

## БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 579.6

### ПИГМЕНТЫ АКТИНОБАКТЕРИЙ *Agreia* КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МАРКЕРЫ ТОПЛИВ

Е.Г. Глазунова, Д.Р. Яруллина, О.Н. Ильинская

#### Аннотация

В настоящей работе изучена возможность применения пигментов актинобактерий рода *Agreia* для маркировки бензина в целях идентификации нефтепродуктов и их защиты от фальсификаций. Получено экспериментальное подтверждение растворимости пигментов в топливе и наличия у них спектров поглощения, отличных от таковых у немаркированного бензина, то есть показано соответствие пигментов бактерий *Agreia bicolorata* основным требованиям, предъявляемым к биомаркерам.

**Ключевые слова:** маркеры топлив, биомаркер, актинобактерии *Agreia*.

#### Введение

В нефтяной промышленности термином «биомаркеры» обозначают присутствующие в топливе остатки молекул органического вещества, по которым можно идентифицировать место и время образования топлива [1]. В последние годы маркерами называют бесцветные вещества химического или биологического происхождения, добавляемые в топливо для мониторинга его качества. Нефтеперерабатывающие заводы вынуждены использовать маркеры, чтобы защитить бензин и дизельное топливо от фальсификации и отслеживать качество маркированных на заводе нефтепродуктов на всех этапах дистрибуции – от завода до автомобильного бензобака. Ключевыми требованиями, предъявляемыми к веществам, которые используют в качестве маркеров топлив, являются их растворимость в топливе и наличие специфических спектров поглощения, не перекрывающихся со спектрами поглощения собственно топлива [2].

На российском рынке представлено несколько импортных маркеров производства “John Hogg Technical Solutions Ltd” и “Rohmand Haas” (Великобритания), “Steiner S.A.S.” (Франция) [3]. Единственным известным отечественным маркером является биомаркер на основе продигозина – пигмента бактерий *Serratia marcescens* [2]. Благодаря способности актинобактерий рода *Agreia* образовывать желтые, оранжевые и красные пигменты [4] эта группа микроорганизмов представляет собой перспективный источник биомаркеров. Цель настоящей работы – рассмотреть возможность использования пигментов актинобактерий рода *Agreia* для маркировки топлив.

## 1. Материалы и методы исследования

В работе использовали актинобактерии *Agreia bicolorata* ВКМ Ас-1375 и *Agreia bicolorata* ВКМ Ас-1804<sup>Т</sup>, предоставленные Институтом биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (г. Пущино). Для получения биомассы штаммы выращивали 72 ч при 28 °С на плотных пептонно-дрожжевой (ПДА) и коринебактериальной (КБА) средах и жидкой пептонно-дрожжевой среде (ПДС) [5]. На ПДС бактерии инкубировали на качалке при 180 об./мин. Клетки осаждали центрифугированием и отмывали 0.1 М раствором NaCl. Из части сырой биомассы пигменты экстрагировали смесью гексан : этанол (1 : 2), осадок упаривали досуха и перерастворяли в бензине АИ 92 [5]. Другую часть клеток разрушали путем растирания с оксидом алюминия, затем отделяли биомассу центрифугированием и смешивали супернатант с бензином в соотношении 1 : 1. Экстрагированные с помощью смеси гексан : этанол пигменты разделяли методом ТСХ на пластинах Silufol (Россия) в системе бензол : ацетон (3 : 1), после чего элюировали этанолом [5]. Полученный раствор пигмента в этаноле упаривали досуха, осадок растворяли в бензине. Полученные смеси бензина и пигмента анализировали на СФ-2000 при 200–1000 нм и на ФЭК при характерной для красного цвета длине волны 540 нм.

## 2. Результаты и их обсуждение

Основной задачей работы явилась оценка возможности использования пигментов *Agreia* в качестве биомаркеров топлив.

На первом этапе работы сравнили биосинтез пигмента на различных питательных средах. При культивировании на плотных средах ПДА и КБА актинобактерии образовывали красный пигмент и не образовывали таковой на жидкой среде ПДС. Известно, что кислород усиливает образование пигментов у актинобактерий [4]. Вероятно, большая площадь соприкосновения с кислородом воздуха на чашках по сравнению с таковой в колбах способствовала регистрируемому более интенсивному образованию пигмента у актинобактерий при культивировании на плотных питательных средах. У обоих исследованных штаммов *A. bicolorata* биосинтез пигмента происходил более интенсивно на среде КБА по сравнению с ПДА (табл. 1), что, вероятно, является следствием более богатого состава первой среды [5].

Табл. 1

Биосинтез пигмента актинобактерий на плотных и жидких питательных средах

Штамм	OD <sub>540</sub>		
	ПДА	ПДС	КБА
<i>Agreia bicolorata</i> Ас-1375	1.32 ± 0.005	0.00 ± 0.005	11.20 ± 0.100
<i>Agreia bicolorata</i> Ас-1804 <sup>Т</sup>	1.52 ± 0.010	0.00 ± 0.005	3.28 ± 0.010

Известно, что пигмент актинобактерий является внутриклеточным и связан с клеточной стенкой микроорганизмов [4]. Поэтому для его выделения разрушали клетки растиранием с оксидом алюминия или экстрагировали пигмент смесью гексан : этанол. Экстракция с помощью органических растворителей позволяет

Табл. 2

Содержание пигмента в маркированном бензине при различных способах выделения пигмента из клеток актинобактерий

Штамм	OD <sub>540</sub>	
	Разрушение клеток с помощью Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Экстракция смесью гексан : этанол
<i>Agreia bicolorata</i> Ac-1375	0.19 ± 0.005	11.20 ± 0.100
<i>Agreia bicolorata</i> Ac-1804 <sup>T</sup>	0.14 ± 0.010	3.28 ± 0.010

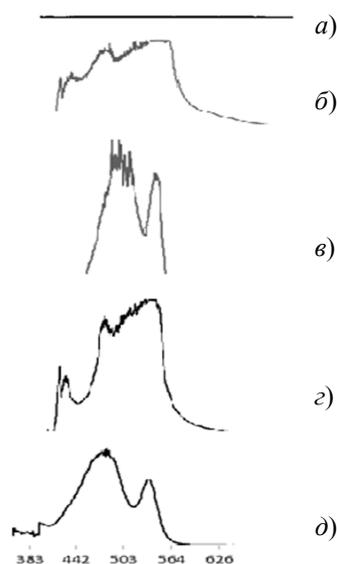


Рис. 1. Спектры поглощения бензина немаркированного (а) и маркированного пигментами *Agreia bicolorata*: б – неочищенный пигмент *A. bicolorata* Ac-1375, в – очищенный пигмент *A. bicolorata* Ac-1375, г – неочищенный пигмент *A. bicolorata* Ac-1804<sup>T</sup>, д – очищенный пигмент *A. bicolorata* Ac-1804<sup>T</sup>

более полно извлекать пигмент из клеток *Agreia* по сравнению с механическим разрушением клеток (табл. 2), поэтому для извлечения пигментов в дальнейших исследованиях использовали экстракцию смесью гексан : этанол. При анализе оптических спектров поглощения бензинов, маркированных извлеченными этим методом пигментами *Agreia*, обнаружено появление специфических спектральных линий в области 383–565 нм, по которым можно судить о присутствии в образце пигмента и о его количестве (рис. 1, б, г). Немаркированный нефтепродукт при аналогичных условиях демонстрирует отсутствие спектра поглощения в данной области (рис. 1, а). В спектре поглощения очищенных с помощью ТСХ пигментов двух штаммов *A. bicolorata* в бензине степень выраженности пиков в области 540 нм существенно снижается, что обусловлено очисткой пигмента от примесей. При этом спектральные линии, обусловленные пигментом (450–480 нм), сохраняются и становятся более выраженными. Таким образом, очистка пигмента, предназначенного для маркировки топлив, улучшает характеристики маркера.

Нами впервые показано, что пигменты актинобактерий *A. bicolorata* представляют собой перспективные кандидаты в биомаркеры нефтепродуктов. Они

растворяются в бензине и имеют характерный спектр поглощения, не перекрывающийся со спектрами поглощения собственно топлива, кроме того, для их выявления в бензине не требуется добавление проявителей.

Авторы выражают благодарность Л.В. Дорофеевой (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино) за предоставленные штаммы актинобактерий и Д.В. Юсуповой (КФУ) за помощь в постановке эксперимента.

### Summary

*E.G. Glazunova, D.R. Yarullina, O.N. Ilinskaya.* Pigments of Actinobacteria *Agreia* as Promising Fuel Markers.

This article deals with the possibility to use pigments of actinobacteria *Agreia* for gasoline labeling to identify fuels and protect them against fraud. It presents an experimental confirmation of the solubility of the pigments in fuel and shows that their absorption spectra are different from those of unmarked gasoline. Thus, the pigments of bacteria *Agreia bicolorata* meet the basic requirements for biomarkers.

**Key words:** fuel markers, biomarker, actinobacteria *Agreia*.

### Литература

1. *Payet C., Bryselbout C., Morel J., Lichtfouse E.* Fossil fuel biomarkers in sewage sludges: environmental significance // *Naturwissenschaften*. – 1999. – V. 86, No 10. – P. 484–488.
2. Пат. 2218381 Российская Федерация, С10L1/00, С10M159/02, С10N30/20. Композиция, включающая нефтепродукт и маркер, способ и раствор для маркирования нефтепродукта, способ идентификации нефтепродукта и способ получения маркера / А.З. Гарейшина, Е.В. Петухова, Д.В. Юсупова, Н.А. Лебедев, Т.Н. Чертилина, А.З. Пономарева. – № 2002119912/04, заявл. 22.07.02, опубл. 10.12.03, Бюл. № 34. – 5 с.
3. *Wilkinson T., Moxam D.A.* Review of Fuel Marker Programs to Identify and Control Fraud. – 2008. – URL: [http://www.saeindia.org/Control/download\\_file/12~22~2008~12~26~41~PM/052.pdf](http://www.saeindia.org/Control/download_file/12~22~2008~12~26~41~PM/052.pdf), свободный.
4. *Бритон Г.* Биохимия природных пигментов. – М.: Мир, 1986. – 422 с.
5. *Трутко С.М., Дорофеева Л.В., Островский Д.Н., Хинтц М.* Распространение изопреноидных пигментов в семействе Microbacteriaceae // *Микробиол.* – 2005. – Т. 74, № 3. – С. 335–341.

Поступила в редакцию  
23.03.11

**Глазунова Евгения Геннадьевна** – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [mia19871@rambler.ru](mailto:mia19871@rambler.ru)

**Яруллина Дина Рашидовна** – кандидат биологических наук, ассистент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [kasfes@gmail.com](mailto:kasfes@gmail.com)

**Ильинская Ольга Николаевна** – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [Olga.Ilinskaya@ksu.ru](mailto:Olga.Ilinskaya@ksu.ru)