

**ВЫДЕЛЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА И ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОЙ  
ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА БИОСУРАКТАНТОВ  
БАКТЕРИЯМИ РОДА *BACILLUS***<sup>1</sup>Сайлиев М.У, <sup>2</sup>Алимова Б.Х., <sup>3</sup>Пулатова О.М., <sup>4</sup>Махсумханов А.А., <sup>5</sup>Давранов К.Д.<sup>1,2,3,4,5</sup>Институт микробиологии Академии наук Республики Узбекистан, г.Ташкент,  
Узбекистан.e-mail: [shodliklaramiri90@gmail.com](mailto:shodliklaramiri90@gmail.com)<https://doi.org/10.5281/zenodo.8372673>

**Аннотация.** Из загрязнённых почв, нефтешламов, замазученных сточных вод, нефтегазовых скважин Бухарского и Кашкадарьинского НПЗ выделено 30 изолятов, с использованием качественных и количественных тестов скрининга отобрано два бактериальных изолята Н 6/4/2/1 и 9/2А как наиболее активных продуцентов биосурфактантов. На основании морфолого-культуральных свойств штаммы отнесены к роду *Bacillus*. Изучено влияние различных источников углерода и азота на биосинтез БС, установлено, что оптимальным источником углерода для биосинтеза БС является глицерин, а оптимальным источником азота мочевины.

**Ключевые слова:** выделение, скрининг, биосурфактант, индекс эмульгирования, экстракция, источники углерода, азота, бактерии рода *Bacillus*.

**Abstract.** 30 isolates were isolated from contaminated soils, oil sludge, oil-contaminated wastewater, oil and gas wells of the Bukhara and Kashkadarya oil refineries; using qualitative and quantitative screening tests, two bacterial isolates Н 6/4/2/1 and 9/2А were selected as the most active producers of biosurfactants. Based on morphological and cultural properties, the strains are assigned to the genus *Bacillus*. The influence of various carbon and nitrogen sources on the biosynthesis of BS was studied, and it was found that the optimal carbon source for the biosynthesis of BS is glycerol, and the optimal source of nitrogen is urea.

**Keywords:** isolation, screening, biosurfactant, emulsification index, extraction, sources of carbon, nitrogen, bacteria of the genus *Bacillus*.

Одним из перспективных направлений увеличения нефтеотдачи пластов являются микробиологические методы, основанные на способности микроорганизмов образовывать в процессе жизнедеятельности различные метаболиты, способствующие вытеснению нефти из вмещающих пород [1, 2]. Данные методы повышения нефтеотдачи привлекают внимание малой капиталоемкостью, эффективностью и экологической безопасностью.

Наиболее широкое применение в микробиологическом методе нефтеотдачи пластов получило использование биосурфактантов (БС).

Биосурфактанты (БС) – это поверхностно-активные вещества, синтезируемые микроорганизмами [3]. Обладая большим потенциалом совместимостью с окружающей средой, более высокой биоразлагаемостью, структурным разнообразием и более низкой критической концентрацией мицеллообразования (ККМ) они находят широкое применение в различных областях промышленности: охрана окружающей среды [4], пищевая промышленность [5], сельское хозяйство [6], биомедицина [7] и нанотехнологии [8]. Низкая токсичность, термическая и рН стабильность, устойчивость к воздействию солей также являются одними из преимуществ БС перед химическими ПАВ. Большинство микроорганизмов синтезируют БС внеклеточно, однако некоторые из них способны

синтезировать БС, связанные с плазматической мембраной. По происхождению и химической природе БС подразделяют на липопротеины, липопептиды, фосфолипиды, гликолипиды, полимерные молекулы и жирные кислоты. В зависимости от молекулярной массы они подразделяются на низкомолекулярные (липопептиды, рамнолипиды, трегалолипиды и софоролипиды) и высокомолекулярные (полимерные молекулы и липопротеины) [9].

Липопептидные БС основными продуцентами которых являются бактерии рода *Bacillus* являются одними из перспективных групп БС [10]. Одним из наиболее известных липопептидных БС синтезируемых бактериями рода *Bacillus* является сурфактин, биологические свойства которого широко используется для устранения органических и неорганических загрязнителей при биоремедиации участков, загрязненных нефтью, и в процессе повышения нефтеотдачи [11].

К сожалению, промышленное производство БС и их широкое применение в настоящее время ограничено из-за высокой стоимости производства БС по сравнению с синтетическими ПАВ [12]. В связи с этим, выделение, характеристика микроорганизмов продуцентов БС, подбор оптимальных питательных сред и условий их и культивирования для биосинтеза БС является актуальным.

Цель исследования: выделение, характеристика и подбор оптимальной питательной среды для биосинтеза БС бактериями рода *Bacillus*.

#### **Материалы и методы**

В исследовании использованы образцы загрязнённых почв, нефтешламов, замазученных сточных вод и нефтегазовых скважин Бухарского и Кашкадарьинского НПЗ.

Выделение проводили методом накопительных культур на минеральной питательной среде МСМ (минимальная солевая среда) с 1% нефтью. Образцы почв, нефтешламов и замазученных сточных вод в количестве 10 г (10мл) добавляли в минерально-солевую среду (МСМ) (100 мл), содержащую 1% (об. /об.) нефти в качестве источника углерода. Колбы инкубировали в течение 6 суток при температуре  $30 \pm 2$  °С на качалке (60 об/мин). Обогащенную культуру высевали на питательный агар (HiMedia) методом серийных разведений. Чашки инкубировали при 30 °С от 48 до 72 часов. После инкубации отбирали колонии с различной морфологией субкультивировали на питательном агаре для получения чистых культур [13].

Все выделенные в чистые культуры бактериальные изоляты протестированы на способность штаммов синтезировать БС на минимальной солевой среде (МСМ). Для приготовления инокулята каждый бактериальный изолят инокулировали в 5 мл бульона ТСБ в течение 14–18 ч при 30° С. Затем в концентрации 2% вносили в пробирки со средой MSM состав среды MSM:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 2,2 г/л,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 1,4 г/л,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,6 г/л,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,01 г / л,  $\text{NaCl}$  - 0,3 г/л,  $\text{CaCl}_2$  - 0,02 г/л и 0,1% раствор микроэлементов, содержащий;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 2,32 г/л,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 1,78 г/л,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 0,56 г/л,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 1,0 г/л,  $\text{NH}_4\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 0,39 г/л и  $\text{KI}$  - 0,66 г/л. в качестве источника углерода использовали глицерин 2%, а в качестве источника азота  $\text{NaNO}_3$ , в концентрации 0,2%, pH среды доводили до  $7,02 \pm 0,2$  с использованием 1 М HCl и 1 М NaOH перед инокуляцией.

Через 5 суток культивирования (во время поздней стационарной фазы) культуральную жидкость центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 10 минут при 4° С, и в бесклеточном супернатанте проводили скрининг на способность изолятов синтезировать БС.

**Скрининг на внеклеточную продукцию БС** проводили по нескольким общепринятым тестам. Тест на растекание нефти проводили в чашке Петри с 20 мл дистиллированной воды, на поверхность которой наносили 5 мл нефти, затем сверху наносили 30 мкл супернатанта. Диаметр прозрачной зоны на поверхности нефти измеряли и сравнивали с отрицательным контролем, в качестве отрицательного контроля служила дистиллированная вода. Тест на СТАВ-агаре и гемолитическую активность проводили по методу Госвани и Дека [14]. Индекс эмульгирования (ИЭ), показывающий способность штаммов эмульгировать углеводороды в водной среде, определяли методом Купера и Голденберга [15].

**Идентификация наиболее активных бактерий-продуцентов БС.** На этапе скрининга два изолята были отмечены как наиболее активные штаммы продуценты БС. Морфологию этих изолятов изучали с помощью световой микроскопии после окрашивания по Граму. Затем выполняли биохимические анализы в соответствии с «Руководством по систематической бактериологии» Берджи [16].

Для подтверждения принадлежности выделенных штаммов к одному виду проведён протеомный анализ клеток бактерий методом MALDI-TOF MS.

Влияние источников углерода и азота на биосинтез БС выделенных активных штаммов бактерий оценивали на среде МСМ с различными источниками углерода и азота. В исследовании было использовано пять источников углерода (сахароза, глюкоза, крахмал, глицерин и гексадекан) в различных концентрациях, в качестве контроля использована среде МСМ без источника углерода.

После подбора оптимального источника углерода, штаммы выращивали на среде с различными источниками азота, всего было использовано шесть вариантов сред с различными источниками азота в концентрации 1,0 г/л: мочевины,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Исходный pH среды 7,0.

Для получения посевного материала чистые культуры бактерий выращивали на среде ТСБ в течении 14-18 часов, затем в концентрации 2% вносили в питательную среду с различными источниками углерода и азота. Культуры инкубировали при 30°С при 150 об/мин в течение 72 часов. Бактериальную биомассу удаляли центрифугированием в условиях охлаждения (10000 об/мин в течение 20 мин), затем в супернатанте, после отделения клеток определяли изучали биосинтез БС.

**Выделение БС.** Для выделения БС использовали технологию экстракции БС (сочетание кислотного осаждения и экстракции растворителем) согласно Фатер и др. [17]. Для осаждения БС (липидов и белков) супернатант подкисляли 6N HCl до pH 2–4, после чего выдерживали 14–18 часов при температуре 4°С для усиления осаждения БС. Осадок отделяли центрифугированием при 12000 об/мин, затем растворяли в 10 мМ фосфатном буфере pH=7,0 и экстрагировали несколько раз равным объёмом смеси хлороформ:метанол в соотношении (2:1). Растворитель удаляли на роторном испарителе при температуре 45°С. Осадки неочищенных БС высушивали при 110 °С в течение 24 часов и взвешивали. В результате был получен неочищенный БС коричневого цвета.

## Результаты и обсуждение

### Выделение и скрининг бактерий рода *Bacillus*, продуцентов БС.

В настоящее время потенциальное коммерческое применение БС становится все более востребованным ввиду того, что они экологически безопасные и нетоксичные биомолекулы. Функции БС включают увеличение площади поверхности и биодоступности гидрофобных водонерастворимых субстратов, связывание тяжелых металлов, бактериальный патогенез, кворум-чувствительная регуляция и образование биопленок [3-8].

В настоящем исследовании из загрязнённых почв, нефтешламов и замазученных сточных вод Бухарского и нефтегазовой скважины Кашкадарьинского НПЗ отобрано 4 образца проб, из которых в процессе выделения, выделено в чистую культуру тридцать изолятов (таблица 1).

Отбор наиболее активных бактериальных изолятов на биосинтез БС проведен с использованием различных методов скрининга, результаты скрининга представлены в (таблице 1). Наиболее активные изоляты продуценты БС были отобраны в соответствии с их эффективностью для более чем одного скринингового теста.

Поскольку, для целесообразности практического применения БС большое значение имеет индекс эмульгирования ( $E_{24}$ ), первичный скрининг изолятов проводили по индексу эмульгирования, критерием определения стабильности эмульсии которых, является способность сохранять более 50% эмульсии в течение 24 часов. При изучении  $E_{24}$  супернатанта из 30 выделенных изолятов,  $E_{24}$  более 60 % наблюдался для 10 изолятов (2 ВГ 2%, 3 ВГ 2%, ВГ 2% ГД, Н 6/4/2/1, № 7/6/2, № 7/8/2, № 9/2А, № 9/2В, Н 4/1/1, и БК),  $E_{24}$  которых варьировал от 60 до 68%. Максимальный  $E_{24}$  наблюдался для изолята Н 6/4/2/1  $E_{24}$ , которого составил 68%. При использовании скрининга методом вытеснения нефти самые высокие значения вытеснения нефти обнаружены для изолятов Н 6/4/1, Н 6/4/2/1, Н 4/1/1, и 9/2А, 9/2Б, зона вытеснения нефти которых составляла 30,35,20 и 25 мм соответственно, тогда как для других изолятов зона вытеснения нефти не превышала 8 мм, следует отметить, что этот метод скрининга быстрый и простой в применении, поскольку не требуется специального оборудования и возможно использовать небольшой объем образца.

В тесте на гемолиз крови изоляты наносили штрихами на среду для чашек с кровяным агаром, максимальная гемолитическая активность наблюдалась у бактериальных изолятов 9/2А и 9/2Б и составляла 21 и 18 мм, тогда как для штаммов Н 6/4/1, Н 6/4/2/1, Н 4/1/1 варьировала от 14 до 17мм. По литературным данным почти все продуценты БС обладают положительной гемолитической активностью, тогда как не все гемолитические виды являются продуцентами БС. Так, исследования проведенные Noha H Youssef и др. показали, что из 205 штаммов относящихся к различным родам, сорок девять процентов штаммов не лизировали кровяной агар, однако при использовании других методов скрининга, проявили способность к биосинтезу БС, лизис кровяного агара также не коррелировался с поверхностным натяжением [18]. Следовательно, гемолитическую активность следует рассматривать как ненадежный критерий для обнаружения БС в микробной культуре.

Агаровая чашка с метиленовым синим, может быть использована для подтверждения наличия анионных БС, это полуколичественный метод обнаружения

внеклеточных гликолипидов. В исследовании чистую культуру каждого изолята наносили штрихом на среду содержащий СТАВ. На чашке с бактериальными изолятами Н 6/4/2/1, 9/2А, 9/2В и Н 4/1/1 вокруг колонии появился темно-синий ореол, указывающий на анионную форму БС в виде нерастворимого комплекса с катионной бромидной солью, и комплекс выявляется с помощью метиленового синего, присутствующего в агаре.

Таблица 1

**Методы скрининга продукции биосурфактанта полученными бактериальными изолятами**

№	Изолят	Эмульгирующая активность, E <sub>24</sub> (%)	Анализ вытеснения нефти (OSM) (мм)	Гемолиз на кровяном агаре (НА)	Тест с петримидным синим агаром (СТАВ)	Поверхностного натяжение (ST)
	ВГ 2% 5	26	2	0	0	0
	2 ВГ 2%	63	5	5	0	0
	3 ВГ 2%	60	5	5	0	0
	4 ВГ 2%	54	2	0	0	0
	№ 5	16	0	0	0	0
	№ 6	48	0	0	0	0
	№ 7	33	0	0	0	0
	ВГ 2% ГД	61	0	0	0	0
	№ 4/3/2	56	0	0	0	0
	Н 6/4/2/1	68	35	17	5	45
	№ 7/3/1	54	0	0	0	0
	А 8/3/1	16	0	0	0	0
	Н 5/1/1	28	0	0	0	0
	№ 109	39	0	0	0	0
	№ 7/6/2	61	8	10	0	0
	№ 7/8/2	62	8	11	0	0
	№ 7/8/3	31	0	0	0	0
	№ 9/2	28	0	0	0	0
	№ 9/2А	63	25	21	5	47
	№ 9/2В	64	25	18	3	0
	Н 4/1/1	61	20	15	4	0
	АН 4/1	28	0	0	0	0
	АР 1	0	0	0	0	0
	№ 5/2/1	36	0	0	0	0
	Н 6/4/1	64	30	14	4	0
	БК	10	0	0	0	0
	№ 2/3/1	34	0	0	0	0
	Н 4/3/1	10	0	0	0	0
	№2/2/1	44	0	0	0	0
	№ 22а/1	44	0	0	0	0



**Рисунок 1. Скрининг по E<sub>24</sub>, OSM и ST активных штаммов бактерий рода *Bacillus* продуцентов БС.**

Следует отметить, что при использовании различных методов скрининга существует корреляция, то есть штаммы, проявившие максимальный E<sub>24</sub>, проявили активность и при других методах скрининга, в частности, при OSM и ST. Изоляты, показавшие более высокие значения при скрининге E<sub>24</sub>, OSM, HA и CTAB, были отобраны для анализа поверхностного натяжения, чтобы подтвердить их способность синтезировать БС.

Экспериментально установлено, что наиболее активными изолятами, снижающими поверхностное натяжение культуральной жидкости до 45 и 47 мН/м были изоляты 6/4/2/1 и 9/2А соответственно. В результате с использованием различных методов скрининга на способность штаммов синтезировать БС отобраны два наиболее активных изолята 6/4/2/1 и 9/2А, в связи с этим в дальнейших наших исследованиях были изучены эти два изолята.

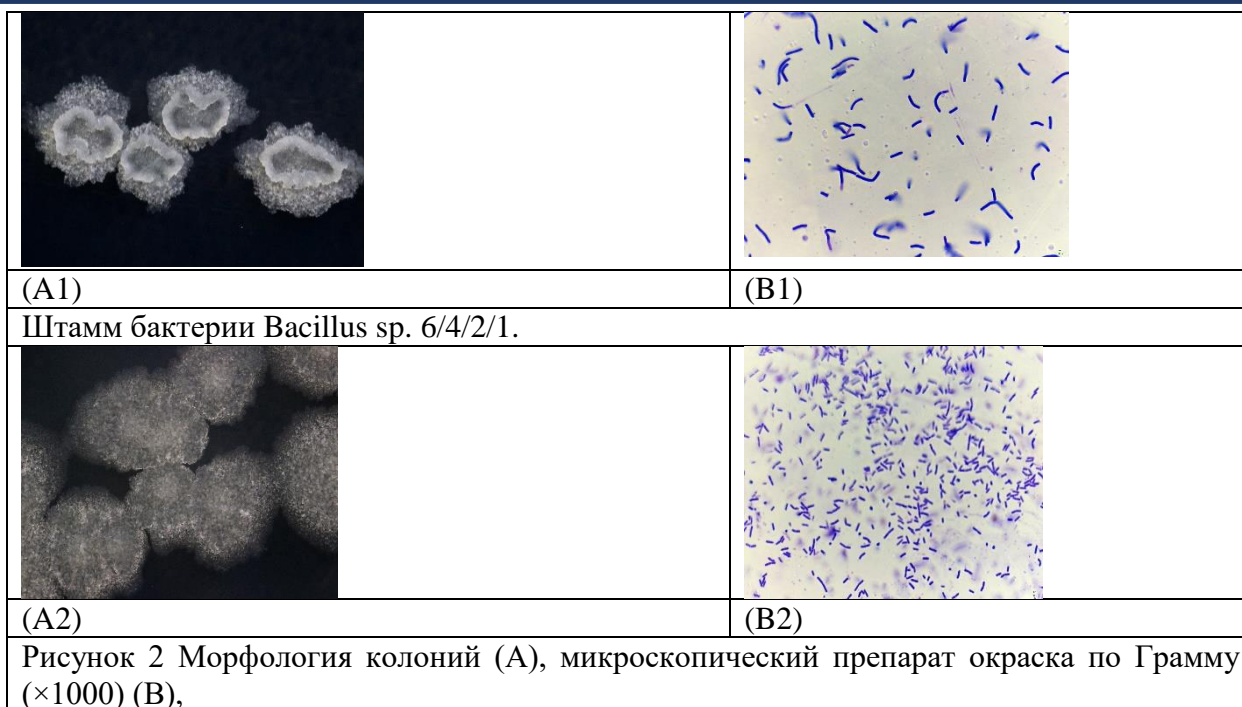
#### **Идентификация активных бактериальных изолятов, продуцирующих БС.**

Для обоих выбранных изолятов с использованием MALDI TOF MS была определена видовая принадлежность штамма. На основании MALDI TOF MS штаммы отнесены к виду *Bacillus subtilis* 6/4/2/1 и *Bacillus licheniformis* 9/2А.

**Морфолого-культуральная характеристика изучаемых штаммов.** Для изучаемых штаммов по культуральным свойствам были зафиксированы несколько особенностей. При росте на ТСБ бактерии вызывали помутнение жидкой среды, при встряхивании образовывали хлопьевидный осадок; при образовании пленки среда просветлялась. При росте различных штаммов на питательном агаре встречались средние и крупные колонии. Максимальный диаметр составлял 0,8–1,1 см, правильной формы, с плоским рельефом. Колонии округлой формы, серовато-белого цвета, матовые, с неровным волнистым краем. В центре колоний наблюдалось плотное матовое уплотнение желтовато-белого цвета, вокруг него располагалась складчатая кайма. Все колонии сухие, не врастают в агар и легко отделяются от него.

При детальном изучении изолированных колоний были выделены основные морфологически разнообразные формы колоний: белые, морщинистые, с выраженными бороздками в центре колонии (рис.2 (A1)) и белые, бугристые, с небольшими бороздками в центре колонии (рис.2 (A2)). Экспериментально установлено, что оба изолята были палочковидными и грамположительными, спорообразующими бактериями. На основании морфологических и биохимических тестов установлено, что оба выделенных штамма близкородственны к роду *Bacillus*.

Штамм бактерии *Bacillus* sp. 6/4/2/1.



По биохимически-физиологическим признакам исследуемых штаммов получены следующие результаты: показано, что оба штамма, как источники углерода (с образованием кислоты) используют: глюкозу, арабинозу, ксилозу, мальтозу, маннит, фруктозу, галактозу, сорбит, крахмал и декстрин. С образованием щелочи рамнозу. Мочевину не гидролизует. Используют минеральные формы азота: аминокислоты, белки, нитраты и соли аммония.

Для подтверждения принадлежности выделенных штаммов к определенному виду необходима дальнейшая идентификация штаммов с использованием полимеразной цепной реакции фрагментов их генов, кодирующих 16S рРНК с использованием системы универсальных праймеров.

### Влияние источников углерода и азота на биосинтез БС

Подбор оптимальной питательной среды для биосинтеза БС является одной из основных задач, поскольку разные микроорганизмы нуждаются в разных питательных веществах, подаваемых в разных количествах, и подбор среды должен учитывать метаболический путь конкретного микроорганизма. Как правило, при биосинтезе БС обычно используются три типа источников углерода; углеводы, масла и жиры, а также углеводородные группы. Для роста микроорганизмов и выработки гидрофильной части БС обычно используются водорастворимые субстраты, такие как углеводные группы, в то время как гидрофобные субстраты, такие как жиры и масла, используются для создания гидрофобной части БС.

Влияние источников углерода и азота на биосинтез БС выделенными активными штаммами изучали на минеральной среде МСМ, где в качестве источника углерода использовали (сахарозу, глюкозу, крахмал, глицерин и гексадекан) в концентрации 2%, в качестве контроля использована среде МСМ без источника углерода. Как показали результаты исследований выделенные штаммы бактерий *Bacillus* 6/4/2/1 и *Bacillus* 9/2 способны расти и синтезировать БС на всех протестированных источниках углерода кроме гексадекана (рисунок 1). Максимальный  $E_{24}$ , наблюдался при росте штаммов как на глицерине, так и на сахарозе, наибольшая эмульгирующая активность была получена с

использованием сахарозы в качестве источника углерода (61,81 %), затем глюкозы (58,34 %), глицерин (57,43 %), крахмал (56,85 %), тогда как н-гексадекане для штамма H6/4/2/1 E<sub>24</sub> составил 0%, а для штамма 9/2A 17 % соответственно. поверхностное натяжение супернатанта культуральной жидкости на 72 часа культивирования снизилось с 72 до 40.1 при культивировании на глицерине, и 48.2 мН/м на сахарозе, соответственно.

Учитывая, что глицерин является более дешевым и технологичным субстратом, использование его для биосинтеза биоПАВ может существенно повысить эффективность технологии получения БС. В связи с этим, для дальнейших исследований в качестве источника углерода был использован глицерин. Для определения оптимальной концентрации глицерина, штаммы культивировали при концентрациях глицерина 2,4,6%. Экспериментально установлено, что оптимальной концентрацией глицерина для биосинтеза БС является 4%, E<sub>24</sub> супернатанта культуральной жидкости на 72 часов культивирования составил 66,4 (68.5) % соответственно, тогда как при концентрации глицерина 2 и 6 % E<sub>24</sub> составил 43.3(58.8) и 56.4(58.5) % соответственно. Поверхностное натяжение супернатанта культуральной жидкости на 72 часа культивирования при концентрации глицерина 4% снизилось от 72 до 36 мН/м, с выходом БС 2.4 г/л (рис.3).

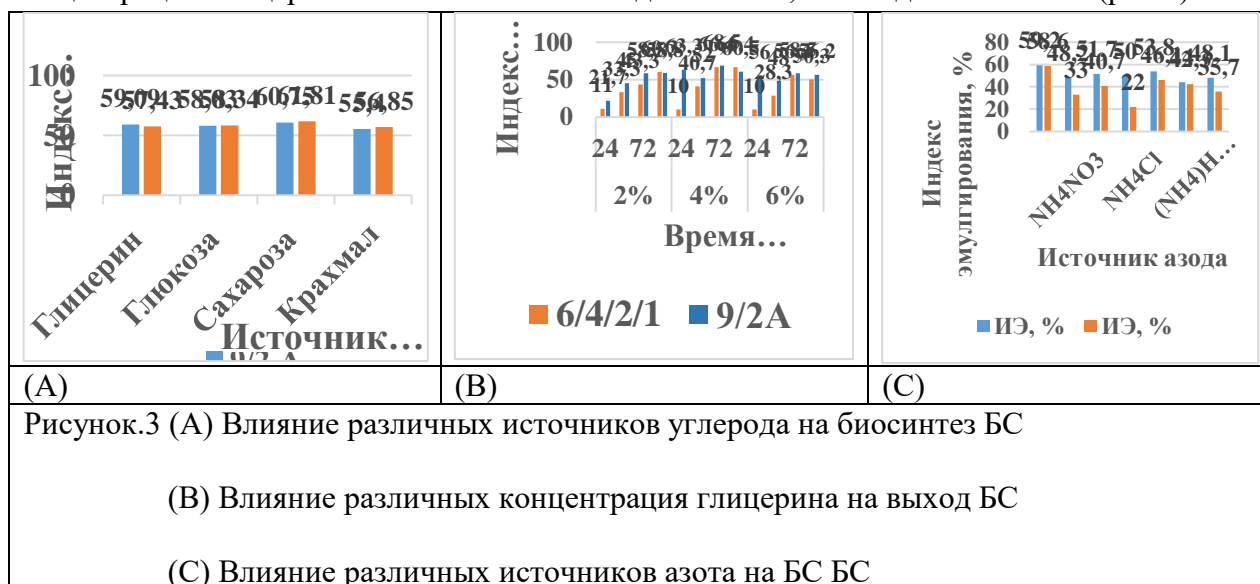


Рисунок.3 (А) Влияние различных источников углерода на биосинтез БС

(В) Влияние различных концентрация глицерина на выход БС

(С) Влияние различных источников азота на БС БС

Анализ литературных данных показал, что бактерии рода *Bacillus* по способности использовать в качестве источника углерода углеводороды (в т.ч. н-гексадекан и парафин) различаются, то есть для некоторых штаммов они являются единственным источником углерода для роста бактерий и биосинтеза БС, однако некоторыми авторами отмечено, что углеводороды либо сильно ограничивают или полностью ингибируют рост бактерий [19]. В наших исследованиях наблюдается ограниченный рост выделенных штаммов при использовании в среде в качестве источника углерода н-гексадекан.

Способность бактерий использовать в качестве источника углерода и биосинтеза БС - глицерин наблюдалось при культивировании штаммов *Lactobacillus delbrueckii* N2, *Lactobacillus cellobiosus* TM1 и *Lactobacillus plantarum* G88, БС с более высоким содержанием липидов [20]. Это может быть связано с тем, что биосинтез БС этими микроорганизмы могут быть в основном направлены на липогенный путь и глюконеогенез (GNG).

Поскольку, азот также необходим для роста микроорганизмов и биосинтеза БС, после подбора оптимального источника углерода, штаммы выращивали на среде с где в



качестве источника углерода использовали глицерин, а в качестве источника азота использовали мочевины,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . в концентрации 1.0 г/л. Экспериментально установлено, что максимальный биосинтез БС наблюдался, когда штаммы культивировали на среде, где в качестве источника азота использовали мочевины, показано что при концентрации мочевины 1.0 г/л выход БС составил 3.8 г/л.

Таким образом, на основании проведенных исследований из загрязнённых почв, нефтешламов, замазученных сточных вод и нефтегазовых скважин Бухарского и Кашкадарьинского НПЗ выделено 30 изолятов, с использованием качественных и количественных тестов скрининга по БС активности отобрано два бактериальных изолята Н 6/4/2/1 и 9/2А как наиболее активные продуценты БС. На основании морфолого-культуральных свойств штаммы отнесены к роду *Bacillus*. Изучено влияние различных источников углерода и азота на биосинтез БС, установлено, что оптимальным источником углерода для биосинтеза БС является глицерин, а оптимальным источником азота мочевины.

## REFERENCES

1. Сарсенова А.С., Гуссейнов И.Ш, Нагметова Г.Ж., Аюпова А.Ж., Аипова Р., Кудайбергенов С.Е., Курманбаев А.А. (2017) Изучение влияния штамма *Bacillus subtilis* ж- 105-11, способного к синтезу биопав, на вытеснение нефти. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.10(2). С.270-273. <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=11902>
2. Christina Nikolova Tony Gutierrez (2020). Use of Microorganisms in the Recovery of Oil from Recalcitrant Oil Reservoirs: Front. Microbiology. 10 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02996>
3. Hentati, D., Chebbi, A., Hadrich, F., Frikha, I., Rabanal, F., Sayadi, S., Manresa, A., & Chamkha, M. (2019). Production, characterization and biotechnological potential of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5. *Ecotoxicology and environmental safety*, 167, 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.036>
4. Eras-Muñoz, E., Farré, A., Sánchez, A., Font, X., & Gea, T. (2022). Microbial biosurfactants: a review of recent environmental applications. *Bioengineered*, 13(5), 12365–12391. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2074621>
5. Nitschke, M., & Silva, S. S. E. (2018). Recent food applications of microbial surfactants. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(4), 631–638. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1208635>
6. Sachdev, D. P., & Cameotra, S. S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3), 1005–1016. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4641-8>
7. Singh, P., & Cameotra, S. S. (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in biotechnology*, 22(3), 142–146. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.01.010>

8. Nabya Nehal, Priyanka Singh (2022). Role of nanotechnology for improving properties of biosurfactant from newly isolated bacterial strains from Rajasthan. *Materials Today: Proceedings*, 50(6), 2555-2561, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.05.682>.
9. Bjerk, T. R., Severino, P., Jain, S., Marques, C., Silva, A. M., Pashirova, T., & Souto, E. B. (2021). Biosurfactants: Properties and Applications in Drug Delivery, Biotechnology and Ecotoxicology. 8(8). 115. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8080115>
10. Hentati, D., Chebbi, A., Hadrich, F., Frikha, I., Rabanal, F., Sayadi, S., Manresa, A., & Chamkha, M. (2019). Production, characterization and biotechnological potential of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5. *Ecotoxicology and environmental safety*, 167, 441–449. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.036>
11. Yahya M. Al-Wahaibi , Saif N. Al-Bahry, Abdulkadir E. Elshafie, Ali S. Al-Bemani, Asma Al-Bahri, Musallam S. Al-Mandhari. (2016) Production, Characterization, and Application of *Bacillus licheniformis* W16 Biosurfactant in Enhancing Oil Recovery ORIGINAL RESEARCH article *Front. Microbiol.*, 23(7) <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01853>
12. Dias, M. A. M., & Nitschke, M. (2023). Bacterial-derived surfactants: an update on general aspects and forthcoming applications. *Brazilian journal of microbiology*.54(1), 103–123. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-00905-7>
13. Егоров Н.С. Практикум микробиологии. Издательство Московского Университета 1976 год.
14. Madhurankhi Goswami, Suresh Deka (2019) Biosurfactant production by a rhizosphere bacteria *Bacillus altitudinis* MS16and its promising emulsification and antifungal activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 178 285–296
15. Cooper D.G., Goldenberg B.G. J. *App. Environ. Microbiol.* (1987). -V.53.-№ 2.-P. 224–233.
16. Определитель бактерий Берджи. Издательство Мир, год 1997.
17. Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N., & Cameotra, S. S. (2002). Matrix-assisted laser desorption ionization--time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and environmental microbiology*, 68(12), 6210–6219. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6210-6219.2002>
18. Noha H. Youssef, Kathleen E. Duncana, David P. Naglea, Kristen N. Savagea, Roy M. Knapp, Michael J. McInerney (2004) Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 56:339– 347 doi: 10.1016/j.mimet.2003.11.001
19. Nurfarahin, A. H., Mohamed, M. S., & Phang, L. Y. (2018). Culture Medium Development for Microbial-Derived Surfactants Production-An Overview. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(5), 1049. <https://doi.org/10.3390/molecules23051049>
20. Mouafo, T. H., Mbawala, A., & Ndjouenkeu, R. (2018). Effect of Different Carbon Sources on Biosurfactants' Production by Three Strains of *Lactobacillus* Spp. *BioMed research international*, 2018, 5034783. <https://doi.org/10.1155/2018/5034783>

