

УДК 579.222.2+579.26

А.Я. Ягофарова<sup>\*1</sup>, Р.С. Шарипов<sup>2</sup>, К.Т. Муканова<sup>1</sup>, Э.Ж. Хасенова<sup>1</sup>, Н.Б. Молдагулова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный Центр Биотехнологии, г. Астана, Казахстан

<sup>2</sup>Центральный институт судебной экспертизы г. Астана, Казахстан

\*e-mail: [Almirayagy@mail.ru](mailto:Almirayagy@mail.ru)

### **Исследование влияния физических факторов на активность биосурфактантов, продуцируемых штаммами *Pseudomonas aeruginosa* КИБ, *Rhodoccus ruber* КЛ4**

Установлено, что штаммы *Rhodoccus ruber* КЛ4, *Pseudomonas aeruginosa* КИБ продуцируют биосурфактанты при выращивании на гидрофобных (гексадекан) и гидрофильных (глюкоза) субстратах. По результатам ИК спектроскопии полученные биоПАВ отнесли к классу гликолипидов. Изучено влияние факторов окружающей среды таких как: температура, рН среды, концентрация минеральных солей, на активность биосурфактантов. Установлено, что биоПАВ остаются активными в интервалах температуры от 4 до 50°C, рН от 6-9,5; однако добавление минеральных солей приводит к резкому снижению активности биосурфактантов.

**Ключевые слова:** биосурфактанты, гликолипиды, ИК спектры, индекс эмульгирования, рН, минеральные соли.

A.Y. Yagofarova, R.S. Sharipov, K.T. Mukanova, E.J. Khasenova, N.B. Moldagulova

### **Study of the effect of physical factors on biosurfactants activity produced by the strain *Pseudomonas aeruginosa* КИБ, *Rhodoccus ruber* КЛ4**

The strains *Rhodoccus ruber* KLA, *Pseudomonas aeruginosa* KIB can produce biosurfactants growing on hydrophobic ( hexadecane ) and hydrophilic ( glucose ) substrates. Due to IR spectroscopy this biosurfactants can be classified as glycolipids. Different environmental factors such as temperature, pH, concentration of mineral salts and ultraviolet on the activity of biosurfactants were studied. Most emulsification index was observed in the temperature range from 4 to 50°C. The optimum pH range for the test glycolipids was 6 - 9.5. However, the increase of salt concentration reduced the emulsification index by 60%, thus falling and activity of biosurfactants.

**Keywords:** biosurfactants, glycolipids, IR spectra, index emulsification, temperature, pH, mineral salts.

А.Я. Ягофарова, Р.С. Шарипов, Қ.Т. Муканова, Э.Ж. Хасенова, Н.Б. Молдагулова

### ***Pseudomonas aeruginosa* КИБ, *Rhodoccus ruber* КЛ4 штамдарынан бөлініп алынатын биосурфактанттардың белсенділігіне физикалық факторлардың әсерін зерттеу**

*Rhodoccus ruber* КЛ4, *Pseudomonas aeruginosa* КИБ штамдары биосурфактанттарды гидрофобты (гексадекан) және гидрофилді (глюкоза) субстраттарда бөліп шығаратыны анықталды. ИК спектроскопия әдісі арқылы алынған спектрлердің нәтижесінде осы биоББЗ гликолипидтер классына жатқызылды. Биосурфактанттардың белсенділігіне қоршаған ортаның факторларының (температура, ортаның рН-ы, минералды тұздардың концентрациясы) әсері зерттелді. ББЗ температураның 4-50°C, рН-тың 6-9,5 аралығында белсенді болады, ал минералды тұздар биосурфактанттардың белсенділігін бірден төмендетеді.

**Түйін сөздер:** биосурфактанттар, гликолипидтер, ИК спектрлер, эмульгирлену индексі, рН, минералды тұздар.

Экологические проблемы, связанные с процессами добычи, транспорта и переработки нефти, являются важной проблемой для современного мира. Природные воды и почва аккумулируют большое количество нефтяного загрязнения.

В настоящее время для повышения биодоступности нефтепродуктов широко используют поверхностно-активные вещества биологического происхождения (биосурфактанты), которые способствуют десорбции и солюбилизации нефтяных углеводородов, тем самым обеспечивая их ассимиляцию микробными клетками.

Биологическая роль микробных биосурфактантов заключена в снижении поверхностного и межфазного натяжения в системе и повышения биодоступности для дальнейшего окисления микробной клеткой. По мнению авторов [1, 2, 3, 4] биосурфактанты характеризуются низкой токсичностью, легкой биodeградебельностью. Несмотря на всё возрастающий интерес к бактериальным сурфактантам как агентам биоремедиации, последние еще не нашли широкого применения в биоремедиационных работах нефтезагрязненных почв и водоемов проводимых на территории Казахстана.

Следует отметить, что при использовании биосурфактантов совместно с препаратами необходимо учитывать влияние факторов окружающей среды таких как: температура, pH среды, концентрация минеральных солей.

Поэтому целью данного исследования являлось определение влияния вышеуказанных факторов на активность исследуемых биоПАВ продуцируемых штаммами *Pseudomonas aeruginosa* КИБ и *Rhodococcus ruber* КЛ4

### Материалы и методы

В качестве исходного материала использовали штаммы нефтеокисляющих микроорганизмов: *Pseudomonas aeruginosa* КИБ, *Rhodococcus ruber* КЛ4.

Для получения экзогенных метаболитов углеводородокисляющие микроорганизмы культивировали на средах Воршиловой-Диановой (В-Д) с добавлением различных субстратов, при температуре 30°C в течение 7 суток на перемешивающем устройстве Stuart S 150 [5].

Культуральную жидкость с бактериями осаждали центрифугированием на центрифуге Beckman J2-21 (Германия) при 10 тыс об/мин в течение 30 минут, при комнатной температуре.

Выделение экзогенных метаболитов проводили двукратной экстракцией из супернатанта при pH=1,6-2. pH раствора устанавливали 1М HCl и измеряли иономером Consort C830. Органическую фазу собирали в приемники. Затем полученный экстракт разбавляли растворителем [6].

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

Определение количественного содержания биосурфактантов проводили с использованием метиленового синего спектрофотометрическим методом. Образец помещали в делительную воронку, устанавливали pH раствора, используя индикатор фенолфталеин, прибавляли растворы 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, фосфатный буфер и раствор метиленового синего. Экстрагировали двумя порциями хлороформа по 2мл. Экстракт собирали в приемнике, фильтруя через воронку со стекловатой.

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

Определение эмульгирующей активности проводили по следующей методике: 4 мл образца помещали в кварцевые пробирки на 15 мл, прибавляли 6 мл керосина и интенсивно перемешивали 2мин. Индекс эмульгирования вычисляют по формуле: ИЭ= (Vэ/Vн)•100%, где Vэ- объем эмульсии; Vн-полный объем жидкости, включающей в себя объем водной фазы, объем углеводородной фазы, объем образовавшейся эмульсии [7].

### Результаты и их обсуждение

Для получение максимального содержания биосурфактантов штаммы –продуценты *Rhodococcus ruber* КЛ4 и *Pseudomonas aeruginosa* КИБ культивировали на среде В-Д с добавлением глюкозы и гексадекана в качестве источника углерода, а мочевины, дигирофосфата калия в качестве источника азота и фосфора, в оптимальных соотношениях. Штаммы культивировали в течении 7 суток. Результаты представлены в таблице 1.

**Таблица 1** – Количественное содержание биоПАВ в супернатантах штаммов *Rhodococcus ruber* КЛ4, *Pseudomonas aeruginosa* КИБ

Название штамма	C, мг/л
<i>Rhodococcus ruber</i> КЛ4	26,2±0,07
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> КИБ	21,5±0,04

Из таблицы видно, что концентрация биоПАВ, продуцируемых отобранными штаммами, составляет в среднем 24 мг/л.

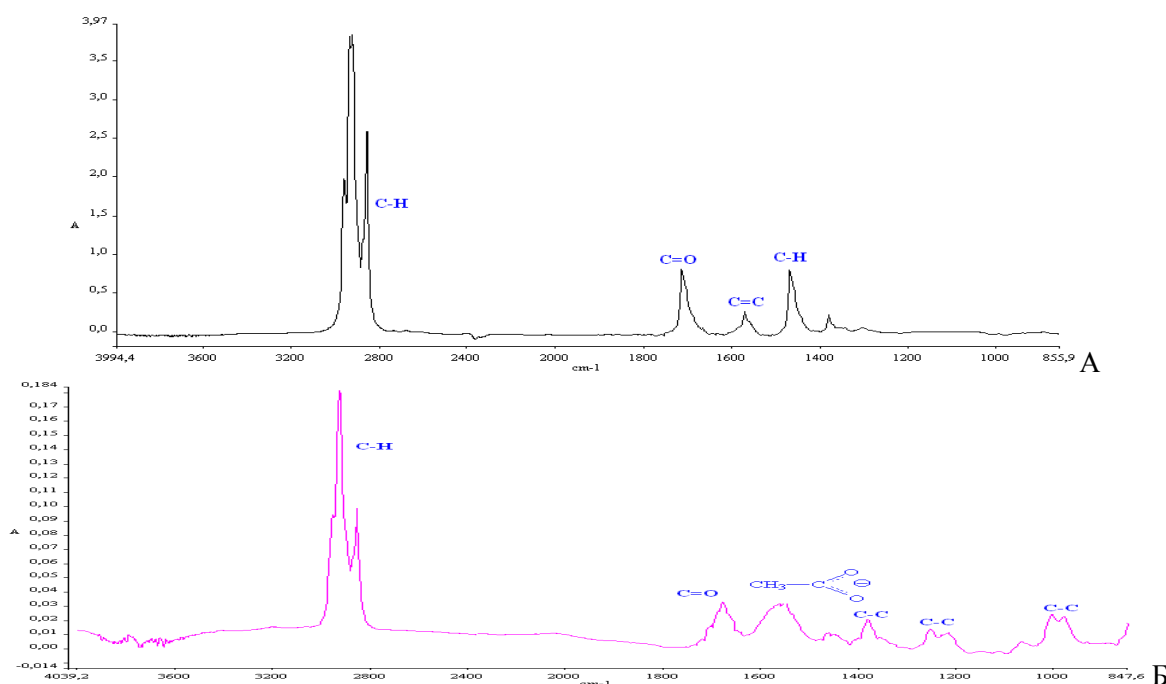
Из литературных источников известно, что выбранные штаммы способны продуцировать биосурфактанты – гликолипиды [8]. Поэтому полученные биоПАВ были идентифицированы методом ИК – спектроскопии. ИК спектры биосурфактантов, полученных из отобранных штаммов, представлены на рисунке 1 и 2.

ИК – спектр биоПАВ, продуцируемого штаммом *Rhodococcus ruber* КЛ4, характеризуется следующими пиками: при 2856-2957 и 1465 см<sup>-1</sup>- колебания функциональных групп алифатических

связей С-Н, полосой при  $1552\text{ см}^{-1}$ , которая соответствует колебанию связи в группе С=C, валентные колебания С=О группы проявляются при  $1704\text{ см}^{-1}$ .

На ИК – спектре биоПАВ, продуцируемого штаммом *Pseudomonas aeruginosa* КИБ, присутствуют следующие пики: интенсивная полоса колебания алифатических связей С-Н при  $2859\text{-}2927\text{ см}^{-1}$ , линия при  $1708\text{ см}^{-1}$  соответствует валентным колебаниям С=О группы, вторая линия при  $1532\text{ см}^{-1}$  соответствует колебанию связи в группе  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , в диапазоне от  $847\text{-}1400\text{ см}^{-1}$  – колебания связей С-С.

Для определения устойчивости, сурфактантной активности полученных биоПАВ проведены исследования по изучению влияния температуры, рН, различных концентраций солей на эмульгирующую активность. Данный показатель характеризует устойчивость и активность биосурфактантов, поэтому изучение влияния вышеуказанных параметров проводили по его изменению[9].



**Рисунок 1** – ИК-спектр биосурфактантов, полученных из культуры *Rhodococcus ruber* КЛ4 (А) и *Pseudomonas aeruginosa* КИБ (Б)

Изучение влияние температуры на активность гликолипидов проводили при температурах от 4 до  $95^{\circ}\text{C}$ . Образцы исследовали в трех повторностях для проверки воспроизводимости. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Из таблицы видно, что наибольшее значение индекса эмульгирования наблюдалось в диапазоне температур от 4 до  $50^{\circ}\text{C}$  и составила 14-37%, отмечено, что при низких температурах эмульгирующая активность биоПАВ не снижалась. Полученные данные показывают, что биоПАВ не теряет активности в широком интервале температур, что значительно расширяет применение последних в разных климатических условиях.

**Таблица 2** – Влияние температуры на активность поверхностно-активных веществ

t, °C	<i>Rhodococcus ruber</i> КЛ4		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> КИБ	
	концентрация биоПАВ, мг/л	индекс эмульгирования, %	концентрация биоПАВ, мг/л	индекс эмульгирования, %
4	21,6±0,1	26,5±0,3	11,0±0,6	14,3±0,4
20	26,2±0,1	27,8±0,7	21,5±0,4	36,8±0,3
50	10,5±0,1	14,3±0,4	15,8±0,4	16,2±0,5
60	6,8±0,5	8,0±0,3	5,1±0,6	8,6±0,3
95	1,3±0,1	1,4±0,5	1,7±0,3	4,4±0,1

Для изучения влияния pH на активность биосурфактантов данный параметр изменяли в интервале от 2,0 до 10,0. Образцы исследовали в трех повторностях для проверки воспроизводимости. Результаты представлены в таблице 3. Установлено, что при значениях pH от 2-4 показатель индекса эмульгирующей активности составил от 5,8 до 8,0. Однако с увеличением pH среды до 6 растет значение индекса эмульгирования до 38%, дальнейшее повышение pH приводит к постепенному снижению эмульгирующей активности биоПАВ (*Rhodoccus ruber* КЛ4) до 2,9%. В случае биосурфактантов штамма *Pseudomonas aeruginosa* КИБ индекс эмульгирования снижается незначительно и при pH=10,0 составляет 21,7%. Следовательно, наибольшая активность выделенных гликолипидов наблюдается в интервале pH 6-10,0.

**Таблица 3** – Изменение эмульгирующей активности биосурфактантов в зависимости от pH среды

pH	<i>Rhodoccus ruber</i> КЛ4		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> КИБ	
	концентрация биоПАВ, мг/л	индекс эмульгирования, %	концентрация биоПАВ, мг/л	индекс эмульгирования, %
2,0	3,1±0,2	5,8±0,1	4,6±0,1	5,7±0,2
4,0	2,9±0,1	8,0±0,3	3,1±0,3	7,4±0,1
6,0	26,2±0,3	38,5±0,2	21,5±0,2	36,8±0,1
8,0	25,9±0,1	37,3±0,4	14,9±0,3	22,4±0,1
10,0	2,1±0,2	2,9±0,2	8,2±0,1	21,7±0,4

Исследование влияния солей проводили, изменяя их содержания от 0,1 до 5%. Для этого использовали следующие минеральные соли: сульфаты, хлориды, нитраты и гидрокарбонаты. Образцы исследовали в трех повторностях для проверки воспроизводимости. Результаты представлены в таблице 4.

**Таблица 4** – Изменение эмульгирующей активности биосурфактантов в зависимости от концентрации минеральных солей

C <sub>соли</sub> %	<i>Rhodoccus ruber</i> КЛ4				<i>Pseudomonas aeruginosa</i> КИБ			
	индекс эмульгирования, %				индекс эмульгирования, %			
	сульфаты	нитраты	хлориды	гидрокарбонаты	сульфаты	нитраты	хлориды	гидрокарбонаты
Контроль	37±0,5	37±0,4	37±0,5	37±0,6	39±0,5	39±0,5	39±0,5	39±0,5
0,10	36±0,4	15±0,5	36±0,5	28±0,6	39±0,5	39±0,5	15±0,4	16±0,4
0,25	36±0,4	14±0,5	36±0,5	24±0,4	39±0,5	39±0,5	15±0,4	16±0,6
0,50	36±0,4	11±0,6	36±0,5	16±0,5	39±0,5	39±0,5	15±0,4	16±0,5
1,00	15±0,5	10±0,7	12±0,7	16±0,4	14±0,4	15±0,3	14±0,6	16±0,6
3,00	7,2±0,6	8,8±0,5	8,8±0,6	16±0,3	8,7±0,4	3,1±0,3	7,5±0,5	15±0,5
5,00	2,9±0,4	6,1±0,5	5,9±0,5	15±0,3	2,9±0,4	3±0,6	3±0,6	13±0,4

Активность биоПАВ (*Rhodoccus ruber* КЛ4), остается неизменным при содержании сульфатов и нитратов 0,1-0,5%; более высокие содержания солей 1-5% снижают значение индекса эмульгирования до 4%. Хлориды и гидрокарбонаты уменьшают эмульгирующую активность в два раза при концентрации 0,1-1%, дальнейшее увеличение содержания минеральных солей также приводит к снижению индекса эмульгирования до 10%, следовательно падает и активность биоПАВ.

Установлено, что малые концентрации хлоридов и сульфатов (0,1-0,5%) не снижают эмульгирующую активность выделенных биоПАВ (*Pseudomonas aeruginosa* КИБ), 1% концентрации соли приводит к уменьшению индекса эмульгирования в два раза. Дальнейшее увеличение содержания соли приводит к значительному снижению эмульгирующей активности до 6%. Нитраты уменьшают эмульгирующую активность биоПАВ с концентрации 0,1%; гидрокарбонаты снижают индекс эмульгирования незначительно уже при малых концентрациях и в два раза с 0,5%.

По результатам исследования можно заключить, что отобранные штаммы *Rhodoccus ruber* КЛ4 и *Pseudomonas aeruginosa* КИБ продуцируют биосурфактанты, относящиеся к классу гликолипидов, с концентрацией 24мг/л. Полученные гликолипиды остаются активными в интервалах температуры от

4 до 50°C, pH от 6-9,5; однако добавление минеральных солей приводит к резкому снижению активности биосурфактантов.

### Литература

- 1 Kosaric N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation.// Food Technol. Biotechnol. - 2001. – V. – 39(4) – P. 295-304.
- 2 Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi TK, et al. Biosurfactants: properties, commercial production and application // Current Science. – 2008. – V. 94(6). – P. 736-774.
- 3 Ganesh A., Lin J. Diesel Degradation and Biosurfactant Production by Gram Positive Isolates // African Journal of Biotechnology. – 2009. – 8(21). – P. 5847-5854.
- 4 Priya T., Usharani G. Comparative study for biosurfactant production by using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*.// Botany Research International – 2009. – 2(4) – P. 284-287.
- 5 Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ // Приклад. биохим. и микробиол.- 2009. – Т.45. – № 3. – С. 304-310.
- 6 Parviz Darvishi, Shahab Ayatollahi, Dariush Mowla, Ali Niazi. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP1-2 // Colloids and surfaces. B; Biointerfaces. – 2011. – V. 84(2) – P. 292-300.
- 7 Волченко Н.Н., Карасева Э.В. Скрининг углеводородокисляющих бактерий – продуцентов поверхностно-активных веществ биологической природы и их применение в опыте по ремедиации нефтезагрязненной почвы и нефтешламмов // Биотехнология. – 2006. – №2. – С. 57-62.
- 8 Самсонова А., Макаревич А. Микробиологические методы повышения вторичной добычи нефти// Нефтехим. комплекс. – 2009. – № 1. – С. 56-64.
- 9 Helmy Q., Kardena E., Nurachman Z. Application of biosurfactants produced by *Azotobacter vinelandii* AV01 for enhanced oil recovery and biodegradation of oil sludge // Internat. Journal of civil & Environ. Engineering. – 2010. – Vol.10. - №1. – P. 7-14.

УДК 574.589

Г.И. Ерназарова, А.А. Рамазанова\*

Қазақ мемлекеттік қыздар педагогикалық университеті, Алматы қ., Қазақстан

\*e-mail: [r.aliya\\_1989@mail.ru](mailto:r.aliya_1989@mail.ru)

### Алматы облысы су өсімдіктері орналасқан су қоймасы мен жол жиегі аралығындағы ауыр металлдардың таралу ерекшеліктері

Мақалада Алматы облысы су өсімдіктері орналасқан су қоймасы мен трассаның аралығындағы ауыр металлдардың таралу ерекшеліктерін айқындау қарастырылған. *Pistia stratiotes*, *Lemna minor*, *Eichhornia crassipes*, *Nuphar lutea* өсімдік мүшелерінде ауыр металлдардың жинақталуы жағалау ұзақтығына байланысты есептелді. Автотрассаға дейінгі қашықтықтағы *Nuphar lutea* өсімдігінің мүшелерінде қорғасынның шоғырлануы және вегетативтік және генеративті мүшелерінде кадмийдің жинақталуы анықталды.

**Түйін сөздер:** ауыр металдар, су өсімдіктері, *Pistia stratiotes*, *Lemna minor*, *Eichhornia crassipes*, *Nuphar lutea*, автотрасса

Г.И. Ерназарова, А.А. Рамазанова

### Влияние расположения автотрассы на распространённость тяжёлых металлов в водных растениях водоемов Алматинской области

В статье рассматриваются высшие водные растения *Pistia stratiotes*, *Lemna minor*, *Eichhornia crassipes*, *Nuphar lutea* водоемов Алматинской области и особенности распространения тяжёлых металлов в них в зависимости от расположения трассы. Определялось накопление кадмия и свинца в вегетативных и генеративных органах.

**Ключевые слова:** тяжёлых металлов, водные растения, *Pistia stratiotes*, *Lemna minor*, *Eichhornia crassipes*, *Nuphar lutea*, автотрасса.

G.I. Ernazarova, A.A. Ramazanova

### The impact of the highway disposition on the prevalence of heavy metals in aquatic plants of Almaty region basin

The article considers the higher aquatic plants *Pistia stratiotes*, *Lemna minor*, *Eichhornia crassipes*, *Nuphar lutea* of Almaty region basin and peculiarities of distribution of heavy metals in them, depending on the location of the highway. It was determined the accumulation of cadmium and lead in the vegetative and generative organs.