

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Медико-профилактический факультет с отделением биологии  
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

*На правах рукописи*

Давлетшин Тимур Табрисович

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОСУРФАКТАНТОВ  
ШТАММА *BACILLUS ALTITUDINIS* API-2019

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
профессор, д.б.н.

Маркушева Т.В.

Уфа – 2022

## Содержание

|                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ВВЕДЕНИЕ .....                                                                                                                                                                                           | 3  |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....                                                                                                                                                                          | 5  |
| 1.1. Свойства биосурфактантов .....                                                                                                                                                                      | 5  |
| 1.1.1. Классификация биосурфактантов .....                                                                                                                                                               | 5  |
| 1.1.2. Метаболические пути синтеза биосурфактанта. ....                                                                                                                                                  | 9  |
| 1.2. Промышленное применение биосурфактантов .....                                                                                                                                                       | 13 |
| 1.2.1. Применение биосурфактантов в добыче нефти.....                                                                                                                                                    | 13 |
| 1.2.2. Применение биосурфактантов в решении экологических проблем                                                                                                                                        | 14 |
| 1.2.3. Биосурфактанты в пищевой промышленности.....                                                                                                                                                      | 16 |
| 1.2.4. Биосурфактанты, как лекарственные средства.....                                                                                                                                                   | 18 |
| 1.2.5. Будущие направления применений биосурфактантов.....                                                                                                                                               | 20 |
| 1.3. Биосурфактанты бактерий рода <i>Bacillus</i> .....                                                                                                                                                  | 21 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....                                                                                                                                                                        | 24 |
| 2.1. Объект исследования.....                                                                                                                                                                            | 24 |
| 2.2. Приготовление питательных сред для культивирования штаммов<br><i>Bacillus altitudinis</i> API-2019, <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> и <i>Serratia</i><br><i>plymuthica</i> . .... | 24 |
| 2.3 Методы посева бактерий.....                                                                                                                                                                          | 25 |
| 2.4 Методика идентификации на Vitek MS (MALDI-TOF) .....                                                                                                                                                 | 26 |
| 2.5 Определение эмульгирующей активности штамма <i>Bacillus altitudinis</i> API<br>– 2019.....                                                                                                           | 27 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....                                                                                                                                                   | 29 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....                                                                                                                                                                                         | 44 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....                                                                                                                                                                                   | 45 |

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность.**

Известно, что большинство производимых в настоящее время поверхностно-активных веществ (ПАВ), получаемых химическим путем из нефти, являются синтетическими тензиоактивными агентами, трудно разрушаемыми под действием внешних факторов. В последние годы экологические проблемы побудили научное сообщество к поиску новых ПАВ, более безопасных для окружающей среды, и в частности, получаемых с помощью биологических агентов, известных как биосурфактанты.

Исследования биосурфактантов как метаболитов, продуцируемых микроорганизмами, растениями и высшими животными начались в 1960-х годах. биопар привлекли внимание благодаря таким преимуществам, как структурное разнообразие, низкая токсичность, большая биоразлагаемость, способность функционировать в широком диапазоне pH, температуры и солености, а также большая селективность, более низкая критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) и производство с использованием возобновляемых источников или промышленных отходов.

В настоящее время рынок биосурфактантов проходит этап своего формирования, но уже имеются примеры предприятий, успешно производящих биосурфактанты и продукцию с их использованием. Основным препятствием для их массового распространения и внедрения остается высокая стоимость производства такой продукции и самих биосурфактантов, поскольку для производства биоПАВ требуются дорогие субстраты, кроме этого, они обладают относительно низкой производительностью, что препятствует их коммерциализации.

Несмотря на большой практический интерес к биоПАВ, обнаруживается недостаточно полное исследование их микробных продуцентов.

**Цель настоящего исследования** – изучение эмульгирующих свойств вновь выделенного штамма *Bacillus altitudinis* API-2019.

В задачи исследования входило:

- Исследование культурально-морфологических и физиолого-биохимических характеристик штамма *Bacillus altitudinis* API-2019;
- Изучение роста штамма *Bacillus altitudinis* API-2019 на твердой и жидкой среде культивирования;
- Анализ эмульгирующей способности штамма *Bacillus altitudinis* API-2019;
- Сравнение эмульгирующей способности штамма *Bacillus altitudinis* API-2019 с эмульгирующей способностью других видов бактерий рода *Bacillus*.

Для сравнительных исследований свойств штамма *Bacillus altitudinis* API-2019 были привлечены штаммы рода *Bacillus* из рабочей коллекции лаборатории.

Для работы были выбраны следующие **методы**: комплекс современных методов микробиологических исследований, включающий идентификацию микроорганизмов методом масс-спектрометрии с использованием технологии времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции / ионизации (MALDI-TOF), а также метод определения индекса эмульгирования, разработанный Купером и Голденбергом (1987).

**В результате** исследования было установлено, что вновь выделенный штамм *Bacillus altitudinis* API-2019 обладает эмульгирующей активностью, индекс эмульгирования данного штамма соизмерим с индексом эмульгирования других представителей рода *Bacillus*.

**Практическое применение результатов исследования.** Полученные данные расширяют сведения о продуцентах сурфактантов рода *Bacillus*, открывают возможности применения вновь выделенного штамма в научных и промышленных целях.

## **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1. Свойства биосурфактантов**

Известно, что микробные ПАВ способны повышать растворимость гидрофильных молекул, тем самым снижая как поверхностное, так и межфазное натяжение на границе раздела масло / вода. Неполярная часть таких соединений часто представляет собой углеводородную цепь, тогда как полярная часть может быть ионной (катионной или анионной), неионной или амфотерной [16].

Большинство производимых в настоящее время ПАВ получают химическим путем из нефти. Однако такие синтетические тензиоактивные агенты обычно токсичны и трудно разрушаются под действием микроорганизмов. В последние годы экологические проблемы побудили научное сообщество искать новые ПАВ, более безопасные для окружающей среды, в частности получаемые с помощью микробного производства, известные как биосурфактанты [123].

Исследования по использованию биосурфактантов начались в 1960-х годах, и в последние десятилетия использование этих соединений расширилось [25, 108]. Биосурфактанты привлекли внимание промышленности благодаря таким преимуществам, как структурное разнообразие, низкая токсичность, большая биоразлагаемость, способность функционировать в широком диапазоне pH, температуры и солености, а также большая селективность, более низкая критическая концентрация мицеллообразования (ККМ) и производство с использованием возобновляемых источников или промышленных отходов [76, 89, 96].

#### **1.1.1. Классификация биосурфактантов**

Большинство биосурфактантов являются либо анионными, либо нейтральными молекулами, тогда как те, которые содержат аминогруппы, являются катионными. Гидрофобная часть содержит жирные кислоты с

длинной цепью, а гидрофильная часть может быть углеводом, циклическим пептидом, аминокислотой, фосфаткарбоновой кислотой или спиртом. Молярная масса биосурфактантов обычно колеблется от 500 до 1500 Да. [21].

Структурное разнообразие и функциональные особенности биосурфактантов делают их привлекательным классом соединений, которые можно использовать для широкого спектра промышленных, экологических и биотехнологических применений. Методы скрининга упрощают поиск потенциальных бактерий, продуцирующих биосурфактанты. Для описания свойств биосурфактантов доступны различные подходы к методам исследования и анализу.

Биосурфактанты классифицируются в основном на основе их химического состава и источника образования. На основании учета молекулярной массы была также предложена другая классификация с двумя основными классами [132]. Гликолипиды и липопептиды сходят в группу низкомолекулярных биосурфактантов, тогда как липопротеины, липополисахариды и амфипатические полисахариды составляют группу с высокой молекулярной массой. Низкомолекулярные биосурфактанты снижают поверхностное и межфазное натяжение, в то время как другие высокоэффективны для стабилизации эмульсий [97]. Другие классы биосурфактантов включают в себя фосфолипиды, полимерные ПАВ и ПАВ в виде частиц [36].

Подробный перечень классификации приведен на рисунке 1 [33].

| Microorganism                         | Biosurfactant type                 | Reference                     |
|---------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|
| <i>Norcardia</i> SFC-D                | Trehalose lipid                    | Kosaric et al. 1990           |
| <i>Rhodococcus</i> sp. H13 A          | Trehalose lipid                    | Singer et al. 1990            |
| <i>Rhodococcus</i> sp. ST-5           | Trehalose lipid                    | Abu Ruwaida et al. 1991a      |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> GL-1    | Rhamnolipid                        | Arino et al. 1996             |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UW-1    | Rhamnolipid                        | Sim et al. 1997               |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> GL-1    | Rhamnolipid                        | Patel and Desai 1997          |
| <i>Alcanivorax borkumensis</i>        | Glycolipid                         | Abraham et al. 1998           |
| <i>Tsukamurella</i> sp.               | Glycolipid                         | Vollbrecht et al. 1998        |
| <i>Serratia rubidea</i>               | Glycolipid                         | Matsuyama et al. 1990         |
| <i>Serratia marcescens</i>            | Glycolipid                         | Pruthi and Cameotra 1997b     |
| <i>Candida antarctica</i>             | Mannosylerythritol lipids          | Kitamoto et al. 1993          |
| <i>Candida bombicola</i>              | Sophorose lipid                    | Brakemeier et al. 1995        |
| <i>Candida apicola</i> IMET 43747     | Sophorose lipid                    | Hommel et al. 1994            |
| <i>Bacillus pumilus</i> A1            | Surfactin                          | Morikawa et al. 1992          |
| <i>Bacillus subtilis</i>              | Surfactin                          | Makkar and Cameotra 1997      |
| <i>Bacillus subtilis</i> C 9          | Surfactin                          | Kim et al. 1997               |
| <i>Bacillus licheniformis</i>         | Lichenysin A                       | Yakimov et al. 1995           |
| <i>Bacillus licheniformis</i> JF-2    | Lichenysin B                       | Lin et al. 1994               |
| <i>Arthrobacter</i> sp. EK1           | Trehalose tetraester               | Schulz et al. 1991            |
| <i>Arthrobacter</i> sp. MIS 38        | Arthrofactin                       | Morikawa et al. 1993          |
| <i>Lactobacillus</i> sp.              | Surfactin                          | Velraeds-Martine et al. 1996b |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>        | Viscosin                           | Laycock et al. 1991           |
| <i>Streptomyces tendae</i> TU901/8c   | Streptofactin                      | Richter et al. 1998           |
| <i>Acinetobacter radioresistens</i>   | Alasan                             | Navon-Venezia et al. 1995     |
| <i>Pseudomonas marginalis</i> PD 14 B | Particulate-surfactant (PM factor) | Burd and Ward 1996            |
| <i>Pseudomonas maltophilia</i> CSV 89 | Biosur Pm                          | Phalle et al. 1995            |

### Рисунок 1. Список основных типов сурфактантов и их продуцентов

Обладая широкой доступностью для производства биосурфактанты, по сравнению с химически синтезированными аналогами стали подходящими веществами для коммерческого применения.

Микробные ПАВ идентифицируют по их поверхностному движению, устойчивости к рН, температуре и ионному качеству, биоразлагаемости, низкой ядовитости, эмульгирующей и деэмульгирующей способности и противомикробному действию [1, 27].

Для биосурфактантов эффективность и результативность являются важными характеристиками. Эффективность измеряется в виде ККМ, то есть показателя концентрации ПАВ в растворе, при которой образуются устойчивые мицеллы, тогда как эффективность связана с поверхностным и межфазным натяжением [9, 18].

Большая часть биосурфактантов и их поверхностно-активные свойства устойчивы по отношению к природным факторам, например, температуре и рН. Макинерни и др. сообщили, что лихенизин из *Bacillus licheniformis* был устойчив к температуре до 50°C, рН в районе 4,5 и 9,0 и концентрации NaCl и Са до 50 и 25 г/л<sup>-1</sup>. Также, было обнаружено, что ещё один биосурфактант

полученный от *Arthrobacter protophormiae*, является как термостабильным (30-100°C), так и стабильным при различных pH (от 2 до 12). Поскольку промышленные процессы включают экстремальные значения температуры, pH и массы, важно выделять в отдельные группы изученные вещества, готовые работать в определенных условиях [30].

Соединения, полученные из бактерий, способны быстрее разлагаться по сравнению с синтетическими ПАВ и подходят для естественного применения, таких как биоремедиация и биосорбция [3, 36, 40]. Синтетические химические ПАВ вызывают различные экологические проблемы, и поэтому биоразлагаемые биосурфактанты из морских микроорганизмов были использованы для биосорбции неэффективно растворяющего полициклического углеводорода фенантрена, загрязненного поверхностными водами. [51]. Цветки морских водорослей *Cochlodinium* содержащих биodeградируемый биосурфактанта софоролипид обладали эффективностью удаления загрязнений в 90% после каждой 30-минутной обработки [53].

Биосурфактанты за счет того, что состоят из сложных молекул со специфическими функциональными группами часто обладают специфическим действием. Это представляет особый интерес для детоксикации различных загрязняющих веществ и деэмульгирования промышленных эмульсий, а также для конкретных пищевых, фармацевтических и косметических применений.

Некоторые микроорганизмы способны образовывать биоплёнку, её можно описать как группу микроорганизмов или другого органического вещества, агрегировавших на какой-либо поверхности [130]. Начальным этапом возникновения биопленки является прилипание бактерий к поверхности под влиянием различных компонентов, это зависит от вида микроорганизмов, гидрофобности и электрического заряда, экологических условий и способности микроорганизмов доставлять внеклеточные полимеры, которые помогают клетке цепляться за поверхности [65]. Биосурфактанты можно использовать для изменения гидрофобных свойств поверхности, что

повлияет на прикрепление микроорганизмов к ним. ПАВ из *Streptococcus thermophilus* препятствует колонизации других термофильных штаммов *Streptococcus* на стали, которые ответственны за образование биопленок. Так же биосурфактанты *Pseudomonas fluorescens* препятствовали присоединению *Listeria monocytogenes* к той же стали [70].

Биосурфактанты могут быть либо эмульгаторами, либо деэмульгаторами. Эмульсии обладают минимальной стабильностью, однако добавление биосурфактантов может привести к тому, что эмульсия останется стабильной в течение нескольких месяцев или даже лет. [122]. Липосан — водорастворимый эмульгатор, синтезированный *Candida lipolytica*, добавляется в пищевые масла для образования стабильных эмульсий [23, 24, 28].

### 1.1.2. Метаболические пути синтеза биосурфактанта.

На данный момент известны десятки продуцентов биосурфактантов, в основном это бактерии и микромицеты. Среди бактерий наиболее широко распространены представители родов *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Burkholderia*, *Nocardia*, *Lactobacillus*, *Starmerella*, *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*. Среди микромицетов – *Pseudozyma*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Pseudomonas*, *Ustilago*, *Trichosporon* [4, 15, 43, 71].

В зависимости от получаемых видов биосурфактантов их продуценты можно разделить на несколько групп. Например, липопептиды производят при помощи *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aspergillus sp.*, *Arthrobacter sp.* и т. д., гликолипиды – *P. aeruginosa*, *Rhodococcus sp.*, *Candida antarctica*, *Ustilago sp.*, *Pseudozyma sp.* и т. д., полимерные биосурфактанты – *Arthrobacter calcoaceticus*, *Candida tropicalis*, *C. lipolytica* [8, 50].

В качестве субстратов для наращивания этих культур применяются сахара, нефти, алканы, различные типы отходов сельскохозяйственной и пищевой промышленности.

Современное общество характеризуется увеличением расходов, необходимостью повторного использования материалов и заботой об окружающей среде. Следовательно, больше внимания уделяется рекуперации, переработке и повторному использованию различных промышленных отходов. Это особенно актуально для пищевой промышленности, отходы, стоки и побочные продукты которой могут быть использованы повторно. [17]. Промышленные отходы вызвали интерес исследователей как недорогой субстрат для производства биосурфактантов. При выборе отходов должен учитываться соответствующий баланс питательных веществ, необходимый для роста микробов и последующего производства биосурфактанта. Промышленные отходы с высоким содержанием углеводов или липидов идеально подходят для использования их в качестве субстрата. [75].

В литературе описан ряд отходов, используемых при производстве биосурфактантов, таких как растительные масла, нефтесодержащие стоки [19], крахмалистые стоки [45, 119], животный жир [37, 77, 101, 102], растительный жир [55], отходы растительного масла для жарки [11, 19, 29 56] и так далее.

Микроорганизмы в основном используют гидрофильные субстраты для клеточного метаболизма и синтеза полярной части биосурфактанта, тогда как гидрофобные субстраты используются исключительно для синтеза углеводородной части [36, 125]. Разнообразные метаболические пути, которые участвуют в синтезе предшественников биосурфактантов, зависят от природы основных источников углерода, используемых в культуральной среде (рисунок 1) [58].

Гидрофильный субстрат, например, глюкоза или глицерин, расщепляется до образования промежуточных продуктов гликолитического пути, таких как глюкозо-6-фосфат, который является одним из основных предшественников углеводов, присутствующих в гидрофильной части биосурфактантов (рисунок 2) [62].

Согласно литературным данным биосинтез ПАВ происходит четырьмя различными путями: 1) синтез углеводов и липидов; 2) синтез углеводной

половины, тогда как синтез липидной половины зависит от длины цепи углеродного субстрата в среде; 3) синтез липидной половины, в то время как синтез углеродной половины зависит от используемого субстрата; 4) синтез углеродной и липидной половин, которые оба зависят от субстрата [69].

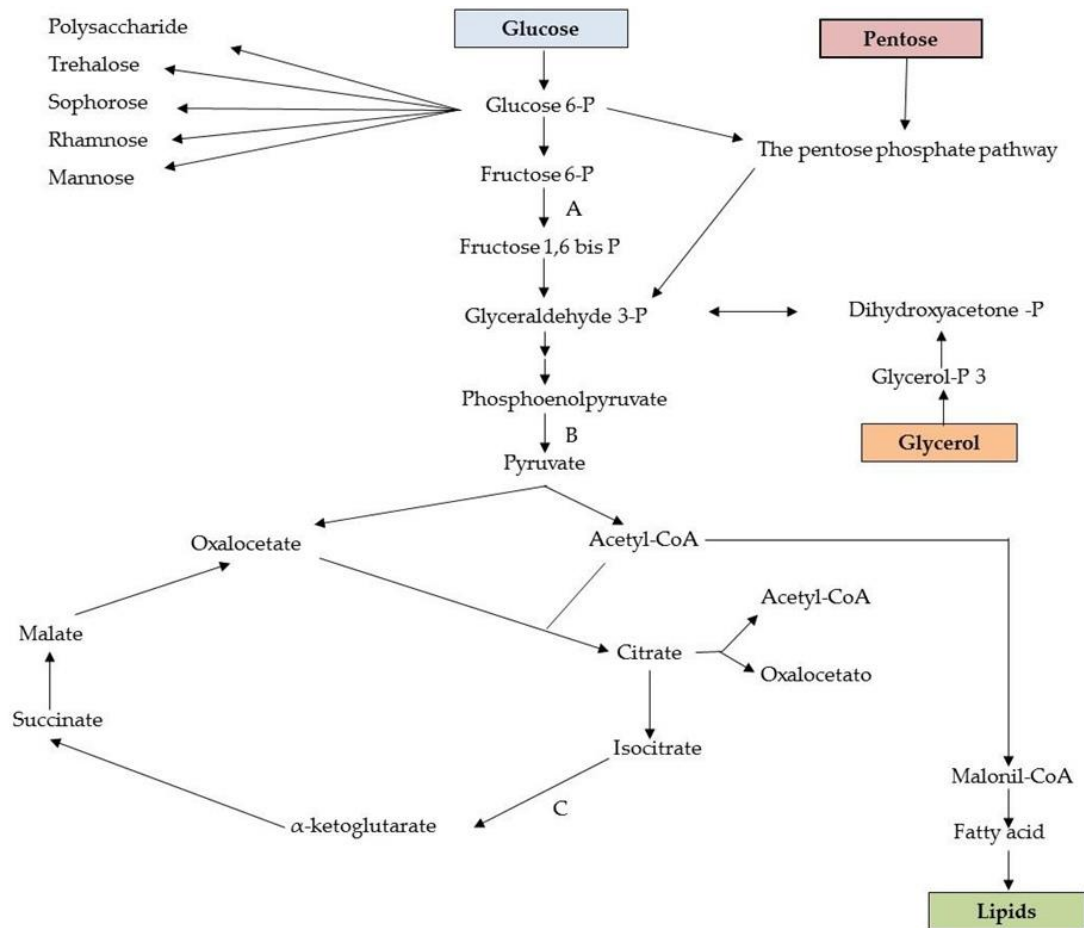


Рисунок 2. Промежуточный метаболизм, связанный с синтезом предшественников биосурфактантов с использованием углеводов в качестве субстрата. Условные обозначения: А – фосфофруктокиназа; В – пируваткиназа; С – изоцитратдегидрогеназа [58]

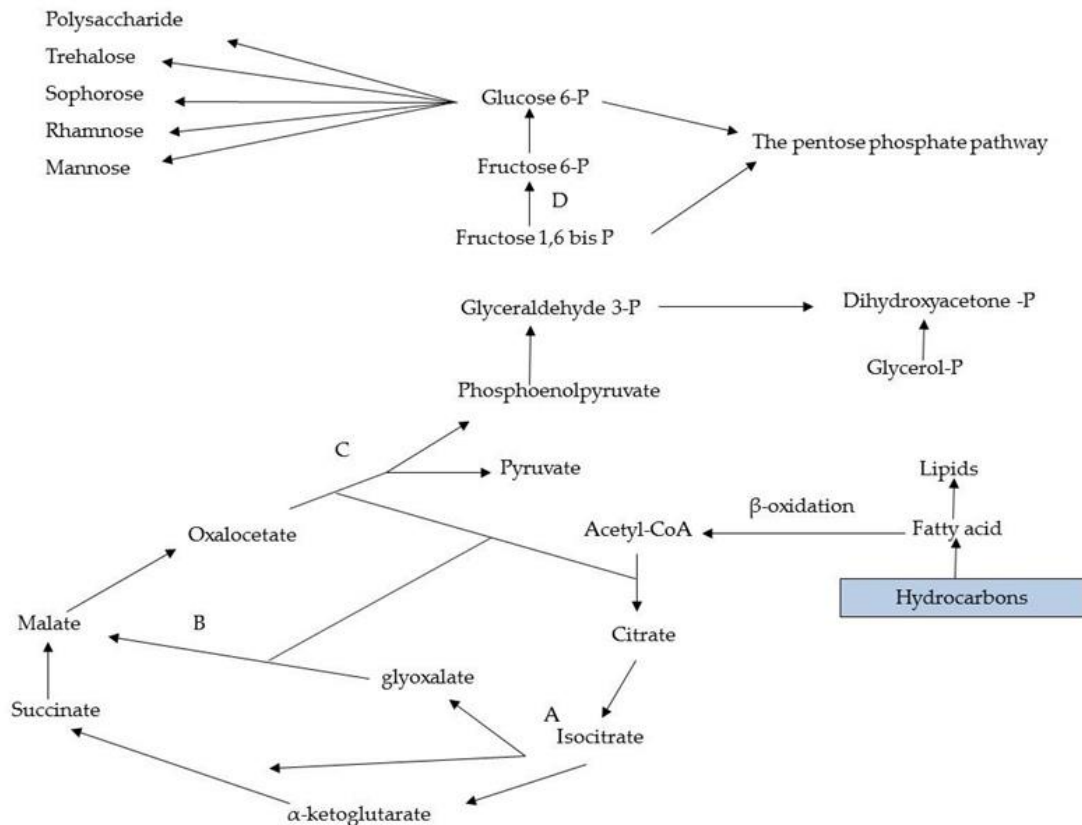


Рисунок 3. Промежуточный метаболизм, связанный с синтезом предшественников биосурфактанта использование углеводов в качестве субстрата. Ключевые ферменты: А – изоцитрат-лиаза; В – малатсинтаза; С – фосфоенолпируват; D – фруктоза-1 [120]

Биосурфактанты продуцируются микроорганизмами либо путем экскреции, либо адгезии к клеткам, особенно при культивировании на субстратах, нерастворимых в воде. Хотя функция микробных клеток еще полностью не изучена, предполагается, что биосурфактанты участвуют в эмульгировании нерастворимых субстратов [36, 116].

Основная физиологическая роль биосурфактантов заключается в том, чтобы позволить микроорганизмам расти на субстратах, которые нерастворимы в воде, это возможно за счет снижения поверхностного натяжения между фазами, делающий субстрат более доступным для поглощения и метаболизма. Механизмы поглощения этих субстратов (например, алканов) еще полностью не выяснены [10]. Помимо

эмульгирования источника углерода биосурфактанты также участвуют в адгезии микробных клеток к углеводородам. Адсорбция клеток микроорганизмов на нерастворимых субстратах и экскреция ПАВ позволяют расти на доступных источниках углерода [36].

## **1.2. Промышленное применение биосурфактантов**

Биосурфактанты имеют широкий спектр биотехнологических применений в нефтяной, горнодобывающей и пищевой промышленности, в производстве напитков, косметики, моющих средств, текстиля, красок, целлюлозы, лекарств и нанотехнологий. [2, 95]. В настоящее время основным рынком сбыта является нефтяная промышленность. Биосурфактанты могут использоваться для извлечения нефтяных остатков из резервуаров с целью их дальнейшего хранения, очистки разливов нефти и биоремедиации почвы и воды [5, 108, 111].

### **1.2.1. Применение биосурфактантов в добыче нефти**

Нефть является важным источником энергии и движущей силой экономического развития. Однако, нефтяной остаток в мелких порах нефтяных пластов составляет от 50% до 65% и улавливается высокими силами капиллярности, а также поверхностным натяжением между углеводородной и водной фазами. Для мобилизации этого углеводорода необходимы различные способы снижения межфазного натяжения [13, 128]. Это возможно достичь только при использовании концентраций ПАВ значительно выше, чем необходимая для образования мицелл. [99, 100]. При повышении нефтеотдачи использование тепла, сурфактантов, микробиологических процессов и закачки газа приводит к извлечению значительной части удерживаемой нефти. Однако высокая стоимость химических тензиоактивных веществ сдерживает широкое использование ПАВ в процессах добычи нефти. Таким образом, биосурфактанты могут использоваться для снижения межфазного натяжения между нефтью / водой и нефтью / породой, что приводит к уменьшению

капиллярных сил, препятствующих движению нефти через поры породы. Биосурфактанты также образуют эмульсию на границе раздела фаз нефть-вода, которая стабилизирует десорбированную нефть в воде и позволяет удалять нефть вместе с закачиваемой водой [6, 78, 89].

### **1.2.2. Применение биосурфактантов в решении экологических проблем**

Разливы нефти возникают при транспортировке грузов или в виде разливов технических масел и побочных продуктов. Нефть оказывает негативное влияние на клеточные мембраны живых организмов, создавая значительный риск загрязнения как морских, так и наземных экосистем. Поэтому были разработаны методы использования биосурфактантов в биоремедиации [7, 108].

Биоразложение углеводородов, которые были получены из нефти, биосурфактантами происходит по двум механизмам. Первый заключается в увеличении биодоступности гидрофобного субстрата для микроорганизмов с последующим снижением поверхностного натяжения среды вокруг бактерии, а также уменьшением межфазного натяжения между клеточной стенкой и молекулами углеводородов. Другой механизм включает взаимодействие между биосурфактантом и клеточной поверхностью, что приводит к изменениям в мембране, облегчению адгезии углеводородов (увеличение гидрофобности) и снижению липополисахаридного индекса клеточной стенки без повреждения мембраны. Таким образом, биосурфактанты блокируют образование водородных мостиков и помогают создать гидрофобно-гидрофильные взаимодействия [12, 47].

Также биосурфактанты могут использоваться для удаления гидрофобных органических загрязнителей. Однако применение биосурфактантов для удаления загрязняющих веществ из почвы менее известно, чем передовое применение этих соединений в процессах биоремедиации, поскольку эффективность удаления определяется в основном физико-химическими свойствами биосурфактанта, а не влиянием на

метаболическую активность или изменениями в свойствах клеточной поверхности. Однако механизмы, которые влияют на мобилизацию и солюбилизацию углеводов в почвах, аналогичны тем, которые участвуют в повышении биодоступности для биоремедиации [14, 47].

Биосурфактанты улучшают удаление углеводов за счет биodeградации, солюбилизации, мобилизации или эмульгирования [89]. Солюбилизирующая способность зависит от способности ПАВ повышать растворимость гидрофобных компонентов в водной фазе. Мобилизация происходит при концентрациях ниже ККМ и подразделяется на вытеснение и дисперсию. Вытеснение состоит в высвобождении капель углеводов из пористой среды за счет снижения межфазного натяжения. Диспергирование – это процесс, при котором углеводород диспергируется в водной фазе в виде крошечных эмульсий. Эмульсии обычно не являются термодинамически стабильными, но могут оставаться стабильными в течение значительных периодов времени из-за кинетических ограничений [14].

Помимо биоремедиации и удаления органических загрязнителей, биосурфактанты способны очищать почву от тяжелых металлов. Тяжелые металлы и радионуклиды являются стойкими загрязнителями почвы. Во многих промышленно развитых странах сообщалось о повышении уровня содержания тяжелых металлов в почве. Металлы и металлоиды, такие как хром, кадмий, ртуть и свинец, могут угрожать экосистемам и здоровью человека либо через пищевую цепь, либо через прямое воздействие на загрязненную почву и воду [26, 78]. Поскольку для очистки от органических загрязнителей и тяжелых металлов можно использовать различные технологии, биосурфактанты так же можно использовать для удаления тяжелых металлов [60, 80, 109].

Были проведены испытания дезактивации с различными синтетическими поверхностно-активными веществами [83], но желание заменить такие соединения природными поверхностно-активными веществами привело к исследованиям использования биосурфактантов [100].

Исследования продемонстрировали потенциал сурфактина, рамнолипидов и софоролипидов [61, 81, 87]. Ионная природа, биоразлагаемость, низкая токсичность и превосходные свойства поверхности делают биосурфактанты подходящими для удаления тяжелых металлов из отложений и почвы. По словам Маллигана [100], удаление возможно при различных концентрациях биосурфактантов. Дас и другие [32], установили, что удаление кадмия с помощью водного раствора происходит также при концентрациях ниже ККМ, а концентрация, в пять раз превышающая ККМ, приводит к практически полному удалению 100 ppm ионов металлов. Вэнь и другие [127] изучали разложение рамнолипидов в почвах, загрязненных кадмием и цинком, и обнаружили, что это соединение может оставаться в почве достаточно долго, чтобы усилить фитоэкстракцию металлов.

### 1.2.3. Биосурфактанты в пищевой промышленности

В пищевой промышленности актуально применение биосурфактантов в качестве функциональных компонентов и пищевых добавок. Например, некоторые дрожжи синтезируют биосурфактанты, которые обладают антиоксидантной активностью, высокой термостойкостью, они нетоксичны, не являются потенциальными патогенами, что позволяет вводить их в рецептуры пищевых продуктов. Так, было предложено заменить яичный желток при промышленном производстве печенья на биосурфактант, продуцируемый *Saccharomyces cerevisiae* [85, 92]. Биосурфактанты выступают как эмульгаторы, антиоксидантные агенты и антиадгезивные агенты. Например, маннопротеин, полученный из *S. cerevisiae*, был успешно использован для стабилизации воды и масла при создании эмульсий для производства майонеза, печенья и мороженого [23]. Дрожжи *Candida valida*, *Candida utilis*, *Hansenula anomala*, *Rhodotorula graminis*, *Rhodospiridium diobovatum*, красная водоросль *Porphyridium cruentum*, бактерии *Klebsiella sp.*, *Acinetobacter calcoaceticus* являются продуцентами внеклеточных биоэмульгаторов, которые отличаются большей стабилизирующей

активностью по сравнению с традиционными эмульгаторами. В дополнение к роли агентов, снижающих поверхностное и межфазное натяжение и усиливающих стабилизацию образования эмульсии, биосурфактанты применяются и в иных сферах пищевой промышленности, включая контроль текстуры и срока хранения крахмалосодержащих продуктов, улучшение консистенции и текстуры продуктов на жировой основе, агломерацию жировых компонентов, стабилизацию аэрированных систем и изменение реологических свойств теста из пшеничной муки. Имеются примеры включения биосурфактантов в рецептуры хлебобулочных изделий и мороженого для улучшения консистенции, отсрочки микробного увядания, солюбилизации масел, в качестве стабилизаторов жира и агентов против разбрызгивания. Рамнолипиды используются для улучшения текстуры теста, стабильности, сохранения объема и консервации хлебобулочных изделий. L-рамноза в составе рамнолипидов имеет значительный потенциал и уже используется в промышленности в качестве предшественника высококачественных ароматизирующих компонентов, таких как фуранеол (клубничный фуранон) [84, 85]. Биосурфактанты обладают некоторым потенциалом в качестве антиоксидантных агентов. Липиды маннозилэритрита – биосурфактанты с доказанной *in vitro* антиоксидантной активностью [115]. Аналогичные наблюдения были опубликованы для биосурфактанта, полученного из *B. subtilis* [64]. Кроме того, полисахаридный биосурфактант, продуцируемый *Klebsiella*, способен ингибировать перекисное окисление соевого масла путем инкапсуляции [23]. Некоторые биосурфактанты проявляют антиадгезивную и антимикробную активность. Опубликованы данные об антиадгезивной активности рамнолипидов и сурфактина на поверхности полистирола в отношении *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Micrococcus luteus* [131]. Лунасан, продуцируемый дрожжами *Candida sphaerica* UCP0995, также полностью подавлял адгезию нескольких штаммов *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* и *Candida* на пластиковых планшетах для культивирования тканей [73]. Та же группа исследователей

описала антиадгезивную и антимикробную активность руфизана, биоПАВ, продуцируемого дрожжами *Candida lipolytica* [98]. Антиадгезивная активность биосурфактантов делает возможным их применение в качестве покрывающих агентов для посуды, используемой для употребления пищи или при производстве пищевых продуктов.

#### **1.2.4. Биосурфактанты, как лекарственные средства**

В медицине и косметологии биосурфактанты являются в первую очередь безопасными аналогами синтетических ПАВ и вспомогательными компонентами медицинских и косметических средств. В литературе имеется ряд упоминаний о применении биосурфактантов для синтеза микроэмульсий [54, 88, 118] и наночастиц медицинского назначения [42, 52, 67, 103]. Они также используются как основа или компоненты различных систем доставки лекарств, включая таргетные, ввиду своей мицеллярной природы, которая позволяет им образовывать стабильные липосомы, способные заключать лекарство в оболочку, защищая его от повреждений, обеспечивая его стабильный выход и зависимость доза-эффект [82, 88, 94, 117]. Благодаря присущим им физико-химическим характеристикам, биосурфактанты сохраняют свои свойства даже в случае, если условия внешней среды изменяются в широких пределах. Это делает их идеальными компонентами основы различных лекарственных форм (жидкостей, жевательных форм, аэрозолей), что, например, актуально при изготовлении препаратов для лечения болезней легких [113].

Биосурфактанты обладают противомикробной, противогрибковой, антибиотикопленочной, антиадгезивной и противовирусной активностью и поэтому могут быть использованы как основные действующие вещества при разработке новых лекарственных средств. Например, в условиях пандемии коронавируса COVID-19 многими исследователями обсуждается возможность применения биосурфактантов в качестве безопасных и эффективных моющих средств. По мнению авторов работы, гигиенические и обеззараживающие

процедуры с использованием биосурфактантов являются реальной и более безопасной альтернативой существующим процедурам. В дополнение к этому, биосурфактанты могут быть включены в схему лечения пациентов, у которых диагностировали COVID-19, особенно при облегчении симптомов, связанных с острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС). Помимо симптоматического лечения вирусных инфекций биоактивные пептиды микробной природы способны инактивировать вирусы, взаимодействуя с их липидной оболочкой – суперкапсидом [31, 110, 113, 126]. Например, циклоспорин А – биопептид, продуцируемый *Tolypocladium inflatum*, – подавляет распространение вируса гриппа, воздействуя на цикл его встраивания и размножения. Циклоспорин А не влияет на адсорбцию или репликацию РНК вируса, но вместо этого ингибирует стадии, следующие за синтезом белка, такие как сборка или почкование [48, 114]. Это чрезвычайно важно, поскольку почкование позволяет вирусам покидать клетки-хозяева и прикрепляться к производным мембранам, обогащенным вирусными белками, тем самым способствуя распространению инфекции [74, 124].

Биосурфактанты могут использоваться и в качестве компонентов вакцин и иммуномодуляторов. В одном из имеющихся по данному вопросу исследований было показано, что синтетические липопептидные вакцины способны индуцировать вирус-специфические цитотоксические Т-лимфоциты против эпитопа нуклеопротеина гриппа [35], что открывает возможности для поиска липопептидов, например, микробной природы, имеющих аналогичное действие. Подобные результаты были получены в отношении вируса ящура и ВИЧ-1 [72, 129].

Известно также, что софоролипиды демонстрируют иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства, в частности, их применение улучшило выживаемость при сепсисе в экспериментах на животных моделях [22]. Помимо этого, софоролипиды проявляют активность в отношении вируса герпеса и ВИЧ при их модификации путем ацетилирования головных групп софорозы. Предполагается, что такая

модификация повышает гидрофильность софоролипидов, тем самым усиливая их противовирусные и цитокин-стимулирующие свойства [57, 104].

Также биосурфактанты используются в нанотехнологиях, а синтез наночастиц становится частью «зеленой» химии [68, 99]. Наностержни из оксида никеля (NiO) могут быть получены с помощью микроэмульсии вода-в-масле [90]. В одном эксперименте образовались две микроэмульсии при добавлении раствора хлорида никеля к биоПАВ и раствору в гептане, при добавлении гидроксида аммония к той же углеводородной смеси. Затем отцентрифугированные микроэмульсии и этанол использовали для промывки осадков и удаления биосурфактанта и гептана [100].

#### **1.2.5. Будущие направления применений биосурфактантов**

В последние десятилетия индустрия биосурфактантов продемонстрировала значительный рост, хотя крупномасштабное производство этих биомолекул остается проблемой с экономической точки зрения. Это в основном связано с огромной разницей между требуемыми финансовыми вложениями и жизнеспособным промышленным производством.

Несмотря на дорогостоящий и сложный производственный процесс, биосурфактанты уже выпускают в промышленном масштабе, причем для нескольких типов биосурфактантов существуют разработанные и успешно внедренные биотехнологические схемы [66]. По оценкам мировых маркетинговых агентств объем мирового рынка биосурфактантов составил более 1.8 млрд долларов США в 2016 г. и, как ожидается, достигнет 2.6 млрд долларов США к 2023 г. Крупнейшие рынки биосурфактантов находятся в Европе (около 53%) и США (около 26%). Ведущими производителями биосурфактантов считаются BASF Cognis (Германия) и Ecover (Бельгия), а также MG Intobio, Urumqui Unite, Saraya, Sun Products Corporation, Akzo Nobel, Croda International PLC, Evonik Industries (Германия), Mitsubishi Chemical Corporation и Jeneil Biosurfactant. Однако, с точки зрения производственного

процесса, биосурфактанты все же менее конкурентоспособны по сравнению с их синтетическими аналогами [20], поэтому снижение стоимости производства и разработка новых биотехнологий для их получения являются одними из приоритетных направлений при изучении данных веществ.

### 1.3. Биосурфактанты бактерий рода *Bacillus*

Липопептидные биосурфактанты, продуцируемые видами *Bacillus*, проявляют специфическое ингибирующее рост и литическое действие в отношении широкого спектра микроорганизмов. К ним относятся грамотрицательные и грамположительные бактерии, грибы и некоторые вирусы [34, 41, 93, 121].

Антибактериальные свойства и способность разрушать биопленки биосурфактантов (рамнолипидов и софоролипидов) и додецилсульфата натрия (ДСН) в сочетании с выбранными органическими кислотами исследовали Риенцо и другие [93]. Результаты этого исследования показывают, что рамнолипиды и софоролипиды могут иметь разные механизмы действия против бактерий. Рамнолипиды подавляют рост в экспоненциальной фазе, предполагается, что они могут влиять на клеточное деление, в то время как антимикробные эффекты софоролипидов проявляются между экспоненциальной и стационарной фазами. Более того, авторы сообщили, что биопленки, образованные *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus* на покровных стеклах разрушали софоролипиды. Результаты показали, что софоролипиды обладают большим потенциалом для использования в разрушении биопленок. Более ранние исследования также показали, что рамнолипиды могут разрушать биопленки, образованные *B. pumilus*, в то время как сурфактин, продуцируемый *B. subtilis*, способен ингибировать биопленки, образованные *Salmonella enterica*, *E. coli* и *Proteus mirabilis* [39, 79].

Также сами некоторые виды *Bacillus* способны образовывать биопленки и эффективно секретировать широкий спектр противомикробных соединений,

таких как полимиксин В, грамицидин S и биосурфактанты, которые принадлежат к семейству липопептидов. Они являются главными кандидатами в будущем производстве противомикробных препаратов против сульфатредуцирующих бактерий (SRB). Джайрамян и другие [63] и Зуо и другие [133] сообщили, что виды *Bacillus* (природные или генетически сконструированные) могут продуцировать противомикробные соединения внутри биопленки, что приводит к ингибированию роста вызывающих коррозию SRB и снижению скорости коррозии мягкой стали. Было показано, что супернатанты продуцентов грамицидина S, а также очищенный грамицидин S ингибируют рост SRB [133]. Показано, что механизм действия этих антимикробных веществ заключается в разрушении наружной и цитоплазматической мембран. Следовательно, использование бактерий, продуцирующих антимикробные пептиды в комплексе биопленки, для ингибирования колонизации SRB внутри биопленки, является привлекательным и многообещающим методом. Успешное внедрение этого метода обеспечит экономию в практическом применении за счет сокращения использования высоких концентраций биоцидов и ингибиторов коррозии.

Еще одна область, где используются биосурфактанты и их продуценты, — это архитектура. Крайне важно разработать надлежащие меры при реставрации, которые должны быть основаны на экологически безвредных альтернативах. Данный биологический метод в случае исторических материалов называется либо биоочисткой, либо биоконсолидацией [44]. Например, бактерии рода *Bacillus* появляются в качестве альтернативы из-за их способности продуцировать биосурфактанты с антагонистической активностью против многих грибковых патогенов [105, 106, 107, 112].

Также некоторые представители рода *Bacillus*, которые были преимущественно выделены из нефтяных резервуаров или загрязненных нефтью почв, были способны производить биосурфактанты реагирующие с нефтью. Например, *Bacillus methylotrophicus* была выделена из нефтяного резервуара и хорошо росла на сырой нефти в водной среде. Через 12 дней

инкубации, *B. methylotrophicus* удалил более 90% сырой нефти. Причем биосурфактант был стабилен при различных значениях pH и высоких температурах (до 100 ° C), что позволяет предположить его потенциальное применение в качестве средства для обработки разливов нефти в морской среде, где обычно высокая соленость и высокая температура [27].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объект исследования

Объектом исследования являлся штамм *Bacillus altitudinis* API-2019, выделенный из помёта медоносной пчелы *Apis mellifera mellifera* L., а также коллекционные штаммы рода *Bacillus* и *Serratia*.

Бактерии рода *Bacillus* были представлены грамположительными, подвижными аэробными мезофильными клетками палочковидной формы. При росте размеры колоний варьировали от 2 до 5 мм, обычно имели круглую форму белого цвета, были блестящими или матовыми, непрозрачными с гладким или волнистым краем, с гладкой и выпуклой поверхностью. Рост по штриху сплошной с волнистым краем, практически не расплывающийся. Границы роста бактерий располагались в пределах от 10°C до 45°C. Росли на питательном агаре. Крайне устойчивы в 2% NaCl, в пределах pH[5] – pH[8].

Бактерия рода *Serratia* относится к грамотрицательным, факультативно-анаэробным, палочковидным бактериям семейства Enterobacteriaceae, производила характерный красный пигмент, продигозин.

### 2.2. Приготовление питательных сред для культивирования штаммов

*Bacillus altitudinis* API-2019, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* и *Serratia plymuthica*

Для выделения чистых культур *B. altitudinis* API-2019, *B. subtilis*, *B. cereus* и *S. plymuthica* были использованы бруцеллагар и кровяной агар.

Состав тиогликолевой среды (г/л): мясной пептон – 10,00; казеиновый пептон – 10,00; дрожжевой экстракт – 2,00; глюкоза – 1,00; хлористый натрий – 5,00; агар-агар – 13,00.

Приготовление среды. В 1 л дистиллированной воды перемешали 41,00 г порошка, и автоклавировали при 121 ° С в течение 20 минут. Цвет готовой среды соломенно-желтый. Среду охлаждали до температуры 45-50 ° С и разливали в стерильные флаконы или пробирки.

Состав кровяного агара (г/л): настой говяжьего сердца – 500,00; триптоза – 10,00; NaCl – 5,00; агар-агар – 15,00. Приготовление среды – в 1 л дистиллированной воды перемешали 40,00 г порошка. Прокипятили до полного растворения частиц, далее автоклавировали в течение 15 минут. После того, как остудили в раствор добавили до 5% дефибринированную кровь. Перемешали и разлили в чашки Петри.

Для изучения эмульгирующей активности *B. altitudinis* API-2019, *B. subtilis*, *B. cereus* и *S. plymuthica* была использована среда М9. Состав среды (г/л):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$  – 171,90;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 30,00; NaCl – 5,00;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 10,00; глюкоза – 40,00. Приготовление среды. В 1 л дистиллированной воды внесли и перемешали 140,00 г порошка до полного растворения частиц и разлили среду по пробиркам. Автоклавировали в течение 20 минут.

### 2.3 Методы посева бактерий

Рассев петлей (метод истощающего штриха) проводили высевом бактериологической петлей из накопительной культуры на поверхность агаризованной среды в чашках Петри. На первом этапе петлей с культурой наносили ряд параллельных штрихов на агаризованной среде. Петлю стерилизовали, остужали об незасеянную часть агаризованной среды и проводили серию штрихов в направлении, перпендикулярном первым. Затем петлю вновь стерилизовали, остужали и штрихи наносили в направлении, перпендикулярном вторым, а после очередной стерилизации – в направлении, перпендикулярном третьим. Чашки помещали в термостат и через определенное время учитывали результаты.

Для оживления штамма во флакон добавляли жидкую тиогликолевую среду и инкубировали 24 ч. в термостате при 37 °С. Далее проводили визуальный анализ посевов.

Посев на жидкую среду проводили высевом бактериологической петлей из накопительной культуры на жидкую среду, разлитую по пробиркам.

Брали петлю, обжигали ее в пламени спиртовки, охлаждали о незасеянную часть среды и брали материал для посева. В левую руку взяли пробирки с жидкой питательной средой и открыли пробку пальцами правой руки, прижав ее мизинцем к ладони или держа между указательным пальцем и мизинцем. Осторожно ввели петлю в пробирку со средой и погрузили в нее. После проведения посева, пробирку вместе с пробкой провели через пламя спиртовки и закрыли. Полученные посевы отправили в термостат на 24 часа при температуре 37 °С. Далее провели визуальный анализ.

## **2.4 Методика идентификации на Vitek MS (MALDI-TOF)**

VITEK® MS – автоматическая система идентификации микроорганизмов, которая использует технологию MALDI-TOF (времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция / ионизация). За считанные минуты этот метод масс-спектрометрии проводит идентификацию до вида, рода и семейства.

Этап 1: Подготовка образцов.

Анализ начинается с того, что на подложке масс-спектрометра смешивают биоматериал из колонии бактерий и специальную матрицу (2',5' дигидроксibenзойная кислота), раствор уже готов к использованию и устойчив к свету). Затраты по времени для подготовки 24 изолятов — 10 минут, для 96 изолятов — 33 минуты.

Этап 2: Идентификация.

Далее образец помещают в прибор и подвергают воздействию наносекундных лазерных импульсов. При этом молекулы матрицы и аналита (в частности, белки) переходят в газовую фазу, а протонированные молекулы матрицы взаимодействуют с белками, перенося на них положительный заряд. Под действием электрического поля ионизированные белки движутся от источника ионизации к детектору с ускорениями, обратно пропорциональными их атомным массам. Программное обеспечение прибора оценивает время пролета частиц и преобразует эту информацию в спектр

молекулярных масс (масс-спектр). Масс-спектр сравнивается со спектрами из базы данных, и на основании сведений о массах характеристических белков происходит идентификация микроорганизмов.

Затраты по времени для идентификации 24 изолятов — 12 минут, для 96 изолятов — 43 минуты.

Таким образом, на идентификацию одного микроорганизма требуется меньше 2-х минут времени, при этом образцом может служить первичная колония. База данных VITEK® MS состоит из клинически значимых видов (бактерий, дрожжей, плесневых грибов / дерматофитов, микобактерий) и покрывает большинство видов, встречающихся в ежедневной практике микробиологической лаборатории.

Метод MALDI-TOF масс-спектрометрии позволяет не только идентифицировать микроорганизм, но и в ряде случаев получать уникальный набор рибосомальных белков (фингерпринт) для каждого из исследуемых штаммов, что открывает широкие возможности и перспективы для изучения штаммовых характеристик.

## 2.5 Определение эмульгирующей активности штамма *Bacillus altitudinis* API – 2019

Активность эмульгирования штамма *Bacillus altitudinis* API-2019 измеряли по методике Розенберга, а также методом Голденберга и Купера (Rosenberg, 2006; Cooper, Goldenberg, 1987). В мерные пробирки с притертыми пробками объемом 25 мл вносили 5 мл гексадекана и 5 мл культуральной жидкости. Содержимое пробирок перемешали на вортексе на максимальной скорости в течение 2 мин. Спустя 24 ч после проведения эксперимента по формуле рассчитывали индекс эмульгирования как отношение объёма плотной эмульсии, которая образуется при перемешивании изучаемого раствора с гексадеканом, к общему объёму раствора, умноженному на 100%:

$$E_{24}=V_3/V*100\%, \text{ где}$$

$E_{24}$  – индекс эмульгирования, %;

$V_3$  – объём плотной эмульсии, мл;

$V$  – общий объём раствора, мл.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что в помёте медоносной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. содержатся бактерии, обладающие спектром биосурфактантов и в частности, такими свойствами обладает вновь выделенный штамм *Bacillus altitudinis* API-2019.

В данный момент изучение, а также сравнение с другими бактериями рода *Bacillus* эмульгирующих свойств штамма *Bacillus altitudinis* API-2019 является актуальным, т.к. позволяет получить сравнительные характеристики о производимых вновь выделенным штаммом биосурфактантах и создает перспективу их практического применения.

Для проведения сравнительного анализа на первом этапе работы были отобраны штаммы из рабочей коллекции лаборатории. В рамках этого этапа отобранные штаммы были идентифицированы до вида с помощью MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation in Time-Of-Flight mass spectrometers) на приборе VITEK® MS.

Ниже представлены рисунки 4-10, полученные в ходе исследований лабораторных штаммов с применением системы VITEK® MS.

Рисунки отражают результаты MALDI TOF-анализа в форме графиков, ось абсцисс которых отражает значения отношения  $m/z$  для каждого пика, а ось ординат - частоту регистрации каждого пика.

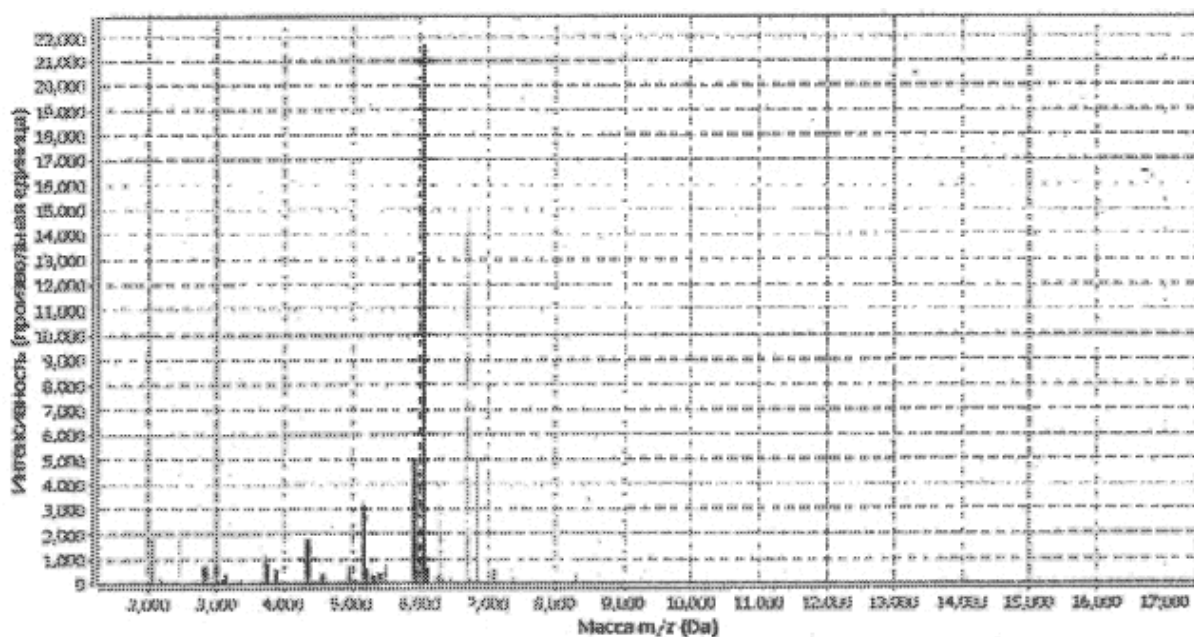


Рисунок 4. График, отражающий масс-спектрометрические данные, полученные при идентификации в системе VITEK<sup>®</sup> MS штамма *Bacillus cereus* DG-1

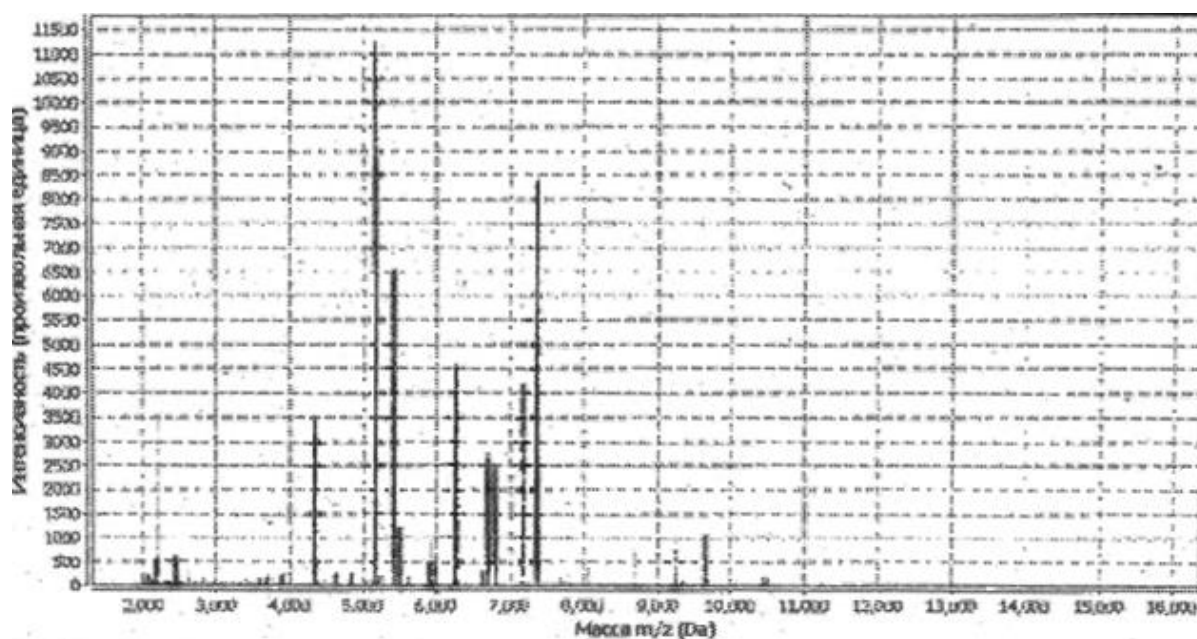


Рисунок 5. График, отражающий масс-спектрометрические данные, полученные при идентификации в системе VITEK<sup>®</sup> MS штамма *Bacillus cereus* DG-5

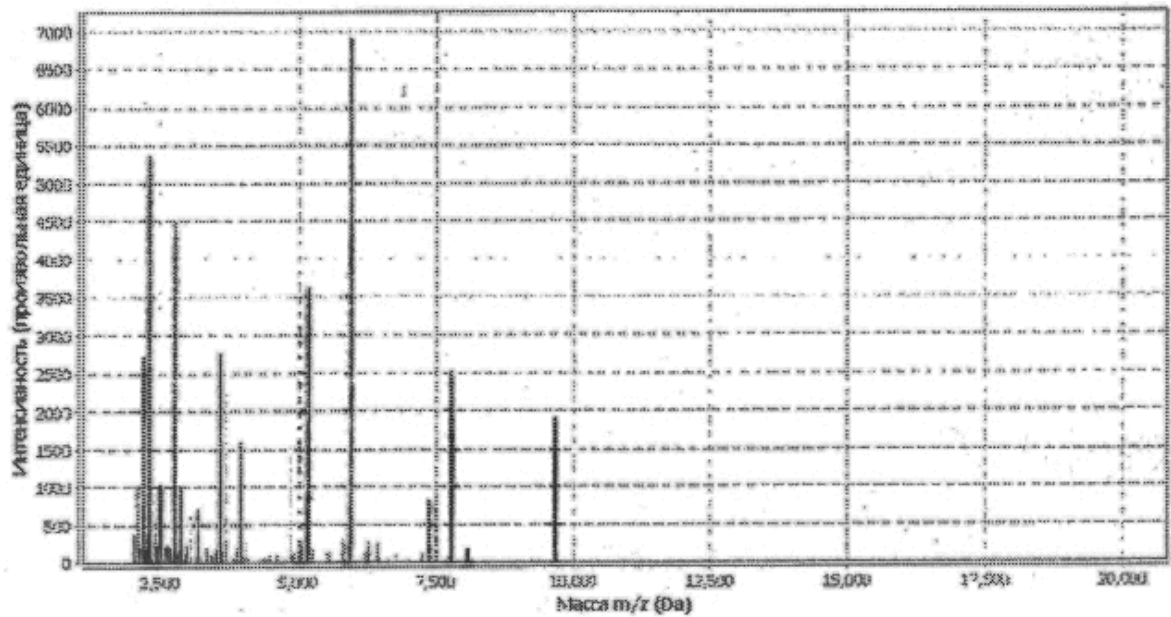


Рисунок 6. График, отражающий масс-спектрометрические данные, полученные при идентификации в системе VITEK<sup>®</sup> MS штамма *Bacillus cereus* DG-6

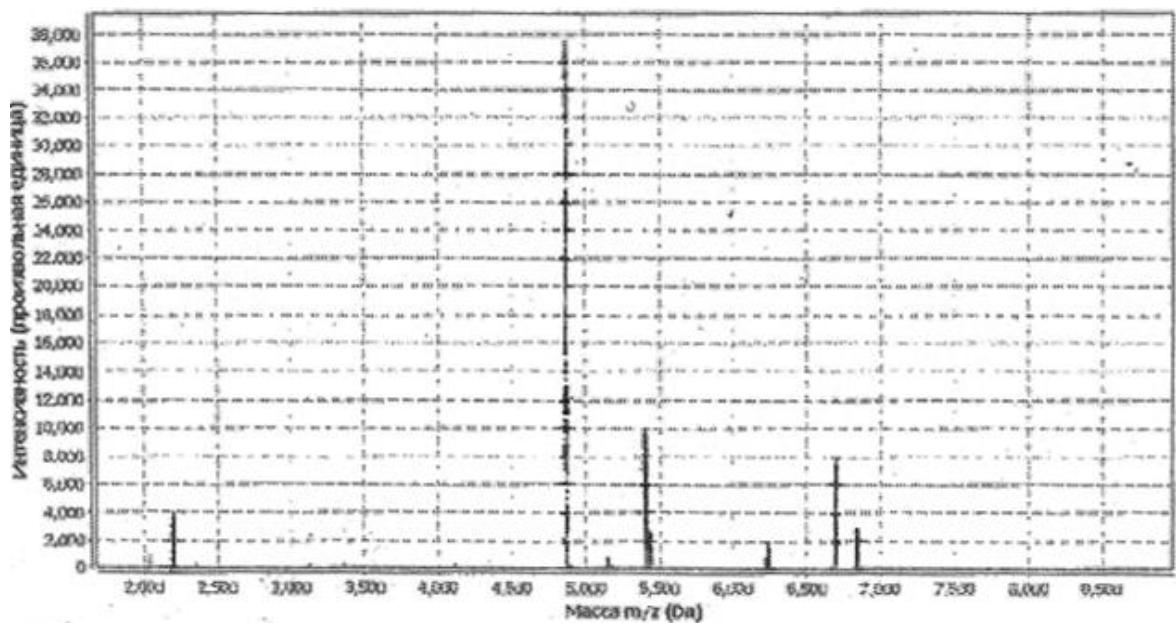


Рисунок 7. График, отражающий масс-спектрометрические данные, полученные при идентификации в системе VITEK<sup>®</sup> MS штамма *Bacillus cereus* DG-7

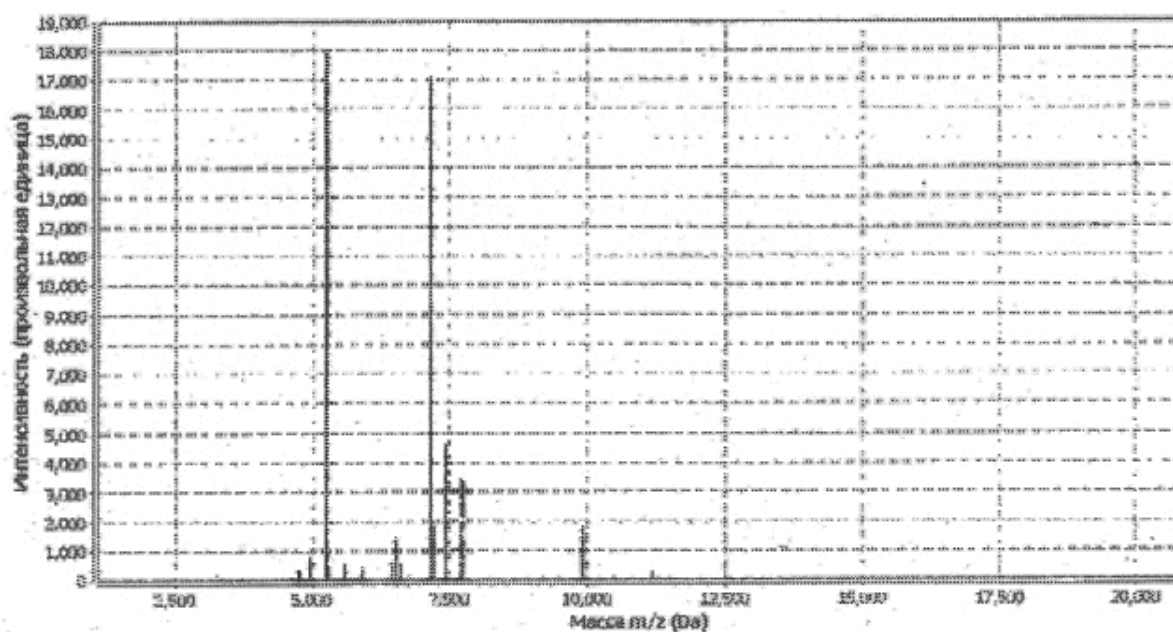


Рисунок 8. График, отражающий масс-спектрометрические данные, полученные при идентификации в системе VITEK® MS штамма *Bacillus subtilis* TA-3

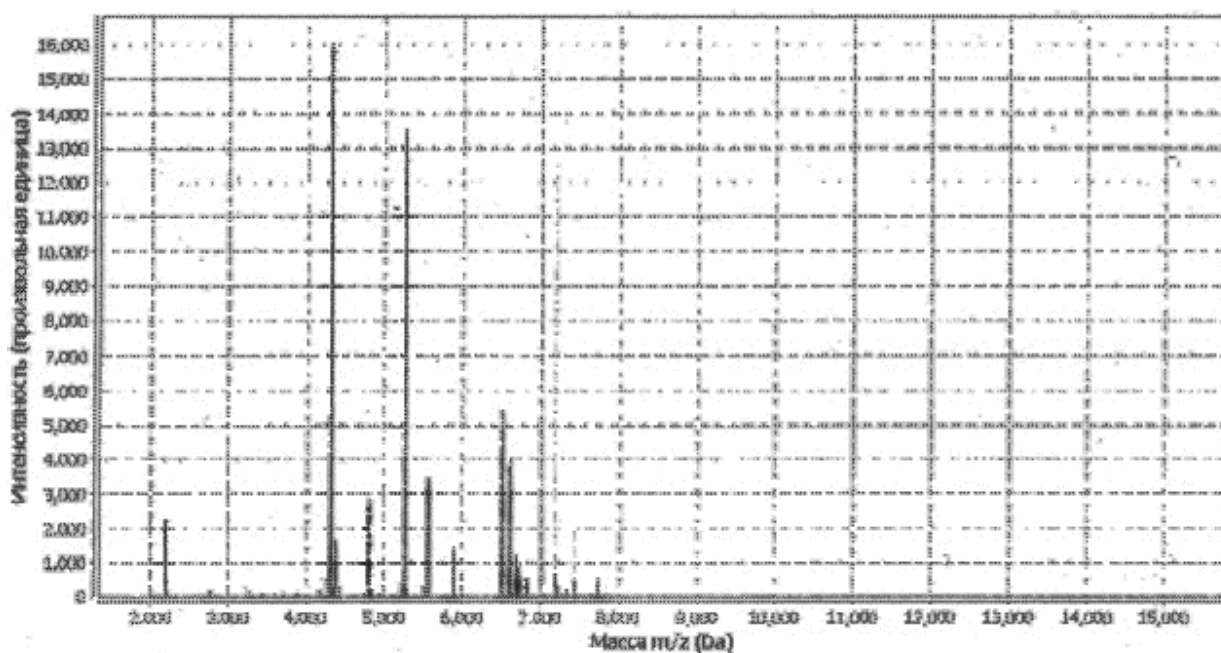


Рисунок 9. График, отражающий масс-спектрометрические данные, полученные при идентификации в системе VITEK® MS штамма *Bacillus subtilis* TA-8

На рисунке 10, показан график масс-спектра бактерии штамма *Serratia plymuthica* TV-4.

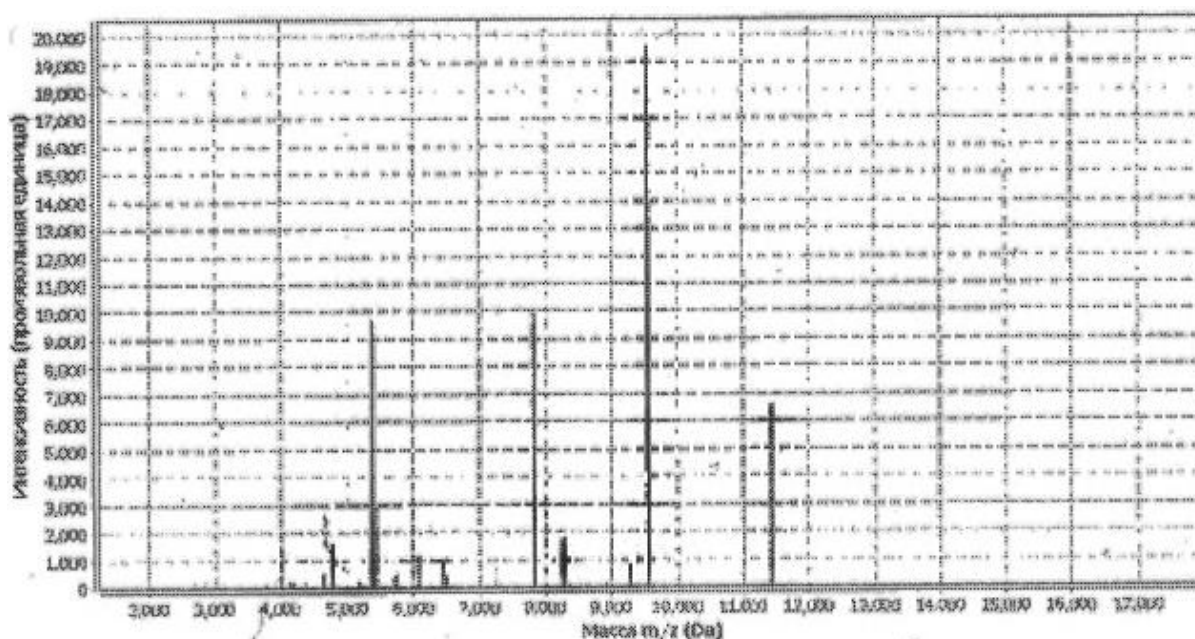


Рисунок 10. График, отражающий масс-спектрометрические данные, полученные при идентификации в системе VITEK® MS штамма *Serratia plymuthica* TV-4

Полученные результаты идентификации бактерий позволили отнести изучаемые штаммы к роду *Bacillus*, а именно: *Bacillus cereus* DG-1, *Bacillus cereus* DG-5, *Bacillus cereus* DG-6, *Bacillus cereus* DG-7, *Bacillus subtilis* TA-3, *Bacillus subtilis* TA-8.

Вместе с тем в ходе работ определение одного из образцов оказалось невозможным. Анализ характера MALDI TOF графика этого образца позволил предположить, что он содержит несколько штаммов. Поэтому он был обозначен, как консорциум штаммов VM-2.

Для дальнейшего исследования эмульгирующей способности штаммов *Bacillus altitudinis* API-2019, *Bacillus cereus* DG-1, *Bacillus cereus* DG-5, *Bacillus cereus* DG-6, *Bacillus cereus* DG-7, *Bacillus subtilis* TA-3, *Bacillus subtilis* TA-8 и

*Serratia plymuthica* TV-4 была использована методика Купера и Голденберга (1987).

В ходе экспериментальной работы в пробирки вносили гексадекан и культуральную жидкость, полученную в ходе культивирования каждого из штаммов.

Содержимое пробирок перемешивали и анализировали спустя 24 ч.

Результаты сравнения взаимодействия воды с гексадеканом, служащего в качестве контроля, и взаимодействия гексадекана с культуральной жидкостью приведены на рисунках 11-19.

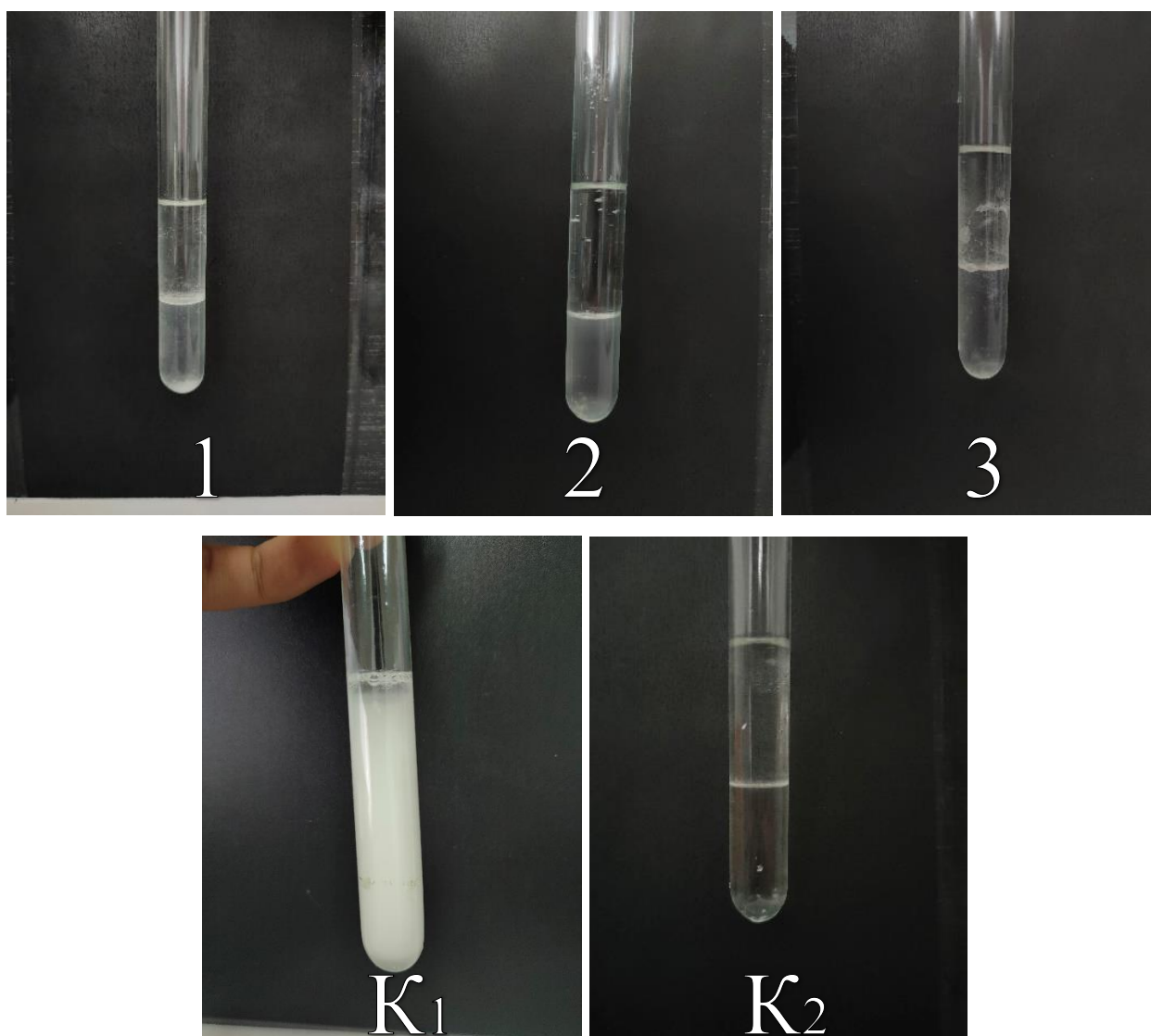


Рисунок 11. Исследование эмульгирующей способности штамма *Bacillus cereus* DG-1. Условные обозначения: образцы 1-3 – взаимодействие

культуральной жидкости штамма *Bacillus cereus* DG-1 с гексадеканом; образец K<sub>1</sub> – взаимодействие воды с гексадеканом (контроль). K<sub>2</sub> – взаимодействие воды и гексадекана спустя 24 ч. (контроль)

Средний индекс эмульгирования штамма *Bacillus cereus* DG-1, определенный по методике Купера и Голденберга (1987), составил 2.7%.

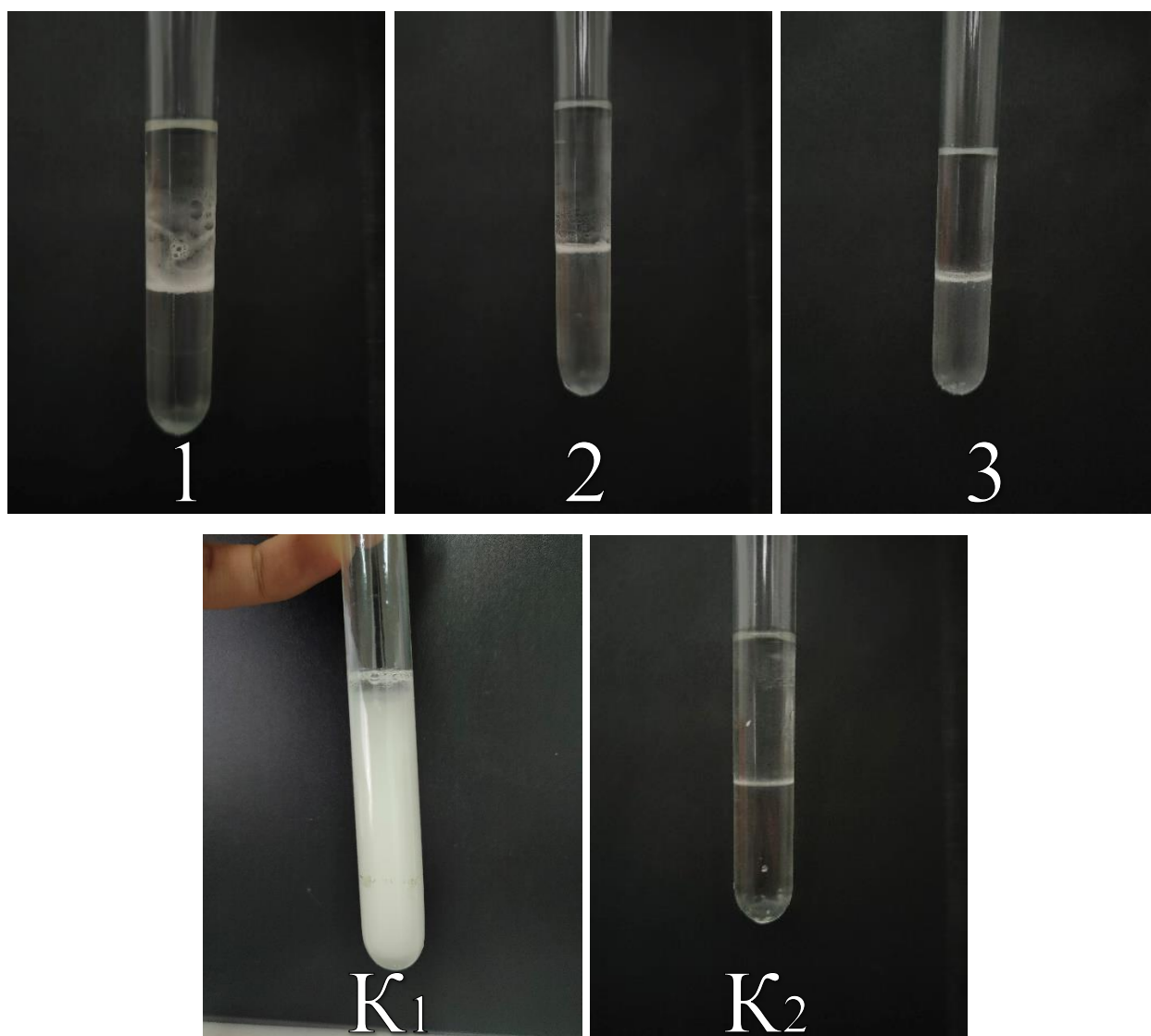


Рисунок 12. Исследование эмульгирующей способности штамма *Bacillus cereus* DG-5. Условные обозначения: образцы 1-3 – взаимодействие культуральной жидкости с гексадеканом; образец K<sub>1</sub> – взаимодействие воды с гексадеканом (контроль). K<sub>2</sub> – взаимодействие воды и гексадекана спустя 24 ч. (контроль)

Средний индекс эмульгирования штамма *Bacillus cereus* DG-5, определенный по методике Купера и Голденберга (1987), составил 2.7%.

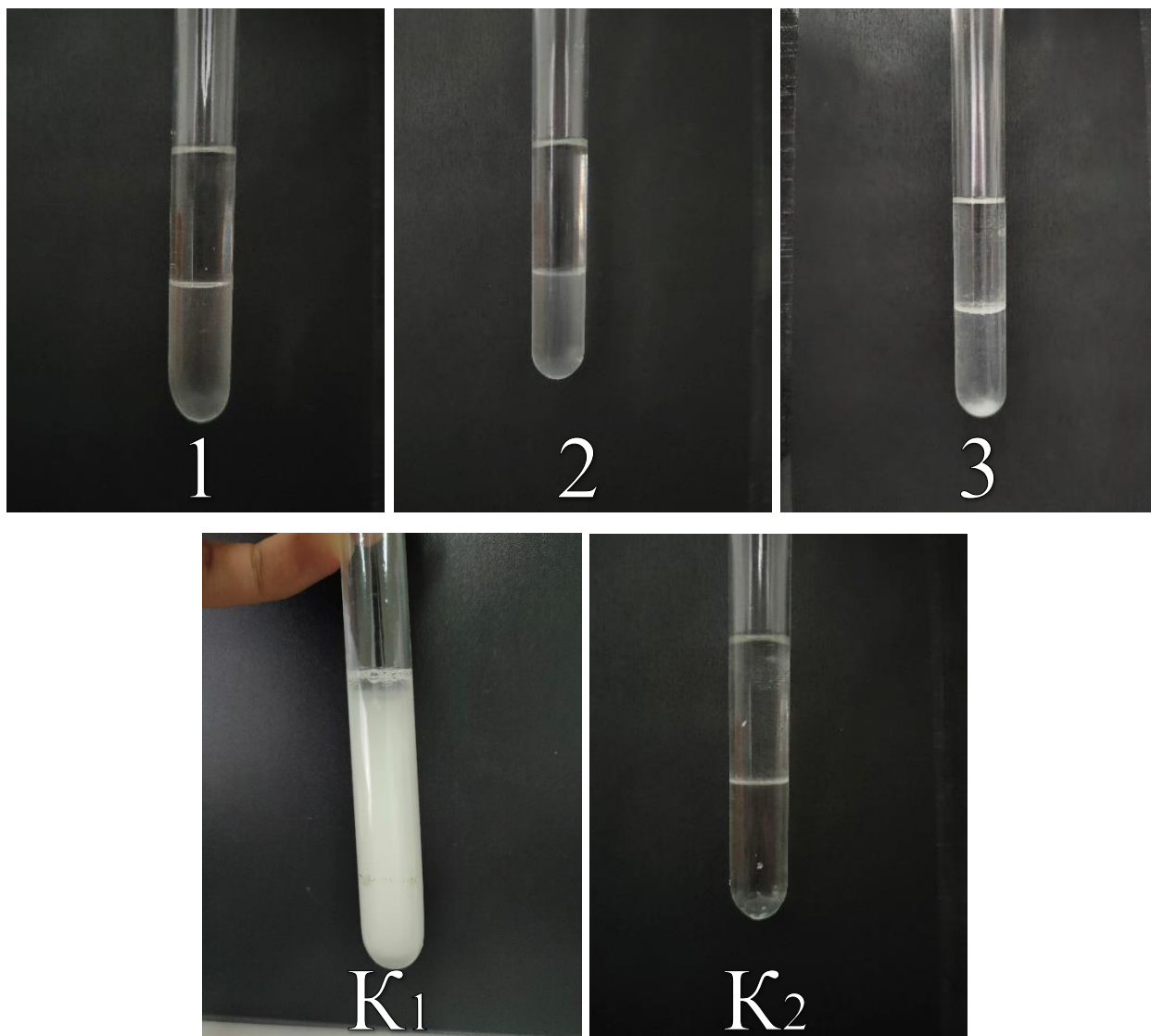


Рисунок 13. Исследование эмульгирующей способности штамма *Bacillus cereus* DG-6. Условные обозначения: образцы 1-3 – взаимодействие культуральной жидкости с гексадеканом; образец K<sub>1</sub> – взаимодействие воды с гексадеканом (контроль). K<sub>2</sub> – взаимодействие воды и гексадекана спустя 24 ч. (контроль)

Средний индекс эмульгирования штамма *Bacillus cereus* DG-6, определенный по методике Купера и Голденберга (1987), составил 0.5%.

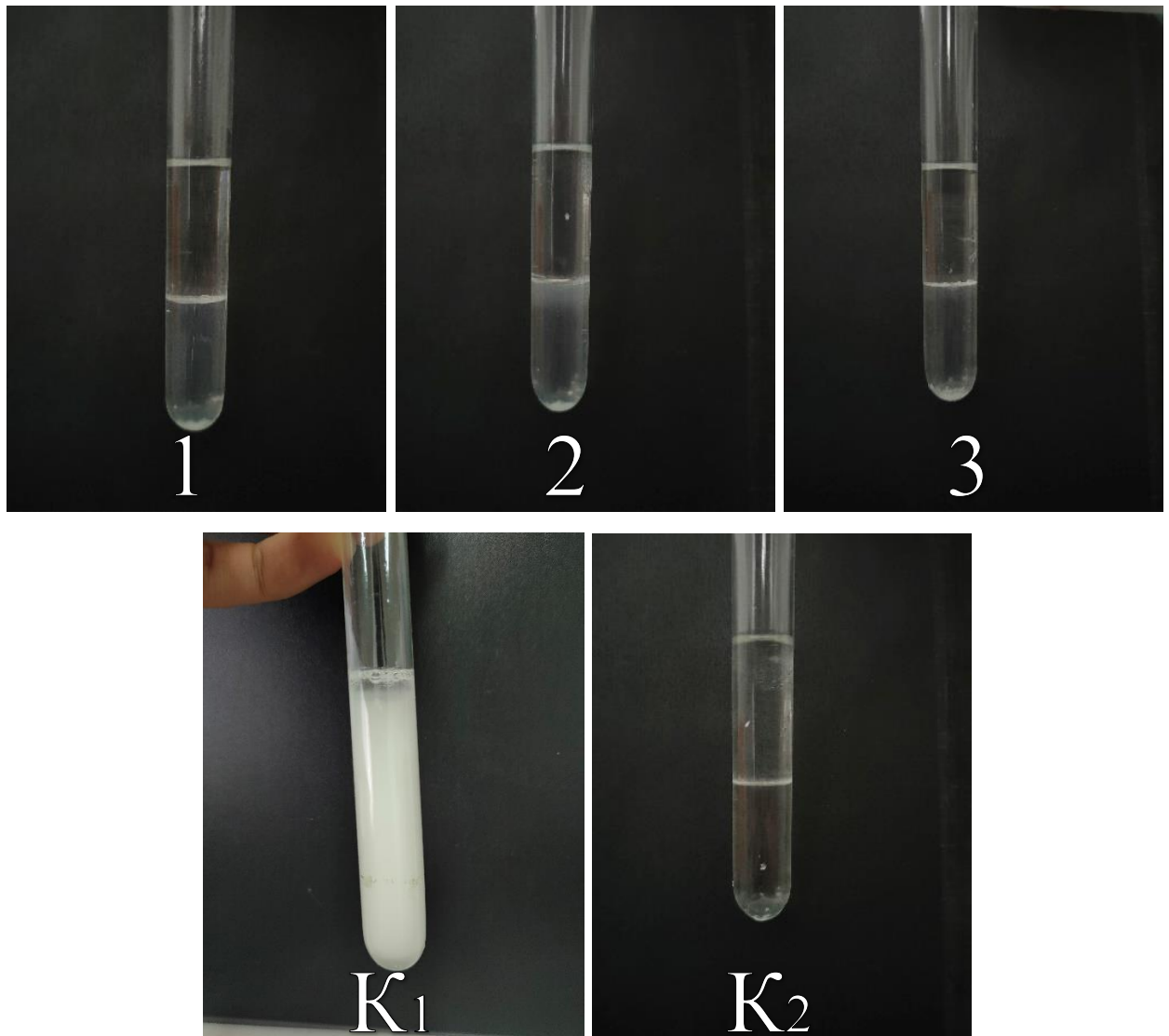


Рисунок 14. Исследование эмульгирующей способности штамма *Bacillus cereus* DG-7. Условные обозначения: образцы 1-3 – взаимодействие культуральной жидкости с гексадеканом; образец K<sub>1</sub> – взаимодействие воды с гексадеканом (контроль). K<sub>2</sub> – взаимодействие воды и гексадекана спустя 24 ч. (контроль)

Средний индекс эмульгирования штамма *Bacillus cereus* DG-7, определенный по методике Купера и Голденберга (1987), составил 0%.

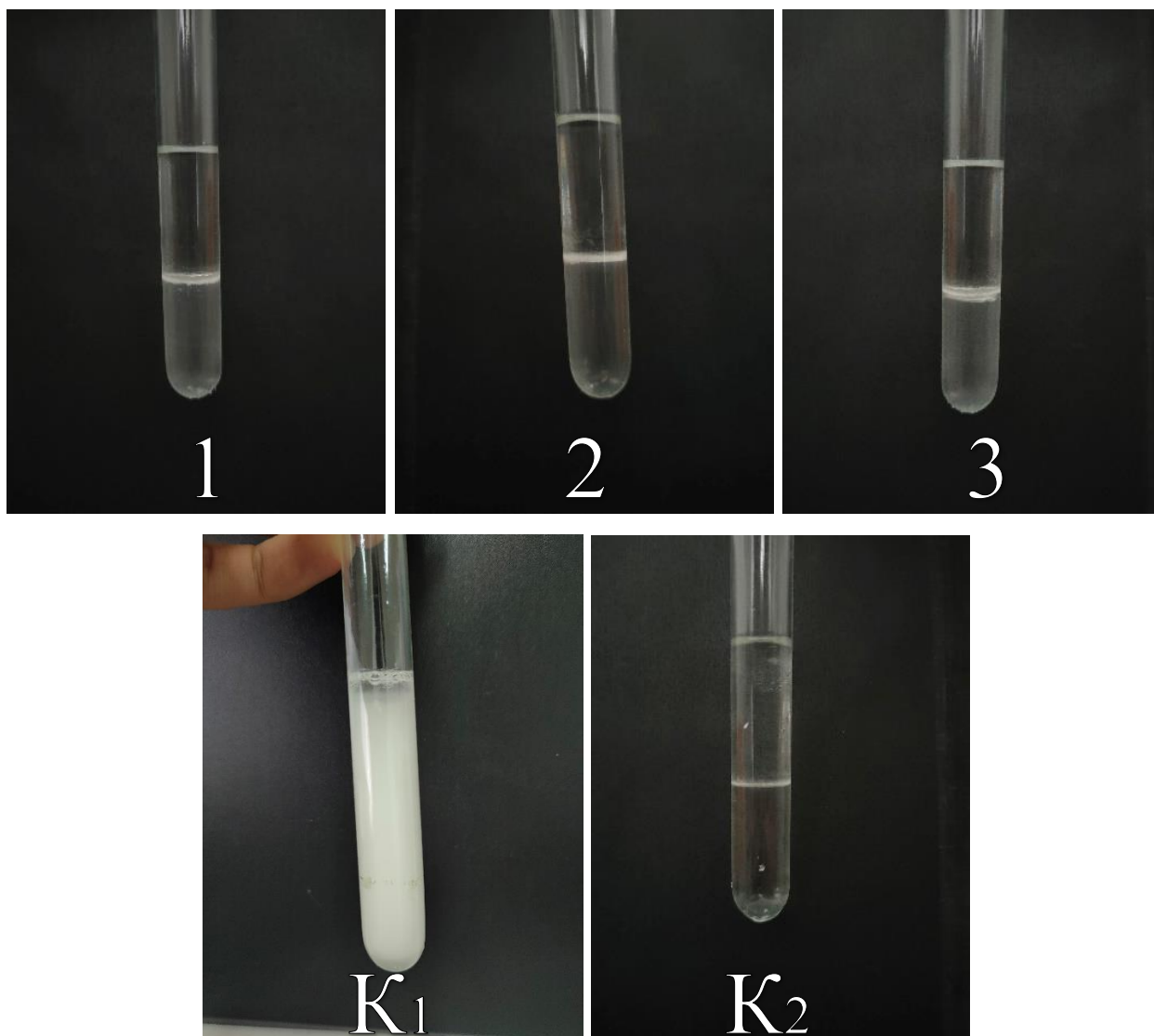


Рисунок 15. Исследование эмульгирующей способности штамма *Bacillus subtilis* TA-3. Условные обозначения: образцы 1-3 – взаимодействие культуральной жидкости с гексадеканом; образец K<sub>1</sub> – взаимодействие воды с гексадеканом (контроль). K<sub>2</sub> – взаимодействие воды и гексадекана спустя 24 ч. (контроль)

Средний индекс эмульгирования штамма *Bacillus subtilis* TA-3, определенный по методике Купера и Голденберга (1987), составил 4.27%.

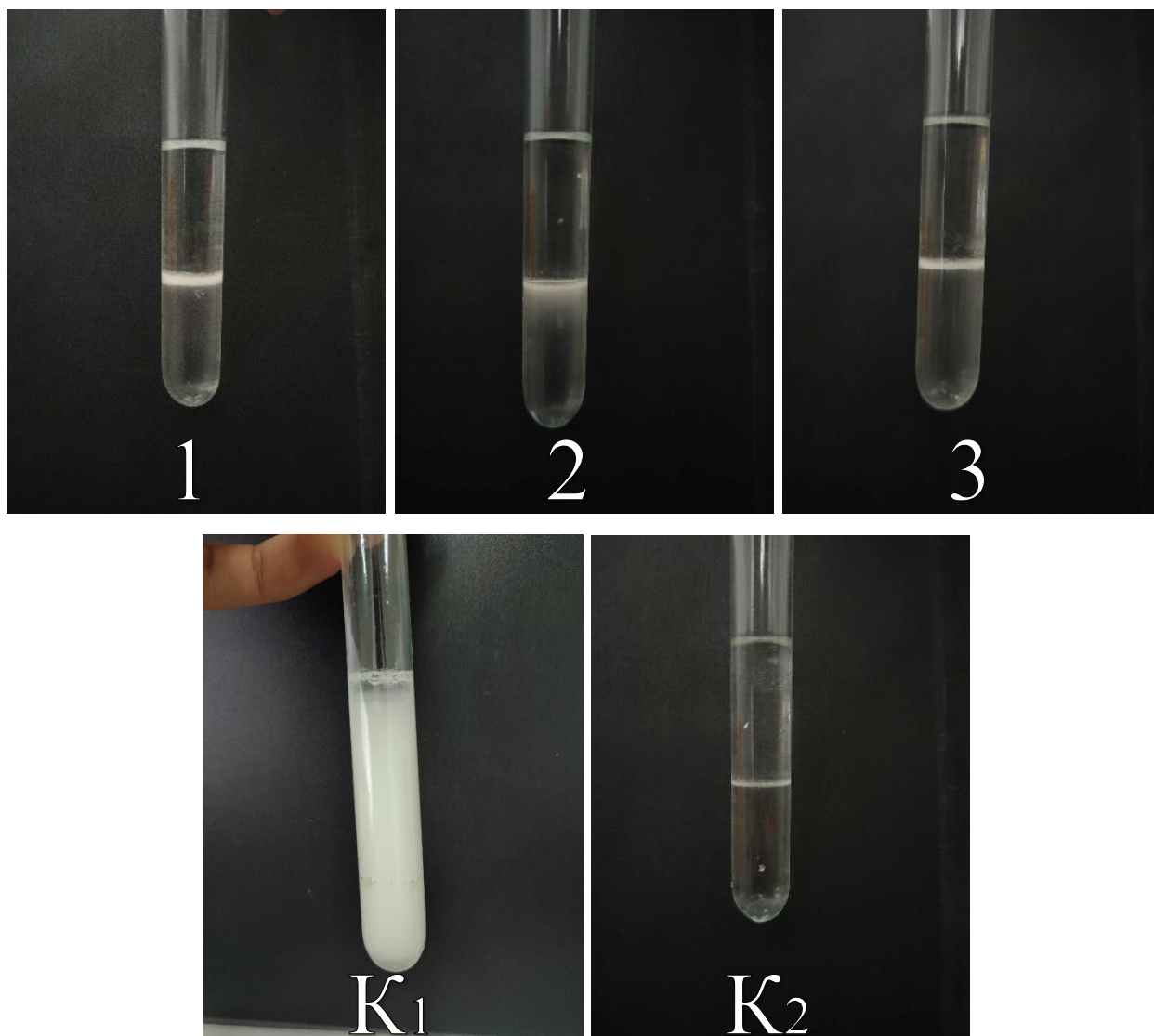


Рисунок 16. Исследование эмульгирующей способности штамма *Bacillus subtilis* TA-8. Условные обозначения: образцы 1-3 – взаимодействие культуральной жидкости с гексадеканом; образец K<sub>1</sub> – взаимодействие воды с гексадеканом (контроль). K<sub>2</sub> – взаимодействие воды и гексадекана спустя 24 ч. (контроль)

Средний индекс эмульгирования штамма *Bacillus subtilis* TA-8, определенный по методике Купера и Голденберга (1987), составил 2.03%.

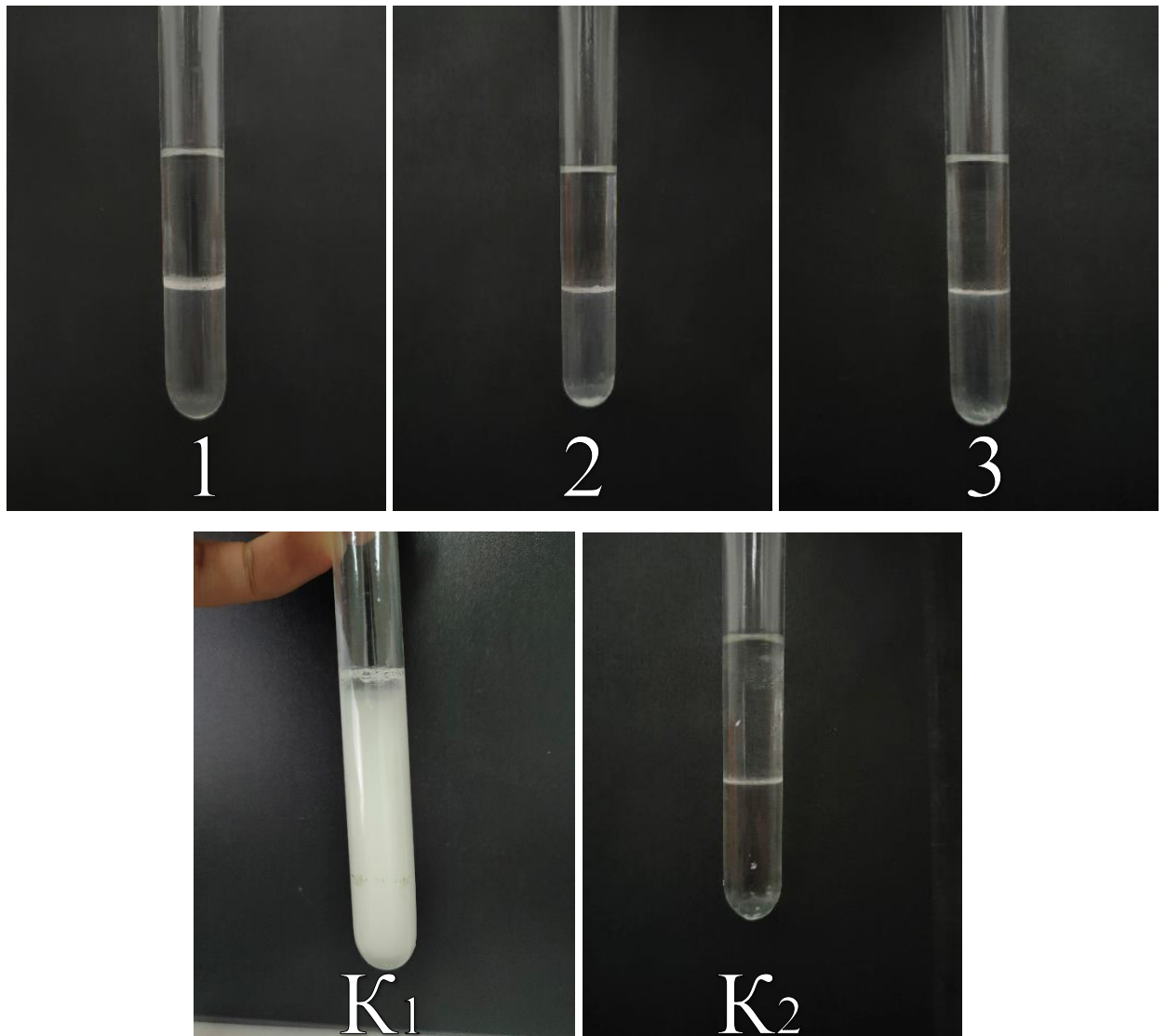


Рисунок 17. Исследование эмульгирующей способности штамма *Bacillus altitudinis* API-2019. Условные обозначения: образцы 1-3 – взаимодействие культуральной жидкости с гексадеканом; образец  $K_1$  – взаимодействие воды с гексадеканом (контроль).  $K_2$  – взаимодействие воды и гексадекана спустя 24 ч. (контроль)

Средний индекс эмульгирования штамма *Bacillus altitudinis* API-2019, определенный по методике Купера и Голденберга (1987), составил 2.03%.

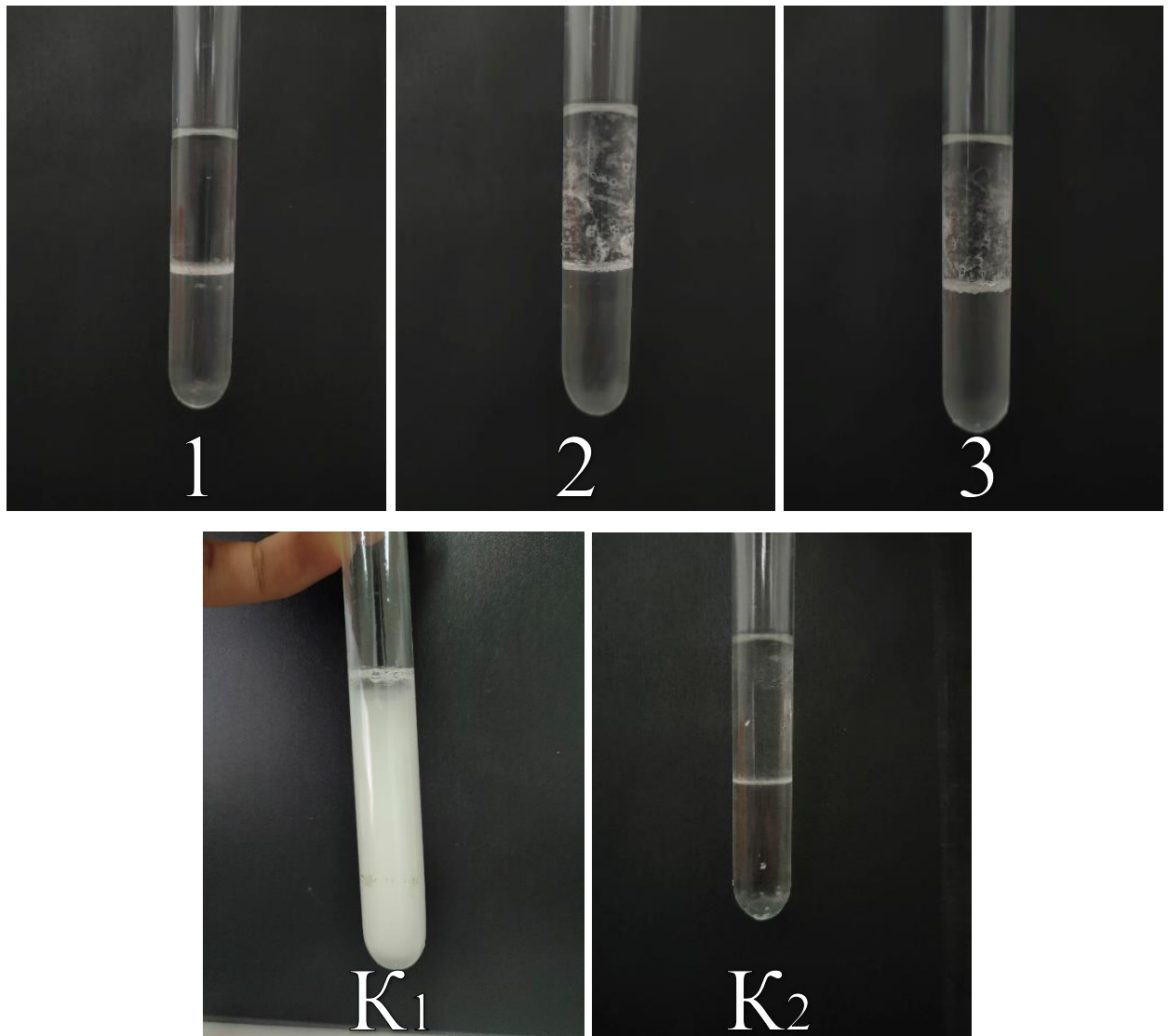


Рисунок 18. Исследование эмульгирующей способности штамма *Serratia plymuthica* TV-4. Условные обозначения: образцы 1-3 – взаимодействие культуральной жидкости с гексадеканом; образец K<sub>1</sub> – взаимодействие воды с гексадеканом (контроль). K<sub>2</sub> – взаимодействие воды и гексадекана спустя 24 ч. (контроль)

Средний индекс эмульгирования штамма *Serratia plymuthica* TV-4, определенный по методике Купера и Голденберга (1987), составил 2.03%.

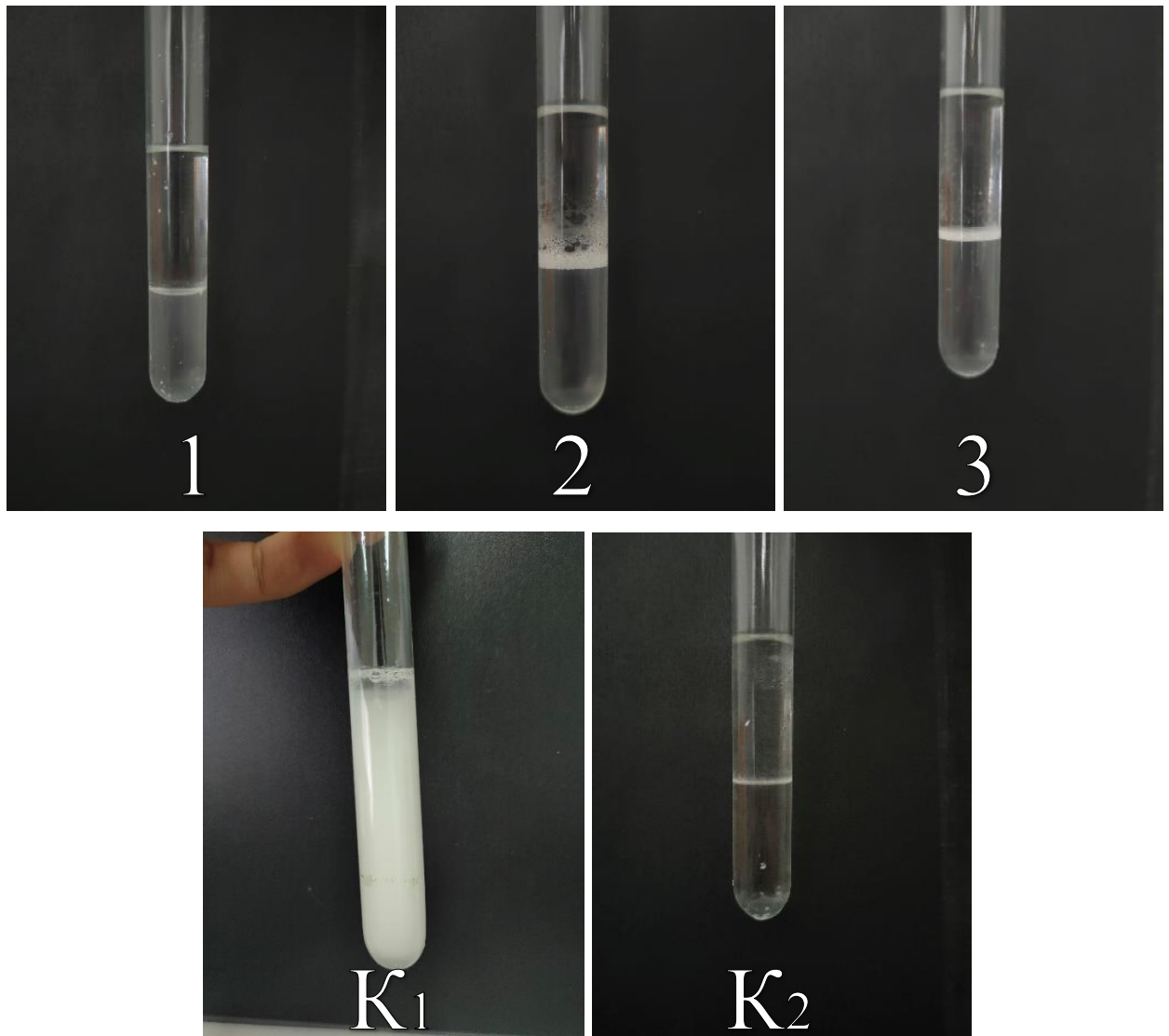


Рисунок 19. Исследование эмульгирующей способности консорциума штаммов *VM-2*. Условные обозначения: образцы 1-3 – взаимодействие культуральной жидкости с гексадеканом; образец  $K_1$  – взаимодействие воды с гексадеканом (контроль).  $K_2$  – взаимодействие воды и гексадекана спустя 24 ч. (контроль)

Средний индекс эмульгирования консорциума штаммов *VM-2*, определенный по методике Купера и Голденберга (1987), составил 2.56%.

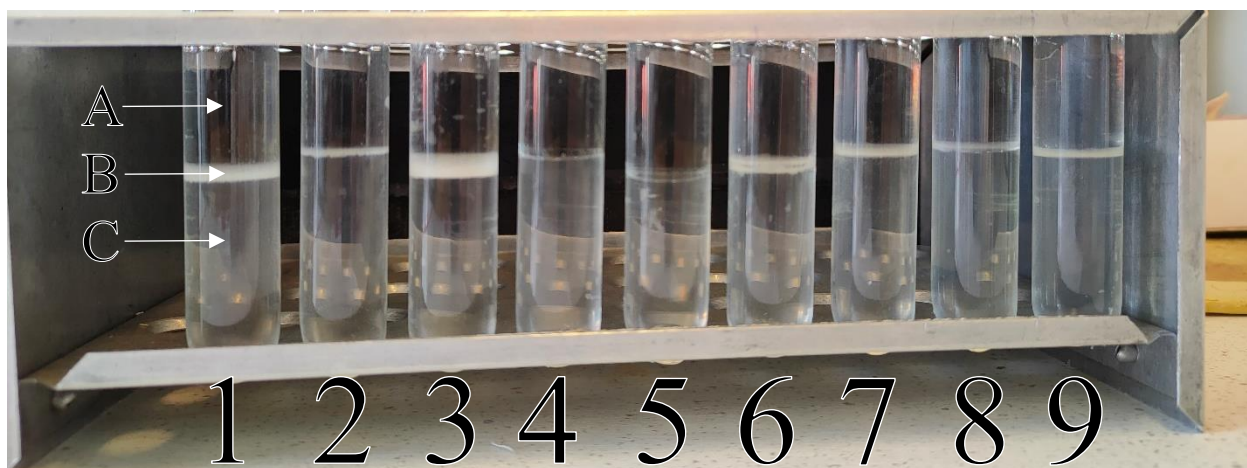


Рисунок 20. Результаты взаимодействия сурфактантов штаммов рода *Bacillus*, а именно *Bacillus subtilis* TA-3, *Bacillus cereus* DG-1 и *Bacillus altitudinis* API-2019 в опытах с гексадеканом. Условные обозначения: А – гексадекан; В – плотная эмульсия; С – культуральная жидкость; 1-3 – *Bacillus subtilis* TA-3; 4-6 – *Bacillus cereus* DG-1; 7-9 – *Bacillus altitudinis* API-2019

Полученные в ходе настоящего исследования сравнительные данные, приведенные выше, указывают на присутствие эмульсификатора(ов) в культуральной жидкости *Bacillus altitudinis* API-2019, *Bacillus cereus* DG-1, *Bacillus cereus* DG-5, *Bacillus cereus* DG-6, *Bacillus cereus* DG-7, *Bacillus subtilis* TA-3, *Bacillus subtilis* TA-8 и *Serratia plymuthica* TV-4.

Исходя из полученных экспериментальных данных можно сделать вывод о том, что полученные в данном исследовании характеристики эмульгирующей активности вновь выделенного из помёта медоносной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. штамма *Bacillus altitudinis* API-2019 соизмеримы с эмульгирующей способностью других штаммов рода *Bacillus* и могут определить его практическое значение как продуцента биосурфактантов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Выводы.

1. Установлено, что индекс эмульгирующей активности штамма *B. altitudinis* API-2019 составляет 2.03%;
2. Показано, что индекс эмульгирующей активности культур группы *B. cereus* составляет 2.53%;
3. Индекс эмульгирующей активности культур группы *B. subtilis* варьирует в пределах 2.03-4.27%;
4. Эмульгирующая способность вновь выделенного из помёта медоносной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. штамма *Bacillus altitudinis* API-2019 соизмерима с эмульгирующей способностью других представителей рода *Bacillus*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамзон А. А. Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, свойства, применение / А. А. Абрамзон, Л. П. Зайченко, С. И. Файнгольд. Л.: Химия, 1988. - 200 с.
2. Гринберг Т. А. Биополимеры, используемые для увеличения нефтеотдачи пластов / Т. А. Гринберг, Т. П. Пирог, А. М. Полищук, Н. В. Краснопевцева // Микробиол. журн. 1990. - Т. 52. №2.-С. 100-112.
3. Елисеев С. А. Поверхностно-активные вещества и биотехнология / С. А. Елисеев, Р. В. Кучер. Киев: Наук, думка, 1991. - 116 с.
4. Ившина И. Б. Бактерии рода *Rhodococcus* (иммунодиагностика, детекция, биоразнообразие)/Дис. .докт. биол. наук. / И. Б. Ившина. Пермь, 1997. - 197 с.
5. Квасников Е. И. Микроорганизмы деструкторы нефти в водных бассейнах / Е. И. Квасников, Т. М. Ключникова - Киев: Наук, думка, 1981.-131 с.
6. Кислухина О. В. Определение способности микроорганизмов диспергировать нефтепродукты / О. В. Кислухина, О. Ж. Хамроев, Г. Н. Морщакова, М. Б. Биттеева // Экология. 1993. - № 3. -С. 81-84.
7. Кондрашенко В. М. Препарат для очистки воды и почвы от нефти и нефтепродуктов / В. М. Кондратенко, В. П. Холоденко, И. А. Дунайцев, З. М. Ермоленко, В. А. Чугунов, И. И. Мартовецкая, Р. И. Миронова, Н. А. Жиркова // Патент РФ № 2191753 от 27.10.2002.
8. Коронелли Т. В. Поверхностно-активные свойства некоторых штаммов углеводородокисляющих бактерий / Т. В. Коронелли, С. Г. Юферова // Вестн. Моск. ун-та. Серия 16. Биология. 1990. № 1.- С.14-18.
9. Ланге К. Поверхностно-активные вещества: синтез, свойства, анализ, применение / К. Ланге. М.: Высш. школа, 2004. - 240 с.

10. Позмогова И. Н. Возможные пути окисления жидких н-алканов микроорганизмами / И. Н. Позмогова //Успехи микробиол. 1968. -Вып. 5. - С. 62-89.
11. Alcântara, R.; Amores, J.; Canoira, L.; Fidalgo, E.; Franco, M.J.; Navarro, A. Catalytic production of biodiesel from soy-hean oil, used frying oil and tallow. *Biomass Bioenergy* 2000, 18, 515–527. [CrossRef].
12. Aparna, A.; Srinikethan, G.; Hedge, S. Effect of addition of biosurfactant produced by *Pseudomonas* ssp. on biodegradation of crude oil. In *International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental Engineering, Proceedings of the 2nd International Proceedings of Chemical*, Singapore, Singapore, 26–28 February 2011; Volume 6, pp. 71–75.
13. Austad, T.; Taugbøl, K. Chemical flooding of oil reservoirs 1 Low tension polymer flood using a polymer gradient in the three-phase region. *Coll. Surf. A Phys. Eng. Asp.* 1995, 101, 87–97. [CrossRef].
14. Bai, G.; Brusseau, M.L.; Miller, R.M. Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. *J. Contam. Hydrol.* 1997, 25, 157–170. [CrossRef].
15. Banat I.M., Thavasi R. (Eds.) *Microbial Biosurfactants and Their Environmental and Industrial Applications*. Boca Raton, Fla., CRC Press, 2019. 372 p.
16. Banat, I.M.; Franzetti, A.; Gandolfi, I.; Bestetti, G.; Martinotti, M.G.; Fracchia, L.; Smyth, T.J.; Marchant, R. Microbial biosurfactants production, applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 87, 427–444. [CrossRef] [PubMed].
17. Banat, I.M.; Satpute, S.K.; Cameotra, S.S.; Patil, R.; Nyayanit, N. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Front. Microbiol.* 2014, 5 [CrossRef] [PubMed].
18. Barros, F.F.C.; Quadros, C.P.; Maróstica, M.R.; Pastore, G.M. *Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos*. *Quím. Nova* 2007, 30, 1–14. [CrossRef].

19. Batista, R.M.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Souza, J.E.G.; Sarubbo, L.A. Effect of Medium components on the production of a biosurfactant from *Candida tropicalis* applied to the removal of hydrophobic contaminants in soil. *Water Environ. Res.* 2010, 82, 418–425. [CrossRef] [PubMed].
20. Biosurfactants Market: By Type; by Application and by Geography – Forecast 2016–2021. – IndustryARC, 2018. – 165 p. – URL: <https://www.researchandmarkets.com/reports/4532369/biosurfactants-market-by-type-by-application#pos-5>.
21. Bognolo, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Coll. Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 1999, 152, 41–52. [CrossRef].
22. Borsanyiova M., Patil A., Mukherji R., Prabhune A., Bopegamage S. Biological activity of sophorolipids and their possible use as antiviral agents // *Folia Microbiol.* – 2016. – V. 61, No 1. – P. 85–89. – doi: 10.1007/s12223-015-0413-z.
23. Campos, J.M.; Stamford, T.L.M.; Sarubbo, L.A. Production of a Bioemulsifier with Potential Application in the Food Industry. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2014, 172, 3234–3252. [CrossRef] [PubMed].
24. Campos, J.M.; Stamford, T.L.M.; Sarubbo, L.A.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Banat, I.M. Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnol. Prog.* 2013, 29, 1097–1108. [CrossRef] [PubMed].
25. Cerqueira, V.S.; Hollenbach, E.B.; Maboni, F.; Vainstein, M.H.; Camargo, F.A.; do Carmo, M.; Peralba, R.; Bento, F.M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresour. Technol.* 2011, 102, 11003–11010. [CrossRef] [PubMed].
26. Chakraborty, J.; Das, S. Biosurfactant-based bioremediation of toxic metals. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 1st ed.; Das, S., Ed.; Elsevier: Rourkela Odisha, India, 2014; pp. 167–201.
27. Chandran P, Das N (2010) Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Int J Eng Sci Technol* 2: 6942-6953.

28. Cirigliano, M.C.; Carman, G.M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1985, 50, 846–850.
29. Cvengros, Z.; Cvengrosova, Z. Used fruing oils and fats and their utilization in the production of methyl ester of higher fatty acids. *Biomass Bioenergy* 2004, 27, 173–181. [CrossRef].
30. Das K, Mukherjee AK (2007) Crude petroleum-oil Biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from petroleum oil contaminated soil from north-east India. *Bioresource Technol* 98: 1339-1345.
31. Das U.N. Can bioactive lipids inactivate coronavirus (COVID-19)? // *Arch. Med. Res.* – 2020. – V. 51, No 3. – P. 282–286. – doi: 10.1016/j.arcmed.2020.03.004.
32. Das, P.; Mukherjee, S.; Sen, R. Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. *Coll. Surf. B Biointerfaces* 2009, 71, 183–186. [CrossRef] [PubMed].
33. Datta P., Tiwari P., Pandey L. M. (2018). Isolation and characterization of biosurfactant producing and oil degrading *Bacillus subtilis* MG495086 from formation water of Assam oil reservoir and its suitability for enhanced oil recovery. *Bioresour. Technol.* 270 439–448.
34. De Rienzo, M.A.; Banat, I.M.; Dolman, B.; Winterburn, J.; Martin, P.J. Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. *New Biotechnol.* 2015, 32, 720–726.
35. Deres K., Schild H., Wiesmüller K.H., Jung G., Rammensee H.G. In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine // *Nature.* – 1989. – V. 342, No 6249. – P. 561–564. – doi: 10.1038/342561a0.
36. Desai JD, Banat IM (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 47-64.

37. Deshpande, M.; Daniels, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. *Bioresour. Technol.* 1995, 54, 143–150. [CrossRef].
38. Dubey, K.V.; Juwarkar, A.A.; Singh, S.K. Adsorption-desorption process using woodbased activated carbon for recovery of biosurfactant from fermented distillery wastewater. *Biotechnol. Prog.* 2005, 21, 860–867. [CrossRef] [PubMed].
39. Dusane, D.H.; Nancharaiah, Y.V.; Zinjarde, S.S.; Venugopalan, V.P. Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. *Coll. Surf. B* 2010, 81, 242–248.
40. Edwards JR, Hayashi JA (1965) Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Biochem Biophys* 111: 415-421.
41. Efremenkova, O.; Gabrielyan, N.; Malanicheva, I.; Demiankova, M.; Efimenko, T.; Rogozhin, E.; Sharapchenko, S.; Krupenio, T.; Davydov, D.; Kornilov, M. Antimicrobial properties of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 534. *Int. Arch. Med. Microbiol.* 2019, 2, 119.].
42. Elshikh M., Moya-Ramírez I., Moens H., Roelants S., Soetaert W., Marchant R., Banat I.M. Rhamnolipids and lactonic sophorolipids: Natural antimicrobial surfactants for oral hygiene // *J. Appl. Microbiol.* – 2017. – V. 123, No 5. – P. 1111–1123. – doi: 10.1111/jam.13550.
43. Fenibo E.O., Ijoma G.N., Selvarajan R., Chikere C.B. Microbial surfactants: The next generation multifunctional biomolecules for applications in the petroleum industry and its associated environmental remediation. *Microorganisms*, 2019, vol. 7, no. 11, art. 581, p. 1–29. doi: 10.3390/microorganisms7110581.
44. Fidanza, M.R.; Caneva, G. Natural biocides for the conservation of stone cultural heritage: A review. *J. Cult. Herit.* 2019, 38, 271–286.
45. Fox, S.I.; Bala, G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresour. Technol.* 2000, 75, 235–240. [CrossRef].

46. Fracchia, L.; Banat, J.J.; Cavallo, M.; Ceresa, C.; Banat, I.M. Potential therapeutic applications of microbial surface-active compounds. *Bioengineering* 2015, 2, 144–162.
47. Franzetti, A.; Careda, P.; Ruggeri, C.; La Colla, P.; Tamburini, E.; Papacchini, M.; Bestetti, G. Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. *Chemosphere* 2009, 75, 810–807. [CrossRef] [PubMed].
48. Garoff H., Hewson R., Opstelten D.-J.E. Virus maturation by budding // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1998. – V. 62, No 4. – P. 1171–1190. – doi: 10.1128/MMBR.62.4.1171- 1190.1998.
49. Gautam KK, Tyagi VK (2006) Microbial surfactants: A review. *J Oleo Sci* 55: 155-166.
50. Geetha S.J., Banat I.M., Joshi S.J. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 2018, vol. 14, pp. 23–32. doi: 10.1016/j.bcab.2018.01.010.
51. Gharaei-Fathabad E (2011) Biosurfactants in pharmaceutical industry: A minireview. *Am J Drug Dis Dev* 1: 58-69.
52. Gudiña E.J., Rangarajan V., Sen R., Rodrigues L.R. Potential therapeutic applications of biosurfactants // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2013. – V. 34, No 12. – P. 667–675. – doi: 10.1016/j.tips.2013.10.002.
53. Guerra-Santos LH, Kappeli O, Fiechter A (1984) *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl Environ Microbiol* 48: 301-305.
54. Gundewadi G., Sarkar D.J., Rudra S.G., Singh D. Preparation of basil oil nanoemulsion using *Sapindus mukorossi* pericarp extract: Physico-chemical properties and antifungal activity against food spoilage pathogens // *Ind. Crops Prod.* – 2018. – V. 125. – P. 95– 104. – doi: 10.1016/j.indcrop.2018.08.076.
55. Gusmão, C.A.B.; Rufino, R.D.; Sarubbo, L.A. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP 1002

cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 26, 1683–1692. [CrossRef].

56. Haba, E.; Espuny, M.J.; Busquets, M.; Manresa, A. Screening and production of rhamnolipids *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste flying oils. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 88, 379–387. [CrossRef] [PubMed].

57. Hardin R., Pierre J., Schulze R., Mueller C.M., Fu S.L., Wallner S.R., Stanek A., Shah V., Gross R.A., Weedon J., Nowakowski M., Zenilman M.E., Bluth M.H. Sophorolipids improve sepsis survival: Effects of dosing and derivatives // *J. Surg. Res.* – 2007. – V. 142, No 2. – P. 314–319. – doi: 10.1016/j.jss.2007.04.025.

58. Haritash, A.K.; Kaushik, C.P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* 2009, 169, 1–15. [CrossRef] [PubMed].

59. Hatha AAM, Edward G, Rahman KSMP (2007) Microbial biosurfactants Review. *J Mar Atmos Res* 3: 1-17.

60. Hazra, C.; Kundu, D.; Chaudhari, A. Biosurfactant-assisted bioaugmentation in bioremediation. In *Microorganisms in Environmental Management: Microbes and Environment*, 1st ed.; Satyanarayana, T., Johri, B.N., Prakash, A., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2012; pp. 631–664.

61. Herman, D.C.; Artiola, J.F.; Miller, R.M. Removal of cadmium, lead and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. *Environ. Sci. Technol.* 1995, 29, 2280–2285. [CrossRef] [PubMed].

62. Hommel, R.K.; Huse, K. Regulation of sophorose lipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. *Biotechnol. Lett.* 1993, 15, 853–858. [CrossRef].

63. Jayaraman, A.; Hallock, P.J.; Carson, R.M.; Lee, C.C.; Mansfeld, F.B.; Wood, T.K. Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms on steel with antimicrobial peptides generated In Situ. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, 52, 267–275.

64. Jemil N., Ayed H.B., Manresa A., Nasri M., Hmidet N. Antioxidant properties, antimicrobial and anti-adhesive activities of DCS1 lipopeptides from

*Bacillus methylotrophicus* DCS1 // BMC Microbiol. – 2017. – V. 17, No 1. – Art. 144, P. 1–11. – doi: 10.1186/s12866-017-1050-2.

65. Kachholz T, Schlingmann M (1987) Possible food and agricultural application of microbial surfactants: an assessment. In: Kosaric N, Cairns WL, Grey NCC, (eds.), *Biosurfactant and Biotechnology*, New York, Marcel Dekker Inc. pp: 183- 208.

66. Khan M.S., Singh B., Cameotra S. Biological applications of biosurfactants and strategies to potentiate commercial production // *Biosurfactants*. – Boca Raton, Fla.: CRC Press, 2014. – P. 269–294. – doi: 10.1201/b17599-16.

67. Kiran G.S., Selvin J., Manilal A., Sujith S. Biosurfactants as green stabilizers for the biological synthesis of nanoparticles // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2011. – V. 31, No 4. – P. 354– 364. – doi: 10.3109/07388551.2010.539971.

68. Kiran, G.S.; Sabu, A.; Selvin, J. Synthesis of silver nanoparticles by glycolipid biosurfactant produced from marine *Brevibacterium casei* MSA19. *J. Biotechnol.* 2010, 148, 221–225. [CrossRef] [PubMed].

69. Kitamoto, D.; Ikegami, T.; Suzuki, G.T.; Sasaki, A.; Takeyama, Y.; Idemoto, Y.; Koura, N.; Yanagishita, H. Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids by *Pseudozyma* (*Candida antarctica*). *Biotechnol. Lett.* 2001, 23, 1709–1714. [CrossRef].

70. Konishi M, Fukuoka T, Morita T, Imura T, Kitamoto D (2008) Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. *J Oleo Sci* 57: 359-369.

71. Kumar R., Das A.J. Rhamnolipid Biosurfactant. *Recent Trends in Production and Application*. Singapore, Springer, 2018. xv, 141 p. doi: 10.1007/978-981-13-1289-2.

72. Loleit M., Ihlenfeldt H.G., Brünjes J., Jung G., Müller B., Hoffmann P., Bessler W.G., Pierres M., Haas G. Synthetic peptides coupled to the lipotriptide P3CSS induce in vivo B and Thelper cell responses to HIV-1 reverse transcriptase // *Immunobiology*. – 1996. – V. 195, No 1. – P. 61–76. – doi: 10.1016/S0171-2985(96)80006-4.

73. Luna J.M., Rufino R.D., Sarubbo L.A., Rodrigues L.R.M., Teixeira J.A.C., de CamposTakaki G.M. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995 // *Curr. Microbiol.* – 2011. – V. 62, No 5. – P. 1527–1534. – doi: 10.1007/s00284-011-9889-1.
74. Ma C., Li F., Musharrafieh R.G., Wang J. Discovery of cyclosporine A and its analogs as broad-spectrum anti-influenza drugs with a high in vitro genetic barrier of drug resistance // *Antiviral Res.* – 2016. – V. 133. – P. 62–72. – doi: 10.1016/j.antiviral.2016.07.019.
75. Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 58, 428–434.
76. Makkar, R.S.; Cameotra, S.S.; Banat, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 1, 1–19. [CrossRef] [PubMed].
77. Maneerat, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2005, 27, 675–683.
78. Mao, X.; Jiang, R.; Xiao, W.; Yu, J. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. *J. Hazard. Mater.* 2015, 285, 419–435. [CrossRef] [PubMed].
79. Mireles, J.R.; Toguchi, A.; Harshey, R.M. *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm forming abilities: Surfactin inhibits biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2001, 183, 5848.
80. Mulligan, C.N.; Wang, S. Remediation of a heavy metal contaminated soil by a rhamnolipid foam. In *Geoenvironmental Engineering: Integrated Management of Groundwater and Contaminated Land*; Thomas Telford: London, UK, 2004; pp. 544–551.
81. Mulligan, C.N.; Yong, R.N.; Gibbs, B.F. Metal removal from contaminated soil and sediments by the biosurfactant surfactin. *Environ. Sci. Technol.* 1999, 33, 3812–3820. [CrossRef].

82. Nakanishi M., Inoh Y., Kitamoto D., Furuno T. Nano vectors with a biosurfactant for gene transfection and drug delivery // *J. Drug Delivery Sci. Technol.* – 2009. – V. 19, No 3. – P. 165–169. – doi: 10.1016/S1773-2247(09)50031-7.
83. Nash, J.; Traver, R.P.; Downey, D.C. Surfactant enhanced in situ soil washing. US.EPA HWERL: Edilsin, NJ, USA, 1987.
84. Nitschke M., Costa S.G.V.A.O. Biosurfactants in food industry // *Trends Food Sci. Technol.* – 2007. – V. 18, No 5. – P. 252–259. – doi: 10.1016/j.tifs.2007.01.002.
85. Nitschke M., Silva S.S.E. Recent food applications of microbial surfactants // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 2018. – V. 58, No 4. – P. 631–638. – doi: 10.1080/10408398.2016.1208635.
86. Nitschke, M.; Pastore, G.M. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. *Química Nova* 2002, 25, 772–776. [CrossRef].
87. Ochoa-Loza, F.J.; Noordman, W.H.; Janssen, D.B.; Brusseau, M.L.; Maier, R.M. Effect of clays, metal oxides, and organic matter on rhamnolipid biosurfactant sorption by soil. *Chemosphere* 2007, 66, 1634–1642. [CrossRef] [PubMed].
88. Ohadi M., Shahravan A., Dehghannoudeh N., Eslaminejad T., Banat I. M., Dehghannoudeh G. Potential use of microbial surfactant in microemulsion drug delivery system: A systematic review // *Drug Des., Dev. Ther.* – 2020. – V. 14. – P. 541–550. – doi: 10.2147/DDDT.S232325.
89. Pacwa-Plociniczak, M.; Plaza, G.A.; Piotrowska-Seget, Z.; Cameotra, S.S. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 13, 633–654. [CrossRef] [PubMed].
90. Palanisamy, P. Biosurfactant mediated synthesis of NiO nanorods. *Mater. Lett.* 2008, 62, 743–746. [CrossRef].
91. Rangarajan, V.; Sem, R. An inexpensive strategy for facilitated recovery of metals and fermentation products by foam fractionation process. *Coll. Surf. B Biointerfaces* 2013, 104, 99–106. [CrossRef] [PubMed].

92. Ribeiro B.G., Guerra J.M.C., Sarubbo L.A. Potential food application of a biosurfactant produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670 // *Front. Bioeng. Biotechnol.* – 2020. – V. 8. – Art. 434, P. 1–13. – doi: 10.3389/fbioe.2020.00434.
93. Rienzo, M.A.D.; Stevenson, P.; Marchant, R.; Banat, I.M. Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and –negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 2016, 363, fnv224.
94. Rodrigues L.R. Microbial surfactants: Fundamentals and applicability in the formulation of nano-sized drug delivery vectors // *J. Colloid Interface Sci.* – 2015. – V. 449. – P. 304– 316. – doi: 10.1016/j.jcis.2015.01.022.
95. Rodrigues, L.R.; Banat, I.M.; Teixeira, J.A.; Oliveira, R. Biosurfactants: Potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006, 57, 609–618. [CrossRef] [PubMed].
96. Rosa, C.F.C.; Freire, D.M.G.; Ferraz, E.C. Biosurfactant microfoam: Application in the removal of pollutants from soil. *J. Environ. Chem. Eng.* 2015, 3, 89–94. [CrossRef].
97. Rosas-Galván, N.S.; Martínez-Morales, F.; Marquina-Bahena, S.; Tinoco-Valencia, R.; Serrano-Carreón, L.; Bertrand, B.; LeónRodríguez, R.; Guzmán-Aparicio, J.; Alvaréz-Berber, L.; Trejo-Hernández, M.D.R. Improved production, purification, and characterization of biosurfactants produced by *Serratia marcescens* SM3 and its isogenic SMRG-5 strain. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2018, 65, 690–700. [CrossRef].
98. Rufino R.D., Luna J.M., Sarubbo L.A., Rodrigues L.R.M., Teixeira J.A.C., CamposTakaki G.M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988 // *Colloids Surf., B.* – 2011. – V. 84, No 1. – P. 1–5. – doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.10.045.
99. Sabatini, D.A.; Harwell, J.H.; Knox, R.C. Surfactant selection criteria for enhanced subsurface remediation. In *Innovative Subsurface Remediation*; Brusseau, M.L., Sabatini, D.A., Gierke, J.S., Annable, M.D., Eds.; American Chemical Society: Washington, WA, USA, 1999; pp. 8–23.

100. Sabatini, D.A.; Knox, R.C.; Harwell, J.H.; Wu, B. Integrated design of surfactant enhanced DNAPL remediation: Efficient super solubilization and gradient systems. *J. Contam. Hydrol.* 2000, 45, 99–121. [CrossRef].
101. Santos, D.K.F.; Brandão, Y.B.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Salgueiro, A.A.; Santos, V.A.; Sarubbo, L.A. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Candida lipolytica*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2014, 3, 48–57. [CrossRef].
102. Santos, D.K.F.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Santos, V.A.; Salgueiro, A.A.; Sarubbo, L.A. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. *J. Pet. Sci. Eng.* 2013, 105, 43–50. [CrossRef].
103. Sathiyarayanan G., Kiran S.G., Selvin J. Synthesis of silver nanoparticles by polysaccharide bioflocculant produced from marine *Bacillus subtilis* MSBN17 // *Colloids Surf., B.* – 2013. – V. 102. – P. 13–20. – doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.07.032.
104. Shah V., Doncel G.F., Seyoum T., Eaton K.M., Zalenskaya I., Hagver R., Azim A., Gross R. Sophorolipids, microbial glycolipids with anti-human immunodeficiency virus and spermimmobilizing activities // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – V. 49, No 10. – P. 4093–4100. – doi: 10.1128/AAC.49.10.4093-4100.2005.
105. Silva, M.; Rosado, T.; Teixeira, D.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Production of green biocides for cultural heritage. Novel biotechnological solutions. *Int. J. Conserv. Sci.* 2015, 6, 519–530.
106. Silva, M.; Rosado, T.; Teixeira, D.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Green mitigation strategy for cultural heritage: Bacterial potential for biocide production. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2017, 24, 4871–4881.
107. Silva, M.; Vador, C.S.; Candeias, M.F.; Teixeira, D.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Toxicological assessment of novel green biocides for cultural heritage. *Int. J. Conserv. Sci.* 2016, 7, 265–272.

108. Silva, R.C.F.S.; Almeida, D.G.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Santos, V.A.; Sarubbo, L.A. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 12523–12542. [CrossRef] [PubMed].
109. Singh, A.; Van-Hamme, J.D.; Ward, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2 Application aspects. *Biotechnol. Adv.* 2007, 25, 99–121. [CrossRef] [PubMed].
110. Smith M.L., Gandolfi S., Coshall P.M., Rahman P.K.S.M. Biosurfactants: A Covid-19 perspective // *Front. Microbiol.* – 2020. – V. 11. – Art. 1341, P. 1–8. – doi: 10.3389/fmicb.2020.01341.
111. Sobrinho, H.B.S.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Porto, A.L.F.; Sarubbo, L.A. Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. *Electron. J. Biotechnol.* 2013, 16 [CrossRef].
112. Soffritti, I.; D’Accolti, M.; Lanzoni, L.; Volta, A.; Bisi, M.; Mazzacane, S.; Caselli, E. The potential use of microorganisms as restorative agents: An update. *Sustainability* 2019, 11, 3853.
113. Subramaniam M.D., Venkatesan D., Iyer M., Subbarayan S., Govindasami V., Roy A., NarayanasamyA., Kamalakannan S., Gopalakrishnan A.V., Thangarasu R., Kumar N.S., Vellingiri B. Biosurfactants and anti-inflammatory activity: A potential new approach towards COVID-19 // *Curr. Opin. Environ. Sci. Health.* – 2020. – V. 17. – P. 72–81. – doi: 10.1016/j.coesh.2020.09.002.
114. Tabassum K.N. Cyclosporin A production from *Tolipocladium inflatum* // *Gen. Med.: Open Access.* – 2017. – V. 5, No 4. – Art. 1000294, P. 1–3. – doi: 10.4172/2327-5146.1000294.
115. Takahashi M., Morita T., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D. Glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, show antioxidant and protective effects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in cultured human skin fibroblasts // *J. Oleo Sci.* – 2012. – V. 61, No 8. – P. 457–464. – doi: 10.5650/jos.61.457.

116. Tan, H.M. Biosurfactants and their roles in bioremediation. Cheong Jit Kong 2000, 1–12.
117. Tanawade O., Shangrapawar T., Bhosale A. Self-emulsifying drug delivery systems: An Overview // *Curr. Pharm. Res.* – 2020. – V. 10, No 2. – P. 3680–3693.
118. Tayeb H.H., Sainsbury F. Nanoemulsions in drug delivery: Formulation to medical application // *Nanomedicine.* – 2018. – V. 13, No 19. – P. 2507–2525. – doi: 10.2217/nnm2018-0088.
119. Thompson, D.N.; Fox, S.L.; Bala, G.A. Biosurfactants from potato process effluents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2000, 84, 917–930. [CrossRef].
120. Tokumoto, Y.; Nomura, N.; Uchiyama, H.; Imura, T.; Morita, T.; Fukuoka, T.; Kitamoto, D. Structural characterization and surface-active properties of a succinoyl trehalose lipid produce by *Rhodococcus* sp. SD-74. *J. Oleo Sci.* 2009, 58, 97–102. [CrossRef] [PubMed].
121. Van Hamme, J.D.; Singh, A.; Ward, O.P. Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 2006, 24, 604–620.
122. Velikonja, J.; Kosaric, N. Biosurfactants in food applications. In *Biosurfactants: Production, Properties, Applications*; Kosaric, N., Sukan, F.V., Eds.; CRC Press: New York, NY, USA, 1993; pp. 419–448.
123. Vijayakumar, S.; Saravanan, V. Biosurfactants-types, sources and applications. *Res. J. Microbiol.* 2015, 10, 181–192.
124. Wang Y., Nie M., Diwu Z., Lei Y., Li H., Bai X. Characterization of trehalose lipids produced by a unique environmental isolate bacterium *Rhodococcus qingshengii* strain FF // *J. Appl. Microbiol.* – 2019. – V. 127, No 5. – P. 1442–1453. – doi: 10.1111/jam.14390.
125. Weber, L.; Doge, C.; Haufe, G.; Hommel, R.; Kleber, H.-P. Oxygenation of hexadecane in the biosynthesis of cyclic glycolipids in *Torulopsis apicola*. *Biocatal* 1992, 5, 267–292. [CrossRef].

126. Weiskirchen R. Severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19): Does surfactant matter? // *Front. Microbiol.* – 2020. – V. 11. – Art. 1905, P. 1–5. – doi: 10.3389/fmicb.2020.01905.
127. Wen, J.; Stacey, S.P.; McLaughlin, M.J.; Kirby, J.K. Biodegradation of rhamnolipid, EDTA and citric acid in cadmium and zinc contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.* 2009, 41, 2214–2221. [CrossRef].
128. West, C.C.; Harwell, J.H. Surfactant and subsurface remediation. *Environ. Sci. Technol.* 1992, 26, 2324–2330. [CrossRef].
129. Wiesmüller K.-H., Jung G., Hess G. Novel low-molecular-weight synthetic vaccine against foot-and-mouth disease containing a potent B-cell and macrophage activator // *Vaccine.* – 1989. – V. 7, No 1. – P. 29–33. – doi: 10.1016/0264-410X(89)90007-8.
130. Xia W.-J., Dong H.-P., Yu L., Yu D.-F. Comparative study of biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of petroleum reservoir. *Colloids Surf., A.*, 2011, vol. 392, no. 1, pp. 124–130. doi: 10.1016/j.colsurfa.2011.09.044.
131. Zeraik A.E., Nitschke M. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: Effect of temperature and hydrophobicity // *Curr. Microbiol.* – 2010. – V. 61, No 6. – P. 554–559. – doi: 10.1007/s00284-010-9652-z.
132. Zuckerberg, A.; Diver, A.; Peeri, Z.; Gutnick, D.L.; Rosenberg, E. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Chemical and Physical Properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 1979, 37, 414–420. [CrossRef].
133. Zuo, R.; Ornek, D.; Syrett, B.C.; Green, R.M.; Hsu, C.-H.; Mansfeld, F.B.; Wood, T.K. Inhibiting mild steel corrosion from sulfate-reducing bacteria using antimicrobial-producing biofilms in Three-Mile-Island process water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2004, 64, 275–283.