

**В.О. Іваниця, О.Г. Горшкова, Н.В. Коротаєва, О.В. Волювач,
Т.В. Гудзенко, А.М. Остапчук**

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

СКЛАД ЖИРНИХ КИСЛОТ ЛІПІДІВ ШТАМУ BACILLUS SP. O3-5, ВИДІЛЕНОГО ІЗ ЗАБРУДНЕНОГО НАФТОЮ ҐРУНТУ О. ЗМІЙНИЙ

Мета. Визначення складу жирних кислот клітинних ліпідів та ідентифікація штаму бактерій, виділеного із ділянки забрудненого нафтою ґрунту о. Зміїний. **Методи.** Аналіз складу жирних кислот штаму *Bacillus sp. O3-5* здійснювали з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI inc., USA) на базі газового хроматографа Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA). **Результати.** Охарактеризований за фенотиповими ознаками штаму *Bacillus sp. O3-5*, за складом жирних кислот ідентифіковано як *Bacillus megaterium O3-5 – GC subgroup A*. Аналіз одержаної хроматограми показав, що переважальними в жирнокислотному спектрі штаму *Bacillus megaterium O3-5* є розгалужені структурні ізомери довголанцюгових насичених жирних кислот з переважним вмістом 12-метилтетрадеканової ($C_{15}:0$ антеїзо, 39,6%) і 13-метилтетрадеканової ($C_{15}:0$ ізо, 32,93%) кислот, серед інших розгалужених ізомерів виявлено $C_{17}:0$ антеїзо (2,69%), $C_{17}:0$ ізо (1,88%), $C_{14}:0$ ізо (6,62%), $C_{16}:0$ ізо (1,76%), $C_{13}:0$ антеїзо (0,25%) та $C_{13}:0$ ізо (0,5%). **Висновок.** Аналіз жирнокислотного профілю досліджуваного штаму з використанням системи MIDI Sherlock дозволив віднести його до виду *Bacillus megaterium-GC subgroup A* з високим індексом подібності 0,731. Виявлені особливості спектру жирних кислот досліджуваного мікроорганізму систематизовані і відрізняють його від інших бактерій роду *Bacillus*.

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

Біологічні методи очищення ґрунту від нафти та нафтопродуктів розроблені із використанням бактерій-деструкторів вуглеводнів нафти. Їх різноманітна і пластична ферментативна система дозволяє досить швидко перемикатися на споживання різних джерел карбону та енергії. Висока пластичність обмінних процесів, швидка адаптація до умов існування дозволяє нафтоокиснювальним бактеріям активно утилізувати вуглеводні, знижуючи вміст нафтопродуктів у ґрунті до фонових значень за низьких експлуатаційних витрат і простоті здійснення процесу очищення забруднених ґрунтів [3].

Використання острова Зміїний впродовж десятиліть у військових цілях призвело до значного нафтового забруднення, що становить до 10% ґрунтового покриття території острова, показано, що вміст нафтопродуктів сягає до



112,5 г/кг ґрунту. Проблема ремедіації ґрунту в цій місцевості ускладнюється його хімічним складом, а саме високим рівнем засоленості, так загальний вміст солей у верхніх горизонтах у більшості випадків знаходиться на рівні 0,05–0,07%, збільшуючись з глибиною до 0,1–0,2%. Джерелом засоленості є продукти вивітрювання щільних порід поверхні острова та аеральне надходження морської води з навколишньої акваторії Чорного моря [1].

Раніше із забрудненого нафтопродуктами ґрунту о. Зміїний було ізольовано штамп бактерій, здатний до утилізації аніонних поверхнево-активних речовин та нафтопродуктів.

Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів як важлива видова та внутрішньовидова хемотаксономічна характеристика [2, 4, 5], корелює, на думку більшості науковців [6, 7, 9], із даними молекулярно-генетичних показників. Для більшості мікроорганізмів він вивчений та використовується як хемотаксономічна ознака. Система MIDI Sherlock дозволяє автоматизувати процес ідентифікації мікроорганізмів за цією ознакою з використанням бібліотеки жирнокислотних профілів [16].

Науковий інтерес до детального вивчення жирнокислотного профілю бактерій посилюється ще й тому, що деякі з їх клітинних жирних кислот (ненасичені та розгалужені) є автоіндукторами у кворум-чутливій системі, яка забезпечує контакти як між членами популяції, так і з макроорганізмами [11], що є особливо важливим в біотехнології.

Метою роботи було визначення таксономічного положення штаму бактерій, виділеного із забрудненого нафтопродуктами ґрунту о. Зміїний, за складом жирних кислот клітинних ліпідів.

Матеріали і методи

В роботі досліджували штамп бактерій, ізольований із забрудненого впродовж десятків років ґрунту острова Зміїний. Попередньо проведені нами дослідження показали, що виділений штамп здатний до утилізації аніонних поверхнево-активних речовин та нафтопродуктів. Ступінь деструкції нафтової плями (10 мг нафти /10 мл бактеріальної культури) у середовищі М-9 протягом 20 діб сягала 45%. На “голодному” агарі з 1% додецилсульфатом натрію (ДДСН) бактерії добре ростуть, що свідчить про їх здатність до утилізації аніонних поверхнево-активних речовин.

За фенотиповими (морфологічними, фізіолого-біохімічними, культуральними) ознаками, визначеними з використанням класичних бактеріологічних методів та тест-системи API 50 CHB Medium (bioMerieux, Франція) штамп було попередньо віднесено до виду *Bacillus megaterium* [10]. Уточнення видової приналежності здійснювали за складом жирних кислот клітинних ліпідів.

Бактерії культивували на середовищі Tryptic soy agar (Merck, Germany) за температури 28 ± 1 °С впродовж 24 годин. Для аналізу складу клітинних ліпідів одну повну петлю вологої біомаси поміщали в скляні віали для подальшого хімічного лізису клітин та омилення ліпідів досліджуваного мікроорганізму. Омилення проводили шляхом додаванням 50% метанолу та 3,7 М NaOH.



Підготовлену пробу витримували впродовж 30 хв за температури 95–100 °С. Метилування 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 [16].

Хроматографічне розділення метилових ефірів жирних кислот проводили на газовому хроматографі Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA) з капілярною колонкою ULTRA-2 (25м×0,2мм×0,33мкм) і полум'яно-іонізаційним детектором. Пробу об'ємом 2 мкл вводили в режимі split з коефіцієнтом 40:1, температура випаровувача 250 °С.

Розділення жирних кислот 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 визначення жирнокислотного складу загальних ліпідів досліджуваного штаму та для його ідентифікації використали програмне забезпечення MIDI Sherlock 4.5 та бібліотеку жирнокислотних профілів аеробних мікроорганізмів RSTBA6 версії 6.2.

Результати та обговорення

В результаті проведених досліджень показано, що виділені із забрудненого нафтою ґрунту о. Зміїний бактерії досліджуваного штаму *Bacillus* sp. O3-5 є аеробними, грампозитивними, каталазопозитивними прямими паличками з закругленими кінцями, що утворюють ендоспори. Бактерії розміром 1,2–1,5 мкм, ростуть у широкому діапазоні температур від 3 до 45 °С за оптимального рН 7,0. На агаризованому середовищі (МПА з додаванням $MnSO_4$ – 10 мг/л) досліджуваний штам утворює глянцеві, круглі колонії, здатний до гідролізу крохмалю, желатину, казеїну, утилізації низки цукрів з утворенням кислоти.

За сукупністю морфологічних, культуральних, фізіолого-біохімічних ознак виділений із забрудненого нафтопродуктами ґрунту острова Зміїний штам був віднесений до виду *Bacillus megaterium*.

Спектр жирних кислот визначено на газовому хроматографі Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA) (рис. 1) і розшифровано з використанням бібліотечної бази даних RTSBA6 6.2 програми MIDI Sherlock (табл. 1).

Результати аналізу жирнокислотного профілю досліджуваного штаму (табл. 1) показали присутність ненасичених ізомерів жирних кислот $C_{16}:1$, $C_{17}:1$ в слідових кількостях (менше 1% кожна). Це відрізняє його від представників рРНК групи 2, які характеризуються значним вмістом ізомерів з ненасиченими зв'язками (17–28%) та дозволяє віднести до рРНК групи 1, де вміст ненасичених ізомерів складає менше 10%. В жирнокислотному профілі досліджуваного штаму також зафіксована присутність насичених ізомерів $C_{16}:0$ (5,86%), та $C_{14}:0$ (2,89%).

У роботах С. Ash зі співавторами [9] із секвенування 16S-РНК, серед представників роду *Bacillus* було виділено 5 окремих груп. До представників рРНК групи 1 віднесені *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. azotoformans*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, тощо.



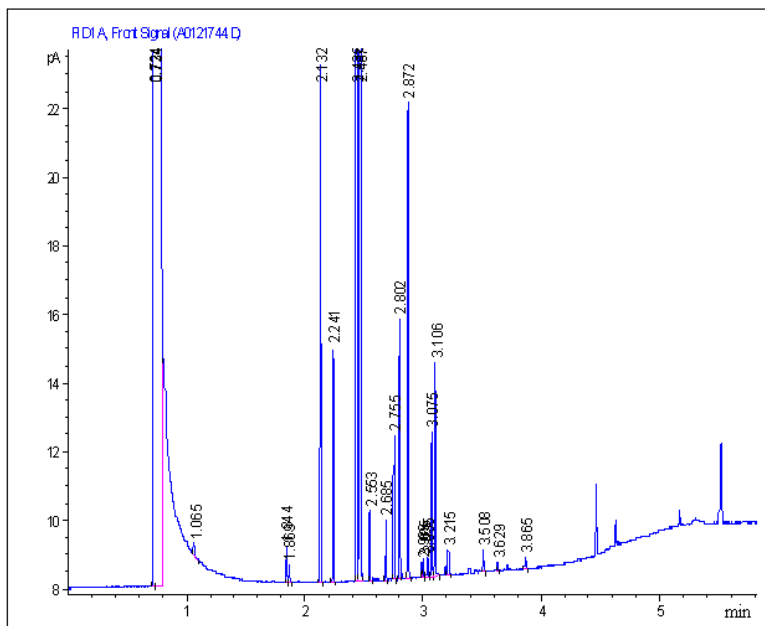


Рис. 1. Хроматограма жирних кислот загальних клітинних ліпідів штаму *Bacillus megaterium* O3-5

Fig. 1. Chromatogram of fatty acids of total cellular lipids of strain *Bacillus megaterium* O3-5

Жирнокислотний склад в більшості представлений $C_{15}:0$ антеїзо (25–66%), $C_{15}:0$ ізо (22–47%), $C_{17}:0$ антеїзо (2–12%) за винятком представників групи *B. cereus*, які характеризуються підвищеним вмістом ненасичених жирних кислот (більше 10%) та меншим вмістом $C_{15}:0$ антеїзо (7–12%). Види *B. sphaericus*, *B. fusiformis*, *B. insolitus*, *B. pasteurii*, *B. psychrophilus* були віднесені до рРНК групи 2 [9]. Переважною в їх жирнокислотному складі є $C_{15}:0$ антеїзо. Також характерним для цієї групи є наявність значної кількості ненасичених жирних кислот (17–28%). До рРНК групи 3 віднесені представники роду *Paenibacillus*, жирнокислотні профілі, яких містять $C_{15}:0$ антеїзо (36–80%), $C_{16}:0$ ізо (0,5–6,6%), $C_{15}:0$ ізо (1–12%) та $C_{17}:0$ антеїзо (2–21%) [12, 17]. До рРНК групи 4 віднесені представники роду *Brevibacillus*. Для переважної більшості мікроорганізмів цієї групи характерний вміст $C_{15}:0$ ізо (18–42%) та $C_{15}:0$ антеїзо (32–72%). Група 5 включає представників роду *Geobacillus*, які є термофілами та представляють цілісну і гомогенну групу. Основні жирні кислоти $C_{15}:0$ ізо, $C_{16}:0$ ізо та $C_{17}:0$ ізо, складають 60–80% від всього пулу [8, 15].

Проведеними дослідженнями показано, що переважають у жирнокислотному профілі штаму *Bacillus* sp. O3-5 $C_{15}:0$ антеїзо (39,6%) та $C_{15}:0$ ізо (32,93%), що є характерним для більшості представників роду *Bacillus* та для представників рРНК групи 1 зокрема. Серед інших розгалужених ізомерів виявлено $C_{17}:0$ антеїзо (2,69%), $C_{17}:0$ ізо (1,88%), $C_{14}:0$ ізо (6,62%), $C_{16}:0$ ізо (1,76%), $C_{13}:0$ антеїзо (0,25%) та $C_{13}:0$ ізо (0,5%).

Таблиця 1

**Жиринокислотний склад загальних ліпідів бактерій
Bacillus megaterium-GC subgroup A O3-5**

Table 1

**Fatty acid composition of total lipids of bacteria
Bacillus megaterium-GC subgroup A O3-5**

Жиринокислота	Відсоток від загальної суми площі піків (%)
C ₁₃ :0 ізо	0,50
C ₁₃ :0 антеізо	0,25
C ₁₄ :0	2,89
C ₁₄ :0 ізо	6,62
C ₁₅ :0 ізо	32,93
C ₁₅ :0 антеізо	39,60
C ₁₆ :0 ізо	1,76
C ₁₆ :0	5,86
C ₁₇ :0 ізо	1,88
C ₁₇ :0 антеізо	2,69
C ₁₈ :0	0,27
C ₁₆ :1 w7c alcohol	0,74
C ₁₆ :1 w11c	0,25
C ₁₇ :1 iso w10c	0,23
C ₁₈ :0 10-methyl	0,12
C ₁₈ :1 2OH	0,15
Σ ЖК _{насих} = 95,25%; К _{насих} = 21,84; Σ ЖК _{ненасич} = 4,36%; К _{ненасич} = 0,046.	

Вміст насичених жирних кислот розгалуженої структури складав 77,1% від загального пулу жирних кислот.

Наявність 7-гексадеценного спирту (C₁₆:1 w7c alcohol), хоча він присутній в малій кількості (0,74%) у спектрі жирних кислот, може слугувати характерною ознакою цього штаму, а також дає можливість з великою вірогідністю спрогнозувати його здатність утилізувати аліфатичні спирти, що є проміжним продуктом окиснення нафтопродуктів. На користь цього твердження вказує той факт, що саме із забрудненого нафтопродуктами ґрунту був виділений досліджуваний аборигенний штам.

Дослідження Т. Kaneda [13] жирнокислотних профілів представників групи *Bacillus* дозволили виділити 6 груп (A-F), в жирнокислотних профілях котрих



переважають розгалужені жирні кислоти з кількістю атомів карбону від 14 до 17 в різних діапазонах та залежно від вмісту ненасичених жирних кислот. Окремо виділяється група D з 70% вмістом циклогексанових жирних кислот з довжиною ланцюга від 17 до 19 атомів карбону як переважальних. Показано, що переважання розгалужених жирних кислот в спектрі є характерною ознакою бактерій роду *Bacillus* [6]. Встановлено, що вміст розгалужених жирних кислот у бацил варіює від 54 до 85% від загального жирнокислотного пулу клітини, включаючи як насичені, так і ненасичені кислоти з переважним вмістом $C_{15}:0$ ізо і $C_{15}:0$ антеїзо. Для бацил також є характерним наявність $C_{17}:0$ ізо і $C_{17}:0$ антеїзо жирних кислот [14].

Порівняльний аналіз та результат обробки жирнокислотного профілю бактерій досліджуваного штаму системою MIDI Sherlock з використанням бібліотек спектрів жирних кислот аеробних мікроорганізмів RSTBA6 6.2 дозволив віднести його до виду *Bacillus megaterium*-GC subgroup A з високим індексом подібності 0,731.

**В.А. Іваньця, О.Г. Горшкова, Н.В. Коротаєва, О.В. Волювач,
Т.В. Гудзенко, А.Н. Остапчук**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: tgudzenko@ukr.net

СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ЛИПИДОВ ШТАММА *BACILLUS* SP. O3-5, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ЗАГРЯЗНЕННОЙ НЕФТЬЮ ПОЧВЫ О. ЗМЕИНЫЙ

Реферат

Цель. Определение состава жирных кислот клеточных липидов и идентификация штамма бактерий, выделенного с участка загрязненной нефтью почвы о. Змеиный. **Методы.** Анализ состава жирных кислот штамма *Bacillus* sp. O3-5 проводили с использованием автоматической системы идентификации микроорганизмов MIDI Sherlock (MIDI inc., USA) на базе газового хроматографа Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA). **Результаты.** Охарактеризованный по фенотипическим признакам штамм *Bacillus* sp. O3-5, по составу жирных кислот был идентифицирован как *Bacillus megaterium* O3-5 – GC subgroup A. Анализ хроматограмм показал, что доминирующими в жирнокислотном спектре штамма *Bacillus megaterium* O3-5 являются разветвлённые структурные изомеры длинноцепочечных насыщенных кислот с преобладающим содержанием 12-метилтетрадекановой ($C_{15}:0$ anteiso, 39,6%) и 13-метилтетрадекановой ($C_{15}:0$ iso, 32,93%) кислот, среди других разветвлённых изомеров обнаружены $C_{17}:0$ anteiso (2,69%), $C_{17}:0$ iso (1,88%), $C_{14}:0$ iso (6,62%), $C_{16}:0$ iso (1,76%), $C_{13}:0$ anteiso (0,25%) и $C_{13}:0$ iso (0,5%). **Вывод.** Анализ жирнокислотного профиля исследуемого штамма с использованием системы MIDI Sherlock позволил отнести его к виду *Bacillus megaterium*-GC subgroup A с высоким индексом сходства 0,731. Выявленные особенности спектра жирных кислот исследуемого микроорганизма систематизированы и отличают его от других бактерий рода *Bacillus*.

Ключевые слова: состав жирных кислот, идентификация, *Bacillus*.



V.O. Ivanytsia, O.G. Gorshkova, N.V. Korotaeva,
O.V. Voliuvach, T.V. Gudzenko, A.M. Ostapchuk

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

FATTY ACID COMPOSITION OF LIPIDS OF STRAIN *BACILLUS* SP. O3-5 ISOLATED FROM OIL- CONTAMINATED SOIL OF THE ZMIINY ISLAND

Summary

The aim. Determination of fatty acid composition of cell lipids and identification of a strain of microorganism selected in 2014 from a portion of the oil-contaminated soil of the Zmiiny island. **Methods.** Fatty acid analysis of the strains of genus *Bacillus* sp. O3-5 was carried using the automatic identification system of microorganisms MIDI Sherlock (MIDI, USA) based on gas chromatograph Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA). **Results.** Phenotypically characterized strain *Bacillus* sp. O3-5 was identified as *Bacillus megaterium* O3-5 – GC subgroup A by fatty acids composition. The analysis of obtained chromatograms revealed that dominant in the fatty-acid profile of strain *Bacillus* sp. O3-5 there were branched structural isomers of long-chain saturated fatty acids with predominant content of 12-metyltetradecane ($C_{15}:0$ anteiso, 39.6%) and 13-metyltetradecane ($C_{15}:0$ iso, 32.93%) acids also $C_{17}:0$ anteiso (2.69%), $C_{17}:0$ iso (1.88%), $C_{14}:0$ iso (6.62%), $C_{16}:0$ iso (1.76%), $C_{13}:0$ anteiso (0.25%) ma $C_{13}:0$ iso (0.5%) isomers were detected. **Conclusion.** By the fatty acid profile analysis with MIDI Sherlock system observable strain is identified as *Bacillus megaterium*-GC subgroup A with high level of similarity index 0.737. The peculiarities of the fatty acid profile of the investigated microorganism is systematized and can be used as an auxiliary key for distinguishing it as a genus and at the species level (based on the results of the study of the cellular fatty acid composition) from other bacteria of genus *Bacillus*.

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

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Біланчин Я.М., Жанталай П.І., ТортикМ.Й., Буяновський А.О. Дослідження ґрунтового покриву о. Зміїний // Острів Зміїний. Абіотичні характеристики: монографія; відп. ред. В.І. Медінець; Одес. нац. ун-т ім. І.І. Мечникова. – Одеса: Астропринт, 2008. – С. 54–79.
2. Васюренко З.П., Фролов А.Ф. Жирнокислотный состав бактерий как хемотаксономический критерий // Журн. гигиены, эпидемиологии, микробиологии и иммунологии (Прага). – 1986. – 30, № 3. – С. 293–300.
3. Гудзенко Т.В., Коротаєва Н.В., Волювач О.В., Беляєва Т.О., Іваниця В.О. Склад жирних кислот ліпідів нафтоокиснювальних штамів бактерій роду *Pseudomonas* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2014. – № 3(27). – С. 31–40.
4. Васюренко З.П., Фролов А.Ф., Смирнов В.В., Рубан Н.М. Жирнокислотные профили бактерий, патогенных для человека и животных. – К.: Наук. думка, 1992. – 253 с.



5. Клочко В.В., Авдеева Л.В. Жиронокислотный состав *Alteromonas*-подобных бактерий Черного моря // Микробиол. журнал. – 2015. – Т. 77, № 5. – С. 47–54.
6. Сафронова Л.А., Зеленая Л.Б., Клочко В.В., Авдева Л.В., Рева О.Н., Подгорский В.С. Гено- и фенотипическая характеристика штаммов бацилл – компонентов эндоспорина // Микробиол. журн. – 2012. – Т. 74, № 5. – С. 55–65.
7. Шмырина А.С. Жирнокислотный профиль и структурное моделирование ДНК-связанных липидов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2005. – 21 с.
8. Andersson M., Laukkanen M., Nurmiäho-Lassila E.-L., Rainey F.A., Niemelä S.I. & Salkinoja-Salonen M. *Bacillus thermosphaericus* sp. nov., a new thermophilic ureolytic *Bacillus* isolated from air // **Systematic and Applied Microbiology**. – 1995. – V. 18. – P. 203–220.
9. Ash C., Farrow J.A.E., Wallbanks S. & Collins M.D. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences // *Letters in Applied Microbiology*. – 1991. – V. 13. – P. 202–206.
10. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, G.M. Garrity. – N.Y.: Springer, 2005. – V. 2. – 1108 p.
11. 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.
12. Heyndrickx M., Vandemeulebroecke K., Scheldeman P. *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *gordonae* (Pichinoty et al. 1986) Ash et al. 1994 is a later synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *validus* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994: emended description of *P. validus* // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1997. – V. 45. – P. 661–669.
13. Kaneda T. Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preferences // *Bacteriological Reviews*. – 1977. – V. 41. – P. 391–418.
14. Kaneda T. Biosynthesis of branched chain fatty acids. IV. Factors affecting relative abundance of fatty acids produced by *Bacillus subtilis* // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1966. – V. 12. – P. 510–51.
15. Kämpfer P. Limits and possibilities of total fatty acid analysis for classification and identification of *Bacillus species* // *Systematic and Applied Microbiology*. – 1994. – V. 17. – P. 86–96.
16. *MIS Operating Manual*. www.midi-inc.com, September 2012.
17. Shida O., Takagi H., Kadowaki K., Nakamura L.K. & Komagata K. Emended description of *Paenibacillus amylolyticus* and description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov. // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1997. – V. 47. – P. 299–306.

Стаття надійшла до редакції 25.11.2015 р.

