

**Т.В. Гудзенко, Н.В. Коротаєва, О.В. Волювач,  
Т.О. Беляєва, О.Г. Горшкова, В.О. Іваниця**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082,  
Україна, e-mail: korotaeva.n@onu.edu.ua

## **СКЛАД ЖИРНИХ КИСЛОТ ЛІПІДІВ НАФТООКИСНЮВАЛЬНИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *PSEUDOMONAS***

**Мета.** Визначення складу жирних кислот ліпідів та ідентифікація штамів бактерій роду *Pseudomonas*, що окиснюють нафту та нафтопродукти, за їх жирно-кислотним складом. **Методи.** Аналіз жирних кислот штамів *Pseudomonas* sp. ONU328 і *Pseudomonas* sp. ONU329 проводили методом газової хроматографії з використанням системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI, USA). **Результати.** Аналіз результатів хроматографічних досліджень показав, що домінуючими в жирно-кислотному профілі штамів *Pseudomonas* sp. ONU328 і *Pseudomonas* sp. ONU329 були довголанцюгові ненасичені та насичені жирні кислоти, а також їх розгалужені структурні ізомери. В профілях обох штамів виявлено гексадеканову ( $C_{16}:0$ ) та гексадеценову ( $C_{16}:1w7c/C_{16}:1w6c$ ) жирні кислоти. На сумарну частку коротколанцюгових насичених гідроксикулот у штамі *Pseudomonas* sp. ONU328 припадало 12,6%, а у штамі *Pseudomonas* sp. ONU329 до 7% від загальної суми площ піків на хроматограмах складали розгалужені ізомери коротколанцюгових насичених гідроксикулот. Вперше встановлено, що штами близькосторідних видів псевдомонад чітко розмежовуються за наявністю циклогептадеканової у *Pseudomonas* sp. ONU328 та 13-метилтетрадеканової ( $C_{15}:0$  iso) і 12-метилтетрадеканової ( $C_{15}:0$  anteiso) жирних кислот у *Pseudomonas* sp. ONU329. Ознакою цих штамів також слугує показник ненасиченості жирних кислот. **Висновок.** За складом жирних кислот досліджувані штами *Pseudomonas* sp. ONU329 та *Pseudomonas* sp. ONU328 ідентифіковані, відповідно як *Pseudomonas maltophilia* ONU329 та *Pseudomonas fluorescens* ONU328. Відмічені особливості жирно-кислотного профілю досліджуваних мікроорганізмів систематизовані та можуть бути використані як допоміжний ключ для розмежовування бактерій цих видів.

*Ключові слова:* склад жирних кислот, ідентифікація, *Pseudomonas*.

Поширеним класичним методом ідентифікації мікроорганізмів є аналіз їх жирно-кислотного профілю в клітині. Жирні кислоти входять до складу фосфоліпідів, які є основними структурними складовими мембран. Часто їх якісний та кількісний склад є специфічною ознакою та використовується як хемотаксономічний маркер.

На сьогодні, при жирнокислотному аналізі широко застосовується система ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа.



Очевидними перевагами такої системи є наявність автоматичної ідентифікації досліджуваних мікроорганізмів з використанням бібліотек жирно-кислотних профілів. [6, 7, 10]. Такі дослідження можуть бути важливими не лише при вивченні нових та малодосліджених мікроорганізмів, а також бути необхідними для періодичної перевірки культур на чистоту у процесі виготовлення нафто-окиснювального біопрепарату для біоремедіації довкілля [12].

У попередніх дослідженнях показано, що два штами бактерій, виділені з морського середовища та попередньо ідентифіковані класичними методами за морфологічними, культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками як *Pseudomonas sp. ONU328* і *Pseudomonas sp. ONU329*, за десять діб експозиції активно утилізують до 70% вуглеводнів сирової нафти з вихідною концентрацією 500 мг/дм<sup>3</sup> [1], здатні до сорбції важких металів [4] та деструкції біорезистентних органічних поверхнево-активних сполук [2].

Метою роботи було визначення складу жирних кислот клітинних ліпідів та ідентифікація штамів бактерій роду *Pseudomonas sp.*, що окиснюють нафту та нафтопродукти, за їх жирно-кислотним складом.

### Матеріали і методи

Як об'єкти дослідження використовували два штами бактерій *Pseudomonas sp. ONU328* і *Pseudomonas sp. ONU329*, що зберігаються в колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Бактерії вирощували на середовищі Tryptic soy agar (Merck, Germany). Культивували при 28±1 °С впродовж 24 годин. Підготовку проб та хроматографічне розділення метилових ефірів жирних кислот здійснювали згідно стандартного протоколу. Одну повну петлю вологої біомаси поміщали в скляні віали для подальшого руйнування клітин та омилення ліпідів мікроорганізмів. Омилення проводили додаванням суміші метанолу та луку, проби витримували впродовж 30 хв при температурі 95–100 °С. Метилювання жирних кислот проводили прогріванням реакційної суміші при 80 °С впродовж 10 хв після додавання розчину кислого метанолу. Екстраговані метилові ефіри жирних кислот нейтралізували 0,3 М розчином NaOH [9].

Хроматографічне розділення проводили на газовому хроматографі Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA), колонка капілярна ULTRA 2 (25 м x 0,2 мм x 0,33 мкм), детектор полум'яно-іонізаційний. Пробу, об'ємом 2 мкл вводили в режимі split з коефіцієнтом 40:1, температура випаровувача 250 °С. Розділення проводили в режимі програмування температури – початкова температура 170 °С з наступним градієнтом 5 °С/хв до 270 °С. Вміст жирних кислот виражали у відсотках до загальної суми площ піків. Для ідентифікації досліджуваних штамів використовували бібліотеку RSTBA6 6.2.

### Результати досліджень

Аналіз хроматограми, представленої на рис. 1, показав, що домінантними в жирнокислотному профілі досліджуваного штаму *Pseudomonas sp. ONU329*



були розгалужені ізомери насичених жирних кислот (42,0%), із яких 32,0% припадало на 13-метилтетрадеканову кислоту ( $C_{15}:0$  iso). Частка 12-метилтетрадеканової кислоти ( $C_{15}:0$  anteiso) від загальної площі піків складала 17,4%. Нерозгалужені насичені жирні кислоти склали 7,5%, що в 5,6 разів менше, ніж розгалужених ізомерів.

Частка жирних кислот з парною кількістю атомів вуглецю у вуглеводневому радикалі: тетрадеканової кислоти ( $C_{14}:0$ ) та гексадеканової кислоти ( $C_{16}:0$ ) склали відповідно 2,6% і 4,9%. Ізомерів гексадеценаної кислоти виявлено 17,7%, з яких 13,5% припадає на 9-гексадеценанову та 10-гексадеценанову кислоти ( $C_{16}:1$  w7c/ $C_{16}:1$  w6c) і 4,2% – на 15-метил-7-гексадеценанову кислоту ( $C_{17}:1$  iso w9c). Дещо в менших кількостях виявлені коротколанцюгові насичені гідроксикислоти  $C_{12}:0$  3ОН (2,8%) та розгалужені структурні ізомери насичених гідроксикислот  $C_{11}:0$  iso 3ОН (1,7%),  $C_{13}:0$  iso 3ОН (2,1%).

За жирнокислотним складом, який розшифровано з використанням бібліотечної бази даних RTSBA6 6.21 програми MIDI Sherlock, досліджуваний штам *Pseudomonas sp. ONU329* ідентифіковано як *Pseudomonas maltophilia* з високим індексом схожості – 0,719 (табл. 1).

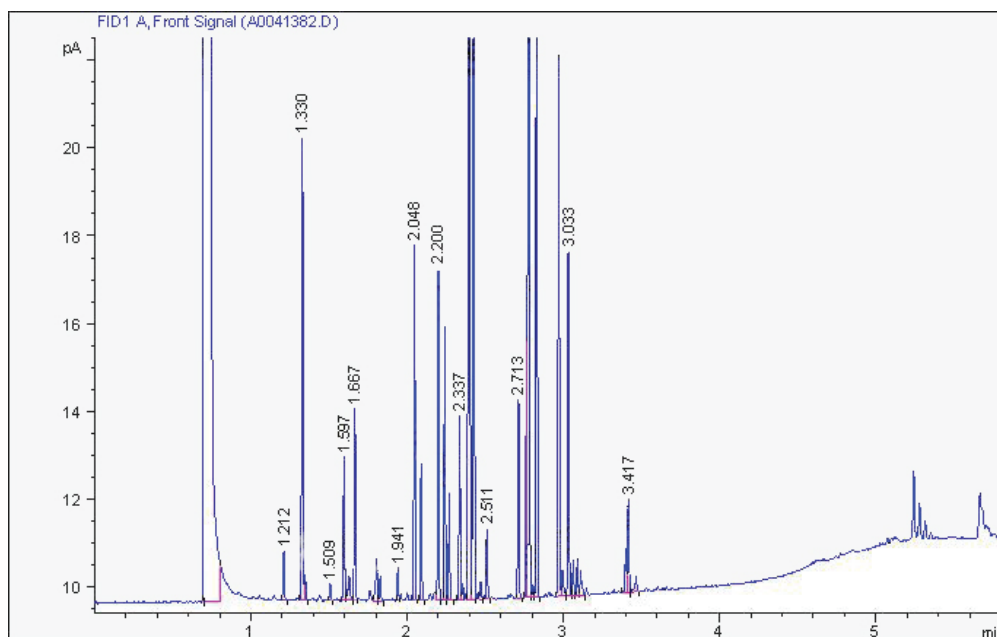


Рис. 1. Хроматограма жирних кислот загальних ліпідів штаму *Pseudomonas sp. ONU329*

Fig. 1. Chromatogram of fatty acids total lipids of strain *Pseudomonas sp. ONU329*

Особливістю другого досліджуваного штаму *Pseudomonas sp. ONU328* є наявність у його жирнокислотному профілі циклогептадеканової кислоти ( $C_{17}:0$  cyclo) – 2,2% та відсутність міристинової кислоти ( $C_{14}:0$ ). Виявлено додеканову кислоту ( $C_{12}:0$ ) в кількості 4,1% від загальної суми площ піків (рис. 2).

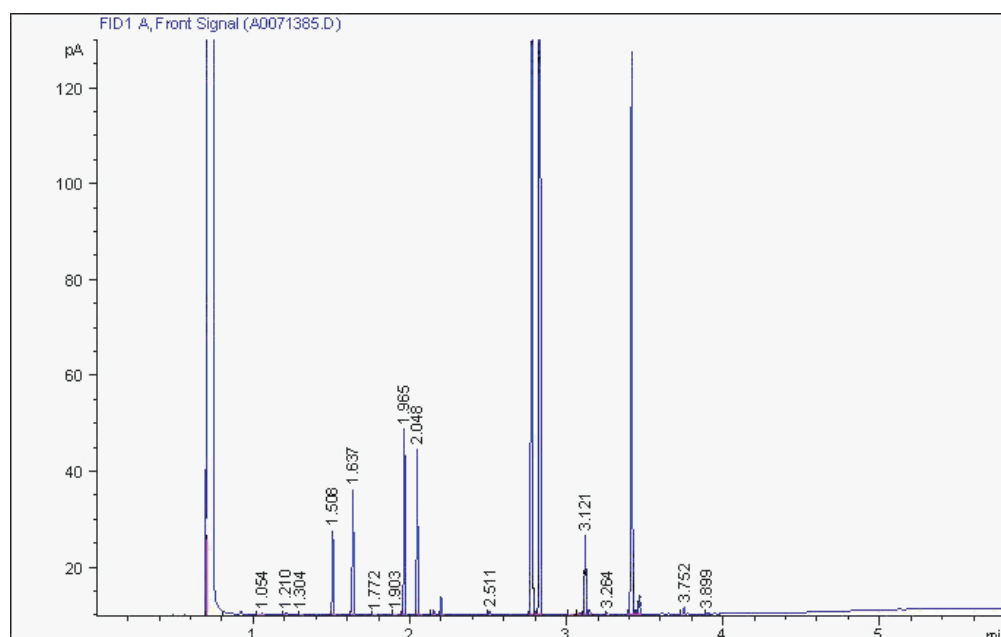


Рис. 2. Хроматограма жирних кислот загальних ліпідів штаму *Pseudomonas sp. ONU328*

Fig. 2. Chromatogram of fatty acids total lipids of strain *Pseudomonas sp. ONU328*

Частка пальмітинової кислоти ( $C_{16}:0$ ) складала 4,9% для штаму *Pseudomonas sp. ONU329*, а для штаму *Pseudomonas sp. ONU328* – 28,0%, при загальному вмісті насичених жирних кислот з парним числом атомів вуглецю у вуглеводневому радикалі 7,5 і 32,0%, відповідно. В жирнокислотному профілі загальних ліпідів штаму *Pseudomonas sp. ONU328* порівняно зі штамом *Pseudomonas sp. ONU329* в 5,7 рази переважали довголанцюгові насичені, та не реєструвались розгалужені структурні ізомери насичених жирних кислот, на їх частку у складі штаму *Pseudomonas sp. ONU329* припадало близько 42,0%, з яких 32,0% – на 13-метилтетрадеканову кислоту ( $C_{15}:0$  iso).

Встановлено більший вміст ізомерів гексадеценової жирної кислоти ( $C_{16}:1$  w7c/  $C_{16}:1$  w6c), майже в 2,7 рази, в складі загальних ліпідів штаму *Pseudomonas sp. ONU328* (36,2%) порівняно зі штамом *Pseudomonas sp. ONU329*, та виявлено 11-октадеценову кислоту з  $\omega$  ( $C_{18}:1$  w7c) – 15,2%. При сумарному вмісті ненасичених жирних кислот – 51,4% у складі клітин штаму *Pseudomonas sp. ONU328* їх перебільшення щодо до насичених жирних кислот (32,0%) є більш помітним (табл. 1).

Порівняно з часткою насичених і ненасичених жирних кислот, як і в штамі *Pseudomonas sp. ONU329*, у малих кількостях виявлено коротколанцюгові насичені гідроксикислоти  $C_{10}:0$  3OH (2,7%),  $C_{12}:0$  2OH (5,3%),  $C_{12}:0$  3OH (4,6%) (табл. 2).

Таблиця 1

Основні жирні кислоти (%) *P. maltophilia* ONU329 та *P. fluorescens* ONU328

Table 1

The main fatty acids (%) of *P. maltophilia* ONU329 and *P. fluorescens* ONU328

Жирна кислота	<i>P. maltophilia</i> ONU329	<i>P. fluorescens</i> ONU328
C <sub>11</sub> :0 iso	4,7	-
C <sub>12</sub> :0	-	4,1
C <sub>14</sub> :0	2,6	-
C <sub>15</sub> :0 anteiso	17,4	-
C <sub>15</sub> :0 iso	32,0	-
C <sub>16</sub> :0	4,9	28,0
C <sub>16</sub> :0 iso	1,5	-
C <sub>16</sub> :1 w7c/ C <sub>16</sub> :1 w6c	13,5	36,2
C <sub>16</sub> :1 w9c	1,8	-
C <sub>17</sub> :1 iso w9c	4,2	-
C <sub>17</sub> :0 cyclo	-	2,2
C <sub>18</sub> :1 w7c	0,4	15,2

Примітка: «-» – не виявлена

Note: «-» – not determined

Другий досліджуваний штам *Pseudomonas* sp. ONU328 ідентифіковано як *Pseudomonas fluorescens* з індексом схожості 0,780.

Таблиця 2

Гідроксикислоти (%) *P. maltophilia* ONU329 та *P. fluorescens* ONU328

Table 2

The hydroxy fatty acids (%) of *P. maltophilia* ONU329 and *P. fluorescens* ONU328

ОН-кислота	<i>P. maltophilia</i> ONU329	<i>P. fluorescens</i> ONU328
C <sub>10</sub> :0 3OH	-	2,7
C <sub>11</sub> :0 iso3OH	1,7	-
C <sub>12</sub> :0 2OH	-	5,3
C <sub>12</sub> :0 iso3OH	2,8	-
C <sub>12</sub> :0 3OH	-	4,6
C <sub>13</sub> :0 2OH	0,8	-
C <sub>13</sub> :0 iso3OH	2,1	-

Примітка: «-» – не виявлена

Note: «-» – not determined



З викладеного вище можна констатувати, що близькоспоріднені види чітко розмежовуються за характерними ознаками: наявністю в жирнокислотному складі загальних жирних кислот у *P. fluorescens ONU328* циклогептадеканової кислоти, а у *P. maltophilia ONU329* – 13-метилтетрадеканової кислоти ( $C_{15}:0$  iso), 12-метилтетрадеканової кислоти ( $C_{15}:0$  anteiso) та інших жирних кислот, що представлені в табл. 1. Іншим показником їх відмінності може слугувати показник ненасиченості ( $K_{\text{ненасич}}$ ), що розраховується за співвідношенням загальних кількостей ненасичених і насичених жирних кислот, або за відсотками вміст пальмітинової ( $C_{16}:0$ ) та пальмітолеїнової ( $C_{16}:1$  w7c/ $C_{16}:1$  w6c) кислот. Так, для штаму *P. maltophilia ONU329* показник ненасиченості з урахуванням насиченої розгалуженої жирної кислоти  $C_{15}:0$  anteiso дорівнює 0,22 (15,4/71,1), а для штаму *P. fluorescens ONU328* з урахуванням кислоти  $C_{17}:0$  cyclo – 1,50 (51,4/34,3). Частка  $C_{16}:0$  і  $C_{16}:1$  w7c/ $C_{16}:1$  w6c при переході від штаму *P. maltophilia ONU329* до штаму *P. fluorescens ONU328* підвищується з 4,9 до 28,0% і від 13,5 до 36,2%.

У таблиці 3 наведено особливості жирнокислотного профілю досліджуваних мікроорганізмів, які можуть бути використані як допоміжний ключ для диференціації на видовому рівні (за результатами дослідження складу жирних кислот) бактерій роду *Pseudomonas*.

Таблиця 3

Особливості складу жирних кислот досліджуваних штамів  
*P. maltophilia ONU329* та *P. fluorescens ONU328*

Table 3

Characteristics of fatty acid composition of the investigated strains  
*P. maltophilia ONU329* and *P. fluorescens ONU328*

Штам	$K_{\text{ненасич}}$	Наявність ЖК			
		$C_{17}:0$ cyclo	$C_{15}:0$ anteiso та $C_{15}:0$ iso	$C_{17}:1$ iso w9c	$C_{12}:0$
<i>P. maltophilia ONU329</i>	0,22	-	+	+	-
<i>P. fluorescens ONU328</i>	1,50	+	-	-	+

Таким чином, при аналізі жирнокислотного складу з використанням системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock, досліджувані штами *Pseudomonas sp. ONU329* та *Pseudomonas sp. ONU328* ідентифіковані як *Pseudomonas maltophilia ONU329* та *Pseudomonas fluorescens ONU328*, відповідно.



Т.В. Гудзенко, Н.В. Коротаєва, О.В. Волювач, Т.А. Беляева,  
О.Г. Горшкова, В.А. Иваныця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,  
e-mail: korotaeva.n@onu.edu.ua

## СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ЛИПИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*, ОКИСЛЯЮЩИХ НЕФТЕПРОДУКТЫ

### Реферат

**Цель.** Определение состава жирных кислот клеточных липидов и идентификация штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, которые окисляют нефть и нефтепродукты. **Методы.** Жирно-кислотный анализ штаммов *Pseudomonas sp.* ONU328 и *Pseudomonas sp.* ONU329 проводили методом газовой хроматографии с использованием системы идентификации микроорганизмов MIDI Sherlock (MIDI, USA). **Результаты.** Анализ результатов хроматографических исследований показал, что доминантными в жирно-кислотном профиле штаммов *Pseudomonas sp.* ONU328 и *Pseudomonas sp.* ONU329 являлись длинноцепочечные ненасыщенные и насыщенные жирные кислоты, а также их разветвленные структурные изомеры. В профилях обоих штаммов были обнаружены гексадекановая ( $C_{16}:0$ ) и гексадеценовая ( $C_{16}:1\ w7c/C_{16}:1\ w6c$ ) жирные кислоты. На суммарную долю короткоцепочечных насыщенных гидроксикислот у штамма *Pseudomonas sp.* ONU328 приходилось 12,6%, а у штамма *Pseudomonas sp.* ONU329 до 7% от общей суммы площадей пиков на хроматограммах составляли разветвленные изомеры короткоцепочечных насыщенных гидроксикислот. Впервые установлено, что штаммы близкородственных видов псевдомонад четко разграничиваются по наличию циклогептадекановой у *Pseudomonas sp.* ONU328, а также 3-метилтетрадекановой ( $C_{15}:0\ iso$ ) и 12-метилтетрадекановой ( $C_{15}:0\ anteiso$ ) жирных кислот у *Pseudomonas sp.* Отличительным признаком этих штаммов является показатель ненасыщенности жирных кислот. **Вывод.** По составу жирных кислот исследуемые штаммы *Pseudomonas sp.* ONU329 и *Pseudomonas sp.* ONU328 идентифицированы соответственно как *Pseudomonas maltophilia* ONU329 и *Pseudomonas fluorescens* ONU328. Отмеченные особенности жирно-кислотного профиля исследуемых микроорганизмов систематизированы и могут быть использованы в качестве вспомогательного ключа для разграничения бактерий этих видов.

Ключевые слова: состав жирных кислот, идентификация, *Pseudomonas*



**T.V. Gudzenko, N.V. Korotaeva, O.V. Voliuvach, T.O. Beliaeva,  
O.G. Gorshkova, V.O. Ivanytsia**

Odesa National I.I. Mechnykov University, 2, Dvorianska str., Odesa, 65082, Ukraine,  
e-mail: korotaeva.n@onu.edu.ua

## FATTY ACID COMPOSITION OF LIPIDS OF BACTERIA OF THE GENUS *PSEUDOMONAS*, OXIDIZING PETROLEUM PRODUCTS

### Summary

**Aim.** Determination of fatty acid composition of lipids and identification of strains of bacteria of the genus *Pseudomonas*, which oxidize crude oil and petroleum products. **Methods.** The fatty acid analysis of strains of *Pseudomonas sp.* ONU328 и *Pseudomonas sp.* ONU329 were carried out by gas chromatography using identification of microorganisms MIDI Sherlock (MIDI, USA). **Results.** The analysis of the results of gas chromatography showed that long-chain unsaturated and saturated fatty acids and branched structural isomers dominated in profile of fatty acid of the strains of *Pseudomonas sp.* ONU328 и *Pseudomonas sp.* ONU329. In the profiles of fatty acid of both strains there were detected hexadecanoic acid ( $C_{16}:0$ ) and hexadecanoic acid ( $C_{16}:1$  w7c/ $C_{16}:1$  w6c). This short-chain saturated hydroxy acids of the strain of *Pseudomonas sp.* ONU328 accounted for 12.6%, and the branched structural isomers of short-chain saturated hydroxy acids of the strain of *Pseudomonas sp.* ONU329 – up to 7% of the total peak areas. For the first time there were established that the closely related species of *Pseudomonas* were distinguished by the presence of cycloheptadecanoic acid of *P. fluorescens* ONU328 and 13-methyltetradecane acid ( $C_{15}:0$  iso), 12-methyltetradecane acid ( $C_{15}:0$  anteiso) of *P. maltophilia* ONU329. A distinctive indicator of their separation is a measure of unsaturations. **Conclusion.** The fatty acid composition of the investigated strains of *Pseudomonas sp.* ONU328 и *Pseudomonas sp.* ONU329 identified as *Pseudomonas maltophilia* ONU329 and *Pseudomonas fluorescens* ONU328. The peculiarities of fatty acid profile of the studied microorganisms were systematized and can be used as an auxiliary key for differentiation at the species level (according to a study in cellular fatty acid composition of bacteria in these species).

**Key words:** fatty acid composition, identification, *Pseudomonas*.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Бєляєва Т.О., Пузирьова І.В., Лісютін Г.В., Горшкова О.Г., Іваниця В.О. Нафтоокиснювальна активність деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 4 (24). – С. 72–80.
2. Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Бєляєва Т.О., Горшкова О.Г., Пузирьова І.В., Іваниця В.О. Видалення броміду гексадецилпіридинію із водних розчинів з





бактеріями роду *Pseudomonas* за їх взаємодії з глинистим мінералом та хітозаном // Мікробіологія і біотехнологія. – 2014. – № 1 (25). – С. 72–78.

3. Жданов Р.И., Керн Д., Лоренц В., Ибрагимова М.Я. Жирнокислотный состав ДНК-связанных липидов *Pseudomonas aurantiaca* по данным масс-спектрометрии // Цитология. – 2014. – Т. 56, № 6. – С. 437–438.

4. Іваниця В.А., Бухтияров А.Е., Лисютин Г.В., Захарія А.Н., Гудзенко Т.В. Аккумуляция тяжелых металлов бактериями рода *Pseudomonas* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – № 4 (20). – С. 76–83.

5. Кейтс М. Техника липидологии. – М. : Мир, 1975. – 324 с.

6. Шмырина А.С. Жирнокислотный профиль и структурное моделирование ДНК-связанных липидов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2005. – 21 с.

7. Carla C.C.R., de Carvalho, Maria-Jose Caramujo. Fatty Acids as a Tool to Understand Microbial Diversity and Their Role in Food Webs of Mediterranean Temporary Ponds // Molecules. – 2014. – V. 19. – P. 5570–5598; doi: 10.3390/molecules 19055570. – www.mdpi.com/journal/molecules.

8. Kunitsky C., Osterhout G., Sasser M. Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the MIDI Sherlock microbial identification system. In Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods; Miller M.I., Ed.; Davis Healthcare International Publishing, LLC: Baltimore, MD, USA. – 2005. – Vol. III. – P. 1–17.

9. MIS Operating Manual. www.midi-inc.com, September 2012.

10. Mukund Chandra Thakur, Arif Khan, Hiren Doshi. Isolation and Screening of Dye Degrading Microorganisms from the Effluents of Dye and Textile Industries at Surat // American Journal of Environmental Engineering. – 2012. – № 2 (6). – P. 152–159. doi: 10.5923/j.ajee.20120206.02 e-ISSN: 2166-465X.

11. Piotrowska-Seget Z., Mrozek A. Signature Lipid Biomarker (SLB) Analysis in Determining Changes in Community Structure of Soil Microorganisms // Polish Journal of Environmental Studies. – 2003. – Vol. 12, № 6. – P. 669–675.

12. Патент України № 95859 А. Біопрепарат для сорбції і деструкції вуглеводнів і спосіб очищення води та /або ґрунту від забруднень нафтою та нафтопродуктами / Іваниця В.О., Гудзенко Т.В., Беляєва Т.О., Бобрешова Н.С., Кожанова Г.А., Кривицька Т.М., Конуп І.П., Баранов О.О. / Опубл. 12.09.2011. Бюл. № 17.

Стаття надійшла до редакції 08.08.2014 р.

