

УДК 579.695

**Т. В. Гудзенко, І. П. Конуп, О. В. Волювач, О. Г. Горшкова,  
Т. О. Беляєва, М. М. Чабан**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,  
тел.: +38(068) 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

## **ВИЛУЧЕННЯ ФЕНОЛУ З ВОДИ БАКТЕРІЯМИ *BACILLUS SUBTILIS* ONU551, АДГЕЗОВАНИМИ НА НОСІЯХ РІЗНОЇ ПРИРОДИ**

**Мета.** Дослідження ефективності вилучення фенолу з води адгезованими на носіях різної природи бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551. **Методи.** Концентрацію фенолу у воді визначали екстракційно-фотометричним методом з використанням 4-аміноантпірину. Достовірність відмінностей між середніми значеннями залишкової концентрації фенолу у воді визначали за критерієм Стьюдента на рівні значущості не менше 95% ( $p \leq 0,05$ ). Опрацювання даних здійснювали з використанням програми "Microsoft Office Excel 2003". **Результати.** Експериментально встановлено здатність бактерій штаму *B. subtilis* ONU551, виділених із стічної води виробництва фармацевтичних препаратів, окиснювати фенол. Концентрація фенолу у воді за її обробки вільними клітинами штаму *B. subtilis* ONU551 у кількості  $5,5 \times 10^5$  КУО/мл протягом 5 діб експозиції зменшувалася з 200,0 до  $112,0 \pm 5,5$  мг/л (на 44%), сягаючи максимуму на 15 добу – ступінь вилучення фенолу з води склав 99–100%. Адгезія бактерій *B. subtilis* ONU551 до поверхні природних (цеоліт, торф, активоване вугілля, пісок) та синтетичних (керамічні трубки, волокнисті насадки типу «ВІЯ») носіїв призводила до прискорення процесу вилучення фенолу з води в 1,4–2,5 рази, в порівнянні з обробкою води вільними клітинами бактерій. Залишкова концентрація фенолу у воді за її обробки бактеріями *B. subtilis* ONU551, адгезованими на піску і на волокнистій насадці типу «ВІЯ», зменшувалася на 6 добу з 200,0 мг/л до  $9,0 \pm 0,25$  мг/л і  $6,0 \pm 0,54$  мг/л відповідно (на 95–96%) та на 11 добу знаходилася на рівні гранично-допустимої концентрації (0,001 мг/л). Ступінь вилучення фенолу з води бактеріями *B. subtilis* ONU 551, адгезованими на стулках мідій, торфі та на цеоліті, наприкінці очищення (11 діб) коливався в межах від 87% до 99% та сягав 100% – при використанні активованого вугілля, керамічних трубок як носіїв. **Висновок.** Використання бактерій *B. subtilis* ONU551, адгезованих на природних і синтетичних носіях – мушлях мідій, торфі, піску та волокнистій насадці типу «ВІЯ» забезпечує 100% вилучення фенолу з води.

**Ключові слова:** *Bacillus subtilis*, адгезія, фенол, окиснення, природні і синтетичні носії.



Серед великої кількості речовин, що забруднюють навколишнє середовище, поряд з нафтопродуктами, циклічними органічними сполуками і важкими металами, вкрай небезпечними є фенольні сполуки, що володіють високою канцерогенною і мутагенною активністю. Це пов'язано з їх високою токсичністю і широким розповсюдженням частково окиснених похідних ароматичних вуглеводнів. Джерелами надходження фенолів у природні водні об'єкти є побутові стоки та стоки медичних закладів, підприємств нафтохімічного комплексу та промислових підприємств, зокрема хіміко-фармацевтичного підприємства [2].

На сьогоднішній день найбільш економічно вигідною обробкою промислових і господарських побутових стоків, що містять органічні поллютанти, зокрема фенол, є їх біологічна обробка за дії мікроорганізмів – деструкторів [6].

Із даних літератури відомо, що бактерії роду *Bacillus* володіють значним біотехнологічним потенціалом [7]. Мікробні спільноти бактерій роду *Bacillus* відрізняються високою автономністю і тісними кооперативними зв'язками, а високо- і низькомолекулярні органічні речовини, в тому числі токсичні фенольні сполуки, використовуються ними в багатоступеневому процесі аеробної і анаеробної деструкції [4, 8, 10, 12, 13].

*Мета роботи* – дослідження ефективності вилучення фенолу з води адгезованими на носіях різної природи бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551.

### Матеріали та методи

Об'єкт дослідження – процес вилучення фенолу з води бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованими на природних і синтетичних носіях.

Попередньо було встановлено, що бактерії *Bacillus subtilis* ONU551, ізольовані із стічних вод виробництва фармацевтичних препаратів, виявляють біохімічну активність щодо токсичного фенолу та інших важкоокиснювальних сполук, зокрема до катіонної поверхнево-активної речовини – N-цетилпіридинію бромистого [14]. Цей штам попередньо за сукупністю морфологічних, фізіолого-біохімічних, культуральних властивостей, визначених з використанням класичних бактеріологічних методів та тест-системи API 50 CHB Medium (bioMérieux, Франція) був віднесений до виду *Bacillus spp.* [9]. За жирнокислотним складом, спектр якого одержано на газовому хроматографі Agilent 7890 і розшифровано з використанням бібліотечної бази даних RTSBA6 6.21 програми MIDI Sherlock, досліджуваний штам *Bacillus spp.* з високим індексом подібності (Sim Index > 0,72) ідентифіковано як *Bacillus subtilis*. Він не є патогенним і на сьогоднішній день зберігається в колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова – *Bacillus subtilis* ONU551.

Штам *Bacillus subtilis* ONU551 представлений рухливими, грам-позитивними паличками розміром 1,5–1,7 × 5,5–5,8 мкм із закругленими кінцями. Клітини розташовуються поодинокі, а також у вигляді ланцюжка, V-подібно. Колонії світло-коричневі, щільні, гладенькі з рівним краєм. Бактерії ростуть у м'ясо-пептонному бульйоні з утворенням плівки. При рості в м'ясо-пептонному бульйоні з 7,5% NaCl утворюється пухкий осад. Штам *Bacillus subtilis*



ONU551 дає негативну реакцію з метиловим червоним і негативну реакцію Фогеса-Проскауера, сірководень не утворює. Бактерії каталазо-позитивні, оксидазо-негативні, гідролізують крохмаль і сечовину, пептонізують молоко. Штам *Bacillus subtilis* ONU551 не відновлює нітрати до нітритів, не розріджує желатин; ферментує глюкозу, сахарозу, маніт з утворенням кислоти. Метаболізм штаму *Bacillus subtilis* ONU551 – окиснювальний.

Підготовка бактерій – деструкторів фенолу. Штам *Bacillus subtilis* ONU551 (попередньо адаптований до високих концентрацій фенолу 200–300 мг/л), для інокуляції носіїв вирощували на чашках Петрі з м'ясо-пептонним агаром (МПА) одну добу. Отриману бактеріальну масу перенесли (методом змиву) в колби Ерленмеєра, ємністю один літр. Попередньо в ці колби вносили 500 мл повного живильного середовища М9 складу (г/л):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1;  $\text{NaCl}$  – 0,5; пептон – 10; дріжджовий екстракт – 5; глюкоза – 2.

Глюкозу стерилізували при 0,5 атм, потім додавали в живильне середовище М9. Бактерії культивували протягом 1,5–2 діб до досягнення густини  $10^9$  кл/мл. Оптичну густину клітинної суспензії визначали на ФЕК з довжиною хвилі 540 нм.

Підготовка носіїв бактерій – деструкторів фенолу. Використовували такі носії для адгезії клітин бактерій *Bacillus subtilis* ONU551: цеоліт (57 г), мушлі мідій (43 г), пісок (93 г), керамічні трубки (44,2 г), активоване вугілля (13 г), торф верховий (7,5 г), синтетичний носій типу «ВІЯ» ТУ995990 (2,3 г) [15] у кількості 1:2 за об'ємом. Вибір носіїв зумовлений їх доступністю, дешевизною та розвиненою питомою площею поверхні, що є найважливішим і основним технологічним параметром для проведення ефективного процесу вилучення фенолу з води.

Цеоліт, мушлі мідій і річковий пісок попередньо відмивали від дрібної дисперсної фази. Неорганічні носії (цеоліт, мушлі мідій, річковий пісок, активоване вугілля, кільця керамічні) стерилізували в жаровій шафі за температури 180 °С. Попередньо мушлі мідій для випалювання органічної фази піддавали обробці високою температурою – 250–300 °С протягом 0,5 год у жаровій шафі. Торф і синтетичний носій стерилізували в автоклаві при 1,0 атм. протягом 30 хвилин.

Для експериментів використовували цеоліт з розміром гранул 0,3–0,7 см; мушлі мідій з розміром пластин 0,5–1,0 см; розмір гранул активованого вугілля 3–4 мм; розміри керамічних трубок: діаметр 8 мм, довжина 10 мм, товщина стінок 1,5 мм.

Отриманими стерильними носіями заповнювали стерильні флакони, ємністю 0,5 л. У кожен з флаконів вносили рівні об'єми (50 мл) носіїв. Після цього в ці флакони вносили по 50 мл інокуляту бактерій *Bacillus subtilis* ONU551. Проводили окремі серії досліджень (5 серій випробувань). Інокуляцію проводили в термостатованому шейкері Innova'40 (швидкість обертання ротора 70 об / хв при температурі 28 °С) протягом 2-х діб. Після проведення інокуляції залишки суспензії бактерій зливали і інокульовані носії тричі промивали середовищем М9 (використовували тільки мінеральні компоненти середовища:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 6;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 3;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1;  $\text{NaCl}$  – 0,5 – 2, г/літр). В кожен з флаконів



додавали по 50 мл мінерального середовища М9, що містив 200 мг/л фенолу.

Оцінку фенол-окиснювальної активності вільних клітин бактерій *Bacillus subtilis* ONU551 здійснювали за ступенем вилучення фенолу з води ( $\alpha$ ,%), що розраховували за рівнянням:

$$\alpha = [(C_0 - C) / C_0] \times 1 \quad (1)$$

де  $C_0$  і  $C$  – концентрації фенолу у воді до (200 мг/л) та після обробки.

Ефективність процесу вилучення фенолу з води бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованими на різних носіях, оцінювали за рівнянням (1). Концентрацію фенолу у контрольних і дослідних пробах до і після обробки визначали фотокolorиметричним методом, оснований на утворенні забарвлених сполук фенолу з 4-аміноантипірином за присутності гексаціаноферату (III) при рН=10,0±0,2 [5].

Достовірність відмінностей між середніми значеннями залишкової концентрації фенолу у воді визначали за критерієм Стьюдента на рівні значущості не менше 95% ( $p \leq 0,05$ ). Опрацювання даних здійснювали з використанням програми «Microsoft Office Excel 2003».

### Результати досліджень та їх обговорення

Експериментально встановлено здатність бактерій штаму *Bacillus subtilis* ONU551, виділених із стічної води виробництва фармацевтичних препаратів, окиснювати фенол. Результати оцінки фенол-окиснювальної здатності бактерій *Bacillus subtilis* ONU551 представлені в табл. 1.

Таблиця 1

#### Окиснення фенолу бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551

Table 1

#### Oxidation of phenol by the bacteria *Bacillus subtilis* ONU551

Доба	Ступінь вилучення фенолу із води, %	Концентрація фенолу у воді, мг/л
5	44	112,0±5,5
8	80	40,0±3,7
15	99	0,05±0,08

Примітка:  $M \pm m$  при  $P < 0,05$ ; концентрація фенолу у воді до обробки – 200,0 мг/л; концентрація бактеріальних клітин –  $5,5 \times 10^5$  КУО/мл

Note:  $M \pm m$  at  $P < 0,05$ ; concentration of phenol in water before treatment – 200,0 mg/l; concentration of bacterial cells is  $5,5 \times 10^5$  CFU/ml

У результаті досліджень встановлено, що при одноразовому введенні вільних клітин штаму *Bacillus subtilis* ONU551 у кількості  $5,5 \times 10^5$  КУО/мл у забруднену фенолом воду на 5 добу експозиції концентрація фенолу у воді зменшувалася з 200,0 мг/л до 112,0±5,5 мг/л (ступінь вилучення фенолу з води – 44%). На 8 добу експозиції ступінь вилучення фенолу з води підвищувався до 80%, сягаючи максимуму (99–100%) на 15 добу [14].

Для підвищення ефективності вилучення фенолу з водних розчинів використовували клітини бактерій *B. subtilis* ONU551, адгезовані на деше-



вих легкодоступних носіях природного та синтетичного походження: цеоліті, подрібнених мушлях мідій, піску, керамічних трубках, активованому вугіллі, торфі верховому, синтетичному носії типу “ВІЯ”. Відомо, що в даний час спектр матеріалів для використання в біотехнологіях очищення води від плютантів дуже різноманітний (це диски, пластини, насадки з полімерних матеріалів, неткане полотно тощо [11, 15], основна вимога до них – інертність і принципова можливість утворення на них біоплівки.

Попередньо було проведено експериментальну оцінку сорбційної здатності цеоліту, подрібнених мушлів мідій, піску, керамічних трубок, активованого вугілля, торфу верхового, синтетичного носія типу “ВІЯ” по відношенню до фенолу з концентрацією 200 мг/л за присутності мінеральних компонентів М-9 при рН  $\sim 7$  і температурі  $18 \pm 2$  °С. Результати хімічного аналізу визначення залишкової концентрації фенолу у воді за її обробки усіма вищезгаданими носіями представлені в табл. 2.

Як видно з табл. 2, випробувані носії слабо адсорбують фенол, за винятком активованого вугілля. Активоване вугілля на 6-ту добу експериментів адсорбує біля 85% фенолу. Показано, що за відсутності біологічної модифікації певною адсорбційною здатністю до фенолу володіють також синтетичний носій типу “ВІЯ” та торф. Протягом перших 24 годин сорбції концентрація фенолу у воді зменшувалася з 200 мг/л до  $90 \pm 8,7$  мг/л (55% вилучення) при використанні активованого вугілля; до  $125 \pm 10,5$  мг/л (38% вилучення) – при використанні синтетичного носія типу “ВІЯ” та до  $160 \pm 15,2$  мг/л (20% вилучення) – при використанні торфу. Додатково встановлено, що протягом 30 хв експозиції сорбція фенолу із водних розчинів спостерігалася лише при використанні активованого вугілля (за визначених умов ступінь вилучення фенолу із водних розчинів активованим вугіллям за відсутності мікроорганізмів становив 28%).

Через три доби ефективність процесу вилучення фенолу із води сягала близько 84% при використанні активованого вугілля (залишкова концентрація фенолу у воді становила  $32,0 \pm 2,4$  мг/л); практично не змінювалася для торфу і була на рівні 20–22% (залишкова концентрація фенолу у воді становила  $157 \pm 14,5$  мг/л) та, мабуть, внаслідок процесу десорбції зменшувалася до 17% для синтетичного носія типу “ВІЯ”.

З подальшим подовженням терміну обробки води зазначеними носіями (до 10–11 діб) її ефективність збільшувалася для активованого вугілля до 97% та залишалася практично незмінною при використанні торфу верхового, синтетичного носія типу “ВІЯ”. Практично інертними по відношенню до фенолу були пісок, цеоліт та мушлі мідій ( $\sim 3\%$  на 2 добу). Експериментально показано, що усі використані матеріали є “біологічно позитивними”.

Встановлено, що за умов адгезії на поверхні піску, цеоліту та мушлях мідій (що практично не сорбують фенол) бактерій *Bacillus subtilis* ONU551 вдається збільшити протягом першої доби експозиції ступінь вилучення фенолу з води до 18–26%.

Найбільш ефективно процес вилучення фенолу з водних розчинів (через добу від початку експерименту) протікав у разі використання клітин *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованих на носієві з найбільшою сорбційною



емністю – активованому вугіллі; ступінь вилучення фенолу з води сягав 62% (з урахуванням поправки на контроль – активоване вугілля за відсутності мікроорганізмів), що відповідало залишковій концентрації фенолу у воді  $34,0 \pm 2,8$  мг/л.

Таблиця 2

Вилучення фенолу з води бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованими на носіях різної природи

Table 2

Removal of phenol from water by bacteria *Bacillus subtilis* ONU551, adhered on the carriers of different nature

Бактерії <i>B. subtilis</i> ONU551, адгезовані на носіях	Концентрація фенолу у воді після обробки, мг/л (% вилучення з поправкою на контроль)				
	Час експозиції, доба				
	1	4	6	8	11
Цеоліт Контроль	$\frac{163,5 \pm 12,5}{199,8 \pm 16,0}$ (18%)	$\frac{163,5 \pm 12,0}{---$	$\frac{119 \pm 12,4}{195 \pm 16,1}$ (39%)	$\frac{2,0 \pm 0,15}{---$	$\frac{2,0 \pm 0,15}{193 \pm 16,1}$ (99%)
Мушлі мідій Контроль	$\frac{145 \pm 12,0}{195 \pm 16,5}$ (26%)	$\frac{145 \pm 11,2}{---$	$\frac{136 \pm 11,2}{182,5 \pm 17,4}$ (26%)	$\frac{136 \pm 10,4}{---$	$\frac{20 \pm 1,25}{159 \pm 12,5}$ (87%)
Торф Контроль	$\frac{118 \pm 10,5}{160 \pm 15,2}$ (26%)	$\frac{24 \pm 1,8}{---$	$\frac{28 \pm 2,5}{157 \pm 14,5}$ (82%)	$\frac{24 \pm 1,8}{---$	$\frac{16 \pm 0,85}{159 \pm 15,2}$ (90%)
Активоване вугілля Контроль	$\frac{34,0 \pm 2,8}{90 \pm 8,7}$ (62%)	$\frac{9,0 \pm 0,72}{---$	$\frac{9,0 \pm 0,65}{32,0 \pm 2,4}$ (72%)	$\frac{4,0 \pm 0,38}{---$	$\frac{0,001 \pm 0,0001}{6,0 \pm 0,5}$ (100%)
Пісок Контроль	$\frac{163,5 \pm 15,6}{200 \pm 17,0}$ (18%)	$\frac{154,0 \pm 14,4}{---$	$\frac{9,0 \pm 0,85}{187,5 \pm 17,9}$ (95%)	$\frac{0,001 \pm 0,0001}{---$	$\frac{0,001 \pm 0,0001}{174 \pm 16,2}$ (100%)
Керамічні трубки Контроль	$\frac{173 \pm 14,1}{178 \pm 15,8}$ (3%)	$\frac{163,5 \pm 15,5}{---$	$\frac{100,0 \pm 9,7}{178 \pm 16,0}$ (44%)	$\frac{0,001 \pm 0,0001}{---$	$\frac{0,001 \pm 0,0001}{167 \pm 15,9}$ (100%)
«ВІЯ» Контроль	$\frac{113 \pm 12,2}{125 \pm 10,5}$ (10%)	$\frac{8,0 \pm 0,94}{---$	$\frac{6,0 \pm 0,54}{167 \pm 15,2}$ (96%)	$\frac{0,001 \pm 0,0001}{---$	$\frac{0,001 \pm 0,0001}{159 \pm 14,8}$ (100%)

Примітка:  $M \pm m$  при  $P < 0,05$ ; "---" не визначено; концентрація фенолу у воді до обробки – 200,0 мг/л; концентрація бактеріальних клітин –  $10 \times 10^9$  КУО/мл; рН 6,8–7,2.

Note:  $M \pm m$  at  $P < 0.05$ ; "---" undefined; concentration of phenol in water before treatment – 200,0 mg/l; concentration of bacterial cells is  $10 \times 10^9$  CFU/ml; pH 6,8–7,2.

Адгезія клітин бактерій *Bacillus subtilis* ONU551 на носіях призводила до стабілізації процесу вилучення фенолу з водних розчинів (не відбувалося процесу десорбції, як наприклад, у разі використання синтетичного волокна «ВІЯ» за відсутності мікроорганізмів) та його прискоренням у 1,4–2,5 рази порівняно з обробкою води вільними клітинами бактерій (табл. 1, 2).

Експериментально встановлено, що вже на 6 добу залишкова концен-



трація фенолу у воді за її обробки бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованими на піску або на волокнистій насадці типу «ВІЯ», зменшувалася з 200,0 мг/л до  $9,0 \pm 0,25$  мг/л і  $6,0 \pm 0,54$  мг/л відповідно. При цьому ступінь вилучення фенолу із води становив 95–96% з урахуванням поправки на контроль (носії за відсутності мікроорганізмів) (табл. 2).

Як видно із табл. 2, бактерії *Bacillus subtilis* ONU551, адгезовані на цеоліті протягом першої доби проявляють слабку біохімічну активність по відношенню до фенолу. На 6-у добу спостерігається деструкція на 39% і тільки на 11-у добу бактеріями утилізовано 98–99% фенолу. Кінетика деструкції фенолу бактеріями, адгезованими на мушлях мідій теж знаходилася на низькому рівні. Швидкість утилізації фенолу бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованими на піску значно вище за тих, що були адгезовані на цеоліті і мішлях мідій. До 6-го дня проведення експерименту деструкція фенолу сягала 95%. Швидкість деструкції фенолу бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, що були прикріплені до керамічних трубок, повторюють дані у випадку їх прикріплення до цеоліту.

Експериментально підтверджено, що через 11 діб адгезовані на активованому вугіллі, піску, керамічних трубках, синтетичному носії типу "ВІЯ" бактерії *Bacillus subtilis* ONU551 зменшували концентрацію фенолу до рівня гранично-допустимої концентрації (ГДК для водних об'єктів господарсько-питного та культурно-побутового користування становить 0,001 мг/л) [1].

Механізм взаємодії штаму *Bacillus subtilis* ONU551 з фенолом досить складний і включає поєднання декількох біохімічних реакцій [3]. Початковий етап біодеградації фенолу супроводжується утворенням катехолу. Наступна стадія метаболізму двоатомного фенолу *Bacillus subtilis* ONU551 пов'язана з розщепленням ароматичного кільця. Утворений двоатомний фенол – катехол в аеробних умовах підлягає інтрадіольному *o*-розщепленню або екстрадіольному *m*-розщепленню. Ці шляхи розщеплення ароматичного кільця каталізуються різними діоксигеназами. Розщеплення кільця за *o*-шляхом каталізує 1,2 -діоксигеназа, а розщеплення кільця за *m*-шляхом каталізує 2,3-діоксигеназа.

Таким чином, біохімічно активний штам *Bacillus subtilis* ONU551 може бути рекомендований для розробки біотехнології очищення стічних вод хімічних, фармацевтичних виробництв, нафтохімічного комплексу, медичних установ від токсичних органічних забруднювачів (нафтопродуктів, широко розповсюдженого представника катіонних поверхнево-активних – галогеніду *N*-цетилпіридинію [14]), зокрема від фенолу. Очищена від фенолу вода може бути використана повторно для виробничих цілей. Основні переваги використання адгезованих на природних та синтетичних носіях бактерій *Bacillus subtilis* ONU551: висока ефективність, відсутність вторинного забруднення, простота здійснення процесу очищення води, зокрема від фенолу, що є "промислово використовуваним", не вимагає кардинальних змін в технології виробництва. Можна рекомендувати включити до композиції носіїв очисних споруд найбільш активні носії бактерій – мушлі мідій, торф, пісок та волокнисту насадку типу "ВІЯ", тому що адгезовані на них бактерії *Bacillus subtilis* ONU551 проявляють істотну біохімічну активність по відношенню до фенолу



(з вихідною концентрацією 200 мг/л) і ці носії необхідні для стабільної роботи очисних споруд, враховуючи їх хороші механічні і фізико-хімічні властивості.

Експериментально встановлено здатність штаму бактерій *Bacillus subtilis* ONU551, виділених із стічної води виробництва фармацевтичних препаратів, окиснювати фенол. Концентрація фенолу у воді за дії вільних клітин штаму *Bacillus subtilis* ONU551 у кількості  $5,5 \times 10^5$  КУО/мл протягом 5 діб експозиції зменшувалася з 200,0 до  $112,0 \pm 5,5$  мг/л (на 44%), сягаючи максимуму на 15 добу – ступінь вилучення фенолу з води складає 99–100%.

Адгезія клітин бактерій *Bacillus subtilis* ONU551 до поверхні природних (цеоліт, торф, активоване вугілля, пісок) і синтетичних (керамічні трубки, волокнисті насадки типу «ВІЯ») носіїв супроводжувалося прискоренням процесу деструкції фенолу в 1,4–2,5 рази порівняно з обробкою води вільними клітинами бактерій. Залишкова концентрація фенолу у воді за її обробки бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованими на піску і на волокнистій насадці типу «ВІЯ», зменшувалася на 6 добу з 200,0 мг/л до  $9,0 \pm 0,25$  мг/л і  $6,0 \pm 0,54$  мг/л відповідно (95–96% вилучення фенолу з урахуванням поправки на контроль – носії за відсутності мікроорганізмів). За цей термін експозиції (6 діб) ступінь вилучення фенолу з води бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованими на активованому вугіллі з урахуванням поправки на контроль (вихідний, необроблений носій), склав лише 72%, не зважаючи на значну сорбцію фенолу протягом перших 24 годин – 62% (з урахуванням поправки на контроль). Концентрація фенолу у воді була на рівні ГДК (0,001 мг/л) за її обробки протягом 11 діб бактеріями *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованими на активованому вугіллі, піску, керамічних трубках, волокнистій насадці типу «ВІЯ».

Доведено, що використання бактерій *Bacillus subtilis* ONU551, адгезованих на найбільш активних природних і синтетичних носіях – мушлях мідій, торфі, піску та волокнистій насадці типу «ВІЯ» – є ефективним способом вилучення фенолу з води.

**Т. В. Гудзенко, И. П. Конуп, О. В. Волювач, Е. Г. Горшкова,  
Т. А. Беляева, Н. Н. Чабан**

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,  
тел.: 068 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

## **УДАЛЕНИЕ ФЕНОЛА ИЗ ВОДЫ БАКТЕРИЯМИ *BACILLUS SUBTILIS* ONU551, АДГЕЗИРОВАННЫМИ НА НОСИТЕЛЯХ РАЗНОЙ ПРИРОДЫ**

### **Реферат**

**Цель.** Исследование эффективности удаления фенола из воды адгезированными на носителях разной природы бактериями *Bacillus subtilis* ONU551.

**Методы.** Концентрацию фенола в воде определяли экстракционно-фотометрическим методом с использованием 4-аминоантипирина. Достоверность различий между средними значениями остаточной концентрации фенола в





воде определяли по критерию Стьюдента на уровне значимости не менее 95% ( $p \leq 0,05$ ). Обработку данных осуществляли с использованием программы "Microsoft Office Excel 2003". **Результаты.** Экспериментально установлена способность штамма бактерий *B. subtilis* ONU551, выделенного из сточной воды производства фармацевтических препаратов, окислять фенол. Концентрация фенола в воде при ее обработке свободными клетками штамма бактерий *B. subtilis* ONU551 в количестве  $5,5 \times 10^5$  КОЕ/мл в течение 5 суток экспозиции уменьшалась с 200,0 до  $112,0 \pm 5,5$  мг/л (на 44%), достигая максимума на 15 сутки – степень удаления фенола из воды составила 99–100%. Адгезия бактерий *B. subtilis* ONU551 к поверхности природных (цеолит, торф, активированный уголь, песок), синтетических (керамические трубки, волокнистые насадки типа «ВИЯ») носителей приводила к ускорению процесса удаления фенола из воды в 1,4–2,5 раза, по сравнению с обработкой воды свободными клетками бактерий. Остаточная концентрация фенола в воде при ее обработке бактериями *B. subtilis* ONU551, адгезированными на песке и на волокнистой насадке типа «ВИЯ», уменьшалась на 6 сутки с 200,0 мг/л до  $9,0 \pm 0,25$  мг/л и  $6,0 \pm 0,54$  мг/л соответственно (на 95–96%) и на 11 сутки находилась на уровне предельно-допустимой концентрации (0,001 мг/л). Степень удаления фенола из воды бактериями *B. subtilis* ONU551, адгезированными на створках мидий, торфе и на цеолите, в конце очистки (11 суток) колебалась в пределах от 87% до 99%; и достигала 100% – при использовании в качестве носителей активированного угля, керамических трубок. **Вывод.** Использование бактерий *B. subtilis* ONU551, адгезированных на природных и синтетических носителях – створках мидий, торфе, песке и волокнистой насадке типа "ВИЯ" обеспечивает 100% удаление фенола из воды.

*Ключевые слова:* *Bacillus subtilis*, адгезия, фенол, окисление, природные и синтетические носители.

**T. V. Gudzenko, I. P. Konup, O. V. Voliuvach, O. G. Gorshkova,  
T. O. Belyaeva, M. M. Chaban**

Odesa National I. I. Mechnykov University,  
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine;  
tel.: 068 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

## **REMOVAL OF PHENOL FROM WATER BY *BACILLUS SUBTILIS* ONU551 BACTERIA, ADHERIZED ON THE CARRIERS OF DIFFERENT NATURE**

### **Summary**

**Aim.** Investigation of the efficiency of removal phenol from water by bacteria *Bacillus subtilis* ONU551 adhered on the carriers of different nature. **Methods.** The concentration of phenol in water was determined by extraction-photometric method using 4-aminoantipyrin. The significance of the differences between the mean values of the residual concentration of phenol in water was determined by Student's criterion at a significance level of at least 95% ( $p \leq 0.05$ ). Data processing was performed using the program "Microsoft Office Excel 2003". **Results.** The ability of a *B. subtilis* ONU551 bacterial strain isolated from waste water



produced by pharmaceuticals to oxidize phenol was experimentally established. The concentration of phenol in water during its treatment with free cells of the *B. subtilis* ONU551 bacterial strain in the amount of  $5.5 \times 10^5$  CFU/ml for 5 days of exposure decreased from 200.0 to  $112.0 \pm 5.5$  mg/l (by 44%), reaching maximum on the 15<sup>th</sup> day – the degree of phenol removal from water was 99-100%. Adhesion of *B. subtilis* ONU551 bacteria to the surface of natural (zeolite, peat, activated carbon, sand), synthetic (ceramic tubes, fibrous nozzles of the “VIYA” type) of carriers accelerated the removal of phenol from water 1.4–2.5 times, compared to the treatment of water by free bacterial cells. The residual concentration of phenol in water during its treatment with *B. subtilis* ONU551 bacteria adhered on sand and on “VIYA” type fiber packing decreased for 6 days from 200.0 mg/l to  $9.0 \pm 0.25$  mg/l and  $6.0 \pm 0.54$  mg/l, respectively (by 95–96%) and on the 11<sup>th</sup> day was at the level of maximum permissible concentration (0.001 mg/l). The degree of removal of phenol from water by *B. subtilis* ONU551 bacteria adhered on mussel doors, peat and zeolite at the end of cleaning (11 days) ranged from 87% to 99%; and reached 100% – when used as the carriers of activated carbon, ceramic tubes.

**Conclusion.** The use of *B. subtilis* ONU551 bacteria adhered on natural and synthetic carriers – mussel shutters, peat, sand and fibrous attachment of “VIYA” type ensures 100% removal of phenol from water.

*Key words:* *Bacillus subtilis*, adhesion, phenol, aqueous solution, natural and synthetic carriers.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Беспамятков Г. П. Предельно-допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде / Г. П. Беспамятков, Ю. А. Кротов. – Л.: Химия, 1985. – 585 с.
2. Быкова Г. С., Шаталаев И. Ф., Воронин А. В. Фитомасса наяды мелкозубчатой в доочистке фенолсодержащих загрязненных вод фармацевтических производств // Медицинский альманах. – 2014. – №1(31). – С. 102–105.
3. Галкін Б. М., Іваниця В. О., Філіпова Т. О. Механізми біодеградації ксенобіотиків мікроорганізмами. Одеса: вид-во ОНУ імені І. І. Мечникова, 2017. – 104 с.
4. Коробов В. В., Стариков С. Н., Сагитова А. И., Журенко Е. Ю., Жарикова Н. В., Ясаков Т. Р., Маркушева Т. В. Штаммы-деструкторы фенола рода *Bacillus* промышленных экотопов // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2017. – №2. – С. 73–77.
5. Лурье Ю. Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. М.: Химия, 1984. – 448 с.
6. Путилина Н. Т., Квитницкая Н. Н., Костовецкий Я. И. Микробный метод обесфеноливания сточных вод. – Киев: Здоровье, 1964. – 87 с.
7. Роль микроорганизмов в функционировании живых систем: фундаментальные проблемы и биоинженерные приложения / Под редакцией В. В. Власова, А. Г. Дегерменджи, Н. А. Колчанова, В. Н. Пармона, В. Е. Репина. Новосибирск: Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук. – 2010. – С. 28.
8. Ankur Gupta, Chandrajit Balomajumder. Simultaneous removal of Cr(VI) and phenol from synthetic binary solution using consortium culture of *Bacillus* sp.



and *E. coli* immobilized on tea waste biomass in packed bed reactor // Korean Journal of Chemical Engineering. – 2016. – Vol. 33, № 2. – P. 559–566. DOI: 10.1007/s11814-015-0137-4.

9. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, G. M. Garrity. – N.Y.: Springer, 2005. – № 2. – 1108 p.

10. *Chris Felshia, S., Aswin Karthick, N., Thilagam, R., Chandralekha, A., Raghavarao, K.S.M.S., Gnanamani, A.* Efficacy of free and encapsulated *Bacillus licheniformis* strain SL10 on degradation of phenol: A comparative study of degradation kinetics // Journal of Environmental Management. – 2017. – Vol. 197. – P. 373–383.

11. *Egli K, Fanger U, Alvarez PJ, Siegrist H, van der Meer JR, Zehnder AJ.* Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate // Arch Microbiol. – 2001. – Vol. 175(3). – P. 198–207.

12. *Ereقات, Suheir I., Abdelkader, Ahmad A., Nasereddin, Abdelmajeed F., Al-Jawabreh, Amer O., Zaid, Taher M., Letnik, Ilya., Abdeen, Ziad A.* Isolation and characterization of phenol degrading bacterium strain *Bacillus thuringiensis* J20 from olive waste in Palestine // Journal of Environmental Science & Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering. – 2018. – Vol. 53, Issue 1. – P. 39–45. DOI: 10.1080/09593330.2017.1296897

13. *Topalova Yana, Dimkov Raycho, Todorova Yovana, Daskalova Elmira & Perar Petrov.* Biodegradation of Phenol by Immobilized in Peo-Cryogel *Bacillus Laterosporus* BT-271 in Sequencing Batch Biofilter // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2011. – Vol. 25(4). – P. 2613–2619. – DOI: 10.5504/BBEQ.2011.0076

14. *Патент України №129673.* Спосіб мікробіологічної очистки води від фенолу і N-цетилпіридинію бромистого / Іваниця В. О., Гудзенко Т. В., Горшкова О. Г., Волювач О. В., Конуп І. П., Беляєва Т. О., Чабан М., Ракитська С. І. – заявка на патент №u201804337 від 20.04.2018. Опубл. 12.11.2018., Бюл. № 21/2018.

15. *Патент України №97747.* Спосіб аеробного біологічного очищення стічних вод/ Гвоздяк П. І., Глоба Л. І., Саблій Л. А., Капарник А. І., Борисенко О. О., Жукова В. С. Опубл. 12.03.2012, Бюл. №5.

## References

1. *Bespanjatkov GP.* Maximum allowable concentrations of chemicals in the environment / GP. Bespanjatkov, JuA. Krotov. L.: Himija, 1985:585 [in Russian].

2. *Bykova GS, Shatalaev IF, Voronin AV.* Phytomass of mollusks of fine-toothed in the tertiary treatment of phenol-containing polluted waters of pharmaceutical production. *Medicinskij al'manah.* 2014;1(31):102–105 [in Russian].

3. *Galkin BM, Ivanycja VO, Filipova TO.* Mechanisms of xenobiotic biodegradation by microorganisms. *Odesa: vyd-vo ONU imeni I.I. Mechnykova.* 2017:104 [in Ukrainian].

4. *Korobov VV, Starikov SN, Sagitova AI, Zhurenko EJu, Zharikova NV, Jasakov TR, Markusheva TV.* Strains-destroyers of phenol of the genus *Bacillus* industrial ecotopes. *Izvestija Ufimskogo nauchnogo centra RAN.* 2017; 2:73–77 [in Russian].



5. Lur'e JuJu. Analytical chemistry of industrial wastewater. M.: Himija, 1984:448 [in Russian].
6. Putilina NT, Kvitnickaja HH, Kostoveckij JaI. Microbial method of dephenolization of wastewater. K: Zdorov'ja, 1964:87 [in Russian].
7. The role of microorganisms in the functioning of living systems: fundamental problems and bioengineering applications / Pod redakciej VV. Vlasova, AG. Degermendzhi, NA. Kolchanova, VN. Parmona, VE. Repina. Novosibirsk: Izd-vo Sibirskogo otdelenija Rossijskoj Akademii nauk. 2010:28 [in Russian].
8. Ankur Gupta, Chandrajit Balomajumder. Simultaneous removal of Cr(VI) and phenol from synthetic binary solution using consortium culture of *Bacillus* sp. and *E. coli* immobilized on tea waste biomass in packed bed reactor. Korean Journal of Chemical Engineering. 2016;33(2):559–566. DOI: 10.1007/s11814-015-0137-4
9. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / DJ. Brenner, NR. Krieg, JT. Staley, GM. Garrity. N.Y.: Springer, 2005;2:1108
10. Chris Felshia S, Aswin Karthick N, Thilagam R, Chandralekha A, Raghavarao KSMS, .Gnanamani A. Efficacy of free and encapsulated *Bacillus licheniformis* strain SL10 on degradation of phenol: A comparative study of degradation kinetics. Journal of Environmental Management. 2017;197:373–383
11. Egli K, Fanger U, Alvarez PJ, Siegrist H, van der Meer JR, Zehnder AJ. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. Arch Microbiol. 2001;175(3):198–207
12. Ereqat Suheir I, Abdelkader Ahmad A, Nasereddin, Abedelmajeed F, Al-Jawabreh Amer O, Zaid Taher M, Letnik Ilya, Abdeen Ziad A. Isolation and characterization of phenol degrading bacterium strain *Bacillus thuringiensis* J20 from olive waste in Palestine. Journal of Environmental Science & Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering. 2018;53(1):39–45. DOI: 10.1080/09593330.2017.1296897
13. Topalova Yana, Dimkov Raycho, Todorova Yovana, Daskalova Elmira&Perar Petrov. Biodegradation of Phenol by Immobilized in Peo-Cryogel *Bacillus Laterosporus* BT-271 in Sequencing Batch Biofilter. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2011;25(4):2613–2619. DOI: 10.5504/BBEQ.2011.0076
14. Patent of Ukrai'ny №129673. Method of microbiological purification of water from phenol and N-cetylpyridinium bromide / Ivanycja VO, Gudzenko TV, Gorshkova OG, Voljuvach OV, Konup IP, Bjel'jajeva TO, Chaban M, Rakyts'ka SI. – заявка на патент №u201804337 vid 20.04.2018. Opubl. 12.11.2018., Byul. № 21/2018 [in Ukrainian].
15. Patent of Ukrai'ny №97747. Method of aerobic biological treatment of sewage / Gvozdyak PI, Globa LI, Sablij LA, Kaparnyk AI, Borysenko OO, Zhukova VS. Opubl. 12.03.2012. Byul. № 5 [in Ukrainian].

Стаття надійшла до редакції 18.03.2019 р.

