sp. ОБР 1). Использование микроорганизмов, способных продуцировать биоПАВ в присутствии соли, может заменить дорогостоящие технологии, направленные на снижение солености или удаление соли путем обратного осмоса, ионного обмена или электродиализа перед практическим применением биологической очистки. Поэтому изученные микробные штаммы, как перспективные продуценты ПАВ в экстремальных экологических условиях, могут быть применены в биотехнологиях ремедиации почв и вод, загрязненных органическими поллютантами и тяжелыми металлами, и для утилизации отходов нефтяной индустрии.

Выводы:

1. С помощью OST-метода установлено, что все 6 исследованных бактериальных штаммов-деструкторов буровых шламов способны к синтезу биосурфактантов, наиболее эффективными продуцентами согласно данному методу являются бактерии: *S. silvestris* ОБР 3.2, *Halomonas* sp. ОБР 1 и *B. firmus* ОБР 1.1.

2. Выявлен оптимальный субстрат – глицерин, использование которого бактериями-деструкторами буровых шлам в качестве единственного источника углерода и энергии позволяет им с максимальной эффективностью

продуцировать биосурфактанты.

3. С помощью метода выявления продуцентов биосурфактантов, основанного на оценке поверхностного натяжения культуральной среды и супернатантов определены наиболее эффективные бактерии-продуценты эндо- и экзоПАВ: *Halomonas* sp. ОБР 1, *B. firmus* ОБР 1.1 и *B. circulans* НШ.

4. Максимальные значения $\Delta\sigma$ культуральной среды и супернатантов при культивировании бактерий в среде с 3,5 %-ной концентрацией NaCl определены у *B. firmus* ОБР 3.1 и *B. circulans* ОБР 3.3; с 6,5 %-ной концентрацией NaCl – у *B. circulans* НШ и *B. firmus* ОБР 1.1.

5. Обнаружены видовые различия в росте бактерий-деструкторов буровых шламов под влиянием источников азота различной природы. Более интенсивный рост всех изученных бактериальных штаммов зарегистрирован в присутствии органических источников азота (мочевина, глутаминовая кислота).

6. Проведен сравнительный анализ результатов скрининговых методов, в соответствии с каждым из методов определены бактериальные штаммы – наиболее эффективные продуценты биосурфактантов.

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 Сарат. ун-та, 2016. – 44 с.
4. Гаретова, Л.А. Оценка параметров роста микроорганизмов в условиях периодического и непрерывного культивирования: методические указания к выполнению лабораторной работы по курсу «Основы микробиологии и биотехнологии» для студентов специальности

280201.65 «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» / Л.А. Гаретова, О.А. Кириенко. – Хабаровск: Изд-во Тихоокеан. гос. ун-та, 2010. – 16 с.

5. 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.