

УДК 628

**БИОСУРФАКТАНТЫ, СИНТЕЗИРУЕМЫЕ МИКРООРГАНИЗМАМИ-  
НЕФТЕДЕСТРУКТОРАМИ: СОСТАВ, СВОЙСТВА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ**

*Л.А. Беловежец<sup>1</sup>, М.С. Третьякова<sup>2</sup>, Б.А. Маркова<sup>2</sup>, Л.П. Ознобихина<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> – Иркутский институт химии СО РАН, Иркутск, Россия

<sup>2</sup> – СИФИБР СО РАН, Иркутск, Россия

Проблема охраны окружающей среды приобретает особую важность в связи с загрязнением водоемов и почв нефтью и нефтепродуктами. Наиболее ощутимо эти воздействия проявляются при добыче нефти, ее переработке, транспортировке, из-за технологических и аварийных выбросов продукции в окружающую среду. При этом наибольший вред наносится почве вследствие того, что она аккумулирует загрязнения в больших количествах. Это приводит к изменению многих характеристик почвы: агрохимических, физических и микробиологических.

В связи с тем, что на естественное восстановление нефтезагрязнённой почвы уходит очень много времени, необходимо разрабатывать эффективные технологии очистки её от нефти.

Во всём мире ведутся интенсивные исследования по изучению действия углеводородных загрязнений на экосистему и разработке эффективных и безопасных методов по ликвидации нефтяных загрязнений. В последнее время приоритетным становится биологический метод очистки углеводородных загрязнений, основанный на применении микроорганизмов – деструкторов нефти и нефтепродуктов. Он характеризуется как наиболее экономичный, эффективный и безвредный способ очистки. Одним из важнейших механизмов биологического метода утилизации компонентов нефти, которые слабо- или нерастворимы в воде, является образование микроорганизмами поверхностно-активных соединений (биоПАВ или биосурфактантов). Они способствуют солубилизации углеводородов, образованию мелкодисперсной эмульсии, в результате чего облегчается контакт микробных клеток с гидрофобным субстратом и поступление его внутрь клетки. В настоящее время биоПАВ являются объектами пристального изучения.

**Цель работы** – определение состава и свойств биосурфактантов, выделенных из культуральной жидкости микроорганизмов-нефтедеструкторов.

Первичная оценка способности микроорганизмов выделять поверхностно-активные вещества оценивалась по индексу эмульгирования. Выяснилось, что все штаммы способны образовывать стойкую эмульсию, но с разной интенсивностью (индекс эмульгирования от 13 до 73 %) и образовывать чистую зону при добавлении на поверхность нефти супернатанта (табл.).

Таблица. Показатели способности бактерий – нефтеструкторов выделять поверхностно-активные вещества

Штамм	Диаметр образовавшихся чистых зон, см	Эмульгирующая активность жидких культур	Индекс эмульгирования, % гексадекан	Н%, количество клеточно-связанных сурфактантов, %	Содержание биосурфактантов, г/л питательной среды
Rhodococcus 108	4.0 ± 0.2	++	73	37	0,166
Acinetobacter 112	3.2 ± 0.4	+	57	31,5	0,177
Acinetobacter 114	1.5 ± 0.2	+	13	31,2	1,523

Для увеличения количества синтезируемых биосурфактантов все микроорганизмы выращивались на питательной среде с гексадеканом в качестве единственного источника углерода. Количество клеточно-связанных биосурфактантов было примерно одинаково для всех штаммов, тогда как Rhodococcus 108 образовывал существенно больше внеклеточных форм. По содержанию свободных биосурфактантов на 1 л питательной среды Rhodococcus 108 можно отнести к суперпродуцентам данных веществ. Проведенные качественные реакции выявили в составе биосурфактантов углеводный и липидный компоненты. На ТСХ-хроматограмме проэкстрагированных сурфактантов Rhodococcus 108 детектируется одно компактное пятно с R<sub>f</sub> 0.78. Это свидетельствует о наличии лишь одного биосурфактанта, либо нескольких очень близких по структуре, что не позволяет разделить их методом ТСХ.

Для Rhodococcus 108 и Acinetobacter 114 были сняты ИК-спектры в тонкой пленке. Анализ пиков ИК-спектра биосурфактанта, продуцируемого штаммом Rhodococcus 108 позволил отнести пик в области частот 3742–3190 см<sup>-1</sup> к ОН-группам, связанным водородной связью. Характерные интенсивные пики, наблюдаемые в области частот 2921–2855 см<sup>-1</sup> соответствуют валентному колебанию СН<sub>2</sub>-группы. Высокий по интенсивности пик с частотой 1461 см<sup>-1</sup> и средний по интенсивности пик с частотой 722 см<sup>-1</sup>, очевидно, принадлежат деформационным колебаниям СН<sub>2</sub>-группы. Также в спектре наблюдаются сигналы, характерные для смещенных колебаний сложноэфирных групп, вследствие наличия водородных связей (1652 см<sup>-1</sup>) и для фрагментов С-О, СН-О-СН и СН<sub>2</sub> – О – СН<sub>2</sub> (1165–1018 см<sup>-1</sup>). Следовательно, анализируемая проба представляет собой соединение, содержащее длинноцепочечные алифатические углеводороды, сложноэфирные связи, карбонильные и ОН-группы. Судя по количеству пиков в спектре и по диапазону частот, при которых мы наблюдаем эти сигналы, соединение обладает сложной структурой. Вероятно, исследованное соединение представляет собой сложный эфир трегалозы и миколовых кислот.

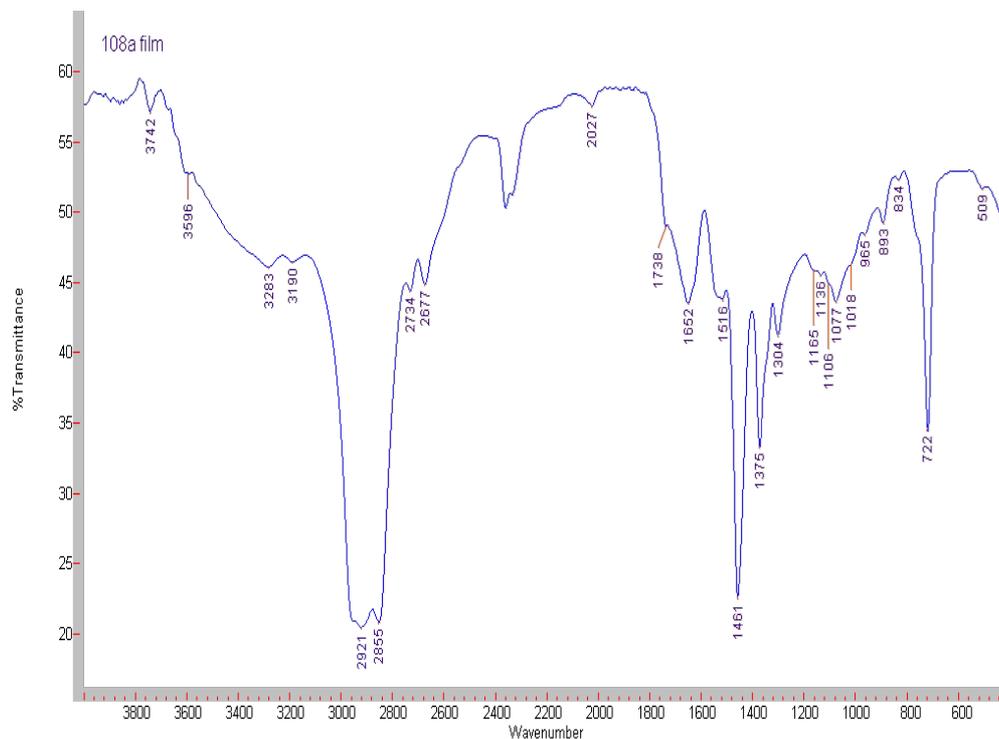


Рис. 1 ИК – спектр биосурфактанта, продуцируемого штаммом Rhodococcus 108

При анализе ИК-спектра биосурфактанта, продуцируемого штаммом *Acinetobacter* 114, были получены следующие данные: характерные пики в области частот 3745–3392 см<sup>-1</sup>, которые могут соответствовать как валентным колебаниям свободных групп ОН (ν<sub>O-H</sub>), внутри- и межмолекулярным водородным связям в димерах и полимерах, так и колебаниям аминогруппы. Интенсивный раздвоенный пик в диапазоне частот 2923–2856 см<sup>-1</sup>, а также пики в области частот 1460 см<sup>-1</sup> и 722 см<sup>-1</sup> являются типичными для СН<sub>2</sub> группы (валентные и деформационные колебания соответственно). Наряду с этим, сигналы малой интенсивности с частотой 1650 см<sup>-1</sup> и 1078 см<sup>-1</sup> соответствуют смещенным колебаниям сложноэфирных групп, вследствие наличия водородных связей, и валентным колебаниям альдегидной группы соответственно. Ряд среднеинтенсивных полос в диапазоне частот 1375–1297 см<sup>-1</sup> свидетельствуют о возможном наличии у соединения разветвлённых или деформированных С(СН<sub>3</sub>)<sub>2</sub> групп. Наличие в элементном составе небольшого количества азота позволяет предположить, что данный биосурфактант представляет собой липополисахарид, состоящий из трисахаридной основы (D-галактозамин+D-галактозаминуриновая кислота + диоксиаминогексоза), к которой присоединены остатки жирных кислот (С<sub>10</sub> – С<sub>22</sub>) через сложноэфирную и амидную связь.

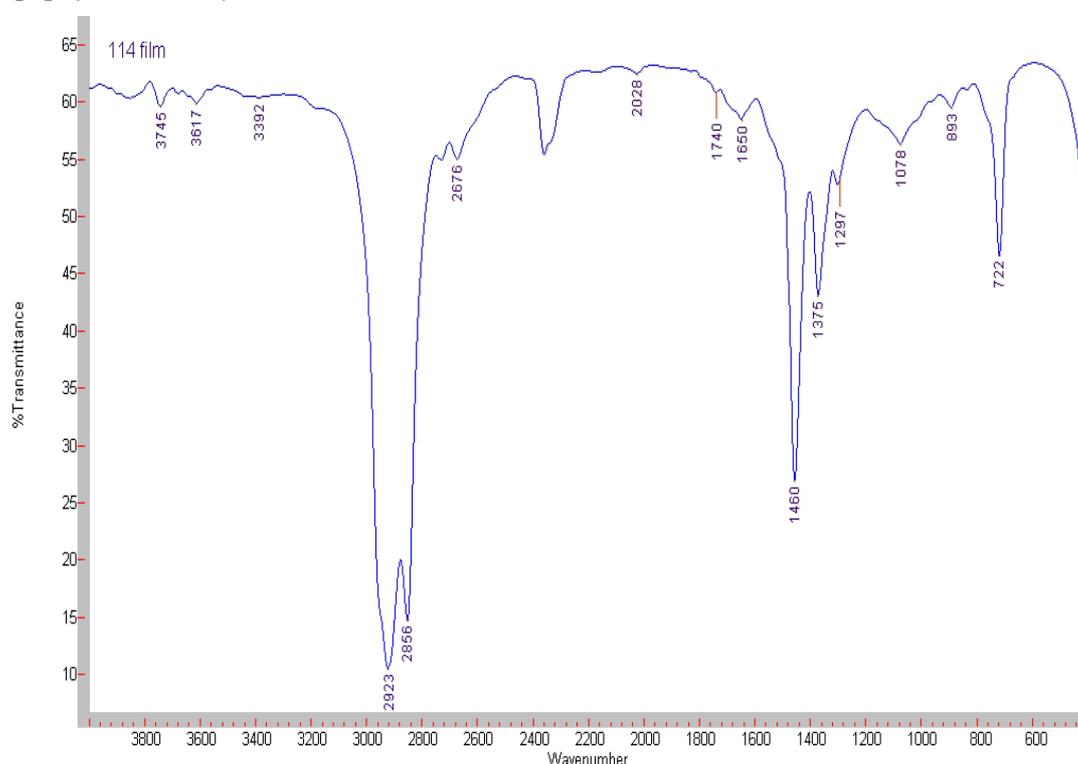


Рис. 2 ИК-спектр биосурфактанта, продуцируемого штаммом *Acinetobacter* 114

Проведенные нами исследования позволили выявить наличие как внеклеточных, так и клеточно-связанных биосурфактантов во всех исследованных микроорганизмах. Был проведен ряд качественных реакций для предварительного определения состава синтезированных биосурфактантов с последующим анализом с помощью методов ТСХ и ИК-спектроскопии. Перечисленные методы позволили установить вероятный состав полученных биосурфактантов (*Rhodococcus* sp. 108 – трегалолипид в состав которого входит трегалоза, и *Acinetobacter* sp. – эмульсан, липополисахарид). Однако, вследствие сложности химической структуры этих соединений, а также их вариативности в зависимости от условий культивирования и состава питательной среды, невозможно однозначно определить точный химический состав выделенных веществ.

*Исследование поддержано грантом РФФИ и Правительства Иркутской области, проект № 17–45–388078 p\_a.*