

УДК 579.695

Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.О. Беляєва, І.П. Конуп,  
А.Є. Бухтіяров, Г.В. Лісютін, І.В. Пузирьова, О.Г. Горшкова,  
В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
65082, Одеса, вул. Дворянська, 2, e-mail: v\_ivanit@ukr.net

## НАФТООКИСНЮВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ДЕЯКИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *PSEUDOMONAS*

**Мета.** Дослідження нафтоокиснювальної активності деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas*, відібраних для використання у біоремедіації ґрунту. **Методи.** Бактерії *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. serasia* ONU327 культивували в поживному середовищі М-9, що містило сирю нафту густиною 0,84 г /см<sup>3</sup> у концентрації 500 мг /л. Залишковий вміст нафти через 10, 20 та 30 діб визначали інтегральним методом інфрачервоної спектрометрії. Екстрагування нафти із проб здійснювали з використанням чотирохлористого вуглецю (CCl<sub>4</sub>). **Результати.** У результаті проведених досліджень встановлено, що бактерії роду *Pseudomonas*, відібрані для використання в біотехнології очищення ґрунту, впродовж місяця розкладають вуглеводні сирової нафти з вихідною концентрацією 500 мг /дм<sup>3</sup> на 70–80%. Нафтоокиснювальна активність усіх використаних штамів мікроорганізмів була високою. Уже в перші 10 діб експозиції – ступінь біодеструкції вуглеводнів нафти досягав 62,0–73,0%. **Висновок.** Штами бактерій *P. serasia* ONU327, *P. maltophilia* ONU329 та *P. fluorescens* ONU328 можуть бути рекомендовані для розробки технологій біоремедіації ґрунту від нафти та нафтопродуктів.

*Ключові слова:* нафта, бактерії роду *Pseudomonas*, біодеструкція, нафтоокиснювальна активність.

Біологічний метод очищення ґрунту і води від нафти та нафтопродуктів, заснований на застосуванні мікроорганізмів-деструкторів вуглеводнів нафти, став пріоритетним. Різноманітна і пластична ферментативна система, що дозволяє досить швидко перемикається на споживання з одних на інші джерела вуглецю та енергії, висока пластичність обмінних процесів, швидка адаптація до умов існування дозволяє нафтоокиснювальним бактеріям активно утилізувати вуглеводні нафти [6, 8, 10].

Відомо широкий спектр гетеротрофних мікроорганізмів представників родів *Acinetobacter*, *Arhtrobacter*, *Arenimonas*, *Bacillus*, *Desulfobacterium*, *Rhodococcus* та інших, які здатні утилізувати вуглеводні нафти [4, 7, 11,

© Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.О. Беляєва, І.П. Конуп, А.Є. Бухтіяров, Г.В. Лісютін, І.В. Пузирьова, О.Г. Горшкова, В.О. Іваниця, 2013



12]. До найбільш активних деструкторів вуглеводнів нафти відносяться бактерії роду *Pseudomonas* – типові хемоорганогетеротрофи, які здатні засвоювати вуглеводні нафти як єдине джерело вуглецю та енергії [12].

Метою роботи було дослідження нафтоокиснювальної активності деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas*, відібраних для використання у біотехнологіях очищення ґрунту.

### Матеріали та методи

Об'єктами дослідження слугували три штами непатогенних бактерій роду *Pseudomonas*, що попередньо були виділені, відібрані та зберігаються у колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова: *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327. Штами *P. fluorescens* ONU328 та *P. maltophilia* ONU329 виділені з морського середовища, а *P. cepacia* ONU327 – з забрудненого нафтопродуктами ґрунту.

В експериментах використовували сиру нафту темно-коричневого кольору з густиною 0,84 г /см<sup>3</sup>. Дослідження нафтоокиснювальної активності бактерій проводили за температури 28 °С впродовж місяця.

Культивування бактерій здійснювали на поживному середовищі М-9, що містило нафту у концентрації 500 мг /л. У контрольних пробах досліджуваних штамів бактерій роду *Pseudomonas* культивували на поживному мінеральному середовищі М-9 без додавання нафти.

Залишковий вміст нафти через 10, 20 та 30 діб визначали інтегральним методом інфрачервоної спектроскопії на приладі «ИКС-29». У кожному випадку в діапазоні хвильових чисел 2700-3200 см<sup>-1</sup> здійснювали реєстрацію ІЧ-спектра поглинання, зумовленого валентними коливаннями СН<sub>3</sub>- і СН<sub>2</sub>- груп аліфатичних і аліциклічних сполук і бокових ланцюгів ароматичних вуглеводнів, а також вуглець-водневих зв'язків ароматичних сполук [5, 6]. Перевагою методу ІЧ-спектроскопії є те, що виключається стадія випаровування екстракту (в порівнянні з гравіметричним аналізом), що зазвичай, супроводжується значною втратою легких фракцій нафти.

Екстрагування нафти із проб здійснювали з використанням чотирихлористого вуглецю (CCl<sub>4</sub>) марки «х.ч.» Органічний розчинник об'ємом 25 мл змішували з 10 мл досліджуваної проби, інтенсивно струшували впродовж хвилини, після чого давали пробі відстоятися впродовж 15 хв.

Шар екстрагента, куди переходили вуглеводні нафти (екстракт) відділяли від залишків суспензійної культури, далі екстракт пропускали через хроматографічну колонку, заповнену оксидом алюмінію (II ступеня активності по Брокману).

Оксид алюмінію заздалегідь витримували при температурі 600 °С впродовж 4 год у муфельній печі, охолоджували в ексікаторі, після чого інтенсивно перемішуючи додавали дистильовану воду в кількості 3% від



маси сорбенту та витримували добу. Перед фільтруванням колонку попередньо добре змочували чистим  $\text{CCl}_4$ . При швидкості фільтрування 5 мл за 10 хв вуглеводні нафти переходили у фільтрат.

Нафтоокиснювальну активність бактерій (А, %) визначали за формулою:

$$A = \left( \frac{K_H^0 - K_{H(\text{практ})}}{K_H^0} \right) \cdot 100\%, \quad (1)$$

де  $K_H^0$  – вихідна концентрація нафти (500 мг /л);  $K_{H(\text{практ})}$  – залишкова або практична концентрація нафти (у мг /л), яка пов'язана з залишковою вимірною концентрацією нафти рівнянням:

$$K_{H(\text{практ})} = \frac{K_{H(\text{вимір})} \cdot \text{Об}_1}{\text{Об}_2}, \quad (2)$$

де  $\text{Об}_1$  – об'єм чотирьох хлористого вуглецю 25 см<sup>3</sup>, взятого для екстракції;  $\text{Об}_2$  – об'єм проби 10 см<sup>3</sup>.

Обробку експериментальних даних, а саме: значень  $K_{H(\text{вимір})}$  і  $K_{H(\text{практ})}$  здійснювали за допомогою програми Excel.

### Результати та їх обговорення

Вуглеводні різних сортів нафти являють собою суміш сполук окремих класів, що володіють суттєво відмінними між собою властивостями. Тому перед вивченням нафтоокиснювальної здатності мікроорганізмів було встановлено градуїзовану логарифмовану залежність різниці оптичних густин досліджуваного і холостого розчинів ( $\Delta D$ ) від концентрації нафти ( $K_H$ ).

Різницю оптичних густин ( $\Delta D$ ) розраховували при хвильових числах, що відповідають максимуму і мінімуму смуги поглинання, за формулою:

$$\Delta D = - \ln (T_1 / T_2), \quad (3)$$

де  $T_1$  – значення пропускання (%) в максимумі смуги поглинання при  $(2926 \pm 15)$  см<sup>-1</sup>;  $T_2$  – значення пропускання (%) в мінімумі смуги поглинання при  $(2700 \pm 15)$  см<sup>-1</sup>.

У результаті досліджень одержано ІЧ-спектри поглинання вуглеводнів при концентраціях досліджуваної нафти 10, 50 і 100 мг /л (рис. 1, А).

На одержаних ІЧ-спектрах поглинання вуглеводнів за різних концентрацій досліджуваної нафти значення  $T_1$  відповідає найвищій точці, а значення  $T_2$  – лівій найнижчій точці на ІЧ-спектрі. У результаті обробки за допомогою програми Excel експериментально одержаних даних для досліджуваної нафти побудовано градуїований графік з точністю  $R^2 = 0,9886$  (рис. 1, Б).



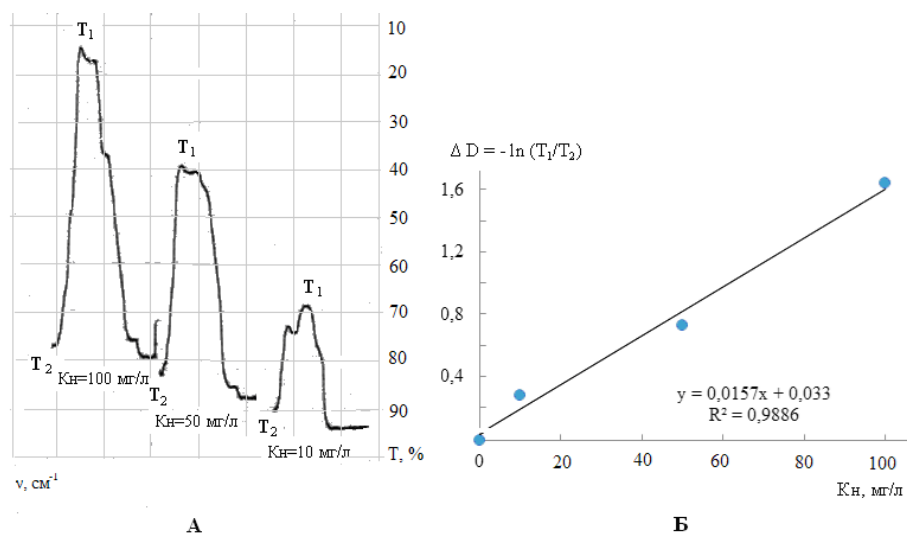


Рис. 1. ІЧ-спектрометричне дослідження нафти з густиною 0,84 г /см<sup>3</sup> (А)  
Градуирований графік визначення вмісту досліджуваної сирої нафти (Б)

Fig. 1. IR spectroscopic study of oil with density 0,84 g /cm<sup>3</sup> (A).  
Calibration curve of determination of investigated crude oil content (B)

У результаті ІЧ-спектрометричного дослідження (рис. 2) контрольних проб (суспензій бактерій штамів *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 та *P. seracia* ONU327), які не містили нафти, встановлено, що сполуки, які входять до складу клітин бактерій, також мають поглинальну здатність в діапазоні хвильових чисел 2700–3200 см<sup>-1</sup> (рис. 2, Б).

На підставі проведених досліджень зроблено висновок про те, що інтерпретацію нафтоокиснювальної активності штамів роду *Pseudomonas* за одержаними ІЧ-спектрами необхідно здійснювати, враховуючи ІЧ-спектри поглинання суспензій бактерій.

Результати дослідження деструктивних властивостей штамів бактерій роду *Pseudomonas*, призначених для використання у біотехнологіях очищення ґрунту від нафтопродуктів, представлені у таблиці.

Дослідження показали, що нафтоокиснювальна здатність всіх використаних штамів мікроорганізмів була високою у перші 10 діб експозиції — ступінь біодеструкції вуглеводнів нафти досягав 62,0–73,0%.

Експериментальні дані, представлені у таблиці показують, що зі збільшенням терміну експозиції до 20 діб залишкова концентрація вуглеводнів нафти зменшувалася у 2,6–3,7 рази, а на тридцяту добу — у 5 разів порівняно з вихідною концентрацією — 500 мг /л.

З наведених у таблиці даних видно, що залишкова концентрація вуглеводнів нафти за деструкції їх бактеріями *P. fluorescens* ONU328 з десятої до двадцятої доби практично не змінилася (38,0%), а через 30 діб експозиції зменшилася до 20,6%.

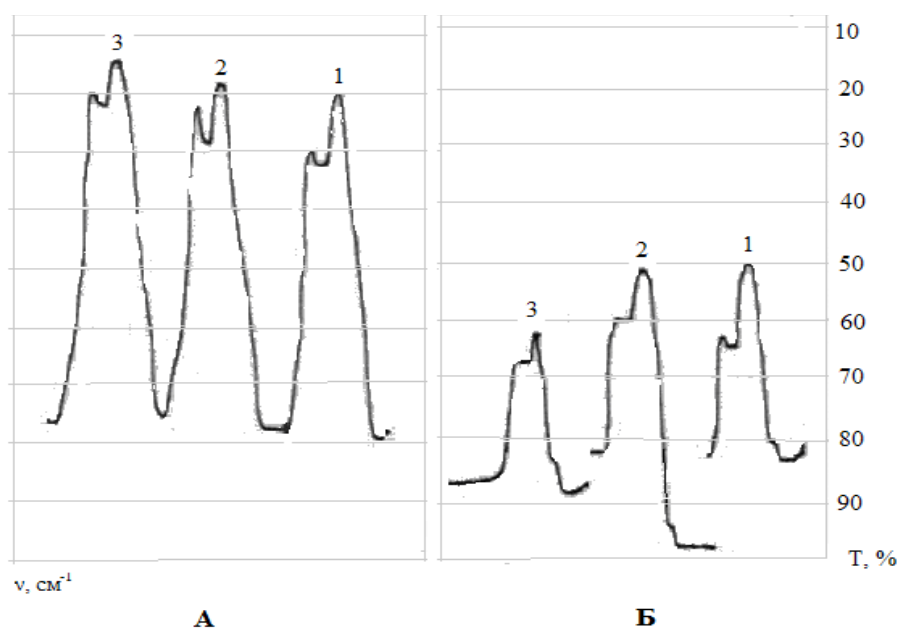


Рис. 2. ІЧ-спектри поглинання в області 2700-3200 см<sup>-1</sup>:

А — дослідні проби, що містили вуглеводні нафти після біодеградації бактеріями; Б — контрольні проби — суспензії бактерій, що не містили вуглеводні нафти. Експозиція двадцять діб.

Позначення: 1 — *P. ceracia* ONU327, 2 — *P. maltophilia* ONU329, 3 — *P. fluorescens* ONU328.

Fig. 2. IR absorption spectra in the field of 2700-3200 cm<sup>-1</sup>:

A — the studied samples containing hydrocarbons of oil biodegradation by bacteria; B — control samples — suspension of bacteria not contained oil hydrocarbons. Exposition of twenty days.

Designation: 1 — *P. ceracia* ONU327, 2 — *P. maltophilia* ONU329, 3 — *P. fluorescens* ONU328.

Таблиця

Залишковий вміст вуглеводнів нафти після деструкції бактеріями роду *Pseudomonas*

Table

The residual content of oil hydrocarbons after the destruction by bacteria of *Pseudomonas* genus

Штам	10 діб		20 діб		30 діб	
	мг /л	%	мг /л	%	мг /л	%
<i>P. fluorescens</i> ONU328	190±1,0	38,0	190±5,0	38,0	103±3,0	20,6
<i>P. maltophilia</i> ONU329	154±3,0	30,8	140±3,0	28,0	100±5,0	20,0
<i>P. ceracia</i> ONU327	135±1,0	27,0	134±3,0	26,8	116±2,0	23,2

Примітка: Вихідна концентрація вуглеводнів нафти 500 мг /л  
 Note: the initial concentration of oil hydrocarbons 500 mg /l



Залишкова концентрація вуглеводнів нафти під дією бактерій *P. maltophilia* ONU329 та *P. seracia* ONU327 впродовж всього терміну спостережень поступово зменшувалася та досягла мінімуму (відповідно, 20,0% і 23,2%) на 30 добу експозиції.

Отже, найвищу деструктивну активність виявили усі досліджувані штами впродовж перших 10 діб культивування. Це, очевидно, можна пояснити тим, що за цей час, в першу чергу, бактерії утилізують легкозасвоювані вуглеводні: н-алкани і циклічні сполуки із одним ароматичним кільцем легких фракцій нафти. Зниження швидкості деградації в другій половині експерименту зумовлено утилізацією вуглеводнів важких (асфальтенових) фракцій нафти, які є важко засвоюваними компонентами і вимагають більш тривалого періоду окиснення [1, 9].

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено, що досліджені в роботі штами бактерій роду *Pseudomonas*, які були відібрані як перспективні для використання у біотехнологіях очищення ґрунту [2, 3], розкладають нафту з густиною 0,84 г /см<sup>3</sup> та вихідною концентрацією 500 мг /л на 70–80% за 10–30 діб експозиції. За здатністю утилізувати вуглеводні нафти досліджені штами бактерій роду *Pseudomonas* перевищують відомі із літератури мікроорганізми, що використовуються у біотехнологіях очищення ґрунту і води від нафти та нафтопродуктів [4, 7, 10, 11].

**Т.В. Гудзенко, О.В. Волювач, Т.А. Беляева, И.П. Конуп,  
А.Е. Бухтияров, Г.В. Лисютин, И.В. Пузырева, Е.Г. Горшкова,  
В.А. Иваница**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: v\_ivanit@ukr.net

## **НЕФТЕОКИСЛИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS***

### **Реферат**

**Цель.** Исследование нефтеокислительной активности некоторых штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, отобранных для использования в биоремедиации почвы. **Методы.** Бактерии *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. seracia* ONU327 культивировали в питательной среде М-9, содержащей сырую нефть плотностью 0,84 г /см<sup>3</sup> с концентрацией 500 мг /л. Остаточное содержание нефти через 10, 20 и 30 суток определяли интегральным методом инфракрасной спектрометрии. Извлечение нефти из проб осуществляли с использованием четыреххлористого



углерода ( $\text{CCl}_4$ ). **Результаты.** В результате проведенных исследований установлено, что бактерии рода *Pseudomonas*, отобранные для использования в биотехнологии очистки почвы, в течение месяца разлагают углеводороды сырой нефти с исходной концентрацией 500 мг / $\text{дм}^3$  на 70–80%. Нефтеокислительная активность всех использованных штаммов микроорганизмов была высокой уже в первые 10 суток экспозиции — степень биодеструкции углеводородов нефти достигала 62.0–73.0%. **Вывод.** Штаммы бактерий *P. cepacia* ONU327, *P. maltophilia* ONU329 и *P. fluorescens* ONU328 могут быть рекомендованы для разработки технологий биоремедиации почвы от нефти и нефтепродуктов.

К л ю ч е в ы е с л о в а: нефть, бактерии рода *Pseudomonas*, биодеструкция, нефтеокислительная активность.

T.V. Gudzenko, O.V. Voliuvach, T.O. Beliaeva, I.P. Konup,  
A.E. Bukhtiarov, G.V. Lisiutin, I.V. Puzyreva, O.G. Gorshkova,  
V.O. Ivanytsia

Odesa National I.I. Mechnykov University, 2, Dvoryanska str.,  
Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: v\_ivanit@ukr.net

## OIL OXIDATIVE ACTIVITY OF SOME STRAINS OF BACTERIA OF *PSEUDOMONAS* GENUS

### Summary

**The aim.** Study of oil oxidative activity of some strains of bacteria of *Pseudomonas* genus, selected for use in bioremediation of soil. **Methods.** Bacteria *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327 have been cultivated in nutrient medium M-9 contained crude oil with density of 0.84 g / $\text{cm}^3$  with the concentration 500 mg /l. The residual content of oil in 10, 20 and 30 days, was determined by the integral method of infrared spectroscopy. Oil extraction of the samples was performed by using carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ). **Results.** It was determined that the bacteria of genus *Pseudomonas* selected for use in biotechnology of purification of soil, within a month broke down hydrocarbons of crude oil with initial concentration of 500 mg / $\text{дм}^3$  up to 70–80%. Oil oxidative activity of all used strains of microorganisms was high in the first 10 days of the exhibition — the degree of biodegradation of petroleum hydrocarbons reached 62.0–73.0%. **Conclusion.** Bacteria strains of *P. cepacia* ONU327, *P. maltophilia* ONU329 and *P. fluorescens* ONU328 can be recommended for the development of technologies of soil bioremediation from oil and oil products.



**K e y w o r d s:** oil, bacteria of *Pseudomonas* genus, biodestruction, oil oxidative activity.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Ветрова А.А.* Биодegradация углеводородов нефти плазмидосодержащими микроорганизмами-деструкторами: автореферат дис. ... канд. биол. наук. М., 2010. — 24 с.
2. *Гудзенко Т.В., Беляева Т.О., Конуп І.П., Бухтияров А.Є., Лісютин Г.В., Волювач О.В., Пузирьова І.В., Горшкова О.Г., Іваниця В.О.* Мікробна технологія біоремедіації засоленого ґрунту о. Зміїний // XIII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (Ялта, жовтень, 2013 р.): тез. доп. — Сімферополь: ФОП Бражнікової Н.А., 2013. — С. 373.
3. *Іваниця В.О., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляева Т.О., Конуп І.П., Пузирьова І.В.* Розробка біотехнологічного способу знешкодження нафтових забруднень ґрунту // Збірник міжнародної конференції «Цілі збалансованого розвитку для України». — 18-19 червня 2013, м. Київ. — С. 157–158.
4. *Киреева Н.А., Григориади А.С., Хайбулина Е.Ф.* Ассоциация углеводородоокисляющих микроорганизмов для биоремедиации нефтезагрязненных почв // Вестник Башкирского университета. — 2009. — Т. 14, № 2. — С. 391–394.
5. *Леоненко И.И., Антонович В.П., Андрианов А.М., Безлуцкая И.В., Цымбалюк К.К.* Методы определения нефтепродуктов в водах и других объектах окружающей среды (обзор) // Методы и объекты химического анализа. — 2010. — Т. 5, № 2. — С. 58–72.
6. *Суртко Л.Ф., Финкельштейн З.И., Баскунов Б.П. Яковлев В.И., Головлева Л.А.* Утилизация нефти в почве и воде микробными клетками // Микробиология. — 1995. — Т. 64, № 3. — С. 393–398.
7. *Чугунов В.А., Ермоленко З.М., Жиглецова С.К. Мартовецкая И.И., Миронова Р.И., Жиркова Н.А., Холоденко В.П.* Разработка и испытания биосорбента «Экосорб» на основе ассоциации нефтеокисляющих бактерий для очистки нефтезагрязненных почв // Прикладная биохимия и микробиология. — 2000. — Т. 36, № 6. — С. 661–665.
8. *Kaczorek E, Satek K, Guzik U, Jesionowski T, Cybulski Z.* Biodegradation of alkyl derivatives of aromatic hydrocarbons and cell surface properties of a strain of *Pseudomonas stutzeri* // Chemosphere. — 2013. — Vol. 90, № 2. — P. 471–478.
9. *Osuji L., Ozioma A.* Environmental degradation of polluting aromatic and aliphatic hydrocarbons: a case study // Chem. Biodivers. — 2007. — Vol. 4. — P. 424–430.
10. *Sutton N.B., Maphosa F., Morillo J.A., Abu Al-Soud W., Langenhoff A.A., Grotenhuis T., Rijnaarts H.H., Smidt H.* Impact of long-term diesel





contamination on soil microbial community structure // *Appl Environ Microbiol.* — 2013. — Vol. 79, № 2. — P. 619–630.

11. *Патент* РФ на изобретение № 2396340. Штамм *Gordona terrae* ВКПМ Ас-1741 для разложения нефти и нефтепродуктов / Немцева Н.В., Гоголева О.А., Бухарин О.В. / Оpubл. 10.08.2010. Бюл. № 22.

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. / Оpubл. 12.09.2011. Бюл. № 17.

Стаття надійшла до редакції 30.05.2013 р.

