

ПРИМЕНЕНИЕ ГЛИКОЛИПИДНЫХ БИОСУРФАКТАНТОВ БАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCUS* ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК МИКРОБНЫХ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

С.В. Алферов, К.В. Астафьева, Т.И. Леонова, В.В. Федина

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия

Введение

В последнее время большое внимание уделяется биосурфактантам – вторичным метаболитам, которые вырабатываются в основном микроорганизмами, а также грибами и дрожжами в процессе их жизнедеятельности. Являясь по своей природе амфифильными молекулами, биосурфактанты являются альтернативой синтетическим поверхностно-активным веществам, которые производятся в химической промышленности [1]. Основные преимущества биосурфактантов по сравнению с синтетическими ПАВ – их низкая токсичность, практически полная биоразлагаемость, экологическая безопасность, высокая биосовместимость, возможность получения из дешевых и возобновляемых источников, разнообразие химической структуры и, как следствие, физико-химических свойств, термостабильность, кислотостойкость, способность растворять гидрофобные компоненты, низкие значения критической концентрации мицеллообразования и т. д. При этом биосурфактанты имеют и ряд свойств, не характерных для синтетических ПАВ. Среди них, например, антибактериальная, антифунгицидная, антиадгезионная и антивирусная активность [1].

Функциональные возможности биосурфактанта в живых системах до сих пор полностью не изучены. Примеры естественной роли биосурфактантов включают: увеличение площади поверхности и биодоступности гидрофобных субстратов, регулирование прикрепления микроорганизмов к поверхностям, участие в механизмах чувства кворума, связывание тяжелых металлов и антимикробная активность. Вышеупомянутые функции могут иметь значительное влияние на производительность биоэлектрохимических систем (БЭС). Недавние исследования подтвердили, что биосурфактанты могут способствовать выработке электроэнергии в различных экзоэлектрогенных бактериях [2, 3]. БиоПАВ усиливают перенос электронов через клеточные мембраны за счёт снижения сопротивления мембраны и увеличения её проницаемости, ускоряют перенос веществ, улучшают деградацию субстрата, при этом значительно повышая выходную мощность [4]. Кроме того, они способствуют прикреплению гидрофильной бактериальной клетки к гидрофобному субстрату. В связи с этим целью данной работы является повышение эффективности работы микробного биотопливного элемента за счёт использования гликолипидных биосурфактантов бактерий рода *Rhodococcus*.

В соответствии с химической природой, биосурфактанты разделяют на следующие группы: гликолипиды (рамнолипиды – *Pseudomonas aeruginosa*; трегалолипиды – *Nocardia rhodochrous*, *Rhodococcus erythropolis*, *N. erythropolis*, *Mycobacterium phlei*; софоролипиды – *T. ampicola*, *Torulopsis bombicola*, *T. petrophilum*); липобелки и липопептиды (лихенизин – *Bacillus licheniformis*; циркулоцины – *B. circularis*; субтилизин – *B. subtilis*; полимиксины – *B. subtilis*; эмульсан – *Phormidium* sp.; вискозин – *Pseudomonas fluorescens*; липозан – *Candida lipolytica*); полисахариды (эмульсаны – *Arthrobacter* sp.; *Phormidium* sp.; *A. calcoaceticus*; ксантан – *Xanthomonas campestris*); жирные кислоты – *C. lepus*, *Candida* sp.; фосфолипиды – *Tiobacillus thiooxidans*; *Candida* sp. *Corynebacterium* sp.

Некоторые авторы делят биосурфактанты на две группы в зависимости от их молекулярной массы – с высокой и низкой молекулярной массой соответственно [5–7]. Биосурфактанты первой группы (липополисахариды, полисахариды, протеины, липопротеины) имеют выраженные свойства эмульсификаторов и стабилизаторов эмульсий. Вторую группу составляют гликолипиды, липопептиды и фосфолипиды, эффективно уменьшающие межфазное и поверхностное натяжение. Наиболее изученной и широко применяемой является подгруппа биосурфактантов с низкой молекулярной массой, к которой относятся гликолипиды, а именно: рамнолипиды, софоролипиды, трегалолипиды, целлобиозолипиды, маннозилэритрит-липиды [6, 8]. Среди представителей группы с высокой молекулярной массой лучше всего исследован биоэмульсификатор эмульсан, продуцируемый *Acinetobacter* [9]. В литературе также можно встретить разделение биосурфактантов на собственно биосурфактанты и биоэмульсификаторы [5, 8]. Необходимо отметить, что биосурфактанты могут сочетать качества обеих групп и быть взаимозаменяемыми [5, 8]. Химическая структура некоторых наиболее изученных биосурфактантов представлена на рис. 1.

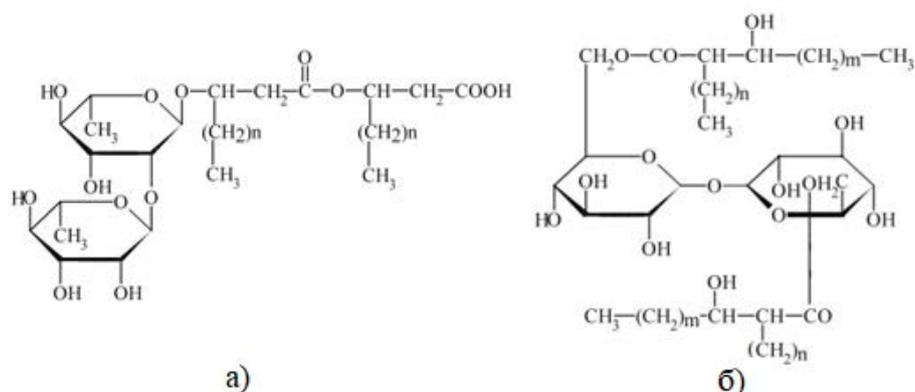


Рисунок 1. Химическая структура некоторых наиболее изученных биосурфактантов. а) диамнолипиды, б) димиколаты трегалозы [5].

Уникальные физико-химические и потребительские свойства, а также перспективы широкого применения в различных областях человеческой деятельности определяют устойчивый научный и практический интерес к биосурфактантам на протяжении последних десятилетий [10, 11]. Основные преимущества биосурфактантов по сравнению с синтетическими ПАВ – их низкая токсичность, практически полная биоразлагаемость, экологическая безопасность, высокая биосовместимость, возможность получения из дешевых и возобновляемых источников, разнообразие химической структуры и, как следствие, физико-химических свойств, термостабильность, кислотостойкость, способность растворять гидрофобные компоненты, низкие значения критической концентрации мицеллообразования и т. д. При этом биосурфактанты имеют и ряд свойств, не характерных для синтетических ПАВ. Среди них, например, антибактериальная, антифунгицидная, антиадгезионная и антивирусная активность [1].

Одним из основных препятствий для эффективного опосредованного внеклеточного переноса электронов является барьерная функция стенок и мембран бактериальных клеток, которая может затруднять взаимодействие с медиаторами. Сурфактанты могут влиять на проницаемость мембраны, что необходимо для переноса электронов при опосредованном переносе электронов (ОПЭ), и может привести к увеличению потока электронов на электрод. Многие исследования показали, что добавление сфоролипидов или липидов трегалозы приводит к увеличению проницаемости мембраны, что в свою очередь эффективно снижает внутреннее сопротивление (БЭС) и, таким образом, увеличивает эффективность переноса электронов [4, 12]. Положительный эффект был связан в основном с ролью сурфактантов в формировании трансмембранных каналов в клеточной мембране. Кроме снижения внутреннего сопротивления биосурфактанты стимулируют образование и влияют на стабильность биопленок в БЭС [4–13].

Материалы и методы

В работе использовали бактерии *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* (ВКМ В-1280) (Всероссийская коллекция микроорганизмов, ИБФМ РАН). Культивирование бактерий проводили на питательной среде, следующего состава: D-сорбит – 200 г./л; дрожжевой экстракт – 20 г./л; дистиллированная вода – 100 мл, pH среды – 5,2–5,5, при температуре 28°C, в течение 18–20 часов. После культивирования клетки собирали центрифугированием при 10000 об/мин 10 мин. и отмывали двукратно 20 мМ натрий-фосфатным буфером с pH 6,0. Осевшие клетки ресуспендировали в новой порции буфера и центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин. Полученные осадки подсушивали на воздухе в течение часа, и замораживали для длительного хранения при температуре –15°C.

Ячейка биотопливного элемента представляла собой две взаимосвязанных кюветы, объём анодного отделения был равен объему катодного и составлял 3 мл. Электродами служили графитовые стержни диаметром 8 мм, площадь рабочей поверхности электродов составляла 300 мм². Высота погружения электродов в раствор – 10 мм. Камеры разделяли протонселективной мембраной МФ-4СК («Пластполимер», Санкт-Петербург, Россия).

В качестве фонового раствора использовали 30 мМ натрий-фосфатный буфер pH=6,0, в качестве субстрата биоокисления использовали глюкозу с концентрацией в кювете 10 мМ. В анодном пространстве использовался медиатор 2,6-дихлорфенолиндофенол, в катодном пространстве гексацианоферрат (III) калия.

Измерения потенциала проводили с помощью гальванопотенциостата Coretest CS120 ("Coretest", КНР). Регистрацию ответов на добавку субстрата в измерительную ячейку начинали после установления стационарного состояния электрода. Оценку электрических характеристик производили после достижения стационарного значения генерируемого потенциала. Измеряемым параметром в процессе биокаталитического окисления субстрата в режиме генерации потенциала являлась величина разности потенциалов за время проведения эксперимента.

Результаты и обсуждение

Для оценки влияния биосурфактанта на энергетические параметры микробного БТЭ проводили сравнительную оценку генерируемого потенциала, максимальной мощности и внутреннего сопротивления, при этом концентрация биосурфактанта в анодном отделении варьировалась от 11 мг/мл до 44 мг/мл. В качестве биокатализатора выступали целые бактериальные клетки *Glucanobacter ohydans* subsp. *industrius* (ВКМ В-1280). В анодном пространстве использовался медиатор 2,6-дихлорфенолиндофенол, в катодное отделение гексацианоферрат (III) калия. В качестве субстрата биоокисления использовалась глюкоза. Для оценки максимальной мощности БТЭ во внешнюю цепь подключалось сопротивление нагрузки в диапазоне от 3 до 47 кОм и проводился расчёт максимальной мощности.

Типичный вид зависимости мощности БТЭ от приложенного внешнего сопротивления при содержании биосурфактанта 22 мг/мл представлен на рисунке 2. Для других содержаний биосурфактанта были получены аналогичные зависимости.

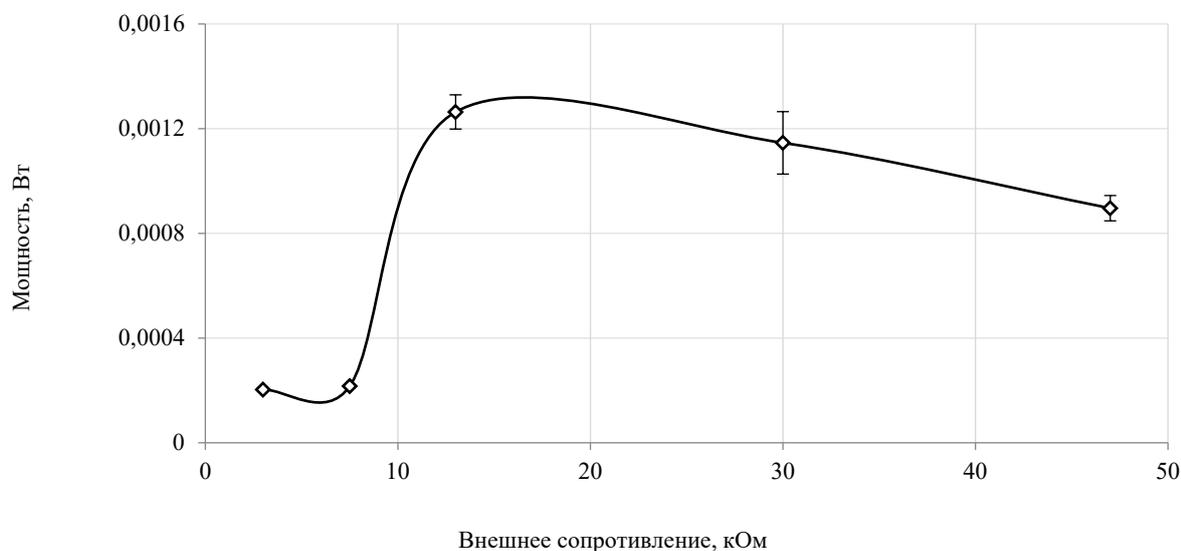


Рисунок 2. Зависимость мощности БТЭ от внешнего сопротивления при содержании биосурфактанта 22 мг/мл.

Как можно видеть максимальная мощность $(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$ Вт наблюдается при внешнем сопротивлении 13 кОм. Исходя из того, что максимальная мощность для БТЭ достигается при равенстве внешнего и внутреннего сопротивления, можно полагать, что внутреннее сопротивление ячейки БТЭ при содержании биосурфактанта 22 мг/мл также находится в области 13 кОм [14].

Полученные значения энергетических параметров микробного БТЭ при различных содержаниях биосурфактанта в анодном пространстве приведены в таблице 1.

Табл. 1. Значения энергетических параметров микробного БТЭ при различном содержании биосурфактанта.

Параметр	Без биосурфактанта	Содержание биосурфактанта 11 мг/мл	Содержание биосурфактанта 22 мг/мл	Содержание биосурфактанта 44 мг/мл
Генерируемый потенциал, мВ	53±7	104±5	176±10	207±10
Мощность, Вт	$(0,30 \pm 0,01) \cdot 10^{-3}$	$(0,30 \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$(0,90 \pm 0,04) \cdot 10^{-3}$
Внутреннее сопротивление, кОм	30	13	13	7,5

Как можно видеть при содержании гликолипидного биосурфактанта 11 мг/мл напряжение макета БТЭ увеличилось в 2 раза, при содержании 22 мг/мл – в 3 раза, при 44 мг/мл – в 4 раза. Кроме того, присутствие биосурфактанта в 3 раза снижает внутреннее макета БТЭ и в значительной степени повышает максимальную мощность. По-видимому, добавление гликолипидного биосурфактанта способствует повышению проницаемости мембраны, что приводит к усилению переноса электронов, однако высокие концентрации биоПАВ могут нарушать целостность бактерий, что приводит к снижению эффективности работы БТЭ.

Подобные результаты были получены в работе [12], где для повышения эффективности работы МТЭ использовали липиды трегалозы, а в качестве биокатализатора бактерии *Rhodococcus pyridinivorans*. С добавлением биосурфактантов потенциал, достигаемый МТЭ, был увеличен до 149, 227 и 284 мВ, что в 1,3 раза, 1,4 раза и 1,8 раза выше по сравнению с контрольным опытом (без добавления биосурфактанта), а максимальная мощность повысилась с $5 \cdot 10^{-3}$ Вт до $30 \cdot 10^{-3}$ Вт.

Дальнейшая оптимизация исследуемой системы БТЭ позволит увеличить выходные характеристики мощности изучаемой модели.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2021–0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами)

Литература

1. Рудакова М.А., Галицкая П.Ю., Селивановская С.Ю. Биосурфактанты: современные тренды применения // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. – 2021. – Т. 163. – №. 2. – С. 177–208.
2. Song Y.C. et al. Effect of surface modification of anode with surfactant on the performance of microbial fuel cell // International Journal of Energy Research. – 2015. – Т. 39. – №. 6. – С. 860–868.
3. Liu J. et al. Enhance electron transfer and performance of microbial fuel cells by perforating the cell membrane // Electrochemistry Communications. – 2012. – Т. 15. – №. 1. – С. 50–53.
4. Wen Q. et al. Electricity generation from synthetic penicillin wastewater in an air-cathode single chamber microbial fuel cell // Chemical engineering journal. – 2011. – Т. 168. – №. 2. – С. 572–576.
5. Banat I.M., Thavasi R. (ed.). Microbial biosurfactants and their environmental and industrial applications. – CRC Press, 2019. – С. 427–444.
6. Gudiña E.J. et al. Potential therapeutic applications of biosurfactants // Trends in pharmacological sciences. – 2013. – Т. 34. – №. 12. – С. 667–675.
7. Naughton P.J. et al. Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries // Journal of applied microbiology. – 2019. – Т. 127. – №. 1. – С. 12–28.
8. Kumar R., Das A.J. Rhamnolipid Biosurfactant. – Springer Nature Singapore, Singapore, Singapore, 2018.
9. Fenibo E.O. et al. Microbial surfactants: The next generation multifunctional biomolecules for applications in the petroleum industry and its associated environmental remediation // Microorganisms. – 2019. – Т. 7. – №. 11. – С. 581.
10. Song Y.C. et al. Effect of surface modification of anode with surfactant on the performance of microbial fuel cell // International Journal of Energy Research. – 2015. – Т. 39. – №. 6. – С. 860–868.
11. Zhang P. et al. Enhanced *Shewanella oneidensis* MR-1 anode performance by adding fumarate in microbial fuel cell // Chemical Engineering Journal. – 2017. – Т. 328. – С. 697–702.
12. Cheng P. et al. Improved performance of microbial fuel cells through addition of trehalose lipids // bioRxiv. – 2018. – С. 339.
13. Pasternak G., Askitosari T.D., Rosenbaum M.A. Biosurfactants and synthetic surfactants in bioelectrochemical systems: a mini-review // Frontiers in microbiology. – 2020. – Т. 11. – С. 358.
14. Das D. A Bioelectrochemical System that Converts Waste to Watts // New Delhi: Capital Publishing Company. 2018. 506 p.