

ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БИОПАВ

А.Асаматдинов – кандидат химических наук

Нукусский государственный педагогический институт имени Ажинияза

А.Курбанбаева – доктор химических наук

Институт общей и неорганической химии АН РУз

БИОПАВЛАРНИНГ ФИЗИК-КИМӒВИЙ ХОССАЛАРИНИ ӒРГАНИШ

А.Асаматдинов – кимӒ фанлари номзоди

АжиниӒз номидаги Нукус давлат педагогика институти

А.Курбанбаева – кимӒ фанлари доктори

ӒЗР ФА Умумий ва ноорганик кимӒ институти

STUDYING THE PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF BIOSAS

A.Asamatdinov – Candidate of Chemical Sciences

Nukus State Pedagogical Institute after named Ajiniyaz

A.Kurbanbayeva – Doctor of sciences in chemistry

Institute of General and Inorganic Chemistry of the Academy of Sciences of Uzbekistan

Таянч сўзлар: биосурфактантлар, микроорганизмлар, *Bacillus* sp., ковшоқлик, электр ўтказувчанлик.

Резюме. Гидрофил ва гидрофоб субстратларда ўстириш оркали олинган самарали биопрепаратлар продуктсиз бўлган *Bacillus* sp. микроорганизмининг физик-кимӒвий хусусиятлари ўрганилди. Глюкозада *Bacillus* sp. ўсганда хужайра мембранаси бактериялари билан боғлиқ эндо-биоПАВлар ҳосил бўлиши кўрсатилган. Шунингдек, олинган культураларнинг электр ўтказувчанлиги ва ковшоқлиги бўйича тадқиқотлар ўтказилди.

Ключевые слова: биосурфактанты, микроорганизмы, *Bacillus* sp., вязкость, электропроводность.

Резюме. Были изучены физико-химические свойства выявленного микроорганизма *Bacillus* sp., являющийся эффективным продуцентом биоПАВ, полученными при росте как на гидрофильных и на гидрофобных субстратах. Показано что при росте на глюкозе *Bacillus* sp. образуются эндо-биоПАВ, связанные с клеточной мембранной бактерией. А также проведены исследования по электропроводности и вязкости полученных культур.

Key words: biosurfactants, microorganisms, *Bacillus* sp., viscosity, electrical conductivity.

Summary. The physicochemical properties of the identified microorganism *Bacillus* sp., which is an effective producer of biologically active substances, obtained during growth on both hydrophilic and hydrophobic substrates, were studied. It has been shown that when *Bacillus* sp. grows on glucose, endo-bioSASs associated with cell membrane bacteria are formed. Studies have also been conducted on the electrical conductivity and viscosity of the obtained cultures.

Введение. Биосурфактанты (БиоПАВ) являются одним из многообещающих структур, которые относятся к классу амфифильных соединений, молекулы которых содержат гидрофильные и гидрофобные группы. Дифильность биосурфактантов обеспечивает высокие характеристики эмульгирующей способности, пенообразования и диспергируемости.

Они обладают многими уникальными свойствами, такими как низкая токсичность, высокая биоразлагаемость, хорошая экологичность, высокая пенообразование и высокая селективность. Эти преимущества позволяют биосурфактантам заменить химически синтезированные поверхностно-активные вещества (ПАВ), и они широко используются в пищевых продуктах, косметике, фармацевтике, в сельском хозяйстве и нефтехимической промышленности [1-3].

Микроорганизмы способны синтезировать и выделять в культуральную жидкость вещества, обладающие высокой биологической активностью. Поиск продуцентов новых эффективных биосурфактантов, изучение коллоидно-химических свойств этих соединений представляется актуальным.

Биоинженерия для пустынь — это междисциплинарный подход, сочетающий биологию, инженерию и экологию для борьбы с опустыниванием, стабилизации песков и восстановления экосистем в аридных зонах. В Узбекистане (особенно в Приаралье, Кызылкуме и Аралкуме) это особенно актуально: ежегодно поднимается до 150 млн тонн токсичной пыли, что приводит к деградации почв, проблемам со здоровьем и экономическим потерям. Биоинженерия предлагает устойчивые, экологичные альтернативы традиционным методам (механическим барьерам или

химическим полимерам), используя живые организмы, биоматериалы и генную инженерию для создания саморегулирующихся систем.

Для исследования были выбраны местные штаммы азотфиксирующих и фосформобилизующих бактерий, выделенные из ризосферы озимой пшеницы, хлопчатника, сахарной свеклы, люцерны [4].

Многие микроорганизмы, такие как бактерии, грибы и дрожжи, имеют способность производить биосурфактанты [4-7]. Биосурфактанты вырабатываемые микроорганизмами имеют широкое структурное разнообразие, включая гликолипиды, липопептиды, липопротеины, жирные кислоты, нейтральные липиды, фосфолипиды, полимерные и твердые частицы биосурфактанты [8].

ПАВ биологического происхождения – биосурфактант, имеет целый ряд преимуществ над синтетическими аналогами: низкие показатели токсичности и себестоимости, повышенную биологическую разрушаемость, высокую совместимость с природными соединениями, повышенное пенообразование, высокую селективность при экстремальных температурах, pH и повышенных концентрациях солей в почве, способность синтезироваться из пищевых отходов, высокую поверхностную активность, низкую ККМ [9].

Сырье для производства биосурфактантов. Объектом наших исследований выбран штамм *Bacillus sp.*, который характеризовался наиболее высокими показателями синтеза биоПАВ. Способность к синтезу биоПАВ оценивали по следующим показателям: поверхностное натяжение (σ) свободной от клеток культуральной жидкости, условная концентрация ПАВ, которую определяли для экспресс оценки количественного содержания биосурфактантов в культуральной жидкости. Липиды экстрагировали из культуральной жидкости этилацетатом.

Таким образом, штамм *Bacillus sp.*, проявлял сильную поверхностную активность, которая свойственна для биосурфактантов микробного происхождения. Кроме того, следует отметить, что способность к продукции биоПАВ характеризовалась стабильностью. Исследования физико-химических свойств, структуры и биологической активности биоПАВ, выделенных из *Bacillus sp.*, свидетельствуют о том, что он, в основном, содержит сурфактины.

Материалы и методы.

Культуральная среда и условия. Микроорганизмы *Bacillus sp* являющиеся эффективными

продуцентами биоПАВ, полученными при росте на гидрофильных (глюкоза) и на гидрофобных (подсолнечное масло) субстратах.

Вязкость сурфактантов. Вязкость биосурфактантов — это один из ключевых реологических параметров, который определяет их поведение в растворах, эмульсиях и применении (например, в нефтедобыче для снижения вязкости нефти, в стабилизации песков, косметике, очистке). Биосурфактанты (rhamnolipids, sophorolipids, surfactin, lipopeptides и др.) обычно имеют низкую вязкость в водных растворах по сравнению с синтетическими ПАВ, но она сильно зависит от концентрации, pH-среды, температуры, солёности и типа (мономерный/димерный, кислотная/лактонная форма).

Изучение электропроводности. Измерение электропроводности проводили на приборе Кондуктометр типа -104. Термостатирование ячейки в водном термостате. Удельная электропроводность равна $\kappa=10^{-8} \text{ ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. С начала биосурфактант нейтрализовали с NaOH (0,1н.) 0,02 мл +2 капли HCl pH=8,0. Приготовили растворы по 0,01% до 1,0%.

Химическая идентификация. Биосурфактанты были отделены и очищены по методике (Купер и др., 1981). ИК-спектроскопия с Фурье-преобразованием биосурфактантов регистрировали на спектрометре 113B, Bruker, Германия, методом гранул KBr. Около 2 мг высушенный сырой биосурфактант измельчали с 200 мг KBr до образуют очень тонкий порошок. Этот порошок был затем сжат в тонкий шарик, который был проанализирован с помощью ИК-спектроскопии в диапазоне 4000-400 см^{-1} .

Результаты и обсуждение.

Электропроводность водных растворов биоПАВ. Критическая концентрация мицеллообразования ККМ характеризует одно из важнейших свойств поверхностно-активных веществ образование мицеллярных растворов. Значение ККМ характеризует равновесия ассоциации молекул ПАВ в растворе. Поэтому исследование ККМ важно как для технологических целей так и коллоидно-химического изучения структуры раствора. ККМ измеряли кондуктометрическим методом, результаты приведены в таблице №1.

Изучение поверхностно-активных свойств, а именно ККМ, липидных биоПАВ дало возможность установить следующие значения ККМ: 20, 100 и 100мг/л для биоПАВ и сурфактина соответственно. В то же время значение σ составили 31,5; 32,0 мН/м соответственно.

Таблица 1. Зависимость электропроводности (æ) биоПАВ от температуры

№ п/п	Концентрация, %	298°K, æ, ом ⁻¹ ·см ⁻¹	303°K, æ, ом ⁻¹ ·см ⁻¹	313°K, æ, ом ⁻¹ ·см ⁻¹	323°K, æ, ом ⁻¹ ·см ⁻¹	pH-среды растворов
1	0,01	4,10·10 ⁻⁵	4,90·10 ⁻⁵	6,00·10 ⁻⁵	7,00·10 ⁻⁵	5,00
2	0,025	9,10·10 ⁻⁵	10,90·10 ⁻⁵	13,00·10 ⁻⁴	14,50·10 ⁻⁴	6,00
3	0,05	17,10·10 ⁻⁴	19,20·10 ⁻⁴	21,20·10 ⁻⁴	25,10·10 ⁻⁴	6,50
4	0,1	3,59·10 ⁻⁴	4,19·10 ⁻⁴	4,80·10 ⁻⁴	5,39·10 ⁻⁴	6,75
5	0,25	7,86·10 ⁻³	8,99·10 ⁻³	10,99·10 ⁻³	12,99·10 ⁻³	7,00
6	0,5	14,99·10 ⁻³	19,50·10 ⁻³	19,99·10 ⁻³	21,00·10 ⁻³	7,50
7	1,0	29,40·10 ⁻³	68,98·10 ⁻³	70,50·10 ⁻³	75,00·10 ⁻³	8,00

Влияние биоПАВ на вязкость. Мы определили вязкость водных растворов биоПАВ при различных концентрациях раствора (0,010, 0,025, 0,5, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0). При изучении вязкости как видно из таблицы удельная вязкость показывает отрицательные результаты. Активно и согласованно двигающиеся бактерии могут придать жидкости невозможную в других случаях отрицательную вязкость. К такому выводу пришли французские ученые физики, которые теоретически изучили свойства жидкости в присутствии таких бактерий. В ходе работы ученые также смогли описать уже наблюдавшийся случай падения вязкости до нуля – как у сверхтекучих жидкостей [16].

Таблица 2. Вязкость водных растворов биоПАВ при температуре 298°K

№ п/п	Концентрация, %	η _{отн.}	η _{уд.}	pH-среды растворов
1	0,01	0,9169	-0,0831	5,00
2	0,025	0,9211	-0,0789	6,00
3	0,05	0,8811	-0,1189	6,50
4	0,1	0,8559	-0,1441	6,75
5	0,25	0,8549	-0,1451	7,00
6	0,5	0,8612	-0,1388	7,50
7	1,0	1,0242	0,0242	8,00

Таблица 3. Зависимости æ, σ, η и pH-среды растворов биоПАВ

№ п/п	Концентрация, %	η _{отн.}	298°K, æ, ом ⁻¹ ·см ⁻¹	σ, мН/м	pH-среды растворов
1	0,01	0,9169	4,10·10 ⁻⁵	37,97	5,00
2	0,025	0,9211	9,10·10 ⁻⁵	38,15	6,00
3	0,05	0,8811	17,10·10 ⁻⁴	40,63	6,50
4	0,1	0,8559	3,59·10 ⁻⁴	43,10	6,75
5	0,25	0,8549	7,86·10 ⁻³	38,14	7,00
6	0,5	0,8612	14,99·10 ⁻³	36,17	7,50
7	1,0	1,0242	29,40·10 ⁻³	34,18	8,00

Химическая характеристика биоПАВ. На рис. №1 представлен ИК-спектр биосурфактанта производства JA-1 в КВг. Видно, что характеристика полосы 3310 см⁻¹ (режим растяжения NH) и 1657 см⁻¹ (режим растяжения связи CO-N) относятся к пептидам. Полосы в 2,958-2,927 см⁻¹, 2,871-2,850 см⁻¹ и в 1,467 см⁻¹, 1402 см⁻¹ относятся к алифатическим цепям (-CH₃, -CH₂), и полоса, наблюдаемая при 1737 см⁻¹, соответствует карбонильная группа. Эти результаты предполагают, что биосурфактант содержит алифатические углеводороды и карбонильные фрагменты.

Из литературных источников известно, что выбранные штаммы способны продуцировать биосурфактанты – гликолипиды [17]. Поэтому полученные БиоПАВ были идентифицированы методик ИК-спектроскопии.

На ИК-спектрах обнаружены следующие полосы поглощения колебаний амидной группы причастоте 1565 и 1673 см⁻¹, эфирной связи при 1780 см⁻¹. Полосы поглощения в области 2850–400 см⁻¹ отнесены к колебанием -CH₂-CH₂-, а также ассоциированной жирнокислотной OH-группы. Полосы поглощения при 1115–1200 см⁻¹ соответствуют колебанием группы —CH₂OH.

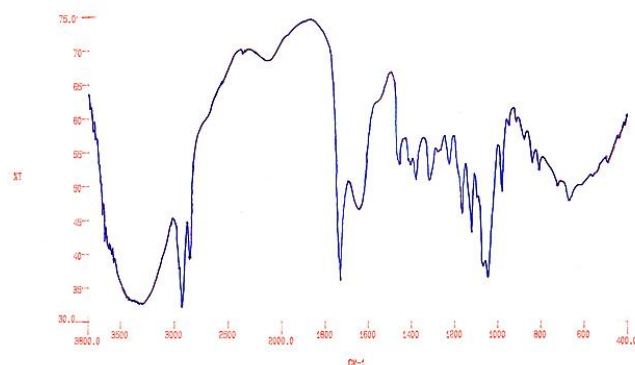


Рис.1. ИК-спектры полученного биоПАВ

Выводы. Полученные биоПАВы являются хорошими поверхностно-активными веществами, обладают привлекательными свойствами в качестве эмульгирующего соединения. БиоПАВы имеют несколько свойств и не зависят от температуры, pH-среды и концентрации хлорида натрия. Предварительный биохимический состав предполагает, что молекула является новым полимерным биоПАВ, включающим липиды (40%), углеводы (35,2%) и белки (20,3%). Эти характеристики являются желательными для промышленных процессов, поскольку они обладают рядом свойств, которые могут быть привлекательными, и являются сильнодействующим эмульгатором и поверхностно-активным соединением, которые полезны во многих областях промышленности. Они представляет собой многообещающий, простой и экономически

эффективный инструмент для обработки маслянистого шлама, образующегося при периодической очистке резервуаров для хранения нефти и в других отраслях народного хозяйства, и имеет другие области применения, когда необходимо увеличение вязкости.

Основные направления биоинженерии для пустынь. На основе последних исследований, биоинженерия фокусируется на микробах, растениях, биополимерах и интегративных технологиях. Вот ключевые методы:

Микробная стабилизация. Бактерии индуцируют образование карбоната кальция (CaCO_3), цементируя песчинки в прочную корку.

Механизм: Бактерии гидролизуют мочевины (urea), производя CO_3^{2-} , который реагирует с Ca^{2+} , заполняя поры (>90%) и создавая корку толщиной до 20 мм.

Эффективность: Снижает ветровую эрозию на 95%, повышает несущую способность до 300–350 кПа. В пустыне Такла-Макане (аналог Кызылкума) после 8 циклов обработки корка выдерживает сухо-влажные циклы с потерей <3%.

Применение в Узбекистане: Тестирование для Аралкума — экологичнее химических полимеров, совместимо с солончаками. Биоаугментация (введение бактерий) + биостимуляция (питательные добавки) оптимальны для масштаба.

Перспективы: Комбинация с ферментами (EICP — Enzyme-Induced Carbonate Precipitation) для ускорения. Проблемы: высокая стоимость, зависимость от влаги.

Биополимеры и биоматериалы Натуральные полимеры (ксантан, гуар, хитозан, альгинат) или из отходов (целлюлоза, лигнин) смешивают с песком для создания водоудерживающей матрицы.

Механизм: Биополимеры образуют плёнки/нити между зёрнами, повышая адгезию и снижая эрозию. Например, карбоксиметилцеллюлоза (СМС) превращает песок в "искусственную почву" с реологическими свойствами (мягкая при влаге, твёрдая в сухости).

Эффективность: Снижает потерю песка ветром на 80–95%, удерживает воду (до 300–500× своего веса), улучшает приживаемость растений. В экспериментах на 1,6 га песка в Китае (аналогично Аралкуму) выросли томаты и рис.

Применение: В Туркменистане тестируют биомассу + добавки для фиксации дюн с посадкой засухоустойчивых растений. В Узбекистане — комбинация с бентонитом для солончаковых песков.

Перспективы: Биоразлагаемые варианты (из макулатуры/агроотходов) — дешевы и устойчивы. Минусы: разложение за 2–5 лет, требует повторного нанесения.

Биокрусты и интегративные системы. Биологические корки (биокрусты) из цианобактерий, мхов, лишайников фиксируют поверхность.

Механизм: Микроорганизмы производят полисахариды, связывающие частицы. Интеграция с растениями и микробами создаёт саморегулирующиеся экосистемы.

Эффективность: Снижает эрозию на 70–90%, улучшает микроклимат. В пустынях Средней Азии (Каракумы) биокрусты + посадки — долговечны (10–30+ лет).

Применение: В Аралкуме — для солончаковых равнин. Комбинация с нанотехнологиями (жидкая наноглина LNC) превращает песок в плодородный субстрат.

Перспективы: Нанофлюидика для точного орошения, минимизируя солонизацию.

Преимущества и вызовы.

Плюсы: Экологичность (биоразлагаемый, низкий углеродный след), устойчивость (самовосстановление), экономия (дешевле бетона/полимеров в долгосрочной перспективе). В Аралкуме снижает токсичную пыль, улучшает здоровье (снижение респираторных заболеваний). **Минусы:** Зависимость от климата (нужна минимальная влага), высокая начальная стоимость, медленный эффект (годы на полное восстановление). В солончаках Аралкума соли подавляют микробы/растения — нужны солестойкие штаммы.

Литература

1. Купер Р.В., Шульга А.Н., Елисеев Р.А., Карпенко Е.В. Туровский А.А. Поверхностно-активные пептолипиды культуры *Bacillus* sp. C-146. // Докл.АН РУз. 1990. №9. – С. 40-41
2. Воробьева Л.И. Промышленная микробиология. – Москва: МГУ, 1989. – С. 410.
3. Shulga A.N., Karpenko E.V., Vildanova-Martishishin R., Turovsky A., Soltys M. Biosurfactant – enhanced Remediation of Oil-contaminated Environments. //Adsorption, & Technology. 2000. Vol.18, №2. – P.171-175.
4. Remichkova M., et al. Anti-herpesvirus activities of *Pseudomonas* sp. S-17 rhamnolipid and its complex with alginate. Z Naturforsch C. 2008. 63: 75-81.
5. Pruthi V., and Cameotra S.S., Effect of nutrients on optimal production of biosurfactants by *Pseudomonas putida* — A Gujarat oil field isolate. Journal of Surfactants and Detergents. 2003. 6(1): 65-68.
6. Abouseoud M., et al. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. Desalination. 2008. 223(1-3): 143-151.
7. Deshpande M., and Daniels L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. Bioresour. Technol.1995. 54(2): 143-150.

8. Ghojavand H., Vahabzadeh F., Roayaei E. et al. Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). *J Colloid Interface Sci.* 2008. 324(1-2): 172-176.
9. Курбанбаева А.Э. коллоидно-химические свойства водных растворов биосурфактантов. Вестник Казахского национального университета Аль-Фараби, серия Химия, 2012, 3(67), С.185-189.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. AuroreLoisy, Jens Eggers, and Tanniemola B. Active Suspensions have Nonmonotonic Flow Curves and Multiple Mechanical Equilibria. *Liverpool Phys. Rev. Lett.* **121**, 2018.
14. Самсонова А., Макаревич А. Микробиологические методы повышения вторичной добычи нефти. // Нефтехим. комплекс. – 2009. – №1. – С. 56-64.