ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



ГОРДЕЕВ АЛЕКСАНДР СЕРГЕЕВИЧ

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БИОСУРФАКТАНТОВ

1.5.6. Биотехнология
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
Галицкая Полина Юрьевна

Казань – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 6
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 15
1.1 Биологическая роль и экологическое значение биосурфактантов 15
1.2 Молекулярно-генетические основы биосинтеза биосурфактантов 16
1.3 Эндофитные микроорганизмы как продуценты биосурфактантов 18
1.4 Структурно-функциональная характеристика биосурфактантов 19
1.4.1 Классификация биосурфактантов 19
1.4.2 Гликолипидные биосурфактанты (на примере рамнолипидов) 21
1.4.3 Липопептидные биосурфактанты (на примере сурфактина, фенгицина, итурина) . 25
1.5 Перспективы применения биосурфактантов и проблемы промышленного внедрения……..31
1.5.1 Сельское хозяйство: биоконтроль и стимуляция растений 36
1.5.2 Нефтедобыча и биоремедиация 39
1.5.3 Альтернативные области применения биосурфактантов 46
1.5.4 Методы оценки биологической активности биосурфактантов 49
1.5.5 Проблемы при разработке промышленной технологии получения биосурфактантов ... 50
1.6 Методы выделения, очистки и анализа биосурфактантов 54
1.6.1 Кислотное осаждение 56
1.6.2 Экстракция растворителем 59
1.6.3 Альтернативные методы 60
1.6.4 Методы идентификации и и обеспечения надлежащего качества 63
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 69
2.1 Выделение изолятов 69
2.2 Идентификация выделенных изолятов 70
2.3 Определение наличия генов синтеза биосурфактантов в выделенных изолятах 71
2.4 Культивирование выделенных штаммов 72
2.5 Получение кислотоосаждаемой фракции и очищенного биосурфактанта 74
2.6 Анализ физико-химических свойств кислотоосаждаемой фракции и очищенного биосурфактанта 75
2.7 Оценка токсичности и биоразлагаемости очищенного биосурфактанта 76
2.8 Общие методы анализа 77

2.8.1 Индекс эмульсификации E24 77
2.8.3 Определение концентрации биомассы гравиметрическим методом 78
2.8.4 Тонкослойная хроматография 79
2.8.5 ИК-спектроскопия 79
2.8.8 Экстракция нуклеиновых кислот 80
2.8.10 Мониторинг динамики роста штаммов-продуцентов методом ОТ-ПЦР 81
2.9 Определение фунгицидной активности *in vitro и in vivo* 82
2.10 Моделирование микробных методов увеличения нефтедобычи 85
2.10.1 Моделирование на песчаных колонках 85
2.10.2 Моделирование на кернах 86
2.11 Статистическая обработка данных 88
ГЛАВА 3 СКРИНИНГ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОТБОР ПРОДУЦЕНТОВ БИОСУРФАКТАНТОВ 89
3.1 Скрининг изолятов с наибольшей сурфактант-продуцирующей активностью 89
3.2 Идентификация изолятов методом MALDI-TOF MS 91
3.3 Установление генов биосинтеза биосурфактантов в штаммах *B. mojavensis* P1709, *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021 99
ГЛАВА 4 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ШТАММОВ *B. MOJAVENSIS* P1709, *P. FLUORESCENS* PCS-20 И *P. PUTIDA* PP021 102
4.1 Оценка роста и продуктивности штаммов *B. mojavensis* P1709, *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021 на синтетических средах 102
4.1.1 Адаптация питательных сред для промышленного культивирования штаммов *B. mojavensis* P1709, *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021 109
ГЛАВА 5 ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, БИОБЕЗОПАСНОСТЬ И ПРИМЕНЕНИЕ БИОСУРФАКТАНТОВ, ПРОДУЦИРУМЫХ *B. MOJAVENSIS* P1709, *P. PUTIDA* PP021 И *P. FLUORESCENS* PCS-20 117
5.1 Получение и характеристика кислотоосаждаемой фракции биосурфактантов 117
5.2 Определение состава биосурфактантов, продуцируемых *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 119
5.3 Оценка токсичности биосурфактантов, продуцируемых *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 124

5.4 Оценка биоразлагаемости биосурфактантов, продуцируемых *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 128
5.5 Термическая стабильность кислотоосаждаемых фракций, содержащих биосурфактанты *B. mojavensis* P1709 и *P. putida* PP021 132
5.6 Защита плодов томатов от фитопатогенных грибов с использованием биосурфактантов *B. mojavensis* P1709 132
5.7 Увеличение нефтеотдачи пластов с использованием биосурфактантов *P. putida* PP021 139
5.7.1 Способность биосурфактантов, продуцируемых *P. fluorescens* PCS-20, повышать третичную нефтеотдачу 141
5.7.2 Способность кислотноосажденной фракции биосурфактантов, продуцируемых *P. putida* PP021, повышать третичную нефтеотдачу 144
ГЛАВА 6 РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БИОСУРФАКТАНТОВ 151
6.1 Блок-схема технологии получения бактериальных препаратов 153
6.2 Расчёт материального баланса 154
6.2.1 Расчёт материального баланса получения биопрепарата ДЗР 154
6.2.2. Расчёт материального баланса получения биопрепарата ППН 157
6.3 Подбор оборудования 160
6.4 Описание принципиальной технологической схемы 163
6.4.1 Стадия I. Подготовка инокулята и направленный биосинтез 166
6.4.2 Стадия II. Первичное разделение 169
6.4.3 Стадия III. Выделение и очистка биосурфактантов и получение товарных форм 170
6.5 Разработка норм качества препаратов ДЗР и ППН 171
6.6 Технико-экономическое обоснование разработанных биотехнологий получения биопрепаратов ДЗР и ППН 173
6.6.1 Режим работы проектируемого производства 173
6.6.2 Капитальные затраты 175
6.6.3 Расчёт численности и фонда оплаты труда персонала 176
6.6.4 Расчёт стоимости сырья, материалов и энергоресурсов 178
6.6.5 Смета затрат и калькуляция себестоимости продукции 179
6.6.6 Расчёт экономической эффективности 182

6.6.7 Сравнение с коммерческими аналогами и оценка региональных потребностей ... 184
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ... 186
ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .. 189
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ... 192
ПРИЛОЖЕНИЕ А ... 233
ПРИЛОЖЕНИЕ Б ... 234
ПРИЛОЖЕНИЕ В ... 235

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Биосурфактанты обладают рядом принципиальных преимуществ перед синтетическими поверхностно-активными веществами: высокая биоразлагаемость, низкая токсичность, возможность получения из возобновляемого сырья, а также селективность действия, что особенно важно при создании экологически безопасных препаратов для агропромышленного комплекса (АПК) и нефтегазовой отрасли. В Российской Федерации отсутствует широкомасштабное промышленное производство биосурфактантов, однако существует устойчивый запрос со стороны АПК и нефтегазового комплекса на отечественные биотехнологии, использующие возобновляемое сырье. В сельском хозяйстве послеуборочные потери плодов от грибных инфекций достигают 30-40 %, а применение химических фунгицидов сопряжено с риском накопления токсичных остатков в продукции и развития резистентности у патогенов. В нефтедобыче доля трудноизвлекаемых запасов постоянно растет, при этом традиционные методы заводнения не обеспечивают извлечения остаточной нефти из низкопроницаемых и обводнённых коллекторов, что требует разработки экологически безопасных методов увеличения нефтеотдачи. Обозначенные проблемы особо актуальны для Республики Татарстан, региона с развитым сельским хозяйством и нефтегазодобывающим комплексом.

Отсутствие в России промышленного производства биосурфактантов при наличии спроса, а также доступного сырья (меласса, гидролизаты, отработанные масла) делает создание отечественных биотехнологий на основе эффективных штаммов-продуцентов актуальной народно-хозяйственной задачей. В связи с этим настоящая работа посвящена поиску и селекции эффективных региональных штаммов-продуцентов биосурфактантов, подбору условий их культивирования, оценке состава и функциональных свойств получаемых биосурфактантов и разработке масштабируемых биотехнологий получения бактериальных препаратов на их основе для защиты растений и увеличения нефтеотдачи пластов.

Степень разработанности темы исследования. Основные классы биосурфактантов (гликолипиды, липопептиды, трегалолипиды) и их продуценты (*Bacillus, Pseudomonas, Rhodococcus*) хорошо описаны в мировой науке. Значительный вклад в их изучение внесли зарубежные ученые: I.M. Banat (Великобритания), J.M. Raaijmakers (Нидерланды), R. Hausmann (Германия), L. Zhou и Y. Wang (Китай), а также российские исследователи: Л.А. Беловежец, М.С. Куюкина, Т.Н. Назина. Однако промышленное внедрение биосурфактантов сдерживается рядом факторов. К числу наименее разработанных вопросов относятся поиск высокоактивных штаммов-продуцентов, подбор состава питательных сред для направленного биосинтеза, а также выбор эффективных и экономически целесообразных технологий выделения и очистки целевого продукта. Особую сложность представляет масштабирование процессов от лабораторного до промышленного уровня, что часто сопровождается снижением удельной продуктивности штаммов и ростом себестоимости. Для многих перспективных штаммов-продуцентов, особенно для аборигенных, отсутствуют систематические данные о влиянии состава питательной среды на биосинтез биосурфактантов и их функциональные свойства. Таким образом, разработка научно обоснованных биотехнологий получения бактериальных препаратов на основе биосурфактантов представляет собой актуальную задачу, решение которой требует комплексного подхода, включающего как подбор условий культивирования, так и оценку эффективности получаемых продуктов в прикладных модельных системах.

Цель работы: обосновать и разработать биотехнологии получения бактериальных препаратов на основе биосурфактантов, продуцируемых *Bacillus mojavensis* P1709 и *Pseudomonas putida* PP021, для использования в растениеводстве и нефтедобывающей отрасли.

Задачи исследования:

1. Провести скрининг бактериальных изолятов, выделенных из нефтезагрязнённых и ризосферных почв, для выявления эффективных продуцентов

биосурфактантов, осуществить их видовую идентификацию и установить наличие генов биосинтеза различных классов биосурфактантов.

2. Подобрать условия направленного биосинтеза биосурфактантов для отобранных штаммов-продуцентов.

3. Оценить физико-химические свойства и функциональные характеристики полученных биосурфактантов.

4. Оценить эффективность применения биосурфактантов в отношении фитопатогенных грибов (*in vitro*) и для послеуборочной защиты плодов томатов (*in vivo*), а также для увеличения нефтеотдачи пластов в модельных системах.

5. Разработать биотехнологии получения биопрепаратов на основе биосурфактантов и провести их технико-экономическую оценку, включая сравнение с коммерческими аналогами.

Научная новизна работы.

По результатам скрининга отобрано 63 бактериальных изолята из региональных экосистем – нефтезагрязнённых и ризосферных почв, продуцирующих метаболиты с эмульгирующими и поверхностно-активными свойствами, внесенных в базу данных микроорганизмов (свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2025624611 от 22.10.2025).

Идентифицированы три новых штамма: *Bacillus mojavensis* P1709, *Pseudomonas putida* PP021 и *Pseudomonas fluorescens* PCS-20, с высокой эмульгирующей активностью и способностью снижать поверхностное натяжение водного раствора. Установлены гены, ответственные за биосинтез липопептидов (*fenD, srfAA, srfA3*) у *B. mojavensis* P1709 и рамнолипидов (*rhlB, rhlC*) у *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20.

Установлено влияние источника углерода в питательных средах на выход и функциональные характеристики биосурфактантов, продуцируемых выделенными штаммами в условиях жидкофазного культивирования. Показано, что наибольший выход биосурфактантов, в виде кислотоосаждаемой фракции (КОФ), равный 5,3 г/л получен при культивировании *B. mojavensis* P1709 на среде с глюкозой (2 % масс.); 9,8 и 7,5 г/л – для *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20, соответственно, на среде с глицерином (2 % масс).

Впервые установлена химическая природа и содержание биосурфактантов, выделенных из КОФ бесклеточной культуральной жидкости. Показано, что на их долю приходится 2-3 % сухих веществ КОФ, при этом у *B. mojavensis* P1709 биосурфактанты являются липопептидами, у *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 – рамнолипидами. Полученные биосурфактанты относятся к 3 классу опасности (умеренно опасные вещества согласно ГОСТ 12.1.007-76) и обладают биоразлагаемостью 58-64 % за 10 сут (ГОСТ 32427-2013), что свидетельствует о перспективе их применения в качестве альтернативы синтетическим ПАВ.

Показано, что КОФ из бесклеточной культуральной жидкости *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021, *P. fluorescens* PCS-20 и выделенные из них биосурфактанты имеют сопоставимые функциональные свойства: поверхностное натяжение снижается до 23,9-27,5 мН/м, эмульгирующая активность составляет 75-85 %.

Определено, что КОФ *B. mojavensis* P1709 при концентрации 10 г/л ингибирует рост мицелия *Fusarium oxysporum* на 93 % и биосинтез микотоксинов Т-2 и НТ-2 на 95 %. При обработке плодов томатов черри раствором КОФ с концентрацией 10 г/л в дозировке 0,7 мл/кг наблюдается повышение хранимоспособности в 5 раз и индукция биосинтеза защитных ферментов: активность пероксидазы возрастает в 2,5 раза, полифенолоксидазы – в 1,6 раза.

Теоретическая значимость диссертационного исследования определяется в расширении представлений о физиолого-биохимических закономерностях вторичного метаболизма у бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*, в частности их способности синтезировать вещества с поверхностно-активными свойствами.

Практическая значимость работы.

Разработана биотехнология получения бактериального препарата для защиты плодов томатов от фитопатогенов (биопрепарат ДЗР) на основе КОФ, содержащей липопептиды *B. mojavensis* P1709, с годовой производительностью 5,5 т, себестоимостью продукции 2 162 руб./кг и сроком окупаемости 5,3 года. Экономическая эффективность предлагаемой технологии обеспечивается использованием свекловичной мелассы и гидролизата рыбной муки в качестве компонентов питательной среды и реализацией получаемой биомассы (180 кг на

цикл) как органического удобрения или биоремедианта. Стоимость обработки 1 т томатов при рабочей концентрации раствора биопрепарата 10 г/л и норме расхода 8 л/т (0,08 кг) составляет 280 руб., что сопоставимо с химическими фунгицидами, но применение биопрепарата более безопасно и экологично.

Установлено, что КОФ *P. putida* PP021 обеспечивает дополнительную нефтеотдачу 48 % в песчаных колонках и 21 % на керне. Разработана биотехнология получения бактериального препарата для повышения нефтеотдачи (биопрепарат ППН) на основе КОФ, содержащей рамнолипиды *P. putida* PP021, с годовой производительностью 7,7 т, себестоимостью продукции 2 193 руб./кг и сроком окупаемости 5,3 года. Экономическая эффективность обеспечивается использованием отработанного растительного масла в качестве субстрата и реализацией полученной биомассы (180 кг на цикл) и побочного продукта масляной фракции (25 кг на цикл). Стоимость 1 м^3 рабочего раствора биопрепарата ППН с концентрацией 0,4 % составляет 8,8 тыс. руб., при этом биопрепарат в 13 раз менее токсичен, чем синтетический Неонол АФ 9-12, и полностью биоразлагаем.

Разработаны технологические решения по получению и очистке биосурфактантов, систематизированные в базе данных (свидетельство № 2022623032 от 22.11.2022). Составлена программа для ЭВМ, позволяющая проводить определение класса биосурфактантов по ИК-спектральным характеристикам (свидетельство № 2023683530 от 08.11.2023).

Технология получения биопрепарата ДЗР апробирована в ООО «Органик-Парк» (акт апробации от 21.09.2026). Технология применения биопрепарата ППН апробирована в ООО «Кемтек Волга» (акт апробации от 25.09.2026).

Результаты работы используются в учебном процессе кафедры биотехнологии ФГАОУ ВО КФУ при подготовке магистров по направлению «Биотехнология» (протокол №1 от 04.09.2026).

Методология и методы исследования. В диссертации применён комплексный методологический подход, сочетающий теоретические и эмпирические методы. Теоретическая часть включает анализ научной литературы,

систематизацию данных и обоснование выбора объектов и методов исследования. Эмпирические исследования выполнены с использованием стандартных микробиологических, молекулярно-генетических и аналитических методов, принятых в биотехнологии.

Морфологию изолятов исследовали методом световой микроскопии с использованием микроскопа Axio Lab A1 (Carl Zeiss, Германия). Скрининг биосурфактантной активности осуществляли по индексу эмульгирования E24 и снижению поверхностного натяжения (ПН) на тензиометре KRUSS K20 (Германия) методом отрыва кольца Де Нюи. Культивирование штаммов-продуцентов проводили в лабораторном биореакторе Minifors 2 (Infors HT, Швейцария) объёмом 3 л. Видовую идентификацию изолятов выполняли с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра Bruker (Германия) и секвенирования по Сэнгеру (ABI 3730 DNA Analyzer, Life Technologies, США). Наличие генов биосинтеза определяли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе Bio-Rad CFX 96 (США); для оценки роста на мутных средах использовали гравиметрическое определение сухой биомассы и обратную транскрипцию с последующей количественной ПЦР (ОТ-ПЦР) с родоспецифичными праймерами.

Тип и состав биосурфактантов устанавливали методами тонкослойной хроматографии (CAMAG, Швейцария) с дериватизацией и ИК-спектроскопии (Bruker Lumos, Германия). Экотоксичность оценивали на *Ceriodaphnia affinis* по 48-часовому протоколу, соответствующему ГОСТ 32536-2020 (аналог OECD 202), биоразлагаемость определяли по минерализации углерода (система OxiTop, WTW, США) согласно ГОСТ 32427-2013 (аналог OECD 301F). Остаточную концентрацию углеродных субстратов в культуральной жидкости определяли колориметрически (антроновый метод) и гравиметрически. Фунгицидные свойства исследовали *in vitro* на чашках Петри со спорами *Fusarium oxysporum* и *in vivo* на плодах томатов черри, искусственно заражённых данным фитопатогеном, с оценкой активности защитных ферментов в тканях плодов. Нефтевытесняющую

способность оценивали на песчаных колонках и кернах с нефтью Ромашкинского месторождения.

Положения, выносимые на защиту:

1. По результатам скрининга 63 бактериальных изолятов из нефтезагрязнённых и ризосферных почв идентифицированы три новых штамма-продуцента биосурфактантов – *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20, в геномах которых установлено наличие генов биосинтеза липопептидов (*fenD, srfAA, srfA3*) и рамнолипидов (*rhlB, rhlC*).

2. Подобраны условия направленного биосинтеза биосурфактантов при жидкофазном культивировании штаммов *B. mojavensis* P1709 и *P. putida* PP021, с последующим получением КОФ, содержащих 2-3 % целевых соединений и обладающих высокой поверхностной активностью (снижение поверхностного натяжения до 23,9-27,5 мН/м), низкой токсичностью (EC_{50} составляет 170-310 мг/л) и высокой биоразлагаемостью (58-64 % за 10 сут). На основе КОФ могут быть разработаны бактериальные препараты для защиты растений и повышения нефтеотдачи (ППН).

3. Разработана биотехнология получения биопрепарата ДЗР на основе КОФ, содержащей липопептиды *B. mojavensis* P1709, с годовой производительностью 5,5 т, себестоимостью продукции 2 162 руб./кг и сроком окупаемости 5,3 года. Применение бактериального препарата обеспечивает подавление роста фитопатогенного гриба *F. oxysporum* на 93 %, снижение биосинтеза грибом микотоксинов Т-2 и НТ-2 на 95 %, повышение хранимоспособности плодов томатов черри в 5 раз, индукцию биосинтеза в их тканях защитных ферментов (активность пероксидазы возрастает в 2,5 раза, полифенолоксидазы – в 1,6 раза).

4. Разработана биотехнология получения биопрепарата ППН на основе КОФ, содержащей рамнолипиды *P. putida* PP021, с годовой производительностью 7,7 т, себестоимостью продукции 2 193 руб./кг и сроком окупаемости 5,3 года. Применение бактериального препарата обеспечивает дополнительную нефтеотдачу в песчаных колонках и керне – 48 % и 21 %, соответственно, что

сопоставимо с действием синтетических ПАВ, при значительно меньшей токсичности биопрепарата (EC_{50} составляет 195 мг/л против 15 мг/л).

Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность результатов обеспечена трёхкратной повторностью экспериментов, стандартизацией условий культивирования и анализа, а также валидацией аналитических методик по показателям линейности, прецизионности и правильности. Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение (SD). Статистическая обработка выполнялась с использованием ~~языка~~ Python (пакеты *scipy.stats, statsmodels*) с оценкой достоверности различий по критерию Манна – Уитни при уровне значимости $p < 0,05$.

Материалы диссертации представлены и изложены на: Международной конференции наук о Земле SGEM (Болгария, Албена, 2022, 2023, 2024), III Молодежной научно-практической конференции «PLANTAE & FUNGI» (Владивосток, 2023), Международном форуме «Агробиотехнологии: достижения и перспективы развития» (Москва, 2023), XII Международной научно-практической конференции «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем» (Краснодар, 2024), XIV Молодежной школе-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2024), VIII Международной молодежной научной конференции «Tatarstan UpExPro 2024» (Казань, 2024), Промышленно-энергетическом форуме TNF 2024 (Казань, 2024), IV Международной конференции «Геномика, метагеномика и молекулярная биология микроорганизмов» (Москва, 2025).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, из них 4 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science, 9 работ в других научных изданиях, включая материалы Международных и Всероссийских конференций, получено 3 свидетельства о государственной регистрации результатов интеллектуальной деятельности.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.6.

Биотехнология (технические науки), в частности пункту 3 «Изучение и разработка технологических режимов выращивания микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных для получения биомассы, ее компонентов, продуктов метаболизма, направленного биосинтеза биологически активных соединений и других продуктов, изучение их состава и методов анализа, технико-экономических критериев оценки, создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения».

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 237 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, раздела результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа содержит 22 рисунка и 39 таблиц. Библиографический список включает всего 358 источников, из них 348 зарубежных.

Личный вклад соискателя. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов, анализе и интерпретации полученных данных, формулировке выводов, подготовке публикаций и диссертационной работы. Автор выражает благодарность научному руководителю – д.б.н., главному научному сотруднику Научно-исследовательской лаборатории OpenLab «Биоконтроль» Института экологии и природопользования КФУ Галицкой П.Ю., а также д.б.н., профессору, директору Института экологии и природопользования КФУ Селивановской С.Ю., участвовавших в обсуждении результатов исследований; научно-исследовательской лаборатории генетики микроорганизмов, где было проведено секвенирование по методу Сэнгера под руководством д.б.н., доцента Григорьевой Т.В. и сотрудникам Учебно-научной лаборатории «Центр агро- и экобиотехнологий» КФУ за помощь в интерпретации данных и поддержке на всех этапах работы.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биологическая роль и экологическое значение биосурфактантов

Биосурфактанты, продуцируемые бактериями и микроскопическими грибами, представляют собой поверхностно-активные вещества (ПАВ), которые вырабатываются внеклеточно, чаще всего при росте микроорганизмов на неполярных субстратах [1]. Структурно-функциональные особенности этих молекул аналогичны синтетическим ПАВ, включая гидрофобную «голову» и гидрофильный «хвост». Первичная классификация биосурфактантов осуществляется по молекулярной массе [2].

Микроорганизмы продуцируют амфифильные соединения, такие как биосурфактанты, для взаимодействия с поверхностями различного характера, включая гидрофильные и гидрофобные [3]. Эти соединения играют ключевую роль в различных биологических процессах, таких как улучшение доступности питательных веществ, защита от неблагоприятных условий окружающей среды и межвидовое взаимодействие.

Низкомолекулярные биосурфактанты включают липопептиды, гликолипиды (рамнолипиды, трегалолипиды, софоролипиды) и их комбинации – гликопептиды. Высокомолекулярные биосурфактанты представлены полианионными гетерополисахаридами, содержащими полисахариды, белки, липопротеины и иногда целые клетки [2].

Наиболее распространёнными биосурфактантами являются соединения с олиго- и полисахаридным фрагментом, такие как рамнолипиды, и соединения с пептидным фрагментом, такие как липопептиды. Эти биосурфактанты продуцируются различными микроорганизмами, включая бактерии, водоросли, цианобактерии, грибы и дрожжи [4].

Рамнолипиды, например, синтезируются бактериями рода *Pseudomonas* и состоят из рамнозы и липидного компонента. Они обладают выраженными поверхностно-активными свойствами и используются для эмульгации

углеводородов, что позволяет микроорганизмам улучшать доступ к питательным веществам. Липопептиды, такие как сурфактин, продуцируются бактериями рода *Bacillus* и обладают антимикробными свойствами, что помогает микроорганизмам защищаться от конкурентов, а трегалолипиды продуцируют бактерии родов *Rhodococcus* и *Mycobacterium*.

Биосурфактанты необходимы микроорганизмам для выполнения различных функций. Они помогают в воздействии на субстраты для извлечения энергии, защищают от неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как токсины или антибиотики, и участвуют во внутри- и межвидовом взаимодействии [1]. Например, биосурфактанты могут способствовать формированию биоплёнок, что позволяет микроорганизмам прикрепляться к поверхностям и защищаться от внешних воздействий.

1.2 Молекулярно-генетические основы биосинтеза биосурфактантов

Генетические предикторы синтеза биосурфактантов хорошо изучены и описаны для таких соединений, как рамнолипиды, сурфактин, фенгицин и итурин, продуцируемых бактериями родов *Pseudomonas* и *Bacillus* [1].

Современные исследования биосурфактантов охватывают широкий спектр аспектов – от молекулярной генетики синтеза до экологических функций. Полногеномное секвенирование модельных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 и *P. fluorescens* Pf-5 выявило кластеры генов, ответственные за биосинтез рамнолипидов (*rhlA/B*, *pqs*) и других поверхностно-активных метаболитов [7-9]. Так, у *P. aeruginosa* PAO1 экспрессия генов *rhlAB* регулируется системой кворум-сенсинга RhlRI, что связывает продукцию биосурфактантов с плотностью популяции и формированием биопленок [8].

Сравнительный геномный анализ *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A продемонстрировал наличие уникальных островков патогенности, кодирующих нетипичные синтетазы поликетидов, потенциально участвующие в синтезе

специализированных липопептидов [9]. Это подчеркивает эволюционную пластичность рода *Pseudomonas* в адаптации к экологическим нишам через диверсификацию биосурфактантов. Методы сборки *de novo* геномов на основе данных низкокачественного секвенирования (например, для рисового патогена *P. syringae* pv. *oryzae*) позволили идентифицировать мобильные генетические элементы (плазмиды, транспозоны), опосредующие горизонтальный перенос генов биосинтеза антимикробных соединений.

Аналогично бактериям рода *Pseudomonas*, для *Bacillus* были детально охарактеризованы этапы взаимодействия с растениями, включая описание процессов биосинтеза и выявление ответственных генов. Эти процессы особенно важны при антимикробном воздействии на поверхности растений и в почве, а также при поддержании роста и развития растений в условиях заражения почвы тяжелыми металлами в подвижной форме [10].

Род *Bacillus* демонстрирует симбиоз с растениями, опосредованный продукцией липопептидных биосурфактантов (сурфактин, итурин, фенгицин). Гены синтеза сурфактина (*srfA operon*) ко-регулируются с системами колонизации корней, такими как образование биопленок под контролем сигнальной молекулы ComX [11]. Исследования штамма *B. amyloliquefaciens* FZB42 показали, что биосурфактанты усиливают подвижность бактерий в ризосфере за счет снижения поверхностного натяжения, облегчая конкуренцию с фитопатогенами [12].

Важным аспектом является роль биосурфактантов в детоксикации тяжелых металлов. Работа [13] продемонстрировала, что сурфактин *B. subtilis* BS-37 хелатирует ионы Cd^{2+} и Pb^{2+}, снижая их биодоступность в почве на 40-60%. Это согласуется с данными о индукции генов *srfA* и *yndJ* (регулятор стрессового ответа) при воздействии Cu^{2+} [14].

Ризосферные микроорганизмы, такие как *Bacillus*, находят широкое применение благодаря своему разнообразию и удобству выделения. Это позволяет выбирать сурфактант-продуцирующие штаммы по относительно простым схемам, наращивая и экстрагируя их по известным протоколам [15]. Однако наличие генов биосинтеза в геноме не всегда гарантирует высокий уровень продукции

биосурфактантов; экспрессия генов зависит от ряда факторов, включая состав питательной среды, стадию роста и внешние стрессовые условия. Для нового штамма, особенно выделенного из нестандартных экосистем (нефтезагрязнённые почвы, ризосфера), требуется экспериментальное подтверждение активности биосинтеза и оптимизация условий культивирования [1].

1.3 Эндофитные микроорганизмы как продуценты биосурфактантов

Отдельным интересным направлением поиска продуцентов биосурфактантов является исследование микроорганизмов-эндофитов, в частности представителей родов *Pseudomonas* и *Bacillus*, населяющих ткани живых растений [16]. Эти микроорганизмы способны продуцировать биосурфактанты в ответ на внешние стрессовые факторы, такие как токсическое воздействие поллютантов [17]. Эндофиты демонстрируют хорошую способность к формированию биосурфактантов, которые можно использовать для средств защиты растений или в рамках ремедиационных мероприятий по очистке почвы [18]. Эндофитные бактерии (*B. velezensis* EB-14*, P. putida* PCL1760) продуцируют биосурфактанты в ответ на оксидативный стресс, вызванный накоплением реактивных форм кислорода при заражении растений патогенами [19]. Новые исследования выявили, что липопептидные биосурфактанты эндофитов (например, курстамин, продуцируемый *Bacillus* sp. JS) индуцируют системную резистентность растений через активацию сигнальных путей салициловой и жасмоновой кислот [20].

Кроме того, имеется информация о потенциале выработки биосурфактантов у эндофитных микроскопических грибов [21]. Микоризные грибы *Glomus* spp. и эндофитные аскомицеты (*Fusarium, Trichoderma*) синтезируют гликопротеиновые биосурфактанты, повышающие биодоступность фосфатов и микроэлементов в ризосфере [22]. Однако их промышленное применение ограничено из-за медленного роста и сложностей в масштабировании [23]. В последнее время появляется всё больше работ, исследующих возможность применения эндофитных

микроорганизмов в качестве продуцентов биосурфактантов, однако они до сих пор недостаточно изучены [24].

1.4 Структурно-функциональная характеристика биосурфактантов

1.4.1 Классификация биосурфактантов

Биосурфактанты представляют собой обширную группу амфифильных соединений, различающихся по молекулярной массе, химической структуре, типу продуцента и механизму действия. Наиболее распространённым подходом является разделение на низкомолекулярные (< 1500 Да) и высокомолекулярные (> 1500 Да) биосурфактанты, что отражает их функциональные особенности – первые преимущественно снижают поверхностное и межфазное натяжение, тогда как вторые действуют как эмульгаторы и стабилизаторы дисперсных систем [1,2].

К низкомолекулярным биосурфактантам относят гликолипиды – молекулы, состоящие из углеводного фрагмента (одного или нескольких остатков рамнозы, софорозы, трегалозы, маннозилэритритола), ковалентно связанного с гидрофобными жирнокислотными цепями (обычно C_{10}-C_{18}). Наиболее изученными гликолипидами являются рамнолипиды (продуценты – *Pseudomonas* spp.), софоролипиды (*Starmerella bombicola*, *Candida* spp.), трегалолипиды (*Rhodococcus* spp.) и маннозилэритритоллипиды (*Pseudozyma* spp.) [25].

Наряду с ними, отмечают такие классы соединений как липопептиды и липопротеины – амфифильные молекулы, содержащие циклический или линейный пептидный фрагмент (обычно 7-10 аминокислот), связанный с жирнокислотной цепью. К этой группе относятся сурфактин, итурин, фенгицин (продуценты – *Bacillus* spp.), а также полимиксины (продуценты – *Paenibacillus* spp.). Липопептиды обладают высокой поверхностной активностью и часто проявляют антимикробные свойства [28-30].

Кроме того, к низкомолекулярным биосурфактантам относят фосфолипиды и жирные кислоты – некоторые микроорганизмы (например, *Acinetobacter* spp.,

Thiobacillus thiooxidans) продуцируют нейтральные липиды и фосфатидилэтаноламины, которые также обладают поверхностно-активными свойствами и участвуют в солюбилизации углеводородов [2].

При этом в отдельную группу выделяют высокомолекулярные биосурфактанты, часто классифицируемые как биоэмульгаторы, основу которых составляют высокополимерные амфифильные гетерополисахариды, липополисахариды или комплексные белок-углеводные конъюгаты. К наиболее изученным представителям данного класса относятся эмульсан (секретируемый штаммами *Acinetobacter calcoaceticus*), биодисперсан, липосан и маннопротеины клеточных стенок дрожжей (в частности, *Saccharomyces cerevisiae*). В отличие от низкомолекулярных аналогов, данные макромолекулы не вызывают значительного падения поверхностного натяжения на границе с газом, однако за счет стерических факторов и формирования прочных межфазных адсорбционных слоев они экстремально эффективно стабилизируют гетерогенные эмульсии и дисперсии, предотвращая коалесценцию и флокуляцию капель гидрофобной фазы [29].

Самостоятельную подгруппу высокомолекулярных поверхностно-активных структур формируют партикулярные биосурфактанты – мембранные везикулы, генерируемые микробными клетками, а также непосредственно целые интактные клетки (например, углеводородокисляющие штаммы рода *Acinetobacter*). За счет выраженной гидрофобности и специфического рельефа клеточной стенки данные биообъекты необратимо адсорбируются на межфазной границе, обеспечивая квазитвердую стабилизацию прямых и обратных эмульсий по механизму, аналогичному поведению эмульсий Пикеринга [30].

Классификация биосурфактантов по молекулярной массе и химической структуре представлена в таблице 1.1 [31]. Следует отметить, что перечисленные классы не являются взаимоисключающими: некоторые микроорганизмы способны продуцировать одновременно гликолипиды и липопептиды, а также полимерные эмульгаторы. Выбор конкретного класса для биотехнологических применений определяется целевой функцией – снижение поверхностного натяжения

(липопептиды, гликолипиды) или стабилизация эмульсий (полимерные биосурфактанты).

Таблица 1.1 – Классификация биосурфактантов [31]

Класс по молекулярной массе	Класс по химической природе	Примеры
Низкомолекулярные (< 1500 Да)	гликолипиды	рамнолипиды, софоролипиды, маннозилэритритоллипиды, трегалолипиды
	липопептиды и липопротеины	сурфактин, итурин, фенгицин, гримицидин С, полимиксин
	фосфолипиды, жирные кислоты и нейтральные липиды	фосфатидилэтаноламин, фосфатидилглицерин, фосфатидилхолин, жирные кислоты, моно- и диацилглицеролы
Высокомолекулярные (> 1500 Да)	полимерные	эмульсан, биодисперсан, липосан, маннопротеин
	частичные	везикулы, целые клетки

1.4.2 Гликолипидные биосурфактанты (на примере рамнолипидов)

Химическая структура рамнолипидов формируется за счет связывания одной или двух молекул рамнозы с тремя гидроксильными жирными кислотами, представляющими собой молекулы с различной длиной цепи от С8 до С14, среди которых преобладает β-гидроксидекановая кислота [25]. Гидрофильный фрагмент представляет собой рамнозное кольцо, тогда как гидрофобные части представлены одной или несколькими цепями жирной кислоты. В зависимости от количества углеводных остатков выделяют две основные структурные формы этих соединений – монорамнолипиды и дирамнолипиды [32].

Типичным и наиболее изученным продуцентом рамнолипидов является бактерия *P. aeruginosa*. В качестве источников углерода при биосинтезе данных сурфактантов этот микроорганизм способен утилизировать широкий спектр субстратов: гидрофобные соединения (алканы с длиной цепи C_{11}-C_{12}, оливковое масло), углеводы (глюкозу, фруктозу, маннит, глицерин), а также органические

кислоты (сукцинат, пируват, цитрат). При этом параметры культивирования – включая конструктивные особенности ферментера, состав питательной среды, значение pH, тип используемого субстрата и температуру – оказывают определяющее влияние на фракционный состав и конечный объем полученных рамнолипидов. Молекулярная структура наиболее распространенных в природе моно- и дирамнолипидов представлена на рисунке 1.1 [33].

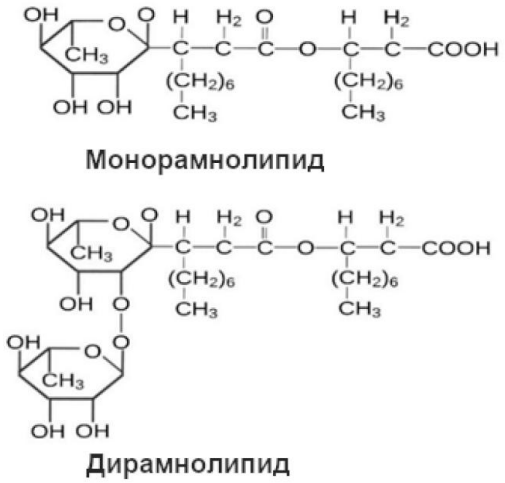
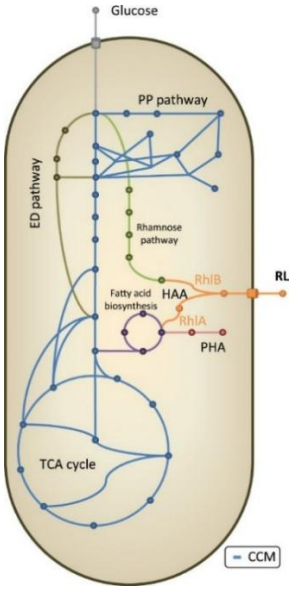


Рисунок 1.1 – Структура моно- и дирамнолипида [33]

В процессе биосинтеза моно- и дирамнолипидов бактериями рода *Pseudomonas* рамнозильный фрагмент (гидрофильная голова) и остаток жирной кислоты (гидрофобный хвост) [34] формируются параллельно в рамках центрального метаболизма клетки [35]. Донором рамнозильной группы выступает активированный сахар – дезокситимидин-дифосфо-L-рамноза (dTDP-L-рамноза) [36]. Для его получения промежуточный субстрат D-глюкозо-1-фосфат сначала вовлекается в специфическую реакцию, катализируемую фосфоманномутазой AlgC. Последующий синтез dTDP-L-рамнозы включает четыре последовательные ферментативные стадии, контролируемые консервативным опероном генов *rml* (*rmlA, rmlB, rmlC, rmlD*) [35]. В свою очередь, за формирование липидной части отвечает фермент RhlG (β-кетоацил-редуктаза), который перенаправляет интермедиаты (в форме ацилкарбоновых кислот, связанных с ацил-переносящим белком) из общего пути синтеза жирных кислот на нужды образования сурфактанта

[36]. Финальный этап биосинтеза рамнолипидов протекает посредством двух последовательных нуклеотид-сахарных трансферазных реакций, катализируемых ключевыми специфическими ферментами. На первой стадии рамнозилтрансфераза I (кодируемая опероном *rhlAB*) осуществляет перенос остатка L-рамнозы от дезокситимидиндифосфат-L-рамнозы (dTDP-L-рамнозы) на димер β-гидроксижирных кислот (HAA) с образованием монорамнолипида [35]. При этом белок RhlA отвечает за предварительный синтез стабильного димера жирных кислот, а мембраносвязанная каталитическая субъединица RhlB завершает сборку молекулы. На второй стадии фермент рамнозилтрансфераза II (кодируемая геном *rhlC*) катализирует присоединение второго рамнозильного остатка к монорамнолипиду, обеспечивая конверсию в дирамнолипидную форму [35] Обобщенная метаболическая карта и ключевые этапы каскада получения рамнолипидов представлены на рисунке 1.2 [37].



Glucose – глюкоза; ED pathway – путь Энтнера–Дудорова; PP pathway – пентозофосфатный путь; TCA cycle – цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса); Fatty acid biosynthesis – биосинтез жирных кислот; Rhamnose pathway – путь биосинтеза рамнозы;
HAA – β-гидроксиалканоилоксиалкановая кислота; PHA – полигидроксиалканоаты;
RhlA – рамнозилтрансфераза RhlA; RhlB – рамнозилтрансфераза RhlB;
RL – рамнолипиды; CCM – центральный метаболизм углерода

Рисунок 1.2 – Биохимический путь синтеза рамнолипидов в *P. aeruginosa* [37]

Практическое применение и изучение свойств рамнолипидов неразрывно связаны с методами их биотехнологического получения. Наиболее распространенным подходом к масштабированию синтеза этих гликолипидов является ферментация – непосредственное наращивание биомассы продуцента в питательной среде. В ходе этого процесса микроорганизм используется для направленного воздействия на субстрат и превращения его в целевой продукт. Такая ферментация включает катализируемые ферментами реакции в конкретной клеточной системе, причем протекание данных реакций критически зависит от физико-химических условий окружающей среды [38]. Ключевыми регулируемыми параметрами среды являются температурный режим (оптимально 30-37 °C), уровень pH, интенсивность аэрации, а также лимитирование по источникам азота или фосфора при избытке углерода, что напрямую запускает экспрессию генов биосинтеза рамнолипидов через систему чувства кворума [38,39].

Как правило, коммерчески используются два режима работы ферментации: твердофазная и при погружении в культуру [40]. Твердофазная ферментация предполагает рост микроорганизмов на твердом материале при небольшом количестве или отсутствии свободной воды. Однако твердые материалы должны содержать достаточное количество влаги, которая остаётся внутри них [41]. Напротив, в процессе погружной ферментации используется жидкий или твердый субстрат, который растворяется в воде для образования среды, способной поддерживать рост микроорганизмов [40]. Процесс ферментации можно дополнительно разделить на анаэробный, который осуществляется в отсутствие кислорода, и аэробный, для которого требуется кислород. Одним из применений анаэробной ферментации является производство биоводорода для биотоплива, в то время как аэробная ферментация используется для производства уксуса для пищевой промышленности [42].

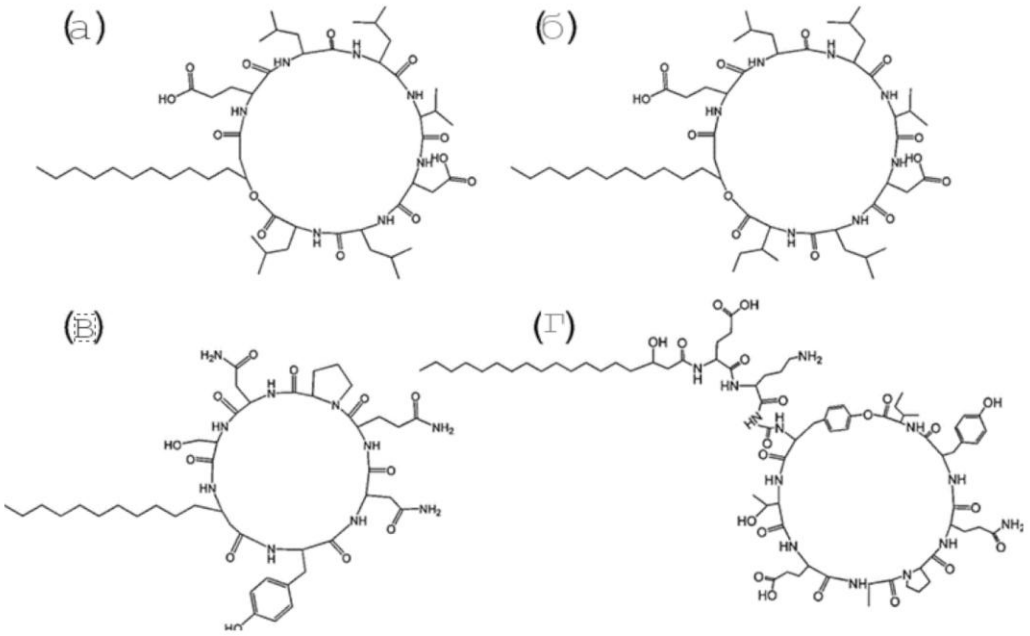
Микроорганизмы рода *Pseudomonas* способны использовать как водорастворимые источники углерода, такие как глюкоза и глицерин, так и не смешивающиеся с водой субстраты, например, пальмовое масло, пальмовое масло для приготовления пищи и использованное пальмовое масло после жарки [43].

Отдельные исследования демонстрируют, что производство биосурфактанта из несмешивающегося с водой субстрата имеет более высокую производительность по сравнению с водорастворимым субстратом, полученным другими исследователями. *P. aeruginosa* LB1 продуцирует биосурфактант из соевого масла с продуктивностью 11,72 г/л по сравнению с глюкозой и глицерином в качестве источников углерода, с продуктивностью 4,20 г/л и 8,05 г/л соответственно [44]. Другие работы подтвердили этот результат: при культивировании штаммов *P. aeruginosa* на отработанном масле для жарки биосинтез рамнолипидов возрастает в несколько раз по сравнению со средами на основе гидрофильного глицерина, поскольку метаболический путь превращения жирных кислот растительных масел через β-окисление энергетически более выгоден для синтеза гидрофобных хвостов биосурфактантов [45]. Это связано с тем, что не смешивающийся с водой субстрат имеет более длинную углеродную цепь по сравнению с глюкозой и глицерином, которые снабжают клетки источниками углерода. Однако *P. aeruginosa* EM1 продуцирует биосурфактант из глюкозы и глицерина, демонстрируя более высокую выработку биосурфактанта примерно 7,50 и 4,93 г/л по сравнению с оливковым маслом и соевым маслом, которые продуцируют около 3,70 и 2,63 г/л продукта [46]. Таким образом, можно сделать вывод, что вид бактериального штамма, типы источников углерода и условия ферментации играют значимую роль в производстве биосурфактанта.

1.4.3 Липопептидные биосурфактанты (на примере сурфактина, фенгицина, итурина)

Липопептиды представляют собой небольшие молекулы, состоящие из кольцевой пептидной структуры – «головки», и цепочки жирных кислот различной длины – «хвоста». На рисунке 1.3 показаны молекулярные структуры сурфактина, итурина, фенгицина, лихенизина и бацилломицина, которые являются наиболее изученными соединениями. Липопептиды имеют потенциальное применение во многих отраслях промышленности: от пищевых эмульгаторов, адъювантов для

улучшения экстракции масла, соединений для биоремедиации, мицеллярных растворов в косметике до антибиотиков в фармацевтике [50].



(а), (б) – изоформы сурфактина; (в) – итурин; (г) – фенгицин

Рисунок 1.3 – Химическая структура липопептидов [50]

Сурфактин был открыт и охарактеризован в 1968 г., а его молекулярная структура была впервые определена в 1969 г. [47]. Он содержит гидрофильную головную группу, состоящую из семи аминокислот, и липофильную цепь жирной кислоты, длина которой может составлять от 13 до 16 атомов углерода, как показано на рисунке 1.4.

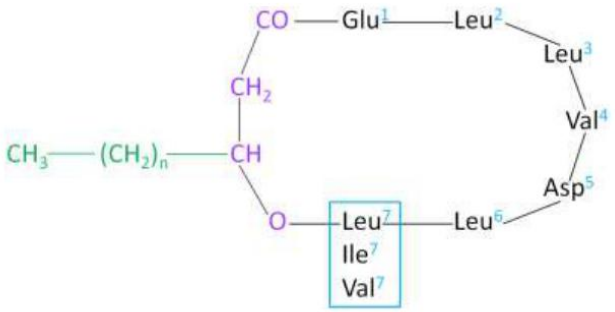


Рисунок 1.4 – Схематичная структура сурфактина [27]

Технологически производство сурфактантов класса липопептидов схоже с производством гликолипидов. В данном разделе будет представлена схема ферментационного производства на основе микроорганизмов рода *Bacillus*.

Биосинтез сурфактина, продуцируемого штаммом *Bacillus* sp., можно улучшить, оптимизировав среду культивирования. С 1940-х годов липопептиды, как правило, производились в среде Ланди – среде с определенными минеральными солями, поскольку было известно, что среда с минимальным содержанием солей индуцирует лучший биосинтез липопептидов, чем обогащенная комплексом среда [48]. За прошедшие годы был опубликован ряд исследований по оптимизации сред, посвященных солевому составу, включая среду Купера, разработанную специально для продукции сурфактина [49]. На сегодняшний день общепризнано, что присутствие в среде ионов железа, марганца, магния и калия критически важно, поскольку они выступают кофакторами ферментов биосинтеза, ускоряя рост бактерий и повышая биосинтез сурфактина [50,51]. Недавно были опубликованы дальнейшие исследования по оптимизации среды для конкретных штаммов. Примечательно, что в работах [52,53] создали модифицированную версию среды Купера для штамма DSM10 и модифицированную версию среды Ланди для штамма BBG131, соответственно.

Также были исследованы тип источника азота и его соотношение с углеродом. Нитраты натрия и калия традиционно считаются наиболее эффективными источниками азота для направленного производства сурфактина [54,55]. В качестве основного источника углерода чаще всего применяется глюкоза; другие простые сахара (фруктоза, сахароза и мальтоза) также могут утилизироваться культурой, но обычно обеспечивают более низкую продукцию целевого продукта [54]. Аналогичная тенденция к снижению продуктивности наблюдается при использовании углеводородов (например, керосина) и некоторых растительных масел, таких как оливковое [56].

Вместе с тем, биосинтез сурфактина успешно осуществляется на альтернативных субстратах – промышленных и сельскохозяйственных отходах, включая послеферментационные воды производства маниоки, яблочный сок

кешью, пульпу сизаля, стоки картофелеперерабатывающих предприятий и рисовую солому [57,58]. Указанные жидкие стоки лишь обогащали минеральными солями без проведения предварительной химической обработки. Исключение составила рисовая солома, которую перед внесением в среду предварительно измельчали и высушивали до состояния порошка. Вовлечение доступных агропромышленных отходов в биотехнологический процесс позволяет существенно снизить себестоимость получения сурфактина и обеспечивает выраженный экологический эффект за счет рациональной утилизации многотоннажных остатков.

Условия культивирования влияют на продукцию сурфактина и других липопептидов. Обычно сурфактин вырабатывается при температуре от 25 до 37 °C [59]. Полуселективное производство липопептидов можно индуцировать, контролируя температуру. Было продемонстрировано, что итурин и микосубтилин преимущественно продуцируются при 25 °C, тогда как сурфактин является преобладающим липопептидом при 37 °C [59]. pH также является ключевым параметром. Его следует поддерживать на уровне около 7, а постоянное значение обычно приводит к наилучшей производительности для данного штамма. Значения pH ниже 6 приводят к более низкому накоплению сурфактина [60]. Подготовка инокулята влияет на лаг-фазу, скорость роста и активацию метаболического пути, следовательно, в конечном итоге на продуктивность. В целом общепризнано, что двухэтапная инокуляция наиболее эффективна [61,62], при этом первый этап длится 24 часа, а второй – менее 10 ч. Были исследованы размер и возраст инокулята; однако наилучший подход, по-видимому, сильно зависит от среды, деформации и критериев оценки. В целом, инокулят от 2 до 10 % (об./об.), который дает измерение оптической плотности от 0,1 до 1,5 при 600 нм, приводит к хорошей продуктивности [39,53]. Скорость перемешивания и аэрации также оказывает значительное влияние на производительность, так как оказывает прямое влияние на массоперенос кислорода. Оптимальное сочетание аэрации и перемешивания во многом зависит от стратегии процесса. В целом скорость воздушного потока выше 1 л/мин, как правило, невыгодна, поскольку образуется чрезмерное и

неконтролируемое пенообразование. Тем не менее, было показано, что введение в ферментационную среду твердых пористых носителей (например, активированного угля или полимерных подложек) позволяет эффективно иммобилизовать клетки и контролировать пенообразование. При этом поддержание частоты вращения мешалки на уровне 300 об/мин в сочетании с удельным расходом воздуха 1,5 л/мин на 1 л рабочего объёма культуральной жидкости (КЖ) обеспечивает оптимальный уровень массопереноса кислорода без разрушения бактериальной биомассы, что гарантирует максимальный выход конверсии субстрата и стабильный отвод целевого липопептида [39].

Согласно классическим представлениям, максимальная продукция липопептидов достигается в условиях интенсивного снабжения культуры растворенным кислородом, при этом производительность процесса напрямую коррелирует с объемным коэффицентом массопереноса кислорода [63,64]. Напротив, глубокий дефицит кислорода или полностью анаэробные условия традиционно рассматриваются как лимитирующий фактор, оказывающий ингибирующее воздействие на удельную скорость роста штаммов-продуцентов и снижающий итоговый титр целевого сурфактанта [53]. Однако современные исследования доказывают, что умеренное лимитирование по кислороду способно интенсифицировать продукцию сурфактина, выступая в роли триггера бактериального стресса и активируя экспрессию генов сурфактинсинтазы в анаэробных условиях [65,66]. На сегодняшний день разработаны и успешно внедряются эффективные альтернативные технологии полностью анаэробного получения липопептидных биосурфактантов [67].

Одной из ключевых проблем при получении липопептидов в жидких средах является пенообразование. Поскольку сурфактин является ПАВ, внутри биореактора активно происходит вспенивание. Уровень пенообразования часто бывает достаточным, чтобы вызвать переполнение сосуда, что приводит к потере среды и, следовательно, снижению биосинтеза продукта. На протяжении многих лет применялись различные стратегии для контроля или предотвращения пенообразования. Использование пеногасителя эффективно для предотвращения

пенообразования, однако оно усложняет последующие процессы и увеличивает общую стоимость производства [68]. Было показано, что оптимизация условий аэрации и перемешивания для исключения неконтролируемого перелива пены оказывается весьма успешной и рентабельной [39]. Хотя может быть достигнуто хорошее обогащение, максимально достижимый выход конкретной системы обычно не достигается.

Концентрирование целевого продукта и сохранение постоянного рабочего объема КЖ в производственном сосуде могут быть достигнуты путем сопряжения биореактора с выносной колонной пенного фракционирования [69,70]. В качестве альтернативного подхода для радикального снижения интенсивности пенообразования применяется метод химической оксигенации среды с использованием пероксида водорода в качестве дискретного источника растворенного кислорода [39]. Данная технологическая стратегия базируется на высокой внутриклеточной каталазной активности штаммов-продуцентов рода *Bacillus*, расщепляющих вносимый субстрат на воду и молекулярный кислород, что минимизирует необходимость интенсивного механического барботирования воздуха; тем не менее, для обеспечения стабильного и полностью контролируемого процесса ферментации по-прежнему требуется строго дозированное введение химических агентов-пеногасителей [39,54].

Было разработано несколько технологических систем, обеспечивающих беспенное получение целевого продукта. Например, ферментационные установки с вращающимися дисками гарантируют эффективную аэрацию биомассы, иммобилизованной в виде биопленки на их поверхности [71]. Альтернативным решением является интеграция воздухопроницаемых мембран для безымпульсного переноса кислорода непосредственно в объем жидкой фазы [72]. Однако существенным ограничением мембранных систем остается прогрессирующее обрастание самой аэрационной мембраны бактериальной биопленкой, что со временем критически снижает коэффициент массопереноса кислорода в объем КЖ.

Использование твердофазных и анаэробных подходов также позволяет полностью предотвратить неконтролируемое пенообразование. Твердофазное

культивирование представляет высокий коммерческий интерес в рамках концепции циркулярной биоэкономики: данные системы характеризуются низкими эксплуатационными расходами за счет минимального потребления воды и энергоносителей, а также базируются на вовлечении доступных твердых субстратов, в частности, крупнотоннажных отходов агропромышленного комплекса и зерноперерабатывающей промышленности [73,74]. Тем не менее, оба подхода (как анаэробный, так и твердофазный) демонстрируют существенно более низкую удельную производительность и итоговый титр сурфактина по сравнению с традиционными глубинными аэрируемыми установками, что обусловлено жесткими ограничениями по диффузии кислорода и отводу метаболического тепла при масштабировании процессов [54].

1.5 Перспективы применения биосурфактантов и проблемы промышленного внедрения

Попытки замещения синтетических сурфактантов биосурфактантами предпринимаются в различных отраслях промышленности. Например, некоторые производители уходовой косметики уже используют биосурфактанты [75]. Согласно Повестке Организации Объединённых Наций (ООН) в области ESG (Environmental, Social and Governance – экологические, социальные и управленческие критерии), опора на биосурфактанты представляется доступной альтернативой для достижения устойчивого потребления и производства [76]. Вовлечение возобновляемых источников энергии и использование отходов в качестве субстрата для продуцирующих ПАВ микроорганизмов потенциально минимизирует издержки, а низкая токсичность и биоразлагаемость конечного продукта могут представлять интерес для государственной поддержки [77].

Применение биосурфактантов в технологических процессах основывается не только на их «зелёном» происхождении, но и на характеристиках, эквивалентных или превосходящих химически синтезированные ПАВ [78]. Высокомолекулярные

биосурфактанты используются в качестве стабилизаторов для поддержания устойчивой эмульсионной системы, особенно в микробных методах увеличения нефтедобычи (ММУН) [79]. Низкомолекулярные сурфактанты рассматриваются в качестве биоремедиантов почв, загрязнённых тяжелыми металлами [80].

На данный момент накоплен большой объем данных, посвященных промышленному потенциалу гликолипидов и липопептидов. Гликолипиды изучены наиболее широко и детально, начиная с установления структуры рамнолипидов в 1965 г. и заканчивая определением таких групп соединений, как трегалолипиды, софоролипиды и липиды маннозилэритритола [81]. Эти соединения, представленные соответствующими остатками углеводов (рамноза, трегалоза, софороза, манноза и эритритол), являются вторичными метаболитами микроорганизмов родов *Rhodococcus, Pseudomonas, Candida* и *Pseudozyma* [81].

Практическое применение гликолипидных биосурфактантов обусловлено их уникальными физико-химическими и биологическими свойствами, среди которых ключевое значение имеют высокая эмульгирующая способность по отношению к гидрофобным субстратам в растворах и выраженная биоцидная активность. Они обладают доказанным противоопухолевым и антивирусным действием, а также эффективно вовлекаются в процессы санации и биоремедиации техногенно нарушенных почв, загрязненных тяжелыми металлами и сырой нефтью [82-84].

Наряду с гликолипидами, липопептиды также широко изучены и охарактеризованы. Они представлены липидными «хвостами» различной длины и «головами» из различных аминокислотных последовательностей, находящихся в замкнутой кольцевой структуре. Структура одного из наиболее распространённых липопептидов – сурфактина – была подтверждена аналитически в 1969 г. [47]. Наряду с сурфактином известны итурин, фенгицин, лихенизин и микосубтилин.

Преимущество итурина и фенгицина перед сурфактином было показано в экспериментах с подавлением роста и прорастания аскоспор возбудителя болезни банановых растений *Mycosphaerella fijiensis* [85]. Эти липопептиды, вместе с сурфактином, часто рассматриваются как противомикробные соединения. Однако

спектр их потенциальных применений весьма широк: от косметических средств до вовлечения в технологические циклы и добычу углеводородов.

Наибольшее внимание с точки зрения биотехнологического потенциала и технологичности извлечения традиционно уделяется ризосферным микроорганизмам. Ключевую роль в их жизнедеятельности, механизмах адаптации и процессах интерференции с растительными организмами играют поверхностно-активные метаболиты. Экзосекреция биосурфактантов ризобактериями выступает важнейшим фактором успешной колонизации корневой системы, модуляции локальных гидродинамических свойств почвы, а также индукции системной устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам [86]. Основная роль этих микроорганизмов заключается в воздействии на потенциальные патогены растений, подавлении их активности, что может быть использовано для создания биологически безопасных средств защиты растений [87]. Биосурфактантам придают ключевую роль в биоконтроле фитопатогенов: липопептидные антимикробные вещества (вискозинамид *P. fluorescens*) подавляют вирулентность *Xanthomonas oryzae* через ингибирование системы секреции типа III (T3SS) [88]. В полевых испытаниях штамм *B. subtilis* QST713 снижал заболеваемость томатов *Fusarium wilt* на 70 % за счет синергии биосурфактантов и индуцированной резистентности [89].

Перспективным направлением является нанокапсулирование биосурфактантов (например, хитозан-липосомальные носители) для пролонгированной защиты семян [90].

Бактерии способны продуцировать биосурфактанты не только для взаимодействия с растениями и другими микроорганизмами, но и для эмульгации углеводородов. Поверхностно-активные свойства этих соединений наиболее ярко проявляются при контакте с маслами или нефтью, что позволяет биосурфактантам находить применение в вопросах ремедиации нефтезагрязненных почв или шламов, содержащих углеводороды [2].

Такие способности к эмульгации нефти позволяют микроорганизмам использовать углеводороды в качестве источника питания, производя разобщение

конденсированных систем и ферментативное окисление. Для облегчения взаимодействия и увеличения площади соприкосновения с углеводородной фазой микроорганизмы интенсивно продуцируют биосурфактанты. Это особенно актуально при аварийных нефтяных разливах в почве, а также при обитании непосредственно в зоне, связанной с постоянным нахождением нефти – нефтяные коллекторы и другие участки месторождений [83].

Современные стратегии включают консорциумы бактерий-деструкторов (такие как *Acinetobacter, Rhodococcus*) и грибов (*Yarrowia lipolytica*), чья синергия повышает деградацию полициклические ароматических углеводородов (ПАУ) на 30-50 % [91]. Метагеномные исследования нефтяных коллекторов выявили доминирование генов *alkB* (окисление алканов) и *rhs* (синтез рамнолипидов) в сообществах с высокой деградационной активностью [92].

Инновационным подходом является иммобилизация биосурфактантов на магнитных наночастицах (Fe_3O_4) для направленной доставки в зоны загрязнения [93]. Полевые испытания рамнолипидов *Pseudomonas sp.* P-1 показали снижение содержания нефтепродуктов в почве на 89 % за 12 нед. [29].

Нативные микробные сообщества нефтяных коллекторов отличаются высокой способностью к продукции биосурфактантов, что позволяет использовать их для извлечения и наращивания в биотехнологических процессах, включая задачи, направленные на эмульгирование нефтей [94]. Нефтезагрязненные экосистемы служат уникальным источником микроорганизмов, адаптированных к деградации углеводородов. Нативные бактерии нефтяных коллекторов (например, *Acinetobacter, Rhodococcus, Pseudomonas*) обладают специализированными ферментативными системами (алканазы, цитохром P450) и усиленной экспрессией генов синтеза биосурфактантов (например, *alkB, rhs, srfA)* [95]. Метагеномные исследования нефтяных месторождений Китая (*Daqing*) выявили доминирование генов *almA* (окисление длинноцепочечных алканов) и *ndoB* (деградация нафталина) в микробных сообществах, что коррелирует с их высокой каталитической активностью [96]. Например, штаммы, выделенные из нефтезагрязненных почв, продуцируют рамнолипиды с критической концентрацией мицеллообразования

(ККМ) 25 мг/л, что на 30 % эффективнее лабораторных аналогов [97]. Они представляют интерес для биотехнологии, так как их метаболизм оптимизирован для работы в условиях высоких концентраций токсинов и дефицита кислорода [95].

Выделение и селекция микроорганизмов-деструкторов углеводородов традиционно базируются на методах накопительного культивирования с использованием сырой нефти или отдельных ПАУ в качестве единственного источника углерода и энергии. Так, в исследовании ученых из Индии из техногенно нарушенных почв были изолированы высокоэффективные углеводородокисляющие штаммы *Bacillus* spp., способные к биодеструкции до 76,4 % асфальтенов – наиболее устойчивой и высокомолекулярной фракции нефти [98]. Данный процесс протекает параллельно с активным синтезом эндогенных липопептидных биосурфактантов, которые солюбилизируют гидрофобные компоненты и значительно повышают эффективность очистки сред от общих нефтяных углеводородов. Современные методологические подходы успешно сочетают классические микробиологические методы с высокопроизводительными омиксными технологиями: метагеномный скрининг позволяет осуществлять точную таксономическую идентификацию доминантных биодеструкторов (например, *Alcanivorax borkumensis*), а метатранскриптомный анализ обеспечивает картирование активных метаболических путей и оценку уровня экспрессии функциональных генов (в частности, *alkH, catA*) [99].

Важным этапом является оптимизация условий культивирования. В работе [100] показано, что добавление 5 мМ нитратов и 0,1 % дрожжевого экстракта увеличивает продукцию биосурфактантов *Rhodococcus erythropolis* S67 на 40 %. Полевые испытания консорциума из *Pseudomonas putida* и *Acinetobacter johnsonii* в нефтезагрязненных почвах Нигерии продемонстрировали снижение содержания углеводородов на 92 % за 60 дней [101]. Однако успех зависит от физико-химических параметров среды: pH (оптимум 6,5-7,5), температура (25-35 °C) и наличие ко-загрязнителей (тяжелые металлы) [95].

1.5.1 Сельское хозяйство: биоконтроль и стимуляция растений

Сельскохозяйственное производство сталкивается с необходимостью снижения химической нагрузки на агроэкосистемы при сохранении высоких урожаев. Химические пестициды, широко применяемые для борьбы с фитопатогенами, вызывают резистентность у патогенных микроорганизмов, накапливаются в почве и растениях и оказывают токсическое действие на нецелевые организмы и человека [102]. В этой связи всё большее внимание уделяется экологически безопасным альтернативам, среди которых особое место занимают биосурфактанты – амфифильные метаболиты микроорганизмов, обладающие фунгицидными, бактерицидными и элиситорными свойствами.

Липопептиды, продуцируемые бактериями рода *Bacillus* (в первую очередь сурфактин, фенгицин и итурин), являются одними из наиболее изученных и эффективных агентов биоконтроля фитопатогенных грибов и бактерий. Механизм их антифунгального действия основан на нарушении целостности клеточных мембран. Сурфактин, содержащий гидрофобный жирнокислотный хвост и гидрофильный пептидный цикл, встраивается в липидный бислой, формирует трансмембранные поры и вызывает неконтролируемый выход ионов, АТФ (аденозинтрифосфорная кислота) и низкомолекулярных метаболитов, что приводит к осмотическому лизису и гибели грибных клеток [65]. Итурин и фенгицин действуют синергически с сурфактином, усиливая его мембранотропную активность и расширяя спектр подавляемых патогенов [85]. Показано, что комбинация этих липопептидов эффективна против таких опасных фитопатогенов, как *F. oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* и *Mycosphaerella fijiensis*.

Помимо прямого антимикробного действия, липопептиды способны индуцировать системную устойчивость растений. Сурфактин активирует сигнальные пути, опосредованные салициловой и жасмоновой кислотами, что приводит к накоплению защитных ферментов – пероксидазы, полифенолоксидазы, фенилаланинаммиаклиазы, хитиназы и β-1,3-глюканазы – а также к синтезу фенольных соединений и лигнина [89]. В результате повышается устойчивость

растений как к биотическим (грибные, бактериальные и вирусные инфекции), так и к абиотическим стрессам (засоление, засуха, тяжелые металлы).

Полевые испытания штамма *B. subtilis* QST713, продуцирующего комплекс липопептидов, показали снижение заболеваемости томатов фузариозным увяданием (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) на 70 % по сравнению с необработанным контролем. Эффект был обусловлен как прямым фунгицидным действием, так и индукцией системной устойчивости. Европейский проект «Interreg IV Phytobio» подтвердил фитосанитарную эффективность липопептидов для защиты посевов редьки, сои и салата от широкого спектра патогенов [103]. В условиях исследований *in vivo* и *in vitro* было экспериментально доказано высокое фунгицидное и антибиопленочное действие сурфактина и его металлокомплексов: обработка липопептидами в рабочих концентрациях до 1,0 мг/мл обеспечивает эффективное подавление альтернариоза растений и гнили плодов, снижая уровень поражения патогеном *Alternaria alternata* на 80-90 % [104,105].

Важным свойством сурфактина является его способность к хелатированию ионов тяжелых металлов. Сурфактин образует стабильные комплексы с Cd^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+} и Zn^{2+}, снижая их подвижность в почве и уменьшая поглощение токсичных металлов растениями [106]. Это открывает перспективы использования липопептидных биопрепаратов для фиторемедиации загрязнённых земель и восстановления почвенного микробиома.

Рамнолипиды, продуцируемые бактериями рода *Pseudomonas*, также демонстрируют высокую антифунгальную и антибактериальную активность. Обработка семян кукурузы раствором рамнолипидов (50 мг/л) полностью подавляла развитие фузариоза, вызванного *F. verticilloides*, увеличивала всхожесть и биомассу растений по сравнению с контрольной группой [107]. Рамнолипиды эффективно ингибируют рост и споруляцию *Colletotrichum capsici* – возбудителя антракноза перца, а также предотвращают развитие инфекции на отделённых плодах при хранении. Механизм действия включает разрушение мембран мицелия, уменьшение подвижности спор и их коллапс [108].

Важно отметить, что рамнолипиды не проявляют фитотоксичности в отношении проростков томатов, пшеницы, сорго, вигны и перца при концентрациях, эффективных против патогенов. Напротив, синтетический эмульгатор Твин 20 при аналогичных концентрациях ингибирует прорастание семян и рост корней всех тестируемых культур [109]. Это подтверждает экологическую безопасность рамнолипидов как средств защиты растений.

Помимо непосредственной защиты растений, биосурфактанты находят применение в технологиях переработки сельскохозяйственных отходов. Добавление рамнолипидов к растительным остаткам при вермикомпостировании с использованием дождевых червей *Eisenia fetida* ускоряет деструкцию лигноцеллюлозных субстратов, повышает численность червей и активность почвенной микробиоты, увеличивает содержание доступного азота, фосфора и калия в готовом биогумусе [110]. Благодаря солюбилизирующей способности рамнолипидов труднорастворимые компоненты пищевых и сельскохозяйственных отходов (жиры, лигнин, целлюлоза) переходят в водную фазу, становясь биодоступными для микроорганизмов-деструкторов, что критически важно для интенсификации биоконверсии органического сырья [111].

Кроме того, рамнолипиды могут использоваться для обработки отходов животноводства, например, шерсти и кожевенного сырья. Предварительная обработка рамнолипидами улучшает смачиваемость и удаляет липидные загрязнения, что облегчает последующую ферментативную деградацию кератиновых волокон бактериями *B. subtilis* и *Streptomyces albidoflavus* [112].

Перспективным вектором развития технологий точного земледелия является нанокапсулирование биосурфактантов, направленное на обеспечение пролонгированной защиты семенного материала и вегетирующих растений. Применение гибридных наноструктурированных хитозановых носителей позволяет оптимизировать кинетику контролируемого высвобождения липопептидов непосредственно в ризосфере, что значительно увеличивает продолжительность их защитного фунгицидного действия и снижает эффективную норму внесения препаратов [113].

Параллельно обоснована целесообразность иммобилизации биосурфактантов и штаммов-продуцентов на пористых углеродных матрицах (в частности, на биоугле), что позволяет создавать многофункциональные препараты для улучшения почвенного плодородия с выраженными протекторными свойствами [114]. Высокая удельная площадь поверхности и развитая система пор таких носителей стабилизируют адсорбированные амфифильные молекулы, предотвращая их преждевременную микробную и гидролитическую деструкцию в эдафических системах и обеспечивая стабильный антифитопатогенный фон.

Промышленное применение биосурфактантов в агросфере также требует стандартизации товарных форм – чаще всего используется КОФ как наиболее технологичный и стабильный препарат, сохраняющий фунгицидную активность в течение длительного хранения и пригодный для включения в состав комплексных защитных составов [115].

Таким образом, липопептиды и рамнолипиды представляют собой эффективную и экологически безопасную альтернативу химическим пестицидам, например, фунгицидам. Липопептиды более предпочтительны для индукции системной устойчивости растений, хелатирования тяжелых металлов и борьбы с широким спектром фитопатогенов. Рамнолипиды проявляют высокую прямую антимикробную активность и дополнительно усиливают вовлечение органических отходов в промышленный цикл, что делает их ценным компонентом систем защиты растений и управления отходами в агропромышленном комплексе.

1.5.2 Нефтедобыча и биоремедиация

Поверхностно-активные свойства биосурфактантов наиболее ярко проявляются при контакте с маслами или нефтью. Они способны эмульгировать углеводороды, повышая их биодоступность для микроорганизмов-деструкторов, что делает их эффективными инструментами для ликвидации разливов нефти и биоремедиации загрязнённых почв и грунтовых вод.

Рамнолипиды являются одними из наиболее изученных гликолипидных биосурфактантов для нефтяных применений. Показано, что они ускоряют биодеградацию сырой нефти в морской среде, не оказывая токсического действия на естественную микрофлору [116,117]. Рамнолипиды повышают растворимость и десорбцию углеводородов, а также стимулируют биодеструкцию бензола, толуола, этилбензола и ксилола в грунтовых водах [118]. Кроме того, длинноцепочечные конгенеры рамнолипидов способны эмульгировать тяжелый вакуумный газойль, что облегчает его последующую переработку [119,120]. В опытах по повышению нефтеотдачи рамнолипиды *P. aeruginosa* NCIM 5514 успешно мобилизовали остаточную нефть, демонстрируя перспективность применения в биологических методах увеличения нефтедобычи [121].

Современные стратегии экологической биоремедиации техногенно нарушенных эдафических систем базируются на использовании многокомпонентных микробных консорциумов. Межцарственный метаболический синергизм между бактериями-деструкторами и углеводородокисляющими грибными культурами позволяет существенно интенсифицировать ко-метаболизм ПАУ, повышая общую степень деградации контаминантов на 30-50 % за счет эффективного взаимодополнения ферментативных каскадов [122].

Наряду с этим, применение методов метагеномного профилирования и анализа стабильных изотопов при исследовании загрязненных почв различного географического расположения выявило доминирование и высокую активность функциональных генов, ответственных за терминальное окисление алканов (*alkB*, *almA*) и ключевые пути деструкции ароматических субстратов (в частности, диоксигеназ ПАУ, путей расщепления салицилата и фталата), что на молекулярно-генетическом уровне подтверждает определяющую роль данных ферментативных систем и ассоциированных с ними ПАВ в процессах природной и индуцированной санации нефтезагрязненных территорий [92,123].

Инновационным направлением интенсификации процессов выделения и очистки является конъюгирование биосурфактантов с функциональными материалами. В частности, иммобилизация рамнолипидов на магнитных

наночастицах оксида железа обеспечивает возможность их таргетной доставки в зоны локализации поллютантов под действием внешнего электромагнитного поля. Полевые и полупромышленные испытания подтвердили высокую эффективность данной технологической схемы, наблюдалось снижение содержания общих нефтяных углеводородов в почве на 89 % за 12 недель экспозиции [122].

Значительный биотехнологический интерес представляют аборигенные микроорганизмы нефтяных коллекторов, изолированные на селективных средах с углеводородным питанием. Нативные штаммы-продуценты способны секретировать рамнолипидные комплексы с экстремально низкой критической концентрацией мицеллообразования (до 25 мг/л), что в среднем на 30 % превосходит поверхностно-активные характеристики коммерческих и стандартных лабораторных аналогов [124]. При этом оптимизация гидродинамических и трофических условий культивирования (путем дробного внесения неорганических нитратов и дрожжевого экстракта в качестве факторов роста) позволяет увеличить итоговый титр целевых биосурфактантов на 40 % и более [39].

Поверхностно-активные свойства амфифильных микробных метаболитов наиболее рельефно проявляются на гетерогенной границе раздела сред «углеводород – вода». Молекулы биосурфактантов эффективно эмульгируют компоненты сырой нефти и иные гидрофобные жидкости, переводя их в мелкодисперсное состояние и кардинально повышая их биодоступность для ферментативных систем микроорганизмов-деструкторов [125].

Кроме того, за счет адсорбции на межфазных границах данные соединения снижают межфазное натяжение в поровых пространствах коллекторов, обеспечивая изменение смачиваемости породы и облегчая вытеснение остаточных пленок нефти. Благодаря сочетанию указанных коллоидно-химических характеристик биосурфактанты находят широкое применение в двух крупномасштабных направлениях современной экологической и промышленной биотехнологии: в технологиях ММУН и при глубокой биоремедиации нефтезагрязненных почвенных и водных экосистем [126].

Эффективность биосурфактантов в процессах извлечения и деградации углеводородов обусловлена тремя основными механизмами, такими как:

1) Снижение межфазного натяжения, когда биосурфактант адсорбируются на границе «вода – нефть», уменьшая капиллярные силы, удерживающие нефть в порах. Для рамнолипидов минимальное межфазное натяжение может достигать 0,1-1,0 мН/м, что сопоставимо с синтетическими ПАВ, используемыми в заводнении [121]. Циклические липопептиды (в частности, сурфактин) способны эффективно снижать межфазное натяжение на границе раздела жидких фаз до уровня 0,05-1,5 мН/м при низких рабочих концентрациях, обеспечивая изменение смачиваемости породы и высокую степень десорбции остаточной нефти [126,127]. Следует отметить, что в мицеллярных растворах амфифилов величина межфазного натяжения на границе с углеводородной фазой демонстрирует прямую корреляционную зависимость от значений поверхностного натяжения на границе «жидкость – воздух»; по этой причине в рутинной лабораторной практике скрининга штаммов и экспресс-контроля стабильности ПАВ измерение поверхностного натяжения выступает эквивалентным и наиболее репрезентативным физико-химическим маркером [127].

2) Изменение смачиваемости породы. При адсорбции биосурфактантов на поверхности породообразующих минералов происходит инверсия их гидродинамического статуса – переход от нефтесмачиваемого состояния к водосмачиваемому, что существенно облегчает вытеснение остаточной нефти вытесняющим агентом. Рамнолипиды эффективно модифицируют краевой угол смачивания карбонатных и песчаных коллекторов, обеспечивая его снижение с исходных 140-160° (характерных для гидрофобизированной нефтью поверхности) до 40-60° (перевод матрицы в гидрофильное состояние) при низких рабочих концентрациях целевого амфифила [125].

3) Эмульгирование и солюбилизация. Биосурфактанты стабилизируют эмульсии «нефть в воде», что увеличивает площадь контакта углеводородов с микробными клетками и ферментами, ускоряя биодеградацию. Индекс эмульгирования (E24) для рамнолипидов может достигать 80-90 % для сырой нефти

и 60-75 % для дизельного топлива. Высокая устойчивость таких эмульсий препятствует обратному слиянию капель нефти и удерживает углеводороды в мелкодисперсном состоянии, обеспечивая их постоянную доступность для бактерий-деструкторов [116].

В лабораторных моделях (песчаные колонки, керны) биосурфактанты демонстрируют дополнительное извлечение нефти на уровне 15-50 % от остаточной нефтенасыщенности. Так, рамнолипиды *P. aeruginosa* NCIM 5514 при концентрации 0,5 % увеличивали нефтеотдачу на 31 % в песчаных колонках [121]. В условиях фильтрационных экспериментов на насыпных песчаных колонках, моделирующих пористую структуру пласта, применение супернатантов штаммов *B. subtilis* обеспечивало дополнительное вытеснение остаточной нефти от 6 до 24 % от начального объема, что обусловлено сочетанным эффектом снижения вязкости флюида и уменьшения капиллярного давления под действием продуцироуемого клетками сурфактина [128].

Однако широкое промышленное внедрение технологий ММУН на основе биосурфактантов сдерживается комплексом лимитирующих факторов: экстремальной вариабельностью пластовых условий (температурные градиенты, ультравысокая минерализация, барические нагрузки), риском термической деструкции некоторых амфифилов при температурах выше 80 °C, а также высокой рыночной стоимостью стадий глубокой очистки препаратов. В связи с этим экономически и технологически перспективным вектором является переход от очищенных коммерческих форм к использованию живых нативных клеток-продуцентов (в рамках технологий внутрипластового заводнения) или неочищенных сырых кислотоосаждённых фракций (КОФ) [129]. Обладая существенно более низкой себестоимостью, такие поликомпонентные фракции демонстрируют высокую агрегативную устойчивость к солевому стрессу и сохраняют поверхностную активность в жестких термобарических условиях реального коллектора за счет синергетического стабилизирующего эффекта сопутствующих метаболитов [130].

Биосурфактанты существенно интенсифицируют процессы очистки сред, ускоряя биодеградацию углеводородов в 2-5 раз по сравнению с контрольными группами [58]. Рамнолипиды эффективно удаляют нефтепродукты из загрязнённых почв: добавление 0,1-0,5 % рамнолипида увеличивало деградацию общих нефтяных углеводородов на 23-40 % за 4-8 нед. [131]. Полевые испытания рамнолипидов *Pseudomonas* sp. подтвердили высокую эффективность метода, зафиксировав снижение содержания нефтепродуктов в почвенном матриксе на 89 % за 12 недель экспозиции [132].

Кроме того, биосурфактанты применяются для очистки грунтовых вод от летучих ароматических углеводородов (бензол, толуол, этилбензол, ксилол). Рамнолипиды повышают растворимость этих углеводородов в воде, что стимулирует их биодеградацию аборигенной микрофлорой [118]. Они также способны эмульгировать и солюбилизировать тяжёлые фракции нефти, включая асфальтены и смолы, которые обычно трудно поддаются биодеструкции [119,120].

Современные стратегии биоремедиации включают использование консорциумов бактерий-деструкторов и грибов, а также иммобилизацию биосурфактантов на магнитных наночастицах для направленной доставки в зоны загрязнения [93]. Метагеномный анализ нефтяных коллекторов выявил доминирование генов, кодирующих синтез биосурфактантов (*rhs, srfA*), что подтверждает их ключевую роль в природной деградации нефти [92,96].

Основным аргументом в пользу биосурфактантов является их биоразлагаемость и низкая токсичность по сравнению с синтетическими ПАВ. В отличие от алкилбензолсульфонатов и неонолов, которые накапливаются в окружающей среде и токсичны для гидробионтов. Тогда как концентрация токсиканта в воде, вызывающая изменение тест-реакции тест-объектов на 50 % (EC_{50}) для *Daphnia magna* находится в диапазоне 1-50 мг/л, биосурфактанты разлагаются микроорганизмами на 60-90 % за 7-28 дней и обладают EC_{50} >100 мг/л [133]. Рамнолипиды и липопептиды относятся к 3-му классу опасности (умеренно опасные) согласно ГОСТ 32536–2020 и не вызывают длительных экологических последствий.

Однако количественных данных о скорости биодеградации биосурфактантов в реальных пластовых условиях недостаточно. Большинство исследований проведены в лабораторных микро- и мезокосмах, и экстраполяция на масштабы месторождений требует осторожности. Также остаётся открытым вопрос о влиянии биосурфактантов на аборигенные микробные сообщества нефтяных коллекторов – возможны как стимуляция, так и подавление отдельных групп микроорганизмов. Эти пробелы определяют актуальность дальнейших исследований в области экологической безопасности биосурфактантов при их промышленном применении.

Для применений в нефтедобыче гликолипидные биосурфактанты считаются наиболее предпочтительными. Они обладают более высокой эмульгирующей способностью по отношению к алканам и ароматическим углеводородам, лучше работают при повышенной солёности (до 10-15 % NaCl) и сохраняют активность в диапазоне температур 20-60 °C. Липопептиды эффективнее снижают поверхностное натяжение (до 23-27 мН/м при ККМ 0,01-0,1 г/л) и лучше изменяют смачиваемость пород, но оказываются более чувствительны к высоким температурам и солёности. Кроме того, липопептиды склонны к сорбции на породе, что снижает их эффективность в третичном заводнении [134]. Важно отметить, что неочищенная КОФ часто демонстрирует более высокую эффективность в вытеснении остаточной нефти по сравнению с очищенным препаратом, в виду содержания сопутствующих амфифильных метаболитов (липопептидов, жирных кислот, фосфолипидов), которые соосаждаются в процессе подкисления и усиливают действие основного биосурфактанта [129].

Так, рамнолипиды являются более универсальными агентами для ММУН и биоремедиации, в то время как липопептиды могут быть эффективны в специфических условиях (низкая солёность, умеренные температуры). Дальнейшие исследования должны быть направлены на оптимизацию составов биосурфактантных композиций, снижение себестоимости и оценку их долгосрочного экологического воздействия.

1.5.3 Альтернативные области применения биосурфактантов

Биосурфактанты находят применение и за пределами сельского хозяйства и нефтяной промышленности. Их высокая биоразлагаемость, низкая токсичность и способность к самоорганизации в мицеллярные структуры делают их привлекательными для ряда отраслей, где традиционные синтетические ПАВ вызывают экологические и токсикологические риски.

Косметическая промышленность стала одним из первых секторов, коммерчески внедривших биосурфактанты. Рамнолипиды, софоролипиды и маннозилэритритоллипиды используются в рецептурах шампуней, гелей для душа, кремов и средств для снятия макияжа как мягкие пенообразователи, эмульгаторы и солюбилизаторы ароматических масел [75]. Преимущества биосурфактантов перед синтетическими аналогами (например, лаурилсульфат натрия) включают отсутствие раздражения кожи и слизистых, а также улучшенную биосовместимость. Крупные косметические бренды (например, Ecover, L'Oréal, BASF) уже внедрили биосурфактантные компоненты в свою продукцию, что подтверждает их технологическую и экономическую приемлемость.

Пищевая промышленность использует биосурфактанты как натуральные эмульгаторы для стабилизации жировых компонентов в соусах, майонезах, мороженом и кондитерских изделиях [2,135-137]. Кроме того, биосурфактанты обладают антимикробной активностью, что позволяет продлевать срок годности пищевых продуктов без добавления синтетических консервантов. Показано, что сурфактин ингибирует рост пищевых патогенов, таких как *Listeria monocytogenes, Salmonella enterica* и *B. cereus*, как в жидких, так и в поверхностных биоплёнках [26]. В молочной промышленности рамнолипиды предотвращают образование биоплёнок *Pseudomonas* spp. и *Bacillus* spp. на оборудовании, снижая риск вторичного обсеменения. Однако применение биосурфактантов в пищевых продуктах требует тщательной оценки их органолептических свойств (привкус, запах) и долгосрочной токсичности, что пока ограничивает их широкое внедрение.

Медицинская сфера представляет собой быстро развивающуюся, но пока преимущественно доклиническую область применения биосурфактантов. Липопептиды (особенно сурфактин и его аналоги) проявляют широкий спектр биологической активности. Так, сурфактин эффективен против грамположительных бактерий, включая метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus*, а также демонстрирует синергизм с традиционными антибиотиками [138]. Механизм действия включает агрегацию липопептида в клеточной мембране с образованием пор и последующим лизисом бактериальной клетки.

Кроме того, известно, что сурфактин инактивирует вирусы с липидной оболочкой, включая вирус гриппа, герпеса и коронавирусы, в том числе SARS-CoV-2, разрушая их суперкапсид [139]. Предполагается, что мембранотропный механизм менее подвержен развитию резистентности по сравнению с ингибиторами вирусных белков.

На моделях системного эндотоксинового шока и индуцированного липополисахаридами цитокинового шторма применение сурфактина обеспечивало достоверное снижение уровня экспрессии ключевых провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-6) и защищало внутренние органы от повреждения за счет модуляции рецепторных каскадов и ингибирования путей воспаления [140]. Рамнолипиды также демонстрируют противовоспалительные свойства, но их механизм менее изучен. Также известно, что и ди- и монорамнолипиды и сурфактин индуцируют апоптоз в клетках рака молочной железы, шейки матки и глиобластомы *in vitro* [84]. Предполагается, что эффект связан с избирательным разрушением мембран раковых клеток за счет их повышенной текучести по сравнению с нормальными клетками. Однако до клинических испытаний ещё далеко из-за низкой стабильности и потенциальной гемолитической активности.

Кроме того, биосурфактанты используются в производстве биодизеля и биоэтанола для эмульгирования гидрофобных субстратов и повышения доступности целлюлозных материалов для ферментов [137]. В горнодобывающей промышленности их исследуют как добавки к флотореагентам для обогащения руд. В сельском хозяйстве, помимо защиты растений, биосурфактанты применяются

как адъюванты для пестицидов, улучшая смачивание листовой поверхности и проникновение действующих веществ.

В горнодобывающей отрасли биосурфактанты рассматриваются как экологически безопасная альтернатива синтетическим флотореагентам (например, ксантогенатам и аминам), которые токсичны и слабо разлагаются в окружающей среде [141]. Благодаря амфифильной природе биосурфактанты способны селективно адсорбироваться на поверхности минеральных частиц, изменяя их гидрофобность и смачиваемость, что повышает эффективность флотации руд цветных и редкоземельных металлов [142]. Показано, что рамнолипиды и липопептиды успешно применяются при флотации сульфидных медных и свинцово-цинковых руд, а также при обогащении фосфоритов и углей, обеспечивая извлечение ценных компонентов на уровне, сопоставимом с традиционными реагентами, но при значительно меньшей экологической нагрузке [143]. Кроме того, микробные гликолипиды исследуются в качестве реагентов для извлечения металлов из низкосортного и вторичного минерального сырья, включая хвосты горнодобывающего производства и металлургические отходы [144]. Это направление особенно перспективно для вовлечения в переработку техногенных месторождений и отходов горно-обогатительных комбинатов, что согласуется с принципами циркулярной экономики и снижения токсичных стоков.

Согласно Повестке ООН в области ESG, опора на биосурфактанты является доступной альтернативой для достижения устойчивого потребления и производства [76]. Однако их широкому промышленному внедрению препятствуют высокая стоимость очищенных форм, нестабильность при хранении и отсутствие стандартизированных протоколов контроля качества. Тем не менее, для косметики и пищевых добавок уже существуют положительные заключения Европейского агентства по безопасности продуктов (EFSA) и Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для некоторых типов биосурфактантов (например, софоролипидов).

Биосурфактанты демонстрируют потенциал в косметике, пищевой промышленности и медицине, но их промышленное применение пока ограничено

доклинической стадией, за исключением нескольких успешных коммерческих примеров. Наиболее перспективными считаются гликолипиды (рамнолипиды, софоролипиды) для косметики и пищевых эмульгаторов, а липопептиды – для разработки новых антибиотиков и антивирусных препаратов. Несмотря на обнадёживающие результаты, большинство медицинских применений находятся на стадии *in vitro* или ранних *in vivo* испытаний, что требует дальнейших инвестиций в доклинические исследования и разработку стабильных лекарственных форм.

1.5.4 Методы оценки биологической активности биосурфактантов

Одним из важных направлений применения биосурфактантов в сельском хозяйстве является их использование в качестве биопестицидов для защиты растений от фитопатогенных грибов. Биосурфактанты разрушают мембраны грибковых клеток, что приводит к повышению проницаемости и, в конечном итоге, к гибели клеток [145]. Для оценки ингибирующего действия биосурфактантов в отношении фитопатогенов применяются различные методы, среди которых наиболее распространены тесты на твердых питательных средах и испытания на растительных субстратах. Одним из классических *in vitro* методов является метод диффузии агара, обеспечивающий надежное измерение зон подавления роста грибов вокруг дисков, пропитанных биосурфактантами. Этот способ характеризуется высокой чувствительностью и воспроизводимостью [145].

Примером такого подхода служит исследование с биосурфактантом *B. licheniformis*, который продемонстрировал противомикробную активность в отношении различных грамположительных бактерий видов *B. subtilis, B. thuringiensis, B. cereus, S. aureus* и *Listeria monocytogenes*, грамотрицательных бактерий видов *P. aeruginosa, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Proteus vulgaris* и *Klebsiella pneumoniae* и дрожжей вида *Candida albicans* [146].

Другим методом оценки воздействия биосурфактантов на фитопатогены является их тестирование на различных растительных субстратах – листьях,

плодах, целых растениях. Например, применение липопептидов *B. subtilis* SPB1 позволило уменьшить симптомы заболевания у инфицированных плодов томатов почти на 100 % при концентрации 3 мг/мл [147].

Аналогично, эксперимент Галиевой Г.Ш. с соавторами [148] показал, что применение биосурфактантов *in vitro* для обработки листьев томата полностью ингибировала рост *F. oxysporum* и снизила рост мицелия *Alternaria* spp. в 11,5 раз при концентрации 1000 мг/л. В эксперименте *in vivo* применение биосурфактанта в той же концентрации снижало степень поражения листьев растений томата в 2,1-2,6 раз и листьев пшеницы в 1,6-2,0 раз для *F. oxysporum* и *Alternaria* spp, соответственно [148]. Биосурфактанты продуцируемые штаммами *P. fluorescens* BPP 039T и BPP 021V показали способность снижал уровень заражения патогеном *Phytophthora infestans* на листьях картофеля на 78,7-79,9 % *in vitro* и на 30,2-38,5 % *in vivo*, соответственно [149].

Совместное применение методов оценки подавления патогенов как на питательных культурах, так и на живых тканях, позволяет учитывать взаимодействие биосурфактантов с поверхностью растительных тканей и их способность проникать в ткани. Таким образом, методы оценки антифунгальной активности биосурфактантов на твердых питательных средах и растительных субстратах являются эффективными инструментами для скрининга и отбора наиболее перспективных штаммов-продуцентов и биосурфактантов для разработки биопестицидных препаратов.

1.5.5 Проблемы при разработке промышленной технологии получения биосурфактантов

Несмотря на очевидные преимущества биосурфактантов перед синтетическими аналогами, их широкое промышленное внедрение остаётся ограниченным. Основные препятствия носят комплексный характер и включают технологические, экономические и логистические аспекты.

Продуктивность большинства описанных в литературе штаммов-продуцентов не превышает 1-5 г/л биосурфактанта, что значительно ниже теоретически достижимых значений (до 50-100 г/л для рекомбинантных штаммов) [37]. Основными причинами являются катаболитная репрессия, субстратное ингибирование, токсичность продукта для клеток, а также интенсивное пенообразование, особенно при культивировании *Bacillus* spp. на глюкозосодержащих субстратов [38,39]. Масштабирование процесса от лабораторной колбы до пилотного или промышленного ферментёра часто сопровождается снижением удельной продуктивности, что связано с изменением гидродинамических условий, появлением градиентов концентраций растворённого кислорода и субстратов, а также с механическим стрессом, повреждающим клетки [137]. Для анаэробных или факультативно анаэробных продуцентов (например, некоторых *Bacillus* spp.) поддержание строгого анаэробиоза в большом объёме представляет определенную техническую сложность [128].

Себестоимость очищенных биосурфактантов (сурфактин, рамнолипиды) составляет 100-500 долларов за 1 кг, что в 5-10 раз дороже синтетических ПАВ (неонолы, алкилбензолсульфонаты). Основные статьи затрат – стоимость питательных сред (источники углерода и азота, витамины) и последующая обработка (центрифугирование, экстракция, хроматографическая очистка) [150,151]. Использование дешёвых возобновляемых субстратов – мелассы, отходов пищевых производств, отработанных растительных масел, гидролизатов сельскохозяйственной биомассы – позволяет снизить затраты на сырьё в 5-10 раз [57,58]. Однако такие субстраты нестандартизованы, содержат ингибиторы и балластные вещества, что требует адаптации штаммов и гибких технологических схем.

КЖ – наименее обработанная форма – эффективна *in vitro*, но имеет короткий срок годности (несколько суток при 4 °C) и требует охлаждения при транспортировке, что нерентабельно при удалённых производствах. Кроме того, низкая концентрация активного вещества (0,1-1 г/л) делает неприемлемым её использование в нефтепромысловых технологиях, где требуется большой объём

закачиваемой жидкости [129]. Напротив, очищенные препараты (лиофилизаты с содержанием активного вещества 80-99 %) стабильны при длительном хранении и легко дозируются, но их стоимость и сложность получения ограничивают применение [152,153].

Компромиссным решением для ряда применений (агрозащита, нефтеотдача) является КОФ, которая сочетает достаточную поверхностную активность с низкой себестоимостью, что подтверждается экспериментами по нефтевытеснению и биоконтролю [115,129]. КОФ получают методом изоэлектрического осаждения при подкислении культуральной жидкости до pH 2,0-3,0 с последующим отделением осадка центрифугированием или фильтрацией. Конечный продукт представляет собой пастообразный концентрат или порошок с содержанием активного биосурфактанта от 5 до 30 % (в зависимости от кратности промывки).

К ключевым технологическим преимуществам КОФ относится низкая рыночная стоимость, обусловленная исключением из процессов выделения и очистки биосурфактантов дорогостоящих органических растворителей, сорбентов и мембранных модулей. Важным аспектом является сохранение нативного синергетического комплекса метаболитов: соосаждающиеся липопептиды, гликолипиды, свободные жирные кислоты и фосфолипиды способны совместно усиливать общую поверхностную (межфазную) активность и антимикробные свойства препарата [154]. Кроме того, КОФ характеризуется удовлетворительной стабильностью (продукт может храниться при комнатной температуре в течение нескольких месяцев без потери функциональных свойств, что критично для удаленных фермерских хозяйств и нефтяных месторождений) и простотой масштабирования, поскольку технология легко реализуется на стандартном промышленном оборудовании (реакторы-осадители, фильтр-прессы) [155].

Существенным недостатком КОФ является присутствие примесных компонентов (минеральных солей, балластных белков, липополисахаридов клеточных стенок), что в ряде отраслей (например, в фармакологии и медицине) недопустимо; однако при защите растений и в технологиях ММУН чистота биосурфактанта не выступает лимитирующим параметром.

Отдельную группу проблем составляют регуляторные и нормативные ограничения. В Российской Федерации отсутствуют специализированные технические условия (ТУ) и ГОСТы на биосурфактанты как на самостоятельную товарную продукцию, что затрудняет их регистрацию и сертификацию для применения в пищевой, косметической и медицинской отраслях. Для сельского хозяйства и нефтедобычи требуется разработка отраслевых регламентов, учитывающих специфику биологических препаратов (нестабильность, вариабельность состава, чувствительность к условиям хранения). Кроме того, существующие санитарные правила (СанПиН 3.3686-21) предъявляют жёсткие требования к работе с микроорганизмами даже IV группы патогенности, что увеличивает затраты на организацию производственных площадей и системы стерилизации. Отсутствие гармонизированных методик контроля качества и межлабораторных сравнительных испытаний также сдерживает внедрение биосурфактантов в промышленность.

Разработка эффективной биотехнологии получения биосурфактантов представляет собой многопараметрическую оптимизационную задачу, требующую учёта взаимосвязей между штаммом, субстратом, условиями культивирования и методом последующей обработки продукта. Ключевыми этапами являются поиск и скрининг высокопродуктивных региональных штаммов, причём предпочтение отдаётся нетоксичным продуцентам (*Bacillus*, *P. putida*, *Rhodococcus*), способным расти на дешёвых субстратах; оптимизация состава питательных сред с вовлечением отходов агропромышленного комплекса (меласса, сыворотка, жмыхи, отработанные масла) и бездорогих источников азота (мочевина, кукурузный экстракт); подбор условий культивирования (температура, pH, аэрация, перемешивание, режим подачи субстратов) для максимизации продуктивности и производительности; выбор экономически целесообразной товарной формы – КОФ для агрозащиты и ММУН, очищенные препараты для фармацевтики и косметики; а также оценка экологической безопасности (токсичность, биоразлагаемость) и технико-экономических показателей (капитальные затраты (CAPEX), операционные затраты (OPEX), себестоимость, окупаемость). Только системный

подход, интегрирующий микробиологию, биохимию, инженерию биопроцессов и экономику, способен преодолеть существующие барьеры и обеспечить конкурентоспособность биосурфактантов на рынке [37,152,153].

1.6 Методы выделения, очистки и анализа биосурфактантов

Биосурфактанты, полученные при культивировании на различных средах и в различных условиях, используются для последующей обработки после достижения определенной концентрации в культуральном бульоне. Процедура разделения фаз используется для извлечения биосурфактантов из культуральной жидкости. Когда концентрация растворимости биосурфактанта выше, чем у исходного культурального бульона, они подвергаются фазовому разделению [156]. Когда к несмешивающимся жидкостям добавляется культуральный бульон, содержащий поверхностно-активное вещество, образуется эмульсия, и капли эмульсии со временем накапливаются, что приводит к разделению двух фаз [157]. Этот процесс, как правило, ускоряется центрифугированием. Для биосурфактантов разделение фаз может осуществляться с использованием различных методов, таких как дистилляция, твердожидкостная экстракция, флокуляционная коагуляция и жидкостно-жидкостная экстракция [158]. При использовании метода коагуляции с последующей промывкой заряд на взвешенных частицах сначала нейтрализуется, а затем частицы агрегируются в хлопья, что повышает эффективность их седиментации [159].

Жидкостно-жидкостная экстракция иногда выступает в качестве применяемого метода, когда в систему вводится жидкая органическая фаза, которая не имеет полной смешиваемости с ферментационным бульоном, главным компонентом которого является вода. Молекулы целевого продукта достигают органической фазы, снижая содержание поверхностно-активных веществ в ферментационном бульоне и подавляя пенообразование [156]. Поскольку преобладающая часть биосурфактантов находится внеклеточно, они легко

извлекаются из культуральной среды методом жидкостно-жидкостной экстракции [160]. Преимущества этого метода особенно эффективны при очистке сырого экстракта и частичной очистке, а также его можно повторно использовать для удаления тяжелых металлов. Эти преимущества согласуются с экономически эффективной процедурой, которая, однако, зависит от концентрации биосурфактанта в культуре. Еще одним недостатком метода является то, что извлечение продукта низкое, особенно при перегонке, всего 48 %. Это можно объяснить потерей продукта при разделении на других фазах [161].

Ключевые процессы, связанные с последующей переработкой микробных поверхностно-активных веществ, включают осаждение с последующей экстракцией растворителем. Осаждение с помощью кислот или сульфата алюминия является наиболее подходящим методом из-за простоты процедуры [162]. Для биосурфактантов липопептидной природы осаждение следует проводить при pH, отличающемся на несколько единиц от изоэлектрической точки (pI) [163].

Самым распространенным первичным процессом извлечения биосурфактантов является кислотное осаждение: концентрированные кислоты вводят для снижения pH, в результате чего молекулы биосурфактантов протонируются и становятся положительно заряженными. Это способствует флокуляции: благодаря силам Ван-дер-Ваальса молекулы притягиваются друг к другу [164]. Происходит увеличение молекулярной массы и стерических параметров флокулы, что, в конечном итоге, приводит к осаждению твердого вещества на дне бульона. Метод широко применяется – от локальных исследований до крупномасштабных экспериментов и полупромышленных подходов к производству – кислотное осаждение изолирует биосурфактанты, особенно липопептиды [152,153].

Осаждение сульфатом аммония может обеспечивать гидрофобизацию, превращая амфифильные биоповерхностно-активные вещества. Следовательно, извлечение рамнолипидов обычно осуществляется с помощью этого процесса. В методе растворитель-антирастворитель выбранный растворитель должен быть смешивающимся с водой и способным растворять целевое соединение в большей

степени, достигая истинного раствора. И наоборот, в качестве антирастворителя выбирается растворитель, в котором целевое соединение будет наименее растворимо или полностью нерастворимо [165].

При осаждении антирастворителем в качестве органического антирастворителя используется ацетон, что может привести к нестабильности белков. Белки стабильны в кислой среде, поэтому биосурфактант пептидной природы можно выявить, варьируя значения pH водной фазы до 1,0-4,0 с помощью кислот. Метод кислотного осаждения считается экономически неэффективным, хотя его можно улучшить, сочетая с экстракцией растворителями и/или ультрафильтрацией. Однако использование этого метода может привести к соосаждению других малых молекул, чего можно избежать, используя кислотное осаждение при pH 4,0. Эта стратегия эффективна только для неселективного извлечения биосурфактантов.

Ниже более детально рассмотрены основные технологии выделения биосурфактантов, включая кислотное осаждение, ультрафильтрацию, абсорбцию и пенное фракционирование.

1.6.1 Кислотное осаждение

В 1980-х годах был разработан базовый протокол извлечения биосурфактантов из культуральной жидкости, получивший широкое известность как метод кислотного осаждения [49]. Он основан на неспецифическом осаждении пептидсодержащих компонентов в кислой среде в сочетании с последующей экстракцией целевого продукта специфическими растворителями. На сегодняшний день это наиболее распространенная технологическая схема для получения очищенной твердой формы сурфактина и рамнолипидов.

На первом этапе осуществляют изоэлектрическое осаждение белков и амфифильных молекул путем снижения pH культуральной жидкости до 2,0. Полученный полутвердый концентрат легко отделяется от нативной среды центрифугированием или фильтрацией, после чего высушивается. Полученный

осадок суспендируют в гидрофобном органическом растворителе (например, дихлорметане, хлороформе или этилацетате) для отделения сурфактина или рамнолипидов от балластных пептидных фракций. Целевые поверхностно-активные молекулы переходят в органическую фазу, в то время как примесные белки остаются в нерастворенном состоянии. Сурфактин выделяют в виде сухого порошка после фильтрации и упаривания растворителя на роторном испарителе.

Несмотря на технологическую эффективность, данный метод имеет существенный недостаток, сопряженный с необходимостью использования токсичных химических реагентов. В промышленном масштабе значительные объемы концентрированных кислот и органических растворителей создают серьезные экологические риски, повышают себестоимость производства и требуют соблюдения жестких мер безопасности. Описанный двухстадийный процесс достаточно селективен только в случае монокомпонентного синтеза. При одновременной выработке культурой нескольких изоформ липопептидов или сопутствующих гликолипидов все они экстрагируются совместно [166], что обусловливает необходимость дальнейшего разделения с использованием высокоэффективных хроматографических методов для получения индивидуальных веществ. В настоящее время данная методология претерпевает модернизацию: базовый протокол оптимизируют путем интеграции дополнительных стадий жидкостно-жидкостной экстракции [167] с целью максимизации степени чистоты итогового биосурфактанта [168].

За стадией осаждения, как правило, следует процедура однократной или многократной жидкостно-жидкостной экстракции. Тем не менее, существуют технологические подходы к извлечению целевых метаболитов, базирующиеся исключительно на использовании сырой КОФ. Так, для целевых продуктов штаммов *B. licheniformis* была продемонстрирована высокая эмульгирующая активность и выраженный потенциал применения в ММУН. При этом анализ методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) показал, что КОФ данных штаммов содержит дополнительные балластные компоненты. Несмотря на то, что указанные сопутствующие вещества требуют проведения дополнительных препаративных

операций для их разделения и идентификации, накопленные данные позволяют предположить, что они способны вступать в синергетическое взаимодействие с липопептидами, обеспечивая максимальную гидродинамическую эффективность биосурфактантов в пластовых условиях [125].

Кислотное осаждение признано высокоэффективным методом первичного изолирования биосурфактантов, поскольку позволяет оперативно удалять основной объем примесей и концентрировать целевой продукт в рамках одного технологического этапа. Данный метод характеризуется высокой экономической эффективностью: он относительно прост в исполнении, не требует дефицитного специализированного оборудования или длительной пробоподготовки, что позволяет осуществлять его в стандартных лабораторных и полупромышленных условиях. В связи с этим кислотное осаждение является значительно более рентабельным подходом по сравнению с такими методами выделения и глубокой очистки, как препаративная хроматография или тангенциальная мембранная фильтрация, которые отличаются высокой стоимостью и трудоемкостью.

В то же время, воздействие сильнокислой среды может инициировать частичную потерю функциональной активности биосурфактантов вследствие деструкции пептидных связей, гидролиза рамнозильных остатков или иных необратимых конформационных изменений молекулярной структуры. Существенным ограничением метода также выступает риск соосаждения примесных компонентов из нативного раствора (включая липополисахариды клеточных стенок и эндопротеазы), что снижает микробиологическую чистоту препарата. Наконец, данный подход обладает лимитированной специфичностью: неселективный характер изоэлектрического осаждения КОФ не обеспечивает фракционирование конкретных гомологов биосурфактантов, приводя к получению поликомпонентной смеси изоформ соединений [115].

1.6.2 Экстракция растворителем

Экстракция растворителем обычно используется в качестве промежуточного этапа отделения биотехнологического продукта. Этот метод можно использовать для извлечения биосурфактантов из культуральной жидкости. Это позволяет культуральной жидкости легче концентрироваться и осуществлять разделение за счет плавающих белков в культуральном супернатанте [169]. Для экстракции биосурфактантов используются растворители разной полярности, такие как хлороформ, гексан, гептан, метанол и этанол. Прежде чем выбирать растворитель, следует учитывать эффективность экстракции и растворимость желаемого биосурфактанта в растворителе. Таким образом, для очистки необходима тщательная оптимизация процесса [170]. Несмотря на то, что метод экстракции основан на способности биомолекул распределяться между жидкими фазами, выделение определенного соединения биосурфактанта из других соединений путем селективной экстракции растворителем остается сложной задачей из-за физического сходства между семействами биосурфактантов [171].

Жидкостная экстракция считается наиболее практичным подходом для чистого извлечения биосурфактантов гликолипидной природы [172]. Традиционно для экстракции софоролипидов используется этилацетат [173], тогда как для экстракции рамнолипидов обычно используется комбинация хлороформа и метанола в соотношении 2:1 по объему [174]. Жидкостная экстракция также используется для извлечения липопептидов при тщательном перемешивании для обеспечения полного массообмена – с помощью этилацетата, н-гексана и смеси растворителей, таких как хлороформ и метанол [175].

Хотя экстракция смесью хлороформ-метанол в различных соотношениях остается часто используемой как наиболее универсальный растворитель (около 7900 упоминаний согласно поисковой системе Google Scholar), но лучшей и все более применяемой альтернативой (около 10700 упоминаний согласно поисковой системе Google Scholar) выступает этилацетат, поскольку эти соединения вредны для человека. Использование значительного количества растворителей требует

более высоких затрат и времени. Когда объем растворителя увеличивается, это оказывает воздействие на окружающую среду [151].

1.6.3 Альтернативные методы

Наиболее распространенным методом отделения биосурфактанта от примесных компонентов является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Принцип ВЭЖХ основан на молекулярных взаимодействиях соединений с твердой подложкой и жидкой подвижной фазой. Эти взаимодействия характеризуются различной интенсивностью, специфичной для каждого соединения, что определяет скорость его элюирования. Разделение соединений достигается за счет различий в скоростях их элюирования

Таким образом, ВЭЖХ обеспечивает получение сурфактина высокой чистоты. Однако это дорогостоящий метод, требующий много времени и не подходящий для промышленных масштабов производства [164]. Впервые метод был использован для описания изоформ сурфактина [176]. В настоящее время этот процесс используется в исследованиях для количественного определения сурфактина и в коммерческих целях компанией Sigma-Aldrich (Швейцария), стоимость 10 мг препарата составляет около 40 000 руб. на 2026 год. Другие процессы сорбционной очистки были созданы с использованием активированного угля [177]. Для этого процесса эффективность сильно зависит от температуры и pH. Он дешевле, быстрее и может обрабатывать больший объем, чем ВЭЖХ, однако он не обладает селективностью по отношению к целевому продукту, и технологический процесс требуется останавливать по мере насыщения колонки [178].

Принцип очистки методом ультрафильтрации основан на способности сурфактина к самосборке в мицеллы при концентрации, превышающей его ККМ. Так, было выявлено, что мицеллы сурфактина могут удерживаться высокомолекулярной отсечной мембраной, отделенные от солей и некоторых белков [179]. Кроме того, традиционные баромембранные процессы (ультрафильтрация и обратный осмос) на протяжении нескольких десятилетий

успешно применяются в отечественной и мировой биотехнологической и пищевой промышленности для концентрирования и фракционирования биологически активных макромолекул. Однако применительно к выделению амфифильных липопептидных биосурфактантов ключевым этапом развития данной методологии стало внедрение ультрафильтрации в тангенциальном потоке, сопряженной с направленным управлением мицеллярным состоянием молекул в растворе.

Поскольку индивидуальный молекулярный вес мономера сурфактина составляет около 1030 Да, он должен беспрепятственно проходить через ультрафильтрационные мембраны. Однако при превышении ККМ молекулы липопептида самоассоциируются в крупные сферические или цилиндрические мицеллы с кажущейся молекулярной массой от 20 до 250 кДа. За счет целенаправленного перевода липопептида в мицеллярную форму и подбора мембран с оптимальным пределом задерживания по молекулярной массе (MWCO, обычно 100 кДа) была успешно реализована система извлечения сурфактина, позволяющая достичь более чем 160-кратного концентрирования целевого продукта в ретентате при уровне его исходной чистоты около 70 % [180]. Для повышения селективности и отсечения соосажденных балластных белков со схожим молекулярным весом впоследствии был разработан двухстадийный мембранный протокол, обеспечивающий увеличение чистоты препарата до 94-96 % за счет интеграции этапа ультрадиафильтрации с добавлением органического растворителя. Введение спиртового агента (например, этанола или метанола) в ретентат первой стадии инициирует обратимое разрушение мицеллярных агрегатов сурфактина до мономерной формы. Это позволяет индивидуальным молекулам липопептида беспрепятственно проходить через поры мембраны на второй стадии фильтрации (с использованием мембран MWCO 10-50 кДа), полностью отделяясь от высокомолекулярных примесных белков [181]. В современных технологических схемах данный мембранный каскад масштабирован до непрерывных интегрированных процессов. Использование современных мембранных модулей, интегрированных в контур биореактора, позволяет осуществлять одновременный биосинтез и непрерывную беспенную экстракцию сурфактина непосредственно из

рабочего объема ферментера, снижая ингибирование продуцента по принципу обратной связи и предотвращая экстремальное пенообразование [181]. Производство сурфактина в непрерывном режиме достигло 7,9 г за три дня, в результате чего производительность составила 0,11 г/л*ч, что является высочайшим результатом из достигнутых на сегодняшний день [163]. Одним из недостатков использования мембранной технологии является неизбежное образование слипшихся частиц, снижающих фильтрующую способность с течением времени. Кроме того, стоимость мембран оказывает серьезные ограничения на масштабирование технологии [150].

Принцип пенного фракционирования основан на выдувании пузырьков и диспергировании газа в жидкости, содержащей соединения с гидрофобными или поверхностно-активными свойствами [182]. Благодаря этим свойствам соединения адсорбируются на поверхности пузырьков, которые поднимаются и уносят соединения на поверхность жидкости. При разделении методом пенного фракционирования пузырьки скапливаются быстрее, чем лопаются, что приводит к образованию пены. Пена продолжает подниматься в вертикальной трубе, и по мере подъема становится все более сухой. В конце столбца пена разрушается перед пеноприемником, в котором концентрируется целевое соединение [150,164].

Эта процедура приобрела популярность в последние годы благодаря относительно доступной реализации, минимальному расходу химических реагентов (растворителей) и возможности постоянного удаления продукта. При этом целевые соединения – сурфактанты – адсорбируются на пузырьках воздуха из культуральной среды без растворителей [183]. При пенном фракционировании пена, содержащая избыточное количество биосурфактанта из ферментера, в котором находится культуральный бульон, продолжает подниматься [173]. ПАВ связываются с поднимающимися пузырьками воздуха в резервуаре с жидкостью, образуя устойчивую пену, которая поднимается по специальной цилиндрической колонне. Пена, собранная в колонне, имеет более высокую концентрацию сурфактантов, чем нижняя часть культурального бульона [184]. Собранную пену, обогащенную целевым соединением,

подкисляют, тем самым осаждая биосурфактант по стандартной схеме кислотного осаждения, описанной выше [185].

Считается, что для масштабных процессов это наиболее эффективный и экономически выгодный метод извлечения биосурфактантов из бесклеточных супернатантов [186]. Этот процесс позволил реализовать полупромышленные способы отделения пены в объеме от 2 до 9 л. Метод обеспечивает получение продуктов высокой чистоты, низкую стоимость, высокую эффективность, небольшие требования к оснащению, быструю работу и хорошие возможности как для непрерывного концентрирования, так и для получения продукта на месте. Однако неконтролируемое пенообразование представляет собой серьезную проблему в процессе культивирования, поскольку оно может привести к засорам в ферментерах и вызвать контаминацию [187]. Непрерывный синтез биосурфактантов может быть затруднен неасептическими системами.

1.6.4 Методы идентификации и и обеспечения надлежащего качества

Биосурфактанты преимущественно выявляются и характеризуются с использованием нескольких традиционных аналитических инструментальных методов, таких как инфракрасная спектроскопия (ИК), тонкослойная хроматография, масс-спектрометрия (МС) или тандемная масс-спектрометрия (МС/МС), как правило, совмещённая с высокоэффективной жидкостной хроматографией, определение поверхностного натяжения в жидкостях методом тензиометрии, а также ядерный магнитный резонанс (ЯМР) на ядрах ^{1}H и ^{13}C и ряд других прецизионных подходов для изучения их структуры и свойств [188,188].

Высокоэффективная жидкостная хроматография зарекомендовала себя как эффективный метод обнаружения биосурфактантов и их разделения. Классическая компоновка измерительной системы состоит из подвижной фазы, стационарной фазы и детектора. Обычно используемые детекторы включают детекторы светорассеяния, УФ-детекторы, детекторы показателя преломления и др. Во время измерения образец переносится подвижной фазой под давлением, проходя через

стационарную фазу, представленную твердым пористым материалом с поверхностью, обладающей различной полярностью, где компоненты разделяются и последовательно проходят через детектор. Затем детектор записывает данные, которые регистрируются в виде пиков на хроматограмме. Для идентификации структуры различных биосурфактантов обычно применяется масс-спектрометрия. Принцип этой технологии заключается в том, что химические вещества ионизируются, а затем ионы разделяются в соответствии с отношением массы к заряду. Проводя масс-спектрометрические измерения, структуру дирамнолипидов (Rha-Rha-C10-C10) идентифицировали из рамнолипидов, которые экстрагировались с использованием смеси растворителей хлороформ/метанол в соотношении 2:1 [189].

Другим хроматографическим методом контроля и идентификации биосурфактантов является ТСХ. Оптимизация состава элюирующей системы позволяет эффективно отделять сопутствующие балластные примеси, идентифицировать целевые соединения и осуществлять препаративное извлечение анализируемых зон с поверхности пластины для дальнейшего инструментального анализа [192,193]. Качественная идентификация хроматографических зон на силикагеле достигается путём их дериватизации специфическими проявляющими реагентами. Использование раствора нингидрина, спиртового раствора п-анисового альдегида и паров кристаллического йода позволяет селективно визуализировать аминокислотные фрагменты пептидных колец, углеводные остатки рамнозы или софорозы и алифатические цепи жирных кислот в структуре молекул исследуемых биосурфактантов [161].

Одним из наиболее информативных физико-химических методов структурной идентификации микробных ПАВ является инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием (FTIR) [39], обеспечивающая возможность качественного анализа функциональных групп по характеристическим полосам поглощения ИК-излучения образцом. При стандартных температурных условиях межатомные связи в молекуле вследствие внутри- и межмолекулярных взаимодействий совершают непрерывные колебания.

Частоты данных колебаний локализованы в инфракрасном диапазоне, причем в силу квантованности энергетических переходов молекулярная система способна поглощать кванты излучения строго определенной частоты. Резонансное поглощение энергии сопровождается увеличением амплитуды колебаний – переходом молекулы в возбужденное колебательное состояние с последующей релаксацией до исходного уровня за счет межмолекулярных столкновений [190,191]. На практике регистрация ИК-спектров для образцов на водной основе (например, нативных культуральных сред) существенно затруднена вследствие интенсивного собственного поглощения молекул воды в диапазонах валентных и деформационных колебаний, что требует предварительного высушивания препаратов или использования специализированных приставок нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Анализ интерферограмм позволяет регистрировать разность интенсивностей измерительного и опорного световых потоков при прохождении через анализируемую матрицу, на основании чего проводят качественную и количественную оценку присутствия конкретных химических группировок.

Метод тензиометрии (в частности, методы Дю Нуи и Вильгельми) широко применяется для прецизионного контроля и фундаментальной характеристики поверхностно-активных веществ микробного происхождения. Измерение термодинамического параметра поверхностного натяжения на границе раздела сред «жидкость – газ» или «жидкость – жидкость» позволяет количественно оценить поверхностную активность и адсорбционную способность амфифильных молекул биосурфактантов [194].

Ключевым направлением применения тензиометрии является определение ККМ – фундаментальной физико-химической константы, характеризующей термодинамическое равновесие, при котором индивидуальные мономеры ПАВ в объеме фазы начинают самоассоциироваться в супрамолекулярные агрегаты (мицеллы) [195]. Анализ изотерм поверхностного натяжения (зависимости натяжения от логарифма концентрации ПАВ) обеспечивает возможность объективной оценки эффективности целевого соединения. Знание ККМ позволяет

проводить верификацию технологических параметров и осуществлять сравнительный анализ поверхностной активности различных пулов биосурфактантов (например, липопептидов и гликолипидов) в сопоставлении с их коммерческими синтетическими аналогами [196].

В качестве одного из наиболее репрезентативных экспресс-методов оценки функциональной активности биоэмульгаторов и биосурфактантов выступает определение индекса эмульгирования, традиционно обозначаемого как E24. Данный методический подход базируется на измерении кинетической стабильности гетерогенных дисперсных систем (эмульсий типа «вода в масле» или «масло в воде»), сформированных в результате высокоинтенсивного механического перемешивания водной фазы с модельным гидрофобным субстратом в присутствии анализируемого амфифила. Индекс эмульгирования рассчитывается как процентное соотношение высоты стабилизированного эмульсионного слоя к общей высоте столба жидкости по истечении 24 ч статического отстаивания, что позволяет количественно охарактеризовать способность молекул предотвращать процессы коалесценции и седиментационного расслоения фаз [197].

Методика E24 обладает высокой универсальностью и эффективна при тестировании биосурфактантов как непосредственно в нативной культуральной среде, так и в бесклеточном супернатанте. Оценка эмульгирующей способности нативной среды в присутствии клеток позволяет оперативно установить селективность утилизации микроорганизмами различных классов углеводородов и растительных масел, что критически важно при разработке биопрепаратов для ликвидации разливов нефти и технологий ММУН. В свою очередь, исследование бесклеточного супернатанта и изолированных препаратов ПАВ обеспечивает определение фундаментальных эмульгирующих свойств очищенных молекул, детерминирующих их применимость в рецептурах косметических средств и фармацевтических форм [198].

Помимо перечисленных методов, в мировой практике для углублённой структурной характеристики биосурфактантов широко применяют ВЭЖХ-МС/МС

и ЯМР на ядрах ^{1}H и ^{13}C. Эти методы позволяют с высокой точностью устанавливать молекулярную массу, последовательность аминокислот в липопептидах и тип жирнокислотных цепей, а также идентифицировать конгенеры в гликолипидных смесях [151,199]. Однако их применение в рутинном контроле качества и в промышленных масштабах ограничено высокой стоимостью оборудования, сложностью пробоподготовки и необходимостью высококвалифицированного персонала [199].

Кроме того, благодаря простоте воспроизведения и высокой корреляции с продуктивностью, индекс E24 служит ключевым маркером при проведении высокопроизводительного скрининга (первичного отбора) новых изолятов микроорганизмов. Данный параметр активно вовлекается в математические модели оптимизации условий культивирования штаммов-продуцентов, выступая в роли надёжного индикатора качества и технологической эффективности синтезируемых поверхностно-активных веществ [198].

Таким образом, анализ литературных данных показал, что биосурфактанты представляют собой перспективную и экологически безопасную альтернативу синтетическим поверхностно-активным веществам для применения в сельском хозяйстве (защита растений от фитопатогенов, стимуляция роста) и нефтедобыче (увеличение нефтеотдачи, биоремедиация). При этом выявлены основные подходы к их выделению, культивированию, идентификации структуры и оценке свойств. Однако широкое промышленное внедрение биосурфактантов сдерживается рядом факторов: относительно низкая продуктивность известных штаммов-продуцентов, высокая стоимость очищенных форм, нестабильность товарных препаратов при хранении, а также отсутствие стандартизированных протоколов контроля качества.

Наиболее технологичным и экономически целесообразным решением для агрозащиты и нефтепромысловых применений является использование кислотно-осаждённой фракции культуральной жидкости (КОФ КЖ), которая сохраняет высокую поверхностную активность и фунгицидные свойства при значительно более низкой себестоимости по сравнению с очищенными препаратами.

Проведённый обзор литературы позволил сформировать методологический подход к настоящему исследованию, а именно определить необходимую последовательность этапов: скрининг аборигенных штаммов-продуцентов из нефтезагрязнённых почв и ризосферы растений, их таксономическую идентификацию, подбор условий культивирования, получение и изучение характеристик биосурфактантов, оценка их экологической безопасности и функциональной эффективности в модельных системах. Это позволило перейти к разработке биотехнологий получения препаратов для защиты растений и увеличения нефтеотдачи на основе биосурфактантов с использованием доступного регионального сырья.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Выделение изолятов

Образцы почвы для выделения бактериальных изолятов отбирали на территории Заинского района Республики Татарстан. Почва относится к типу чернозём выщелоченный среднегумусный среднемощный тяжелосуглинистый (Классификация и диагностика почв России, 2004). Отбор проб проводили из верхнего пахотного горизонта (0-20 см) на участках, не подвергавшихся антропогенному нефтяному загрязнению.

Для исследований использовали модельную нефтезагрязнённую почву: навески воздушно-сухой почвы (по 200 г) помещали в стеклянные кюветы и вносили сырую товарную нефть Ромашкинского месторождения в количестве 1-2 % от массы почвы. Почву тщательно перемешивали до получения однородной массы и выдерживали при комнатной температуре (22±2 ℃) в течение 14 сут для установления равновесного распределения углеводородов в почвенном матриксе; периодическое перемешивание обеспечивали каждые 48 ч. Параллельно для исследований использовали пробы исходной (незагрязнённой) почвы, выдержанной условиях, аналогичных получению модельной нефтезагрязнённой почвы.

Другим объектом для выделения изолятов являлось почва ризосферы салата-латука (*L. sativa*), культивируемого в контролируемых условиях оранжереи КФУ.

Выделение изолятов осуществляли из образцов почв методом посева почвенной вытяжки в разведении 10^8-10^{10} на агаризованную среду МПА [200]. Микробные изоляты в чашках Петри с МПА культивировались при температуре 28 ℃ в течение 24 ч в термостате (ТСО-1/80 СПУ, Россия). Выросшие колонии пересевали на чистоту и исследовали их макро- и микроморфологию на микроскопе Axio Lab A1 (Carl Zeiss, Германия).

Для оценки способности выделенных изолятов продуцировать биосурфактанты, проводили их жидкофазное культивирование на глицерин-

нитратной среде ($NaNO_3$ (1,38 г), KH_2PO_4 (3 г), $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (9,2 г), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2 г), глицерин (30 г) в 1 л дистиллированной воды) в течение 48 ч при температуре 23±2 °С и скорости перемешивания 120 об/мин на орбитальном шейкере IKA KS 4000i control (IKA-Werke, Германия). КЖ отделяли центрифугированием при 10 000 g в течение 30 мин при 24 °С, затем определяли эмульгирующую активность (п. 2.8.1) и ПН (п. 2.8.2).

2.2 Идентификация выделенных изолятов

Идентификацию выделенных изолятов проводили методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролётной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS) на системе Microflex LT/SH (Bruker Daltonics, Германия). Управление системой и обработку данных осуществляли с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics) со встроенной базой данных, содержащей более 4000 эталонных спектров (>3000 видов из 540 родов). Для пробоподготовки биомассу, полученную в ходе культивирования изолятов в течение 18-24 ч на среде Лурия – Бертани (LB), переносили стерильной петлей на 96-позиционную стальную мишень (MSP 96 target, Bruker Daltonics) в виде тонкого слоя. Каждый образец наносили в двух повторностях. После высушивания на воздухе образцы покрывали 1 мкл матричного раствора, содержащего α-циано-4-гидроксикоричную кислоту (Bruker Daltonics) в концентрации 10 мг/мл в 50 % водном растворе ацетонитрила и 2,5 % растворе трифторуксусной кислоты [212]. После кристаллизации матрицы при комнатной температуре образцы анализировали в линейном положительном режиме детектирования ионов в диапазоне масс от 2000 до 20 000 Да. Калибровку прибора выполняли с использованием коммерческого стандарта Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics) перед каждой серией измерений. Для каждого образца регистрировали суммарный спектр за 240 лазерных импульсов (частота 60 Гц) в 40 различных позициях сканирования. Полученные масс-спектры обрабатывали автоматически в программе MALDI Biotyper 3.1 с применением

стандартных алгоритмов сглаживания, вычитания фона и детекции пиков. Идентификацию осуществляли путём сравнения экспериментальных спектров с эталонными; результат выражали в виде логарифмического оценочного балла (score value) в диапазоне от 0 до 3,0. Значения баллов ≥ 2,0 считали достоверной идентификацией до вида, 1,7-2,0 – достоверной идентификацией до рода, < 1,7 – недостоверным результатом [213,214].

Идентификация изолятов также проводилась методом секвенирования по Сенгеру ампликона гена 16S рРНК (праймеры 27F: 5’-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’ / 1492R: 5’-GGTTACCTTGTTACGACTT-3’) на секвенаторе ABI 3730 DNA Analyzer (Life Technologies, USA). Предварительно проводили экстракцию ДНК согласно методике (п. 2.8.8). Анализ последовательностей нуклеотидов был проведен в программе MEGA 10 (Pennsylvania State University, USA), далее проведен поиск в базе данных ДНК на сайте Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) [215].

2.3 Определение наличия генов синтеза биосурфактантов в выделенных изолятах

Количество генов, кодирующих синтез биосурфактантов было проанализировано с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Анализ проводили с использованием специфических праймеров (таблица 2.1) [216, 217]. Праймеры были синтезированы компанией ООО НПК Синтол (г. Москва). Оптимизация ПЦР и подбор температуры отжига проводилась опытным путем.

Реакционная смесь включала в себя 0,1 U/мкл полимеразы SynTaq, 1-кратный буфер с красителем SYBR Green, 2,5 мМ $MgCl_2$, по 200 мкМ каждого dNTP, 0,2 мкМ каждого праймера и 1 мкл ДНК. Амплификация осуществлялась на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Munich, Germany), и представляла следующий режим: 15 минут при 95℃, и 39 циклов, включающих 30 с при 95℃, 30 с при T_m (таблица 2.1), и 30 с при 72℃.

Стандартную кривую для каждого гена, кодирующего синтез биосурфактантов строили следующим образом: ДНК положительного клона *E. coli*, несущего интересующий ген, разбавляли до различных концентраций и амплифицировали для построения стандартной кривой.

Таблица 2.1 – Праймеры, использованные в исследовании

Название целевого гена	Целевой биосурфактант	Последовательность праймера (5′-3′)	Температура отжига
ituC	Итурин	GGCTGCTGCAGATGCTTTAT	58 °C
		TCGCAGATAATCGCAGTGAG	
fenD	Фенгицин	GGCCCGTTCTCTAAATCCAT	58 °C
		GTCATGCTGACGAGAGCAAA	
bamC	Бацилломицин	TGCAGGAGGAGAGAGCAGAT	60 °C
		AGGTTGTCCGATGTTGCTTC	
srfAA	Сурфактин	TCGGGACAGGAAGACATCAT	60 °C
		CCACTCAAACGGATAATCCTGA	
srfA3	Сурфактин	CAAAAKCGCAKCATACCAAKTTGAG	50 °C
		AGCGGCAYATATTGATGCGGYTC	
rhlB	Рамнолипид	GCCCACGACCAGTTCGAC	54 °C
		CATCCCCCTCCCTATGAC	
rhlC	Рамнолипид	AGGCAATTGTCTCTGGACGG	60 °C
		CAGGCTGTATTCGGTGTCCA	

Концентрацию ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Для анализа методом ПЦР использовали три повтора для каждого образца. Эффективность анализа методом ПЦР составила 94 %, а значение R^2 превысило 0,99.

2.4 Культивирование выделенных штаммов

Культивирование штаммов *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 осуществляли методом погружённого (жидкофазного) культивирования в колбах на орбитальном шейкере IKA KS 4000i control (IKA-Werke, Германия) и в лабораторных ферментерах Minifors 2 (Infors HT, Швейцария) объемом 3 л. Использовали следующие синтетические питательные среды:

- жидкую среду Bussnel Haas (BH) – готовили путем смешивания солей $K_2HPO_4•3H_2O$ (1,39 г), KH_2PO_4 (1 г), NH_4NO_3 (1 г), $MgSO_4•7H_2O$ (0,2 г), $FeCl_3•6H_2O$ (0,08 г) и $CaCl_2$ (0,02 г) в 1 л дистиллированной воды и глюкозы (20 г), автоклавировали при 121 °С в течение 20 мин;

- жидкую глицерин-нитратную среду – готовили путем смешивания солей $NaNO_3$ (1,38 г), KH_2PO_4 (3 г), $K_2HPO_4•3H_2O$ (9,2 г), $MgSO_4•7H_2O$ (0,2 г) и глицерина (30 г) в 1 л дистиллированной воды, автоклавировали при 121 °С в течение 20 мин;

- жидкую минеральную среду с н-гексадеканом – готовили путем смешивания солей KH_2PO_4 (3 г), $MgSO_4•7H_2O$ (0,2 г), $Na_2HPO_4•12H_2O$ (4,5 г), $(NH_4)_2SO_4$ (1 г) в 1 л дистиллированной воды, автоклавировали при 121 °С в течение 20 мин, 2 % н-гексадекана добавляли стерильно после автоклавирования.

Также для культивирования использовали полусинтетические среды с добавлением регионального сырья:

- среда с мелассой свекловичной – меласса свекловичная (30 г/л), гидролизат рыбной муки (5 г/л), $MgSO_4·7H_2O$ (0,5 г/л); автоклавировали при 121 °С в течение 20 мин;

- среда с гидролизатом рыбной муки – гидролизат рыбной муки (10 г/л), глюкоза (20 г/л), $MgSO_4·7H_2O$ (0,5 г/л); автоклавировали при 121 °С в течение 20 мин;

- среда с отработанным растительным растительным маслом (20 г/л), $NaNO_3$ (3 г/л), KH_2PO_4 (1 г/л), $MgSO_4*7H_2O$ (0,5 г/л), $FeSO_4·7H_2O$ (0,05 г/л); автоклавировали при 121 °С в течение 20 мин, масло добавляли стерильно после автоклавирования;

- среда с кукурузным экстрактом – кукурузный экстракт (10 г/л), глюкоза (20 г/л), $MgSO_4*7H_2O$ (0,5 г/л); автоклавировали при 121 °С в течение 20 мин;

- среда с соевой мукой – соевая мука (15 г/л), глюкоза (20 г/л), $MgSO_4·7H_2O$ (0,5 г/л); автоклавировали при 121 °С в течение 20 мин

Кукурузный экстракт (ТУ 10.62.20-012-55958380-2017, ООО «Рустарк», Россия), соевая мука (ГОСТ 3898-56, ООО «КСК», Россия), меласса свекловичная (ГОСТ 30561-2017), гидролизат рыбной муки (ТУ 10.62.20-012-55958380-2017),

отработанное растительное масло двух типов: от предприятий общественного питания (г. Казань) и с масложирового комбината (ООО «МЖК», Россия) хранили при температуре 4 °С не более 14 сут до использования.

Для используемых субстратов определяли содержание углерода и азота по стандартной методике (п. 2.8.6). Культивирование на синтетических средах осуществляли при 28±2 °С в течение 72 ч в условиях аэрации (120 об/мин), с контролем прироста биомассы с помощью нефелометрии (п. 2.8.9) и ОТ-ПЦР (п. 2.8.10); накопления биосурфактантов – по результатам определения эмульгирующей активности (п. 2.8.1) и ПН (п. 2.8.2) КЖ. Культивирование на полусинтетических средах осуществляли при 28±2 °С в течение 24-36 ч в условиях аэрации (120 об/мин), с контролем прироста биомассы с помощью ОТ-ПЦР (п. 2.8.10) и гравиметрии (п. 2.8.3); накопления биосурфактантов – по результатам определения эмульгирующей активности (п. 2.8.1) и ПН (п. 2.8.2) КЖ. Уровень потребления источников углерода оценивали по снижению суммарного содержания углеводов антроновым методом (п. 2.8.7).

2.5 Получение кислотоосаждаемой фракции и очищенного биосурфактанта

Клетки продуцента из КЖ удаляли центрифугированием (10 000 g, 30 мин, 24 ℃). Бесклеточный супернатант подкисляли с помощью 5М HCl до pH 2, смесь выдерживали при 4 ℃ в течение 12 ч. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием при 4 ℃ и 10 000 g в течение 30 минут [203] и высушивали до постоянной массы при 50 ℃. Выход КОФ оценивали гравиметрически (п. 2.8.3). Хранение сухих образцов КОФ осуществляли в герметичных условиях при температуре 4 ℃.

КОФ, после отделения супернатанта, обрабатывалась смесью метанол : хлороформ (1:2) [205] при соотношении твёрдой фазы к жидкой 1:10 (масс./об.) при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке IKA C-MAG HS 7 (IKA-Werke, Германия) в течение 30 мин при комнатной температуре (22±2 °С). Экстракт

отделяли фильтрованием через мембранный фильтр Fluoropore (PTFE, 0,22 мкм) в вакуумной фильтровальной установке Millipore (Merck Millipore, Германия). Фильтрат переносили в круглодонную колбу и упаривали на роторном испарителе IKA RV 10 digital V (IKA-Werke, Германия) с нагревательной баней HB digital (объём 4 л) при температуре 40-50 °C, давлении 100-150 мбар и скорости вращения 100-160 об/мин до получения сухого остатка (маслянистой или воскоподобной массы). Массу экстрагированного вещества определяли взвешиванием на аналитических весах с точностью до 0,0001 г после выдерживания в эксикаторе над силикагелем при комнатной температуре в течение 24 ч до достижения постоянной массы. Для дальнейших аналитических исследований (ТСХ, ИК-спектроскопия) полученный экстракт высушивали в лиофильной сушилке BIO-RUS (модель Bio-Rus-6SFD) при температуре полки минус 44 °C и остаточном давлении 0,05-0,10 мбар в течение 24 ч до достижения остаточной влажности не более 5 %. Хранение очищенных образцов очищенных биосурфактантов осуществляли в герметичных условиях при температуре 4 °C.

2.6 Анализ физико-химических свойств кислотоосаждаемой фракции и очищенного биосурфактанта

Для КОФ и очищенных биосурфактантов определяли эмульгирующую активность (п. 2.8.1) и ПН (п. 2.8.2). Для этого готовили растворы с концентрацией 0,5; 2; 5; 10 и 20 г/л в дистиллированной воде.

Термическую стабильность КОФ определяли нагреванием навесок препарата в сушильном шкафу в интервале температур 25-120 °C с шагом 20-30 °C в течение времени, эквивалентном распылительной сушке (не более 10 мин). После нагревания образцы растворяли в дистиллированной воде (1 % масс.) и измеряли Е24 (п. 2.8.1) и ПН (п. 2.8.2).

Для образцов, очищенных биосурфактантов, определяли химическую структуру с помощью ТСХ (п. 2.8.4) и ИК-спектроскопии (п. 2.8.5).

Для ТСХ готовили растворы образцов следующим образом: 10 мг очищенного биосурфактанта растворяли в 1,5 мл смеси хлороформа и метанола (1:2) (об./об.) под воздействием ультразвука. Полученный раствор пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Фильтрат разбавляли смесью метанол-хлороформ, соотношение 1:5 и наносили в количестве 20 мкл на стеклянные хроматографические пластины. После разделения в системе растворителей, просматривали пластины в видимом свете и при обработке УФ-лучами (254 нм), а далее пластины обрабатывали специфическими проявителями и просматривали их в видимом свете.

2.7 Оценка токсичности и биоразлагаемости очищенного биосурфактанта

Токсичность полученных биосурфактантов (п. 2.5) оценивали с использованием *Ceriodaphnia affinis* (Cladocera, Crustacea) в соответствии со стандартным 48-часовым протоколом [210].

Тесты на острую токсичность всех химических веществ проводились в соответствии с Руководством ОЭСР 202 [211]. Тесты проводились в статической системе, в стеклянных стаканах объемом 20 мл, с использованием 10 новорожденных особей цериодафний (возрастом менее 24 ч), подвергавшихся воздействию 10 мл раствора различных концентраций биосурфактанта, разведенного в аквариумной воде. В качестве отрицательного контроля использовали воду для разбавления. Тестируемые виды организмов не кормили во время тестов на острую токсичность, тестирование проводили при температуре 20±1 °C в течение 48 ч. Все испытания с использованием *C. affinis* проводились в пяти повторностях для каждого соединения. Скорость иммобилизации регистрировалась через 48 ч. Ракообразные считались неподвижными при отсутствии реакции в течение 15 сек после воздействия светового стимула с последующим легким постукиванием стеклянного стакана.

Биоразлагаемость биосурфактантов определяли методом манометрической респирометрии с использованием системы OxiTop (WTW) в соответствии с ГОСТ 32427-2013 (аналог стандарта Организации экономического сотрудничества и развития OECD 301F). Испытание проводили в течение 28 сут в аэробных условиях. Степень биоразложения оценивали по потреблению кислорода микроорганизмами в процессе окисления исследуемого вещества с учетом потребления кислорода в холостой пробе.

Степень биоразложения рассчитывали по формуле (2.1):

$$D_t = (БПК_t / ТПК) \times 100\ \% \qquad (2.1)$$

где D_t – степень биоразложения исследуемого вещества к моменту времени t, %;

$БПК_t$ – биохимическое потребление кислорода исследуемым веществом к моменту времени t с учетом поправки на потребление кислорода холостой пробой, мг O_2/мг исследуемого вещества;

ТПК – теоретическая потребность исследуемого вещества в кислороде, мг O_2/мг исследуемого вещества.

2.8 Общие методы анализа

2.8.1 Индекс эмульсификации E24

Эмульгирующая активность объектов исследования оценивалась по индексу эмульсификации E24, определяемая по методу Cooper и Goldenberg [202]. К 4 мл сырой нефти Ромашкинского месторождения добавляли 4 мл объекта исследования в стеклянные градуированные пробирки Boro 3.3 (объём 10 мл) с винтовой крышкой и ПТФЭ прокладкой. Полученную смесь перемешивали на вортексе IKA MS 3 digital (IKA-Werke, Германия) в течение 5 мин при 3000 об/мин для получения стойкой эмульсии. Пробирки оставляли в вертикальном положении при комнатной

температуре (22±2 °С) на 24 ч. Высоту эмульсионного слоя и общую высоту столба жидкости измеряли с помощью линейки с миллиметровой шкалой [201]. Индекс Е24 рассчитывали, как процентное отношение высоты эмульсионного слоя (в см) к общей высоте столба жидкости (в см). В качестве отрицательного контроля использовали дистиллированную воду. В качестве положительного контроля применяли раствор ТВИН 80 в концентрации 1 мг/мл (или 0,1 % об./об.). Индекс Е24 рассчитывали по формуле (2.2):

$$\text{E24} = \frac{\text{высота слоя эмульсии}}{\text{общая высота столбика жидкости в пробирке}} \times 100\ \%. \quad (2.2)$$

2.8.2 Измерение поверхностного натяжения

Поверхностное натяжение (ПН) измеряли методом отрыва кольца Де Нюи на автоматическом тензиометре K20 (KRÜSS Scientific, Германия) [196]. Кольцо из сплава платины-иридия промывали дистиллированной водой и прокаливали в пламени горелки. Образец (20 мл) термостатировали при 25±0,5 °С. Калибровку проводили по дистиллированной воде (71,96 мН/м). Измерения проводили в трёх повторностях, погрешность ±0,2 мН/м.

2.8.3 Определение концентрации биомассы гравиметрическим методом

КЖ фильтровали через предварительно высушенный и взвешенный бумажный фильтр (Whatman №1). Осадок на фильтре промывали дистиллированной водой в объёме, равном двукратному объёму пробы, для удаления остатков питательной среды. Фильтр с биомассой высушивали до постоянной массы при температуре 105 °С в сушильном шкафу, затем охлаждали в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,1 мг [206]. Концентрацию биомассы рассчитывали, как отношение массы сухого осадка к объёму исходной пробы и выражали в г/л. Все определения выполняли в трёх повторностях.

2.8.4 Тонкослойная хроматография

Для анализа использовали стеклянные пластины с силикагелем с добавкой флуоресцентного индикатора Silica gel 60 F_{254} (Merck Millipore, Germany). Нанесение и элюирование осуществлялось в автоматической системе для тонкослойной хроматографии CAMAG ATS 4 и ADC 2 (CAMAG, Швейцария). В качестве подвижной фазы использовали систему хлороформ:метанол:вода (65:25:4, об./об./об.) [207]. Идентификацию отдельных пятен на пластине в УФ-свете проводили путем сопоставления с местоположением пятен стандартов: рамнолипидов (моно- и дирамнолипиды) производства AGAE Technologies LLC (США), чистота 95 %; сурфактина производства Sigma Aldrich (США), чистота 99 %. В качестве окрашивающих агентов использовали пары йода, 1 % раствор нингидрина в абсолютном спирте, 1 % раствор пара-анисового альдегида в смеси серной и уксусной кислот (1:50 об./об.) для выявления липидных фрагментов, наличия пептидов и остатков углеводов, соответственно [208,209]. Коэффициент удерживания (R_f) рассчитывали, как отношение расстояния, пройденного зоной анализируемого соединения, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя. Идентификацию соединений проводили путём сравнения полученных R_f с таковыми для стандартных образцов (сурфактин, рамнолипиды), хроматографированных в идентичных условиях.

2.8.5 ИК-спектроскопия

ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье (FTIR) нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) объектов исследования проводилась с использованием прибора Lumos I (Bruker, Германия). Спектры были получены в диапазоне от 4000 до 600 $см^{-1}$ со спектральным разрешением 4 $см^{-1}$ при накоплении 128 сканов с последующим усреднением.

2.8.6 Определение содержания углерода и азота

Содержание общего углерода (C) и общего азота (N) в образцах определяли на элементном анализаторе Vario Max Cube (Elementar, Германия), работающем по принципу каталитического сжигания в токе кислорода при температуре 1150 °C с последующей детекцией газов методом термической проводимости. Образцы предварительно высушивали до постоянной массы при 105 °C, измельчали до размера частиц < 0,2 мм. Навеску 500 мг помещали в никелевые гильзы и сжигали. Калибровку прибора проводили по стандартным образцам аминокислот. Все измерения выполняли в трёх повторностях, результаты выражали в процентах от сухой массы. Соотношение C/N рассчитывали, как отношение массовых долей углерода и азота.

2.8.7 Определение остаточной концентрации углеродных субстратов

Остаточную концентрацию углеводов (глюкоза, сахароза, глицерин) определяли антроновым методом. К 1 мл раствора объекта исследования добавляли 4 мл антронового реактива (0,2 г антрона в 100 мл концентрированной H_2SO_4), нагревали 10 мин на кипящей водяной бане, и измеряли оптическую плотность при длине волны 620 нм. Для остаточного масла (н-гексадекан, отработанное масло) проводили экстракцию смесью хлороформ–метанол (2:1) с последующим гравиметрическим определением.

2.8.8 Экстракция нуклеиновых кислот

Общая геномная ДНК была выделена с помощью набора FastDNA®SPIN Kit for Soil (Bio101, Qbiogene, Germany) согласно протоколу производителя. Выделенная ДНК анализировалась сразу или хранилась при минус 20 °C.

2.8.9 Мониторинг динамики роста штаммов-продуцентов

Динамику роста культур оценивали путём измерения оптической плотности культуральной суспензии на спектрофотометре ПЭ-5400ВИ (Экохим, Россия) при длине волны 600 нм. Перед измерением пробы разводили стерильной питательной средой до оптической плотности в пределах линейного диапазона прибора (0,1-0,8 ед. опт. плотности).

2.8.10 Мониторинг динамики роста штаммов-продуцентов методом ОТ-ПЦР

Динамику роста культур в ферментационных средах оценивали методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием родоспецифичных праймеров. Данный подход позволяет селективно отслеживать накопление метаболически активной биомассы штаммов-продуцентов, исключая вклад нерастворимых компонентов среды и вторичных метаболитов.

Экстракцию тотальной РНК из проб ферментационной среды объёмом 1 мл проводили с помощью набора RNeasy PowerSoil (Qiagen, Германия). Последующий синтез кДНК и количественную ПЦР в реальном времени выполняли в единой постановке (one-step RT-qPCR) на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad, Германия). Для нормировки и верификации логарифмической фазы роста использовали референсный ген 16S рРНК (таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Родоспецифичные праймеры для мониторинга роста штаммов

Штамм	Последовательность праймеров (5'→3')	Ссылка
B. mojavensis P1709	GCTGGTTAGAGCGCACGCCTGATA / CATCCACCGTGCGCCCTTTCTAAC	[218]
P. putida PP021, *P. fluorescens* PCS-20	CTACGGGAGGCAGCAGTGG/ TCGGTAACGTCAAAACAGCAAAGT	[219]

Такой подход позволил нивелировать погрешность, вносимую оптически активными компонентами промышленных субстратов, и обеспечить мониторинг исключительно метаболически активной биомассы целевого продуцента.

2.9 Определение фунгицидной активности *in vitro и in vivo*

Для исследования использовали КОФ в сухом виде, полученные из КЖ при культивировании штамма *B. mojavensis* P1709 на среде с глюкозой (п. 2.4). Тест-объектом в исследовании был выбран фитопатогенный гриб *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, взятый из коллекции кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии КФУ. Для получения спор клетки гриба культивировали на картофельно-декстрозном агаре (0,4 % мас./об. экстракта картофеля, 2 % мас./об. глюкозы, 1,5 % мас./об. агара) в течение 120 ч при 28±2 ℃. Выращенный мицеллий смывали стерильной водопроводной водой, далее фильтровали через четыре слоя марли. В полученной суспензии определяли концентрацию спор с использованием ручного автоматизированного счетчика клеток Scepter (Millipore, Burlington, MA, США). Для дальнейших экспериментов концентрацию спор доводили до 1×10^6 спор/мл.

Фунгицидную активность *in vitro* оценивали по стандартному протоколу с внесением препарата в питательную среду и последующим нанесением аликвоты со спорами гриба [106,220]. Для этого в агар с солодовым экстрактом (солодовый экстракт 2% масс./об., пептон 0,1% масс./об., глюкоза 2% масс./об.) добавляли раствор КОФ в концентрациях 0,5; 2; 5; 10 и 20 г/л в количестве 1 мл и разливали в чашки Петри (диаметром 90 мм). Суспензию спор в объеме 10 мкл добавляли в центр подготовленных чашек Петри. Чашки Петри инкубировали в течение 5 дней при 25±2 °C. По истечению указанного времени измеряли диаметр зоны роста гриба и сравнивали с контрольным образцом (без добавления раствора КОФ).

Для определения наличия и концентрации микотоксинов Т-2 и НТ-2, продуцируемых в ходе роста гриба на питательной среде без и с добавкой КОФ, вырезали кусок мицеллия медицинским скальпелем, взвешивали и

гомогенизировали его в суспензию с помощью вибрационной мельницы ММ 400 (Retsch, Haan, Германия) в течение 2 мин при максимальной частоте колебаний 30 Гц (1800 мин$^{-1}$). Полученную гомогенную субстанцию анализировали с помощью набора для иммуноферментного анализа производства RIDASCREEN (R-Biopharm, Дармштадт, Германия) согласно инструкции производителя. Результаты иммуноанализа оценивали с помощью микропланшетного ридера Мультискан FC (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Общую концентрацию микотоксинов выражали в мкг/г гомогенизированного вещества.

Для оценки защитного действия КОФ *in vivo* использовали плоды томата черри сорта «Черрипальчики F1» (*Solanum lycopersicum* var. cerasiforme, оригинатор – ООО «Селекционная фирма Гавриш», Россия). Данный сорт характеризуется плодами удлинённо-цилиндрической формы, средней массой 12-18 г, ярко-красной окраской и высокой подверженностью растрескиванию при механических повреждениях, что делает его удобной моделью для изучения послеуборочных инфекций, проникающих через микротрещины. Растения выращивали в условиях защищённого грунта в оранжерее Казанского федерального университета с контролем температуры (22-26 °C днём, 16-18 °C ночью) и влажности (65-75 %). Для эксперимента были отобраны плоды без морфологических признаков инфекционных поражений болезней и видимых механических повреждений, длиной 2-3 см и диаметром 1,0-1,5 см. Поверхность плодов стерилизовали в 75 % растворе этанола в течение 30 с, трижды промывали стерильной дистиллированной водой в течение 60 с, а затем сушили в стерильных условиях [221]. На 4 группы, каждая из которых состояла из 6 плодов, стерильной металлической трубкой наносили одинаковые повреждения (диаметр 3 мм и глубина 2 мм). В каждую рану в стерильных условиях вносили по 10 мкл раствора КОФ с концентрацией 0,5, 2,5, 10 и 20 г/л. Через 2 ч наносили по 10 мкл суспензии спор патогенного гриба *F. oxysporum*. В качестве контроля вместо КОФ вносили 10 мкл стерильной воды. Для каждого варианта использовали по шесть томатов (разные концентрации КОФ, отрицательный и положительный контроль). Плоды, относящиеся к одному варианту, хранили вместе в закрытой бумажной коробке при

28 °C в темноте в течение 2 и 7 дней. После инкубации заболеваемость оценивалась, согласно модифицированному протоколу [222]. В частности, рост грибка на каждом плоде оценивали визуально по шкале от 0 до 5, где 0 = нет признаков гниения, 1 = видны небольшие колонии возбудителя, 2 = колонии возбудителя занимают 30-50 % раны, 3 = колонии возбудителя занимают 50-100 % раны, 4 = диаметр распада незначительно превышает диаметр раны (10-50 %), 5 = диаметр распада значительно превышает диаметр раны (>50 %). Для расчёта заболеваемости использовалась формула 2.3:

$$\text{Заболеваемость (\%)} = \frac{\sum_1^5 \text{Уровень заболеваемости} \times \text{Число плодов с данным уровнем заболеваемости}}{\text{Общее число плодов} \times \text{Наивысший балл (5)}} \times 100\ \%. \qquad (2.3)$$

Также в плодах томатов после тестирования фунгицидного действия КОФ определяли активность защитных ферментов (полифенолоксидазы и пероксидазы). Для анализа брали 1 г ткани плодов вокруг каждого повреждённого участка через 2 часа (исходный уровень) и через 2-6 дней после начала эксперимента. Ткань смешивали с 10 мл фосфатного буфера (50 ммоль/л, pH 7,8, предварительно охлаждённого до 4±2 °C), содержащего 1,33 ммоль/л этилендиаминтетрауксусной кислоты и 1 % поливинилпирролидона. Полученную смесь измельчали и центрифугировали при 12 000 об/мин при 4±2 °C в течение 10 мин. Супернатант использовали для дальнейших исследований [223].

Активность полифенолоксидазы определяли, смешивая 0,2 мл супернатанта с 2,8 мл раствора катехола, предварительно нагретого до 30±2 °C. Оптическую плотность измеряли каждые 3 мин при длине волны 398 нм. За единицу активности брали увеличение оптической плотности на 0,01 за мин на грамм свежей массы.

Активность пероксидазы определяли, смешивая 0,2 мл супернатанта с 2,2 мл 0,3 % гваякола (50 ммоль/л, pH 6,4) и инкубируя в течение 10 мин при 30±2 °C. Затем добавляли 0,6 мл 0,3 % перекиси водорода (50 ммоль/л, pH 6,4) и инкубировали ещё 10 мин при 30±2 °C. Оптическую плотность измеряли каждые 3

мин при длине волны 470 нм. За одну единицу активности принимали увеличение оптической плотности на 0,01 за мин на грамм свежей массы.

Активность обоих ферментов выражали в единицах на грамм свежей массы для каждого дня измерения как для контрольных, так и для обработанных КОФ вариантов.

2.10 Моделирование микробных методов увеличения нефтедобычи

2.10.1 Моделирование на песчаных колонках

Для экспериментов по увеличению нефтеотдачи использовали две формы биосурфактантов: КОФ и очищенный биосурфактант. КОФ получали из бесклеточной КЖ штаммов *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021, культивированных на глицерин-нитратной среде, методом кислотного осаждения согласно методике п. 2.5. Очищенный биосурфактант получали из КОФ методом жидкостной экстракции смесью метанол : хлороформ (1:2) также согласно методике п. 2.5. В экспериментах на песчаных колонках с очищенным биосурфактантом использовали препарат *P. fluorescens* PCS-20, в экспериментах с КОФ – препарат *P. putida* PP021.

Оценку эффективности биосурфактантов для увеличения нефтеотдачи проводили в двух модельных системах: 1) в песчаных насыпных колонках (колонки из поливинилхлорида (ПВХ), заполненные прокаленным кварцевым песком фракции 0,2-1,0 мм) с очищенным биосурфактантом *P. fluorescens* PCS-20 в концентрациях 0,1 % и 0,5 % и 2) в кернах на лабораторной установке для моделирования процесса вытеснения нефти (стандартная система УИПК – установка исследования проницаемости кернов) с КОФ биосурфактантов *P. putida* PP021 в концентрациях действующего вещества 0,1 % и 0,5 % (эффективность сравнивали с таковой химического анионного ПАВ производства «Мастер кемикалз» в аналогичных концентрациях).

Процедура подготовки модели пласта:

1. Определение порового объема (PV). Сухую колонку прокачивали аргоном для удаления воздуха и насыщали модельным пластовым рассолом (раствор NaCl, 15 г/л и $CaCl_2$, 2 г/л). Объём закачанного рассола соответствовал поровому объёму колонки.

2. Насыщение нефтью (определение начальных запасов нефти, OOIP). В насыщенную рассолом колонку закачивали нефть (вязкость 12 мПа·с при 25 °C) до прекращения выхода рассола. Объём вытесненной воды соответствовал объёму внедрённой нефти, который принимали за начальные запасы нефти (OOIP – Original Oil in Place).

3. Моделирование вторичной добычи (водонагнетание). Проводили вытеснение нефти рассолом при постоянном давлении 4,0-4,2 атм и температуре 25±1°C. Закачку продолжали до момента обводнения продукции до 98 % (визуально – до появления практически чистой воды). Объем нефти, извлеченный на этой стадии, регистрировали. Расчёт объёма оставшейся в колонке нефти производили по разности между OOIP и объёмом добытой нефти и принимали за остаточную нефтенасыщенность (Sor – Residual Oil Saturation).

Методика подготовки песчаных колонок и проведения эксперимента по вытеснению нефти была предварительно валидирована на культуральных жидкостях, содержащих липопептиды *B. pumilus* и *Peribacillus simplex* [224]. Воспроизводимость метода подтверждена результатами многократных экспериментов со стабильными значениями коэффициента извлечения нефти.

2.10.2 Моделирование на кернах

Для оценки эффективности в условиях, приближенных к натурным, использовали стандартные керны песчаника из коллекции Института геологии и нефтегазовых технологий КФУ (диаметр 3 см, длина 10 см, проницаемость ~500 мД). Процедура подготовки (насыщение рассолом, нефтью и вторичное

вытеснение) была аналогичной, но проводилась на кернодержателе установки УИПК при поддержании температуры 39±1°C и давления 9,5-10 атм.

После этапа вторичного вытеснения, когда нефть уже не вытекала под действием рассола, проводили ключевую стадию опыта – закачку реагентов для оценки их способности извлекать остаточную нефть. В модель закачивали 1 поровый объем одного из испытуемых препаратов:

а) Раствор очищенного биосурфактанта *P. fluorescens* PCS-20, полученного из КОФ экстракцией (п. 2.5), в концентрациях 0,1 % и 0,5 %;

б) КОФ КЖ *P. putida* PP021 (без очистки, в пересчете на действующее вещество), в концентрациях 0,1 % и 0,5 %;

в) Раствор анионного синтетического ПАВ (0,1 % и 0,5 %) для положительного контроля;

г) Стерильная питательная среда для отрицательного контроля.

Колонки/керны герметизировали и инкубировали с реагентом в течение 24 часов для обеспечения контакта и взаимодействия с остаточной нефтью. После инкубации систему промывали рассолом (1,0 PV) для вытеснения мобилизованной нефти. Элюат собирали и центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин для разделения эмульсии и волюметрического измерения объёма дополнительно извлечённой нефти.

Эффективность процесса оценивали по показателю дополнительной нефтеотдачи (AOR – Additional Oil Recovery), %. Ключевой показатель, характеризующий эффективность реагента. Показывает, какую долю от остаточной нефти (Sor), недоступной для традиционных методов, смог извлечь раствор биосурфактанта.

$$AOR\ (\%) = (V_{третичная} / V_{остаточная}) \times 100\%,$$

где $V_{третичная}$ – объём нефти, извлечённый после закачки реагента, мл;

$V_{остаточная}$ – объём нефти, остававшийся в модели после стадии вторичного вытеснения ($V_{остаточная} = OOIP - V(втор)$), мл.

2.11 Статистическая обработка данных

Экспериментальные данные получены в условиях троекратно заложенного опыта, измерения всех параметров проводились не менее чем в трёхкратной повторности. Представленные в таблицах и графиках значения выражены как средние арифметические ± стандартное отклонение. Проверку нормальности распределения данных осуществляли с использованием критерия Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения для оценки силы и направления линейной связи между параметрами применяли коэффициент корреляции Пирсона. При отклонении от нормального распределения для оценки корреляционных связей использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для оценки статистической значимости различий между независимыми выборками применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Статистический анализ проводили с использованием языка программирования Python с пакетами *scipy.stats* и *statsmodels*.

ГЛАВА 3 СКРИНИНГ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОТБОР ПРОДУЦЕНТОВ БИОСУРФАКТАНТОВ

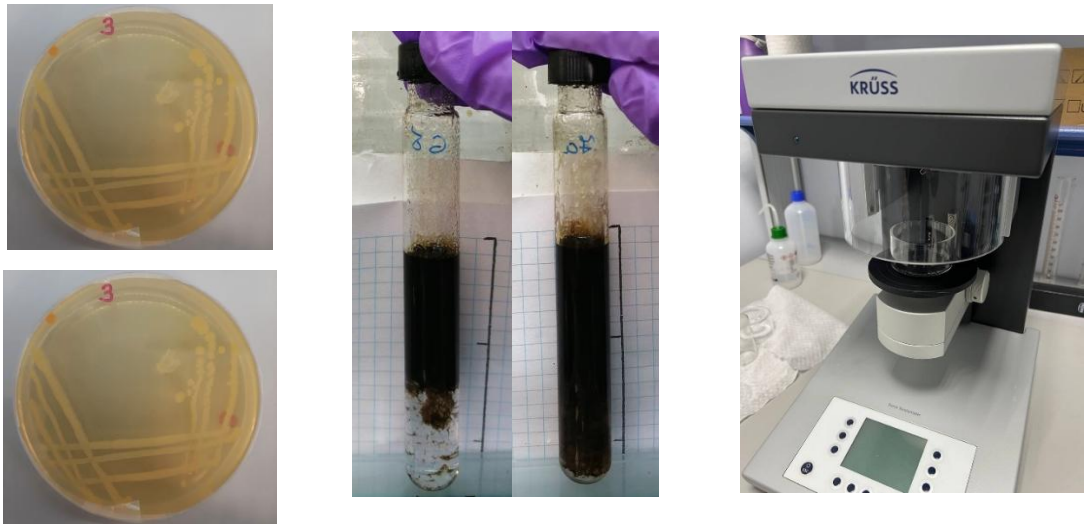
В настоящей главе представлены результаты экспериментальных исследований по скринингу изолятов бактерий из нефтезагрязнённых и ризосферных почв, для выявления эффективных продуцентов биосурфактантов; видовой идентификации изолятов с наибольшей сурфактант-продуцирующей активностью и установлению у них генов биосинтеза различных классов биосурфактантов.

3.1 Скрининг изолятов с наибольшей сурфактант-продуцирующей активностью

Известно, что микроорганизмы, продуцирующие биосурфактанты, широко распространены в средах, загрязнённых углеводородами (нефтезагрязнённые почвы), а также в ризосфере растений, где их активность связана с повышением доступности питательных веществ [1,31]. В настоящем исследовании для выделения потенциальных продуцентов биосурфактантов были отобраны образцы из двух источников: нефтезагрязнённые почвы и ризосфера салата-латука (*L. sativa*) (п. 2.1). Всего получено 63 бактериальных изолята, из которых 44 было выделено из ризосферной почвы, 19 из нефтезагрязнённых образцов почвы. Все полученные изоляты были подвергнуты скринингу на способность синтезировать биосурфактанты. Критериями отбора служили индекс эмульгирования (Е24), отражающий стабильность эмульсии «культуральная жидкость-гексадекан» через 24 ч [202] и снижение ПН, измеренное методом отрыва кольца Де Нюи с использованием тензиометра Kruss [217,225] (рисунок 3.1). Для анализа использовали бесклеточную КЖ, полученную после отделения путём центрифугирования биомассы, выращиваемой в течение 48 ч на глицерин-нитратной среде.

Анализ способности к продукции биосурфактантов 63 изолятов выявил значительную вариабельность ключевых параметров. Минимальное значение

индекса эмульгирования Е24 для бесклеточной КЖ составило 5,00±0,60 % (изолят 4ос), тогда как максимальное достигло 81,0±3,10 % (изолят 12ос). ПН варьировалось в диапазоне от 21,6±0,66 мН/м (изолят 1мо) до 63,4±0,92 мН/м (изолят 6ос) (таблица 3.1).



а б в

Рисунок 3.1 – Изоляты микроорганизмов из нефтезагрязненной почвы (а), оценка индекса эмульсификации Е24 (на примере изолятов 16б и 17а) (б), оценка ПН (в)

Согласно [202, 226, 227], биосурфактанты считаются эффективными при Е24 более 40 % и ПН менее 35 мН/м, и соответственно, полученные результаты указывают, что ряд выделенных изолятов может быть перспективным в качестве продуцентов биосурфактантов.

Между показателями Е24 и поверхностным натяжением выявлена умеренная отрицательная корреляция (коэффициент Пирсона, $R = –0,57$; $p < 0,05$) для всего массива данных ($n=63$). Однако для изолятов из нефтезагрязнённых почв R составил –0,65 ($p < 0,05$). Наблюдаемая тенденция снижения поверхностного натяжения при увеличении Е24 согласуется с общепринятыми представлениями о роли биосурфактантов в снижении межфазного натяжения [228]. В то же время отсутствие строгой корреляции, особенно среди ризосферных изолятов ($R = –0,26$), свидетельствует о независимости механизмов, ответственных за эмульгирование и

изменение поверхностного натяжения. Это может быть связано с различиями в химической структуре биосурфактантов: эмульгирование в большей степени определяется гидрофильно-липофильным балансом и молекулярной массой молекулы [229], тогда как поверхностная активность – наличием полярных групп (например, карбоксильных или гидроксильных) [230].

Полученные результаты согласуются с исследованиями, в которых также не выявлена однозначная связь между Е24 и ПН для ризосферных изолятов [229, 231]. Таким образом, для адекватной оценки биосурфактантной активности целесообразно анализировать данные, полученные обоими методами.

Ранее нами было показано, что бактерии-продуценты биосурфактантов распространены не только в почвах умеренного климата, но и в нефтяных коллекторах других регионов. В частности, из нефти месторождения Бока-де-Харуко (Куба) выделены изоляты *B. subtilis*, *B. licheniformis* и *Aeromonas veronii*, способные продуцировать биосурфактанты и сохраняющие активность в широком диапазоне температур (30-60 °C), солёности (0,5-10 % NaCl) и pH (6-9) [232]. Это подтверждает перспективность поиска аборигенных штаммов-продуцентов для конкретных месторождений.

3.2 Идентификация изолятов методом MALDI-TOF MS

Для всех 63 изолятов проведена идентификация методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролётной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS). Несмотря на ограниченную точность для природных (неклинических) штаммов по сравнению с секвенированием генов рибосомальной РНК [233], метод продемонстрировал высокую эффективность для скринингового анализа на уровне рода, что согласуется с его ключевыми преимуществами: минимальные временные затраты (анализ ≤ 30 мин на образец); относительно низкая стоимость; возможность работы с некультивируемыми формами [234].

Таблица 3.1 – Результаты скрининга изолятов по сурфактант-продуцирующей активности и их родовая идентификация

Номер образца	Почвы	Лабораторный шифр изолята	E24, %	Ранг для E24	ПН, мН/м	Ранг для ПН	Суммарный ранг	Родовая принадлежность
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Ризосфера *L. sativa*	1а	10,0±0,20	2,00	43,5±0,64	29,0	31,0	*Bacillus spp.*
2		2а	52,0±1,10	20,0	27,7±0,75	50,0	70,0	*Bacillus spp.*
3		2б	61,0±1,80	25,0	28,3±0,40	48,0	73,0	*Bacillus spp.*
4		2в	46,0±0,70	15,0	34,5±0,53	40,0	55,0	*Bacillus spp.*
5		3а	40,0±0,60	9,00	38,8±0,50	38,0	47,0	*Bacillus spp.*
6		4в	54,0±1,40	22,0	35,1±0,74	39,0	61,0	*Paenibacillus spp.*
7		5а	48,0±1,70	17,0	32,6±1,14	42,0	59,0	*Paenibacillus spp.*
8		6а	43,0±1,60	12,0	41,2±0,54	33,0	45,0	*Bacillus spp.*
9		6в	47,0±1,20	16,0	44,0±0,66	27,0	43,0	*Bacillus spp.*
10		7а	41,0±0,90	10,0	56,3±1,47	6,00	16,0	*Bacillus spp.*
11		7б	42,0±0,90	11,0	54,4±1,58	8,00	19,0	*Bacillus spp.*
12		8а	42,0±1,50	11,0	48,9±1,73	12,0	23,0	*Bacillus spp.*
13		9а	40,0±0,40	9,00	44,6±0,93	26,0	35,0	*Bacillus spp.*
14		10а	20,0±0,20	3,00	45,7±1,24	22,0	25,0	*Bacillus spp.*
15		11а	37,0±1,10	8,00	39,9±1,03	36,0	44,0	*Bacillus spp.*
16		12а	25,0±0,60	4,00	43,4±0,66	28,0	32,0	*Bacillus spp.*
17		12б	51,0±0,60	19,0	23,3±0,72	53,0	72,0	*Pseudomonas spp.*
18		13а	30,0±0,30	5,00	45,6±0,61	23,0	28,0	*Pseudomonas spp.*
19		14а	44,0±1,70	13,0	46,6±1,61	19,0	32,0	*Bacillus spp.*
20		15а	45,0±0,50	14,0	42,1±1,20	32,0	46,0	*Bacillus spp.*
21		16а	40,0±1,50	9,00	43,3±1,27	31,0	40,0	*Bacillus spp.*
22		16б	45,0±1,00	14,0	45,6±0,82	23,0	37,0	*Bacillus spp.*
23		17а	60,0±1,10	23,0	27,8±0,49	49,0	72,0	*Pseudomonas spp.*
24		18а	50,0±0,70	18,0	47,8±0,73	15,0	33,0	*Bacillus spp.*
25		19а	45,00±1,00	14,0	34,50±1,30	40,0	54,0	*Paenibacillus spp.*

Продолжение таблицы 3.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
26		20а	53,0±1,10	21,0	44,8±0,87	25,0	46,0	*Paenibacillus spp.*
27		20б	56,0±2,10	24,0	47,8±0,60	15,0	39,0	*Bacillus spp.*
28		20в	25,0±0,30	4,00	41,1±0,89	34,0	38,0	*Bacillus spp.*
29		21а	44,0±1,30	13,0	43,4±0,62	30,0	43,0	*Bacillus spp.*
30		22а	36,0±0,30	7,00	45,5±1,27	24,0	31,0	*Bacillus spp.*
31		22б	50,0±0,90	18,0	32,1±0,79	44,0	62,0	*Bacillus spp.*
32		23а	56,0±2,20	24,0	33,0±0,73	41,0	65,0	*Bacillus spp.*
33		24а	53,0±1,60	21,0	45,8±1,18	21,0	42,0	*Bacillus spp.*
34		25а	52,0±0,80	20,0	47,7±0,57	16,0	36,0	*Bacillus spp.*
35		26б	56,0±1,25	24,0	34,5±0,41	40,0	64,0	*Bacillus spp*
36		26в	43,0±1,10	12,0	45,9±1,78	20,0	32,0	*Bacillus spp.*
37		27а	35,0±0,50	6,00	43,7±1,70	28,0	34,0	*Paenibacillus spp.*
38		27б	55,0±1,50	23,0	46,9±0,64	17,0	40,0	*Paenibacillus spp.*
39		28а	54,0±1,00	22,0	50,0±1,25	11,0	33,0	*Bacillus spp.*
40		28б	40,0±1,00	9,00	23,4±0,61	52,0	61,0	*Paenibacillus spp.*
41		28в	48,0±0,70	17,0	48,9±1,45	12,0	29,0	*Arthrobacter spp.*
42		29а	50,0±0,70	18,0	32,2±0,63	43,0	61,0	*Bacillus spp.*
43		30а	50,0±1,00	18,0	40,2±1,22	35,0	53,0	*Bacillus spp.*
44		31а	40,0±0,50	9,00	46,7±1,37	18,0	27,0	*Bacillus spp.*
45	Нефтеза-грязненная почва	1мо	40,00±1,30	9,00	21,60±0,66	54,0	63,0	*Peribacillus spp.*
46		2мо	50,00±1,30	18,0	39,70±0,50	37,0	55,0	*Sphingomonas spp.*
47		3мо	30,00±0,70	5,00	48,60±0,52	13,0	18,0	*Nocardiopsis spp.*
48		4мо	10,00±0,40	0,00	47,90±0,74	14,0	14,0	*Bacillus spp.*
49		5мо	40,00±1,50	9,00	29,20±1,04	46,0	55,0	*Ochrobactrum spp.*
50		6мо	30,00±0,40	5,00	59,20±0,60	4,00	9,00	*Shouchella spp.*
51		7мо	10,00±0,30	2,00	47,90±0,94	14,0	16,0	*Sphingomonas spp.*

Продолжение таблицы 3.1

1	2	3	4	5	6	7	8	9
52		1ос	40,0±1,00	9,00	53,5±1,36	9,00	18,0	*Bacillus spp.*
53		2ос	5,00±0,60	1,00	60,4±1,37	2,00	3,00	*Bacillus spp.*
54		3ос	20,0±0,30	3,00	50,1±1,05	10,0	13,0	*Bacillus spp.*
55		4ос	5,00±0,20	1,00	45,8±1,14	21,0	22,0	*Staphylococcus spp.*
56		5ос	20,0±0,70	3,00	29,4±0,43	45,0	48,0	*Bacillus spp.*
57		6ос	30,0±0,30	5,00	63,4±0,92	1,00	6,00	*Sphingomonas spp.*
58		7ос	10,0±0,30	2,00	55,4±1,21	7,00	9,00	*Sphingomonas spp.*
59		8ос	30,0±1,10	5,00	59,8±0,81	3,00	8,00	*Sphingomonas spp.*
60		9ос	20,0±0,80	3,00	68,1±1,14	0,00	3,00	*Sphingomonas spp.*
61		10ос	20,0±0,70	3,00	57,5±2,20	5,00	8,00	*Unidentified bacterium*
62		11ос	75,0±2,30	26,0	29,5±0,43	47,0	73,0	*Pseudomonas spp.*
63		12ос	81,0±3,10	27,0	27,1±0,87	51,0	78,0	*Pseudomonas spp.*
Положительный контроль (синтетическое ПАВ)			83,0±2,40	-	21,6±0,48	-	-	-
Положительный контроль (промышленный ди-монорамнолипид, КНР)			88,0±1,50	-	24,0±0,27	-	-	-

Установлено, что выделенные изоляты относятся к 10 родам: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Peribacillus*, *Sphingomonas*, *Nocardiopsis*, *Ochrobactrum*, *Shouchella*, *Staphylococcus* (таблица 3.1).

Среди изолятов, выделенных из нефтезагрязнённых почв преобладали рода *Sphingomonas* spp. (6 изолятов) и *Bacillus* spp. (4 изолята). Данные таксоны широко описаны как деструкторы углеводородов за счёт синтеза биосурфактантов, повышающих биодоступность гидрофобных субстратов [123,235]. Для изолятов, полученных из ризосферы *L. sativa,* доминировали рода *Bacillus* spp. (16 изолятов), *Paenibacillus* spp. (6 изолятов) и *Pseudomonas* spp. (3 изолята). Указанные роды играют ключевую роль в стимуляции роста растений через синтез фитогормонов (например, ауксинов), фосфат-солюбилизации и подавление фитопатогенов [236, 237].

Наименьшие значения суммарного ранга (73-78) продемонстрировали изоляты 2б (ризосферная почва), 11ос и 12ос (нефтезагрязненный субстрат). У этих изолятов наблюдалось сочетание высокой эмульгирующей активности (Е24 61-81 %) и низкого ПН (27,1-29,5 мН/м), что подтверждает их высокий биотехнологический потенциал. Напротив, изоляты с наибольшими значениями суммарного ранга характеризовались либо низкой эмульгирующей активностью, либо высокими значениями ПН – то есть их КЖ обладали наименьшей поверхностной активностью. Корреляционная зависимость между Е24 и ПН подтверждена статистически (коэффициент Пирсона $R = –0,57$; $p<0,05$).

Все изоляты, проявившие высокие показатели Е24 и ПН, были внесены в базу данных перспективных сурфактант-продуцирующих микроорганизмов, зарегистрированную как результат интеллектуальной деятельности (свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2025624611 от 22.10.2025 [238]).

Для дальнейшей работы были отобраны 3 изолята – 2б; 11ос; 12ос. Их видовую принадлежность установили методом секвенирования по Сэнгеру. После экстракции геномной ДНК из культур, выращенных в жидкой питательной среде, проведен анализ нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с использованием универсальных праймеров 27F и 1492R (рисунок 3.2).

а

```
   1 gggggggttgg ggttattttg tggcggcgtg ctatacatgc aagtcgagcg gacagatggg
  61 agcttgctcc ctgatgttag cggcggacgg gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcctgtaa
 121 gactgggata actccgggaa accggggcta ataccggatg gttgtttgaa ccgcatggtt
 181 caaacataaa aggtggcttc ggctaccact tacagatgga cccgcggcgc attagctagt
 241 tggtgaggta acggctcacc aaggcaacga tgcgtagccg acctgagagg gtgatcggcc
 301 acactgggac tgagacacgg cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttccgc
 361 aatggacgaa agtctgacgg agcaacgccg cgtgagtgat gaaggttttc ggatcgtaaa
 421 gctctgttgt tagggaagaa caagtaccgt tcgaataggg cggtaccttg acggtaccta
 481 accagaaagc cacggctaac tacgtgccag cagccgcggt aatacgtagg tggcaagcgt
 541 tgtccggaat tattgggcgt aaagggctcg caggcggttt cttaagtctg atgtgaaagc
 601 ccccggctca accggggagg gtcattggaa actggggaac ttgagtgcag aagaggagag
 661 tggaattcca cgtgtagcgg tgaaatgcgt agagatgtgg aggaacacca gtggcgaagg
 721 cgactctctg gtctgtaact gacgctgagg agcgaaagcg tgggggagcg aaca
```

в

```
   1 agtttgaacc tggctcagat tgaacgctgg cggcaggcct aacacatgca agtcgagcgg
  61 atgagaagag cttgctcttc gattcagcgg cggacgggtg agtaatgcct aggaatctgc
 121 ctggtagtgg gggacaacgt ttcgaaagga acgctaatac cgcatacgtc ctacgggaga
 181 aagcgggggga ccttcgggcc ttgcgctatc agatgagcct aggtcggatt agctagttgg
 241 tgaggtaatg gctcaccaag gcgacgatcc gtaactggtc tgagaggatg atcagtcaca
 301 ctggaactga gacacggtcc agactcctac gggaggcagc agtggggaat attggacaat
 361 gggcgaaagc ctgatccagc catgccgcgt gtgttaagaa ggtcttcgga ttgtaaagca
 421 ctttaagttg ggaggaaggg cattaaccta atacgttagt gttttcacgt taccgacaga
 481 ataagcaccg gctaactctg tgccagcagc cgcggtaata acagagggtg caagcgttaa
 541 tcggaattac tgggcgtaaa gcgcgcgtgg gtggtttgtt aagttggatg tgaaagcccc
 601 gggctcaacc tgggaactgc atccaaaact ggcaagctag agtacggtag agggtggtgg
 661 aatttcctgt gtagcggtga aatgcgtaga tataggaagg aacaccagtg gcgaaagcga
 721 ccacctggac tgatactgac actgaggtgc gaaagcgtgg ggagcaaaca ggattagata
 781 ccctggtagt ccacgccgta atcgatgtca actagccgtt ggaatccttg agattttagt
 841 ggcgcagcta acgcattaag ttgaccgcct ggggagtacg gccgcaaggt taaaactcaa
 901 atgaattgac gggggcccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga
 961 agaaccttac caggccttga catgcagaga actttccaga gaacgattgg tgccttcggg
1021 aactctgaca caggtgctgc atggctgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag
1081 tcccgtaacg agcgcaaccc ttgtccttag ttaccagcac gtaatggtgg gcactctaag
1141 gagactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaagtcatc atggccctta
1201 cggcctgggc tacacacgtg ctacaatggt cggtacagag ggttgccaag ccgcgaggtg
1261 gagctaatct cacaaaaccg aacgtagtcg cagtctgcaa ctcgactgcg tgaagtcgga
1321 atcgctagta atcgcgaatc agaatgtcgc ggtgaatacg ttcccgggcc ttgtacacac
1381 cgcccgtcac accatgggag tgggttgcac cagaagtagc tagtctaacc ttcgggagga
1441 cggttaccac ggtgtgattc atgactgggg tgaagtcgta acaaggtagc cgtaggggaa
1501 cctgcggctg gatcacctcc tt
```

б

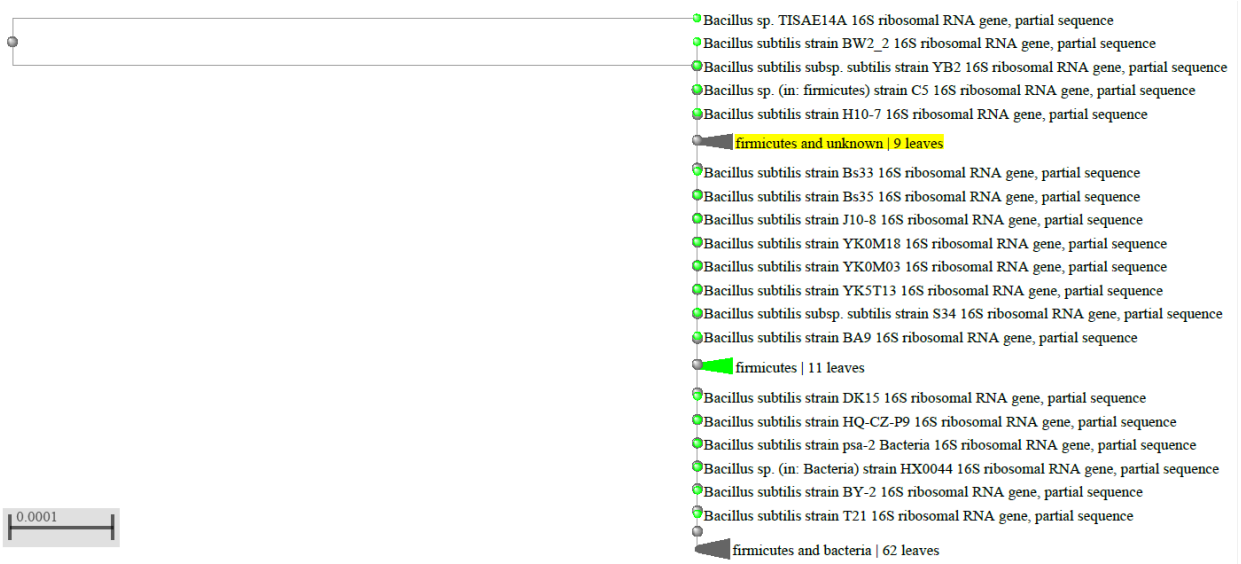
```
   1 atgcacctct tgagagcggc ggacgggtga gtaatgccta ggaatttgcc tggtagtggg
  61 ataacgctcg gaaacggacg ctaataccgc atacgtccta cgggagaaag caggggacct
 121 tcgggccttg cgctatcaga tgagcctagg tcggattagc tagttggtga ggtaatggct
 181 caccaaggcg acgatccgta actggtctga gaggatgatc agtcacactg gaactgagac
 241 acggtccaga ctcctacggg aggcagcagt ggggaatatt ggacaatggg cgaaagcctg
 301 atccagccat gccgcgtgtg tgaagaaggt cttcggattg taaagcactt taagttggga
 361 ggaagggcat taacctaata cgttagtgtt ttgacgttac cgacagaata agcaccggct
 421 aactctgtgc cagctgccgc ggtaatacag agggtgcaag cgttaatcgg aattactggg
 481 cgtaaagcgc gcgtaggtgg ttcgttaagt tggatgtgaa atccccgggc tcaacctggg
 541 aactgcattc aaaactgtcg agctagagta tggtagaggg tggtggaatt tcctgtgtag
 601 cggtgaaatg cgtagatata ggaaggaaca ccagtggcga aggcgaccac ctggactgat
 661 actgacactg aggtgcgaaa gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtggac
 721 gccgtaaacg atgtcaacta gcccgttggg agccttgagc tcttagtggc gcagctaacg
 781 cattaagttg accgcctggg gagtacggcc gcaaggttaa aactcaaatg aattgacggg
 841 ggcccgcaca agcggtggag catgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga acctttccag
 901 gccttgacat ccaatgaact ttccagagat ggattggtgc cttcgggaac attgagacag
 961 gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgtcg tgagatgttg ggttaagtcc cgtaacgagc
1021 gcaacccttg tccttagtta ccagcacgtt atggtgggca ctctaaggag actgccggtg
1081 acaaaccgga ggaaggtggg gatgacgtca agtcatcatg gcccttacgg cctgggctac
1141 accg
```

Рисунок 3.2 – Олигонуклеотидные последовательности изолятов: а) 2б; б) 11ос; в)12ос

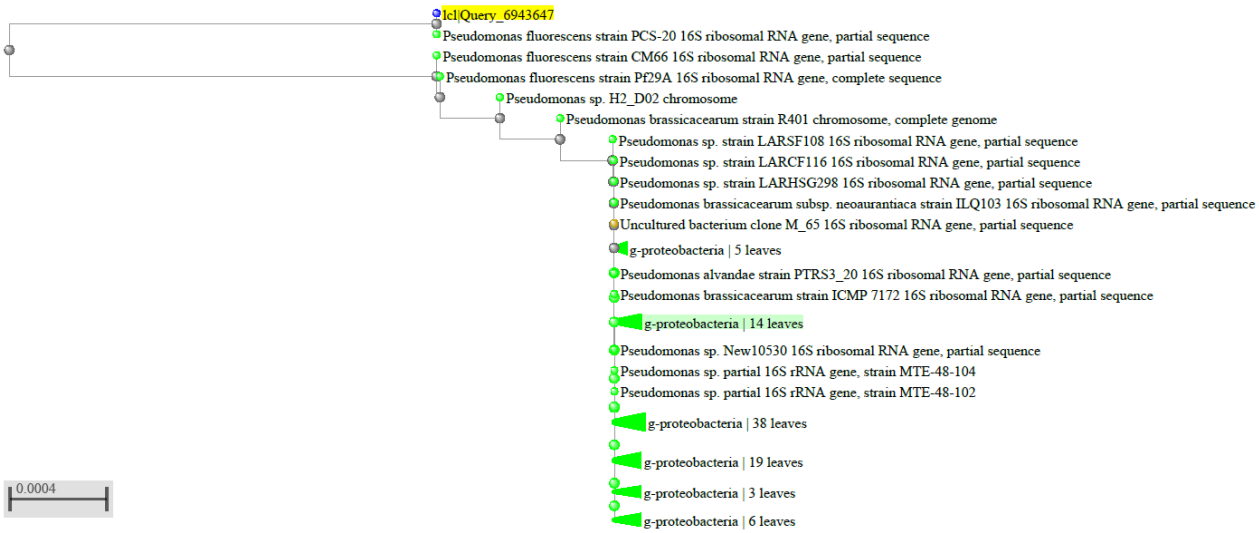
Полученные данные сопоставлены с референсными последовательностями в международных базах (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/PZ277301.1/). Филогенетический анализ секвенированных фрагментов, выполненный в программе MEGA 11.0, и последующее сравнение с базой данных NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) позволило установить сходство изолятов 2б, 11ос и 12ос со штаммами *Bacillus mojavensis, Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas putida* более чем на 99 %.

На основании построенных дендрограмм была проведена оценка филогенетического положения исследуемых микроорганизмов (рисунок 3.3). Согласно полученным данным, изолят *B. mojavensis* P1709 локализуется в едином кластере с представителями группы *B. subtilis*. При этом наибольший уровень гомологии и обособленное положение на ветви он демонстрирует со штаммом *Bacillus* sp. TISAE14A. Для целевого штамма *P. fluorescens* PCS-20 характерно формирование монофилетической группы совместно с родственным изолятом *P. fluorescens* CM66. Это подтверждает его четкую таксономическую дифференциацию от более отдаленных ветвей рода, в частности от штаммов вида *P. brassicacearum*. В свою очередь, построение филогенетического древа для штамма *P. putida* PP021 выявило его принадлежность к обширному кластеру бактерий вида *P. putida*. Внутри данной группы исследуемый микроорганизм занимает медианное положение, обнаруживая максимальное генетическое родство с референтным изолятом *P. putida* AHK_SHA007.

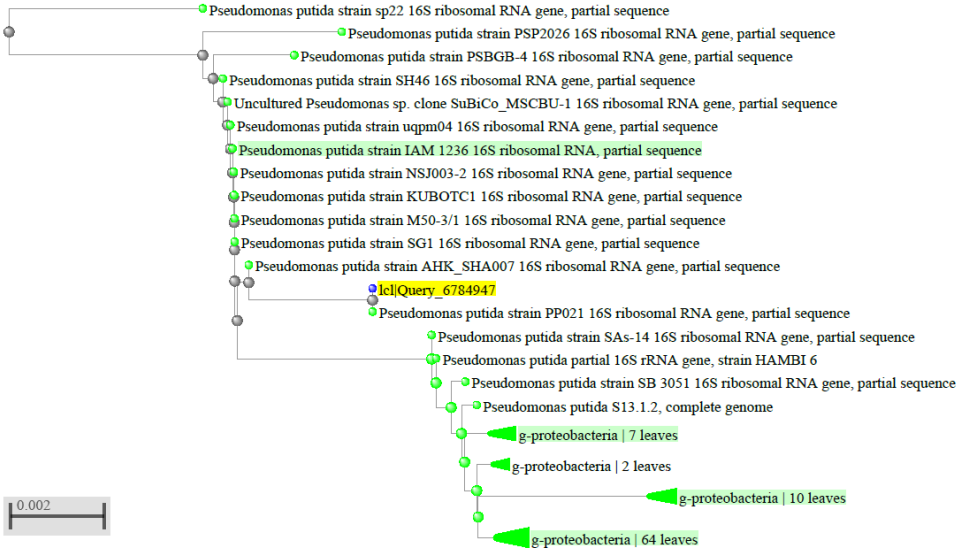
Результаты секвенирования подтвердили данные, полученные методом MALDI-TOF масс-спектрометрии, однако продемонстрировали более высокое разрешение: в отличие от масс-спектрального анализа, ограниченного определением до рода, секвенирование гена 16S рРНК обеспечило возможность установить вид штамма. Указанным штаммам присвоены внутрилабораторные регистрационные коды: *B. mojavensis* P1709, *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021. Последовательности штаммов зарегистрированы в базе данных GenBank (таблица 3.2).



а



б



в

Рисунок 3.3 – Филогенетическое древо выделенных штаммов: а) *B. mojavensis* P1709; б) *P. fluorescens* PCS-20; в) *P. putida* PP021

Таблица 3.2 – Регистрация выделенных штаммов в базе данных GenBank

Бактерия	Штамм	Год выделения	Номер GenBank
B. mojavensis	P1709	2021	PZ277301
P. fluorescens	PCS-20	2020	PZ277302
P. putida	PP021	2020	PZ277303

3.3 Установление генов биосинтеза биосурфактантов в штаммах *B. mojavensis* P1709, *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021

На следующем этапе проведен скрининг геномов отобранных штаммов на наличие ключевых генов биосинтеза различных классов биосурфактантов. Методом ПЦР в реальном времени исследовали гены, ассоциированные с синтезом липопептидов (сурфактин – *srfAA*, бацилломицин – *bamC*, фенгицин – *fenD*, итурин – *ituC*) и гликолипидов (рамнолипиды С и В – *rhlC* и *rhlB*) [239-242]. Протокол амплификации выполнен в соответствии с методиками [243, 244]. Полученные данные приведены в таблице 3.3.

Геномный анализ штамма *B. mojavensis* P1709 выявил наличие генов *fenD* и *srfAA/srfA3*, кодирующих синтез фенгицинов и сурфактинов – липопептидов с выраженной биологической активностью. Полученные данные согласуются с исследованиями, продемонстрировавшими, что штаммы *Bacillus*, выделенные из филлосферы, продуцируют двухкомпонентные смеси фенгицина и сурфактина, но не итурина, при этом фенгицин демонстрирует фунгицидную активность [245]. Отсутствие гена *ituC* в геноме P1709 позволяет предположить, что данный штамм, подобно филлосферным изолятам, не синтезирует итурин.

Установлено, что штаммы *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021 содержат гены *rhlB* и *rhlC*, ответственные за синтез ключевых ферментов биосурфактантов: рамнозилтрансферазы 1 (образование dTDP-L-рамнозы) и рамнозилтрансферазы 2 (биосинтез дирамнолипидов). Эти данные подтверждают способность штаммов продуцировать как моно-, так и дирамнолипиды, что коррелирует с результатами китайских ученых, обнаруживших аналогичные генетические кластеры у углеводородокисляющих штаммов *Pseudomonas* [246].

Таблица 3.3 – Анализ наличия генов, кодирующих синтез биосурфактантов, в геномах исследуемых штаммов

Штаммы	Кодируемый белок/функция						
	Сурфактант синтетаза (первый модуль)	Сурфактант синтетаза (дополнительный модуль)	Бацилломицин синтетаза	Итурин синтетаза	Фенгицин синтетаза	Рамнолипид синтетаза	Рамнолипид синтетаза
	Вид биосурфактанта, синтез которого кодируется геном						
	сурфактин	сурфактин	бацилломицин	итурин	фенгицин	моно- и дирамно-липиды	моно- и дирамно-липиды
	Ген и число копий генов/мл						
	srfAA	*srfA3*	*bamC*	*ituC*	*fenD*	*rhlB*	*rhlC*
B. mojavensis P1709	$2{,}76 \times 10^4$	$1{,}21 \times 10^2$	0	0	$2{,}30 \times 10^2$	0	0
P. putida PP021	0	0	0	0	0	$8{,}80 \times 10^3$	$4{,}04 \times 10^2$
P. fluorescens PCS-20	0	0	0	0	0	$1{,}01 \times 10^3$	$9{,}01 \times 10^2$

На основе выявленных генетических особенностей изолятов были определены два направления их практического использования: липопептиды *B. mojavensis* P1709 – для подавления фитопатогенных грибов, а рамнолипиды *P. putida* PP021 – для эмульсификации нефти и увеличения нефтеотдачи.

Выбор *B. mojavensis* P1709 для защиты растений обусловлен наличием генов *fenD* и *srfAA/srfA3*, кодирующих синтез фенгицина и сурфактина – соединений с доказанной антимикробной активностью [241, 243].

Для нефтяных применений выбран штамм *P. putida* PP021, поскольку ди- и монорамнолипиды эффективно снижают межфазное натяжение и модулируют смачиваемость пород [247, 248]. Выбор штамма *P. putida* PP021 в качестве продуцента рамнолипидов для задач увеличения нефтеотдачи обусловлен их более высокой эффективностью по сравнению с липопептидами. Кроме того показано, что липопептидсодержащие КЖ *B. pumilus* и *Peribacillus simplex* в аналогичных условиях уступали или незначительно превосходили синтетические ПАВ [224]. При этом, липопептиды более чувствительны к высоким температурам и солёности пластовых вод, а также склонны к сорбции на породе, что снижает их эффективность в третичном заводнении, тогда как гликолипиды сохраняют активность в широком диапазоне температур (20-80 °C) и солёности (до 10-15 % NaCl).

Следует отметить, что штамм *P. fluorescens* PCS-20 не рассматривался для промышленного применения. Согласно классификатору патогенных биологических агентов (Приложение 1, СанПиН 3.3686-21), *P. fluorescens* не отнесена к патогенным микроорганизмам и в мировой практике рассматривается как непатогенный сапротроф. Однако в литературе описаны единичные случаи выделения *P. fluorescens* из клинического материала у иммунокомпрометированных пациентов, что позволяет характеризовать отдельные штаммы как условно-патогенные. Штамм *P. fluorescens* PCS-20, также продуцирующий рамнолипиды, использован исключительно как модельный объект для сравнительных экспериментов по исследованию ММУН (раздел 5.7); его биомасса после экспериментов инактивировалась в соответствии с требованиями биологической безопасности.

ГЛАВА 4 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ШТАММОВ *B. MOJAVENSIS* P1709, *P. FLUORESCENS* PCS-20 И *P. PUTIDA* PP021

4.1 Оценка роста и продуктивности штаммов *B. mojavensis* P1709, *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021 на синтетических средах

Для интенсификации синтеза биосурфактантов традиционно применяются специализированные питательные среды [249], при этом максимальная продуктивность штаммов достигается только при удовлетворении в потребности как в источнике углерода, так и в источниках азота, фосфора и других минеральных элементов. В рамках настоящего исследования был проведен выбор состава питательной среды и определена оптимальная продолжительность инкубирования, обеспечивающие наибольшую продуктивность биосурфактантов при жидкофазном культивировании штаммов *B. mojavensis* P1709, *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021.

Протестированы три питательные среды: модифицированная среда ВН с 2 % глюкозы, глицерин-нитратная среда (20 г/л глицерина, 2 г/л KNO_3) и минеральная среда с 1 % н-гексадекана в качестве источника углерода. Культивирование осуществляли при 28±2 ℃ в течение 72 ч в условиях аэрации (120 об/мин). В ходе культивирования оценивали прирост биомассы и накопление биосурфактантов по ПН КЖ. Для каждого штамма проведено сравнение сурфактантн-продуцирующей активности в конце культивирования на трёх средах с различными источниками углерода. Наилучшие показатели по Е24 и поверхностному натяжению выделены в таблице 4.1. Максимальная продуктивность штамма *B. mojavensis* P1709 достигнута при культивировании на среде ВН с 2 % глюкозы – данная комбинация, вероятно, стимулирует экспрессию генов липопептидного синтеза (*srfAA, fenD*), что подтверждается увеличением значения Е24 в 1,1-2,0 раза по сравнению с альтернативными средами. Для штаммов *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 наивысшие значения снижения ПН (до 28 мН/м) и стабильная эмульгация нефти

зарегистрированы в глицерин-нитратной среде, где глицерин выступает как предшественник для синтеза рамнолипидов [250]. Полученные значения сопоставимы с литературными данными для промышленных продуцентов *Bacillus* и *Pseudomonas* (Е24 40-80 %, ПН 25-35 мН/м) [251,252].

Таблица 4.1 – Показатели Е24 и ПН КЖ штаммов при культивировании на трёх средах с разными источниками углерода

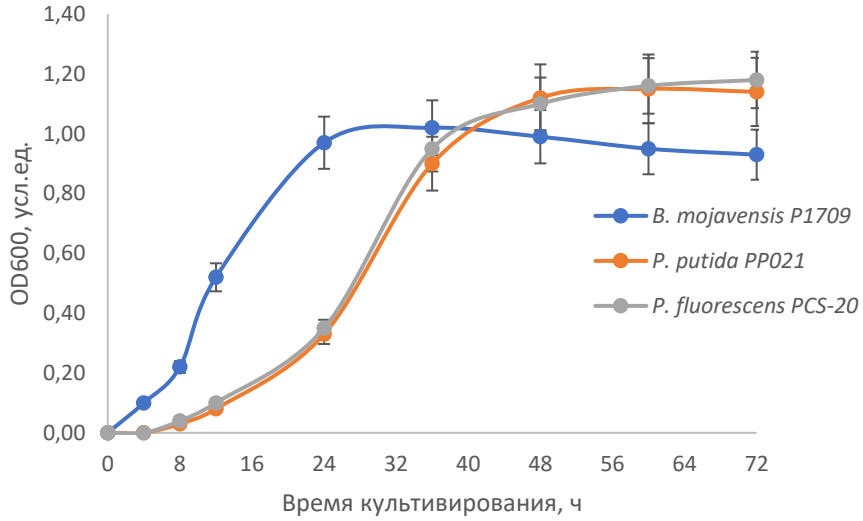
Источник углерода в среде	Показатель	*B. mojavensis* P1709	*P. putida* PP021	*P. fluorescens* PCS-20
глюкоза	Е24, %	61,0±5,5	81,0±7,1	75,0±6,6
	ПН, мН/м	28,3±0,45	28,8±0,33	31,5±0,42
глицерин	Е24, %	55,0±3,6	85,0±6,5	80,0±7,0
	ПН, мН/м	29,3±0,23	27,5±0,34	29,4±0,55
н-гексадекан	Е24, %	30,0±1,8	66,0±5,0	54,0±4,3
	ПН, мН/м	45,6±0,78	52,4±0,65	43,3±0,54

Далее для каждого штамма определена длительность культивирования, обеспечивающая пиковую продукцию биосурфактантов. Анализ динамики изменений ПН и оптической плотности (OD600) КЖ в ходе культивирования *B. mojavensis* P1709 на среде ВН с глюкозой и *P. putida* PP021/*P. fluorescens* PCS-20 на глицерин-нитратной среде (рисунок 4.1), позволил определить оптимальные сроки завершения ферментации для наибольшей продукции биосурфактантов. Критерием остановки процесса служило достижение двух условий: стабилизация значений ПН на минимальных значениях, характерных для исследуемых штаммов (28-32 мН/м для *Pseudomonas* spp. и 28-30 мН/м для *B. mojavensis*), что свидетельствует о насыщении среды биосурфактантами [253]; и выход оптической плотности на плато, отражающий переход культуры в стационарную фазу роста и прекращение образования биомассы [254].

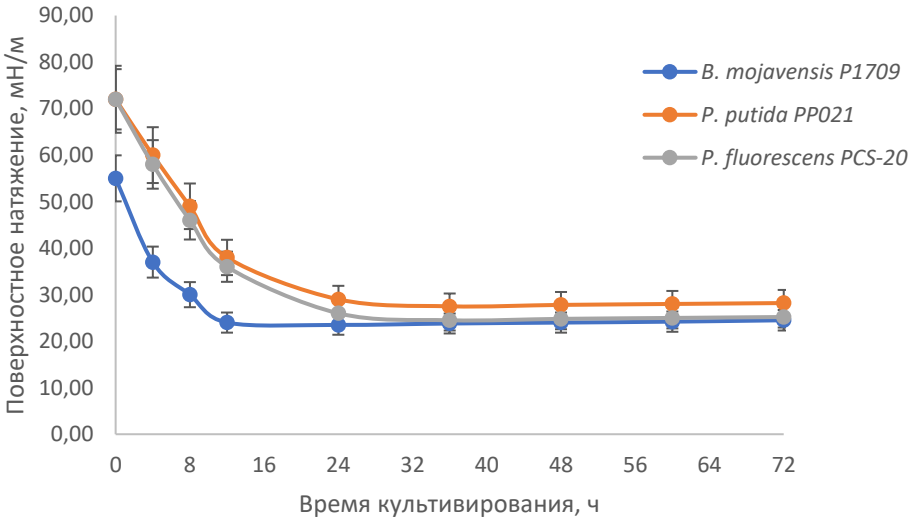
Согласно данным измерения OD (рисунок 4.1а), динамика роста исследуемых штаммов существенно различалась. Для штамма *B. mojavensis* P1709 лаг-фаза составляла около 4 ч, после чего наблюдался интенсивный экспоненциальный рост в интервале от 4 до 24 ч культивирования. В период с 24

по 36 ч отмечалась фаза замедления роста с последующим выходом на стационарный уровень (OD600 ≈ 1,00).

а



б



в

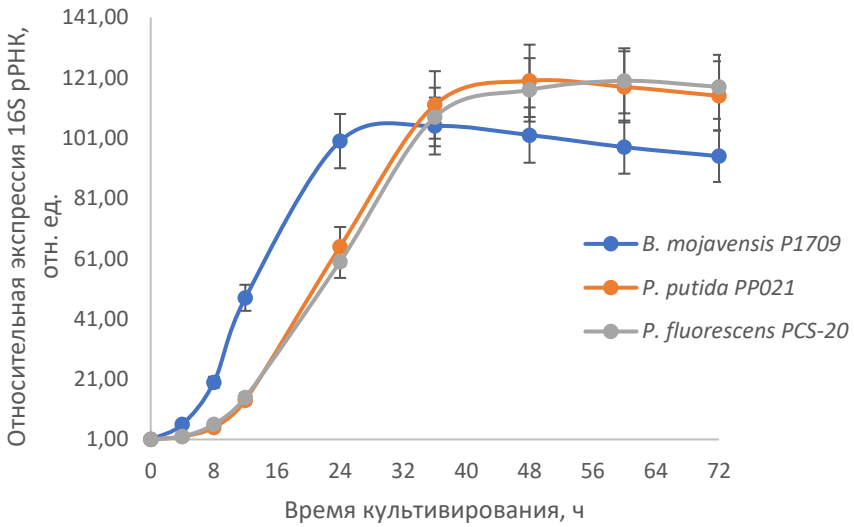


Рисунок 4.1 – Оптическая плотность (а), ПН (б) и экспрессия генов 16S рРНК (в) КЖ штаммов *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021, *P. fluorescens* PCS-20

Штаммы *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 характеризовались более длительным периодом адаптации (лаг-фаза до 8 ч). Фаза активного логарифмического роста для псевдомонад продолжалась в интервале от 8 до 36-48 ч, после чего обе кривые выходили на плато стационарной фазы (48-72 ч) при максимальных значениях OD600 в диапазоне 1,10-1,20. Полученные данные согласуются с метаболическими паттернами, описанными для родственных таксонов [255,256].

Далее оценивали динамику ПН КЖ в процессе ферментации (рисунок 4.1б). Начальные значения ПН КЖ демонстрируют выраженную зависимость от состава питательной среды и видовой специфики штаммов. Так, значения ПН для культуральной жидкости *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021, выращенных на глицерин-нитратной среде, на 0 сутки составили 72,0±0,5 мН/м и 73,8±0,3 мН/м соответственно, тогда как для *B. mojavensis* P1709, культивированного на среде ВН с глюкозой, исходный показатель был существенно ниже (50,1±0,7 мН/м). Такие различия объясняются присутствием в среде ВН предшественников биосурфактантов (например, глюкозы, стимулирующей синтез липопептидов), что снижает базовое поверхностное натяжение ещё до начала активной продукции биосурфактантов [257].

Согласно данным оценки динамики ПН КЖ интервал 24-48 ч культивирования соответствует фазе активного синтеза биосурфактантов для всех штаммов. Так, для *B. mojavensis* P1709 в первые 36 ч одновременно с экспоненциальным ростом оптической плотности наблюдалось резкое снижение ПН на 40-50 % до 23,9 мН/м. Продолжение культивирования свыше этого времени не приводило к дальнейшему снижению ПН и, следовательно, увеличению продукции биосурфактантов.

Тем временем, для КЖ штамма *P. fluorescens* PCS-20 было отмечено максимальное снижение ПН до 24,4 мН/м на 36 ч культивирования, тогда как для КЖ штамма *P. putida* PP021 минимальные значения ПН (27,5 мН/м) достигнуты на 72 ч. Более позднее снижение ПН для КЖ штамма *P. putida* PP021 может быть связано с пролонгированной фазой накопления дирамнолипидов. Полученные

данные согласуются с диапазонами ПН, характерными для промышленных штаммов-продуцентов биосурфактантов: 22-30 мН/м для *Pseudomonas* spp. и 25-35 мН/м для *Bacillus* spp. [258,259]. Снижение поверхностного натяжения до 24-28 мН/м указывает на высокую эффективность штаммов в контексте применения биосурфактантов в целях ММУН. Для сравнения, коммерческие препараты на основе рамнолипидов демонстрируют поверхностное натяжение 25-30 мН/м [260], что подтверждает конкурентоспособность изученных изолятов. Различия во временных точках достижения минимума поверхностного натяжения между *Pseudomonas* и *Bacillus* объясняются особенностями регуляции генов биосинтеза биосурфактантов: у *Bacillus* кластеры *srfAA* и *fenD* активируются раньше, чем опероны *rhlAB* у *Pseudomonas* [243,261].

Корреляционный анализ выявил сильную отрицательную взаимосвязь между OD и ПН для всех штаммов (коэффициент Пирсона: –0,953 для *B. mojavensis* P1709, –0,972 для *P. putida* PP021, –0,947 для *P. fluorescens* PCS-20; $p < 0,001$). Это подтверждает, что активный рост биомассы (экспоненциальная фаза) сопровождается интенсивной секрецией биосурфактантов, тогда как стабилизация оптической плотности (стационарная фаза) коррелирует с насыщением среды поверхностно-активными соединениями. Наблюдаемая закономерность соответствует общепринятым моделям кинетики синтеза биосурфактантов, где максимальная продуктивность достигается при переходе культуры из экспоненциальной в стационарную фазу [202].

Наблюдаемая инертность корреляции между биомассой клеток и активностью биосурфактантов может быть объяснена рядом факторов. Одним из которых, может быть, прекращение синтеза биосурфактантов на поздних стадиях роста. Ключевой причиной данного эффекта является истощение лимитирующих субстратов (C, N) и изменение физико-химических параметров среды. Например, при снижении pH ниже 6,5 в результате накопления органических кислот ингибируется активность синтаз липопептидов у *Bacillus* spp. [262]. Дополнительным фактором служит достижение ККМ, при которой избыток биосурфактантов в среде запускает механизмы негативной обратной

связи, подавляя экспрессию генов биосинтеза [263]. В условиях стресса (например, при накоплении токсичных метаболитов) ресурсы клетки перенаправляются на системы антистрессового ответа, что снижает продукцию вторичных метаболитов [202]. Другой причиной асинхронности наращивания биомассы и продукции биосурфактантов может являться динамика состава их пула вследствие того, что видовые особенности регуляции метаболизма приводят к смене доминирующих классов биосурфактантов в зависимости от фазы роста. Так, у бактерий вида *B. subtilis* в экспоненциальной фазе преобладает синтез сурфактинов (*srfAA*), тогда как в стационарной фазе активируются гены фенгицинов (*fenD*) [264]. Аналогично, у бактерий вида *Pseudomonas* spp. ранние стадии характеризуются продукцией монорамнолипидов (*rhlB*), а поздние – дирамнолипидов (*rhlC*), обладающих разной поверхностной активностью [265]. Кроме того, часть биосурфактантов (например, итурины) остаётся ассоциированной с клеточной поверхностью, что искажает результаты измерения внеклеточной активности [266]. Достаточно значимым аспектом является нелинейная зависимость снижения поверхностного натяжения от концентрации биосурфактантов в связи с достижением насыщения. После достижения ККМ (0,1-1,0 г/л для большинства биосурфактантов) дальнейшее накопление поверхностно-активных веществ не приводит к значимому изменению ПН из-за заполнения межфазной границы [267]. Это объясняет, почему на поздних стадиях ферментации, несмотря на рост биомассы, активность биосурфактантов стабилизируется. Для промышленного применения ключевым параметром становится скорость снижения ПН на единицу времени: например, у *P. putida* PP021 снижение ПН на 0,8 мН/м в час в первые 24 ч делает его перспективным для ММУН-технологий [268].

Динамика относительного уровня экспрессии 16S рРНК гена (ОТ-ПЦР) представлена на рисунке 4.1в. Сигнал ОТ-ПЦР возрастал синхронно с увеличением OD, достигая максимума в поздней экспоненциальной – ранней стационарной фазе. Полученные данные подчёркивают необходимость видоспецифичной оптимизации протоколов ферментации. Асинхронность

выхода культур в стационарную фазу и вариабельность состава биосурфактантов требуют как однозначного мониторинга физиологических маркеров (экспрессия генов *srfAA, rhlB*) для точного определения момента сбора супернатанта, так и динамического контроля параметров среды (pH, концентрация субстратов) для предотвращения преждевременного прекращения синтеза биосурфактантов. Наряду с этим, может быть рекомендовано обеспечение экономического моделирования процессов на основе кинетики снижения ПН КЖ.

Следует отметить, что, несмотря на высокие показатели поверхностной активности КЖ *P. fluorescens* PCS-20, данный штамм использован исключительно как модельный объект для сравнительных экспериментов по нефтеотдаче (глава 5).

Таким образом, оптимальный интервал культивирования для *B. mojavensis* P1709 составляет 24 ч, для *P. fluorescens* PCS-20 – 36 ч, а для *P. putida* PP021 – 36-48 ч (основное снижение ПН завершается к 36 ч, дальнейшее культивирование до 72 ч даёт незначительный прирост). Установленные временные интервалы обеспечивают баланс между скоростью синтеза и стабильностью метаболитов. Наблюдаемая корреляция между снижением поверхностного натяжения и экспоненциальным ростом биомассы подтверждает, что активная продукция биосурфактантов происходит параллельно с накоплением клеток, однако после достижения ККМ дальнейший синтез становится экономически нецелесообразным. Полученные данные подчёркивают необходимость индивидуального подхода к выбору длительности ферментации для каждого штамма-продуцента в зависимости от целевого применения биосурфактантов.

По завершении культивирования на выбранных средах был оценён выход КОФ. Для *B. mojavensis* P1709 на среде ВН с глюкозой выход КОФ составил 5,3±0,3 г/л культуральной жидкости; для *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 на глицерин-нитратной среде – 9,8±0,5 г/л и 8,2±0,4 г/л соответственно. Полученные значения сопоставимы с литературными данными для штаммов-продуцентов *Bacillus* и *Pseudomonas* [249, 251] и подтверждают, что

подобранные условия обеспечивают не только высокую поверхностную активность, но и значительный выход целевого продукта.

4.1.1 Адаптация питательных сред для промышленного культивирования штаммов *B. mojavensis* P1709, *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021

Полученные на лабораторных синтетических средах кинетические закономерности (рисунок 4.1) послужили основой для масштабирования процесса. Однако использование очищенных субстратов (глюкоза, глицерин) в промышленных объёмах экономически нецелесообразно. В связи с этим исследована возможность замены лабораторных компонентов на доступное региональное сырьё: свекловичную мелассу (источник углерода, витаминов и микроэлементов), гидролизат рыбной муки (источник аминного азота) и отработанное растительное масло (источник углерода для синтеза рамнолипидов). Все перечисленные субстраты являются типичными для Поволжья и Республики Татарстан: свекловичная меласса образуется как побочный продукт сахарных заводов региона (например, Буинского сахарного завода), гидролизат рыбной муки производится из отходов рыбопереработки Волго-Каспийского бассейна, а отработанное растительное масло собирается на предприятиях общественного питания и масложировых комбинатах. В данных субстратах, взятых для проведения исследований, определено содержание общего углерода (C) и общего азота (N), результаты представлены в таблице 4.2.

Широкие диапазоны значений обусловлены сезонной и партионной вариабельностью состава сырья, что требует входного контроля каждой партии при промышленном использовании. Полученные данные использованы для расчёта рецептур питательных сред, обеспечивающих требуемое соотношение C/N для оптимального биосинтеза биосурфактантов.

Культивирование проводили в ферментёре объёмом 3 л (рабочий объём 2 л) при температуре 30±0,5 °C, pH 7,0±0,2, аэрации 1,2 об/об·мин и перемешивании 150-200 об/мин. Прямое измерение OD600 на средах с мелассой

и маслом оказалось неприменимым: меласса обладает значительным фоновым поглощением в области 600 нм, а масло образует стойкую эмульсию, искажающую результаты. Мониторинг роста и биосинтеза проводили с использованием гравиметрии, ОТ-ПЦР и измерения ПН.

Таблица 4.2 – Элементный состав региональных субстратов (в пересчёте на сухое вещество)

Субстрат	C, % масс.	N, % масс.	C/N
Свекловичная меласса	35-42	0,8-1,5	25-45
Гидролизат рыбной муки	40-48	8-12	3,5-5,5
Отработанное растительное масло	70-78	<0,1	>700

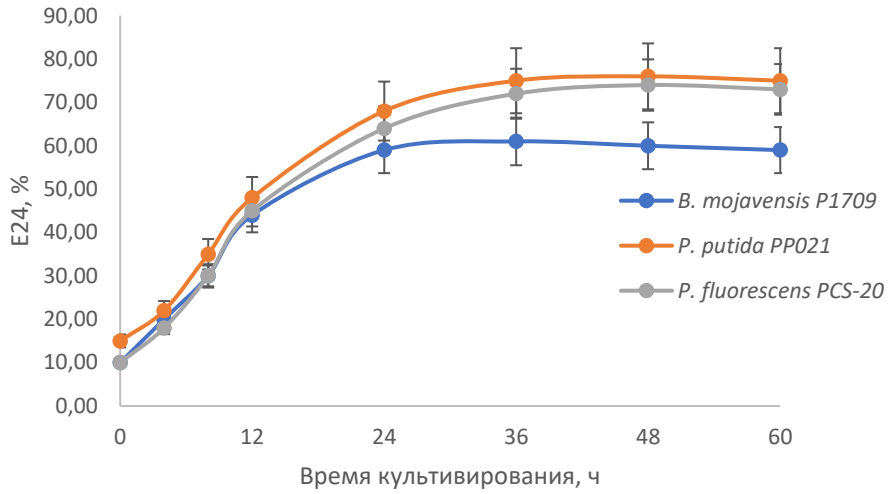
Для выбора наиболее перспективных промышленных субстратов был проведён их скрининг по влиянию на рост и биосинтез биосурфактантов. Так, кукурузный экстракт вызывал ингибирование роста всех трёх штаммов (снижение биомассы на 30-40 % относительно контроля), что, вероятно, связано с высоким содержанием сульфитов, используемых при его производстве [269]. Соевая мука демонстрировала значительную вариабельность состава от партии к партии (разброс по содержанию белка до 15 %), что делало её непригодной для стандартизации процесса. При сравнении отработанного растительного масла из двух источников установлено, что масло с предприятий общественного питания обеспечивало более высокие показатели роста и продукции биосурфактантов, чем масло с масложирового комбината. Предположительно, это связано с различиями в термической истории масел: масло с масложирового комбината подвергается более длительным и высокотемпературным режимам нагрева, что приводит к накоплению продуктов окисления и полимеризации – ингибиторов микробного роста [270,271]. Напротив, масло из предприятий общепита, как правило, имеет более «мягкую» термическую историю и содержит больше свободных жирных кислот, которые служат эффективными предшественниками для синтеза рамнолипидов [272]. Полученные результаты согласуются с литературными

данными о предпочтительности использования отработанных кулинарных масел в качестве субстрата для продукции рамнолипидов псевдомонадами [273]. Напротив, свекловичная меласса, гидролизат рыбной муки и отработанное растительное масло показали стабильные и воспроизводимые результаты. Помимо доступности, данные субстраты содержат комплекс микроэлементов и ростовых факторов, что положительно сказывается на синтезе биосурфактантов [267,274]. Однако следует учитывать, что все перечисленные субстраты, будучи продуктами вторичной переработки, не являются полностью стандартизованным сырьём: их состав подвержен сезонным колебаниям, а в отработанном масле могут присутствовать токсичные продукты окисления и полимеризации, способные ингибировать рост бактерий. Для мелассы существует риск накопления сульфитов и меланоидинов, образующихся при высокотемпературной обработке, что также может негативно сказаться на биосинтезе. Поэтому при масштабировании технологии необходим входной контроль каждой партии сырья по основным показателям (C/N, pH, содержание ингибиторов), а также целесообразно иметь резервные рецептуры с использованием альтернативных источников углерода и азота (например, технического глицерина, кукурузного глютена) для обеспечения стабильности производственного процесса.

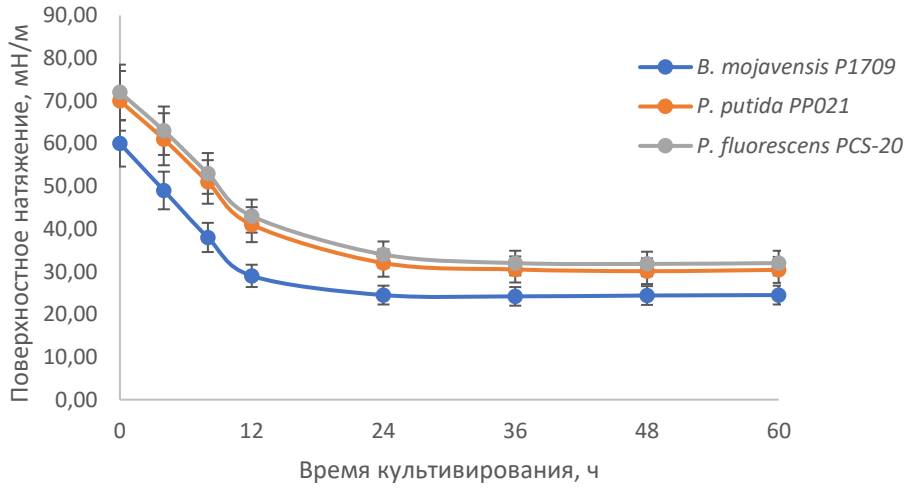
Поскольку основной задачей являлось определение времени достижения целевых показателей, длительность культивирования на промышленных субстратах ограничивали 60 ч, что достаточно для выхода всех параметров на плато. Кинетику накопления биомассы, изменения числа копий гена 16S рРНК и снижения ПН и увеличения Е24 оценивали при культивировании штаммов на выбранных промышленных субстратах в ферментере объёмом 3 л с отбором проб каждые 12 ч. Для оценки роста и биосинтеза на промышленной среде для *B. mojavensis* P1709 использовали мелассу в смеси с рыбной мукой, а для штаммов *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 – отработанное растительное масло (20 г/л) с добавлением $NaNO_3$ (3 г/л). Выбранные концентрации (20 г/л масла и 3 г/л $NaNO_3$) соответствуют литературным данным для культивирования

псевдомонад на гидрофобных субстратах [275,276]. Полученные данные представлены на рисунке 4.2.

а



б



в

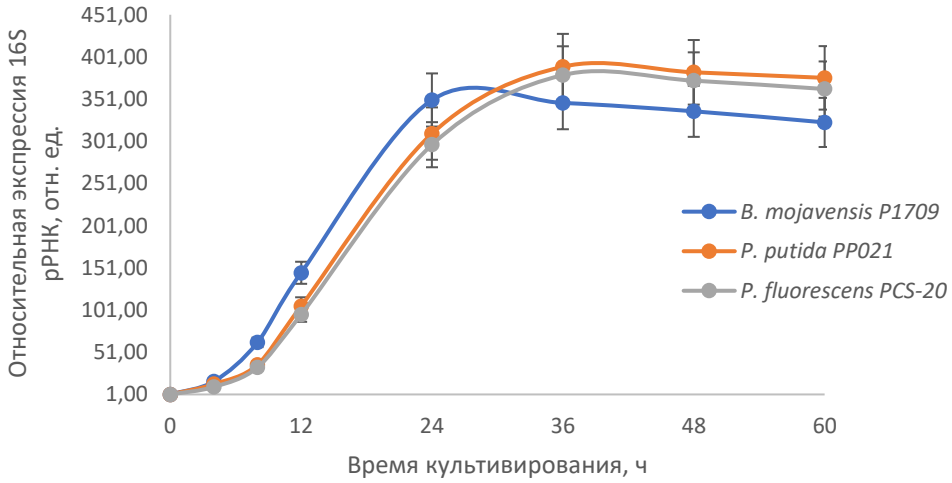


Рисунок 4.2 – Эмульгирующая активность (а), ПН (б) и относительная экспрессия генов 16S рРНК (в) КЖ штаммов *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021, *P. fluorescens* PCS-20

Для всех трёх штаммов наблюдается синхронное снижение ПН с ростом биомассы: минимальные значения ПН достигаются к 36 ч и составляют 25 мН/м для *B. mojavensis* P1709 и 27-28 мН/м для *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20, после чего кривые выходят на плато. Такая динамика соответствует кинетике, установленной на лабораторных средах (рисунок 4.1), и типична для биосинтеза биосурфактантов, когда основная продукция происходит в поздней экспоненциальной – ранней стационарной фазе [137,202]. Стабилизация ПН свидетельствует о достижении ККМ, после которой дальнейший синтез не приводит к значимому снижению поверхностного натяжения [267].

Для всех трёх штаммов наблюдается синхронное снижение ПН и рост Е24 по мере накопления биомассы, что подтверждает корректность замены оптического метода на ОТ-ПЦР. Так, для *B. mojavensis* P1709 сигнал ОТ-ПЦР (относительный уровень 16S рРНК) возрастал с 0,12±0,02 на 0 ч до 1,00±0,08 на 24 ч, после чего стабилизировался на уровне 0,98±0,07 к 60 ч. Для *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 максимальный сигнал ОТ-ПЦР (1,15±0,10 и 1,08±0,09 соответственно) достигался к 36 ч и также сохранялся до конца эксперимента. Динамика изменения сигнала ОТ-ПЦР коррелировала с падением ПН и ростом Е24, что подтверждает, что основная продукция биосурфактантов происходит в поздней экспоненциальной фазе, соответствующей максимальной метаболической активности клеток. Корреляционный анализ выявил сильную отрицательную взаимосвязь между сигналом ОТ-ПЦР и поверхностным натяжением (коэффициент Пирсона $r = –0,94…–0,97$; $p < 0,01$), а также положительную корреляцию между ОТ-ПЦР и эмульгирующей активностью ($r = 0,91–0,95$; $p < 0,01$). Это свидетельствует о тесной взаимосвязи процессов роста и биосинтеза. Аналогичные корреляции между данными ПЦР и физиологическими показателями ранее отмечались для бактериальных культур, растущих на сложных субстратах [277,278], а также для биосурфактант-продуцирующих штаммов [137,279].

Таким образом, выбранные промышленные субстраты (свекловичная меласса с гидролизатом рыбной муки для *B. mojavensis* P1709 и отработанное

растительное масло для *Pseudomonas* spp.) обеспечивают кинетику роста и биосинтеза, полностью сопоставимую с лабораторным протоколом культивирования. Альтернативные источники (кукурузный экстракт, соевая мука) исключены из-за ингибирования роста или нестабильности состава. Полученные данные позволяют перенести режимы ферментации, установленные на лабораторных средах (24 ч для бацилл, 36 ч для псевдомонад), на промышленное масштабирование без дополнительной корректировки продолжительности цикла.

Следующим этапом, на основе анализа кинетических кривых (рисунок 4.2), были формализованы количественные критерии для своевременной остановки ферментации, позволяющие максимизировать выход целевого продукта и минимизировать энергозатраты. Завершение биосинтеза определяется по комплексу критериев, адаптированных для каждого штамма-продуцента:

1. **Достижение целевого уровня ПН.** Для *B. mojavensis* P1709 минимальное зафиксированное значение поверхностного натяжения составляет 23,96 мН/м, для *P. fluorescens* PCS-20 – 24,40 мН/м, для *P. putida* PP021 – 27,50 мН/м. Контроль осуществляется с погрешностью измерения ±0,2 мН/м. Остановка процесса допустима при приближении к указанным значениям с учётом скорости их достижения.

2. **Падение скорости снижения ПН.** Критическим считается уменьшение скорости до величины менее 0,2 мН·м$^{-1}$·ч$^{-1}$ в течение последних 4 часов культивирования. Данный критерий свидетельствует о приближении концентрации биосурфактантов к ККМ.

3. **Достижение целевого уровня Е24** Для *B. mojavensis* P1709 значения Е24 должны составлять не менее 55%, для *P. fluorescens* PCS-20 – не менее 70%, для *P. putida* PP021 – не менее 75%. Выход на плато Е24 подтверждает стабилизацию эмульгирующих свойств КЖ.

4. **Выход культуры в стационарную фазу.** Выход культуры в стационарную фазу, регистрируемый по стабилизации сигнала ОТ-ПЦР

(относительное изменение уровня 16S рРНК менее 10 % за последние 8 ч культивирования). Для *B. mojavensis* P1709 стабилизация сигнала наступает к 24 ч, для *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 – к 36 ч, что соответствует поздней экспоненциальной фазе и началу стационарной.

5. **Экономический критерий (остаточный субстрат).** Остаточная концентрация основного углеродного субстрата снижается до 0,3±0,05 %, что обеспечивает максимальную конверсию сырья и минимизацию отходов. Полное истощение углеродного источника недопустимо, поскольку может индуцировать переход культуры в стационарную фазу с активацией катаболических путей, приводящих к деградации уже синтезированных биосурфактантов [280].

Время достижения каждым штаммом пороговых значений по перечисленным критериям (в часах от начала ферментации) представлено в таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Установление продолжительности культивирования штаммов-продуцентов на основе результатов опытно-промышленных испытаний

Критерий	*B. mojavensis* P1709	*P. fluorescens* PCS-20	*P. putida* PP021
Достижение ПН ≤ 26 мН/м (бациллы) / ≤ 30 мН/м (псевдомонады), ч	24	36	36
Скорость снижения ПН < 0,2 мН/м·ч в течение 4 ч	24	36	36
Достижение Е24 ≥ 55 % (бациллы) / ≥ 70 % (псевдомонады), ч	20	24	24
Скорость повышения Е24 < 2,5 %/ч в течение последних 4 ч	24	30	36
Остаточная концентрация субстрата 0,3-0,5 %, ч	24	36	36
Рекомендуемая продолжительность промышленного цикла, ч	24	36	36

Основная продукция биосурфактантов наблюдается в поздней экспоненциальной и ранней стационарной фазе роста культуры, которая для всех трёх штаммов завершается к 24-36 ч. Дальнейшее культивирование сопровождается резким снижением удельной скорости синтеза: прирост Е24 после 24 ч у бацилл не превышает 3-5 % за 12 ч, а снижение ПН составляет менее 1,5 мН/м. Для псевдомонад после 36 ч скорость изменения обоих показателей падает ниже 10% от максимальной. Продление цикла до 48-72 ч экономически нецелесообразно.

На основании анализа пяти критериев установлены следующие продолжительности цикла направленного биосинтеза биосурфактантов: для *B. mojavensis* P1709 – 24 ч, для *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021 – 36 ч. Выбор данных временных точек обеспечивает максимальное накопление целевого продукта при минимальных энергозатратах. Для бациллярного штамма дальнейшее культивирование до 48 ч снижает ПН лишь на 1,7 мН/м (с 25,7 до 23,96 мН/м) при увеличении цикла вдвое. Для *P. putida* PP021 продление цикла до 72 ч позволяет дополнительно снизить ПН лишь на 0,3-0,5 мН/м (с 27,5 до 27,0-27,2 мН/м).

Полученные данные формируют методологическую основу для разработки биотехнологий получения биосурфактантов широкого спектра применения, включая подавление фитопатогенов с помощью липопептидов бактерий рода *Bacillus*, а также интенсификацию нефтедобычи с помощью рамнолипидов бактерий рода *Pseudomonas*.

ГЛАВА 5 ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, БИОБЕЗОПАСНОСТЬ И ПРИМЕНЕНИЕ БИОСУРФАКТАНТОВ, ПРОДУЦИРУМЫХ *B. MOJAVENSIS* P1709, *P. PUTIDA* PP021 И *P. FLUORESCENS* PCS-20

5.1 Получение и характеристика кислотоосаждаемой фракции биосурфактантов

Метод кислотного осаждения биосурфактантов из бесклеточного супернатанта с последующим центрифугированием широко применяется для биосурфактантов различной природы. В частности, для биосурфактантов, продуцируемых штаммом *Nocardiopsis* sp. 3mo, показана эффективность осаждения при pH 2 с использованием 2M HCl и последующего центрифугирования при 3000 rpm в течение 40 мин [204]. В настоящей работе параметры осаждения скорректированы в сторону более высокой скорости центрифугирования (10 000 g) и увеличенного времени выдерживания (12 ч), что обеспечивает более полное осаждение целевого продукта.

Процесс получения КОФ включал четыре последовательные стадии: (1) отделение биомассы центрифугированием; (2) подкисление бесклеточного супернатанта 5M HCl до pH 2,0 и выдерживание при 4 °C в течение 12 ч; (3) отделение образовавшегося осадка центрифугированием при 10 000 g и 4 °C; (4) высушивание осадка до постоянной массы при 50 °C. Полученная таким образом КОФ использовалась в дальнейшем как в виде сухого порошка (для оценки токсичности, биоразлагаемости, термостабильности и в экспериментах по защите растений), так и в виде водного раствора (для экспериментов по нефтеотдаче).

Выход КОФ из 1 л бесклеточного супернатанта, полученного из КЖ при культивированиии бактерий на синтетических средах, составил 5,3±0,3 г/л для *B. mojavensis* P1709, 9,8±0,5 г/л для *P. putida* PP021 и 8,2±0,4 г/л для *P. fluorescens* PCS-20. Полученные значения согласуются с данными, опубликованными ранее

для этих же штаммов [306, 307], и подтверждают воспроизводимость процесса кислотного осаждения. Более высокий выход КОФ у штаммов *Pseudomonas* по сравнению с *B. mojavensis* обусловлен, вероятно, как более высокой продуктивностью псевдомонад на глицерин-нитратной среде, так и различиями в химической природе синтезируемых биосурфактантов: рамнолипиды, имеющие в составе углеводные фрагменты, эффективнее соосаждаются при подкислении, чем липопептиды.

Выход КОФ при культивировании на промышленных субстратах (свекловичная меласса с гидролизатом рыбной муки для *B. mojavensis* P1709; отработанное растительное масло для *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20) после стадий промывки и нейтрализации составил 4,2±0,2 г/л для *B. mojavensis* P1709 и 7,8±0,4 г/л для *P. putida* PP021. Снижение выхода КОФ относительно лабораторных условий (5,3 и 9,8 г/л соответственно) обусловлено удалением балластных солей и примесей на стадиях промывки и нейтрализации, что, однако, сопровождается увеличением содержания активного биосурфактанта в препарате с 1,2-2,9 % до 3,0 % (*B. mojavensis* P1709) и 2,0 % (*P. putida* PP021 и PCS-20).

Сухая КОФ представляет собой сыпучий порошок. Массовая доля влаги в сухой КОФ не превышала 5 %, зольность составляла 15-20 % в зависимости от штамма. pH 1 % водного раствора КОФ находился в диапазоне 6,5-7,0, что соответствует требованиям для препаратов, контактирующих с растительной продукцией. Сухая КОФ хорошо растворима в дистиллированной и пластовой воде (с минерализацией до 100 г/л) с образованием устойчивой мелкодисперсной суспензии без видимого осадка в течение 24 ч.

Внешний вид полученных порошков КОФ различался в зависимости от штамма-продуцента: фракция, полученная при культивировании *B. mojavensis* P1709, имела бежевый цвет, тогда как фракция *P. putida* PP021 – светло-коричневый (рисунок 5.1, а и б соответственно). Фракция, полученная при культивировании *P. fluorescens* PCS-20, по внешнему виду была аналогична фракции *P. putida* PP021 и также имела светло-коричневую окраску.

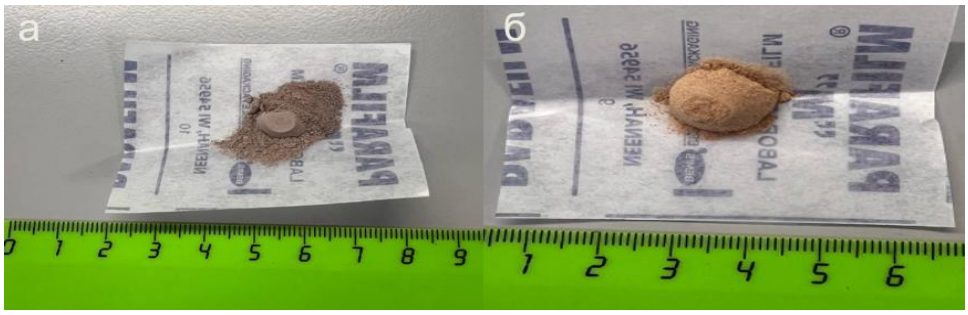


Рисунок 5.1 – Внешний вид сухой кислотоосаждаемой фракции биосурфактантов: а – *B. mojavensis* P1709; б – *P. putida* PP021

Различие в окраске между липопептидной и рамнолипидной фракциями обусловлено составом балластных компонентов, соосаждающихся вместе с целевым продуктом: для *B. mojavensis* P1709 это соли и остатки мелассы, для штаммов *Pseudomonas* остатки отработанного масла и продукты его окисления. Окраска не влияла на функциональные свойства полученных фракций.

5.2 Определение состава биосурфактантов, продуцируемых *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20

Определение состава биосурфактантов проводилось с использованием двух методов – тонкослойной хроматографии с последующим селективным окрашиванием хроматографических пятен красителями-индикаторами липидов, белков и сахаров, а также ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье, позволяющей выявить наличие функциональных групп и связей. Оба метода являются широко применимыми в анализе органических молекул, в частности, биосурфактантов [302].

Методом ТСХ установлено, что для каждого из штаммов на пластинах ТСХ в УФ-свете выявлено несколько хроматографических зон, что свидетельствует о гетерогенности пула биосурфактантов. Так, на пластине с биосурфактантами, продуцированными *B. mojavensis* P1709, обнаружено два дискретных пятна, не относящихся к фоновым примесям (R_f 0,13 и 0,51) (рисунок

5.2а). Значения Rf 0,13 и 0,51 соответствуют стандартным образцам липопептидов фенгицина и сурфактина, что согласуется с экспрессией генов *srfAA* и *fenD* [305,306]. На пластинах с биосурфактантами обоих штаммов *Pseudomonas* обнаружено по два четко выраженных пятна (R_f 0,74 и 0,79 для *P. putida* PP021; R_f 0,65 и 0,70 для *P. fluorescens* PCS-20) (рисунки 5.3а и 5.4а). Значения Rf 0,74 и 0,65 соответствуют монорамнолипидам, а R_f 0,79 и 0,70 – дирамнолипидам, что согласуется как с положением стандартных образцов, так и с экспрессией генов *rhlB* и *rhlC* [307,308]. Некоторые различия в R_f между продуктами штаммов связаны с вариабельностью состава конгенеров.

Для определения наличия в составе биосурфактантов липидных, пептидных и углеводных фрагментов проводили окрашивание йодом, нингидридом и пара-анисовым альдегидом соответственно. На пластине с биосурфактантами, продуцированными *B. mojavensis* P1709, пятна с R_f 0,13 и 0,51 окрасились в коричневый цвет, что свидетельствует о взаимодействии липидных фрагментов с молекулами йода, и те же пятна приобретали фиолетовую окраску после обработки раствором нингидрина, что свидетельствует о взаимодействии с пептидами (рисунок 5.2а). Так, выявлено, что биосурфактанты содержат пептидные и липидные фрагменты и могут быть отнесены к липопептидам. На пластине с биосурфактантами, продуцированными *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20, пятна с R_f 0,74 и 0,79 и R_f 0,65 и 0,70 окрасились в коричневый цвет, что свидетельствует о взаимодействии липидных фрагментов с молекулами йода, и в тех же положениях пятна приобретали розоватую и зеленоватую окраску после обработки раствором п-анисового альдегида, что свидетельствует о взаимодействии реагента с углеводными (рамнозными) фрагментами (рисунки 5.3а и 5.4а).

Таким образом, оба биосурфактанта, полученных при культивировании *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 содержат фрагменты липидов и углеводов и могут быть отнесены к гликолипидам, что согласуется с данными [8, 309-311].

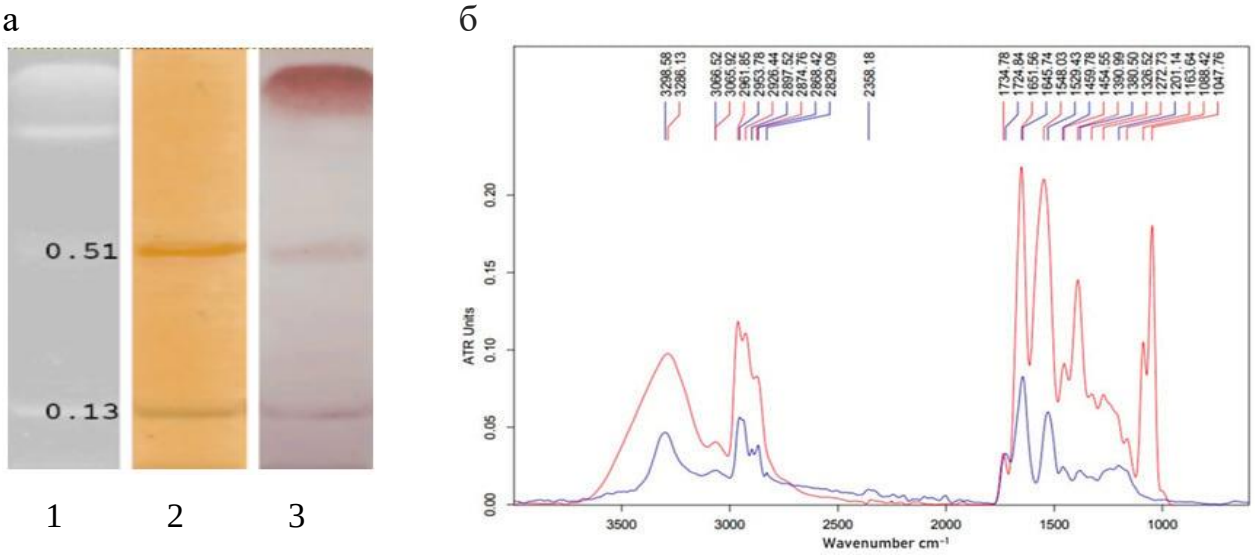


Рисунок 5.2 – (а) ТСХ биосурфактантов, продуцируемых штаммом *B. mojavensis* P1709 (пятна выявляются: (1) под воздействием УФ-света; (2) после окрашивания парами йода; (3) после окрашивания нингидрином); (б) ИК-спектры биосурфактанта, продуцируемого *B. mojavensis* P1709 (синий) и стандарта сурфактина (красный)

Значения R_f 0,13 и 0,51, полученные для биосурфактантов штамма *B. mojavensis* P1709, демонстрируют хроматографическую идентичность со стандартными образцами липопептидов сурфактина и фенгицина (Sigma-Aldrich, Германия; калибровка проведена с использованием коммерческих стандартов при идентичных условиях хроматографирования), что подтверждается не только совпадением коэффициентов удерживания, но и характерным окрашиванием нингидрином (фиолетовая окраска, специфичная для α-аминогрупп) и йодом (коричневое окрашивание липидных компонентов). В случае *Pseudomonas* (*P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20) наблюдались четко выраженные пятна с R_f 0,74 и 0,79 и R_f 0,65 и 0,70, соответствующие стандартам моно- и дирамнолипидов, что подтверждалось интенсивным окрашиванием при дериватизации пара-анисовым альдегидом (специфичная реакция на рамнозные остатки) и соответствовало литературным данным по хроматографическому поведению гликолипидов этого класса [166,312].

Данные ТСХ подтвердили результаты ПЦР-детектирования генов *srfAA* (оперон синтеза сурфактина) и *fenD* (ген синтетазы фенгицина), а также генов *rhlB/rhlC* (кластер биосинтеза рамнолипидов) у *Pseudomonas* spp. [313-315].

На ИК-спектрах биосурфактантов, продуцируемых штаммом *B. mojavensis* P1709 (рисунок 5.2 б), выявлены пики, характерные для липопептидов: для пептидных фрагментов (с волновыми числами 3292-3276 см$^{-1}$ для групп NH (амидные связи), 1659-1648 см$^{-1}$ для C=O и 1630-1510 см$^{-1}$ для колебаний CN, также присутствующих в пептидах), и алифатических цепей (с волновыми числами 2933-2855 см$^{-1}$ для колебаний C–H). Спектры совпадают с референсными данными для сурфактина [259,316].

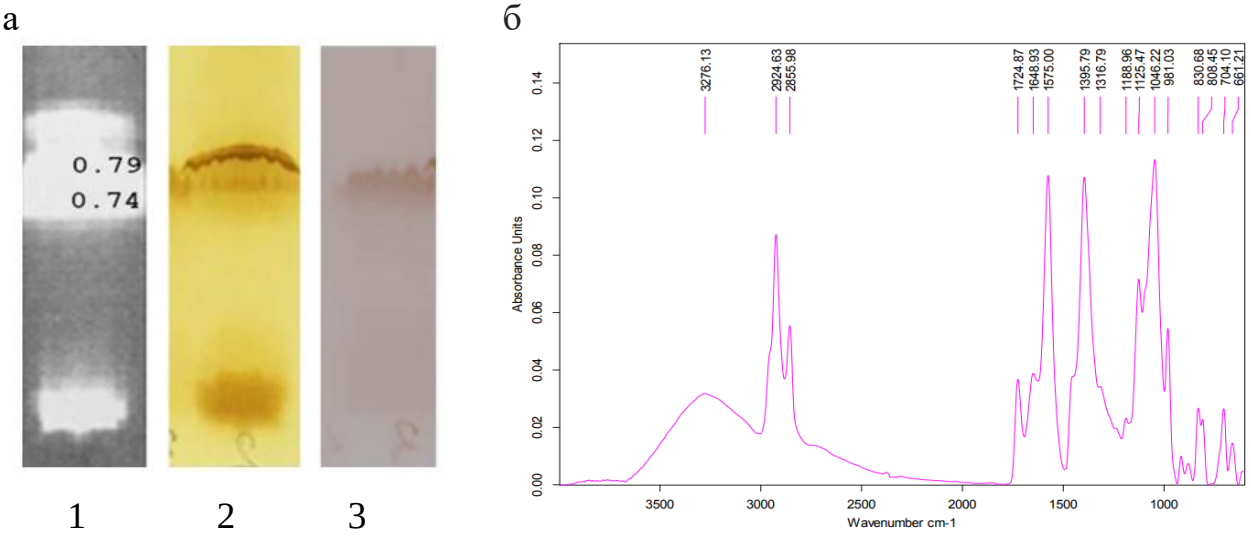


Рисунок 5.3 – (а) ТСХ биосурфактантов, продуцируемых штаммом *P. putida* PP021 (пятна выявляются: (1) под воздействием УФ-света; (2) после окрашивания парами йода; (3) после окрашивания пара-анисовым альдегидом); (б) ИК-спектр – биосурфактанта, продуцируемого *P. putida* PP021

На ИК-спектре биосурфактантов, продуцированных *P. putida* PP021 (рисунок 5.3 б), идентифицированы ключевые полосы поглощения: широкая полоса в области 3298-3286 см$^{-1}$, соответствующая валентным колебаниям O–H связей гидроксильных групп углеводного компонента; пики в диапазоне 3066-2953 см$^{-1}$, характерные для асимметричных и симметричных колебаний C–H связей алкильных цепей, а также сигналы при волновых числах 1734-1724 см$^{-1}$

(эфирные C=O связи). Данные спектральные особенности соответствуют эталонным характеристикам ди- и монорамнолипидов стандартных образцов, а также известных из литературы [317,318], что подтверждает наличие в исследуемых образцах моно- и дирамнолипидов.

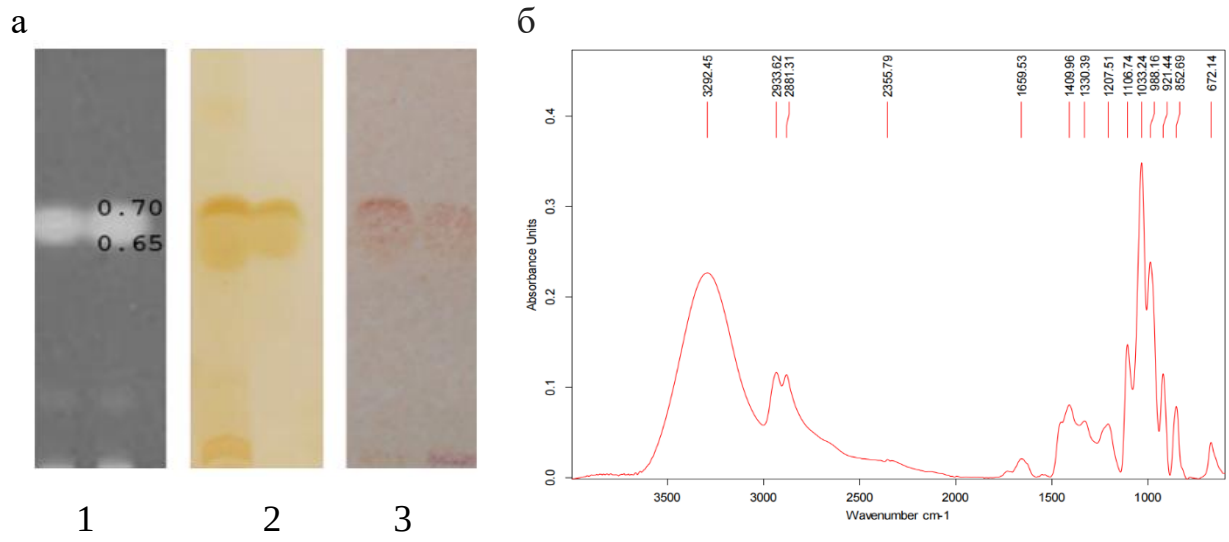


Рисунок 5.4 – (а) ТСХ биосурфактантов, продуцируемых штаммом *P. fluorescens* PCS-20 (пятна выявляются: (1) под воздействием УФ-света; (2) после окрашивания парами йода; (3) после окрашивания пара-анисовым альдегидом); (б) ИК-спектр – биосурфактантов, продуцируемого *P. fluorescens* PCS-20

На ИК-спектре биосурфактантов, продуцированных *P. fluorescens* PCS-20 (рисунок 5.4 б), выявлены полосы поглощения, аналогичные *P. putida* PP021: широкая полоса в области 3298-3286 $см^{-1}$, соответствующая валентным колебаниям O–H связей гидроксильных групп углеводного компонента; пики в диапазоне 3066-2953 $см^{-1}$, характерные для асимметричных и симметричных колебаний C–H связей алкильных цепей; сигналы при 1734-1724 $см^{-1}$ (эфирные C=O связи). Однако наблюдаются некоторые отличия в интенсивности пиков в области больших волновых чисел, что может указывать на некоторые различия в структуре биосурфактантов [317].

Таким образом, комплексное использование методов ТСХ с селективным окрашиванием, FTIR и сопоставления этих данных с результатами молекулярно-генетического анализа позволяет идентифицировать в составе биосурфактантов,

продуцируемых *B. mojavensis* P1709, липопептиды структурных классов сурфактина и фенгицина, что соответствует современным представлениям о вторичных метаболитах бактерий *B. subtilis* [166,311]. В случае штаммов *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20, выявленные значения Rf в диапазоне 0,65-0,79 в сочетании с характерным розовым окрашиванием пара-анисовым альдегидом и данными ИК-спектроскопии (пики 3292 $см^{-1}$ для ОН–групп и 1724 $см^{-1}$ для сложноэфирных связей) свидетельствуют о продуцировании преимущественно ди- и монорамнолипидов, что согласуется с экспрессией генов *rhlB* и *rhlC* кластера биосинтеза рамнолипидов и литературными данными по штаммам-продуцентам рода *Pseudomonas* [313,319,320].

Методические подходы к производству и очистке биосурфактантов систематизированы в зарегистрированной базе данных (свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022623032 от 14.11.2022) [303]. По результатам анализа и интерпретации характеристических участков ИК-спектров биосурфактантов разработана и зарегистрирована программа для ЭВМ (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023683530 от 08.11.2023) [304].

5.3 Оценка токсичности биосурфактантов, продуцируемых *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20

Тестирование опасности биосурфактантов для компонентов окружающей среды является одним из решающих этапов для их внедрения в различные сферы народного хозяйства, включая сельское хозяйство и нефтедобычу. Традиционно такая опасность определяется с использованием экотестов, наиболее распространенными из которых являются тесты с использованием гидробионтов. В нашей работе экологическая токсичность биосурфактантов определялась с использованием кладоцер, поскольку именно эти организмы наиболее часто используются авторами исследований и, соответственно, для

этих организмов в научной литературе представлено значительное количество данных, что важно для последующего сопоставления результатов [281-283]. Безусловно, полученные с использованием одного тестового организма показатели токсичности требуют дополнения, и в будущем потребуется применение батареи тестов для оценки каждого из сурфактантов, однако для скрининговой оценки потенциальной опасности биосурфактантов для окружающей среды теста с гидробионтами достаточно [284]. Растворы биосурфактантов готовили в дистиллированной воде (для КОФ) или в фосфатном буфере (для очищенных препаратов) непосредственно перед экспериментом. Предварительные тесты показали, что используемые растворители в применяемых концентрациях не оказывают токсического эффекта на тест-организмы (иммобилизация цериодафний в контрольных образцах без биосурфактанта не превышала 5 %). Результаты по оценке токсичности сурфактантов, продуцируемых *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20, представлены на рисунке 5.5.

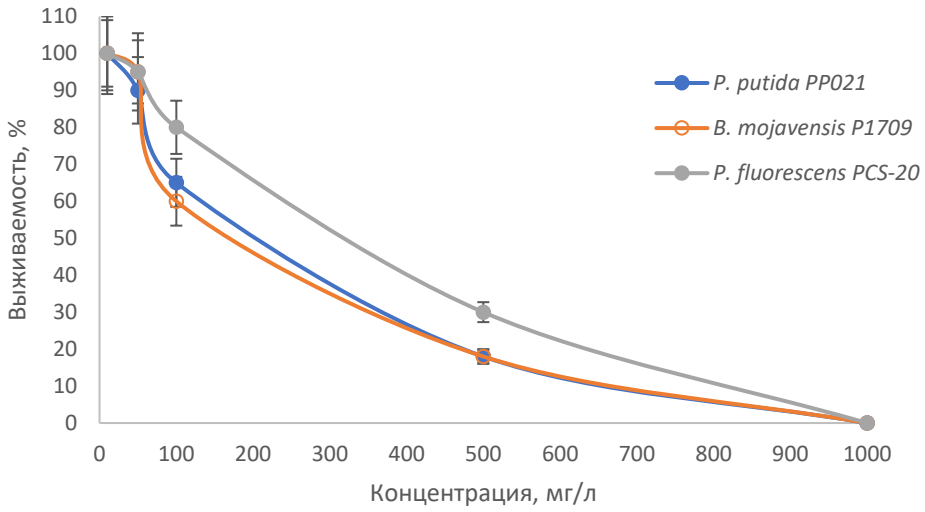


Рисунок 5.5 – Оценка острой токсичности биосурфактантов, продуцируемых *B. mojavensis* P1709, *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021, по отношению к цериодафниям

Все три биосурфактанта обладают токсичностью по отношению к цериодафниям, причём 100 % смертность рачков наблюдается при концентрациях, достигающих 1000 мг/л. Во всех случаях зафиксирован дозозависимый характер токсического эффекта. С помощью серий разведений установлены концентрации биосурфактантов, вызывающие 50 %-ную иммобилизацию тест-организмов (EC_{50}). Как видно из рисунка 5.5 все три биосурфактанта проявляют дозозависимую токсичность в отношении цериодафний. Значения EC_{50} составили 170, 195 и 310 мг/л для биосурфактантов, продуцируемых *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20, соответственно.

Согласно ГОСТ 12.1.007-76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности», вещества с EC_{50} для водных организмов в диапазоне 50-500 мг/л относятся к 3 классу опасности (умеренно опасные) [285]. Несмотря на более высокую токсичность липопептидов *B. mojavensis* P1709, что может быть связано с их выраженным мембранотропным действием, все исследуемые биосурфактанты относятся к 3 классу опасности.

Оценка токсичности проведена для очищенных биосурфактантов, полученных на лабораторных средах. Поскольку токсикологический профиль определяется химической структурой активных соединений (липопептидов и рамнолипидов), а не составом питательной среды, полученные значения EC_{50} отражают фундаментальные свойства самих биосурфактантов. При переходе к промышленным субстратам (меласса, гидролизат рыбной муки, отработанное масло) конечный продукт (КОФ) может содержать окрашенные примеси, однако они не изменяют токсикологический профиль активного компонента. Для подтверждения этого дополнительно проведена оценка токсичности КОФ, выделенных из КЖ на мелассосодержащей среде; полученные значения EC_{50} находились в том же диапазоне. Таким образом, результаты, полученные для очищенных препаратов, могут быть экстраполированы на товарные формы КОФ,

производимые на промышленных субстратах, с учётом контроля качества по показателям содержания активного вещества и балластных примесей.

Полученные значения EC_{50} существенно превышают показатели как тестируемых нами химических ПАВ (для анионного ПАВ, используемого в качестве сравнения, EC_{50} составил 15 мг/л), так и таковых, описанных в литературе (например, для додецилсульфата натрия EC_{50} составлял 1,8-11,8 мг/л [286-288], что подтверждает относительную экологическую безопасность исследуемых соединений. Следует отметить, что значения EC_{50}, полученные в экспериментах с очищенными биосурфактантами, не являются прямым эквивалентом концентраций КОФ, используемых в технологических применениях. Во-первых, доля активного биосурфактанта в КОФ составляет 2-3 % (см. раздел 5.1), поэтому в рабочем растворе КОФ концентрация чистого сурфактанта на порядок ниже, чем общая концентрация препарата. Во-вторых, оценка острой токсичности на гидробионтах в стандартных тестах (48 ч экспозиции в водной среде) не эквивалентна условиям послеуборочной обработки плодов, где биосурфактант наносится локально и подвергается биодеградации в течение нескольких суток (см. раздел 5.4). Таким образом, прямое сопоставление EC_{50} и рабочих концентраций КОФ без учёта этих факторов было бы некорректным.

Полученные значения EC_{50} для исследуемых биосурфактантов (варьирующие в диапазоне 170 до 310 мг/л) в целом согласуются с опубликованными данными для аналогичных соединений. Согласно ряду исследований, рамнолипиды, продуцируемые штаммами рода *Pseudomonas*, обладают умеренной токсичностью для водных беспозвоночных: EC_{50} для *D. magna* колеблется в диапазоне 200-500 мг/л [281,289]. Так, рамнолипиды *P. putida* и *P. fluorescens* с EC_{50} = 195 и 310 мг/л находятся в пределах ожидаемого токсикологического профиля.

Более высокая токсичность сурфактина *B. mojavensis* (EC_{50} = 170 мг/л) также подтверждается литературой, в которой липопептиды, синтезируемые *Bacillus* spp., описываются как более активные по отношению к клеточным

мембранам, вызывая разрушение липидных слоёв даже при низких концентрациях [290,291]. Разница в токсичности между рамнолипидами и сурфактином составляет 15-30 %, что согласуется с нашими данными.

Полученные нами значения сопоставимы и с таковыми для коммерческих препаратов биосурфактантов. Так, для очищенных рамнолипидов (например, Sigma-Aldrich, Rha-C10-C10) EC_{50} для дафний составляет 280-320 мг/л [292]. Для коммерческих сурфактинов оценка токсичности для гидробионтов не проводилась, однако для биопрепарата на основе *B. subtillis* EC_{50} для дафний составляет 162 мг/л [293].

Стоит отметить, что рабочие концентрации биосурфактантов варьируют в зависимости от конкретного технологического применения. Для обработки семян, листовой поверхности или биоремедиации, как правило, используют растворы с концентрацией 10-100 мг/л, что значительно ниже значений EC_{50} и не представляет риска для гидробионтов. При послеуборочной обработке плодов, напротив, применяют более высокие концентрации препарата (до 10 г/л КОФ), однако в этом случае следует учитывать, что КОФ содержит лишь 2-3 % активного липопептида (раздел 5.1), а препарат наносится локально в микроколичествах и подвергается биодеградации в процессе хранения. Таким образом, прямое сопоставление концентраций КОФ, используемых в защите растений, с EC_{50} для очищенных биосурфактантов в водных тест-системах было бы некорректным. Детальное обсуждение этого вопроса приведено в разделе 5.6.

5.4 Оценка биоразлагаемости биосурфактантов, продуцируемых *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20

Биоразлагаемость является важной характеристикой для последующего применения биосурфактантов в практике. С одной стороны, она – один из ключевых критериев экологической безопасности биосурфактантов, определяющих их способность к быстрому разложению в природных условиях.

С другой стороны, слишком быстрое разложение является проблемой при организации хранения биосурфактантов, а также вызывает вопросы о достаточности времени их жизни для осуществления полезной функции. Согласно требованиям Агентства по охране окружающей среды США [294], вещества классифицируются как легко биоразлагаемые, если за 10 дней уровень их минерализации (по выделению CO_2) превышает 60 % от теоретического максимума.

В качестве источника микробного инокулюма для тестов биоразлагаемости использовали активный ил очистных сооружений г. Казани, отобранный в аэротенке станции аэрации. Активный ил предварительно охарактеризовали по основным микробиологическим показателям (общая численность микроорганизмов, соотношение бактерий и простейших) и адаптировали к условиям эксперимента путём предварительного культивирования в минеральной среде ВН в течение 48 ч при 28 ℃. В нашей работе, строго говоря, определялась суммарная биологическая и химическая деградируемость биосурфактантов, поскольку они подвергались воздействию многокомпонентного микробного сообщества в жидкой среде, и специального определения химической деградируемости не проводилось [295]. Однако использование стерильного контроля (среда с биосурфактантом без инокулята) позволило исключить вклад абиотических процессов, и основной вклад в деградацию вносила именно биологическая минерализация. Показателем деградируемости выступала доля углерода биосурфактантов, перешедший в состав углекислого газа в результате минерализации.

На рисунке 5.6 представлены данные о выделении углекислого газа при инкубации биосурфактантов, продуцируемых *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20, с микробным сообществом в течение 10 сут, в динамике. Дополнительно в качестве положительного контроля разложению подвергалась глюкоза, биоразлагаемость которой составила 70 % на 10 сут. Для биосурфактантов, продуцируемых *P. putida* PP021, *P. fluorescens* PCS-20 и *B. mojavensis* P1709 биоразлагаемость на 10 сут составила 58±3 %, 60±4 % и 64±5 %, соответственно. Высокая скорость разложения биосурфактантов объясняется

их природным происхождением. Известно, что рамнолипиды легко метаболизируются бактериями благодаря наличию гидролизуемых эфирных связей [133,296]. Липопептиды, несмотря на устойчивость пептидного кольца, деградируют за счет активности протеаз и липаз [296]. Полученные результаты согласуются с исследованиями Хирата (2009), где биоразлагаемость микробных биосурфактантов превышала 61 % за 8 дней [297]. Это подтверждает их преимущество перед синтетическими ПАВ, такими как алкилбензолсульфонаты (менее 40 % за 28 дней). Полученные значения биоразложения (до 58-64 % за 10 суток) хорошо согласуются с данными литературы: для рамнолипидов разных штаммов *Pseudomonas* отмечают 74 % за 10 дней [133], а биоразлагаемость сурфактина обычно на 5-10 % выше за счет более доступной для ферментов пептидной структуры [298]. В ряде исследований, однако, сообщается о более медленной деградации рамнолипидов в 34-51 % из-за различий в составе молекулы, микробных сообществ и методиках тестирования [133].

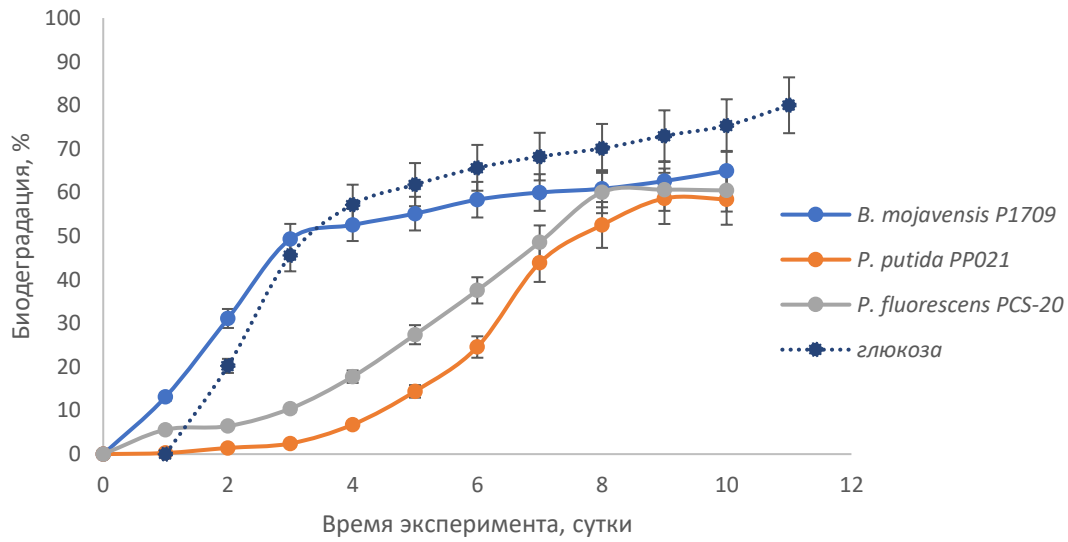


Рисунок 5.6 – Уровень биодеградации биосурфактантов, продуцированных *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20, в течение 10 сут

Для подтверждения степени биодеградации биосурфактантов была дополнительно оценена их поверхностная активность до и после инкубации с микроорганизмами (таблица 5.1).

Таблица 5.1 – Поверхностная активность растворов биосурфактантов до и после биодеградации

Штамм-продуцент биосурфактантов	ПН водного раствора биосурфактантов (100 мг/л), мН/м	
	до биодеградации	после биодеградации
B. mojavensis P1709	23,44±0,03	55,35±0,05
P. putida PP021	29,21±0,15	51,64±0,40
P. fluorescens PCS-20	28,87±0,05	50,45±0,07

Во всех трех случаях наблюдалось значительное (почти двукратное) снижение способности к изменению поверхностного натяжения: для рамнолипидов *P. putida* PP021 значение поверхностного натяжения раствора до и после деградации составило 29±0,05 мН/м и 52±0,05 мН/м, соответственно, для рамнолипидов *P. fluorescens* PCS-20 – с 28,87±0,05 мН/м до 50,45±0,07 мН/м, а для сурфактина *B. mojavensis* P1709 – с 23,44±0,03 мН/м до 55,35±0,05 мН/м. Это указывает на существенную деструкцию молекулярной структуры биосурфактантов в процессе микробной деградации.

Снижение поверхностной активности после деградации (в 1,8-2,0 раза) находится в рамках опубликованных значений [299,300]. При этом остаточные величины (50-55 мН/м) существенно ниже характерных для синтетических ПАВ после биологического разложения (70-75 мН/м) [301], что указывает на сохранение частичной поверхностной активности и свидетельствует о возможности более длительного хранения биосурфактантов без полной потери функциональных свойств.

В настоящей работе оценка биодеградируемости проведена в жидкой среде по ГОСТ 32427-2013 (минерализация углерода), что позволяет напрямую сопоставлять полученные значения с международными нормативами для

поверхностно-активных веществ. Полученные значения биоразлагаемости 58-64 % за 10 сут согласуются с литературными данными о высокой биодеградируемости биосурфактантов и подтверждают их экологическую безопасность по сравнению с синтетическими ПАВ.

5.5 Термическая стабильность кислотоосаждаемых фракций, содержащих биосурфактанты *B. mojavensis* P1709 и *P. putida* PP021

Для обоснования режима сушки исследована стабильность КОФ при нагревании (таблица 5.2). Установлено, что нагрев до 120 °C не вызывает значимой деградации: снижение E24 ≤ 5-7 %, повышение ПН ≤ 1,1–1,5 мН/м. Полученные данные согласуются с литературными сведениями о термостабильности гликолипидных и липопептидных биосурфактантов [333,334].

Таблица 5.2 – Оценка термической стабильности биопрепаратов

T, °C	КОФ *B. mojavensis* P1709		КОФ *P. putida* PP021	
	E24, %	ПН, мН/м	E24, %	ПН, мН/м
25	61±2	23,9±0,2	85±2	27,5±0,2
50	60±2	24,0±0,2	84±2	27,6±0,2
70	59±2	24,2±0,2	83±2	27,8±0,2
90	58±2	24,5±0,2	81±2	28,1±0,2
120	56±2	25,0±0,2	79±2	28,6±0,2

5.6 Защита плодов томатов от фитопатогенных грибов с использованием биосурфактантов *B. mojavensis* P1709

Современное сельское хозяйство сталкивается с серьезной проблемой поражения культурных растений фитопатогенными грибами, включая

представителей родов *Fusarium, Botrytis, Alternaria* и *Colletotrichum*. Эти патогены способны инфицировать различные органы растений – от вегетативных (листья, стебли) до генеративных (цветки, плоды), что приводит к значительным потерям урожая (до 30-40 %) и накоплению опасных микотоксинов, таких как Т-2 и НТ-2. Особую опасность представляют послеуборочные заболевания плодов, которые традиционно контролируются с помощью химических фунгицидов. Однако применение химических препаратов вызывает растущую озабоченность по поводу безопасности пищевых продуктов и устойчивости патогенов к фунгицидам [321,322].

В условиях этих вызовов биосурфактанты, такие как липопептиды, продуцируемые штаммами *Bacillus* spp., представляют собой альтернативу химическим средствам защиты. Они обладают как прямым фунгицидным действием, обусловленным мембранотропной активностью, так и способностью индуцировать системную резистентность растений. Кроме того, биосурфактанты характеризуются высокой биоразлагаемостью, что делает их более экологически безопасными.

В рамках настоящего исследования была оценена эффективность комплекса биосурфактантов, продуцируемого ризосферным штаммом *B. mojavensis* P1709, против *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* – одного из наиболее опасных патогенов для томатов и других плодовых и злаковых культур. В качестве объекта исследования использовались плоды томата черри (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*), которые отличаются подверженностью грибковым инфекциям при хранении. Результаты данного этапа исследования опубликованы в работе [306]; отдельные результаты представлены на научных конференциях и опубликованы в материалах конференций [323,324].

В работе использовали КОФ в концентрациях 0,5-20 г/л, которые вносили в искусственно созданные порезы плодов томатов со средней массой 15 г. Такой подход, описанный в работе Rani с соавторами [115], позволяет получать экономически эффективный биопрепарат без трудоемких этапов экстракции и очистки, при этом сохраняя его биологическую активность. Этот метод

обеспечит сохранение нативного комплекса вторичных метаболитов и исключает использование токсичных органических растворителей, что делает его более безопасным для окружающей среды и человека.

Установлено, что радиальный рост *F. oxysporum* существенно снижался по мере увеличения концентрации КОФ в агаризованной среде, что свидетельствует о выраженной обратной зависимости между этими показателями (рисунок 5.7). Уже при минимальной исследованной концентрации КОФ (0,5 г/л) отмечалось подавление роста микромицетов на 28±3 % по сравнению с контролем, а при максимальной концентрации (20 г/л) ингибирование достигало 93±11 %. Важно отметить, что концентрации КОФ, использованные в экспериментах *in vitro* (до 20 г/л), не эквивалентны концентрациям чистого биосурфактанта: доля активных липопептидов в КОФ составляет 2-3 % (см. раздел 5.1), что соответствует содержанию действующего вещества 400-600 мг/л в максимальной дозе. Такие высокие концентрации в агаризованных средах применяются для оценки максимального потенциала препарата в условиях, где биосурфактант может сорбироваться на компонентах среды. В экспериментах же *in vivo* (на плодах томатов черри) оптимальная рабочая концентрация КОФ была снижена до 10 г/л, что обеспечивает эффективную защиту при экономически оправданном расходе Полученные результаты согласуются с данными других авторов [325]. В частности, в работе бразильских ученых было показано, что вторичные метаболиты, продуцируемые бактериями рода *Bacillus*, оказывают выраженное ингибирующее действие на прорастание спор *F. oxysporum* при совместном культивировании микроорганизмов на чашках Петри [325].

Кроме влияния биосурфактантов на рост фитопатогенов на чашках Петри, нами оценивалось и влияние биосурфактантов на функциональные характеристики микромицета, в частности, на его способность продуцировать микротоксины. Согласно рисунку 5.7, в контрольных образцах, куда липопептиды не добавлялись, микотоксины Т-2 и НТ-2 были обнаружены в концентрации 76 мкг/г. Важно отметить, что зоны агара с присутствием грибов, даже при низких концентрациях КОФ, содержали значительно меньше

микотоксинов, чем контрольные образцы. Так, при внесении КОФ в концентрации 0,5 г/л содержание микотоксинов снижается на 85 %, а при концентрации 20 г/л – на 95 %. Этот результат позволяет предположить, что метаболизм микромицетов был изменен, несмотря на возможность роста мицелия. Таким образом, КОФ биосурфактантов демонстрирует потенциал в качестве агента биоконтроля, способного подавлять рост патогенных грибов и снижать их продукцию микотоксинов.

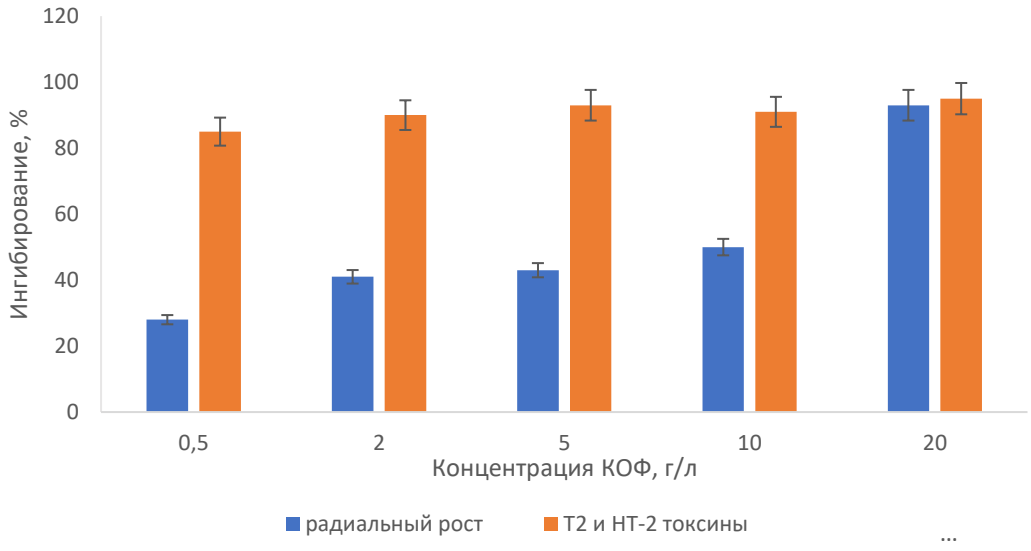


Рисунок 5.7 – Ингибирование радиального роста и продукции микотоксинов *F. oxysporum* в присутствии КОФ, содержащей биосурфактанты *B. mojavensis* P1709

На следующем этапе для оценки активности биосурфактанта *in vivo*, плоды томата черри (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) надрезались, и в надрезы последовательно были внесены КОФ в концентрациях 0,5-20 г/л (0,05-2 % масс.) и споры *F. oxysporum*. Через 2-7 суток инкубации оценивали заболеваемость томатов по площади зарастания надреза микромицетом в сравнении с контролем (не обработанным биосурфактантом) (рисунок 5.8).

Установлено, что КОФ подавляла развитие патогена при всех тестируемых концентрациях, причём эффект усиливался с увеличением дозы. На 2-е сутки

инкубации заболеваемость в контроле достигала 48 %, тогда как при обработке 0,5 г/л и 20 г/л КОФ она составляла 27 % и 7 % соответственно. В контрольной группе 100 % поражение фиксировалось на 5-е сутки; при дозах 0,5, 2 и 5 г/л – на 6-7-е сутки. При дозах 10 и 20 г/л полного поражения плодов не наблюдалось в течение всего 7-дневного периода. Эти данные соответствуют литературным результатам: Kumar с соавторами [258] показали, что липопептидный биосурфактант из *Bacillus subtilis* при концентрации 20 г/л снижает заболеваемость на 44 % у плодов чили, инфицированных *Colletotrichum capsici*, через 5 дней инкубации. Также стоит отметить, что Yan с соавторами продемонстрировали снижение заболеваемости на 20 % при использовании рамнолипидов в концентрации 0,5 г/л для томатов черри, инфицированных *Alternaria alternata* [326].

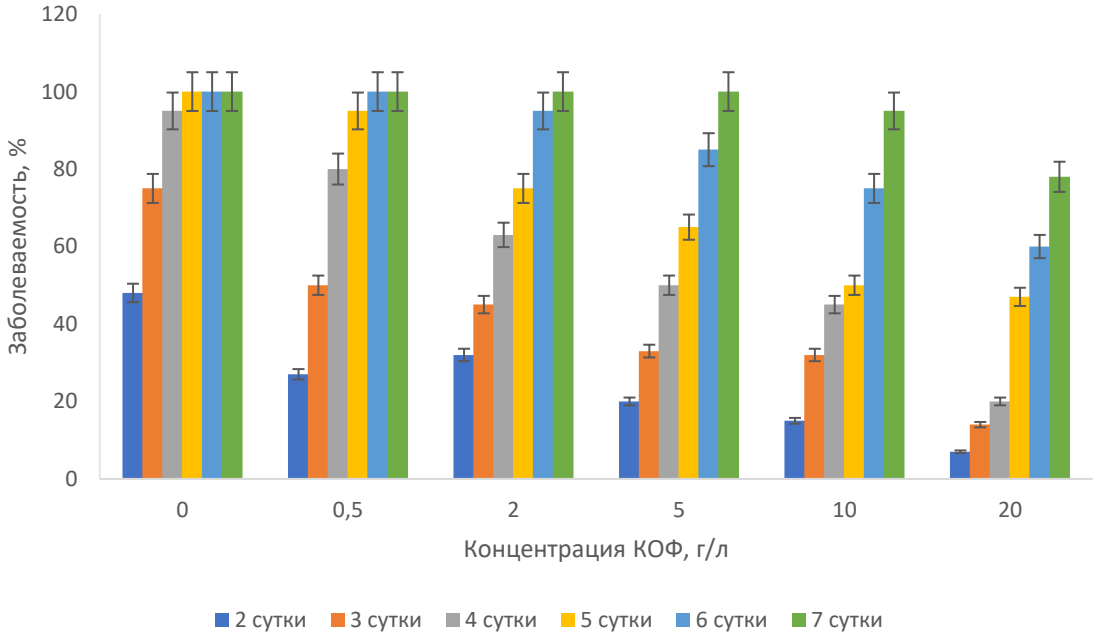


Рисунок 5.8 – Динамика заболеваемости плодов томата черри при воздействии *F. oxysporum* в присутствии КОФ, содержащей биосурфактанты *B. mojavensis* P1709

Из литературы известно, что защитное действие биосурфактантов для растения обусловлено не только подавлением роста и активности патогена, но и

тем, что биосурфактанты способны индуцировать устойчивость растений. Для проверки, способны ли биосурфактанты *B. mojavensis* P1709 к такому индуцированию, нами оценивалась активность двух защитных ферментов – полифенолоксидазы и пероксидазы – в плодах томатов черри, инфицированных *F. oxysporum*, при и без добавления КОФ в концентрации 20 г/л (рисунок 5.9). Эти ферменты участвуют в индукции синтеза антимикробных фенольных соединений и в укреплении клеточной стенки, что дополнительно усиливает сопротивляемость растения к фузариозу [327].

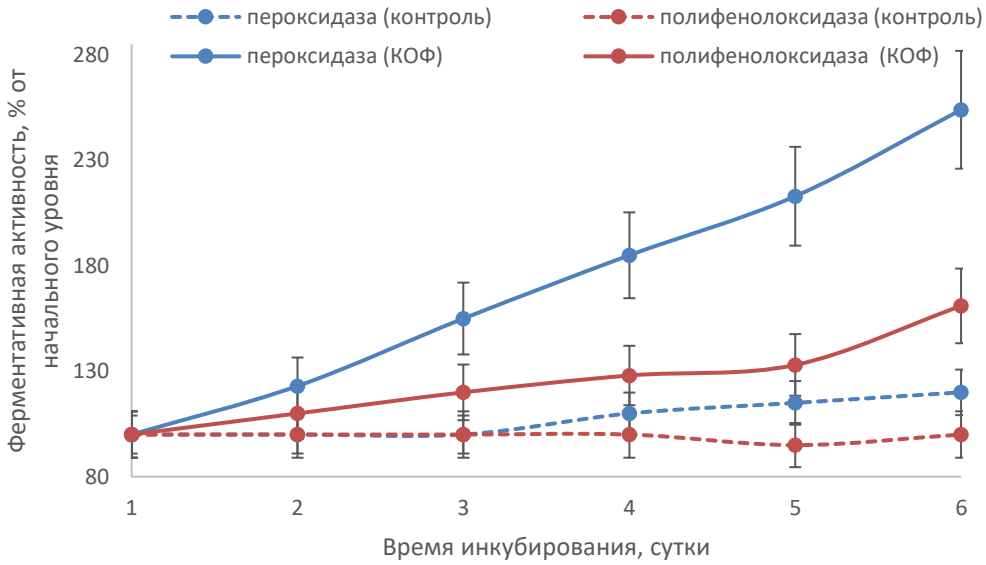


Рисунок 5.9 – Пероксидазная и полифенолоксидазная активность в ткани томатов черри, инфицированных *F. oxysporum* и обработанных КОФ, содержащей биосурфактанты *B. mojavensis* P1709

Исходная активность полифенолоксидазы и пероксидазы в тканях томатов черри составляла 27,1 и 4,2 ед./г соответственно. Сходные значения были зафиксированы в более ранних работах [223]. В контрольной группе (инфицированные, но не обработанные КОФ растения) активность полифенолоксидазы оставалась стабильной в течение 6 суток, тогда как активность пероксидазы возросла на 23 %, что, вероятно, отражает естественный ответ плодов на патогенную инвазию [328]. Применение КОФ в дозе 20 г/л

спровоцировало резкий рост активности ферментов: к 6-му дню эксперимента показатели пероксидазы и полифенолоксидазы увеличились на 254 % и 161 % соответственно. Данный результат указывает на способность биосурфактантов стимулировать иммунный ответ клеток томата.

Схожие по тематике исследования демонстрируют, что биосурфактанты *Achromobacter xylosoxidans* усиливали устойчивость томатов к *Ralstonia solanacearum* за счет активации фенилаланинаммиаклиазы, полифенолоксидазы и пероксидазы [329]. Аналогично, инокуляция *Bacillus subtilis* CBR05 повышала активность каталазы, пероксидазы и полифенолоксидазы в листьях томатов, снижая поражение *Xanthomonas campestris* [330].

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что кислотно-осаждённая фракция биосурфактантов *B. mojavensis* P1709 подавляет развитие *F. oxysporum* и продукцию микотоксинов в широком диапазоне концентраций – от 0,5 до 20 г/л. Однако для практического применения критически важно определить минимальную эффективную дозу, обеспечивающую надёжную защиту плодов при экономически оправданном расходе препарата.

Как показано на рисунке 5.8 при концентрации 0,5 г/л заболеваемость плодов достигает 100 % уже на 6-е сутки хранения, а при 2 и 5 г/л – на 7-е сутки, что сопоставимо с контролем по конечному результату. В то же время обработка раствором КОФ с концентрацией 10 г/л предотвращает полное поражение плодов в течение всего периода наблюдения (7 суток), а в расширенных испытаниях обеспечивает сохранность до 30 суток. При этой дозе ингибирование радиального роста мицелия составляет не менее 85 %, а снижение содержания микотоксинов Т-2 и НТ-2 превышает 90 %.

Важно отметить, что концентрации КОФ, использованные в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (0,5-20 г/л), не противоречат данным по экотоксичности, поскольку EC_{50} (170-310 мг/л) определена для очищенного сурфактина, тогда как КОФ содержит лишь 2-3 % активного вещества. Таким образом, в максимальной использованной концентрации КОФ (20 г/л) содержание активного сурфактина составляет 400-600 мг/л, что сопоставимо с

$EC_{50.}$ При локальном нанесении 10 мкл раствора КОФ на плод массой 15 г концентрация активного вещества в пересчёте на единицу массы плода не превышает 0,4 мг/г, что значительно ниже токсических порогов для млекопитающих. Кроме того, высокая скорость биодеградации липопептидов (снижение поверхностной активности на 50 % за 3 сут, раздел 5.4) обеспечивает их разложение в процессе хранения плодов, что исключает риск поступления сурфактанта в организм человека при употреблении продуктов. С учётом этих факторов, а также сопоставимости экономических затрат с химическими фунгицидами (раздел 6.6.7) КОФ *B. mojavensis* P1709 может быть рекомендована для разработки на её основе биопрепарата для послеуборочной обработки томатов (биопрепарат ДЗР) с целью их защиты от фитопатогенных грибов.

Дальнейшее увеличение концентрации до 20 г/л даёт лишь незначительный прирост защитного эффекта (ингибирование 93-100 %, снижение микотоксинов 95 %) при двукратном увеличении расхода препарата. Следовательно, с точки зрения баланса «эффективность – экономическая целесообразность» концентрация КОФ 10 г/л является оптимальной и рекомендуется в качестве рабочей дозы для послеуборочной обработки томатов.

5.7 Увеличение нефтеотдачи пластов с использованием биосурфактантов *P. putida* PP021

Работы по оценке потенциала биосурфактантов для повышения нефтеотдачи проводились в рамках научных направлений, поддержанных проектом Российского научного фонда № 23-24-00611 «Способ получения биосурфактантов из органических отходов и исследование их потенциала в качестве интенсификаторов добычи нефтей» и программой стратегического академического лидерства «Приоритет-2030» по теме «Создание технологии повышения нефтеотдачи на зрелых месторождениях с использованием продуктов метаболизма микроорганизмов». Полученные результаты легли в

основу дальнейшей оценки возможности применения микробных метаболитов в технологиях увеличения нефтеотдачи.

В экспериментах по оценке эффективности биосурфактантов для увеличения нефтеотдачи использованы два типа препаратов и две модельные системы, что обусловлено различными целями исследования. Очищенный препарат, полученный из культуральной жидкости *P. fluorescens* PCS-20, применяли исключительно на песчаных колонках для оценки максимальной потенциальной эффективности рамнолипидов в сравнении с синтетическим ПАВ при равной концентрации активного вещества. Этот подход позволил нивелировать влияние сопутствующих примесей и оценить «чистый» вклад биосурфактанта в процессы снижения межфазного натяжения и вытеснения нефти. Штамм *P. fluorescens* PCS-20 не рассматривается для промышленного использования и применён исключительно как модельный объект для методологической отработки.

Для препарата, предназначенного к практическому внедрению, использована КОФ бесклеточного супернатанта *P. putida* PP021. Данная форма выбрана как наиболее технологичная, экономически целесообразная и стабильная при хранении. Испытания КОФ проведены в двух модельных системах: на песчаных колонках – для прямого сравнения с очищенным препаратом и синтетическим ПАВ в идентичных условиях, и на натурных кернах – для подтверждения эффективности в условиях, максимально приближенных к пластовым (температура 39 °C, давление, естественная пористость и минералогический состав породы). Комбинирование двух модельных систем позволяет нивелировать ограничения каждой из них: песчаные колонки обеспечивают высокую воспроизводимость и параллельное тестирование, а керны дают результаты, релевантные для реальных месторождений. Такой дизайн эксперимента обеспечивает как строгую научную верификацию, так и практическую обоснованность рекомендаций для промышленности.

БС, продуцируемые двумя штаммами *Pseudomonas*, были испытаны с точки зрения их способности повышать третичную нефтеотдачу в сравнении с

химически синтезированным ПАВ. Апробацию проводили на модельных песчаных колонках и в системе с керном. В экспериментах использовались два типа биосурфактантов: очищенный препарат из культуральной жидкости *P. fluorescens* PCS-20 и КОФ из бесклеточного супернатанта *P. putida* PP021 без дополнительной очистки. Эти два типа биосурфактантов были выбраны для того, чтобы сравнить эффективность различных методов подготовки биосурфактанта, а также чтобы исключить влияние побочных метаболитов, таких как органические кислоты и полисахариды, которые могут влиять на результаты [331]. Очищенный препарат был выбран для оценки максимально достижимой эффективности в сравнении с синтетическим ПАВ, тогда как КОФ отражает наиболее технологичную и экономически целесообразную форму для промышленного внедрения.

5.7.1 Способность биосурфактантов, продуцируемых *P. fluorescens* PCS-20, повышать третичную нефтеотдачу

Испытания проводились на вертикальных цилиндрических колонках из ПВХ, заполненных прокаленным речным песком, что позволило создать модель коллекторов, аналогичную природным резервуарам нефти [332]. Первоначальное заполнение модельных коллекторов проводилось закачкой рассола (раствор NaCl и $CaCl_2$), что имитировало процессы закачки воды в реальные нефтяные пласты. Раствор подавался в свободный объем над песчаной матрицей до появления первых капель элюата в нижней части системы [TABER JJ, 1969]. На основании разницы между объемом закачанного и дренированного раствора определили объем порового пространства (PV) в колонках [333]. Схема эксперимента представлена на рисунке 5.10.

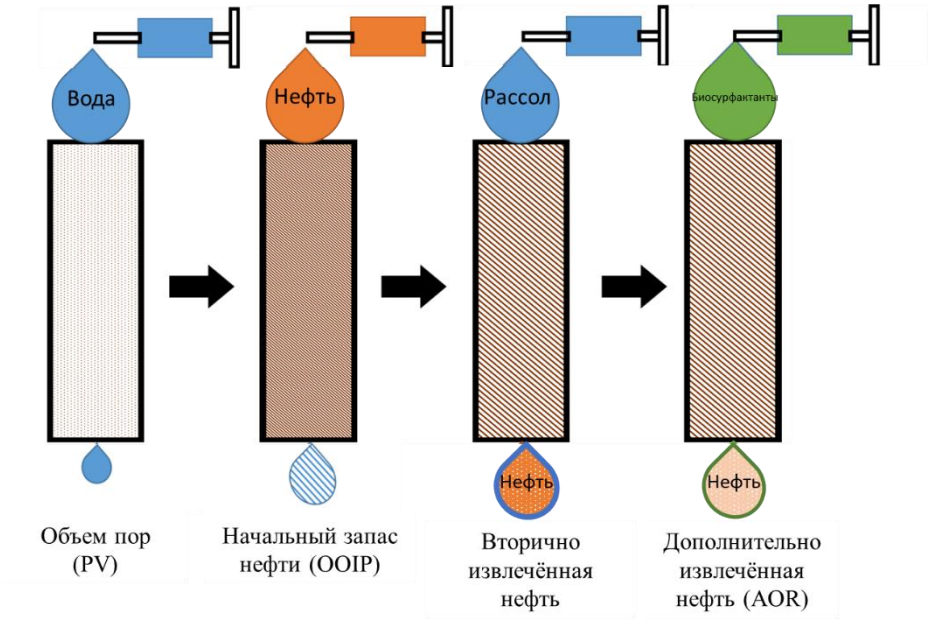


Рисунок 5.10 – Схема сравнения эффективности синтетического и биологически продуцированного сурфактантов для повышения нефтеотдачи

PV в колонках колебался в пределах 52,9-54,2 мл (таблица 5.3). После предварительного насыщения колонок рассолом, на них наливали нефть, что приводило к вытеснению части рассола. Как только из колонок начинали выходить первые капли нефти, закачку нефти сверху останавливали. Объем задержавшейся в колонках нефти принимали за OOIP - начальные запасы нефти. Относя OOIP к PV, вычисляли запасы нефти в процентах от объема пор (Soi). Среднее значение OOIP для всех колонок составило 43,76 ± 1,0 мл при средней нефтенасыщенности Soi = 77,64±0,8 %. Эти значения типичны для песчаных модельных систем [334]. Далее проводили вторичное вытеснение нефти – для этого через колонки проливали объем рассола, шестикратно превышающий OOIP. При этом часть нефти OOIP изливалась из колонок вместе с рассолом (OOIP-Sorwf), а часть – оставалась в колонках (Sorwf). В нашей модельной системе, из колонок изливалось 23,1-28,5 мл, а оставалось в них 19,0-24,4 мл. Таким образом, после вторичного вытеснения в колонках осталось (Sor) от 40,0 % до 51,4 % нефти от ее первоначальных запасов (от OOIP). На следующем этапе проводили третичное вытеснение нефти – для этого на поверхность колонок наливали растворы синтетического анионного ПАВ или биосурфактанта,

продуцированного *P. fluorescens* PCS-20, в объёме 0,6 PV. Синтетическое ПАВ и биосурфактант использовали в двух концентрациях (0,1 и 0,5 % масс.), в качестве контроля использовали рассол в объёме 0,6 PV. Выход снизу из колонок закрывали и инкубировали колонки в течение 24 ч. Далее объем дополнительно излившей нефти фиксировали и относили к Sorwf, получая процентное значение дополнительно извлеченной нефти (AOR).

Таблица 5.3 – Характеристика нефтеотдачи в эксперименте на песчаных колонках

Вариант	PV (мл)	OOIP (мл)	Soi (%)	Sorwf (мл)	OOIP - Sorwf (мл)	Sor (%)	AOR (%)
Контроль	53,1±0,6	41,5±1,1	77,4±0,8	24,4±0,6	23,1±1,1	51,4±1,2	0
Биосур-фактант 0,1 %	53,8±0,8	42,7±1,1	77,0±1,2	21,1±0,6	26,4±1,3	44,3±1,5	28,6±0,4
Биосур-фактант 0,5 %	54,2±0,3	44,9±0,8	77,3±1,0	19,6±0,6	27,9±1,0	40,9±1,4	31,4±0,5
Синт. ПАВ 0,1 %	52,9±0,5	47,5±1,0	78,3±0,6	21,1±0,2	26,4±1,2	44,4±0,9	32,0±0,5
Синт. ПАВ 0,5 %	54,0±0,3	42,2±0,9	78,2±0,8	19,0±0,3	28,5±0,8	40,0±1,0	32,9±0,7

Как видно из таблицы 5.3, AOR для биосурфактанта составил 28,6±0,4 % и 31,4±0,5 %, а для синтетического ПАВ 32,0±0,5 % и 32,9±0,7 % при концентрациях 0,1 % и 0,5 % соответственно. Результаты достоверно не различаются для концентрации 0,5 %, являющейся основной рабочей концентрацией для синтетического ПАВ [335-337].

По данным литературы, значения AOR 20-35 % рассматриваются как эффективные при тестировании микробиологических продуктов на модельных системах [338,339]. Полученные нами значения находятся в указанных пределах. Кроме того, они соответствуют данным, полученным другими авторами для бактериальных биосурфактантов и живых культур-продуцентов биосурфактантов. Так, сообщалось, что при внесении сурфактант-

продуцирующих микроорганизмов рода *Bacillus* spp. в резервуар нефтеотдача увеличивается до 43 % [340,341], однако следует учитывать, что такие показатели достигались в условиях применения натурных кернов, повышенного давления и нефтей с различной плотностью (0,82-0,91 г/см³). Действительно, такие методологические различия, включая пористость коллектора и вязкость нефти, могут оказать влияние на эффективность процессов снижения межфазного натяжения и эмульгирования неполярной фазы с последующим вытеснением нефти. Другие исследования также подтверждают, что AOR для песчаных колонок при участии биосурфактантов может составлять от 36 до 61 % [342,343]. Purwasena с соавторами (2024) установили, что применение очищенного биосурфактанта *Pseudoxanthomonas taiwanensis* в концентрации 0,73 г/л позволяет добиться значений AOR равных 36,04 % [334]. Результаты Pornsunthorntawee (2008) показали, что биосурфактанты в культуральных супернатантах *B. subtilis* PT2 и *P. aeruginosa* SP4 позволяют добиться извлечения 61,62 и 57,01 % нефти в песчаных моделях, соответственно [342].

Таким образом, по эффективности биосурфактанты, продуцируемые *P. fluorescens* PCS-20, сопоставимы с синтетическим ПАВ, а по экологическим показателям превосходят его. Однако, как отмечено в разделе 3.3, этот штамм не рассматривается для промышленного внедрения из-за условной патогенности, что потребовало бы дополнительных мер биобезопасности и увеличило бы себестоимость. Поэтому для промышленного использования выбран штамм *P. putida* PP021, результаты испытаний которого представлены в разделе 5.7.2.

5.7.2 Способность кислотноосажденной фракции биосурфактантов, продуцируемых *P. putida* PP021, повышать третичную нефтеотдачу

В рамках настоящего этапа работы была проведена оценка применимости КОФ, полученной из бесклеточного супернатанта КЖ *P. putida* PP021 без предварительной очистки, для целей повышения нефтеотдачи.

Использование КЖ в БМУН зачастую ограничено рядом факторов: необходимостью соблюдения строгих условий хранения, короткими сроками годности, а также значительными затратами на транспортировку больших объёмов от места производства к месту применения – будь то фермерское хозяйство или нефтяное месторождение. В связи с этим все чаще рассматривается альтернатива в виде КОФ, частично очищенного концентрата биосурфактантов, полученного без использования органических растворителей. Такой подход позволяет снизить логистические и производственные издержки, а также упростить процедуру транспортировки [129].

Нами была оценена эффективность КОФ в двух типах модельных систем: 1) на песчаных колонках (T = 25 °C); 2) в натурных кернах (T = 39 °C, соответствует пластовым условиям). Использование песчаных моделей обеспечивает высокую воспроизводимость экспериментов, возможность параллельного тестирования нескольких вариантов, а также контроль за концентрацией и расходом реагентов. Однако песок отличается меньшей удельной поверхностью по сравнению с природными породами-коллекторами, что снижает вклад капиллярных и адсорбционных эффектов и, как следствие, может приводить к завышенным значениям дополнительной нефтеотдачи [344]. В то же время использование природных кернов позволяет воспроизвести реальные условия месторождений (проницаемость, пористость), обеспечивая практически релевантные значения нефтеотдачи, особенно при повышенных давлении и температуре. Однако такой подход ограничен невозможностью статистической обработки данных из-за высокой трудоемкости и невозможности поставить эксперимент в нескольких (одинаковых по характеристикам керна) повторностях [129]. Комбинированное применение обеих моделей позволяет нивелировать ограничения каждой из них и получить более объективную оценку эффективности реагента для третичной нефтеотдачи.

Эксперимент с песчаными колонками проводили по схеме, описанной разделе 5.7.1 (рисунок 5.10). Было установлено, что среднее значение порового объема (PV) в песчаных колонках составляет 6,16±0,12 мл. Средний

первоначальный объем нефти составлял 3,81±0,1 мл, при средней начальной нефтенасыщенности Soi равной 61,2±1,2 % (таблица 5.4). После вторичного вытеснения рассолом объем остаточной нефти в среднем составлял 1,03-2,86 мл, что соответствует остаточной нефтенасыщенности (Sor) в диапазоне 24,9-72,9 %. Дополнительно вытесненный объем нефти после использования кислотно-осажденной фракции (КОФ) составил 48 % от остаточной нефти (AOR). Данный показатель эффективности вытеснения нефти (AOR) для КОФ превышает таковой, полученный для очищенных сурфактантов в разделе 5.7.1, примерно в 1,5 раза. Важно отметить, что сравнение проводилось при идентичных условиях эксперимента: типе нефти, характеристиках песчаной набивки и материале колонок, а также при равной концентрации основного биосурфактанта в рабочих растворах (0,1-0,5 % масс.). Превышение эффективности КОФ над очищенным препаратом, вероятно, обусловлено синергетическим эффектом сопутствующих амфифильных соединений, которые экстрагируются и соосаждаются вместе с основным биосурфактантом при воздействии 5М HCl. Эти дополнительные компоненты, отсутствующие в высокоочищенном препарате, вероятно, усиливают действие основного ПАВ, повышая общую эффективность композиции.

Далее КОФ была использована в модельном эксперименте с керном. Как уже было отмечено, использование керна и сравнение полученных результатов с таковыми на песчаных колонках позволяют приблизиться к реальным условиям нефтедобычи. Так, керн сохраняет естественную структуру пористой среды, включая минералогический состав, размеры и форму пор, а также капиллярные свойства, которые существенно влияют на процессы вытеснения нефти [129]. Кроме того, в экспериментах с керном можно более точно имитировать пластовые условия, такие как температура, давление и химический состав, что критично для оценки эффективности методов увеличения нефтеотдачи [344].

Таблица 5.4 – Характеристики нефтеотдачи в эксперименте на песчаных колонках и нативном керне

Вариант	PV (мл)	OOIP (мл)	Soi (%)	Sorwf (мл)	OOIP – Sorwf (мл)	Sor (%)
Контроль (песчаная колонка)	6,21 ± 0,12	3,87 ± 0,09	60,9± 1,3	2,78 ± 0,07	1,03 ± 0,05	72,9 ± 1,3
КОФ (песчаная колонка)	6,10± 0,11	3,75 ± 0,10	61,5 ± 1,1	0,95 ± 0,04	2,86 ± 0,06	24,9 ± 1,2
КОФ (керн)	12,67±0,8	6,30±0,09	49,7±1,0	2,58±0,10	3,72±0,10	41,0±1,0

В эксперименте с вытеснением нефти из керна оценивали те же показатели, что и в эксперименте с песчаными колонками (таблица 5.4). В керн закачивали 1 поровый объём КОФ в концентрации действующего вещества 0,1 % или 0,5 %. Установили, что среднее значение порового объёма (PV) в керне составляет 12,67±0,8 мл, средний первоначальный объём нефти – 6,30±0,09 мл, или 49,7±1,0 % от OOIP. Объем нефти после вторичного вытеснения рассолом в среднем составляет 3,72±0,10 мл (Sor – 41,0±1,0 %), а дополнительно вытесненный объем нефти после использования КОФ – 21% (AOR). Показатель Soi был ниже такового в эксперименте с песчаными колонками (около 50 % от PV), что связано с различиями поровых пространств песчаной модели и натурного керна ввиду различного генезиса пород. Этот факт требует внимания при планировании дизайна экспериментов и обработке и сравнении данных, так как различия в структуре пористой среды могут существенно влиять на поведение нефти в порах [129]. Уровень вторичной нефтеотдачи (Sor) в эксперименте с вытеснением из керна был оценен в 41 % от количества первоначально залегающей нефти, что значительно выше, чем в эксперименте с колонкой. Предположительно, нефть в керне содержалась в порах и была менее связана с частицами породы, чем в эксперименте с колонкой. Это может объясняться различиями в минералогическом составе и структуре пор керна, которые способствуют более эффективному вытеснению нефти [336].

В ранее выполненных нами исследованиях на аналогичной модельной системе с использованием липопептидсодержащих культуральных жидкостей *Bacillus pumilus* и *Peribacillus simplex* было показано, что дополнительная нефтеотдача для *B. pumilus* на 34 % превышала показатель синтетического ПАВ Atren, тогда как для *P. simplex* оказалась на 16 % ниже [224]. Полученные в настоящей работе значения для рамнолипидов *P. putida* PP021 превышают эти показатели, что подтверждает преимущество гликолипидных биосурфактантов для задач увеличения нефтеотдачи.

Результаты сравнения Sor и AOR для песчаных колонок и керна представлены на рисунке 5.11. При вторичном извлечении на начальных этапах (внесение 1,2 PV рассола) объем извлекаемой нефти увеличивался пропорционально объему вносимого рассола. После внесения объема рассола, кратного 2,5 PV, степень вытеснения оставалась стабильной, независимо от дальнейшей закачки рассола. Такое замедление согласуется с данными других исследований и подтверждает необходимость использования третичных методов нефтеизвлечения [334].

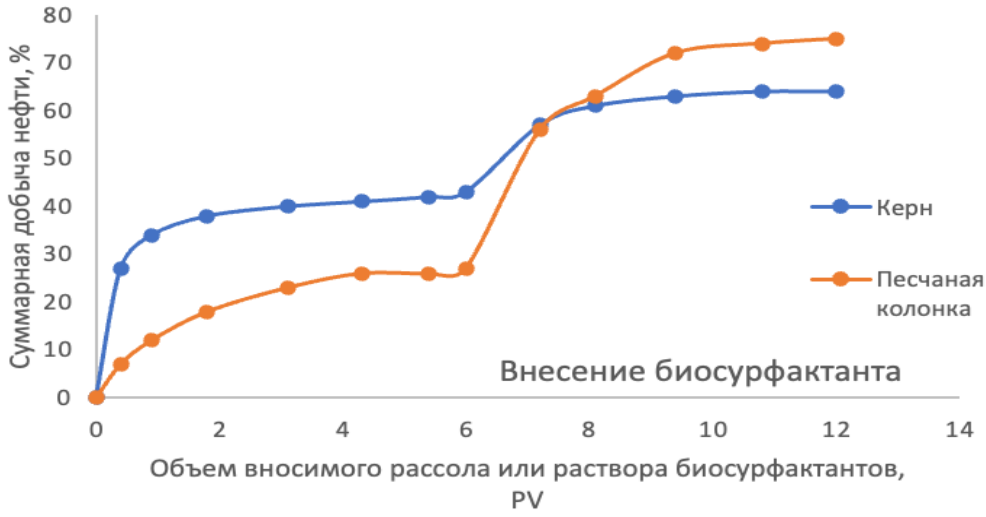


Рисунок 5.11 – Вторичная (до введения раствора биосурфактантов, Sor) и дополнительная (после закачки биосурфактантов, AOR) нефтеотдача, оцененная в экспериментах с песчаными колонками и керном

Добавление КОФ привело к дополнительному увеличению нефтеотдачи (AOR) на 21 %, что относится к категории эффективных результатов (более 10

%) [342]. Следует учесть тип сырой нефти, использованной в эксперименте – тяжелая нефть с высокими содержанием парафинов и серы, что затрудняет ее извлечение [345]. С одной стороны, эффективное третичное вытеснение такой нефти свидетельствует о высоком потенциале КОФ биосурфактантов. С другой, позволяет рекомендовать интенсификацию вытеснения: т.е. использовать биосурфактанты в комбинации с другими методами, такими как тепловое воздействие или химическое заводнение [336].

Результаты нашего исследования согласуются или превышают таковые, представленные в литературе для испытаний биосурфактантов в условиях, близких к реальным. Так, в экспериментах индийских ученых по заводнению кернов из песчаника и карбонатов с использованием сапонинов дополнительная нефтеотдача составила 8,4 % для песчаника и 6,2 % для карбонатов [346]. Заводнение песчаного керна рамнолипидами в концентрации 0,5 % (в пересчёте на сырую КОФ; содержание активного рамнолипида 2-3 %, что соответствует 100-150 мг/л чистого вещества) привело к дополнительной нефтеотдаче на уровне 19,6 % от OOIP и общей нефтеотдаче на уровне 59,1 % [134]. Следует подчеркнуть, что в экспериментах по нефтеотдаче, в отличие от тестов на гидробионтах, биосурфактант находится в замкнутой системе «порода–нефть–рассол», и его токсическое действие на гидробионты не является релевантным критерием. Однако, следует учитывать, что в случае технологических утечек или контакта с персоналом биосурфактанты представляют значительно меньший риск, чем синтетические ПАВ. Рабочие концентрации биопрепарата ППН (0,4-0,5 %) соответствуют содержанию активного рамнолипида на уровне 100-150 мг/л, что ниже значений EC_{50} (195 мг/л). Кроме того, высокая скорость биодеградации (58-64 % за 10 сут) обеспечивает быстрое разложение биосурфактантов в окружающей среде, предотвращая их длительное накопление. Таким образом, даже при случайных разливах или попадании на почву биопрепарат не создаёт долгосрочной экологической угрозы.

Так, КОФ, полученная из изолята *P. putida* PP021, способствовала значительному увеличению степени извлечения тяжелой нефти из

Ромашкинского месторождения как на песчаных моделях, так и на моделях с керном. Эти результаты подтверждают потенциал использования биосурфактантов, полученных из *P. putida* PP021, для повышения эффективности извлечения нефти. Возможно, наличие других метаболитов в КОФ, таких как липопептиды, может синергически усиливать эффект рамнолипидов, что объясняет высокую эффективность КОФ в наших экспериментах [129]. Подобные данные позволяют рассматривать КОФ как перспективную форму биосурфактанта для промышленного внедрения, обладающую как технологической эффективностью, так и преимуществами в части логистики и устойчивости к условиям хранения.

В целом, применение как очищенных биосурфактантов, так и КОФ, производимых *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20, открывает новые возможности для разработки более устойчивых и экономически эффективных технологий извлечения нефти. Оба штамма могут быть использованы для создания препаратов на основе биосурфактантов, которые не только способствуют увеличению нефтеотдачи, но и могут быть адаптированы для применения в различных условиях. Это позволяет рассматривать их для вовлечения в дальнейшие испытания и для коммерческого использования в нефтяной промышленности [345]. Результаты нашего исследования согласуются с данными литературы, где биосурфактанты, особенно рамнолипиды, демонстрируют высокую эффективность в снижении поверхностного натяжения и улучшении вытеснения нефти [347]. Представленные результаты экспериментов по третичному вытеснению тяжелой нефти с использованием рамнолипидов *P. putida* PP021 были опубликованы с участием автора диссертации в работе [307].

ГЛАВА 6 РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БИОСУРФАКТАНТОВ

На основании результатов экспериментальных исследований, представленных в главах 4 и 5, предложена разработка биотехнологий получения бактериальных препаратов:

- биопрепарата ДЗР – для защиты растений от фитопатогенов на основе КОФ, содержащей липопептиды, синтезируемые *B. mojavensis* P1709;

- биопрепарата ППН – для повышения нефтеотдачи пластов на основе КОФ, содержащей гликолипиды, синтезируемые *P. putida* PP021.

Основным ведущим оборудованием в технологии является ферментер с рабочим объёмом 2000 л в количестве трех единиц, что обеспечит непрерывный процесс производства. Выбор такой производительности проектируемой технологической линии обусловлен результатами анализа региональных потребностей предприятий АПК и нефтегазовой отрасли в биопрепаратах, а также необходимостью проведения их опытно-промышленных испытаний.

Согласно данным Министерства промышленности и торговли Республики Татарстан [352], годовая добыча нефти в регионе составляет около 35 млн т, при этом эксплуатационный фонд скважин превышает 45 тыс. единиц, из которых около 30 % относятся к категории трудноизвлекаемых запасов. Для проведения одной обработки призабойной зоны нагнетательной скважины требуется от 0,8 до 4,0 т биопрепарата ППН, что при его годовом выпуске 7,7 т позволяет обработать от 2 до 8 скважин. Этого достаточно для проведения опытно-промышленных испытаний на пилотном участке, но недостаточно для промышленного охвата рынка, что подтверждает необходимость дальнейшего масштабирования.

В сельскохозяйственном секторе Приволжского федерального округа (ПФО) валовой сбор томатов защищённого грунта в 2025 г., по данным Росстата, составил около 178,3 тыс. т [353]. Для послеуборочной обработки 1 т плодов требуется 0,08 кг биопрепарата ДЗР, что при годовом выпуске препарата в

количестве 5,5 т позволяет обработать до 68,75 тыс. т продукции. Данный объём составляет примерно 38,6 % годового валового сбора томатов закрытого грунта в ПФО, что свидетельствует об обоснованности выбранной мощности производства. Меньший объём производства не позволил бы удовлетворить даже пилотные запросы агропромышленного комплекса и нефтегазовой отрасли, а больший – потребовал бы значительных капитальных вложений без гарантии сбыта. Выбранная производительность является оптимальной для отработки технологии, оценки рыночного спроса и минимизации капитальных рисков перед переходом к полномасштабному производству. При подтверждении спроса предусмотрена возможность масштабирования путём установки ферментёров объёмом 10-15 м^3, что позволит снизить себестоимость до 250-350 руб./кг и сократить срок окупаемости до 2 лет.

При разработке биотехнологий учитывались основные принципы проектирования современных предприятий: экономическая эффективность, технологичность и экологическая безопасность. При производстве биопрепаратов сопутствующим продуктом является биомасса. Известно, что *B. mojavensis* обладает фосфатмобилизующей и азотфиксирующей активностью, а также способностью продуцировать фитогормоны [348,349], а бактерии *P. putida* способны к солюбилизации фосфатов и продукции сидерофоров [350,351]. В связи с этим, получаемая биомасса может быть использована в качестве органического удобрения или биоремедианта. При культивировании *P. putida* PP021 на отработанном растительном масле после сепарации образуется дополнительный побочный продукт – масляная фракция, которая может быть возвращена в технологический цикл или реализована как техническое масло. Количественные выходы биомассы и масляной фракции приведены в разделе 6.2. Надо отметить, что предложенный подход по реализации биомассы и масляной фракции повысит экономическую эффективность и экологическую безопасность разрабатываемых биотехнологий.

Технологический процесс получения бактериальных препаратов на основе биосурфактантов включает стадии подготовки питательной среды,

ферментации, первичного разделения, выделения и очистки продукта. При разработке биотехнологий препаратов учтены требования действующей нормативно-технической документации, в частности ГОСТ Р 56639-2015, СанПиН 3.3686-21, ГОСТ Р ИСО 14644 и др.

6.1 Блок-схема технологии получения бактериальных препаратов

Разработанная биотехнология получения бактериальных препаратов состоит из семи модулей (рисунок 6.1), отражающих движение материальных потоков от подготовки сред до фасовки готового продукта.

Модуль 1. Подготовка питательной среды. Компоненты среды дозируют, смешивают с водой, стерилизуют *in situ* в ферментёре. Готовую стерильную среду распределяют на два потока: на получение посевного материала и на основную ферментацию.

Модуль 2. Подготовка инокулята. Лиофилизированный штамм восстанавливают в колбе (5 л), затем последовательно наращивают в посевном ферментёре (50 л) до достижения необходимой биомассы.

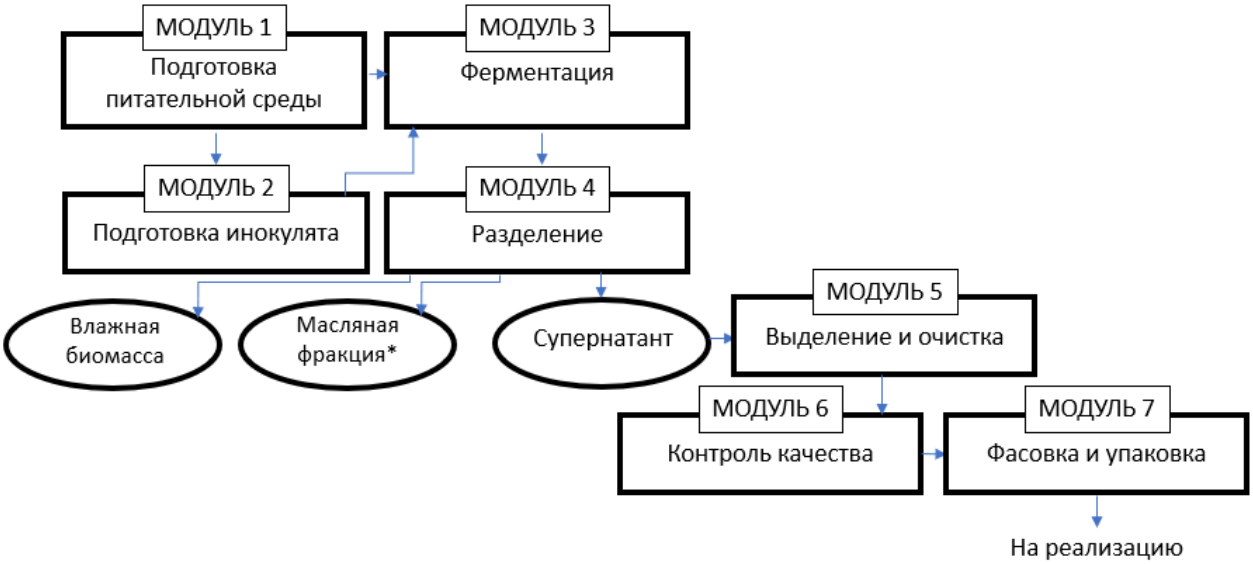
Модуль 3. Направленный биосинтез (основная ферментация). В основном ферментёре (общий объем 3000 л) проводят культивирование при контролируемых параметрах (температура, pH, аэрация, перемешивание).

Модуль 4. Первичное разделение. КЖ с биомассой подают на декантерную центрифугу, где разделяют на потоки: влажную биомассу, бесклеточный супернатант, а также масляную фракцию для штамма, культивируемого на маслосодержащей среде.

Модуль 5. Выделение и очистка биопрепарата. Супернатант подкисляют до pH 2,0 в реакторе-осадителе; осадок отделяют на центрифуге; промывают ресуспендированием в подкисленной воде (2-3 цикла); нейтрализуют 1 М раствором NaOH до pH 6,5-7,0; высушивают в распылительной сушилке.

Модуль 6. Контроль качества. Готовый сухой порошок проверяют по показателям влажности, зольности, поверхностного натяжения, эмульгирующей активности и микробиологической чистоты.

Модуль 7. Фасовка и маркировка. Готовый сухой порошок биопрепарата фасуют в герметичные крафт-мешки по 25 кг с указанием даты производства, серии и срока годности.



* – масляная фракция образуется при культивировании на маслосодержащей среде

Рисунок 6.1 – Блок-схема технологического процесса получения бактериальных препаратов на основе биосурфактантов

На основе составленной блок-схемы проектируемых биотехнологий в работе проведены дальнейшие необходимые расчеты и технические предложения.

6.2 Расчёт материального баланса

6.2.1 Расчёт материального баланса получения биопрепарата ДЗР

На основании разработанной блок-схемы (рисунок 6.1) и результатов, полученных при лабораторной апробации способа получения биопрепарата ДЗР

(раздел 4.1.1), проведён расчёт материального баланса получения биопрепарата ДЗР в одном производственном цикле (таблица 6.1-6.7). Все значения приведены для рабочего объёма ферментёра 2000 л.

Таблица 6.1 – Материальный баланс стадии приготовления питательной среды

Приход	Масса, кг	%	Расход	Масса, кг	%
Меласса	60,97	2,92	Стерильная среда	2002,0	96,0
Гидролизат рыбной муки	10,16	0,49	Потери при стерилизации	83,42	4,0
$MgSO_4*7H_2O$	2,03	0,10			
Вода питьевая	2012,26	96,49			
Итого	2085,42	100,0	Итого	2085,42	100,0

Таблица 6.2 – Материальный баланс стадии получения посевного материала

Приход	Масса, кг	%	Расход	Масса, кг	%
Стерильная посевная среда	32,0	99,97	Инокулят	30,0	93,74
Культура	0,01	0,03	Потери	2,01	6,26
Итого	32,01	100	Итого	32,01	100

Таблица 6.3 – Материальный баланс стадии культивирования *B. mojavensis* P1709

Приход	Масса, кг	%	Расход	Масса, кг	%
Стерильная среда	1970,0	98,5	КЖ с биомассой	2000,0	100,0
Инокулят	30,0	1,5			
Итого	2000,0	100,0	Итого	2000,0	100,0

Таблица 6.4 – Материальный баланс стадии сепарации КЖ

Приход	Масса, кг	%	Расход	Масса, кг	%
КЖ с биомассой	2000,0	100,0	Супернатант	1800,0	90,0
			Влажная биомасса	180,0	9,0
			Потери	20,0	1,0
Итого	2000,0	100,0	Итого	2000,0	100,0

Таблица 6.5 – Материальный баланс стадии осаждения и центрифугирования

Приход	Масса, кг	%	Расход	Масса, кг	%
Супернатант	1800,0	99,15	Полупродукт (КОФ)	185,0	10,19
2 М HCl	15,5	0,85	Отработанный супернатант	1630,5	89,81
Итого	1815,5	100,0	Итого	1815,5	100,0

Таблица 6.6 – Материальный баланс стадии промывки и нейтрализации

Приход	Масса, кг	%	Расход	Масса, кг	%
Полупродукт (КОФ)	185,0	63,79	Очищенный полупродукт (КОФ)	28,0	9,66
Подкисленная вода (pH 2,0)	100,0	34,48	Надосадочная жидкость	262,0	90,34
1 М NaOH	5,0	1,73			
Итого	290,0	100,0	Итого	290,0	100,0

Таблица 6.7 – Материальный баланс стадии сушки

Приход	Масса, кг	Расход	Масса, кг
Очищенный полупродукт (КОФ)	28,0	Сухой порошок	8,4
		Удаляемая влага и потери	19,6
Итого	28,0	Итого	28,0

Теоретический выход высушенного полупродукта без учета потерь составляет 8,8 кг (влажность 3-5 %); с учётом потерь при сушке фактический выход биопрепарата ДЗР составляет 8,4 кг.

Количество влаги, удаляемой при распылительной сушке, рассчитывают по формуле:

$$W = \text{M} \times \frac{W1-W2}{100-W2}, \qquad (6.1)$$

где M – масса влажного полупродукта, кг;

W1 – начальная влажность полупродукта (65-70 %);

W2 – конечная влажность готового продукта (3-5 %).

Количество удаляемой влаги:

$$W = 28{,}0 \cdot (70-5)/(100-5) = 19{,}2 \text{ кг}$$

Масса высушенного готового продукта:

$$\text{M} = 28{,}0 - 19{,}2 = 8{,}8 \text{ кг}.$$

С учётом потерь при сушке (0,4 кг) суммарные потери влаги и продукта составляют 19,6 кг; масса высушенного биопрепарата – 8,4 кг. Так, за один производственный цикл при использовании для культивирования ферментера с рабочим объёмом 2000 л может быть получено с учетом потерь 8,4 кг биопрепарата ДЗР с содержанием активного действующего вещества (биосурфактанта) 3,0 %.

6.2.2. Расчёт материального баланса получения биопрепарата ППН

Расчёт материального баланса получения биопрепарата ППН выполнен по той же схеме, что и для биопрепарата ДЗР, с учетом различий в составе продукционной среды и параметрах культивирования *P. putida* PP021. Все значения приведены для рабочего объёма ферментёра 2000 л. Результаты расчета сведены в таблицах 6.8-6.14.

Таблица 6.8 – Материальный баланс стадии приготовления питательной среды

Приход	Масса, кг	%	Расход	Масса, кг	%
Отработанное растительное масло	40,65	1,95	Стерильная среда	2002,0	96,0
$NaNO_3$	6,10	0,29	Потери при стерилизации	83,42	4,0
KH_2PO_4	2,03	0,10			
$MgSO_4*7H_2O$	1,02	0,05			
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,10	0,005			
Вода питьевая	2035,52	97,6			
Итого	2085,42	100,0	Итого	2085,42	100,0

Таблица 6.9 – Материальный баланс стадии получения посевного материала

Приход	Масса, кг	%	Расход	Масса, кг	%
Стерильная посевная среда	32,0	99,97	Инокулят	30,0	93,74
Культура	0,01	0,03	Потери	2,01	6,26
Итого	32,01	100	Итого	32,01	100

Таблица 6.10 – Материальный баланс стадии культивирования

Приход	Масса, кг	%	Расход	Масса, кг	%
Стерильная среда	1970,0	98,5	КЖ с биомассой	2000,0	100,0
Инокулят	30,0	1,5			
Итого	2000,0	100,0	Итого	2000,0	100,0

Таблица 6.11 – Материальный баланс стадии сепарации КЖ (ППН)

Приход	Масса, кг	%	Расход	Масса, кг	%
КЖ с биомассой	2000,0	100,0	Супернатант	1775,0	88,75
			Влажная биомасса	180,0	9,0
			Масляная фракция	25,0	1,25
			Потери	20,0	1,0
Итого	2000,0	100,0	Итого	2000,0	100,0

Таблица 6.12 – Материальный баланс стадии осаждения КОФ

Приход	Масса, кг	%	Расход	Масса, кг	%
Супернатант	1775,0	98,85	Полупродукт (КОФ)	340,0	18,94
2М HCl	20,6	1,15	Отработанный супернатант	1455,6	81,06
Итого	1795,6	100,0	Итого	1795,6	100,0

Таблица 6.13 – Материальный баланс стадии промывки и нейтрализации

Приход	Масса, кг	%	Расход	Масса, кг	%
Осадок КОФ (влажный)	340,0	71,13	Нейтрализованный концентрат	52,0	10,88
Подкисленная вода (pH 2,0)	130,0	27,20	Надосадочная жидкость	426,0	89,12
NaOH (1М)	8,0	1,67			
Итого	478,0	100,0	Итого	478,0	100,0

Таблица 6.14 – Материальный баланс стадии сушки

Приход	Масса, кг	Расход	Масса, кг
Очищенный полупродукт (КОФ)	52,0	Сухой порошок	15,4
		Удаляемая влага и потери	36,4
Итого	52,0	Итого	52,0

Теоретический выход высушенного полупродукта без учёта потерь составляет 16,4 кг (влажность 3-5 %); с учётом потерь при сушке фактический выход биопрепарата ППН составляет 15,6 кг.

Количество влаги, удаляемой при распылительной сушке, рассчитывают по формуле (6.1):

$W = 52{,}0 \times (70-5)/(100-5) = 35{,}6$ кг.

Таким образом, за один производственный цикл при использовании для культивирования ферментёра с рабочим объёмом 2000 л может быть получено с учётом потерь 15,6 кг биопрепарата ППН с содержанием активного

действующего вещества (биосурфактанта) 2,0 %. Побочными продуктами являются влажная биомасса массой 180 кг на цикл и масляная фракция массой 25 кг на цикл. Обе фракции направляются на реализацию. Для обеспечения цикла готовится 2002 кг стерильной питательной среды, из которых 1970 кг подаётся в основной ферментёр, а 32 кг – на получение посевного материала.

6.3 Подбор оборудования

Выбор технологического оборудования обусловлен данными, полученными при расчете материального баланса процессов получения препаратов ДЗР и ППН. Перечень основного и вспомогательного оборудования с указанием марок, характеристик и стоимости приведен в таблице 6.15.

Биореакторы из нержавеющей стали 316L обеспечивают устойчивость к коррозии в среде с органическими кислотами и хлоридами, накапливающимися в процессе ферментации, и соответствуют требованиям ГОСТ Р 56639-2015 для биотехнологических производств.

Для отделения полупродукта (КОФ) от отработанного супернатанта выбрана центрифуга с выгрузкой осадка, обеспечивающая эффективное разделение высоковязких гелеобразных суспензий, которые плохо фильтруются на вакуумных или барабанных фильтрах. Применение центрифуги позволяет также сократить потери продукта и упростить последующую промывку осадка методом повторного ресуспендирования в подкисленной воде (2-3 цикла) [164]. Распылительная сушилка предпочтительнее сублимационной, так как при сохранении поверхностной активности (подтверждено экспериментально, раздел 5.5) её эксплуатационные затраты в 4-5 раз ниже, что критично для промышленного масштаба [152]. Декантерная центрифуга позволяет эффективно разделять трёхфазную систему (влажная биомасса, супернатант, масляная фракция) с производительностью до 5 $м^3$/ч, что соответствует стандартам для микробных производств [354]. Промежуточные резервуары-

накопители оснащены рубашками охлаждения/нагрева для обеспечения температурного режима при хранении супернатанта (4-10 °C) и биомассы.

По данным независимых обзоров рынка биореакторов [355,356], цены китайских производителей на установки объёмом 3-5 м^3 находятся в диапазоне 7-15 млн руб., что подтверждает реалистичность принятой в расчётах цены. При этом оборудование BAILUN BIO соответствует требованиям ГОСТ Р 56639-2015 и имеет сертификаты CE и ISO 9001, что подтверждает его пригодность для биотехнологических производств.

Таблица 6.15 – Оборудование для проектируемого пилотного производства

Стадия / Операция	Наименование, марка	Характеристики	Стоимость, млн руб.
1	2	3	4
Основное оборудование			
Стадия I. Ферментация	Биореактор основной, BAILUN BIO	V=3000 л, нерж. 316L, CIP/SIP, ПЛК	21,2
	Посевной ферментёр, BAILUN BIO	V=50 л, полный контроль	2,6
Стадия II. Сепарация	Декантерная центрифуга HX LWS350	1,5-5,0 м^3/ч, 4000 об/мин, SUS304	3,1
Стадия III. Выделение КОФ	Реактор-осадитель эмалированный	V=3 м^3, якорная мешалка, рубашка	0,92
	Центрифуга с выгрузкой осадка (декантер)	1,5-3,0 м^3/ч, нерж. сталь, автоматическая выгрузка	3,0
	Распылительная сушилка Haijiang CT-C-II	t входа 120-140 °C, испарение 50 л/ч	8,0

Продолжение таблицы 6.15

1	2	3	4
	Дробилка роторная	200-500 кг/ч, нерж. сталь	0,36
	Устройство зашивки мешков	Полуавтомат	0,12
Вспомогательное оборудование			
Использование в ходе всего технологического процесса	Ёмкость-накопитель нерж. Wuxi Derksen	V=2500 л, рубашка, мешалка	0,56
	CIP-мойка Wonsen ZQX	Автоматический цикл	1,12
	Компрессор воздушный Denair	2-5 м³/мин, безмасляный	0,6
	Парогенератор	200-500 кг/ч	2,25
	Чиллер	50-100 кВт, до -5 °C	1,85
	Система водоподготовки	Обратный осмос + деионизация	1,15
	Прочее (ёмкости, КИП, трубопроводы)	-	1,5
ИТОГО:	-	-	48,3

Примечание: стоимость указана по состоянию на 2026 г., средние рыночные цены.

Как следует из таблицы 6.15, общая стоимость основного и вспомогательного оборудования составляет 48,3 млн руб. Основную долю (21,2 млн руб., или 43,9 %) формируют три основных биореактора объемом 3000 л каждый. Существенный вклад вносят также распылительная сушилка (8,0 млн руб.) и декантерная центрифуга (3,1 млн руб.). Выбранный комплект оборудования обеспечивает полный цикл производства от ферментации до фасовки и соответствует требованиям ГОСТ Р 56639-2015.

6.4 Описание принципиальной технологической схемы

На основе разработанной блок-схемы (раздел 6.1), рассчитанного материального баланса (раздел 6.2) и подобранного комплекта оборудования (раздел 6.3) разработана принципиальная технологическая схема получения биопрепаратов ДЗР и ППН (рисунок 6.2). Схема отражает движение материальных потоков от подготовки питательных сред до фасовки готового продукта и учитывает различия в технологических режимах культивирования для двух штаммов-продуцентов *B. mojavensis* P1709 и *P. putida* PP021.

Технологическая схема построена по принципу параллельно-последовательной организации процесса. Три основных ферментёра объёмом 3000 л с рабочим объёмом 2000 л эксплуатируются в режиме поочерёдной загрузки и сдвига фаз. Пока в одном аппарате осуществляется ферментация, другой проходит разгрузку и подготовку к следующему циклу, а третий может использоваться для следующей производственной загрузки. Такая организация позволяет ритмично использовать общее оборудование последующих стадий: декантерную центрифугу, реактор-осадитель, центрифугу с выгрузкой осадка и распылительную сушилку. Для сглаживания неравномерности потоков между стадиями предусмотрены промежуточные резервуары-накопители: для супернатанта, для влажной биомассы и для масляной фракции, а также бак-декантатор для осаждения КОФ.

Схема является единой для обоих биопрепаратов, но имеет два аппаратурных отличия, связанных с различиями в составе продукционной среды и свойствах целевых продуктов. Во-первых, для *P. putida* PP021 предусмотрена линия отделения масляной фракции (поток 3′), поскольку при культивировании на отработанном растительном масле после сепарации образуется дополнительный продукт. Во-вторых, режимы работы декантерной центрифуги и реактора-осадителя настраиваются под свойства каждого биосурфактанта: липопептиды *B. mojavensis* образуют компактный осадок, тогда как

рамнолипиды *P. putida* - объёмный гелеобразный осадок, удерживающий больше воды (см. раздел 6.4.3).

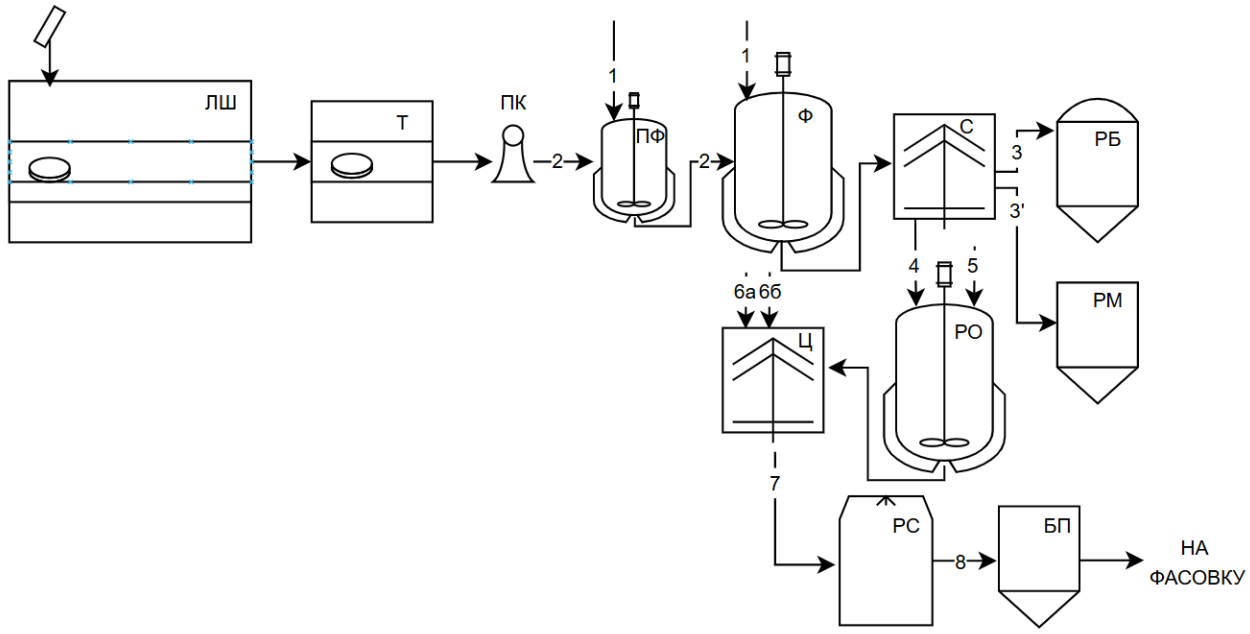


Рисунок 6.2 – Принципиальная технологическая схема получения бактериальных препаратов ДЗР и ППН на основе биосурфактантов

Экспликация оборудования:

1. ЛШ – ламинарный шкаф (для восстановления лиофилизированной культуры);
2. Т – термостат (для инкубации прекультуры);
3. ПК – колба с прекультурой (1 л);
4. ПФ – посевной ферментёр (50 л);
5. Ф – основной ферментёр (3000 л);
6. С – декантерная центрифуга (сепаратор) – для разделения КЖ на влажную биомассу, бесклеточный супернатант и масляную фракцию;
7. РБ – резервуар влажной биомассы;
8. РМ – резервуар масляной фракции;
9. РО – реактор-осадитель (3 м³);
10. Ц – центрифуга с выгрузкой осадка – для отделения полупродукта (КОФ) от отработанного супернатанта, последующей промывки и нейтрализации осадка непосредственно в центрифужных стаканах;

11. РС – распылительная сушилка;

12. БП – бункер готового препарата;

13. Компрессор – источник воздуха для аэрации и сушки

Материальные потоки:

1) стерильная питательная среда;

2) посевной материал;

3) влажная биомасса;

3′) масляная фракция (только для *P. putida* PP021);

4) бесклеточный супернатант (из С в реактор-осадитель);

5) 2 М HCl (в реактор-осадитель);

6а) подкисленная вода для промывки осаждённого полупродукта (КОФ) непосредственно в центрифужных стаканах;

6б) раствор NaOH для нейтрализации промытого осадка непосредственно в центрифужных стаканах;

7) нейтрализованный концентрат (из Ц в распылительную сушилку);

8) сухой биопрепарат.

Как видно из схемы, технологический процесс состоит из трёх последовательных стадий. Стадия I включает подготовку инокулята и культивирование: культура восстанавливается посевом на плотную питательную среду в ламинарном шкафу (ЛШ), инкубируется в термостате (Т), переносится в колбу (ПК) и далее в посевной ферментёр (ПФ), откуда инокулят подаётся в основной ферментёр (Ф). Стадия II – первичное разделение культуральной жидкости на декантерной центрифуге (С) с получением трёх фракций: влажной биомассы (в РБ), бесклеточного супернатанта (в РО) и масляной фракции (в РМ, только для биопрепарата ППН). Стадия III – выделение и очистка: бесклеточный супернатант подкисляется в реакторе-осадителе (РО) с образованием осадка КОФ, после чего полученная суспензия направляется в центрифугу (Ц) для отделения осадка от жидкой фазы. Промывка осадка подкисленной водой и последующая нейтрализация раствором NaOH осуществляются непосредственно в центрифужных стаканах с удалением жидкой фазы после

каждой операции. Полученный нейтрализованный концентрат (поток 7) высушивается в распылительной сушилке (РС), после чего сухой биопрепарат через бункер (БП) направляется на фасовку.

Схема предусматривает рациональное использование и утилизацию основных побочных продуктов производства: влажная биомасса используется как органическое удобрение или биоремедиант; масляная фракция реализуется как техническое масло или возвращается в цикл; промывные воды направляются на нейтрализацию и утилизацию. Материалы контактирующих с продуктом поверхностей оборудования выбраны с учетом коррозионной стойкости к компонентам технологической среды, включая кислые растворы, хлориды и органические соединения. Схема предусматривает автоматический контроль и управление ключевыми параметрами процесса (температура, pH, аэрация, перемешивание), а также CIP-мойку оборудования между циклами.

6.4.1 Стадия I. Подготовка инокулята и направленный биосинтез

Технологический процесс в промышленном масштабе (рабочий объём ферментёра 2000 л) инициируется восстановлением лиофилизированных производственных штаммов. В асептических условиях ламинарного шкафа содержимое ампулы с лиофилизированной культурой переносят в колбу объёмом 5 л, содержащую 2 л стерильной полноценной среды. Так, для *B. mojavensis* P1709 – среда LB (триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 10 г/л); для *P. putida* PP021 – среда на основе соевого пептона (CASO бульон) или LB. Культивирование проводят на орбитальном шейкере (140 об/мин) при 30±1 °C в течение 12-14 ч до достижения OD600 = 1,2-1,8.

Полученную первую прекультуру в полном объёме асептически переносят в посевной ферментёр объёмом 50 л, содержащий 30 л стерильной среды, адаптированной к промышленным субстратам. Состав посевной среды для *B. mojavensis* P1709 (г/л): меласса свекольная – 30,0; гидролизат рыбной муки – 5,0; $MgSO_4*7H_2O$ – 0,5. Для *P. putida* PP021 (г/л): отработанное растительное масло

– 20,0; $NaNO_3$ – 3,0; KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4*7H_2O$ – 0,5; $FeSO_4*7H_2O$ – 0,05. pH сред после стерилизации – 7,0±0,1; стерилизацию проводят в ферментёре *in situ* подачей острого пара при 121 °C в течение 30 мин. Культивирование в посевном ферментёре ведут при 30±0,5 °C, pH 7,0±0,1, аэрации стерильным воздухом 0,8 VVM, перемешивании 300 об/мин. Для *B. mojavensis* P1709 процесс продолжают 14-16 ч до OD600 = 2,0–2,5; для *P. putida* PP021 – 22-24 ч до OD600 = 1,8-2,2. Концентрация растворённого кислорода не ниже 30 % от насыщения.

Основной процесс направленного биосинтеза осуществляют в стальном ферментёре объёмом 3000 л (рабочий объём 2000 л). Продукционную среду готовят непосредственно в ферментёре, для *B. mojavensis* P1709 – 3 % мелассы, 0,5 % гидролизата рыбной муки, 0,1 % $MgSO_4$; для *P. putida* PP021 – 2 % отработанного растительного масла, 0,3 % $NaNO_3$, 0,05 % $FeSO_4$.

После охлаждения до 30 °C вносят 30 л посевной культуры (1,5 % от рабочего объёма), полученной в посевном ферментёре объёмом 50 л. Выбранный объём инокулята соответствует стандартной практике для бактериальных культур и обеспечивает сокращение лаг-фазы при сохранении экономической эффективности процесса [354]. Культивирование в основном ферментёре ведут в автоматическом режиме: температура 30±0,2 °C, pH 7,0±0,2 (регулировка 20 % растворами NaOH и H_3PO_4), аэрация 1,2 VVM (2400 л/мин), перемешивание – трёхъярусная комбинированная мешалка (турбинная + якорная) со скоростью 120 об/мин. Коэффициент массопередачи кислорода $kLa \geq 120–150$ $ч^{-1}$. Для обеспечения воспроизводимости процесса и своевременного принятия решений о завершении ферментации организован многоуровневый контроль. Online-контроль включает измерение pH (поддержание 7,0±0,2 титрованием 20 % NaOH и H_3PO_4), растворённого кислорода (pO_2, не ниже 30 % от насыщения, регулировка каскадным изменением скорости перемешивания), температуры (30±0,2 °C) и уровня пенообразования (при достижении критического уровня подаётся стерильный пеногаситель – подсолнечное масло, 0,01% об.). Offline-контроль предусматривает отбор проб каждые 8 ч для измерения оптической плотности (OD600, компенсация фона среды), поверхностного натяжения (метод

кольца Де Нюи) и остаточной концентрации субстрата (глюкозы – глюкозооксидазным методом, масла – гравиметрически после экстракции). Критерии остановки ферментации (таблица 6.16) разработаны на основе экспериментальных данных (глава 3) и включают достижение целевых значений ПН, стабилизацию Е24 и выход культуры в стационарную фазу (по ОТ-ПЦР). Такой комплексный подход соответствует рекомендациям для промышленного культивирования биосурфактантов и позволяет минимизировать риск снижения продуктивности из-за переферментации [39]. Мониторинг процесса осуществляется системой *in situ* сенсоров (pH, pO_2, температура, пенообразование) и пробами, отбираемыми каждые 8 ч, в которых определяют OD600, ПН и Е24.

Таблица 6.16 – Критерии остановки ферментации для штаммов-продуцентов

Критерий	*B. mojavensis* P1709	*P. putida* PP021
Достижение ПН, мН/м	≤ 26	≤ 30
Скорость снижения ПН, мН·м$^{-1}$*ч$^{-1}$	< 0,2	< 0,2
Е24, %	≥ 55	≥ 70
Стабилизация ОТ-ПЦР (изменение <10% за 8 ч)	+	+
Остаточный субстрат, %	0,3-0,5	0,3-0,5
Рекомендуемое время, ч	24	36

Согласно таблице 6.16, для *B. mojavensis* P1709 рекомендуемая продолжительность ферментации составляет 24 ч, для *P. putida* PP021 – 36 ч. К этому времени достигаются целевые значения ПН (≤ 26 и ≤ 30 мН/м соответственно), стабилизируется Е24 (≥ 55 % и ≥ 70 %), а сигнал ОТ-ПЦР выходит на плато, что свидетельствует о переходе культуры в стационарную фазу. Остаточная концентрация субстрата снижается до 0,3-0,5 %, что

обеспечивает максимальную конверсию сырья. Дальнейшее культивирование экономически нецелесообразно, так как не приводит к значимому приросту целевого продукта.

6.4.2 Стадия II. Первичное разделение

По окончании ферментации КЖ объёмом 2000 л охлаждают до 10 °C и подают на трёхфазный декантерный сепаратор (производительность 2000-5000 л/ч). В результате разделения получают такие потоки как: 1) Влажная биомасса (влажность 75-82 %, продуктивность 180-220 кг на цикл). Биомассу высушивают в барабанной сушилке до влажности 8-10 % и используют как органическое удобрение или кормовую добавку. 2) Бесклеточный супернатант (фугат) объёмом 1775-1800 л – направляют на стадию выделения КОФ. 3) Масляная фракция – образуется только при культивировании *P. putida* PP021 (накопление 20-30 кг на цикл); её отделяют и используют как техническое масло или возвращают в цикл.

Важно отметить, что сушка биомассы бациллярных клеток представляет отдельную технологическую задачу. Вегетативные клетки *B. mojavensis* термочувствительны, поэтому для сохранения жизнеспособности и ростстимулирующей активности биомассу рекомендуется сушить в мягком режиме (до 60 ℃) либо предварительно индуцировать спорообразование, поскольку споры *Bacillus* устойчивы к нагреванию до 80-100 ℃. Для *P. putida*, не образующего спор, сохранение жизнеспособности клеток при высушивании проблематично; биомассу целесообразно использовать в виде пасты или после мягкой сублимационной сушки. При использовании биомассы в качестве органического удобрения жизнеспособность клеток не критична, однако для биоремедиации этот фактор необходимо учитывать. Центрифуга с выгрузкой осадка и распылительная сушилка подобраны с учётом работы с высоковязкими гелеобразными осадками и обеспечивают производительность, соответствующую объёму ферментации.

Контроль эффективности разделения: мутность супернатанта ≤ 50 NTU, OD600 ≤ 0,05 после 10-кратного разведения. Потери целевых биосурфактантов за один цикл ≤ 2-3 %.

6.4.3 Стадия III. Выделение и очистка биосурфактантов и получение товарных форм

Бесклеточный супернатант направляют на линию получения КОФ. Процесс включает осаждение, центрифугирование с промывкой и сушку.

Осаждение. В реактор-осадитель РО (3 м^3, якорная мешалка, рубашка) при охлаждении (10-12 °С) и перемешивании (40-60 об/мин) дозируют 2 М HCl до pH 2,0±0,1. Расход кислоты: 12-15 л для фугата от B. mojavensis и 18-22 л для фугата от *P. putida*. После подкисления перемешивают 40-60 мин для укрупнения осадка КОФ.

Разделение и промывка. Суспензию из реактора-осадителя РО подают на центрифугу с выгрузкой осадка Ц. Жидкую фазу (отработанный супернатант) направляют на нейтрализацию и утилизацию. Осадок промывают холодной подкисленной водой (pH 2,0) в объёме 0,7-1,0 объёма маточного раствора: 100-120 л для осадка от *B. mojavensis*, 130-150 л – от *P. putida*. Промывку проводят методом повторного ресуспендирования осадка в подкисленной воде с последующим центрифугированием на Ц (2-3 цикла). Затем осадок нейтрализуют раствором NaOH (1 М) до pH 6,5-7,0 (расход 5-8 л для биопрепарата ДЗР, 8-10 л для биопрепарата ППН) при перемешивании барботажем воздуха.

Важно отметить, что масса осадка существенно изменяется в ходе последующей обработки продукта. После кислотного осаждения и первого центрифугирования на Ц получают влажный осадок КОФ массой 185 кг для биопрепарата ДЗР и 340 кг для биопрепарата ППН (таблицы 6.6, 6.13). Этот осадок содержит значительное количество маточного раствора и балластных солей. Для их удаления осадок промывают и нейтрализуют, как описано выше.

После повторного обезвоживания на Ц масса нейтрализованного концентрата снижается до 28 кг для биопрепарата ДЗР и 52 кг для биопрепарата ППН при влажности 65-70 %, что соответствует 8,4 и 15,6 кг сухого вещества соответственно. Именно этот концентрат поступает в распылительную сушилку.

Таким образом, 185 кг и 28 кг (или 8,4 кг сухого вещества) – это отражение разных технологических стадий: центрифугирования (влажный осадок) и подготовки к сушке (нейтрализованный концентрат). Различие в массе влажного осадка обусловлено как более высоким выходом КОФ у *P. putida* (7,8 г/л против 4,2 г/л), так и различной природой биосурфактантов: липопептиды B. mojavensis образуют компактный, хорошо отжимаемый осадок, тогда как рамнолипиды P. putida – более объёмный гелеобразный осадок, удерживающий больше воды за счёт углеводных фрагментов в молекуле.

Сушка. Нейтрализованный концентрат (влажность 65-70 %, масса сухого вещества 8,4 кг для биопрепарата ДЗР или 15,6 кг для биопрепарата ППН на цикл) подают в распылительную сушилку РС (вход 120-140 °С, выход 70-80 °С). Готовый сухой порошок КОФ (влажность 3-5 %) фасуют в крафт-мешки по 25 кг.

6.5 Разработка норм качества препаратов ДЗР и ППН

Для обеспечения высокого качества, эффективности и безопасности применения разработанных биопрепаратов необходима их стандартизация. На основании экспериментальных данных, а также с учётом требований ОФС.1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» (ГФ РФ) и ТР ТС 021/2011, разработаны нормы качества на сухие биопрепараты (таблица 6.17).

Как следует из таблицы 6.17, разработанные нормы качества устанавливают требования к внешнему виду, влажности, зольности, поверхностному натяжению, эмульгирующей активности, содержанию активного биосурфактанта и микробиологической чистоте. Для ДЗР установлены более высокие требования по содержанию активного

биосурфактанта (≥ 2,5 %), для ППН – по эмульгирующей активности (Е24 ≥ 70 %), что отражает специфику их целевого применения. Срок годности обоих препаратов в герметичной упаковке при 5-25 °С составляет не менее 12 месяцев.

Таблица 6.17 – Показатели качества биопрепаратов ДЗР и ППН

Показатель	Метод контроля	Норма для ДЗР	Норма для ППН
Внешний вид	Органолептически	Сыпучий порошок от белого до светло-коричневого цвета	Сыпучий порошок от бежевого до светло-коричневого цвета
Запах	Органолептически	Специфический, без посторонних запахов	Специфический, без посторонних запахов
Массовая доля влаги, %	ОФС.1.5.3.0007.15	≤ 5,0	≤ 5,0
Массовая доля золы, %	ОФС.1.2.2.2.0013.15	≤ 15,0	≤ 20,0
Поверхностное натяжение 1 % водного раствора, мН/м	Тензиометрия (метод Де Нюи)	≤ 30	≤ 30
Эмульгирующая активность Е24, %	[200,201]	≥ 50	≥ 70
Содержание активного биосурфактанта, %	Гравиметрия + ТСХ	≥ 2,5	≥ 1,5
Микробиологическая чистота:			
- КМАФАнМ, КОЕ/г, не более	ОФС.1.2.4.0002.18	1×10^3	1×10^3
- Дрожжи и плесени, КОЕ/г, не более	ОФС.1.2.4.0002.18	1×10^2	1×10^2
- Бактерии группы кишечной палочки в 1 г	ОФС.1.2.4.0002.18	Отсутствие	Отсутствие
Срок годности, мес. (в герметичной упаковке при 5-25 °С)	-	≥ 12	≥ 12

6.6 Технико-экономическое обоснование разработанных биотехнологий получения биопрепаратов ДЗР и ППН

В настоящей главе представлены результаты технико-экономического анализа разработанных биотехнологий. Оценка проведена для пилотного производства с тремя ферментёрами объёмом 3000 л каждый, работающими в режиме последовательной загрузки. Рассчитаны капитальные затраты (CAPEX), эксплуатационные расходы (OPEX), себестоимость единицы продукции, показатели прибыли и рентабельности, а также срок окупаемости. Дополнительно проанализированы региональные потребности и обоснованы перспективы масштабирования. Расчёты выполнены в соответствии с методическими подходами, принятыми в биотехнологической промышленности [183,184,189,190].

6.6.1 Режим работы проектируемого производства

Производство организовано по непрерывному круглосуточному графику. Эффективный фонд рабочего времени:

Тэф=365-25(ремонт)-10(остановки)=330 дней.

Продолжительность полного производственного цикла составляет 36 ч для биопрепарата ДЗР и 48 ч для ППН. В это время включены все стадии: подготовка и стерилизация питательной среды, наращивание инокулята, основная ферментация (24 ч для *B. mojavensis* и 36 ч для *P. putida*), сепарация культуральной жидкости, выделение и сушка КОФ, а также CIP-мойка ферментёра и вспомогательных линий. При трех ферментерах со сдвигом фаз число циклов в год составляет: для биопрепарата ДЗР – 220 циклов на один аппарат (660 суммарно), для биопрепарата ППН – 165 циклов на один аппарат (495 суммарно). Поскольку каждый ферментёр в рамках одного производственного цикла может выпускать только один продукт, далее рассматриваются два альтернативных сценария загрузки производства. Так,

сценарий А (производство биопрепарата ДЗР): все три ферментёра в течение года загружены культурой *B. mojavensis* P1709; годовая производительность – 5,5 т. И сценарий Б (производство биопрепарата ППН): все три ферментёра в течение года загружены культурой *P. putida* PP021; годовая производительность – 7,7 т. Технико-экономические показатели, приведённые ниже, рассчитаны отдельно для каждого сценария и не суммируются.

В таблице 6.18 приведены показатели для двух альтернативных сценариев загрузки производства. Годовая производительность:

Биопрепарат ДЗР = 8,4*660 = 5544 кг = 5,5 т,

Биопрепарат ППН = 15,6*495 = 7722 кг = 7,7 т.

Таблица 6.18 – Режим работы и производительность

Показатель	ДЗР	ППН
Режим работы, дней/год	330	330
Эффективный фонд, ч/год	7920	7920
Продолжительность полного цикла, ч	36	48
Циклов на 1 ферментёр в год	220	165
Количество ферментёров	3	3
Суммарно циклов в год	660	495
Выход КОФ за цикл, кг	8,4	15,6
Годовая производительность, т	5,5	7,7

Таким образом, при полной загрузке под каждый продукт производство обеспечивает выпуск 5,5 т биопрепарата ДЗР (сценарий А) или 7,7 т биопрепарата ППН (сценарий Б).

6.6.2 Капитальные затраты

Капитальные вложения включают стоимость основного и вспомогательного оборудования, его доставку, монтаж, а также реконструкцию помещений и коммуникаций. На основе подобранного комплекта оборудования (таблица 6.15) общая стоимость оборудования составляет 48,3 млн руб., в том числе три основных биореактора объёмом 3000 л каждый – 21,2 млн руб., или 7,07 млн руб. за единицу.

Столь низкая по сравнению с европейскими и американскими аналогами стоимость биореакторов обусловлена их производством китайской компанией BAILUN BIO. Цены китайских производителей биотехнологического оборудования в 2-3 раза ниже, чем у Bioengineering (Швейцария), Sartorius (Германия) или Applikon (Нидерланды), что связано с крупносерийным производством, низкой стоимостью рабочей силы и металла, а также агрессивной экспортной политикой на рынке биотехнологического оборудования. По коммерческим предложениям производителя, стоимость реактора объёмом 3000 л из нержавеющей стали 316L с CIP/SIP-системой и ПЛК-управлением составляет (программируемый логический контроллер) около 7 млн руб., что соответствует принятой в расчётах цифре. Оборудование BAILUN BIO соответствует требованиям ГОСТ Р 56639-2015 и имеет сертификаты CE и ISO 9001, что подтверждает его пригодность для биотехнологических производств.

С учётом доставки (5 %), монтажа (20 %) и непредвиденных расходов (10 %) капитальные вложения в оборудование составляют 66,9 млн руб [357]. Затраты на реконструкцию помещений и коммуникации – 7,2 млн руб. Итого, CAPEX = 74,1 млн руб. Амортизация (линейный метод, срок полезного использования 10 лет) составит 7,41 млн руб./год.

Приведённая оценка CAPEX соответствует полному циклу создания пилотного производства без учёта мер государственной поддержки. Вместе с тем разрабатываемая биотехнология относится к приоритетным направлениям

импортозамещения и «зелёной» экономики, что открывает доступ к следующим инструментам государственной поддержки:

1. Льготные займы Фонда развития промышленности по программам «Проекты развития» и «Проекты лесной промышленности» – от 3 % до 5 % годовых сроком до 7 лет, что снижает стоимость заёмного финансирования в 3–5 раз по сравнению с коммерческими кредитами (15–20 %) [358].

2. Субсидии Минпромторга России на компенсацию части затрат на создание импортозамещающих производств (постановления Правительства РФ № 1649 и № 208) – до 30 % капитальных затрат.

3. Субсидии Минсельхоза России на производство биологических средств защиты растений (в рамках Федеральной научно-технической программы развития сельского хозяйства на 2017-2030 гг. – компенсация до 50 % затрат на НИОКР и до 30 % затрат на организацию производства.

4. Налоговые льготы для биотехнологических производств, включённых в перечень приоритетных инвестиционных проектов: ставка налога на прибыль 0 % в первые 5 лет, пониженные тарифы страховых взносов (7,6 % вместо 30 %).

С учётом комплекса этих мер эффективная стоимость CAPEX для инициатора проекта снижается до 50-60 млн руб., а срок окупаемости пилотного производства сокращается до 3-4 лет, что соответствует нормативам для инновационных биотехнологических проектов на стадии масштабирования.

6.6.3 Расчёт численности и фонда оплаты труда персонала

Баланс рабочего времени одного среднесписочного рабочего рассчитан по нормативам [184,185] и представлен в таблице 6.19.

Как видно из таблицы 6.20, эффективный фонд рабочего времени одного среднесписочного рабочего составляет 258 дней, или 6192 ч, что соответствует непрерывному трёхсменному графику работы производства.

Таблица 6.19 – Баланс рабочего времени одного среднесписочного рабочего

Показатель	Значение
Календарный фонд, дней	365
Выходные по графику сменности, дней	71
Номинальный фонд, дней	294
Очередной отпуск, дней	28
Прочие невыходы, дней	8
Эффективный фонд, дней	258
Эффективный фонд, ч	6192

На основе рассчитанного баланса рабочего времени и норм обслуживания оборудования сформировано штатное расписание пилотного производства. Численность персонала определена с учётом трёхсменной работы трёх ферментёров, обслуживания линии выделения КОФ и вспомогательных систем. Фонд оплаты труда персонала (ФОТ) представлен в таблице 6.20.

Таблица 6.20 – Фонд оплаты труда персонала

Категория	Численность, чел.	Средний оклад, тыс. руб./мес.	Годовой ФОТ, тыс. руб.
Основные производственные рабочие	6	60	4320
Вспомогательные рабочие	2	50	1200
Инженерно-технические работники	3	80	2880
Административно-управленческий персонал	2	100	2400
Итого	13	–	10800
Страховые взносы (30 %)	–	–	3240
Всего ФОТ с отчислениями			14040

Как следует из таблицы 6.20, общая численность персонала пилотного производства составляет 13 человек. Годовой фонд оплаты труда с учётом страховых взносов (30 %) составляет 14 040 тыс. руб. Удельные затраты на оплату труда в пересчёте на 1 кг готовой продукции составляют 14 040 000 / 13 266 = 1 058,3 руб./кг и одинаковы для биопрепарата ДЗР и ППН при распределении по массе выпуска.

6.6.4 Расчёт стоимости сырья, материалов и энергоресурсов

На основании материального баланса и средних рыночных цен (2026 г.) рассчитаны затраты на сырьё и энергоресурсы (таблица 6.21, 6.22). Транспортно-заготовительные расходы составляют 20 % от стоимости сырья.

Таблица 6.21 – Количество и стоимость сырья для выпуска 1 кг готового продукта

Наименование сырья	Продукт	Цена, руб./кг	Норма расхода на 1 кг КОФ, кг	Стоимость, руб./кг
Меласса свекольная	ДЗР	8	7,14	57,1
Гидролизат рыбной муки	ДЗР	120	1,19	142,8
$MgSO_4*7H_2O$	ДЗР	25	0,238	6,0
2М HCl	ДЗР	20	1,85	37,0
NaOH	ДЗР	30	0,057	1,7
			Итого сырьё для ДЗР	244,6
ТЗР (20 %)	ДЗР	-	-	+48,9
			Всего с ТЗР для ДЗР	293,5
Отработанное растительное масло	ППН	15	2,56	38,4
$NaNO_3$	ППН	60	0,385	23,1
KH_2PO_4	ППН	80	0,128	10,2
$MgSO_4*7H_2O$	ППН	25	0,064	1,6
$FeSO_4*7H_2O$	ППН	45	0,0064	0,3
2М HCl	ППН	20	1,32	26,4
NaOH	ППН	30	0,038	1,1
			Итого сырье для ППН	101,1
ТЗР (20 %)	ППН	-	-	+20,2
			Всего с ТЗР для ППН	121,3

Таблица 6.22 – Расчёт количества и стоимости воды и электроэнергии

Параметр	Ед. изм.	Годовое потребление	Тариф, руб.	Годовая стоимость, тыс. руб.	Удельные затраты, руб./кг
Вода технологическая	$м^3$	1871	25	46,8	3,5
Электроэнергия	кВт*ч	15 598	5	78,0	5,9
Пар	Гкал	363	1800	653,4	49,3
			Итого:	778,2	58,7

Как следует из таблиц 6.21 и 6.22, суммарные затраты на сырьё с учётом транспортно-заготовительных расходов составляют 293,5 руб./кг для биопрепарата ДЗР и 121,3 руб./кг для биопрепарата ППН, а суммарные удельные энергозатраты – 58,7 руб./кг для обоих препаратов.В структуре сырьевых затрат для биопрепарата ДЗР преобладает гидролизат рыбной муки (142,8 руб./кг, или 48,7 %), тогда как для биопрепарата ППН основную долю формируют отработанное растительное масло (38,4 руб./кг, или 31,7 %) и нитрат натрия (23,1 руб./кг, или 19,0 %). Различия обусловлены составом питательных сред для разных штаммов-продуцентов. В структуре энергозатрат преобладает пар (49,3 руб./кг, или 84,0 %), что связано с необходимостью стерилизации питательных сред и работы распылительной сушилки. Затраты на электроэнергию и воду существенно ниже и составляют 5,9 и 3,5 руб./кг соответственно. Удельные энергозатраты одинаковы для ДЗР и ППН при распределении по массе выпуска.

6.6.5 Смета затрат и калькуляция себестоимости продукции

Общепроизводственные расходы (таблица 6.23) включают амортизацию, ремонт, зарплату вспомогательных рабочих. Общехозяйственные расходы (таблица 6.24) – аренду, содержание зданий, охрану труда.

Таблица 6.23 – Смета общепроизводственных расходов

Статья затрат	Сумма, тыс. руб./год
Амортизация оборудования	7 410
Зарплата вспомогательных рабочих	1 200
Страховые взносы (30 %)	360
Ремонт оборудования (5 % от 48,3 млн)	2 415
Прочие производственные расходы (20 %)	2 277
Итого	13 662

Таблица 6.24 – Смета общехозяйственных расходов

Статья затрат	Сумма, тыс. руб./год
Аренда помещений (280 м² × 0,2 тыс. руб./м² × 12)	672
Текущий ремонт зданий (1 %)	72
Капитальный ремонт зданий (2 %)	144
Содержание зданий (4 %)	288
Амортизация зданий (2,5 %)	180
Охрана труда	200
Прочие общехозяйственные (10 %)	156
Итого	1 712

Как следует из таблиц 6.23 и 6.24, суммарные общепроизводственные расходы составляют 13 662 тыс. руб./год, общехозяйственные – 1 712 тыс. руб./год.

В структуре общепроизводственных расходов основную долю формируют амортизация оборудования (7 410 тыс. руб./год, или 54,2 %), ремонт оборудования (2 415 тыс. руб./год, или 17,7 %) и прочие производственные расходы (2 277 тыс. руб./год, или 16,7 %). В структуре общехозяйственных

расходов преобладают аренда помещений (672 тыс. руб./год, или 39,3 %) и содержание зданий (288 тыс. руб./год, или 16,8 %). Удельные общепроизводственные и общехозяйственные расходы в пересчёте на 1 кг продукции составляют 1 029,8 и 129,1 руб./кг соответственно и одинаковы для биопрепаратов ДЗР и ППН при распределении по массе выпуска.

Калькуляция себестоимости 1 кг готового продукта (таблица 6.25) выполнена с учётом компенсации от реализации побочных продуктов. Для биопрепарата ДЗР компенсация от реализации биомассы составляет 118,8 т/год*22 руб./кг = 2 613,6 тыс. руб./год (471,4 руб./кг). Для биопрепарата ППН компенсация от реализации биомассы составляет 89,1 т/год*22 руб./кг = 1 960,2 тыс. руб./год (253,8 руб./кг), от реализации масляной фракции – 12,375 т/год*11 руб./кг = 136,1 тыс. руб./год (10,3 руб./кг).

Принятые цены реализации побочных продуктов (22 руб./кг для биомассы и 11 руб./кг для масляной фракции) обоснованы тем, что биомасса *B. mojavensis* обладает фосфатмобилизующей, азотфиксирующей и ростстимулирующей активностью и соответствует по потребительским свойствам биоудобрениям с рыночной ценой 20-50 руб./кг, тогда как отработанное растительное масло реализуется как техническое по цене 10-15 руб./кг.

Как следует из таблицы 6.26, полная себестоимость 1 кг биопрепарата до компенсации от реализации побочных продуктов составляет 2 633,6 руб. для ДЗР и 2 457,1 руб. для ППН. С учётом компенсации от реализации биомассы (471,4 руб./кг для ДЗР, 253,8 руб./кг для ППН) и масляной фракции (10,3 руб./кг для ППН) итоговая себестоимость составляет 2 162,2 руб./кг для ДЗР и 2 193,0 руб./кг для ППН. Основную долю в структуре себестоимости занимают затраты на оплату труда (1 058,3 руб./кг, или 48,9 % для ДЗР и 48,3 % для ППН) и общепроизводственные расходы (1 029,8 руб./кг, или 47,6 % для ДЗР и 47,0 % для ППН). Материальные затраты и общехозяйственные расходы формируют меньшую часть себестоимости.

Таблица 6.25 – Калькуляция себестоимости 1 кг биопрепаратов (пилотный масштаб)

Статья затрат	Биопрепарат	
	ДЗР, руб./кг	ППН, руб./кг
I. Материальные затраты		
Сырье и материалы (с ТЗР)	293,5	121,3
Энергоресурсы	58,7	58,7
Итого по статье I	352,2	180,0
II. Затраты на оплату труда		
Заработная плата с отчислениями	1 058,3	1 058,3
Итого по статье II	1 058,3	1 058,3
III. Общепроизводственные расходы	1 029,8	1 029,8
IV. Общехозяйственные расходы	129,1	129,1
V. Фабрично-заводская себестоимость	2 569,4	2 397,2
Внепроизводственные расходы (2,5 %)	64,2	59,9
VI. Полная себестоимость	2 633,6	2 457,1
Компенсация от реализации биомассы	-471,4	-253,8
Компенсация от масляной фракции	-	-10,3
Итоговая себестоимость	2 162,2	2 193,0

6.6.6 Расчёт экономической эффективности

Экономическая эффективность проекта оценена исходя из отпускной цены 3500 руб./кг, принятой по среднерыночным ценам для аналогичных биопрепаратов. Полная себестоимость годового выпуска определена в разделе 6.6.5 и составляет 2 162,2 руб./кг для бипрепарата ДЗР и 2 193,0 руб./кг для

биопрепарата ППН. Финансовые результаты проектируемого производства представлены в таблице 6.26.

Таблица 6.26 – Финансовые результаты проектируемого производства

Показатель	Биопрепарат ДЗР	Биопрепарат ППН
Годовой выпуск, т	5,5	7,7
Выручка (при 3500 руб./кг), млн руб.	19,40	27,03
Полная себестоимость, млн руб.	11,99	16,93
Валовая прибыль, млн руб.	7,41	10,10
Налог на прибыль (20 %), млн руб.	1,48	2,02
Чистая прибыль, млн руб.	5,93	8,08
Рентабельность, %	49,5	47,7

Как следует из таблицы 6.26, годовая выручка от реализации биопрепарата ДЗР составляет 19,40 млн руб., от реализации биопрепарата ППН – 27,03 млн руб. Полная себестоимость годового выпуска составляет 11,99 млн руб. для биопрепарата ДЗР и 16,93 млн руб. для биопрепарата ППН. Валовая прибыль составляет 7,41 млн руб. для биопрепарата ДЗР и 10,10 млн руб. для биопрепарата ППН. После уплаты налога на прибыль по ставке 20 % чистая прибыль составляет 5,93 млн руб. для биопрепарата ДЗР и 8,08 млн руб. для биопрепарата ППН. Рентабельность рассчитана как отношение чистой прибыли к полной себестоимости продукции и составляет 49,5 % для биопрепарата ДЗР и 47,7 % для биопрепарата ППН.

Производство является универсальным и может работать в смешанном режиме, переключаясь между выпуском ДЗР и ППН. При суммарной чистой прибыли 14,01 млн руб./год и капитальных вложениях 74,1 млн руб. средневзвешенный срок окупаемости составляет 5,3 года.

6.6.7 Сравнение с коммерческими аналогами и оценка региональных потребностей

Сравнение с аналогами. Синтетический ПАВ Неонол АФ 9-12 стоит 300-400 руб./кг, но его экотоксичность (EC50 15 мг/л) в 13 раз выше, чем у биопрепарата ППН (EC_{50} 195 мг/л), а биоразлагаемость практически отсутствует. При рабочей концентрации биопрепарата ППН 0,4 % (4 г/л) стоимость приготовления 1 $м^3$ рабочего раствора составляет 14 000 руб. С учётом разбавления в пласте (1 $м^3$ раствора на 1000-10 000 $м^3$ пластовой воды) удельные затраты на обработку составляют 1,4-14 руб./$м^3$, что в нижней границе диапазона сопоставимо с Неонолом АФ 9-12 (1,5-2,0 руб./$м^3$).

Затраты на послеуборочную обработку биопрепаратом ДЗР 1 т томатов составляют 280 руб. (0,08 кг * 3500 руб./кг), что сопоставимо с химическими фунгицидами (100-300 руб./т), но не требует периода ожидания.

В пересчёте на 1 кг готового препарата себестоимость биопрепаратов ДЗР и ППН (2162-2193 руб./кг) значительно ниже коммерческих очищенных биосурфактантов (сурфактин Sigma-Aldrich - 4000-8000 руб./кг, рамнолипиды - до 400 000 руб./кг), поскольку препараты представляют собой неочищенные концентраты биосурфактантов, а не индивидуальные вещества.

Региональные потребности. Годовая добыча нефти в РТ – около 35 млн т, эксплуатационный фонд скважин – 45 тыс. (30 % трудноизвлекаемые). При рабочей концентрации ППН 0,4 % расход на одну обработку скважины – 0,8-4,0 т. Пилотный выпуск 7,7 т/год позволяет обработать 2-8 скважин, что составляет менее 0,01 % от потенциальной потребности. Валовый сбор томатов в Поволжье составляет 120 тыс. т/год, обработка 1 т требует 0,08 кг биопрепарата ДЗР. Пилотный выпуск 5,5 т/год позволяет обработать 69 тыс. т томатов, что покрывает около 57 % региональных потребностей в послеуборочной защите.

Перспективы масштабирования. При переходе на ферментёры объемом 10-15 $м^3$ себестоимость снижается до 250-350 руб./кг, срок окупаемости сокращается до 2 лет. Годовой выпуск биопрепарата ППН может достигнуть 100-

150 т, биопрепарата ДЗР – 80-100 т, что позволит охватить 5-10 % рынка экологичных реагентов в регионе.

Технико-экономический анализ подтверждает конкурентоспособность разработанных биотехнологий. При пилотном масштабе себестоимость биопрепарата ДЗР составляет 2162 руб./кг, биопрепарата ППН – 2193 руб./кг, рентабельность – 48-50 %, средневзвешенный срок окупаемости – 5,3 года. Масштабирование позволяет снизить себестоимость до 250-350 руб./кг и сократить окупаемость до 2 лет. Разработанные биопрепараты являются экологически безопасной альтернативой синтетическим ПАВ и фунгицидам, что делает их перспективными для внедрения в агропромышленном и нефтегазовом комплексах России.

Следует подчеркнуть, что экономические показатели пилотного производства (себестоимость 2162-2193 руб./кг, окупаемость 5,3 года) отражают специфику начального этапа коммерциализации. При использовании мер государственной поддержки (ФРП, субсидии Минпромторга и Минсельхоза, налоговые льготы) эффективный срок окупаемости сокращается до 3-4 лет. При переходе к промышленному масштабу (ферментеры объёмом 10-15 $м^3$) удельные постоянные затраты снижаются в 3-5 раз за счёт эффекта масштаба, что обеспечивает снижение себестоимости до 250-350 руб./кг и сокращение срока окупаемости до 2 лет при сохранении текущей отпускной цены. Именно пилотное производство является инструментом валидации технологии и обоснования перехода к промышленному масштабу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе реализован комплексный подход к разработке биотехнологий получения бактериальных препаратов на основе биосурфактантов, охватывающий полный цикл: от скрининга аборигенных штаммов-продуцентов до технико-экономического обоснования промышленного масштабирования. Отобраны три перспективных штамма, синтезирующих липопептиды и рамнолипиды, изучено влияние условий культивирования на их продуктивность, охарактеризованы физико-химические свойства и биобезопасность целевых метаболитов. Показана эффективность липопептидов для биоконтроля фитопатогенов и повышения сохранности плодов томатов, а рамнолипидов – для увеличения нефтеотдачи пластов. Разработаны принципиальные технологические схемы, рассчитаны материальные балансы и проведена технико-экономическая оценка получения двух биопрепаратов.

На основании проведенных исследований сделаны следующие **выводы**:

1. В результате скрининга 63 изолятов, выделенных из образцов нефтезагрязненной и ризосферной почвы, были определены три наиболее эффективных штамма-продуцента биосурфактантов, идентифицированные как *B. mojavensis* P1709, *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021. Показатели эмульгирующей активности (E24) для этих штаммов составили 61 %, 75 % и 81 %, а индекс снижения поверхностного натяжения (ПН) – 28,3 мН/м, 29,5 мН/м и 27,1 мН/м, соответственно. Установлено, что геном *B. mojavensis* P1709 включает гены, кодирующие синтез фенгицинов (ген *fenD*) и сурфактинов (гены *srfAA* и *srfA3*). Геномы *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 содержат гены *rhlB* и *rhlC*, кодирующие синтез моно- и дирамнолипидов соответственно.

2. Установлено, что состав питательной среды, содержащей глюкозу, гексадекан или глицерин в качестве единственного источника углерода, оказывает влияние на ростовые характеристики и биосурфактационную активность культивируемых в ней штаммов. С точки зрения эффективности

биосинтеза биосурфактантов, наиболее предпочтительной для штамма *B. mojavensis* P1709 является среда с глюкозой (2 % масс.) (E24 = 61 %, ПН = 28,3 мН/м), а для штаммов *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021 – глицерин-нитратная среда (E24 = 80 % и 85 % и ПН = 28 и 29 мН/м, соответственно). Оптимальным временем культивирования для всех трех штаммов является диапазон 24-36 ч: в течение этого времени кривые роста выходят на плато с оптическими плотностями 1,1-1,2 опт. ед., а значения ПН достигают минимальных (24 мН/м для *P. fluorescens* PCS-20 и *B. mojavensis* P1709) или близких к минимальным значениям (32,2 мН/м для штамма *P. putida* PP021).

3. Экотоксичность биосурфактантов по отношению к *C. affinis*, оцененная на основании EC50, составила 195, 310 и 170 мг/л, а биоразлагаемость гетеротрофным микробным сообществом в течение 10 сут – 58 %, 60 % и 64 % для *P. putida* PP021, *P. fluorescens* PCS-20 и *B. mojavensis* P1709 соответственно, что свидетельствует о меньшей экологической опасности биосурфактантов в сравнении с химически синтезированными ПАВ. Методами ИК-Фурье спектроскопии и тонкослойной хроматографии установлено, что *B. mojavensis* P1709 производит липопептиды (сурфактины и фенгицины), а *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021 – рамнолипиды.

4. КОФ *B. mojavensis* P1709 в концентрации 10 г/л подавляет рост F. oxysporum на 93 %, снижает содержание микотоксинов Т-2 и НТ-2 на 95 % и повышает хранимоспособность плодов томатов черри в 5 раз за счёт активации защитных ферментов. Препарат рекомендован для послеуборочной защиты плодов.

5. Очищенный препарат рамнолипидов *P. fluorescens* PCS-20 обеспечил дополнительное извлечение нефти на уровне 28 % и 31 % в рабочих концентрациях 0,1 и 0,5 % в модельной системе с песчаными колонками, что сопоставимо по эффективности с химически синтезированным ПАВ. Препарат на основе кислотно осажденной фракции культуральной жидкости *P. putida* PP021 приводил к дополнительному извлечению нефти в модельной системе с песчаными колонками на 48 %, а в системе с керном – на 21 %, что сопоставимо

по эффективности с очищенным препаратом *P. fluorescens* PCS-20 в рабочих концентрациях. С учетом показателей экологической безопасности обоих видов рамнолипидов, они могут быть рекомендованы для использования в технологиях повышения нефтеотдачи, как в очищенном, так и в виде кислотноосажденной фракции культуральной жидкости.

6. Разработаны биотехнологии получения биопрепаратов ДЗР на основе B. *mojavensis* P1709 и ППН на основе *P. putida* PP021. Товарная форма – КОФ с содержанием активного биосурфактанта 3,0 % для биопрепарата ДЗР и 2,0 % для биопрепарата ППН. Капитальные вложения составляют 74,1 млн руб. при сроке окупаемости – 5,3 года, себестоимость – 2 162 руб./кг и 2 193 руб./кг, годовая производительность – 5,5 и 7,7 т, для биопрепаратов ДЗР и ППН, соответсвенно. Биопрепараты являются экологически безопасной альтернативой синтетическим ПАВ и фунгицидам.

Перспективы дальнейших исследований связаны с масштабированием разработанных технологий до промышленного уровня и оптимизацией режимов непрерывного культивирования. Приоритетными задачами являются расширение спектра региональных субстратов, повышение стабильности товарных форм биопрепаратов и разработка нормативной документации для их регистрации. Целесообразно проведение полевых испытаний биопрепарата ДЗР в условиях реальных агроценозов и опытно-промышленных испытаний биопрепарата ППН на месторождениях с трудноизвлекаемыми запасами нефти.

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ПАВ – поверхностно-активные вещества

dTDP-L-рамноза – дезокситимидиндифосфат-L-рамноза

HAA – димеры β-гидроксижирных кислот

PP pathway – пентозофосфатный путь (pentose phosphate pathway)

КЖ – культуральная жидкость

ООН – Организация Объединённых Наций

ESG – Environmental, Social and Governance – экологические, социальные и управленческие критерии

ММУН – микробные методы увеличения нефтеотдачи

ККМ – критическая концентрация мицеллообразования

ПАУ – полициклические ароматические углеводороды

АТФ – аденозинтрифосфат (аденозинтрифосфорная кислота)

Е24 – индекс эмульгирования через 24 часа

КОФ – кислотоосаждённая фракция

EC_{50} – концентрация токсиканта в воде, вызывающая изменение тест-реакции тест-объектов на 50 % при установленных условиях экспозиции в течение заданного срока наблюдений

SARS-CoV-2 - Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 – коронавирус 2, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром (возбудитель COVID-19).

TNF-α – Tumor Necrosis Factor Alpha – фактор некроза опухоли альфа (ФНО-α)

IL-6 – Interleukin 6 – интерлейкин-6 (ИЛ-6)

EFSA – Европейское агентство по безопасности пищевых продуктов (European Food Safety Authority)

FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration)

CAPEX – капитальные затраты (capital expenditures)

OPEX – операционные затраты (operating expenditures)

ТСХ – тонкослойная хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

MWCO – номинальная граница отсечения по молекулярной массе (molecular weight cut-off)

УФ – ультрафиолетовый

ИК – инфракрасная спектроскопия

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

МС – масс-спектрометрия

FTIR – инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение

КОФ КЖ – кислотно-осаждённая фракция культуральной жидкости

LB – среда Лурия – Бертани (Luria–Bertani)

MALDI-TOF MS – масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролётным анализатором

ПЦР – полимеразная цепная реакция

NCBI – Национальный центр биотехнологической информации США

OECD – Организация экономического сотрудничества и развития

БПК – биохимическая потребность в кислороде

ТПК – теоретическая потребность в кислороде

ПН – поверхностное натяжение

Rf – коэффициент удерживания в тонкослойной хроматографии

ОТ-ПЦР – ПЦР с обратной транскрипцией

ПВХ – поливинилхлорид

ППН – биопрепарат для увеличения нефтеотдачи

УИПК – установка исследования проницаемости кернов

PV – поровый объем

OOIP (Original Oil in Place) – начальные запасы нефти

Sor (Residual Oil Saturation) – остаточная нефтенасыщенность

AOR (Additional Oil Recovery) – дополнительная нефтеотдача

Vтретичная – объём нефти, извлечённый после закачки реагента

Vостаточная – объём нефти, остававшийся в модели после стадии вторичного вытеснения

КНР – Китайская Народная Республика

OD600 – оптическая плотность при длине волны 600 нм

ДЗР – биопрепарат для защиты растений

EC50 – эффективная концентрация, вызывающая 50%-ный эффект

БС – биосурфактанты

Soi – начальная нефтенасыщенность

Sorwf – остаточная нефтенасыщенность после вторичного вытеснения

CIP – очистка оборудования без разборки (cleaning in place)

SIP – стерилизация оборудования без разборки (sterilization in place)

ПЛК – программируемый логический контроллер

VVM – объём воздуха, подаваемого за минуту, на единицу объёма культуральной жидкости

КОЕ – колониеобразующая единица

ФОТ – фонд оплаты труда

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Markande, A.R. A review on biosurfactants: properties, applications and current developments / A.R. Markande, D. Patel, S. Varjani // Bioresource Technology. – 2021. – V. 330. – P. 124963.

2. Karlapudi, A.P. Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review / A.P. Karlapudi, et al. // Petroleum. – 2018. – V. 4. – № 3. – P. 241-249.

3. Santos, D.K.F. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century / D.K.F. Santos, et al. // Int J Mol Sci. – 2016. – V. 17. – № 3. – P. 401.

4. Araújo S. C. da, S. MBSP1: a biosurfactant protein derived from a metagenomic library with activity in oil degradation / S. Araújo S. C. da, et al. // Sci Rep. – 2020. – V. 10. – № 1. – P. 1340.

5. Grace, A. Pseudomonas aeruginosa reference strains PAO1 and PA14: A genomic, phenotypic, and therapeutic review / A. Grace, et al. // Front. Microbiol. – 2022. – V. 13. – DOI: 10.3389/fmicb.2022.1023523.

6. Shaikh, S. Interactive potential of Pseudomonas species with plants / S. Shaikh, N. Yadav, A.R. Markande // Journal of Applied Biology and Biotechnology. – 2020. – V. 8. – № 6. – P. 101-111.

7. Silby, M.W. Pseudomonas genomes: diverse and adaptable / M.W. Silby, et al. // FEMS Microbiol Rev. – 2011. – V. 35. – № 4. – P. 652-680.

8. Wang, S. Coordination of Swarming Motility, Biosurfactant Synthesis, and Biofilm Matrix Exopolysaccharide Production in Pseudomonas aeruginosa / S. Wang, et al. // Appl Environ Microbiol. – 2014. – V. 80. – № 21. – P. 6724-6732.

9. Joardar, V. Whole-Genome Sequence Analysis of Pseudomonas syringae pv. phaseolicola 1448A Reveals Divergence among Pathovars in Genes Involved in Virulence and Transposition / V. Joardar, et al. // J Bacteriol. – 2005. – V. 187. – № 18. – P. 6488-6498.

10. Wang, Y. Plant growth-promoting bacteria in metal-contaminated soil: Current perspectives on remediation mechanisms / Y. Wang, et al. // Front. Microbiol. – 2022. – V. 13. – P. 966226.

11. Valenzuela Ruiz, V. Regulation, Biosynthesis, and Extraction of Bacillus-Derived Lipopeptides and Its Implications in Biological Control of Phytopathogens / V. Valenzuela Ruiz, et al. // Stresses. – 2024. – V. 4. – № 1. – P. 107-132.

12. Kröber, M. Effect of the strain Bacillus amyloliquefaciens FZB42 on the microbial community in the rhizosphere of lettuce under field conditions analyzed by whole metagenome sequencing / M. Kröber, et al. // Front Microbiol. – 2014. – V. 5. – P. 252.

13. Liu, Q. Production of surfactin isoforms by Bacillus subtilis BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions / Q. Liu, et al. // Biochemical Engineering Journal. – 2015. – V. 93. – P. 31-37.

14. de Oliveira Silva, Y.R. Copper acquisition in Bacillus subtilis involves Cu(II) exchange between YcnI and YcnJ / Y.R. de Oliveira Silva, et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2025. – V. 301. – № 8. – P. 110480.

15. Sharuddin, S.S.N. Potential bifunctional rhizobacteria from crude oil sludge for hydrocarbon degradation and biosurfactant production / S.S.N. Sharuddin, et al. // Process Safety and Environmental Protection. – 2021. – V. 155. – P. 108-121.

16. Serrano, L. Biosurfactants synthesized by endophytic Bacillus strains as control of Moniliophthora perniciosa and Moniliophthora roreri / L. Serrano, et al. // Scientia Agricola. – 2021. – V. 78. – № Supl. 1. – P. e20200172–e20200172.

17. Ashitha, A. Characterization of biosurfactant produced by the endophyte Burkholderia sp. WYAT7 and evaluation of its antibacterial and antibiofilm potentials / A. Ashitha, E.A. Radhakrishnan, M. Jyothis // Journal of Biotechnology. – 2020. – V. 313. – P. 1-10.

18. Feng, N.-X. Efficient phytoremediation of organic contaminants in soils using plant–endophyte partnerships / N.-X. Feng, et al. // Science of The Total Environment. – 2017. – V. 583. – P. 352-368.

19. Shameer, S. Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses / S. Shameer, T.N.V.K.V. Prasad // Plant Growth Regul. – 2018. – V. 84. – № 3. – P. 603-615.

20. Sreedharan, S.M. Microbial lipopeptides: Properties, mechanics and engineering for novel lipopeptides / S.M. Sreedharan, N. Rishi, R. Singh // Microbiological Research. – 2023. – V. 271. – P. 127363.

21. Silva, M.E.T. Biosurfactant production of Piper hispidum endophytic fungi / M.E.T. Silva, et al. // Journal of Applied Microbiology. – 2021. – V. 130. – № 2. – P. 561-569.

22. Günther, M. Fungal Glycolipids as Biosurfactants / M. Günther, S. Zibek, S. Rupp // Current Biotechnology. Bentham Science Publishers, 2017. – V. 6. – № 3. – P. 205-218.

23. da Silva, A.F. Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications / A.F. da Silva, et al. // Bioprocess Biosyst Eng. – 2021. – V. 44. – № 10. – P. 2003-2034.

24. Zhang, X. Diesel degradation potential of endophytic bacteria isolated from Scirpus triqueter / X. Zhang, et al. // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2014. – V. 87. – P. 99-105.

25. Eslami, P. Recent advancements in the production of rhamnolipid biosurfactants by Pseudomonas aeruginosa / P. Eslami, H. Hajfarajollah, S. Bazsefidpar // RSC Advances. Royal Society of Chemistry, 2020. – V. 10. – № 56. – P. 34014-34032.

26. Diaz,, P. Antibacterial activity of Bacillus licheniformis B6 against viability and biofilm formation of foodborne pathogens of health importance | Request PDF / P. Diaz,, et al. // W J Microb and Biotech. – 2022. – V. 38. – № 0.

27. Jacques, P. Surfactin and Other Lipopeptides from Bacillus spp. / P. Jacques // Biosurfactants: From Genes to Applications / под ред. Soberón-Chávez G. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011. – P. 57-91.

28. Rangarajan, V. Process development and intensification for enhanced production of Bacillus lipopeptides / V. Rangarajan, K.G. Clarke // Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. – 2015. – V. 31. – № 1-2. – P. 46-68.

29. Garg, R. Comprehensive review of the synthesis and sustainable applications of biosurfactants / R. Garg, et al. // Discov Appl Sci. – 2025. – V. 7. – № 10. – P. 1168.

30. Begum, W. A comprehensive review on production of bio-surfactants by bio-degradation of waste carbohydrate feedstocks: an approach towards sustainable development / W. Begum, B. Saha, U. Mandal // RSC Adv. – 2023. – V. 13. – № 36. – P. 25599-25615.

31. Banat, I.M. Microbial biosurfactants production, applications and future potential / I.M. Banat, et al. // Appl Microbiol Biotechnol. – 2010. – V. 87. – № 2. – P. 427-444. – DOI: 10.1007/s00253-010-2589-0.

32. Li, Z. Review in Structure–Activity Relationships, Synthetic Regulation, and Applications of Mono / Di-Rhamnolipids / Z. Li, et al. // Microorganisms. – 2026. – V. 14. – № 3. – P. 570.

33. Dobler, L. Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting / L. Dobler, et al. // New Biotechnology. – 2016. – V. 33. – № 1. – P. 123-135.

34. Sen, S. Rhamnolipid exhibits anti-biofilm activity against the dermatophytic fungi Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytes / S. Sen, et al. // Biotechnology Reports. – 2020. – V. 27. – P. e00516.

35. Liu, Y. Promoter and Enzyme Engineering Strategies to Maximize Rhamnolipid Titer in Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 / Y. Liu, et al. // Processes. – 2026. – V. 14. – № 10. – P. 1577.

36. Filbig, M. Heterologous rhamnolipid biosynthesis by P. putida KT2440–ACP dependency and the role of fatty acid metabolism / M. Filbig, et al. // Appl Environ Microbiol. – 2025. – V. 91. – P. e00930-25.

37. Tiso, T. Creating metabolic demand as an engineering strategy in Pseudomonas putida – Rhamnolipid synthesis as an example / T. Tiso, et al. // Metabolic Engineering Communications. – 2016. – V. 3. – P. 234-244.

38. Gong, Z. Foaming of rhamnolipids fermentation: impact factors and fermentation strategies / Z. Gong, et al. // Microb Cell Fact. – 2021. – V. 20. – № 1. – P. 77.

39. Jiang, J. Recent progress towards industrial rhamnolipids fermentation: Process optimization and foam control / J. Jiang, et al. // Bioresource Technology. – 2020. – V. 298. – P. 122394.

40. Soetaert W., Vandamme E. J. Industrial Biotechnology: Sustainable Growth and Economic Success. John Wiley & Sons, 2010. 524 c.

41. Campos-García, J. The Pseudomonas aeruginosa rhlG Gene Encodes an NADPH-Dependent β-Ketoacyl Reductase Which Is Specifically Involved in Rhamnolipid Synthesis | Journal of Bacteriology / J. Campos-García, et al. // J Bacteriol. – 1998. – V. 180. – № 17. – P. 4442-4451.

42. Bakonyi, P. Fermentative hydrogen production in anaerobic membrane bioreactors: a review / P. Bakonyi, N. Nemestóthy, V. Simon, K. Bélafi-Bakó // Bioresource Technology. – 2014. – V. 156. – P. 357-363. – DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.079.

43. Nitschke, M. Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on Pseudomonas-derived molecules of increasing industrial interest / M. Nitschke, S.G.V.A.O. Costa, J. Contiero // Process Biochemistry. – 2011. – V. 46. – № 3. – P. 621-630.

44. Nitschke, M. Structure and Applications of a Rhamnolipid Surfactant Produced in Soybean Oil Waste / M. Nitschke, S.G.V.A.O. Costa, J. Contiero // Appl Biochem Biotechnol. – 2010. – V. 160. – № 7. – P. 2066-2074.

45. Ramírez, I.M. Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source / I.M. Ramírez, et al. // Bioresource Technology. – 2015. – V. 198. – P. 231-236.

46. Wu, J.-Y. Rhamnolipid production with indigenous Pseudomonas aeruginosa EM1 isolated from oil-contaminated site / J.-Y. Wu, et al. // Bioresource Technology. – 2008. – V. 99. – № 5. – P. 1157-1164. – DOI: 10.1016/j.biortech.2007.02.026.

47. Kakinuma, A. Confirmation of the Structure of Surfactin by Mass Spectrometry / A. Kakinuma, et al. // Agricultural and Biological Chemistry. – 1969. – V. 33. – № 11. – P. 1669-1671.

48. Landy, M. Bacillomycin: An Antibiotic from Bacillus subtilis Active against Pathogenic Fungi∗ / M. Landy, et al. // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. SAGE Publications, 1948. – V. 67. – № 4. – P. 539-541.

49. Cooper, D.G. Enhanced Production of Surfactin from Bacillus subtilis by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions / D.G. Cooper, et al. // Applied and Environmental Microbiology. American Society for Microbiology, 1981. – V. 42. – № 3. – P. 408-412.

50. Abdel-Mawgoud, A.M. Optimization of Surfactin Production by Bacillus subtilis Isolate BS5 / A.M. Abdel-Mawgoud, M.M. Aboulwafa, N.A.-H. Hassouna // Appl Biochem Biotechnol. – 2008. – V. 150. – № 3. – P. 305-325.

51. Márquez-Villa, J.M. Optimization of Lipopeptide Biosurfactant Production by Salibacterium sp. 4CTb in Batch Stirred-Tank Bioreactors / J.M. Márquez-Villa, et al. // Microorganisms. – 2022. – V. 10. – № 5. – P. 983.

52. Dos Santos, A.S. Strategies for improved rhamnolipid production by Pseudomonas aeruginosa PA1 / A.S. Dos Santos, N. Pereira, D.M.G. Freire // PeerJ. PeerJ Inc., 2016. – V. 2016. – № 5. – P. e2078.

53. Willenbacher, J. Enhancement of Surfactin yield by improving the medium composition and fermentation process / J. Willenbacher, et al. // AMB Expr. – 2015. – V. 5. – № 1. – P. 57.

54. Bustos-Vázquez, M.G. Recent Advances in Biosurfactant Production in Solid-State Fermentation / M.G. Bustos-Vázquez, et al. // Fermentation. – 2025. – V. 11. – № 10. – P. 592.

55. Meena, K.R. Two factor at a time approach by response surface methodology to aggrandize the Bacillus subtilis KLP2015 surfactin lipopeptide to use as antifungal agent / K.R. Meena, et al. // Journal of King Saud University - Science. – 2020. – V. 32. – № 1. – P. 337-348.

56. Xia, W.-J. Synthesis, Characterization, and Oil Recovery Application of Biosurfactant Produced by Indigenous Pseudomonas aeruginosa WJ-1 Using Waste Vegetable Oils / W.-J. Xia, et al. // Appl Biochem Biotechnol. – 2012. – V. 166. – № 5. – P. 1148-1166.

57. Dias, M.A.M. Bacterial-derived surfactants: an update on general aspects and forthcoming applications / M.A.M. Dias, M. Nitschke // Brazilian Journal of Microbiology. – 2023. – V. 54, № 1. – P. 103-123. – DOI: 10.1007/s42770-023-00905-7.

58. Sundaram, T. Advancements in biosurfactant production using agro-industrial waste for industrial and environmental applications / T. Sundaram, et al. // Frontiers in Microbiology. – 2024. – V. 15. – Ст. 1357302. – DOI: 10.3389/fmicb.2024.1357302.

59. Koim-Puchowska, B. Influence of the Medium Composition and the Culture Conditions on Surfactin Biosynthesis by a Native Bacillus subtilis natto BS19 Strain / B. Koim-Puchowska, et al. // Molecules. – 2021. – V. 26. – № 10. – P. 2985.

60. Yi, G. Repeated batch fermentation for surfactin production with immobilized Bacillus subtilis BS-37: two-stage pH control and foam fractionation / G. Yi, et al. // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 2017. – V. 92. – № 3. – P. 530-535.

61. Mnif, I. Optimization of Inocula Conditions for Enhanced Biosurfactant Production by Bacillus subtilis SPB1, in Submerged Culture, Using Box–Behnken Design / I. Mnif, S. Ellouze-Chaabouni, D. Ghribi // Probiotics & Antimicro. Prot. – 2013. – V. 5. – № 2. – P. 92-98.

62. Oliveira, R.R. Surfactin and Surfactin-Like Production, Purification and Application in Marine Environments / R.R. Oliveira, et al. // Marine Surfactants. CRC Press, 2022. 38 c.

63. Banat, I.M. Biosurfactants: The green generation of speciality chemicals and potential production using Solid-State fermentation (SSF) technology / I.M. Banat, et al. // Bioresource Technology. – 2021. – V. 320. – P. 124222.

64. Martins, T.B. Effect of oxygen mass transfer coefficient (kLa) on surfactin production by Bacillus subtilis ATCC 21332 / T.B. Martins, et al. // Braz. J. Chem. Eng. – 2025. – V. 42. – № 4. – P. 1315-1326.

65. Zhen, C. Chemical structure, properties and potential applications of surfactin, as well as advanced strategies for improving its microbial production / C. Zhen, et al. // AIMSMICRO. – 2023. – V. 9. – № 2. – P. 195-217.

66. Zhi, Y. Genome and transcriptome analysis of surfactin biosynthesis in Bacillus amyloliquefaciens MT45 / Y. Zhi, Q. Wu, Y. Xu // Sci Rep. – 2017. – V. 7. – P. 40976.

67. Gudiña, E.J. Bacillus licheniformis: The unexplored alternative for the anaerobic production of lipopeptide biosurfactants? / E.J. Gudiña, J.A. Teixeira // Biotechnology Advances. – 2022. – V. 60. – P. 108013.

68. Barros, F.F.C. Production of biosurfactant by Bacillus subtilis LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate / F.F.C. Barros, A.N. Ponezi, G.M. Pastore // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2008. – V. 35. – № 9. – P. 1071-1078.

69. Anic, I. Production of rhamnolipids by integrated foam adsorption in a bioreactor system / I. Anic, et al. // AMB Expr. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 122.

70. Willenbacher, J. Evaluation of different Bacillus strains in respect of their ability to produce Surfactin in a model fermentation process with integrated foam fractionation / J. Willenbacher, et al. // Appl Microbiol Biotechnol. – 2014. – V. 98. – № 23. – P. 9623-9632.

71. Chtioui, O. Rotating discs bioreactor, a new tool for lipopeptides production / O. Chtioui, et al. // Process Biochemistry. – 2012. – V. 47. – № 12. – P. 2020-2024.

72. Coutte, F. Production of surfactin and fengycin by Bacillus subtilis in a bubbleless membrane bioreactor / F. Coutte, et al. // Appl Microbiol Biotechnol. – 2010. – V. 87. – № 2. – P. 499-507.

73. Li, Y. Anaerobic digestion of agricultural wastes from liquid to solid state: Performance and environ-economic comparison / Y. Li, et al. // Bioresource Technology. – 2021. – V. 332. – P. 125080.

74. Martínez, M. A Simplified Techno-Economic Analysis for Sophorolipid Production in a Solid-State Fermentation Process: 11 / M. Martínez, et al. // Energies. – 2022. – V. 15. – № 11. – P. 4077.

75. Bezerra, K.G.O. Saponins and microbial biosurfactants: Potential raw materials for the formulation of cosmetics / K.G.O. Bezerra, et al. // Biotechnology Progress. – 2018. – V. 34. – № 6. – P. 1482-1493.

76. Mgbechidinma, C.L. Integration of green economy concepts for sustainable biosurfactant production – A review / C.L. Mgbechidinma, et al. // Bioresource Technology. – 2022. – V. 364. – P. 128021.

77. Lebelo, K. Chapter 8 - The environmental impact of municipal solid waste and the application of biosurfactants in the bioremediation of polluted environments / K. Lebelo, M.J. Mochane // Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science / под ред. Inamuddin, Adetunji C. O. – 2021. – P. 129-161.

78. Perfumo, A. Production and Roles of Biosurfactants and Bioemulsifiers in Accessing Hydrophobic Substrates / A. Perfumo, et al. // Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer Berlin Heidelberg, 2010. – P. 1501-1512.

79. Geetha, S. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR) / S. Geetha, I.M. Banat, S.J. Joshi // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2018. – V. 14. – P. 23-32.

80. Mao, X. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review / X. Mao, et al. // Journal of Hazardous Materials. – 2015. – V. 285. – P. 419-435.

81. Edwards, J.R. Structure of a rhamnolipid from Pseudomonas aeruginosa / J.R. Edwards, J.A. Hayashi // Arch Biochem Biophys. – 1965. – V. 111. – № 2. – P. 415-421.

82. McMahon, A.M.B. The Application of Glycolipid-Type Microbial Biosurfactants as Active Pharmaceutical Ingredients for the Treatment and Prevention of Cancer / A.M.B. McMahon, et al. // Pharmaceuticals. – 2025. – V. 18. – № 5. – P. 676.

83. Melikoglu, M. Biosurfactants for enhanced oil recovery and bioremediation in the modern petroleum industry: A global review / M. Melikoglu // JCIS Open. – 2026. – V. 21. – P. 100168.

84. Puyol McKenna, P. Microbial Biosurfactants: Antimicrobial Activity and Potential Biomedical and Therapeutic Exploits / P. Puyol McKenna, et al. // Pharmaceuticals. – 2024. – V. 17. – № 1. – P. 138.

85. González-Jaramillo, L.M. Antimycotic activity of fengycin C biosurfactant and its interaction with phosphatidylcholine model membranes / L.M. González-Jaramillo, et al. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2017. – V. 156. – P. 114-122.

86. Abdoli, S. Unlocking the Potential of Biosurfactants in Agriculture: Novel Applications and Future Directions / S. Abdoli, et al. // Sustainability. – 2025. – V. 17. – № 5. – P. 2110.

87. D'aes, J. Biosurfactants in plant-Pseudomonas interactions and their importance to biocontrol / J. D'aes, et al. // Environ Microbiol Rep. – 2010. – V. 2. – № 3. – P. 359-372.

88. Fan, S. Identification of phenolic compounds that suppress the virulence of Xanthomonas oryzae on rice via the type III secretion system / S. Fan, et al. // Mol Plant Pathol. – 2016. – V. 18. – № 4. – P. 555-568.

89. Cawoy, H. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by Bacillus subtilis / amyloliquefaciens / H. Cawoy, et al. // Microb Biotechnol. – 2015. – V. 8. – № 2. – P. 281-295.

90. Detsi, A. Nanosystems for the Encapsulation of Natural Products: The Case of Chitosan Biopolymer as a Matrix / A. Detsi, et al. // Pharmaceutics. – 2020. – V. 12. – № 7. – P. 669.

91. Davletgildeeva, A.T. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Means of Bacteria and Bacterial Enzymes / A.T. Davletgildeeva, N.A. Kuznetsov // Microorganisms. – 2024. – V. 12. – № 9. – P. 1814.

92. Yergeau, E. Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel-contaminated Canadian high arctic soils / E. Yergeau, et al. // PLoS One. – 2012. – V. 7. – № 1. – P. e30058.

93. Pacwa-Płociniczak, M. Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits / M. Pacwa-Płociniczak, et al. // J Environ Manage. – 2016. – V. 168. – P. 175-184.

94. She, Y.-H. Investigation of Biosurfactant-Producing Indigenous Microorganisms that Enhance Residue Oil Recovery in an Oil Reservoir After Polymer Flooding / Y.-H. She, et al. // Appl Biochem Biotechnol. – 2011. – V. 163. – № 2. – P. 223-234.

95. Varjani, S.J. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants / S.J. Varjani, V.N. Upasani // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2017. – V. 120. – P. 71-83.

96. Yin, C.-F. AlmA involved in the long-chain n-alkane degradation pathway in Acinetobacter baylyi ADP1 is a Baeyer-Villiger monooxygenase / C.-F. Yin, et al. // Appl Environ Microbiol. – 2024. – V. 90. – № 1. – P. e0162523.

97. Leite, G.G.F. Production of rhamnolipids and diesel oil degradation by bacteria isolated from soil contaminated by petroleum / G.G.F. Leite, et al. // Biotechnol Prog. – 2016. – V. 32. – № 2. – P. 262-270.

98. Das, S. Biodegradation of asphaltene by lipopeptide-biosurfactant producing hydrocarbonoclastic, crude oil degrading Bacillus spp. / S. Das, et al. // Bioresource Technology. – 2023. – V. 382. – P. 129198.

99. El Samak, M. Metagenomic and metatranscriptomic exploration of the Egyptian Red Sea sponge Theonella sp. associated microbial community / M. El Samak, et al. // Mar Genomics. – 2023. – V. 70. – P. 101032.

100. Pacheco, G.J. Biosurfactant Production by Rhodococcus Erythropolis and its Application to Oil Removal / G.J. Pacheco, et al. // Braz J Microbiol. – 2010. – V. 41. – № 3. – P. 685-693.

101. Obayori, O.S. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Role of plasmids / O.S. Obayori, L.B. Salam // Scientific Research and Essays. – 2010. –.

102. Nicolopoulou-Stamati, P. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture / P. Nicolopoulou-Stamati, et al. // Frontiers in Public Health. – 2016. – V. 4.

103. Alvarez, F. The plant-associated Bacillus amyloliquefaciens strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease / F. Alvarez, et al. // Journal of Applied Microbiology. – 2011. – V. 1. – № 112. – P. 159-174.

104. Ahmad, T. Biocontrol potential of lipopeptides produced by the novel Bacillus subtilis strain Y17B against postharvest Alternaria fruit rot of cherry / T. Ahmad, et al. // Frontiers in Microbiology. – 2023. – V. 14. – Ст. 1150217. – DOI: 10.3389/fmicb.2023.1150217.

105. Sani, A. Inhibition of Alternaria alternata biofilms and invitro antifungal efficacy of [Glu1, Asp5] surfactin-C15 and its divalent metal-ion complexes / A. Sani, et al. // Microbial Pathogenesis. – 2025. – V. 206. – P. 107788.

106. Singh, A.K. Surfactin restores and enhances swarming motility under heavy metal stress / A.K. Singh, S. Dhanjal, S.S. Cameotra // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2014. – V. 116. – P. 26-31.

107. Borah, S.N. Rhamnolipid Biosurfactant against Fusarium verticillioides to Control Stalk and Ear Rot Disease of Maize / S.N. Borah, et al. // Frontiers in Microbiology. – 2016. – V. 7. – Ст. 1505. – DOI: 10.3389/fmicb.2016.01505.

108. Dimkić, I. Plant-associated Bacillus and Pseudomonas antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review / I. Dimkić, et al. // Physiological and Molecular Plant Pathology. – 2022. – V. 117. – P. 101754.

109. Charles Oluwaseun, A. Characterization and optimization of a rhamnolipid from Pseudomonas aeruginosa C1501 with novel biosurfactant activities / A. Charles Oluwaseun, et al. // Sustainable Chemistry and Pharmacy. – 2017. – V. 6. – P. 26-36.

110. Gong, X. Alkyl polyglycoside and earthworm (Eisenia fetida) enhance biodegradation of green waste and its use for growing vegetables / X. Gong, et al. // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2019. – V. 167. – P. 459-466.

111. Lin, C. Composting and its application in bioremediation of organic contaminants / C. Lin, et al. // Bioengineered. – 2022. – V. 13. – № 1. – P. 1073-1089.

112. Jibia, S.A. Biodegradation of Wool by Bacteria and Fungi and Enhancement of Wool Quality by Biosurfactant Washing / S.A. Jibia, et al. // Journal of Natural Fibers. – 2018. – V. 15. – № 2. – P. 287-295.

113. Kang, B.R. Effect of Chitosan Coating for Efficient Encapsulation and Improved Stability under Loading Preparation and Storage Conditions of Bacillus Lipopeptides / B.R. Kang, et al. // Nanomaterials. – 2022. – V. 12. – № 23. – P. 4189.

114. Guan, T.-K. Biochar immobilized plant growth-promoting rhizobacteria enhanced the physicochemical properties, agronomic characters and microbial communities during lettuce seedling / T.-K. Guan, et al. // Frontiers in Microbiology. – 2023. – V. 14. – Ст. 1218205. – DOI: 10.3389/fmicb.2023.1218205.

115. Rani, M. Isolation and Characterization of Biosurfactant-Producing Bacteria From Oil Well Batteries With Antimicrobial Activities Against Food-Borne and Plant Pathogens / M. Rani, J.T. Weadge, S. Jabaji // Front. Microbiol. – 2020. – V. 11.

116. Pi, Y. The contribution of chemical dispersants and biosurfactants on crude oil biodegradation by Pseudomonas sp. LSH-7′ / Y. Pi, et al. // Journal of Cleaner Production. – 2017. – V. 153. – P. 74-82.

117. Zahed, M.A. Biosurfactant, a green and effective solution for bioremediation of petroleum hydrocarbons in the aquatic environment / M.A. Zahed, et al. // Discover Water. – 2022. – V. 2. – Ст. 5. – DOI: 10.1007/s43832-022-00013-x.

118. Chang, S.-H. Fabrication of novel rhamnolipid-oxygen-releasing beads for bioremediation of groundwater containing high concentrations of BTEX / S.-H. Chang, et al. // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2017. – V. 116. – P. 58-63.

119. Alkhalaf, S.A. Heavy Vacuum Gas Oil Upregulates the Rhamnosyltransferases and Quorum Sensing Cascades of Rhamnolipids Biosynthesis in Pseudomonas sp. AK6U: 14 / S.A. Alkhalaf, et al. // Molecules. – 2021. – V. 26. – № 14. – P. 4122.

120. Ismail, W.A. Simultaneous valorization and biocatalytic upgrading of heavy vacuum gas oil by the biosurfactant-producing Pseudomonas aeruginosa AK6U

/ W.A. Ismail, et al. // Microbial Biotechnology. – 2017. – V. 10. – № 6. – P. 1628-1639.

121. Varjani, S.J. Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of Pseudomonas aeruginosa NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant / S.J. Varjani, V.N. Upasani // Bioresource Technology. – 2016. – V. 221. – P. 510-516.

122. Gu, D. Synergy between fungi and bacteria promotes polycyclic aromatic hydrocarbon cometabolism in lignin-amended soil / D. Gu, et al. // Journal of Hazardous Materials. – 2022. – V. 425. – P. 127958.

123. Li J., et al. Metabolic Characterization and Geochemical Drivers of Active Hydrocarbon-Degrading Microorganisms. – 2024. – V. 129. – № 6. – P. e2024JG008104.

124. Datta, P. 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 / P. Datta, P. Tiwari, L.M. Pandey // Bioresource Technology. – 2018. – V. 270. – P. 439-448.

125. Andrade, A. Application of biosurfactants in enhanced oil recovery ex-situ: a review / A. Andrade, et al. // Braz J Microbiol. – 2024. – V. 55. – № 4. – P. 3117-3139.

126. Gupta, K. Cutting-edge perspectives on biosurfactants: implications for antimicrobial and biomedical applications / K. Gupta, V.K. Sharma // 3 Biotech. – 2024. – V. 14. – № 12. – P. 297.

127. Shaimerdenova, U. Biosurfactant and biopolymer producing microorganisms from West Kazakhstan oilfield / U. Shaimerdenova, et al. // Sci Rep. – 2024. – V. 14. – № 1. – P. 2294.

128. Gudiña, E.J. Biosurfactant-producing and oil-degrading Bacillus subtilis strains enhance oil recovery in laboratory sand-pack columns / E.J. Gudiña, et al. // Journal of Hazardous Materials. – 2013. – V. 261. – P. 106-113.

129. Zargar, A.N. Enhanced Oil Recovery using a Combination of Biosurfactants / A.N. Zargar, et al. // JoVE (Journal of Visualized Experiments). – 2022. – № 184. – P. e63207.

130. Ahluwalia, O. Prospects and challenges regarding biosurfactants in advancing the petroleum industry / O. Ahluwalia, et al. // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2026. – V. 13. – Ст. 1697361. – DOI: 10.3389/fbioe.2025.1697361.

131. Brown, D.M. Comparison of landfarming amendments to improve bioremediation of petroleum hydrocarbons in Niger Delta soils / D.M. Brown, et al. // Science of The Total Environment. – 2017. – V. 596-597. – P. 284-292.

132. Ostovar, M. Advancements in biopile-based sustainable soil remediation: a decade of improvements, integrating bioremediation technologies and AI-based innovative tools / M. Ostovar, et al. // Environ Sci Pollut Res. – 2025. – V. 32. – № 40. – P. 22766-22793.

133. Hogan, D.E. Biodegradability and toxicity of monorhamnolipid biosurfactant diastereomers / D.E. Hogan, et al. // Journal of Hazardous Materials. – 2019. – V. 364. – P. 600-607. – DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.10.050.

134. Al-Ghamdi, A. Surfactant formulation for Green Enhanced Oil Recovery / A. Al-Ghamdi, et al. // Energy Reports. – 2022. – V. 8. – P. 7800-7813.

135. Chen, Y. The structure evolution of biochar from biomass pyrolysis and its correlation with gas pollutant adsorption performance / Y. Chen, et al. // Bioresource Technology. – 2017. – V. 246. – P. 101-109.

136. Chong, H. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies / H. Chong, Q. Li // Microbial Cell Factories 2017 16:1. BioMed Central, 2017. – V. 16. – № 1. – P. 1-12.

137. Henkel, M. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production / M. Henkel, et al. // Process Biochemistry. – 2012. – V. 47. – № 8. – P. 1207-1219.

138. Carrillo, C. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin / C. Carrillo, et al. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. – 2003. – V. 1611. – № 1. – P. 91-97.

139. Simon, M. Surfactants – Compounds for inactivation of SARS-CoV-2 and other enveloped viruses / M. Simon, et al. // Current Opinion in Colloid & Interface Science. – 2021. – V. 55. – P. 101479.

140. Iskander Madhi, Younghee Kim. Immunomodulatory Properties of the Cyclic Lipopeptide Surfactin - PubMed // J Microbiol Biotechnol. – 2026. – V. 17. – № 36. – P. e2602005.

141. Simões, C.R. Biosurfactants: An Overview of Their Properties, Production, and Application in Mineral Flotation / C.R. Simões, et al. // Resources. – 2024. – V. 13. – № 6. – P. 81.

142. Behera, S.K. Microbes Assisted Mineral Flotation a Future Prospective for Mineral Processing Industries: A Review / S.K. Behera, A.F. Mulaba–Bafubiandi // Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review. – 2016. – V. 38. – № 2. – P. 96.

143. Khoshdast, H. Effect of rhamnolipid biosurfactants on performance of coal and mineral flotation / H. Khoshdast, et al. // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2011. – V. 65. – № 8. – P. 1238-1243.

144. Castelein, M. Bioleaching of metals from secondary materials using glycolipid biosurfactants / M. Castelein, et al. // Minerals Engineering. – 2021. – V. 163. – P. 106665.

145. Nweze, E.I. Agar-Based Disk Diffusion Assay for Susceptibility Testing of Dermatophytes | Journal of Clinical Microbiology / E.I. Nweze, P.K. Mukherjee, M.A. Ghannoum // J Clin Microb. – 2010. – V. 48. – № 10. – P. 3750-3752.

146. Gomaa, E.Z. Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by Bacillus licheniformis strain M104 grown on whey / E.Z. Gomaa // Braz. arch. biol. technol. Instituto de Tecnologia do Paraná - Tecpar, 2013. – V. 56. – P. 259-268.

147. Mnif, I. Purification and identification of Bacillus subtilis SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against Rhizoctonia bataticola and

Rhizoctonia solani / I. Mnif, et al. // Environ Sci Pollut Res. – 2016. – V. 23. – № 7. – P. 6690-6699.

148. Galieva, G. Biosurfactants produced by the novel strain Bacillus subtilis H1 as an efficient tool to biocontrol fungal diseases of tomato and wheat / G. Galieva, et al. // E3S Web Conf. EDP Sciences, 2023. – V. 392. – P. 01012.

149. Rivera H. F., et al. Respuesta de biosurfactantes producidos por Pseudomonas fluorescens para el control de la gota de la papa Phytophthora infestans (Mont) de Bary, bajo condiciones controlada. – V. 11. – № 1. – P. 21-30.

150. Najmi, Z. In situ downstream strategies for cost-effective bio / surfactant recovery / Z. Najmi, et al. // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2018. – V. 65. – № 4. – P. 523-532.

151. Varjani, S.J. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant / S.J. Varjani, V.N. Upasani // Bioresource Technology. – 2017. – V. 232. – P. 389-397. – DOI: 10.1016/j.biortech.2017.02.123.

152. Coutte, F. Microbial lipopeptide production and purification bioprocesses, current progress and future challenges / F. Coutte, et al. // Biotechnology Journal. – 2017. – V. 12. – № 7. – P. 1600566.

153. Tiso, T. Integration of Genetic and Process Engineering for Optimized Rhamnolipid Production Using Pseudomonas putida / T. Tiso, et al. // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – V. 8. – Ст. 976. – DOI: 10.3389/fbioe.2020.00976.

154. McInerney, M.J. Jr. Properties of the biosurfactant produced by Bacillus licheniformis strain JF-2 / M.J. McInerney, M. Javaheri, D.P. Nagle // Journal of Industrial Microbiology. – 1990. – V. 5. – № 2-3. – P. 95-101.

155. Kiran, G.S. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus Aspergillus ustus MSF3 / G.S. Kiran, et al. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2009. – V. 73. – № 2. – P. 250-256.

156. Banat, I. Downstream Processing of Microbial Biosurfactants / I. Banat, R. Thavasi // Microbial Biosurfactants and their Environmental and Industrial Applications / под ред. Thavasi R., Banat I. CRC Press, 2018. – P. 16.

157. Singh, R.S. Investigating aqueous phase separation of pullulan from Aureobasidium pullulans and its characterization / R.S. Singh, et al. // Carbohydrate Polymers. – 2019. – V. 223. – P. 115103.

158. Demling, P. Selection of a recyclable in situ liquid–liquid extraction solvent for foam-free synthesis of rhamnolipids in a two-phase fermentation / P. Demling, et al. // Green Chem. – 2020. – V. 22. – № 23. – P. 8495-8510.

159. Zhen, Z. A Modified Transformed Soil Adjusted Vegetation Index for Cropland in Jilin Province, China / Z. Zhen, et al. // Acta Geologica Sinica - English Edition. – 2019. – V. 93. – P. 173-176.

160. Vecino, X. Optimization of extraction conditions and fatty acid characterization of Lactobacillus pentosus cell-bound biosurfactant / bioemulsifier / X. Vecino, et al. // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2015. – V. 95. – № 2. – P. 313-320.

161. Venkataraman, S. Extraction, purification and applications of biosurfactants based on microbial-derived glycolipids and lipopeptides: a review / S. Venkataraman, et al. // Environ Chem Lett. – 2022. – V. 20. – № 1. – P. 949-970.

162. Shah, M.U.H. A comparison of Recovery Methods of Rhamnolipids Produced by Pseudomonas Aeruginosa / M.U.H. Shah, et al. // Procedia Engineering. – 2016. – V. 148. – P. 494-500.

163. Coutte, F. New integrated bioprocess for the continuous production, extraction and purification of lipopeptides produced by Bacillus subtilis in membrane bioreactor / F. Coutte, et al. // Process Biochemistry. – 2013. – V. 48. – № 1. – P. 25-32.

164. Baker, S.C. Enrichment and Purification of Lipopeptide Biosurfactants / S.C. Baker, C.-Y. Chen // Biosurfactants / под ред. Sen R. New York, NY: Springer, 2010. – P. 281-288.

165. Patil, A.S. Exploring the Solvent-Anti-solvent Method of Nanosuspension for Enhanced Oral Bioavailability of Lovastatin / A.S. Patil, et al. // Turk J Pharm Sci. – 2021. – V. 18. – № 5. – P. 541-549.

166. Smyth, T. Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants / T. Smyth, et al. // Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. – 2010. – V. Chap. 27. – P. 3687-3704.

167. Santos, E.F. Production of a new lipoprotein biosurfactant by Streptomyces sp. DPUA1566 isolated from lichens collected in the Brazilian Amazon using agroindustry wastes / E.F. Santos, et al. // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2019. – V. 17. – P. 142-150.

168. Hu, M. An efficient method for the recovery and separation of surfactin from fermentation broth by extraction-back extraction / M. Hu, J. Yu, H. Zhang, Q. Xu // Process Biochemistry. – 2022. – V. 114. – P. 59-65. – DOI: 10.1016/j.procbio.2022.01.014.

169. Rangarajan, V. Improved performance of cross-flow ultrafiltration for the recovery and purification of Ca2+ conditioned lipopeptides in diafiltration mode of operation / V. Rangarajan, G. Dhanarajan, R. Sen // Journal of Membrane Science. – 2014. – V. 454. – P. 436-443.

170. Nataraj, B.H. Characterization of biosurfactants derived from probiotic lactic acid bacteria against methicillin-resistant and sensitive Staphylococcus aureus isolates / B.H. Nataraj, C. Ramesh, R.H. Mallappa // LWT. – 2021. – V. 151. – P. 112195.

171. Rangarajan, V. Towards bacterial lipopeptide products for specific applications – a review of appropriate downstream processing schemes / V. Rangarajan, K.G. Clarke // Process Biochemistry. – 2016. – V. 51. – № 12. – P. 2176-2185.

172. Elakkiya, V.T. Studies on antibacterial and chemotaxis properties of Pseudomonas aeruginosa TEN01 biomass-derived sustainable biosurfactant / V.T. Elakkiya, et al. // Chemosphere. – 2021. – V. 285. – P. 131381.

173. Hubert, J. New perspectives for microbial glycolipid fractionation and purification processes / J. Hubert, et al. // Comptes Rendus. Chimie. – 2012. – V. 15. – № 1. – P. 18-28.

174. Joy, S. Synergistic extraction using sweep-floc coagulation and acidification of rhamnolipid produced from industrial lignocellulosic hydrolysate in a bioreactor using sequential (fill-and-draw) approach / S. Joy, S.K. Khare, S. Sharma // Process Biochemistry. – 2020. – V. 90. – P. 233-240.

175. Chtioui, O. Biosurfactants production by immobilized cells of Bacillus subtilis ATCC 21332 and their recovery by pertraction / O. Chtioui, et al. // Process Biochemistry. – 2010. – V. 45. – № 11. – P. 1795-1799.

176. Kowall, M. Separation and Characterization of Surfactin Isoforms Produced by Bacillus subtilis OKB 105 / M. Kowall, et al. // Journal of Colloid and Interface Science. – 1998. – V. 204. – № 1. – P. 1-8.

177. Montastruc, L. Integrated process for production of surfactin: Part 2. Equilibrium and kinetic study of surfactin adsorption onto activated carbon / L. Montastruc, et al. // Biochemical Engineering Journal. – 2008. – V. 38. – № 3. – P. 349-354.

178. Carmen dos Santos Mendes de Oliveira, A. Recovery of Rhamnolipids Produced by Pseudomonas aeruginosa Using Acidic Precipitation, Extraction, and Adsorption on Activated Carbon / A. Carmen dos Santos Mendes de Oliveira, et al. // Separation Science and Technology. – 2013. – V. 48. – № 18. – P. 2852-2859.

179. Mulligan, C.N. Recovery of biosurfactants by ultrafiltration / C.N. Mulligan, B.F. Gibbs // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 1990. – V. 47. – № 1. – P. 23-29.

180. Yu, F. Efficient preparation of extremely high-purity surfactin from fermentation broth by ethanol extraction / F. Yu, et al. // Separation and Purification Technology. – 2023. – V. 304. – P. 122278.

181. Vicente, R. A prospection on membrane-based strategies for downstream processing of surfactin / R. Vicente, et al. // Chemical Engineering Journal. – 2021. – V. 415. – P. 129067.

182. Santos da Silva, M.T. Integral production and concentration of surfactin from Bacillus sp. ITP-001 by semi-batch foam fractionation / M.T. Santos da Silva, et al. // Biochemical Engineering Journal. – 2015. – V. 104. – P. 91-97.

183. Khondee, N. Lipopeptide biosurfactant production by chitosan-immobilized Bacillus sp. GY19 and their recovery by foam fractionation / N. Khondee, et al. // Biochemical Engineering Journal. – 2015. – V. 93. – P. 47-54.

184. Díaz De Rienzo, M.A. aeruginosa ATCC 9027 using foam fractionation / M.A. Díaz De Rienzo, I.D. Kamalanathan, P. Martin P. J. Comparative study of the production of rhamnolipid biosurfactants by B. thailandensis E264 and // Process Biochemistry. – 2016. – V. 51. – № 7. – P. 820-827.

185. Winterburn, J.B. Integrated recirculating foam fractionation for the continuous recovery of biosurfactant from fermenters / J.B. Winterburn, A.B. Russell, P.J. Martin // Biochemical Engineering Journal. – 2011. – V. 54. – № 2. – P. 132-139.

186. Huang, D. A novel process intensification approach of recovering creatine from its wastewater by batch foam fractionation / D. Huang, et al. // Chemical Engineering and Processing: Process Intensification. – 2016. – V. 104. – P. 13-21.

187. Chen, C. Enhanced biosurfactant production in a continuous fermentation coupled with in situ foam separation / C. Chen, et al. // Chemical Engineering and Processing - Process Intensification. – 2021. – V. 159. – P. 108206.

188. Ankulkar, R. Characterisation and Application Studies of Sophorolipid Biosurfactant by Candida tropicalis RA1 / R. Ankulkar, M. Chavan // J Pure Appl Microbiol. – 2019. – V. 13. – № 3. – P. 1653-1665.

189. Rahman, K.S.M. Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of Pseudomonas aeruginosa Using Low-Cost Raw Materials / K.S.M. Rahman, et al. // Biotechnology Progress. – 2002. – V. 18. – № 6. – P. 1277-1281.

190. Kaur, H. Fundamentals of ATR-FTIR Spectroscopy and Its Role for Probing In-Situ Molecular-Level Interactions / H. Kaur, et al. // Modern Techniques of Spectroscopy: Basics, Instrumentation, and Applications / под ред. Singh D. K., Pradhan M., Materny A. Singapore: Springer, 2021. – P. 3-37.

191. Kiefer, J. Infrared Spectroscopy for Studying Structure and Aging Effects in Rhamnolipid Biosurfactants: 5 / J. Kiefer, M.N. Radzuan, J. Winterburn // Applied Sciences. – 2017. – V. 7. – № 5. – P. 533.

192. Meena, K.R. Purification and identification of a surfactin biosurfactant and engine oil degradation by Bacillus velezensis KLP2016 / K.R. Meena, et al. // Microb Cell Fact. – 2021. – V. 20. – № 1. – P. 26.

193. Sriram, M.I. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain Bacillus cereus NK1 / M.I. Sriram, et al. // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2011. – V. 85. – № 2. – P. 174-181.

194. Liu, J.-F. Chemical Structure, Property and Potential Applications of Biosurfactants Produced by Bacillus subtilis in Petroleum Recovery and Spill Mitigation / J.-F. Liu, et al. // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – V. 16. – № 3. – P. 4814-4837.

195. Perinelli, D.R. Surfactant Self-Assembling and Critical Micelle Concentration: One Approach Fits All? / D.R. Perinelli, et al. // Langmuir. American Chemical Society, 2020. – V. 36. – № 21. – P. 5745-5753.

196. Johnson, P. Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants / P. Johnson, et al. // Advances in Colloid and Interface Science. – 2021. – V. 288. – P. 102340.

197. Roghayeh Rezaeimalidareh, Mohammad Ahmadi, Seyed-Ahmad Shahidi. Lactobacillus-Derived Biosurfactants: Emulsification and Antioxidant Properties in Oil Emulsions // Food Sci Nutr. – 2025. – V. 13. – № 6. – P. e70334.

198. Singh, V. Assessment of Rheological Behaviour of Water-in-Oil Emulsions Mediated by Glycolipid Biosurfactant Produced by Bacillus megaterium SPSW1001 / V. Singh, et al. // Appl Biochem Biotechnol. Springer US, 2022. – V. 194. – № 3. – P. 1310-1326.

199. Twigg, M.S. Microbial biosurfactant research: time to improve the rigour in the reporting of synthesis, functional characterization and process development /

M.S. Twigg, et al. // Microb Biotechnol. – 2021. – V. 14. – № 1. – P. 147-170. – DOI: 10.1111/1751-7915.13704.

200. Roy, A.S. Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study / A.S. Roy, et al. // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2014. – V. 94. – P. 79-89.

201. Понаморева, О. Методы скрининга биосурфактант-продуцирующих бактерий (мини обзор): 4 / О. Понаморева, И. Нечаева, М. Лыонг – Т. // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. Россия, Тула: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Тульский государственный университет», 2019. – № 4. – С. 98–111.

202. Cooper, D.G. Surface-Active Agents from Two Bacillus Species / D.G. Cooper, B.G. Goldenberg // Applied and Environmental Microbiology. – 1987. – V. 53. – № 2. – P. 224-229.

203. Javaheri, M. Anaerobic Production of a Biosurfactant by Bacillus licheniformis JF-2 / M. Javaheri, et al. // Appl Environ Microbiol. – 1985. – V. 50. – № 3. – P. 698-700.

204. Biktasheva, L. Bioremediation of Oil-Contaminated Soils Using Biosurfactants Produced by Bacteria of the Genus Nocardiopsis sp. / L. Biktasheva, et al. // Microbiology Research. – 2024. – V. 15. – № 4. – P. 2575-2592.

205. Bligh, E.G. A Rapid Method for Total Lipid Extraction and Purification. Canadian Journal of Bio-Chemistry and Physiology / E.G. Bligh, W.J. Dyer // Can. J. Biochem. Physiol. – 1959. – V. 37. – № 1. – P. 911-917.

206. Le Meur, S. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by sequential feeding of xylose and octanoic acid in engineered Pseudomonas putida KT2440 / S. Le Meur, et al. // BMC Biotechnol. – 2012. – V. 12. – P. 53.

207. Guo, P. Isolation and Characterization of a Biosurfactant Producing Strain Planococcus sp. XW-1 from the Cold Marine Environment / P. Guo, et al. // IJERPH. – 2022. – V. 19. – № 2. – P. 782.

208. Sharma, V. Characterization and cytotoxicity assessment of biosurfactant derived from Lactobacillus pentosus NCIM 2912 / V. Sharma, et al. // Braz J Microbiol. – 2022. – V. 53. – № 1. – P. 327-340.

209. Zargar, A.N. Structural and functional characterization of a novel biosurfactant from Bacillus sp. IITD106 / A.N. Zargar, et al. // Journal of Hazardous Materials. – 2022. – V. 423. – P. 127201.

210. Martins, R. Toxicity assessment of crude and partially purified extracts of marine Synechocystis and Synechococcus cyanobacterial strains in marine invertebrates / R. Martins, et al. // Toxicon. – 2007. – V. 50. – № 6. – P. 791-799.

211. OECD. Test № 211: Daphnia magna Reproduction Test / OECD. // OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, 2012.

212. Seng, P. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry / P. Seng, et al. // Clinical Infectious Diseases. – 2009. – V. 49, № 4. – P. 543-551. – DOI: 10.1086/600885.

213. Pinar-Méndez, A. Rapid and improved identification of drinking water bacteria using the Drinking Water Library, a dedicated MALDI-TOF MS database / A. Pinar-Méndez, et al. // Water Research. – 2021. – V. 203. – P. 117543.

214. Zompra, A.A. Multi-method biophysical analysis in discovery, identification, and in-depth characterization of surface-active compounds / A.A. Zompra, et al. // Frontiers in Marine Science. – 2022. – V. 9. – Ст. 1023287. – DOI: 10.3389/fmars.2022.1023287.

215. Balasubramanian, S. Sequencing nucleic acids: from chemistry to medicine / S. Balasubramanian // Chem. Commun. – 2011. – V. 47. – № 26. – P. 7281-7286.

216. Muyzer, G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA / G. Muyzer, E.C. de Waal, A.G. Uitterlinden // Appl Environ Microbiol. – 1993. – V. 59. – № 3. – P. 695-700.

217. White, T.J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T.J. White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor // PCR Protocols: A

Guide to Methods and Applications / eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White. – San Diego: Academic Press, 1990. – P. 315-322. – DOI: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.

218. Solichova, K. Novel identification methods including a species-specific PCR for hazardous Bacillus species / K. Solichova, et al. // Acta Alimentaria. – 2019. – V. 48. – P. 415-422.

219. Xu, X. Soil microbial augmentation by an EGFP-tagged Pseudomonas putida X4 to reduce phytoavailable cadmium / X. Xu, et al. // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2012. – V. 71. – P. 55-60.

220. Caulier, S. Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the Bacillus subtilis Group / S. Caulier, et al. // Front Microbiol. – 2019. – V. 10. – P. 302.

221. Medina-Romero, Y.M. Volatile organic compounds from endophytic fungi as innovative postharvest control of Fusarium oxysporum in cherry tomato fruits / Y.M. Medina-Romero, G. Roque-Flores, M.L. Macías-Rubalcava // Appl Microbiol Biotechnol. – 2017. – V. 101. – № 22. – P. 8209-8222.

222. Khaliq, G. Effect of gum arabic coating combined with calcium chloride on physico-chemical and qualitative properties of mango (Mangifera indica L.) fruit during low temperature storage / G. Khaliq, et al. // Scientia Horticulturae. – 2015. – V. 190. – P. 187-194.

223. Raynaldo, F.A. Investigating the biocontrol potentiality of Wickerhamomyces anomalus against postharvest gray mold decay in cherry tomatoes / F.A. Raynaldo, et al. // Scientia Horticulturae. – 2021. – V. 285. – P. 110137.

224. Galitskaya, P. Bacterial Cultural Media Containing Lipopeptides for Heavy Oil Recovery Enhancement: The Results of Sand-Packed Column Experiment / P. Galitskaya, et al. // Processes. – 2023. – V. 11. – № 11. – P. 3203. – DOI: 10.3390/pr11113203.

225. Walter, V. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms / V. Walter, C. Syldatk, R. Hausmann // Adv Exp Med Biol. – 2010. – V. 672. – P. 1-13.

226. Barin, R. Fast bioremediation of petroleum-contaminated soils by a consortium of biosurfactant / bioemulsifier producing bacteria / R. Barin, et al. // Int. J. Environ. Sci. Technol. – 2014. – V. 11. – № 6. – P. 1701-1710.

227. Mouafo, T.H. Effect of Different Carbon Sources on Biosurfactants' Production by Three Strains of Lactobacillus spp. / T.H. Mouafo, A. Mbawala, R. Ndjouenkeu // Biomed Res Int. – 2018. – V. – 2018. – P. 5034783.

228. Zhang, B. Natural antimicrobial lipopeptides secreted by Bacillus spp. and their application in food preservation, a critical review / B. Zhang, et al. // Trends in Food Science & Technology. – 2022. – V. 127. – P. 26-37.

229. Saeed, Q. Rhizosphere Bacteria in Plant Growth Promotion, Biocontrol, and Bioremediation of Contaminated Sites: A Comprehensive Review of Effects and Mechanisms / Q. Saeed, et al. // Int J Mol Sci. – 2021. – V. 22. – № 19. – P. 10529.

230. Georgiou, G. Surface-active compounds from microorganisms / G. Georgiou, S.C. Lin, M.M. Sharma // Biotechnology (N Y). Nature Publishing Company, 1992. – V. 10. – № 1. – P. 60-65.

231. Al-Zaban, M.I. Bioremediation of Crude Oil by Rhizosphere Fungal Isolates in the Presence of Silver Nanoparticles / M.I. Al-Zaban, et al. // Int J Environ Res Public Health. – 2020. – V. 17. – № 18. – P. 6564.

232. Biktasheva, L. Environmental adaptability and biosurfactant production of bacterial isolates from the Boca de Jaruco oil field (Cuba) / L. Biktasheva, et al. // Arab J Geosci. – 2025. – V. 18. – № 1. – P. 17.

233. Sandrin, T.R. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review / T.R. Sandrin, J.E. Goldstein, S. Schumaker // Mass Spectrom Rev. – 2013. – V. 32. – № 3. – P. 188-217.

234. Haider, A. The Current Level of MALDI-TOF MS Applications in the Detection of Microorganisms: A Short Review of Benefits and Limitations / A. Haider, et al. // Microbiology Research. – 2023. – V. 14. – № 1. – P. 80-90.

235. Kaczorek, E. Uptake of Hydrocarbon by Pseudomonas fluorescens (P1) and Pseudomonas putida (K1) Strains in the Presence of Surfactants: A Cell Surface

Modification / E. Kaczorek, A. Olszanowski // Water Air Soil Pollut. – 2011. – V. 214. – № 1. – P. 451-459.

236. Platamone, G. Arthrobacter sp. Inoculation Improves Cactus Pear Growth, Quality of Fruits, and Nutraceutical Properties of Cladodes / G. Platamone, et al. // Curr Microbiol. – 2023. – V. 80. – № 8. – P. 266.

237. Poveda, J. Bacillus as a source of phytohormones for use in agriculture / J. Poveda, F. González-Andrés // Appl Microbiol Biotechnol. – 2021. – V. 105. – № 23. – P. 8629-8645.

238. База данных микроорганизмов, продуцирующих метаболиты с эмульгирующей и поверхностно-активной активностью: свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2025624611 Российская Федерация: заявка № 2025624246: заявл. 15.10.2025: зарегистр. 22.10.2025 / Л. Р. Бикташева, А. С. Гордеев, А. А. Кириченко, П. А. Курынцева; правообладатель ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

239. Bodour, A.A. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils / A.A. Bodour, K.P. Drees, R.M. Maier // Applied and Environmental Microbiology. American Society for Microbiology, 2003. – V. 69. – № 6. – P. 3280-3287.

240. Ndlovu, T. Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by Bacillus amyloliquefaciens and Pseudomonas aeruginosa isolated from a wastewater treatment plant / T. Ndlovu, et al. // AMB Express. SpringerOpen, 2017. – V. 7. – № 1. – P. 1-19.

241. Plaza, G. Detection of biosurfactants in Bacillus species: genes and products identification / G. Plaza, et al. // Journal of Applied Microbiology. Blackwell Publishing Ltd, 2015. – V. 119. – № 4. – P. 1023-1034.

242. Simpson, D.R. Biosurfactant-producing Bacillus are present in produced brines from Oklahoma oil reservoirs with a wide range of salinities / D.R. Simpson, et al. // Applied microbiology and biotechnology. Springer, 2011. – V. 91. – P. 1083-1093.

243. Xu, Y. Genome-Wide Identification and Evolutionary Analyses of SrfA Operon Genes in Bacillus / Y. Xu, et al. // Genes (Basel). – 2023. – V. 14. – № 2. – P. 422.

244. Vollenbroich, D. Analysis of surfactin synthetase subunits in srfA mutants of Bacillus subtilis OKB105 / D. Vollenbroich, et al. // J Bacteriol. – 1994. – V. 176. – № 2. – P. 395-400.

245. Rahman, A. Induced systemic resistance responses in perennial ryegrass against Magnaporthe oryzae elicited by semi-purified surfactin lipopeptides and live cells of Bacillus amyloliquefaciens / A. Rahman, W. Uddin, N.G. Wenner // Molecular Plant Pathology. – 2015. – V. 16. – № 6. – P. 546-558.

246. Chen, J. Biosynthesis and Gene Regulation of Rhamnolipid Congeners / J. Chen, et al. // Curr Microbiol. – 2023. – V. 80. – № 9. – P. 302.

247. Sekhar, K.P.C. A systematic surface studies on the glycolipids to understand the surface adsorption behavior / K.P.C. Sekhar, P.R. Bangal, R.R. Nayak // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2019. – V. 563. – P. 226-236.

248. Li, J.-Y. Microbial Lipopeptide-Producing Strains and Their Metabolic Roles under Anaerobic Conditions / J.-Y. Li, et al. // Microorganisms. – 2021. – V. 9. – № 10. – P. – 2030. –.

249. Microbial Biosurfactants and their Environmental and Industrial Applications / под ред. Banat I. M., Thavasi R. Boca Raton: CRC Press, 2018. 380 с.

250. Zhao, F. Medium factors on anaerobic production of rhamnolipids by Pseudomonas aeruginosa SG and a simplifying medium for in situ microbial enhanced oil recovery applications / F. Zhao, et al. // World J Microbiol Biotechnol. – 2016. – V. 32. – № 4. – P. 54.

251. Li, X. Optimizing Systems for Robust Heterologous Production of Biosurfactants Rhamnolipid and Lyso-Ornithine Lipid in Pseudomonas putida KT2440 / X. Li, Z. Yang, J. Liu // Molecules. – 2024. – V. 29. – № 14. – P. 3288.

252. Kabeil, S.S.A. Rhamnolipids bio-production and miscellaneous applications towards green technologies: a literature review / S.S.A. Kabeil, et al. // PeerJ. – 2025. – V. 13. – P. e18981.

253. Saikia, R.R. Isolation of biosurfactant-producing Pseudomonas aeruginosa RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production: 2 / R.R. Saikia, et al. // Ann Microbiol. BioMed Central, 2012. – V. 62. – № 2. – P. 753-763.

254. Das, P. Analysis of biosurfactants from industrially viable Pseudomonas strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity / P. Das, X.-P. Yang, L.Z. Ma // Front Microbiol. – 2014. – V. 5. – P. 696.

255. Aggo, G.M. Use of agricultural wastes in rhamnolipid production by Pseudomonas aeruginosa USM-AR2 / G.M. Aggo, N.A.M. Noh, A.R.M. Yahya // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. IOP Publishing, 2023. – V. 1139. – № 1. – P. 012007.

256. Luo, Y. Optimization of Medium Composition for Lipopeptide Production from Bacillus subtilis N7 using Response Surface Methodology / Y. Luo, et al. // Korean Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2013. – V. 41, № 1. – P. 52-59. – DOI: 10.4014/kjmb.1207.07020.

257. Snook, M.E. Isolation and characterization of leu7-surfactin from the endophytic bacterium Bacillus mojavensis RRC 101, a biocontrol agent for Fusarium verticillioides / M.E. Snook, et al. // J Agric Food Chem. – 2009. – V. 57. – № 10. – P. 4287-4292.

258. Kumar, A. Antagonistic activity of lipopeptide-biosurfactant producing Bacillus subtilis AKP, against Colletotrichum capsici, the causal organism of anthracnose disease of chilli / A. Kumar, J. Rabha, D.K. Jha // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2021. – V. 36. – P. 102133.

259. Nayak, N.S. Biosurfactant production and engine oil degradation by marine halotolerant Bacillus licheniformis LRK1 / N.S. Nayak, et al. // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. – 2020. – V. 29. – P. 101808.

260. Li, Y. Numerical Modeling of Oxy-fuel Combustion in a Refractory-Lined Down Flame Furnace / Y. Li, et al. // Energy Fuels. American Chemical Society, 2014. – V. 28. – № 1. – P. 155-162.

261. Borhani, B. Diversity and phylogeny of the bacterial strains isolated from nodules of fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.) in Iran / B. Borhani, G. Khodakaramian, E. Velázquez // FEMS Microbiol Lett. – 2022. – V. 369. – № 1. – P. fnac045.

262. Ali Khan, A.H. Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation / A.H. Ali Khan, et al. // Ecological Engineering. – 2017. – V. 104. – P. 158-164.

263. Eras-Muñoz, E. Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications / E. Eras-Muñoz, et al. // Bioengineered. – 2022. – V. 13, № 5. – P. 12365-12391. – DOI: 10.1080/21655979.2022.2074621.

264. Guo, Z. Improving Surfactin Production in Bacillus subtilis 168 by Metabolic Engineering / Z. Guo, et al. // Microorganisms. – 2024. – V. 12. – № 5. – P. 998.

265. Mnif, I. Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications / I. Mnif, D. Ghribi // Biopolymers. – 2015. – V. 104. – № 3. – P. 129-147.

266. Pecci, Y. LC / ESI-MS / MS characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by the Bacillus licheniformis V9T14 strain / Y. Pecci, et al. // J Mass Spectrom. – 2010. – V. 45. – № 7. – P. 772-778.

267. Banat, I.M. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production / I.M. Banat, S.K. Satpute, S.S. Cameotra, R. Patil, N.V. Nyayanit // Frontiers in Microbiology. – 2014. – V. 5. – Ст. 697. – DOI: 10.3389/fmicb.2014.00697.

268. Müller, M.M. Rhamnolipids--next generation surfactants? / M.M. Müller, et al. // J Biotechnol. – 2012. – V. 162. – № 4. – P. 366-380.

269. Vecino, X. Study of the surfactant properties of aqueous stream from the corn milling industry / X. Vecino, et al. // J Agric Food Chem. – 2014. – V. 62. – № 24. – P. 5451-5457.

270. Oliveira, A. Employing Spent Frying Oil as a Feedstock to Produce Short-Chain Organic Acids Using Mixed Microbial Cultures / A. Oliveira, S. Petronilho, L.S. Serafim // Fermentation. – 2023. – V. 9. – № 11. – P. 975.

271. Shi, S. Conversion of Waste Cooking Oil to Rhamnolipid by a Newly Oleophylic Pseudomonas aeruginosa WO2 / S. Shi, et al. // Int J Environ Res Public Health. – 2022. – V. 19. – № 3. – P. 1700.

272. Zhang, L. Fatty Acid Cosubstrates Provide β-Oxidation Precursors for Rhamnolipid Biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa, as Evidenced by Isotope Tracing and Gene Expression Assays / L. Zhang, et al. // Appl Environ Microbiol. – 2012. – V. 78. – № 24. – P. 8611-8622.

273. Ozdal, M. Optimization of rhamnolipid production by Pseudomonas aeruginosa OG1 using waste frying oil and chicken feather peptone / M. Ozdal, S. Gurkok, O.G. Ozdal // 3 Biotech. – 2017. – V. 7. – № 2. – P. 117.

274. Makkar, R.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications / R.S. Makkar, S.S. Cameotra // Appl Microbiol Biotechnol. – 2002. – V. 58. – № 4. – P. 428-434.

275. Zhao, F. Optimization of culture medium for anaerobic production of rhamnolipid by recombinant Pseudomonas stutzeri Rhl for microbial enhanced oil recovery / F. Zhao, et al. // Lett Appl Microbiol. – 2014. – V. 59. – № 2. – P. 231-237.

276. Radzuan, M.N. Biorefining palm oil agricultural refinery waste for added value rhamnolipid production via fermentation / M.N. Radzuan, I.M. Banat, J. Winterburn // Industrial Crops and Products. – 2018. – V. 116. – P. 64-72.

277. Hatt, J.K. Quantitative real-time PCR (qPCR) detection chemistries affect enumeration of the Dehalococcoides 16S rRNA gene in groundwater / J.K. Hatt, F.E. Löffler // Journal of Microbiological Methods. – 2012. – V. 88. – № 2. – P. 263-270.

278. Smith, C.J. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology / C.J. Smith, A.M. Osborn // FEMS Microbiol Ecol. – 2009. – V. 67. – № 1. – P. 6-20.

279. Rizvi H., Ashish. A critical review on scale-up strategies of biosurfactant production and its applications // Tenside Surfactants Detergents. De Gruyter, 2024. – V. 61. – № 4. – P. 297-309.

280. Desai, J.D. Microbial production of surfactants and their commercial potential / J.D. Desai, I.M. Banat // Microbiology and Molecular Biology Reviews. American Society for Microbiology, 1997. – V. 61. – № 1. – P. 47-64.

281. Santos, V.S.V. Ecotoxicological assessment of synthetic and biogenic surfactants using freshwater cladoceran species / V.S.V. Santos, E. Silveira, B.B. Pereira // Chemosphere. – 2019. – V. 221. – P. 519-525.

282. Tkaczyk, A. Daphnia magna model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review / A. Tkaczyk, et al. // Sci Total Environ. – 2021. – V. 763. – P. 143038.

283. Yun, J.-H. Application of biosurfactant from Bacillus subtilis C9 for controlling cladoceran grazers in algal cultivation systems / J.-H. Yun, et al. // Sci Rep. – 2018. – V. 8. – № 5365.

284. Abdullahi, M. Daphnia as a Sentinel Species for Environmental Health Protection: A Perspective on Biomonitoring and Bioremediation of Chemical Pollution / M. Abdullahi, et al. // Environ Sci Technol. – 2022. – V. 56. – № 20. – P. 14237-14248.

285. ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда (ССБТ). Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с Изменениями N 1, 2) [Электронный ресурс]. URL: https: // docs.cntd.ru/document/5200233 (дата обращения: 29.05.2026).

286. Merck Life Science LLC. Safety Data Sheet: Sodium Dodecyl Sulfate (CAS 151-21-3) [Электронный ресурс]. – 2025. – URL: https://www.sigmaaldrich.com/US/en/sds (дата обращения: 12.10.2026).

287. Romanelli, M.F. Evaluation of toxicity reduction of sodium dodecyl sulfate submitted to electron beam radiation / M.F. Romanelli, et al. // Radiation Physics and Chemistry. – 2004. – V. 71. – № 1. – P. 411-413.

288. Thermo Fisher Scientific Chemicals, Inc. Safety Data Sheet: Sodium n-Dodecyl Sulfate (CAS 151-21-3, Cat. No. A11183) [Электронный ресурс]. – Дата первоначального выпуска: 24.11.2010; дата пересмотра: 21.12.2025. – 9 p. – URL: https://www.fishersci.com/store/msds?countryCode=US&language=en&partNumber=AAA1118314&productDescription=SOD+N-DODECL+SFAT+99+DRY+25G&vendorId=VN00024248 (дата обращения: 12.10.2026).

289. Johann, S. Mechanism-specific and whole-organism ecotoxicity of mono-rhamnolipids / S. Johann, et al. // Sci Total Environ. – 2016. – V. 548-549. – P. 155-163.

290. De Oliveira, D.W.F. Aquatic toxicity and biodegradability of a surfactant produced by Bacillus subtilis ICA56 / D.W.F. De Oliveira, et al. // J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. – 2017. – V. 52. – № 2. – P. 174-181.

291. Zhu, M. Two New Biocontrol Agents Against Clubroot Caused by Plasmodiophora brassicae / M. Zhu, et al. // Frontiers in Microbiology. – 2020. – V. 10. – Ст. 3099. – DOI: 10.3389/fmicb.2019.03099.

292. Goswami, D. Antifungal properties of rhamnolipid produced by Pseudomonas aeruginosa DS9 against Colletotrichum falcatum / D. Goswami, et al. // Journal of Basic Microbiology. – 2015. – V. 55.

293. Bacillus subtilis QST 713 - Microbial pest control agent against plant pathogenic fungi and bacteria - Summary documentation, Tier II - Annex IIM, section 4 - Point IIM 6: Metabolism and residue studies.

294. U.S. Environmental Protection Agency. Guidelines for Ecological Risk Assessment. – Washington, DC: Risk Assessment Forum, U.S. EPA, 1998. – EPA / 630 / R-95 / 002F.

295. OECD. Test № 301: Ready Biodegradability / OECD. // OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. OECD Publishing, 1992.

296. Zhang, X.-J. Mechanism responsible for the reduction of interfacial tension by extended surfactants / X.-J. Zhang, et al. // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2022. – V. 634. – P. 128013.

297. Hirata, Y. Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants / Y. Hirata, et al. // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2009. – V. 108. – № 2. – P. 142-146.

298. Chen, X. A mini-review: mechanism of antimicrobial action and application of surfactin / X. Chen, et al. // World J Microbiol Biotechnol. – 2022. – V. 38. – № 8. – P. 143.

299. Singh, P. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies / P. Singh, Y. Patil, V. Rale // J Appl Microbiol. – 2019. – V. 126. – № 1. – P. 2-13.

300. Lima, T.M.S. Biodegradability of bacterial surfactants / T.M.S. Lima, et al. // Biodegradation. – 2011. – V. 22. – № 3. – P. 585-592.

301. Scott, M.J. The biodegradation of surfactants in the environment / M.J. Scott, M.N. Jones // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. – 2000. – V. 1508, № 1-2. – P. 235-251. – DOI: 10.1016/S0304-4157(00)00013-7.

302. Suthar, H. Characterization of Biosurfactant Produced by Bacillus licheniformis TT42 Having Potential for Enhanced Oil Recovery / H. Suthar, A. Nerurkar // Appl Biochem Biotechnol. – 2016. – V. 180. – № 2. – P. 248-260.

303. База данных технологий производства и очистки биосурфактантов: свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022623032 Российская Федерация: заявка № 2022622987: заявл. 14.11.2022: зарегистр. 22.11.2022 / А. С. Гордеев, П. А. Курынцева, П. Ю. Галицкая, Л. Р. Бикташева; правообладатель ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

304. Программа для спектроскопической идентификации биосурфактантов, применяемых в нефтедобыче, по характеристическим участкам ИК-спектров: свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023683530 Российская Федерация: заявка №

2023682990: заявл. 30.10.2023: зарегистр. 08.11.2023 / А. С. Гордеев, С. Ю. Селивановская, П. Ю. Галицкая, Л. Р. Бикташева; правообладатель ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

305. Chen, Y. Pulsed elution modulation for on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupling reversed phase liquid chromatography and hydrophilic interaction chromatography / Y. Chen, et al. // Journal of Chromatography A. – 2019. – V. 1583. – P. 98-107.

306. Galitskaya, P. Lipopeptides Produced by Bacillus mojavensis P1709 as an Efficient Tool to Maintain Postharvest Cherry Tomato Quality and Quantity: 5 / P. Galitskaya, et al. // Agriculture. – 2022. – V. 12. – № 5. – P. 609.

307. Biktasheva, L. Di- and Mono-Rhamnolipids Produced by the Pseudomonas putida PP021 Isolate Significantly Enhance the Degree of Recovery of Heavy Oil from the Romashkino Oil Field (Tatarstan, Russia): 4 / L. Biktasheva, et al. // Processes. – 2022. – V. 10. – № 4. – P. 779.

308. Wittgens, A. Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic Pseudomonas putida KT2440 / A. Wittgens, et al. // Microbial Cell Factories. – 2011. – V. 10. – № 1. – P. 80.

309. Ando, S. Chapter 9 TLC and HPTLC of Phospholipids and Glycolipids in Health and Disease / S. Ando, M. Saito // Journal of Chromatography Library. – 1987. – V. 37. – P. 266-310.

310. Laillet, B. Analysis of Neutral Lipids, Phospholipids, Glycolipids, and Total Lipids by High-Performance Thin Layer Chromatography / B. Laillet, M. Viau, H.P. Ta // Springer Protocols. – 2024. –.

311. Banerjee, S. Production, purification and characterization of biosurfactant isolated from Bacillus oceanisediminis H2 / S. Banerjee, U. Ghosh // Materials Today: Proceedings. – 2023. – V. 81. – P. 1012-1016.

312. Sun, W. Isolation and characterization of biosurfactant-producing and diesel oil degrading Pseudomonas sp. CQ2 from Changqing oil field, China / W. Sun, et al. // RSC Adv. – 2018. – V. 8. – № 69. – P. 39710-39720.

313. Rahim, R. Cloning and functional characterization of the Pseudomonas aeruginosa rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis / R. Rahim, et al. // Mol Microbiol. – 2001. – V. 40. – № 3. – P. 708-718.

314. Din I. ud Bacterial Lipopeptides Are Effective against Pear Fire Blight / Din I. ud, et al. // Microorganisms. – 2024. – V. 12. – № 5. – P. 896.

315. Soares, M.A. Functional Role of Bacteria from Invasive Phragmites australis in Promotion of Host Growth / M.A. Soares, et al. // Microb Ecol. – 2016. – V. 72. – № 2. – P. 407-417.

316. El-Sheshtawy, H.S. Production of biosurfactant from Bacillus licheniformis for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria / H.S. El-Sheshtawy, et al. // Egyptian Journal of Petroleum. – 2015. – V. 24. – № 2. – P. 155-162.

317. Deepika, K. Rhamnolipid biosurfactant production by Pseudomonas aeruginosa strain KVD-HR42 isolated from oil contaminated mangrove sediments / K. Deepika, M. Raghuram, B. Chari // African Journal of Microbiology Research. – 2017. – V. 11. – P. 218-231.

318. Leitermann, F. Fast quantitative determination of microbial rhamnolipids from cultivation broths by ATR-FTIR Spectroscopy / F. Leitermann, C. Syldatk, R. Hausmann // J Biol Eng. – 2008. – V. 2. – № 1. – P. 13.

319. Arisah, F.M. Novel Insights into Cr(VI)-Induced Rhamnolipid Production and Gene Expression in Pseudomonas aeruginosa RW9 for Potential Bioremediation / F.M. Arisah, et al. // J Microbiol Biotechnol. – 2024. – V. 34. – № 9. – P. 1877-1889.

320. Toribio, J. Rhamnolipids: Production in bacteria other than Pseudomonas aeruginosa / J. Toribio, A.E. Escalante, G. Soberón-Chávez // European Journal of Lipid Science and Technology. – 2010. – V. 112. – № 10. – P. 1082-1087.

321. Yin, Y. Fungicide Resistance: Progress in Understanding Mechanism, Monitoring, and Management / Y. Yin, et al. // Phytopathology. Scientific Societies, 2023. – V. 113. – № 4. – P. 707-718.

322. Islam, T. Resistance Mechanisms of Plant Pathogenic Fungi to Fungicide, Environmental Impacts of Fungicides, and Sustainable Solutions / T. Islam, et al. // Plants. – 2024. – V. 13. – № 19. – P. 2737.

323. Гордеев А. –, С. Антагонистические свойства биосурфактантов, продуцируемых бактериями рода Bacillus spp / С. Гордеев А. –, Л.Р. Бикташева, Д.Н. Корнилова // Материалы Международной научно-практической конференции. Краснодар: ООО «ЭДВИ», 2024. – С. 119–126.

324. Гордеев А. –, С. Фунгицидная активность биосурфактантов, выделенных из штаммов Bacillus amyloliquefaciens B-12464 и Bacillus mojavensis PS17 / С. Гордеев А. –, Н.А. Ежкин, З.И. Осморская // Сборник тезисов III молодежной всероссийской научной конференции с международным участием «PLANTAE & FUNGI». Владивосток, 2023. – С. 12.

325. Velho, R.V. Production of lipopeptides among Bacillus strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi / R.V. Velho, et al. // Folia Microbiol. – 2011. – V. 56. – № 4. – P. 297-303.

326. Yan, F. Effect of rhamnolipids on Rhodotorula glutinis biocontrol of Alternaria alternata infection in cherry tomato fruit / F. Yan, et al. // Postharvest Biology and Technology. – 2014. – V. 97. – P. 32-35.

327. Moosa, A. Transcriptional and biochemical profiling of defense enzymes in Citrus sinensis during salicylic acid and cinnamon mediated suppression of green and blue mold / A. Moosa, F. Zulfiqar, K.H.M. Siddique // Frontiers in Plant Science. – 2022. – V. 13. – Ст. 1048433. – DOI: 10.3389/fpls.2022.1048433.

328. Crouzet, J. Biosurfactants in Plant Protection Against Diseases: Rhamnolipids and Lipopeptides Case Study / J. Crouzet, et al. // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – V. 8. – Ст. 1014. – DOI: 10.3389/fbioe.2020.01014.

329. Benson, A. Seed priming with biosurfactant and biosurfactant producing bacteria induces resistance against Ralstonia solanacearum in tomato plants / A. Benson, et al. // Biocontrol Science and Technology. – 2022. – V. 32. – № 8. – P. 1027-1033.

330. Chandrasekaran, M. Induction of defense-related enzymes in tomato (Solanum lycopersicum) plants treated with Bacillus subtilis CBR05 against Xanthomonas campestris pv. vesicatoria / M. Chandrasekaran, S.C. Chun // Biocontrol Science and Technology. – 2016. – V. 26. – № 10. – P. 1366-1378.

331. Biosurfactants: Research Trends and Applications / под ред. Mulligan C. N., Sharma S. K., Mudhoo A. Boca Raton: CRC Press, 2014. 352 с.

332. Sen, R. Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR / R. Sen // Progress in Energy and Combustion Science. – 2008. – V. 34. – № 6. – P. 714-724.

333. Dullien F. A. L. Porous Media: Fluid Transport and Pore Structure. – 2nd ed. – San Diego: Academic Press, 1992. – 574 P. – ISBN 978-0-12-223651-8.

334. Purwasena, I.A. Production, characterization, and application of Pseudoxanthomonas taiwanensis biosurfactant: a green chemical for microbial enhanced oil recovery (MEOR) / I.A. Purwasena, et al. // Sci Rep. – 2024. – V. 14. – № 1. – P. 10270.

335. Massarweh, O. The use of surfactants in enhanced oil recovery: A review of recent advances / O. Massarweh, A.S. Abushaikha // Energy Reports. – 2020. – V. 6. – P. 3150-3178.

336. Liu, Q. Optimization of lipopeptide biosurfactant production by Bacillus licheniformis L20 and performance evaluation of biosurfactant mixed system for enhanced oil recovery / Q. Liu, et al. // Journal of Petroleum Science and Engineering. – 2022. – V. 208. – P. 109678.

337. Andriyan, R. The utilization of Surfactant on enhanced oil recovery chemical injection to maintain energy in Indonesia / R. Andriyan, R. Pratiwi, R. Setiati // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. IOP Publishing, 2021. – V. 780. – № 1. – P. 012015.

338. Lake, L. W. Fundamentals of Enhanced Oil Recovery / L. W. Lake, R. T. Johns, W. R. Rossen, G. A. Pope. – Richardson, TX : Society of Petroleum Engineers, 2014. – 496 p. – ISBN 978-1-61399-328-6. – DOI: 10.2118/9781613993286.

339. Lake, L. W. Enhanced Oil Recovery / L. W. Lake. – Richardson, TX: Society of Petroleum Engineers, 2010. – 550 p. – ISBN 978-1-55563-305-9.

340. Nerurkar, A.S. Biosystem Development for Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) / A.S. Nerurkar, H.G. Suthar, A.J. Desai // Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology / под ред. Satyanarayana T., Johri B. N. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. – P. 711-737.

341. Amani, H. Production of microbial rhamnolipid by Pseudomonas aeruginosa MM1011 for ex situ enhanced oil recovery / H. Amani, et al. // Appl Biochem Biotechnol. – 2013. – V. 170. – № 5. – P. 1080-1093.

342. Pornsunthorntawee, O. Isolation and comparison of biosurfactants produced by Bacillus subtilis PT2 and Pseudomonas aeruginosa SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery / O. Pornsunthorntawee, et al. // Biochemical Engineering Journal. – 2008. – V. 42. – № 2. – P. 172-179.

343. Shaikhah, D. New Trends in Biosurfactants: From Renewable Origin to Green Enhanced Oil Recovery Applications: 2 / D. Shaikhah, et al. // Molecules. – 2024. – V. 29. – № 2. – P. 301.

344. Liu, Q. Production, characterization and application of biosurfactant produced by Bacillus licheniformis L20 for microbial enhanced oil recovery / Q. Liu, et al. // Journal of Cleaner Production. – 2021. – V. 307. – P. 127193.

345. Al-Anssari S., et al. Effect of Nanoparticles on the Interfacial Tension of CO2-Oil System at High Pressure and Temperature: An Experimental Approach. OnePetro, 2020.

346. Khayati, H. An experimental investigation on the use of saponin as a non-ionic surfactant for chemical enhanced oil recovery (EOR) in sandstone and carbonate oil reservoirs: IFT, wettability alteration, and oil recovery / H. Khayati, et al. // Chemical Engineering Research and Design. – 2020. – V. 160. – P. 417-425.

347. Bai, Y. Microstructure, dispersion, and flooding characteristics of intercalated polymer for enhanced oil recovery / Y. Bai, et al. // Journal of Molecular Liquids. – 2021. – V. 340. – P. 117235.

348. Prajakta, B.M. Potential biocontrol and superlative plant growth promoting activity of indigenous Bacillus mojavensis PB-35(R11) of soybean (Glycine max) rhizosphere / B.M. Prajakta, et al. // SN Appl. Sci. – 2019. – V. 1. – № 10. – P. 1143.

349. Rath, M. Volatiles produced by Bacillus mojavensis RRC101 act as plant growth modulators and are strongly culture-dependent / M. Rath, T.R. Mitchell, S.E. Gold // Microbiological Research. – 2018. – V. 208. – P. 76-84.

350. Jin, T. Plant growth-promoting effect and genomic analysis of the P. putida LWPZF isolated from C. japonicum rhizosphere / T. Jin, et al. // AMB Expr. – 2022. – V. 12. – № 1. – P. 101.

351. Sah, S. Pseudomonas mediated nutritional and growth promotional activities for sustainable food security / S. Sah, S. Krishnani, R. Singh // Current Research in Microbial Sciences. – 2021. – V. 2. – P. 100084.

352. Нефтегазохимический комплекс – драйвер экономики Татарстана [Электронный ресурс] // Министерство промышленности и торговли Республики Татарстан. – 14.11.2024. – URL: https: // mpt.tatarstan.ru/index.htm/news/2360205.htm (дата обращения: 21.09.2026).

353. Валовой сбор томатов защищённого грунта в разрезе федеральных округов в 2025 г. [Электронный ресурс] // Федеральная служба государственной статистики (Росстат). – 2025. – URL: https: // rosstat.gov.ru/storage/mediabank/Val2_2025.xlsx (дата обращения: 21.09.2026).

354. Soderberg, A.C. 2 - Fermentation Design / A.C. Soderberg // Fermentation and Biochemical Engineering Handbook (Second Edition) / под ред. Vogel H. C., Todaro C. L. Westwood, NJ: William Andrew Publishing, 1996. – P. 67-121.

355. Global Fermenters and Bioreactors Market Size Report, 2035 [Электронный ресурс] // Roots Analysis. – URL: https: // www.rootsanalysis.com/reports/bioreactors-and-fermenters-market.html (дата обращения: 20.09.2026).

356. How Much Does a Bioreactor Cost? [Электронный ресурс] // Excedr. – URL: https: // www.excedr.com/blog/how-much-does-a-bioreactor-cost (дата обращения: 21.09.2026).

357. Peters M. S., Timmerhaus K. D., West R. E. Plant Design and Economics for Chemical Engineers. McGraw-Hill Education, 2003. 1016 с.

358. База документов информационно-правовой системы ГАРАНТ [Электронный ресурс]. – URL: https: // base.garant.ru/73229392/ (дата обращения: 20.09.2026).

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ООО «Органик парк»

ИНН 7708754375 КПП 165801001
420095, Республика Татарстан, Г.О. ГОРОД КАЗАНЬ,
г.Казань, тер. Химград, д.102 помещ. 9
Почтовый адрес: 420095, г. Казань, а/я 45
8 (800) 500-26-45, +7 (843) 212-19-19
info@bionovatic.ru; bionovatic.ru

21.09.2026 г. № Оп.26/374

АКТ АПРОБАЦИИ

ООО «Органик парк» подтверждает, что результаты диссертационного исследования Гордеева Александра Сергеевича на тему «РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БИОСУРФАКТАНТОВ», а именно - разработанная биотехнология получения бактериального препарата на основе липопептидных биосурфактантов, продуцируемых штаммом *Bacillus mojavensis* P1709, прошла апробацию на базе нашего предприятия.

Производственные и лабораторные испытания полученного бактериального препарата проводились в условиях опытно-экспериментального цеха ООО «Органик парк» в августе - декабре 2025 года. Испытания подтвердили стабильность биотехнологических параметров получения целевого продукта и его эффективность для защиты плодов томатов после сбора урожая от фитопатогенов.

Генеральный директор
ООО «БИОНОВАТИК» -
Управляющей организации
ООО «Органик Парк» М.Н. Шальнов

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Chemtech Volga

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ «КЕМТЕК ВОЛГА»
420087, РТ, г. Казань, ул. Аделя Кутуя, д.159, помещение 4, +7 (843)500-03-69
e-mail: info@chemt.ru

25 сентября 2026 г.

АКТ АПРОБАЦИИ

Общество с ограниченной ответственностью «КЕМТЕК ВОЛГА» подтверждает, что научно-практические результаты диссертационной работы Гордеева Александра Сергеевича «РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БИОСУРФАКТАНТОВ», а именно разработанная биотехнология получения бактериального препарата на основе рамнолипидных биосурфактантов, продуцируемых штаммом *Pseudomonas putida* PP021, была принята к использованию и успешно апробирована в деятельности предприятия.

В период с апреля по июнь 2025 г. на базе предприятия были проведены комплексные лабораторные фильтрационные и опытно-промысловые испытания полученного препарата применительно к условиям Альметьевской площади Ромашкинского нефтяного месторождения.

Проведенные испытания на керновом материале терригенных коллекторов и опытно-промышленные испытания растворов биопрепарата показали его высокую поверхностную активность, эффективное снижение межфазного натяжения на границе «нефть–вода» и способность изменять смачиваемость породы. Результаты апробации подтвердили технологическую эффективность разработанной биотехнологии, сопоставимую с синтетическими ПАВ, применяемыми при извлечении остаточной нефти. Бактериальный препарат на основе рамнолипидных биосурфактантов *Pseudomonas putida* PP021 рекомендуется для дальнейшей опытно-промысловой оценки и применения в технологиях повышения нефтеотдачи пластов на объектах с аналогичными геолого-физическими условиями.

Директор Любицкий Вадим Иванович

ПРИЛОЖЕНИЕ В



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2022623032

База данных технологий производства и очистки биосурфактантов

Правообладатель: ***федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (ФГАОУ ВО КФУ) (RU)***

Авторы: ***Гордеев Александр Сергеевич (RU), Курынцева Полина Александровна (RU), Галицкая Полина Юрьевна (RU), Бикташева Лилия Рамилевна (RU)***

Заявка № **2022622987**
Дата поступления **14 ноября 2022 г.**
Дата государственной регистрации
в Реестре баз данных ***22 ноября 2022 г.***

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации программы для ЭВМ

№ 2023683530

Программа для спектроскопической идентификации биосурфактантов, применяемых в нефтедобыче, по характеристическим участкам ИК-спектров

Правообладатель: ***федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (ФГАОУ ВО КФУ) (RU)***

Авторы: ***Гордеев Александр Сергеевич (RU), Селивановская Светлана Юрьевна (RU), Галицкая Полина Юрьевна (RU), Бикташева Лилия Рамилевна (RU)***

Заявка № **2023682990**

Дата поступления **30 октября 2023 г.**

Дата государственной регистрации в Реестре программ для ЭВМ ***08 ноября 2023 г.***

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации программы для ЭВМ

№ 2026688663

Программа прогнозирования выхода биосурфактантов на основе показателей их эффективности

Правообладатель: ***Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (RU)***

Авторы: ***Гордеев Александр Сергеевич (RU), Бикташева Лилия Рамилевна (RU), Кириченко Анастасия Алексеевна (RU), Гильмутдинова Ильсина Мансуровна (RU), Кабирова Аделина Рустемовна (RU)***

Заявка № **2026688109**

Дата поступления **14 сентября 2026 г.**

Дата государственной регистрации в Реестре программ для ЭВМ ***21 сентября 2026 г.***

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 00a570e4f7...ad5d5314b4b8818e75f29506
Владелец Зубов Юрий Сергеевич
Действителен с [illegible] по 28.11.2026

Ю.С. Зубов