

УДК 579.222.2+579.26

А.Я. Ягофарова, К.Т. Муканова, Э.Ж. Хасенова,
Г.Ж. Шарипова, Н.Б. Молдагулова

РГП «Национальный Центр Биотехнологии», Казахстан, г. Астана
E-mail: Ecolab@biocenter.kz

**Исследование влияния физических факторов
на активность биосурфактантов продуцируемых штаммом *Dietzia maris mb3*
и изучение их фитотоксичности**

В работе приведены результаты исследования влияния различных факторов окружающей среды, таких, как: температура, pH среды, содержание минеральных солей, ультрафиолетовое облучение на активность биосурфактантов полученных из штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов *Dietzia maris MB3*. Изучена токсичность выделенных биоПАВ на следующих тест-культурах: зерновые (пшеница «Акм-Нива»), бобовые (горох «Substar») и овощные (редис «Аскания»).

Ключевые слова: биосурфактанты, эмульгирующая активность, индекс эмульгирования, температура, pH, минеральные соли, ультрафиолетовое облучение, всхожесть семян, фитотоксичность.

А.Я. Ягофарова, К.Т. Мұқанова, Э.Ж. Хасенова,
Г.Ж. Шарипова, Н.Б. Молдағұлова

***Dietzia maris mb3* штамынан бөлініп алынатын биосурфактанттардың белсенділігіне
физикалық факторлардың әсерін және олардың фитоулылығын зерттеу**

Dietzia maris MB3 көмірсутектотықтырғыш микроағзалардың штамдарынан бөлініп алынған биосурфактанттардың белсенділігіне қоршаған ортаның әртүрлі факторлардың: температура, ортаның pH-ы, минералды тұздардың құрамы, ультракүлгін сәлеленудің әсерінің нәтижелері келтірілген.

Бөлініп алынған био ББЗ-дың келесі дақылдарға: дәнді-дақылдар («Акм-Нива» бидайы), бұршақ («Substar» асбұршағы) және көкөніс («Аскания» шалғамы) улылығы зерттелді.

Түйін сөздер: биосурфактанттар, эмульгирлену белсенділігі, эмульгирлену индексі, температура, pH, минералды тұздар, ультракүлгін сәулелену, тұқымның өнгіштігі, фитоулылық.

A.Y. Yagofarova, K.T. Mukanova, E.J. Khasenova,
G.Sh. Sharipova, N.B. Moldagulova

Study of physical factors the effect on biosurfactants activity produced by the strain *Dietzia maris mb3*, and research of their phytotoxicity

Different environmental factors such as temperature, pH, and concentration of mineral salts, ultraviolet on the activity of biosurfactants were studied. This surface-active substances were produced by strains of hydrocarbon – oxidizing microorganisms *Dietzia maris MB3*. The toxicity of selected biosurfactants was studied on the following crops: wheat “AKM-Niva”, peas “Substar” and radish “Ascanius”.

Keywords: biosurfactants, emulsifying activity, index emulsification, temperature, pH, mineral salts, ultraviolet irradiation, germination capacity, phytotoxicity.

Одним из важнейших механизмов утилизации компонентов нефти, которые слабо- или нерастворимы в воде, является образование

микроорганизмами поверхностно-активных соединений (биоПАВ или сурфактантов) [1]. Они способствуют солубилизации углеводов,

образованию мелкодисперсной эмульсии, в результате чего облегчается контакт микробных клеток с гидрофобным субстратом и поступление его внутрь клетки. В настоящее время поверхностно-активные вещества биологического происхождения являются объектами пристального изучения.

На образование биоПАВ продуцируемых углеводородокисляющими микроорганизмами в основном влияет источник углерода [2]. Синтез биосурфактантов часто наблюдается у различных микроорганизмов при росте на гидрофобных субстратах: углеводороды, растительные жиры. С другой стороны, интенсивное образование биосурфактантов наблюдается и при росте микроорганизмов на гидрофильных источниках углерода (глюкоза, глицерин). Образование биоПАВ одними и теми же микроорганизмами на гидрофильных и гидрофобных субстратах могут принципиально различаться. ПАВ микробного происхождения имеет преимущество перед синтетическими ПАВ, так как они высокоэффективны, обладают низкой токсичностью. Поэтому современные биопрепараты – нефтеструкторы используют как активные штаммы, так и в сочетании последних с биосурфактантами.

Поэтому исследование биосурфактантов, продуцируемых штаммами углеводородокисляющих бактерий, изучение изменения их активности в зависимости от различных физических факторов, таких, как температура, pH, содержание минеральных солей и т.д., исследование их фитотоксичности является главным вопросом при разработке препарата для ликвидации углеводородных загрязнений.

Объекты и методы исследования

В качестве исходного материала использовали штамм *Dietzia maris* MB3.

Для получения экзогенных метаболитов микроорганизмы культивировали на агаризованной среде при температуре 30°C. Для получения биомассы углеводородокисляющих микроорганизмов их выращивали на питательном бульоне при температуре 37°C в течение пяти суток на перемешивающем устройстве Stuart S 150.

Культуральную жидкость с бактериями осаждали центрифугированием на центрифуге Beckman J2-21 (Германия) при 10 тыс. об/мин в

течение 30 минут, при комнатной температуре [3, 4].

Определение эмульгирующей активности проводили по следующей методике: 4 мл образца помещали в борсиликатные пробирки на 15 мл, прибавляли 6 мл керосина и интенсивно перемешивали 2 мин. Принцип определения индекса эмульгирования заключается в оценке объема эмульсии, образовавшейся в результате встряхивания образца культуры – эмульгатора с гидрофобной жидкостью. Индекс эмульгирования вычисляют по формуле:

$$\text{ИЭ} = (V_{\text{э}}/V_{\text{н}}) \cdot 100\%$$

где $V_{\text{э}}$ – объем эмульсии;

$V_{\text{н}}$ – полный объем жидкости, включающей в себя объем водной фазы, объем углеводородной фазы, объем образовавшейся эмульсии [5, 6].

Определение всхожести семян проводили по следующей методике. Отобрали семена, различающиеся размерами или скоростью прорастания, каждого растения по 10–20 крупных семян или по 100 мелких. Семена проращивали в растильнях на влажной марле (фильтровальной бумаге), поставив в теплое место (выше 18°C). Подсчет проросших семян проводили на 3, 5, 7 сутки [7].

Семена обрабатывались:

- биосурфактантами (концентрация от 9 мг/л до 50 мг/л);
- синтетическим ПАВ и сравнивались с контрольными образцами.

Результаты и их обсуждения

Для определения изменения значения индекса эмульгирования на активность выделенных биосурфактантов из культуры углеводородокисляющих микроорганизмов штамма *Dietzia maris* MB3 проведены исследования по изучению влияния pH среды, температуры, ультрафиолетового облучения и изменения содержания солей. Эмульгирующая активность представляет собой показатель, характеризующий устойчивость и активность биосурфактантов, поэтому изучение влияния вышеуказанных параметров проводили по его изменению [8].

Влияния pH среды на сурфактантную активность изучали при значениях pH 2 до 9. Результаты представлены на рисунке 1.

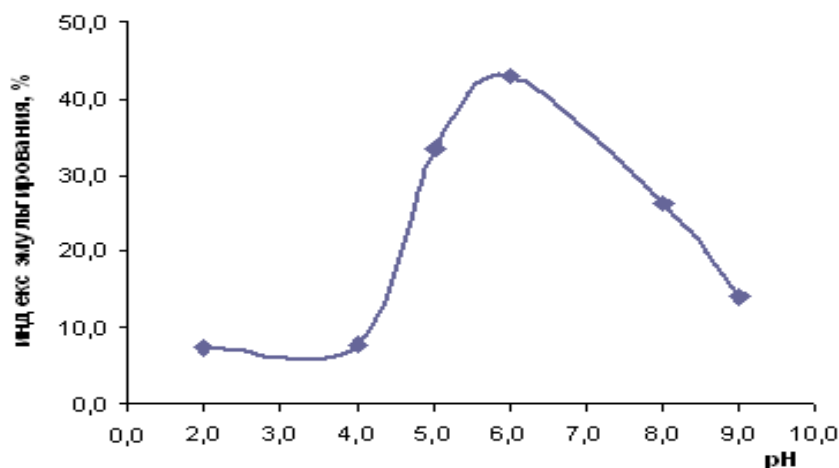


Рисунок 1 – Изменение значение индекса эмульгирования биоПАВ в зависимости от pH среды

Из рисунка видно, что наибольшее значение индекса эмульгирования отмечается при значениях pH от 5 до 8; в основных и более кислых областях значение индекса эмульгирования не повышается. Следовательно, оптимальный интервал pH среды для биосурфактантов культуры *Dietzia maris* MB3 является 5-8.

Изучение влияние температуры на активность биоПАВ, полученных из штамма *Dietzia maris* MB3, проводили в температурном диапазоне от 4 до 95°C. С этой целью биосурфактанты выдерживали при различных температурах в течение 4 часов. Затем определяли индекс эмульгирования. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Изменение эмульгирующей активности биосурфактантов культуры *Dietzia maris* MB3 в зависимости от температуры

№	t°C	%
1	4°C	13,4±0,2
2	25-30°C	46,2±0,4
3	60°C	12,9±0,1
4	95°C	13,4±0,1

Как видно из таблицы, наибольшее значение эмульгирующей активности отмечается при температуре 25-30°C. При этом индекс эмульгирования составил 46,2%, тогда как при низких и высоких показателях температуры его значение не превышало 13,4. Полученные данные свидетельствуют, что биосурфактанты активны при 25-30°C.

Следующую серию опытов проводили исследование влияния ультрафиолетовое облучение (УФО) на сурфактантную активность исследуемых биоПАВ. При этом биосурфактанты выдерживали в ультрафиолете в течение 180 мин. Пробы отбирали через 30 мин. Результаты представлены на рисунке 2.

Установлено, что УФО не влияет на эмульгирующую активность биоПАВ в зависимости от продолжительности облучения образцов ультрафиолетом.

В природных и сточных водах и в почве содержание минеральных солей колеблется в пределах от 0,25 до 10% [9, 10]. Поэтому необходимо изучить влияние данных солей на активность и устойчивость продуцируемых культурой биосурфактантов. Исследование влияния солей проводили, изменяя их содержания с 1 до 5%. Использовали следующие минеральные соли: сульфат магния(II), хлорид натрия (I), нитрат натрия (I). Результаты представлены на рисунке 3.

Установлено, что при 1% концентрации минеральных солей эмульгирующая активность выделенных биоПАВ падает до 6%, дальнейшее увеличение содержания солей так же приводит к снижению индекса эмульгирования.

Далее определяли токсичность выделенных биосурфактантов. С этой целью была отобрана методика определения всхожести семян.

Для проведения исследования были отобраны следующие культуры: зерновые (пшеница «Акм-Нива»), бобовые (горох «Substar») и овощные (редис «Аскания»). Семена обрабатывались биосурфактантами (концентрация от 20 мг/л),

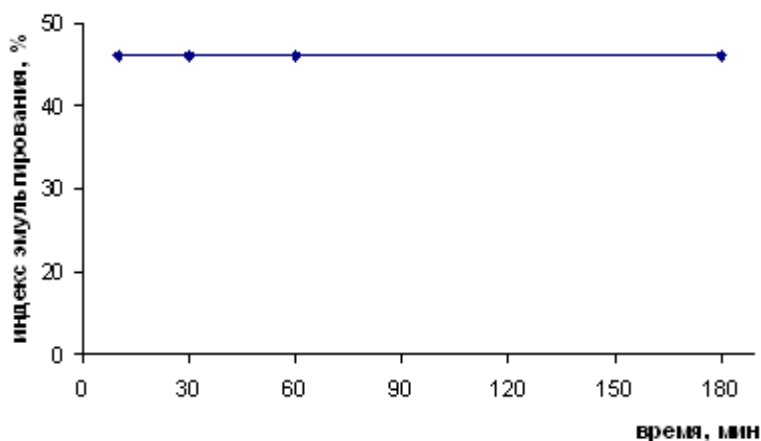


Рисунок 2 – Изменение значение индекса эмульгирования биоПАВ в зависимости от времени пребывания под ультрафиолетовым облучением

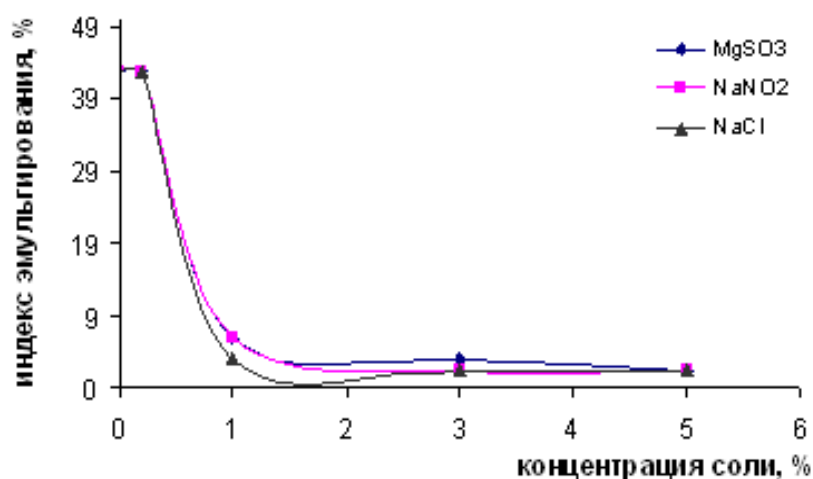


Рисунок 3 – Изменение значение индекса эмульгирования биоПАВ в зависимости от концентрации минеральных солей

Таблица 2 – Процент всхожести семян на 7-е сутки в контроле и после обработки синтетическими и биоПАВами

Контроль			Синтетический ПАВ			Биосурфактанты культуры <i>Dietzia maris</i> MB3		
горох	редис	пшеница	горох	редис	пшеница	горох	редис	пшеница
98%	98%	82%	20%	33%	11%	98%	79%	85%

синтетическим ПАВ (концентрация 20 мг/л) и сравнивались с контрольными образцами. Подсчет проросших семян проводили на 3, 5, 7 сутки. Результаты представлены в таблице 2.

Процент всхожести семян пшеницы «Акмива» в контрольном образце составил 82%, при обработке биосурфактантами – 85%, в случае синтетического ПАВ значение не превышало 11%.

Семена гороха «Substar» в контрольном образце и в случае обработки биосурфактантами показали одинаковый процент всхожести 98%. Однако обработка семян синтетическим ПАВ привела к снижению всхожести до 20%.

Процент всхожести семян редиса «Аскания» в контроле образце составил 98%, незначительно снизился до 79% после обработки биосурфактантами, в случае синтетического ПАВ не превысил 33%.

Закключение

На основании полученных данных можно сделать вывод, что на устойчивость и активность биосурфактантов, полученных из культуры *Dietzia maris* MB3, не влияет ультрафиолетовое облучение, биоПАВ остаются активными в интервалах температуры от 20 до 35°C, при pH от 6-8; однако соленость среды приводит к резкому снижению их активности. Биосурфактанты, полученные из углеводородокисляющих микроорганизмов, не влияют на всхожесть семян тестовых культур.

Литература

- 1 Desai J., Banat I. Microbial production of surfactants and their commercial potential // Microbiol. and Molecular Biology Reviews - 1997 - V. 61. - № 1. - P. 47-64.
- 2 Muthusamy K., Gopalakrishnan S., Thiengungal K.R., Sivachidambaram P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application // Current Science -2008 - V. 94. - № 6. - P. 736-747.
- 3 Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 на синтез поверхностно-активных веществ// Приклад. биохим. и микробиол.- 2009. – Т.45 № 3.- С. 304-310.
- 4 Parviz Darvishi, Shahab Ayatollahi, Dariush Mowla, Ali Niazi. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP-2// Colloids and surfaces. B; Biointerfaces. – 2011. - 84(2) – С. 292-300.
- 5 Berg G., Seech A. G., Lee H., and Trevors J. T. Identification and characterization of a soil bacterium with extracellular emulsifying activity// Journal of Environmental Science and Health. -1990. – Vol. 25 – P.753-764.
- 6 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 нефтешламов// Биотехнология. - 2006. - №2. – С. 57-62.
- 7 ГОСТ № 12038-84 Семена сельскохозяйственных культур. Метод определения всхожести.- Москва. Дата введения 01.07.1986.
- 8 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.
- 9 В.Г. Минеев Агрохимия. - М.: Изд-во «КолосС», 2004.- 750с.
- 10 Львович М. И. Мировые водные ресурсы и их будущее. – М.: Мысль, 1974.

References

- 1 Desai J., Banat I. Microbial production of surfactants and their commercial potential // Microbiol. and Molecular Biology Reviews - 1997 - V. 61. - № 1. - P. 47-64.
- 2 Muthusamy K., Gopalakrishnan S., Thiengungal K.R., Sivachidambaram P. Biosurfactants: Properties, commercial production and application // Current Science -2008 - V. 94. - № 6. - P. 736-747.
- 3 Pirog T.P., Antonjuk S.I., Karpenko E.V., Shevchuk T.A. Vliyanie uslovij kul'tivirovanija shtamma *Acinetobacter calcoaceticus* K-4 na sintez poverhnostno-aktivnyh veshhestv.// Priklad. biohim. i mikrobiolog.- 2009. – T.45 № 3.- S. 304-310.
- 4 Parviz Darvishi, Shahab Ayatollahi, Dariush Mowla, Ali Niazi. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPP-2.// Colloids and surfaces. B; Biointerfaces. – 2011. - 84(2) – S. 292-300.

- 5 Berg G., Seech A. G., Lee H., and Trevors J. T. Identification and characterization of a soil bacterium with extracellular emulsifying activity.// Journal of Environmental Science and Health. -1990. – Vol. 25 – P.753-764
- 6 Volchenok N.N., Karaseva Je. V. Skrining uglevodorodokisljajushhih bakterij – producentov poverhnostno-aktivnyh veshhestv biologicheskoy prirody i ih primenenie v opyte po remediacii neftezagriznennoj pochvy i nefteshlammov.// Biotehnologija. -2006. - №2. – S. 57-62.
- 7 GOST № 12038-84 Semena sel'skhozjajstvennyh kul'tur. Metod opredelenija vshozhesti. // Moskva, Data vvedenija 01.07.1986.
- 8 Priya T., Usharani G. Comparative study for biosurfactant production by using Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa.// Botany Research International – 2009. – 2(4) – R. 284-287
- 9 V.G. Mineev Agrohimija// M.: Izd-vo «KolosS», 2004.- 750s.
- 10 L'vovich M. I. Mirovye vodnye resursy i ih budushhee.— M.: Mysl', - 1974.