На правах рукописи



ГОРДЕЕВ АЛЕКСАНДР СЕРГЕЕВИЧ

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БИОСУРФАКТАНТОВ

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Казань – 2026

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент, **Галицкая Полина Юрьевна**

Официальные оппоненты: **Горькова Ирина Вячеславовна,** доктор технических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина», профессор кафедры биотехнологии и химии имени профессора Н.Е. Павловской;

Беловежец Людмила Александровна, доктор биологических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения Российской академии наук», заведующий лабораторией экологической биотехнологии

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь.

Защита диссертации состоится “23” декабря 2026 г. в 14:00 на заседании объединенного диссертационного совета 99.2.028.02, созданного на базе ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет», ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68, Зал заседаний Ученого совета (А-330).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет» и на сайте: https://www.kstu.ru/event.jsp?id=185974&id_cat=141

Автореферат диссертации разослан “___” октября 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 99.2.028.02 — Хабибрахманова Венера Равилевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 обводненных 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 нефтезагрязненных 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 – нефтезагрязненных 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 (КЖ). 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 применен 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 на тензиометре KRUSS K20 (Германия) методом отрыва кольца Де Нюи. Культивирование штаммов-продуцентов проводили в лабораторном биореакторе Minifors 2 (Infors HT, Швейцария) объемом 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 зараженных 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 нефтезагрязненных 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 (EC50 составляет 195 мг/л против 15 мг/л).

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обеспечена трехкратной 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.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность разработки биотехнологии получения биосурфактантов на основе региональных штаммов-продуцентов для импортозамещения и достижения технологического суверенитета. Определены цель и задачи исследования, сформулированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту. Приведены сведения об апробации результатов на российских и международных конференциях, о публикациях и личном вкладе автора.

В первой главе представлены обобщенные литературные данные о биосурфактантах, их биосинтезе, их основных классах, штаммах-продуцентах, методах получения, выделения и анализа. Рассмотрены перспективы применения биосурфактантов для защиты растений от фитопатогенов и повышения нефтеотдачи пластов, а также технологические и экономические ограничения их промышленного производства.

Во второй главе подробно описаны материалы и методы исследований. На первом этапе из нефтезагрязненных и ризосферных почв выделены аэробные изоляты, проведен скрининг их способности продуцировать биосурфактанты по индексу эмульгирования (E24) и снижению поверхностного натяжения культуральной жидкости. Отобраны три наиболее активных изолята, идентифицированные как *Bacillus mojavensis* P1709, *Pseudomonas putida* PP021 и *Pseudomonas fluorescens* PCS-20 с присвоением указанных лабораторных шифров. Видовую идентификацию выполняли с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) и секвенирования по Сэнгеру (степень сходства более 99 %); нуклеотидные последовательности штаммов регистрировали в базе данных GenBank.

Методом ПЦР-РВ установлено наличие генов биосинтеза липопептидов (*fenD, srfAA, srfA3*) у *B. mojavensis* P1709 и генов рамнолипидов (*rhlB, rhlC*) у *Pseudomonas*. Для получения биосурфактантов с разной степенью очистки использовали центрифугирование, кислотное осаждение и экстракцию органическими растворителями. Химическую структуру изучали методом ТСХ и ИК-спектроскопии. Экотоксичность оценивали на *Ceriodaphnia affinis*, биоразлагаемость – по минерализации углерода (метод OxiTop). Фунгицидные свойства КОФ *B. mojavensis* P1709 оценивали в два этапа. *In vitro,* на чашках Петри, определяли ингибирование радиального роста мицелия *Fusarium oxysporum* и снижение продукции микотоксинов Т-2 и НТ-2. *In vivo,* на плодах томатов черри, оценивали защитный эффект при искусственном заражении патогеном через поверхностные повреждения (надрезы), а также активность защитных ферментов в тканях плодов (пероксидазы и полифенолоксидазы). Эффективность применения биосурфактантов для увеличения нефтеотдачи оценивали на песчаных колонках и кернах с нефтью Ромашкинского месторождения в сравнении с синтетическим ПАВ. Термическую стабильность КОФ определяли при нагревании до 120 °C. Описаны также методы масштабирования и технико-экономической оценки разработанной биотехнологии.

Экспериментальные данные получены в условиях троекратно заложенного опыта, измерения проводили не менее чем в трех биологических и аналитических повторностях. Проверку нормальности распределения данных осуществляли с использованием критерия Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения применяли коэффициент корреляции Пирсона, при отклонении от нормального - коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Результаты представлены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение. Статистическую значимость различий между независимыми выборками оценивали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни (уровень значимости $p < 0,05$).

В третьей главе представлены результаты скрининга, идентификации и генетического анализа отобранных продуцентов биосурфактантов.

Скрининг изолятов с наибольшей сурфактант-продуцирующей активностью. Поиск эффективных штаммов проводили среди 63 бактериальных изолятов, выделенных из двух типов образцов: 44 изолята - из ризосферы салата-латука (*Lactuca sativa*) и 19 – из нефтезагрязненных почв. Первичный скрининг сурфактант-продуцирующей активности осуществляли по Е24 и способности снижать поверхностное натяжение культуральной жидкости. Значения Е24 варьировались в широком диапазоне - от 5 до 81 %, а поверхностное натяжение – от 21,6 до 63,4 мН/м. Поскольку данные показатели не коррелировали между собой, для объективного отбора использовали метод суммирования рангов. В результате были отобраны три изолята, обладающие наибольшей суммарной активностью (2б, 11ос и 12ос).

Идентификация изолятов. Для всех 63 изолятов проведена предварительная идентификация методом MALDI-TOF MS. Установлено, что в ризосферной почве преобладают бактерии родов *Bacillus, Paenibacillus* и *Pseudomonas*, а в нефтезагрязненной – *Sphingomonas* и *Bacillus*. Наилучшие показатели имели изоляты 2б, 11ос и 12ос, проявившие сочетание высокой эмульгирующей активности (Е24 61-81 %) и низкого поверхностного натяжения (27,1-29,5 мН/м). Для дальнейшей работы из этих трех изолятов была выделена геномная ДНК, и их видовая принадлежность была уточнена методом секвенирования по Сэнгеру (степень сходства с референсными последовательностями более 99 %). Они были идентифицированы как *Bacillus mojavensis* P1709, *Pseudomonas fluorescens* PCS-20 и *Pseudomonas putida* PP021. Последовательности штаммов депонированы в базу данных GenBank.

Установление генов биосинтеза биосурфактантов в штаммах B. mojavensis P1709, P. fluorescens PCS-20 и P. putida PP021. Для подтверждения потенциала выбранных штаммов в их геномах определяли наличие ключевых генов биосинтеза. Установлено, что геном *B. mojavensis* P1709 содержит гены фенгицина (*fenD*) и сурфактина (*srfAA, srfA3*). У штаммов *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 выявлены гены *rhlB* и *rhlC*, ответственные за биосинтез моно- и дирамнолипидов. На основании генетических особенностей продуцентов были определены два направления практического применения: липопептиды *B. mojavensis* P1709 – для защиты растений от фитопатогенных грибов, а рамнолипиды *P. putida* PP021 – для эмульсификации нефти и повышения нефтеотдачи пластов.

В четвертой главе представлены результаты оценки культивирования штаммов *B. mojavensis* P1709, *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021.

Оценка роста и продуктивности штаммов B. mojavensis P1709, P. fluorescens PCS-20 и P. putida PP021. Для интенсификации синтеза биосурфактантов подбирали состав питательной среды и длительность культивирования. Штаммы культивировали в течение 72 ч на средах с добавлением глюкозы, глицерина или гексадекана в качестве единственного источника углерода. По окончании в КЖ определяли индексы Е24 и поверхностного натяжения (таблица 1).

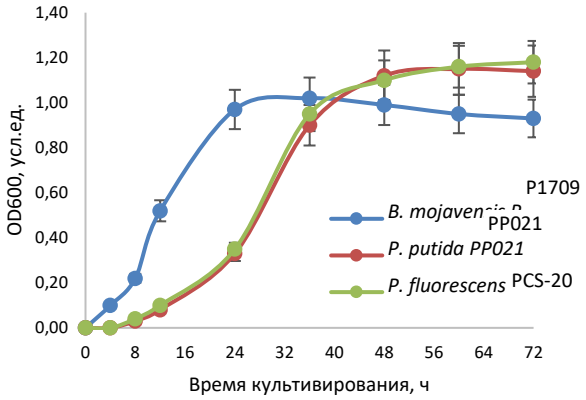
Таблица 1 – Показатели Е24 и поверхностного натяжения КЖ штаммов *B. mojavensis* P1709, *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021 при инкубировании на трех средах (серым выделены наилучшие значения)

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
	поверхностное натяжение, 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
	поверхностное натяжение, мН/м	29,3±0,23	27,5±0,34	29,4±0,55
Гексадекан	Е24, %	30,0±1,8	66,0±5,0	54,0±4,3
	поверхностное натяжение, мН/м	45,6±0,78	52,4±0,65	43,3±0,54

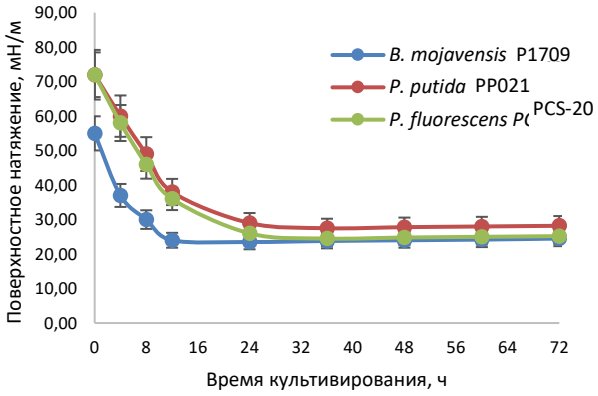
Оптимальной средой для *B. mojavensis* P1709 оказалась среда с глюкозой, для *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 – глицерин-нитратная среда. Эти среды использовали в дальнейших кинетических исследованиях.

Для определения оптимальной длительности культивирования на выбранных средах сопоставляли изменения OD_{600}, поверхностного натяжения и относительного уровня экспрессии по данным ОТ-ПЦР (рисунок 1) в образцах КЖ.

а



б



в

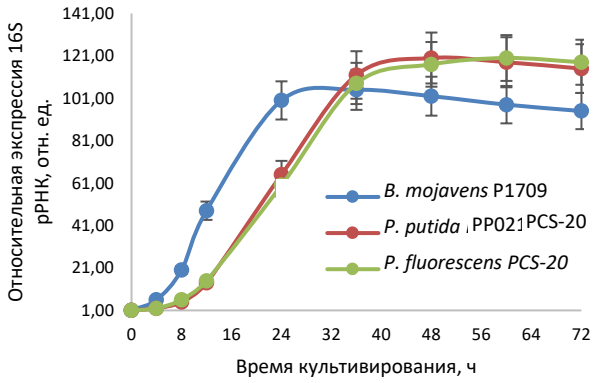


Рисунок 1 – Кинетика OD_{600} (а), поверхностного натяжения (б) и относительного уровня экспрессии (в) на лабораторных средах

В процессе глубинного культивирования в биореакторе Minifors 2 (общий объем 3 л, рабочий объем 2 л) осуществляли автоматический контроль основных параметров: температуры (30±1 °С), pH (7,0±0,2) с автоматической подачей 10 % растворов NaOH и H_3PO_4, а также уровня растворенного кислорода. Перемешивание обеспечивалось механической мешалкой с двумя шестилопастными турбинами, что гарантировало равномерное распределение питательных веществ и кислорода. Кривые роста *Pseudomonas* имели классическую S-образную форму: лаг-фаза 32-38 ч, лог-фаза 20-24 ч, плато к 60 ч. *B. mojavensis* P1709 начинал активный рост с 4 ч, лог-фаза продолжалась до 50 ч. Сигнал ОТ-ПЦР возрастал синхронно с увеличением оптической плотности, достигая максимума в поздней экспоненциальной – ранней стационарной фазе. Наиболее интенсивное снижение поверхностного натяжения отмечено в первые 10-20 ч. К 36 ч значения поверхностного натяжения стабилизировались на уровне 23,9-27,5 мН/м. Так, оптимальный интервал культивирования для получения биосурфактантов составляет 24-36 ч. Корреляционный анализ выявил сильную отрицательную взаимосвязь между OD_{600} и поверхностным натяжением для всех штаммов. Это подтверждает, что активный рост биомассы в экспоненциальной фазе сопровождается интенсивной секрецией биосурфактантов, тогда как стабилизация оптической плотности коррелирует с насыщением среды поверхностно-активными соединениями.

Адаптация питательных сред для промышленного культивирования штаммов B. mojavensis P1709, P. fluorescens PCS-20 и P. putida PP021. Для масштабирования биотехнологического процесса исследована возможность замены лабораторных субстратов (глюкозы и глицерина) доступным региональным сырьем: свекловичной мелассой, гидролизатом рыбной муки и отработанным растительным маслом. Для культивирования *B. mojavensis* P1709 использовали среду

на основе мелассы и гидролизата рыбной муки, а для *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 – среду с отработанным растительным маслом (20 г/л) и $NaNO_3$ (3 г/л). В связи с невозможностью корректного определения оптической плотности OD_{600} на данных средах вследствие фонового поглощения мелассы и образования устойчивых масляных эмульсий мониторинг роста и биосинтеза проводили с использованием гравиметрического метода, ОТ-ПЦР и определения Е24 и поверхностного натяжения. Культивирование осуществляли в ферментере объемом 3 л (рабочий объем 2 л) с отбором проб каждые 12 ч. Продолжительность эксперимента ограничивали 60 ч для определения времени достижения целевых показателей и их стабилизации. На рисунке 2 представлена динамика индексов Е24, поверхностного натяжения и относительной экспрессии 16S рРНК для трех исследуемых штаммов.

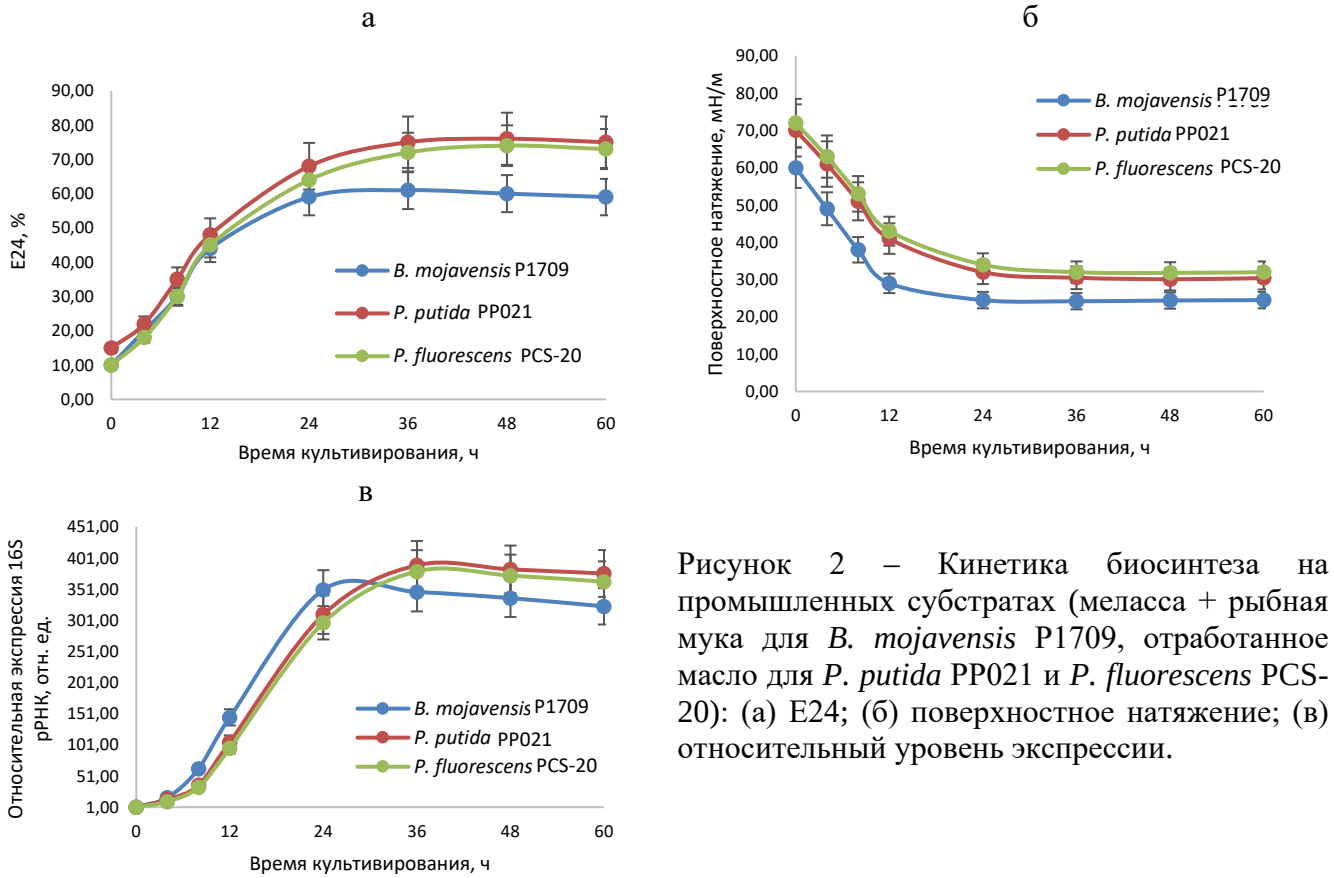


Рисунок 2 – Кинетика биосинтеза на промышленных субстратах (меласса + рыбная мука для *B. mojavensis* P1709, отработанное масло для *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20): (а) Е24; (б) поверхностное натяжение; (в) относительный уровень экспрессии.

Характер изменения исследованных показателей на промышленных субстратах в целом соответствовал кинетике, установленной на лабораторных средах. Для *B. mojavensis* P1709 стабилизация сигнала ОТ-ПЦР наблюдалась к 24 ч культивирования, тогда как для *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 – к 36 ч. Снижение поверхностного натяжения и увеличение Е24 происходили по мере накопления биомассы. Минимальные значения поверхностного натяжения достигались к 36 ч и составляли около 25 мН/м для *B. mojavensis* P1709 и 27–28 мН/м для штаммов *Pseudomonas*, после чего показатели стабилизировались. Установлена сильная отрицательная корреляция между сигналом ОТ-ПЦР и поверхностным натяжением и положительная корреляция с Е24. Полученные результаты подтвердили возможность переноса лабораторно установленных режимов культивирования на промышленные субстраты с рекомендуемой продолжительностью ферментации 24 ч для *B. mojavensis* P1709 и 36 ч для штаммов *Pseudomonas*.

На основе полученных кинетических данных формализованы критерии остановки процесса применительно к промышленным субстратам (таблица 2). Завершение биосинтеза определяется по комплексу параметров: достижение целевых значений поверхностного натяжения и Е24, падение скорости их изменения, выход культуры в стационарную фазу (по стабилизации сигнала ОТ-ПЦР) и остаточная концентрация субстрата.

Таблица 2 – Время достижения критериев остановки ферментации на промышленных субстратах

Критерий	*B. mojavensis* P1709	*P. fluorescens* PCS-20	*P. putida* PP021
Достижение поверхностного натяжения ≤ 26 мН/м (*Bacillus*) / ≤ 30 мН/м (*Pseudomonas*), ч	24	36	36
Скорость снижения поверхностного натяжения < 0,2 мН/м·ч в течение 4 ч	24	36	36
Достижение E24 ≥ 55 % (*Bacillus*) / ≥ 70 % (*Pseudomonas*), ч	20	24	24
Скорость повышения E24 < 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

Для промышленного масштабирования выбраны *B. mojavensis* P1709 (биопрепарат ДЗР) и *P. putida* PP021 (биопрепарат ППН); *P. fluorescens* PCS-20 использован как модельный объект. При культивировании на лабораторных средах выход кислотно-осажденной фракции из 1 л КЖ составил для *B. mojavensis* P1709 – 5,3 ± 0,3 г/л; для *P. fluorescens* PCS-20 – 7,5 ± 0,4 г/л; для *P. putida* PP021 – 9,8 ± 0,5 г/л. Содержание целевых биосурфактантов в КЖ при экстракции органическими растворителями из КОФ находилось в диапазоне 120-155 мг/л (1,2-2,9 % от массы КОФ). Полученные данные в совокупности подтверждают, что выбранные промышленные субстраты обеспечивают кинетику биосинтеза, полностью сопоставимую с лабораторными условиями, и пригодны для масштабирования процесса.

Различия в выходе КОФ обусловлены как видовой спецификой продуктивности штаммов, так и химической природой синтезируемых ими биосурфактантов. Рамнолипиды, имеющие в составе углеводные фрагменты, эффективнее соосаждаются при подкислении культуральной жидкости, чем липопептиды, преимущественно, представленные сурфактином и фенгицином. Кроме того, высушенные порошки КОФ визуально различались: для *B. mojavensis* P1709 был характерен светло-коричневый оттенок, обусловленный остатками мелассы и солей, тогда как у продукта *Pseudomonas* был более темный цвет за счет остатков отработанного растительного масла и продуктов его окисления. При этом окраска не влияла на функциональные свойства полученных фракций

В пятой главе представлены физико-химические свойства, биобезопасность и применение биосурфактантов, продуцируемых *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20.

Получение и характеристика кислотоосаждаемой фракции биосурфактантов. В ходе дальнейшей работы из бесклеточного супернатанта КЖ получали КОФ методом кислотного осаждения. Процесс включал отделение биомассы центрифугированием, подкисление супернатанта 5 M HCl до pH 2,0 с выдерживанием при 4 °C в течение 12 ч, отделение осадка центрифугированием при 10 000 g и 4 °C и высушивание до постоянной массы при 50 °C. Полученную КОФ использовали в виде сухого порошка для оценки токсичности, биоразлагаемости, термостабильности и в экспериментах по защите растений, а в виде водного раствора – в экспериментах по нефтеотдаче. Выход КОФ при культивировании 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 7,5±0,4 г/л для *P. fluorescens* PCS-20. При использовании промышленных субстратов после промывки и нейтрализации выход КОФ составил 4,2±0,2 г/л для *B. mojavensis* P1709 и 7,8±0,4 г/л для *P. putida* PP021. Полученные фракции представляли собой сухие сыпучие порошки с массовой долей влаги не более 5 %.

Определение состава биосурфактантов, продуцируемых B. mojavensis P1709, P. putida PP021 и P. fluorescens PCS-20. Методом ТСХ для *B. mojavensis* P1709 выявлены пятна с R_f 0,13 и 0,51, соответствующие стандартам фенгицина и сурфактина; окрашивание йодом и нингидрином подтвердило липидную и пептидную природу. Для *P. putida* PP021 (R_f 0,74 и 0,79) и *P. fluorescens* PCS-20 (R_f 0,65 и 0,70) пятна соответствовали моно- и дирамнолипидам; окрашивание йодом и пара-анисовым альдегидом подтвердило наличие липидных и углеводных (рамнозных) фрагментов.

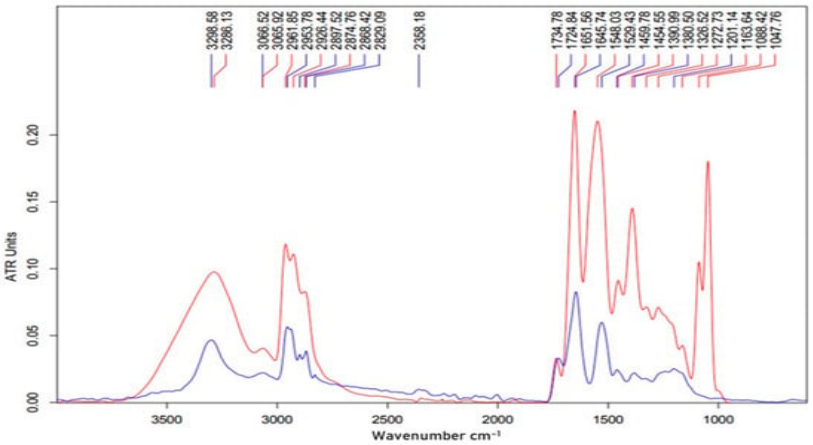


Рисунок 3 – Оценка химической структуры биосурфактантов: ИК-спектры биосурфактанта, продуцируемого *B. mojavensis* P1709 (синий) и стандарта сурфактина (красный)

Химическую структуру и природу синтезируемых биосурфактантов подтверждали методом ИК-Фурье спектроскопии. На рисунке 3 в качестве примера приведен ИК-спектр биосурфактанта, продуцируемого *B. mojavensis* P1709, и стандарта сурфактина; спектры для продукта штаммов *Pseudomonas* имеют аналогичный характер полос в области углеводных фрагментов. В спектре биосурфактантов *B. mojavensis* P1709 выявлены полосы, характерные для липопептидов: 3292-3276 $см^{-1}$ (амидные N-H), 1659-1648 $см^{-1}$ (амид I, C=O), 1630-1510 $см^{-1}$ (амид II, C–N и N–H) и 2933-2855 $см^{-1}$ (алифатические C-H), что соответствует стандарту сурфактина. Для биосурфактантов *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021 ИК-спектры демонстрируют полосы, характерные для гликолипидов: широкая полоса 3292-3286 $см^{-1}$ (O-H углеводов), пики 3066-2953 $см^{-1}$ (C-H алкильных цепей) и сигнал 1734-1724 $см^{-1}$ (эфирные C=O). Полученные данные согласуются с результатами генетического анализа, подтверждая, что *B. mojavensis* P1709 производит липопептиды, а бактерии рода *Pseudomonas* – рамнолипиды.

Оценка токсичности биосурфактантов, продуцируемых B. mojavensis P1709, P. putida PP021 и P. fluorescens PCS-20. Токсичность биосурфактантов оценивали по 48-часовому тесту на *Ceriodaphnia affinis*. Значения EC_{50} составили 170, 195 и 310 мг/л для биосурфактантов *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20 соответственно, что на порядки превышает токсичность химических ПАВ (например, для анионного ПАВ EC_{50} = 15 мг/л). Низкая токсичность является критически важной для послеуборочной обработки плодов, поскольку свидетельствует о низком уровне экотоксикологической нагрузки на гидробионтов.

Оценка биоразлагаемости биосурфактантов, продуцируемых B. mojavensis P1709, P. putida PP021 и P. fluorescens PCS-20. Биоразлагаемость биосурфактантов изучали по минерализации углерода аэробным микробным сообществом (рисунок 4).

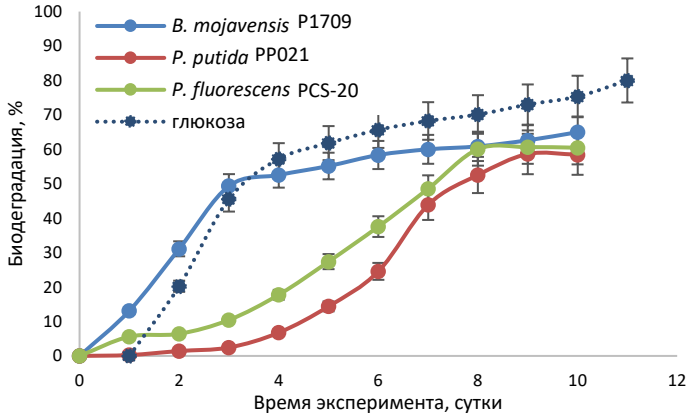


Рисунок 4 – Уровень биодеградации биосурфактантов, продуцированных *B. mojavensis* P1709, *P. putida* PP021 и *P. fluorescens* PCS-20, в течение 10 суток

Таблица 3 – Изменение поверхностного натяжения раствора биосурфактантов в результате их биодеградации

Штамм-продуцент биосур-фактантов	Поверхностное натяжение водного раствора биосурфактантов (в концентрации 100 мг/л), мН/м	
	До биодегра-дации	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

Показано, что биосурфактанты *B. mojavensis* P1709 минерализовались быстрее: на 3-и сутки доля минерализованного углерода достигла 31 % от теоретического максимума. Для биосурфактантов *Pseudomonas* на 3-и сутки минерализация составляла 1–6 % и выходила на плато на 8-9 сутки. К концу эксперимента все образцы соответствовали уровню «легко деградируемые вещества» (USEPA). Подтверждением биодеградации биосурфактантов также выступает и изменение поверхностного натяжения от начала до конца инкубирования с аэробным сообществом – так, показатель поверхностного натяжения увеличился для всех штаммов в 1,74-2,36 раза (таблица 3). Так, время функционального действия биосурфактантов составляет 2-7 сут., что достаточно для подавления патогенов или стимуляции иммунного ответа.

Различия в скорости минерализации обусловлены химическим строением молекул. Липопептиды *B. mojavensis* P1709, содержащие гидролизуемые пептидные связи, быстрее подвергаются ферментативному расщеплению микробным сообществом. Рамнолипиды *Pseudomonas* требуют более длительной адаптации микроорганизмов-деструкторов, однако к концу эксперимента все исследуемые образцы полностью соответствовали критериям экологически безопасных веществ. В качестве источника микробного инокулюма использовали активный ил очистных сооружений, предварительно адаптированный к минеральной среде. Также в качестве положительного контроля разложению подвергалась глюкоза, биоразлагаемость которой составила 70 % на 10 сут. При этом величины поверхностного натяжения после биодеградации были существенно ниже для синтетических ПАВ, что указывает на сохранение частичной функциональной активности и возможность хранения биосурфактантов без полной потери свойств

Термическая стабильность кислотоосаждаемых фракций, содержащих биосурфактанты B. mojavensis P1709 и P. putida PP021. Для обоснования режима сушки исследована термическая стабильность КОФ, содержащих биосурфактанты *B. mojavensis* P1709 и *P. putida* PP021, при температурах 25-120 °C. Установлено, что нагревание до 120 °C не вызывает значимой деградации биосурфактантов: снижение эмульгирующей активности E24 не превышает 5-7 %, а повышение поверхностного натяжения составляет не более 1,1-1,5 мН/м. Полученные результаты подтверждают возможность применения термической сушки при получении биопрепаратов.

Защита плодов томатов от фитопатогенных грибов с использованием биосурфактантов B. mojavensis P1709. Фитопатогенные грибы, в том числе представители рода *Fusarium*, вызывают значительные потери урожая и снижение качества плодов при хранении. Перспективной альтернативой химическим фунгицидам являются липопептидные биосурфактанты бактерий рода *Bacillus*, обладающие противогрибковой активностью и способностью стимулировать защитные реакции растений. В данной главе исследована эффективность КОФ, содержащей биосурфактанты *B. mojavensis* P1709, в отношении *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. Оценку проводили в экспериментах in *vitro* и *in vivo* с использованием плодов томатов черри (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*). Применение КОФ позволяет сохранить комплекс биологически активных метаболитов без дополнительных стадий экстракции и очистки органическими растворителями. Для оценки противогрибковой активности использовали КОФ в диапазоне концентраций 0,5-20 г/л. Первоначально оценили способность КОФ ингибировать радиальный рост *F. oxysporum* и продукцию микотоксинов на агаризованной среде (рисунок 5а). Рост колоний подавлялся на 28±3 % при 0,5 г/л и на 93±11 % при 20 г/л КОФ. На следующем этапе работ, в агаризованной среде под мицелием определяли содержание двух микотоксинов, характерных для грибов рода *Fusarium* – Т-2 и НТ-2. В контрольных образцах, куда липопептиды не добавлялись, их суммарное содержание составило 76 мкг/г. При внесении КОФ в концентрации 0,5 г/л содержание микотоксинов снизилось на 85 %, а при концентрации 20 г/л – на 95 %. Этот результат позволяет предположить, что метаболизм микромицетов был изменен, несмотря на возможность частичного роста мицелия. 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 %, что соответствует 400-600 мг/л действующего вещества. Такие высокие дозы в агаризованных средах применяются для оценки максимального потенциала препарата, поскольку часть биосурфактанта неизбежно сорбируется на компонентах питательной среды. Для последующих экспериментов *in vivo* рабочая концентрация была оптимизирована до 10 г/л.

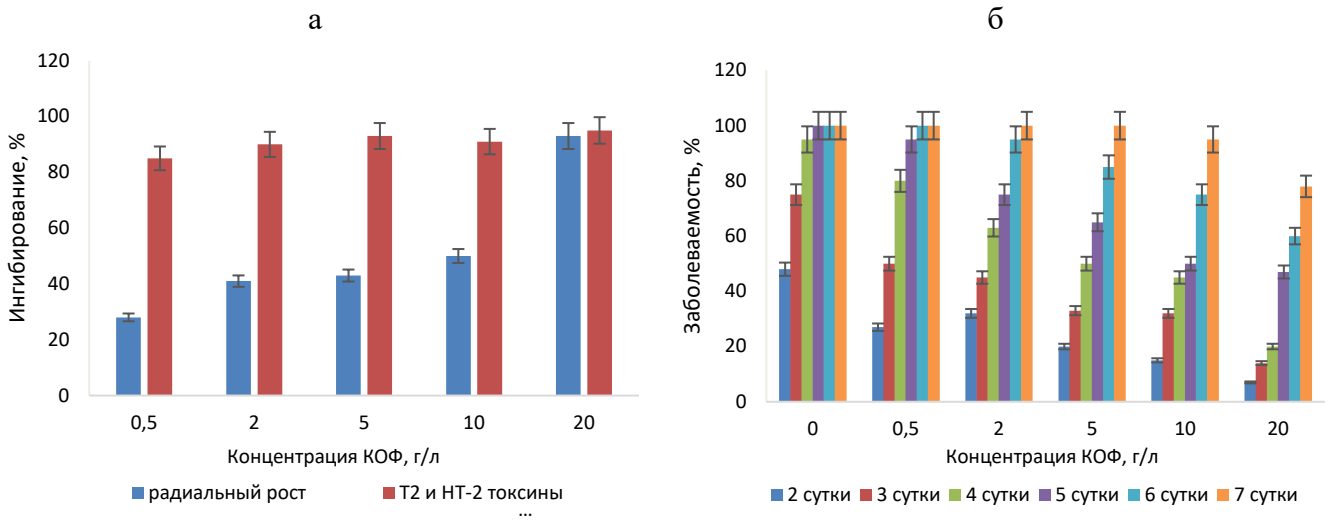


Рисунок 5 – Ингибирование радиального роста и продукции микотоксинов *F. oxysporum* в присутствии КОФ (а), заболеваемость плодов томатов черри, обработанных *F. oxysporum* в присутствии КОФ, продуцируемого *B. mojavensis* P1709 (б)

Далее оценивали влияние КОФ на рост фитопатогена *in vivo* на томатах черри. Установлено, что КОФ подавлял рост *F. oxysporum* при всех используемых концентрациях (от 0,5 до 20 г/л) и что эффект был более выраженным при более высоких концентрациях. Так, после двух дней инкубации заболеваемость оценивалась в 48 % в контрольном варианте, а также в 27 % и 7 % в вариантах, обработанных 0,5 г/л и 20 г/л КОФ соответственно (рисунок 5б). Заболеваемость со временем увеличивалась при всех концентрациях; этот показатель достигал 100 % на 5-е сутки после инокуляции в контрольном варианте и на 6-е, 7-е и 7-е сутки в вариантах, обработанных 0,5, 2 и 5 г/л биосурфактантом соответственно, но не достигал 100 % в вариантах, обработанных 10 и 20 г/л в течение всего эксперимента.

Анализ динамики заболеваемости показал выраженный дозозависимый эффект. При концентрациях 10 и 20 г/л КОФ полностью ингибировала развитие патогена на плодах в течение всего периода наблюдения. Это свидетельствует о том, что вместе с прямым подавлением роста мицелия, КОФ обеспечивает пролонгированное защитное действие, предотвращая развитие послеуборочных инфекций

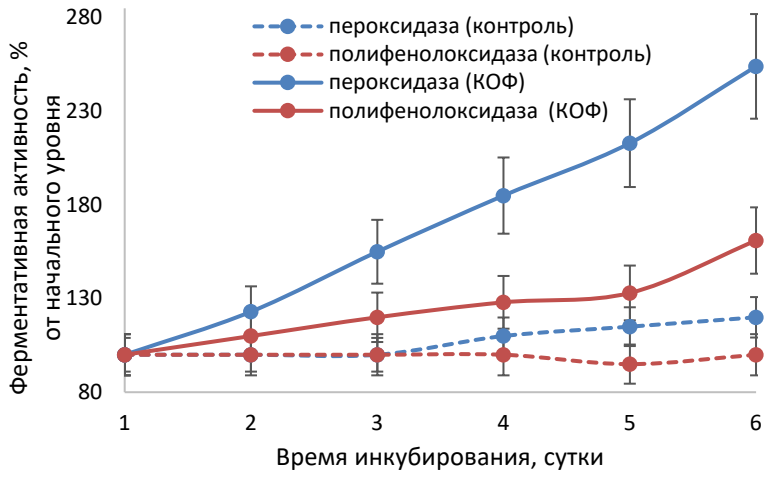


Рисунок 6 – Пероксидазная и полифенолоксидазная активность в ткани томатов черри, инфицированных *F. oxysporum* и обработанных КОФ *B. mojavensis* P1709

Также нами была проведена оценка способности КОФ *B. mojavensis* P1709 увеличивать продукцию двух защитных ферментов – полифенолоксидазы и пероксидазы – в плодах томатов черри, зараженных *F. oxysporum*. Исходная активность полифенолоксидазы и пероксидазы в тканях томатов черри составляла 27,1 и 4,2 ед./г соответственно. У контрольных томатов черри, искусственно зараженных возбудителем, но не обработанных КОФ, активность полифенолоксидазы существенно не менялась в течение 6 дней инкубации (рисунок 6).

Уровень активности пероксидазы в контроле увеличился на 20 % в течение 6 суток, что, скорее всего, свидетельствует о естественных ответных процессах плодов томата на инвазию патогена. При обработке плодов томатов черри раствором биосурфактантов уровень активности обоих ферментов значительно повышался - на 254 % и 161 % на 6 сутки для пероксидазы и полифенолоксидазы соответственно. Это позволяет предположить, что липопептиды, продуцируемые *B. mojavensis* P1709, воздействуют на *F. oxysporum* с использованием различных механизмов – напрямую ингибируют рост, подавляют продукцию микотоксинов и, наконец, стимулируют иммунный ответ клеток организма-хозяина для подавления фитопатогена, что позволяет обеспечить их сохранность после обработки раствором липопептидов. Более высокий уровень активности ферментов в обработанных плодах по сравнению с контролем указывает на активацию собственных механизмов системной устойчивости растения-хозяина.

Увеличение нефтеотдачи пластов с использованием биосурфактантов P. putida PP021. ПАВ в нефтедобыче используются как для снижения вязкости нефти, так и для изменения поверхностных свойств пор коллектора, в которых она закрепляется. Применение ПАВ может значительно увеличить нефтеотдачу – на 20-50 %, однако химически синтезированные ПАВ зачастую накапливаются в окружающей среде и приводят к ряду негативных экологических эффектов. Использование биосурфактантов вместо традиционных ПАВ может сохранить увеличенную нефтеотдачу и снизить нагрузку на окружающую среду. На данном этапе работ нами была оценена возможность применения биосурфактантов, продуцируемых штаммами *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021, в технологиях повышения нефтеотдачи. Апробацию для сурфактантов *P. fluorescens* PCS-20 проводили на модельных песчаных колонках, для сурфактантов *P. putida* PP021 – на модельных песчаных колонках и в системе с керном.

Способность биосурфактантов, продуцируемых P. fluorescens PCS-20, повышать третичную нефтеотдачу. Эффективность очищенных биосурфактантов, продуцируемых *P. fluorescens* PCS-20, в отношении вытеснения нефти оценивали в экспериментах на модельных песчаных колонках со средним поровым объёмом (PV – Pore Volume) 53,6 мл и начальными запасами нефти (OOIP – Original Oil in Place) 43,8 мл. В качестве препарата сравнения использовали химически синтезированный ПАВ (таблица 4, рисунок 7).

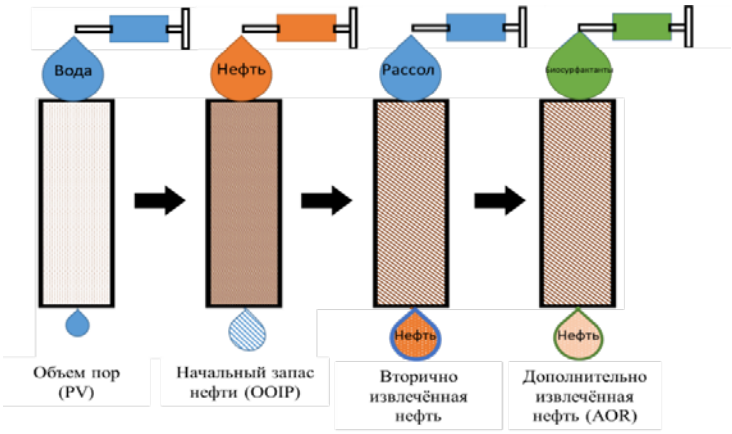


Рисунок 7 – Схема сравнения эффективности синтетического и биологически продуцированного сурфактантов для повышения нефтеотдачи

Таблица 4 – Сравнение эффективности синтетического и биологически продуцированного сурфактантов для повышения нефтеотдачи

Вариант	PV (мл)	OOIP (мл)	OOIP - Sorwf (мл)	AOR (%)
Контроль	53,1±0,6	41,5±1,1	23,1±1,1	0
Биосурфактант 0,1 %	53,8±0,8	42,7±1,1	26,4±1,3	28,6±0,4
Биосурфактант 0,5 %	54,2±0,3	44,9±0,8	27,9±1,0	31,4±0,5
Синт. ПАВ 0,1 %	52,9±0,5	47,5±1,0	26,4±1,2	32,0±0,5
Синт. ПАВ 0,5 %	54,0±0,3	42,2±0,9	28,5±0,8	32,9±0,7

Обработка колонок очищенными биосурфактантами *P. fluorescens* PCS-20 позволила достичь дополнительного нефтеизвлечения (AOR – Additional Oil Recovery) на уровне 28 % и 31 %, тогда как химически синтезированный ПАВ позволял извлечь 32 % и 33 % при концентрации действующего вещества 0,1 % и 0,5 % соответственно.

Способность кислотноосажденной фракции биосурфактантов, продуцируемых P. putida PP021, повышать третичную нефтеотдачу. Во втором случае оценивалась эффективность КОФ биосурфактантов *P. putida* PP021 без дополнительной очистки. Эксперименты проводили на двух моделях: песчаных колонках при 25 °С и натурных кернах при 39 °С (рисунок 8). Использование керна позволяет приблизиться к условиям, близким к пластовым с точки зрения пористости и проницаемости, однако не позволяет сопоставить результаты различных экспериментов между собой.

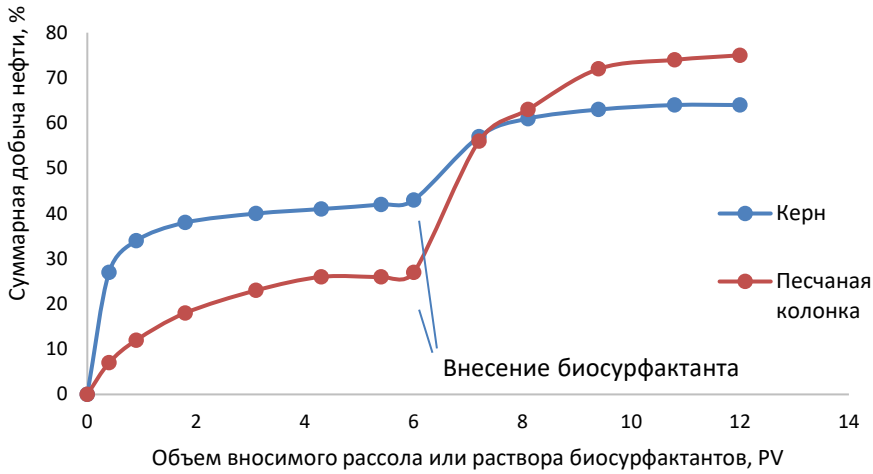


Рисунок 8 – Вторичная (до) и дополнительная (после внесения биосурфактантов) нефтеотдача, оцененная в модельных экспериментах с песчаными колонками и керном

Установили, что среднее значение порового объема (PV) в эксперименте с песчаными колонками составляет 6,16±0,12 мл, объем задержавшейся в колонках нефти (начальные запасы нефти, OOIP) равен 3,81±0,06 мл, а объем объем нефти после вторичного вытеснения рассолом (Sorwf – остаточная нефтенасыщенность после вторичного вытеснения) в среднем составляет 1,95±0,9 мл. В эксперименте с вытеснением нефти из керна оценивали те же показатели. Установили, что среднее значение порового объема (PV) для керна составляет 12,67±0,8 мл, объем нефти после вторичного вытеснения рассолом в среднем составляет 3,72±0,10 мл.

В обоих системах использование биосурфактантов позволило увеличить объем добываемой нефти, однако уровень такого увеличения различался. Так, при моделировании на песчаных колонках использование КОФ обеспечило AOR на уровне 48 % по сравнению с остаточной нефтью после вторичного вытеснения. В опытах же с керном дополнительная нефтеотдача составила 21 %. Более низкие значения AOR для модели с керном могут быть объяснены меньшим размером пор и большей площадью их поверхности. Различия для двух модельных систем подтверждают необходимость их совместного использования при оценке эффективности сурфактантов для нефтедобычи. Штамм *P. fluorescens* PCS-20 послужил модельным объектом для отработки методологии получения гликолипидов и их тестирования в процессах нефтевытеснения. Однако по соображениям биобезопасности (потенциальная оппортунистическая патогенность биомассы) для промышленной реализации биопрепарата ППН был выбран полностью безопасный штамм *P. putida* PP021, не уступающий по продуктивности и эффективности.

Так, КОФ является эффективной заменой очищенными биосурфактантами в технологиях увеличения нефтеотдачи. В лабораторных испытаниях использовали КОФ без промывки и нейтрализации. Промышленная технология включает эти стадии, что повышает содержание биосурфактантов в биопрепарате (до 3,0 % для ДЗР и 2,0 % для ППН) и, соответственно, позволяет снизить рабочие концентрации при применении: для ДЗР – до 8 г/л, для ППН – до 0,4 % (масс).

В шестой главе представлена разработка биотехнологий получения бактериальных препаратов на основе биосурфактантов.

Блок-схема технологии получения бактериальных препаратов. На основании экспериментальных данных разработаны биотехнологии получения двух биопрепаратов – ДЗР для защиты растений и ППН для повышения нефтеотдачи. Блок-схема технологического процесса получения бактериальных препаратов представлена на рисунке 9.



* – масляная фракция образуется при культивировании на маслосодержащей среде

Рисунок 9 – Блок-схема технологического процесса получения бактериальных препаратов на основе биосурфактантов

Разработанная технология включает подготовку питательных сред, получение посевного материала, направленный биосинтез биосурфактантов, первичное разделение КЖ, выделение и очистку КОФ, контроль качества, фасовку и хранение готовых препаратов.

Расчет материального баланса. На основании установленных выходов КОФ и параметров технологического процесса рассчитаны материальные балансы получения биопрепаратов ДЗР и ППН при рабочем объеме основного ферментера 2000 л. В расчетах учтены выход целевых биопрепаратов и образование побочных продуктов – влажной бактериальной биомассы и масляной фракции. При проведении одного цикла культивирования *B. mojavensis* P1709 в ферментере рабочим объемом 2000 л расчетный выход биопрепарата ДЗР составляет 8,4 кг. Товарная форма представляет собой высушенную КОФ с остаточной влажностью 3-5 % и содержанием активного липопептида 3,0 %. Дополнительно образуется 180-220 кг влажной биомассы *B. mojavensis* P1709 с влажностью 75-82 % после сепарации, потенциально пригодной для использования в качестве органического удобрения или биоремедианта. При проведении одного цикла культивирования *P. putida* PP021 в ферментере рабочим объемом 2000 л расчетный выход биопрепарата ППН составляет 15,6 кг. Товарная форма представляет собой высушенную КОФ с остаточной влажностью 3-5 % и содержанием активного рамнолипида 2,0 %. Дополнительно образуется 180-220 кг влажной биомассы *P. putida* PP021 и 20-30 кг масляной фракции, которую предусматривается использовать для внутренних технических нужд производства.

Подбор оборудования. На основании разработанных материальных балансов и технологических параметров подобран комплекс оборудования для производства биопрепаратов ДЗР и ППН. Производственная линия предусматривает оборудование для восстановления культур и подготовки инокулята, посевные ферментеры, три основных ферментера объемом 3000 л с рабочим объемом 2000 л каждый, оборудование для первичного разделения КЖ, реактор-осадитель,

оборудование для выделения и промывки КОФ, распылительную сушилку и бункер готового продукта. Основные ферментеры эксплуатируются в режиме чередования загрузки.

Описание принципиальной технологической схемы. На основании разработанной блок-схемы, рассчитанных материальных балансов и подобранного комплекта оборудования разработана принципиальная технологическая схема получения биопрепаратов ДЗР и ППН (рисунок 10).

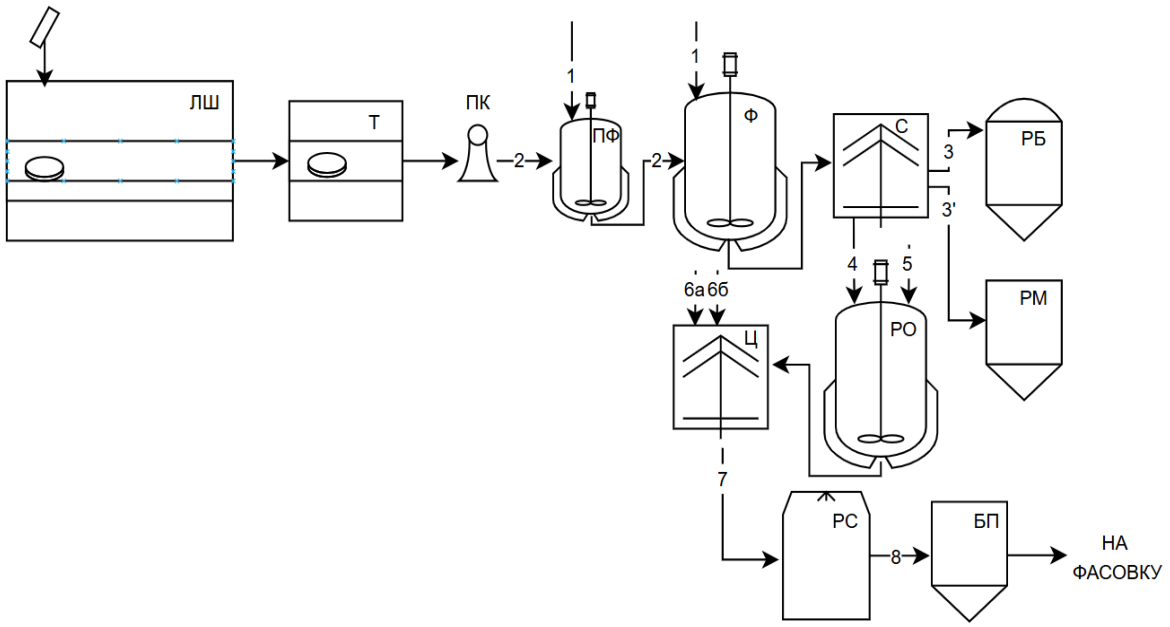


Рисунок 10 – Принципиальная технологическая схема получения бактериальных препаратов ДЗР и ППН на основе биосурфактантов

Экспликация оборудования: ЛШ – ламинарный шкаф; Т – термостат; ПК – колба с прекультурой; ПФ – посевной ферментёр; Ф – основной ферментёр; С – декантерная центрифуга; РБ – резервуар биомассы; РМ – резервуар масляной фракции; РО – реактор-осадитель; Ц – центрифуга с выгрузкой осадка; РС – распылительная сушилка; БП – бункер готового препарата. Материальные потоки: 1 – стерильная питательная среда; 2 – посевной материал; 3 – влажная биомасса; 3' – масляная фракция; 4 – бесклеточный супернатант; 5 – 2М HCl; 6а – подкисленная вода для промывки; 6б – 1М NaOH для нейтрализации; 7 – нейтрализованный концентрат; 8 – сухой биопрепарат.

Схема построена по принципу параллельно-последовательной организации процесса с использованием трех основных ферментеров, работающих со сдвигом фаз, что обеспечивает ритмичную загрузку общего оборудования для последующих стадий разделения и очистки. Технологический процесс включает три взаимосвязанные стадии.

Стадия I. Подготовка инокулята и направленный биосинтез. Процесс инициируется в асептических условиях ламинарного шкафа (ЛШ). Лиофилизированные культуры *B. mojavensis* P1709 и *P. putida* PP021 восстанавливают на плотной среде LB и инкубируют в термостате (Т) при 30±1 °С в течение 24-48 ч. Выросшие колонии переносят в колбы (ПК) с жидкой средой и культивируют на орбитальном шейкере при 140 об/мин и 30±1 °С в течение 12-14 ч. Полученную прекультуру переносят в посевной ферментер (ПФ). Для биопрепарата ДЗР (*B. mojavensis* P1709) используют ПФ объемом 30 л с 20 л продукционной среды (меласса - 30 г/л, гидролизат рыбной муки – 5 г/л, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5 г/л). Культивирование ведут 14-16 ч до OD_{600} = 2,5-3,0. Для биопрепарата ППН (*P. putida* PP021) применяют ПФ объемом 50 л с 30 л среды (отработанное растительное масло - 20 г/л, $NaNO_3$ - 3 г/л, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5 г/л). Продолжительность этапа - 18-20 ч до OD_{600} = 3,0-3,5.

Основной биосинтез проводят в ферментерах (Ф) объемом 3000 л (рабочий объем 2000 л) в автоматическом режиме. Для получения биопрепарата ДЗР процесс длится 24 ч при 30±0,5 °С, pH 7,0±0,2, аэрации 120-130 м³/ч и перемешивании 150-200 об/мин. Для получения биопрепарата ППН ферментация длится 36 ч при 30±0,5 °С, pH 7,0±0,2, аэрации 190-250 м^3/ч и перемешивании 100-150 об/мин. Для предотвращения неконтролируемого пенообразования в аппаратах предусмотрен

механический дисковый пеногаситель. Онлайн-контроль процессов осуществляется с помощью системы *in situ* сенсоров (pH, pO2, температура), а также периодическим отбором проб для анализа остаточного субстрата, E24 и поверхностного натяжения.

Стадия II. Первичное разделение. По завершении ферментации культуральную жидкость (КЖ) охлаждают в основном ферментере до 10-15 °C (для предотвращения термической деградации метаболитов) и подают на трехфазный декантерный сепаратор (С) производительностью до 5 $м^3$/ч. В результате разделения получают три потока. Первый - влажная биомасса (влажность 75-82 %) в количестве 180-220 кг на цикл, которая направляется в резервуар биомассы (РБ) для последующей сушки и реализации в качестве органического удобрения. Второй - бесклеточный супернатант (фугат) объемом 1850-1900 л, который поступает в реактор-осадитель (РО). Третий поток (только для биопрепарата ППН) - масляная фракция в количестве 20-30 кг на цикл, которую отводят в резервуар масла (РМ) для возврата в технологический цикл или реализации как техническое масло.

Стадия III. Выделение и очистка биосурфактантов и получение товарных форм. Бесклеточный супернатант из РО охлаждают до 4-10 °C и при постоянном перемешивании (40-60 об/мин) дозируют 2 М HCl до достижения pH 2,0±0,1. Расход кислоты составляет 12-15 л для биопрепарата ДЗР и 18-22 л для биопрепарата ППН. Смесь выдерживают для укрупнения и осаждения хлопьев кислотоосаждаемой фракции. Полученную суспензию направляют на центрифугу с выгрузкой осадка (Ц), где отделяется отработанный супернатант, направляемый на нейтрализацию и утилизацию. Осадок КОФ промывают холодной водой, подкисленной до pH 2,0, и нейтрализуют 1 М раствором NaOH до pH 6,5-7,0 непосредственно в центрифужных стаканах.

Полученный нейтрализованный концентрат с влажностью 65-70 % направляют в распылительную сушилку (РС). Сушка осуществляется при температуре входящего воздуха 120-140 °C и выходящего 70-80 °C, что обеспечивает остаточную влажность готового порошка 3-5 %. Полученный сухой биопрепарат поступает в бункер готового продукта (БП) для фасовки. Все контактирующие с продуктом поверхности оборудования выполнены из коррозионностойкой нержавеющей стали 316L, а схема предусматривает автоматизированную безразборную мойку (CIP) и стерилизацию (SIP) между циклами.

Разработка норм качества биопрепаратов ДЗР и ППН. На основании экспериментальных исследований разработаны нормы качества биопрепаратов ДЗР и ППН, включающие органолептические, физико-химические, функциональные и микробиологические показатели. Оба препарата представляют собой сухие сыпучие порошки с массовой долей влаги не более 5 %. Массовая доля золы не должна превышать 15 % для биопрепарата ДЗР и 20 % для биопрепарата ППН. Поверхностное натяжение 1 % водных растворов препаратов составляет не более 30 мН/м, эмульгирующая активность E24 – не менее 50 и 70 % соответственно. Содержание активного биосурфактанта составляет не менее 2,5 % для биопрепарата ДЗР и 1,5 % для биопрепарата ППН. Установлены требования к микробиологической чистоте препаратов: КМАФАнМ – не более 1×10^3 КОЕ/г, содержание дрожжей и плесеней – не более 1×10^2 КОЕ/г, отсутствие бактерий группы кишечной палочки в 1 г. Срок годности биопрепаратов в герметичной упаковке при температуре 5-25 °C составляет не менее 12 месяцев.

Технико-экономическое обоснование разработанных биотехнологий получения биопрепаратов ДЗР и ППН. Проведена технико-экономическая оценка производства биопрепаратов на универсальной технологической линии с тремя ферментёрами объёмом 3000 л каждый. При эффективном фонде рабочего времени 330 дней в год количество производственных циклов составляет 660 для ДЗР и 495 для ППН, что обеспечивает годовую производительность 5,5 и 7,7 т соответственно. Капитальные вложения в создание производства составляют 74,1 млн руб.

Расчёт себестоимости выполнен с учётом затрат на сырье, энергоресурсы, оплату труда, амортизацию оборудования и общепроизводственные расходы. Дополнительно учтена возможность реализации побочных продуктов (влажной биомассы и масляной фракции). Итоговая себестоимость составляет 2162,2 руб./кг для ДЗР и 2193,0 руб./кг для ППН. При отпускной цене 3500 руб./кг годовая выручка составляет 19,40 млн руб. для ДЗР и 27,03 млн руб. для ППН. Чистая прибыль составляет 5,93 млн руб. для ДЗР и 8,08 млн руб. для ППН, рентабельность производства – 49,5 и 47,7 % соответственно. Средневзвешенный срок окупаемости универсальной

производственной линии составляет 5,3 года. Стоимость послеуборочной обработки 1 т томатов биопрепаратом ДЗР составляет 280 руб., а приготовления 1 $м^3$ рабочего раствора ППН концентрацией 0,4 % - 8,8 тыс. руб. При переходе к промышленному масштабу с использованием ферментёров объёмом 10-15 $м^3$ прогнозируется снижение себестоимости до 250-350 руб./кг и сокращение срока окупаемости до 2 лет.

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 – 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 %, поверхностное натяжение = 28,3 мН/м), а для штаммов *P. fluorescens* PCS-20 и *P. putida* PP021 – глицерин-нитратная среда (E24 = 80 % и 85 % и поверхностное натяжение = 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 поверхностного натяжения 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 EC_{50}, 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 счет 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, соответственно. 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.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях

Научные статьи, опубликованные в зарубежных изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus/ Web of Science:

1. Galitskaya P. Lipopeptides produced by *Bacillus mojavensis* P1709 as an efficient tool to maintain postharvest cherry tomato quality and quantity / P. Galitskaya, K. Karamova, L. Biktasheva, G. Galieva, **A. Gordeev,** S. Selivanovskaya // Agriculture (Switzerland). – Т.12 (5). – Номер статьи 609. – DOI: 10.3390/agriculture12050609. (WoS; Scopus, *Q2=K1 (ВАК)*)

2. Biktasheva L. Di- and monorhamnolipids produced by the *Pseudomonas putida* PP021 isolate significantly enhance the degree of recovery of heavy oil from the Romashkino oil field (Tatarstan, Russia) / L. Biktasheva, **A. Gordeev**, S. Selivanovskaya, P. Galitskaya // Processes. – 2022. – Т.10 (4). – Номер статьи 779. — DOI: 10.3390/pr10040779. (WoS; Scopus, *Q2=K1 (ВАК)*)

3. Galitskaya P. Bacterial cultural media containing lipopeptides for heavy oil recovery enhancement: the results of sand-packed column experiment / P. Galitskaya, **A. Gordeev,** N. Ezhkin, L. Biktasheva, P. Kuryntseva, S. Selivanovskaya // Processes. – 2023. – Т.11 (11). – Номер статьи 3203. – DOI: 10.3390/pr11113203. (WoS; Scopus, *Q3=K1 (ВАК)*)

4. Biktasheva L. Bioremediation of oil-contaminated soils using biosurfactants produced by bacteria of the genus *Nocardiopsis* sp. / L. Biktasheva, **A. Gordeev,** A. Usova, A. Kirichenko, P. Kuryntseva, S. Selivanovskaya // Microbiology Research. – 2024. – Т.15 (4). – С.2575-2592. (WoS; Scopus, *Q3=K1 (ВАК)*)

Результаты интеллектуальной деятельности:

5. **Гордеев А.С.** База данных технологий производства и очистки биосурфактантов: свидетельство о государственной регистрации базы данных RU № 2022623032, 22.11.2022 / **А.С. Гордеев,** П.А. Курынцева, П.Ю. Галицкая, Л.Р. Бикташева; правообладатель ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». Заявка №2022622987, 14.11.2022.

6. **Гордеев А.С.** Программа для спектроскопической идентификации биосурфактантов, применяемых в нефтедобыче, по характеристическим участкам ИК-спектров: свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ RU №2023683530, 08.11.2023 / **А.С. Гордеев**, С.Ю. Селивановская, П.Ю. Галицкая, Л.Р. Бикташева; правообладатель ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». Заявка №2023682990, 30.10.2023.

7. Бикташева Л.Р. База данных микроорганизмов, продуцирующих метаболиты с эмульгирующей и поверхностно-активной активностью: свидетельство о государственной регистрации базы данных RU №2025624611, 22.10.2025 / Л.Р. Бикташева, **А.С. Гордеев**, А.А.

Кириченко, П.А. Курынцева; правообладатель ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». Заявка №2025624246, 15.10.2025.

Публикации в других научных изданиях:

8. Biktasheva L. Application of culture supernatants containing surfactants to enhance oil recovery / L. Biktasheva, N. Ezhkin, Z. Osmorskaya, **A. Gordeev**, P. Kuryntseva // SGEM. – 2024. – Т. 24 (1.1). – С. 541-547.

9. Kirichenko A. Optimization of cultivation conditions for biosurfactant production by *Bacillus mojavensis* P1709, *Pseudomonas putida* PP021, and *Pseudomonas fluorescens* PCS-20 strains / A. Kirichenko, **A. Gordeev,** L. Biktasheva // Bio Web of Conferences. – 2025. – Т.160. – № Art. 01015. – DOI: 10.1051/bioconf/202516001015.

10. **Gordeev A.** Screening of effective biosurfactant-producing bacteria from plant rhizosphere and oil-polluted soils / **A. Gordeev**, L. Biktasheva, P. Galitskaya // Bio Web of Conferences. – 2025. – Т.160. – № Art. 02018. – DOI: 10.1051/bioconf/202516002018.

11. **Гордеев А.С.** Фунгицидная активность биосурфактантов, выделенных из штаммов *Bacillus amyloliquefaciens* B-12464 и *Bacillus mojavensis* PS17 / **А.С. Гордеев**, Н.А. Ежкин, З.И. Осморская // Plantae & Fungi – 2023: сб. тезисов конф., Владивосток, 25-29 сент. 2023 г. – С. 12.

12. **Гордеев А.С.** Сравнение эффективности синтетического и биологически продуцированного сурфактантов для повышения нефтеотдачи (эксперимент на насыпных моделях) / **А.С. Гордеев**, Л.Р. Бикташева, П.А. Курынцева, С.Ю. Селивановская, П.Ю. Галицкая // Нефтяное хозяйство. – 2024. - №2. - С.79-83.

13. **Гордеев А.С.** Антагонистические свойства биосурфактантов, продуцируемых бактериями рода *Bacillus* spp. / **А.С. Гордеев**, Л.Р. Бикташева, Д.Н. Корнилова // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем: матер. Междунар. науч.-практ. конф., Краснодар, 17-19 сент. 2024 г. – Краснодар: ЭДВИ, 2024. – С. 119-126.

14. **Гордеев А.С**. Выделение микроорганизмов-продуцентов биосурфактантов из органических отходов / **А.С. Гордеев**, Л.Р. Бикташева, А.А. Кириченко // Актуальные аспекты современной микробиологии: XIV молодеж. школа-конф. с междунар. участием, Москва, 6-8 нояб. 2024 г. – М.: ВАШ ФОРМАТ, 2024. – С. 47-49.

15. Biktasheva L. Environmental adaptability and biosurfactant production of bacterial isolates from the Boca de Jaruco oil field (Cuba) / L. Biktasheva, **A. Gordeev,** T. Hernández, P. Galitskaya, S. Selivanovskaya // Arabian Journal of Geosciences. – 2025. – Т.18. – Номер статьи 17. – https://doi.org/10.1007/s12517-024-12130-z

16. **Гордеев А.С.** Ремедиация нефтезагрязненных почв биосурфактантами, продуцируемыми штаммом *Nocardiopsis* sp. 3mo / **А.С. Гордеев,** А.А. Кириченко, Л.Р. Бикташева // Геномика, метагеномика и молекулярная биология микроорганизмов: сборник тезисов IV Международной конференции. Сколтех, 25-26 октября 2025 г. – Москва: РУДН, 2026. – С.120-122.