

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

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

ОЧИЩЕННЯ ВОДИ ВІД ФЕНОЛУ БАКТЕРІЯМИ РОДУ *PSEUDOMONAS*, ІММОБІЛІЗОВАНИМИ НА ПРИРОДНИХ І СИНТЕТИЧНИХ НОСІЯХ

Мета. Оптимізація процесу очищення води від фенолу з використанням бактерій роду *Pseudomonas* (*P. serasia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329), іммобілізованих на природних і синтетичних носіях. **Методи.** Концентрацію фенолу у воді визначали екстракційно-фотометричним методом з використанням 4-аміноантипірину. Для очищення води від фенолу (з концентрацією 200 мг/л) використано непатогенні окремі штами бактерій *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. serasia* ONU327, іммобілізовані на носіях різної природи (цеоліт, мушлі мідій, річковий пісок, керамічні кільця, активоване вугілля, верховий торф, синтетичний носій типу «ВІЯ»). **Результати.** Експериментально підтверджено, що адгезія клітин штамів бактерій *P. serasia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 до цеоліту, річкового піску (що практично не сорбують фенол) сприяла ефективній біодеструкції фенолу на 96–100% (залежно від обраного штаму бактерій). Залишкова концентрація фенолу у воді за її обробки (протягом 11 діб) іммобілізованими на цеоліті клітинами штаму *P. fluorescens* ONU328 або штаму *P. maltophilia* ONU329 зменшувалася з 200 мг/л до 8,0±0,95 мг/л (ступінь очищення води від фенолу (α)–96%) і до 2,0±0,14 мг/л (α = 99%) – у разі використання іммобілізованих клітин штаму *P. serasia* ONU327. Встановлено, що при використанні іммобілізованих на піску річковому мікроорганізмів-деструкторів залишкова концентрація фенолу у воді на 11 добу обробки складала 6,0±0,55 мг/л (α =97%) і 2,0±0,14 мг/л (α = 99%) – відповідно для штамів *P. maltophilia* ONU329 і *P. fluorescens* ONU328; та сягала рівня гранично-допустимої концентрації (ГДК= 0,001 мг/л) – у разі іммобілізованих (на піску річковому) клітин штаму *P. serasia* ONU327. Експериментально виявлено, що прискорення очищення води від фенолу відбувалося за умови використання клітин бактерій роду *Pseudomonas* (*P. serasia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328) іммобілізованих на керамічних трубках і волокнистій насадці типу «ВІЯ». Протягом 5-ти діб експозиції ступінь очищення води від фенолу іммобілізованими на волокнистій насадці типу «ВІЯ» мікроорганізмами-деструкторами з урахуванням поправки на контроль (нативний немодифікований сорбент «ВІЯ») сягав 97% – за дії штаму *P. serasia* ONU327; та 99% – за дії штаму *P. fluorescens* ONU328. **Висновок.** Для прискореного очищення води від фенолу (протягом 5 діб) на 97–99% рекомендовано використовувати штами бактерій *P. serasia* ONU327 і *P. fluorescens* ONU328, іммобілізовані на во-



локнистій насадці типу "ВІЯ". Повне знефенолення води спостерігається за її обробки штамами бактерій *P. seracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, окремо іммобілізованих на активованому вугіллі, річковому піску (для штаму *P. seracia* ONU327) та мушлях мідії (для штаму *P. fluorescens* ONU328) відповідно.

Ключові слова: очищення води, фенол, сорбенти, іммобілізовані бактерії роду *Pseudomonas*.

Біосфера володіє певним потенціалом самоочищення від токсичних сполук, але ці можливості не безмежні. З метою запобігання екологічній катастрофі заходи щодо захисту навколишнього середовища від зростаючого забруднення різними хімічними сполуками, зокрема фенольними, повинні постійно посилюватися [7]. Поряд з нафтопродуктами, циклічними органічними сполуками і деякими важкими металами, найнебезпечнішими є фенольні сполуки. Фенол і його похідні є одними з пріоритетних забруднювачів навколишнього середовища у зв'язку з їх токсичністю, здатністю накопичуватися в навколишньому середовищі та стійкістю. Фенол має мутагенну і канцерогенну дію, тобто здатність накопичуватися в організмі людини. Крім цього, потрапляючи у водойми, фенол різко погіршує загальний санітарний стан, негативно впливаючи на живі організми не тільки своєю високою токсичністю, а й значною зміною порушуючи режим споживання біогенних елементів і розчинених газів [3]. 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]. Відомо, що процеси самоочищення водойм від фенолу протікають повільно і можливі лише при концентрації фенолу менше 75 мг/дм³ [11].

Здійснення заходів щодо захисту навколишнього середовища від різних поллютантів, зокрема від високотоксичного фенолу, може йти різними шляхами. Найбільш ефективним з них є комплекс заходів, спрямованих на запобігання (зменшення або повне припинення) їх попадання в об'єкти навколишнього середовища. Це може бути досягнуто шляхом постійного вдосконалення технологічних процесів, переходом на сучасні безвідходні технології. Серед усіх методів дуже часто неможливо виділити фізико-хімічні та біологічні окремо, оскільки для підвищення ефективності їх постійно комбінують [7]. Екологічно доцільними є біоремедіація об'єктів навколишнього середовища і біологічна очистка стічних вод, які засновані на використанні штамів мікроорганізмів, здатних руйнувати органічні сполуки, зокрема фенол [13]. Для біоремедіації мікроорганізми-деструктори частіше застосовуються у вигляді бактеріальних препаратів, що містять вільні мікробні клітини; для очищення сильно забруднених стічних вод, в тому числі що містять фенольні сполуки, їх використовують в іммобілізованому стані [4, 10]. Це пов'язано з тим, що очищення стічних вод прикріпленою біомасою порівняно з виваженою вільною біомасою є більш стійким до коливань рН середовища, впливу температури та інших несприятливих факторів. Крім того, використання іммобілізованих мікроорганізмів в локальних очисних спорудах дозволяє стабілізувати склад



мікрофлори, знизити її вимивання з біореакторів з рідиною, що очищується, а також створити більш компактні проточні біореактори.

З огляду на вищевикладене, питання глибокого біотехнологічного очищення води від високотоксичного поллютанту – фенолу іммобілізованими непатогенними мікроорганізмами-деструкторами досі залишається актуальним.

Мета даної роботи – оптимізація процесу очищення води від фенолу з використанням бактерій роду *Pseudomonas* (*P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329), іммобілізованих на природних і синтетичних носіях.

Матеріали та методи

В роботі використані біохімічно-активні щодо фенолу штами бактерій роду *Pseudomonas*: *P. ceracia* ONU327 (виділений із ґрунту), *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329 (виділені з морської води), що зберігаються в колекції непатогенних мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова.

Підготовка бактерій-деструкторів фенолу для інокуляції носіїв. Для інокуляції носіїв біохімічно-активні щодо фенолу штами бактерій *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 вирощували на чашках Петрі на м'ясо-пептонному агарі (МПА) протягом доби. Бактеріальні маси методом зливу переносили в колби Ерленмаєйр (ємністю 1 л). Попередньо в ці колби вносили 500 мл живильного середовища М9 складу (г/л): Na_2HPO_4 – 6; KH_2PO_4 – 3; NH_4Cl – 1; NaCl – 0,5; пептон – 10; дріжджовий екстракт – 5; глюкоза – 2. Попередньо глюкозу стерилізували при 0,5 атм і потім добавляли в живильне середовище М9.

Бактерії культивували протягом 2-х діб до досягнення густини 10^9 КУО/мл. Оптичну густину клітинної суспензії визначали на приладі ФЕК з довжиною хвилі 540 нм, кількість клітин визначали за калібрувальним графіком залежності оптичної густини від концентрації бактеріальних клітин.

Підготовка носіїв для іммобілізації бактерій-деструкторів фенолу. Для закріплення клітин використовували сорбційний метод іммобілізації псевдомонад на твердих носіях. Отримані за допомогою флуоресцентного мікроскопа Carl Zeiss зображення свідчили про те, що іммобілізація бактерій роду *Pseudomonas* призводила до утворення біоплівки на носіях різної природи.

Для іммобілізації клітин бактерій *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 – деструкторів фенолу використовували носії різної природи однакового об'єму: 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 (люб'язно наданий професором, д.б.н., Гвоздяком П.І. [4, 15]) – 2,3 г. Вибір носіїв зумовлений їх доступністю, дешевизною та необхідною питомою площею поверхні, що є важливим технологічним параметром для створення на їх поверхні біоплівки.

Для експериментів використовували цеоліт 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.

Цеоліт, мушлі мідій і річковий пісок попередньо відмивали від дрібно-дисперсної фази. Додатково мушлі мідій для випалювання органічної фази піддавали обробці високою температурою – 250–300 °С протягом 0,5 год. Неорганічні носії (цеоліт, мушлі мідій, пісок, активоване вугілля, кільця керамічні) стерилізували в сухожаровній шафі за $t=180$ °С; торф і синтетичний носій типу “ВІЯ” стерилізували в автоклаві при 1 атм протягом 30 хвил.

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 заливали по 50 мл інокуляту, відібраних бактерій-деструкторів роду *Pseudomonas*. Інокуляцію проводили в термостатованому шуторі (70 об / хв при температурі 28 °С) протягом 2-х діб. Після проведення інокуляції залишки суспензії бактерій акуратно зливали і інокульовані носії тричі промивали середовищем М9 (використовували тільки мінеральний компонент середовища складу (г/л): Na_2HPO_4 – 6; KH_2PO_4 – 3; NH_4Cl – 1; NaCl – 0,5–2). Мікроскопія носіїв виявляло їх біообростання, товщина біоплівки 0,5–1 мм. Потім в кожен з флаконів додавали по 50 мл мінерального середовища М9, що містило 200 мг/л фенолу.

Визначення концентрації фенолу у контрольних і дослідних пробах до і після очищення. Ефективність процесу очищення води нативними сорбентами (контроль) і бактеріями роду *Pseudomonas*-деструкторами, іммобілізованими на різних носіях, оцінювали за ступенем очищення води від фенолу (α ,%), що розраховували за рівнянням:

$$\alpha = [(C_0 - C) / C_0] \times 100\%, \quad (1)$$

де C_0 і C – концентрації фенолу у воді до (200 мг/л) та після обробки. Концентрацію фенолу у контрольних і дослідних пробах до і після очищення визначали фотокolorиметричним методом, заснованим на утворенні забарвлених сполук фенолу з 4-аміноантипірином за присутності гексаціаноферату (III) при $\text{pH}=10,0 \pm 0,2$ [8].

Проводили окремі серії досліджень (5 серій випробувань, $n=5$). Опрацювання даних здійснювали з використанням програми «Microsoft Office Excel 2003». Достовірність відмінностей між середніми значеннями залишкової концентрації фенолу у воді визначали за критерієм Стьюдента на рівні значущості не менше 95% ($M \pm m$ при $p \leq 0,05$).

Результати досліджень та їх обговорення

В попередніх наших роботах було встановлено здатність штамів бактерій *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 окиснювати фенол. Експериментально підтверджено, що за дії окремих штамів мікроорганізмів у кількості $7,5 \times 10^5$ КУО/мл протягом 18–22 діб (залежно від штаму) відбувається повне знефенолення водних розчинів [5, 6, 14]. Аналогічну високу ефективність знефенолення стічних вод коксохімічних заводів шляхом використання фенол-деструктивних мікроорганізмів підтверджено Путиліною Н.Т. та іншими авторами [7, 9].

Здатність бактерій роду *Pseudomonas* (*P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329) окиснювати фенол дозволила нам підібрати



для іммобілізації клітин цих бактерій-деструкторів фенолу різні сорбенти для прискорення очищення води за умов отримання високих результатів. Для цього нами було досліджено сорбційну здатність деяких легкодоступних дешевих матеріалів і можливість утворення на їх поверхні біоплівки, сформованої клітинами окремих штамів бактерій роду *Pseudomonas*. Для цієї мети нами було використано цеоліт, подрібнені мушлі мідій, пісок, керамічні трубки, активоване вугілля, торф верховий, синтетичний носій типу "ВІЯ". Хоча відомо, що в даний час асортимент матеріалів для використання їх в біотехнологіях очищення води від поллютантів дуже різноманітний (це диски, пластини, насадки з полімерних матеріалів, неткане полотно тощо [12, 15], основна вимога до них – інертність і принципова можливість утворення на них біоплівки. Перевага також надається використанню дрібнодисперсних твердих носіїв, матеріалів типу піску, який, наприклад, в процесах з псевдозрідженим шаром забезпечує набагато більшу площу поверхні для прикріплення на одиницю об'єму реактора, ніж в традиційних процесах. Частинки носія, які зазвичай мають діаметр менший за один мм, просто завантажуються в реактор, який потім інокують звичайним чином.

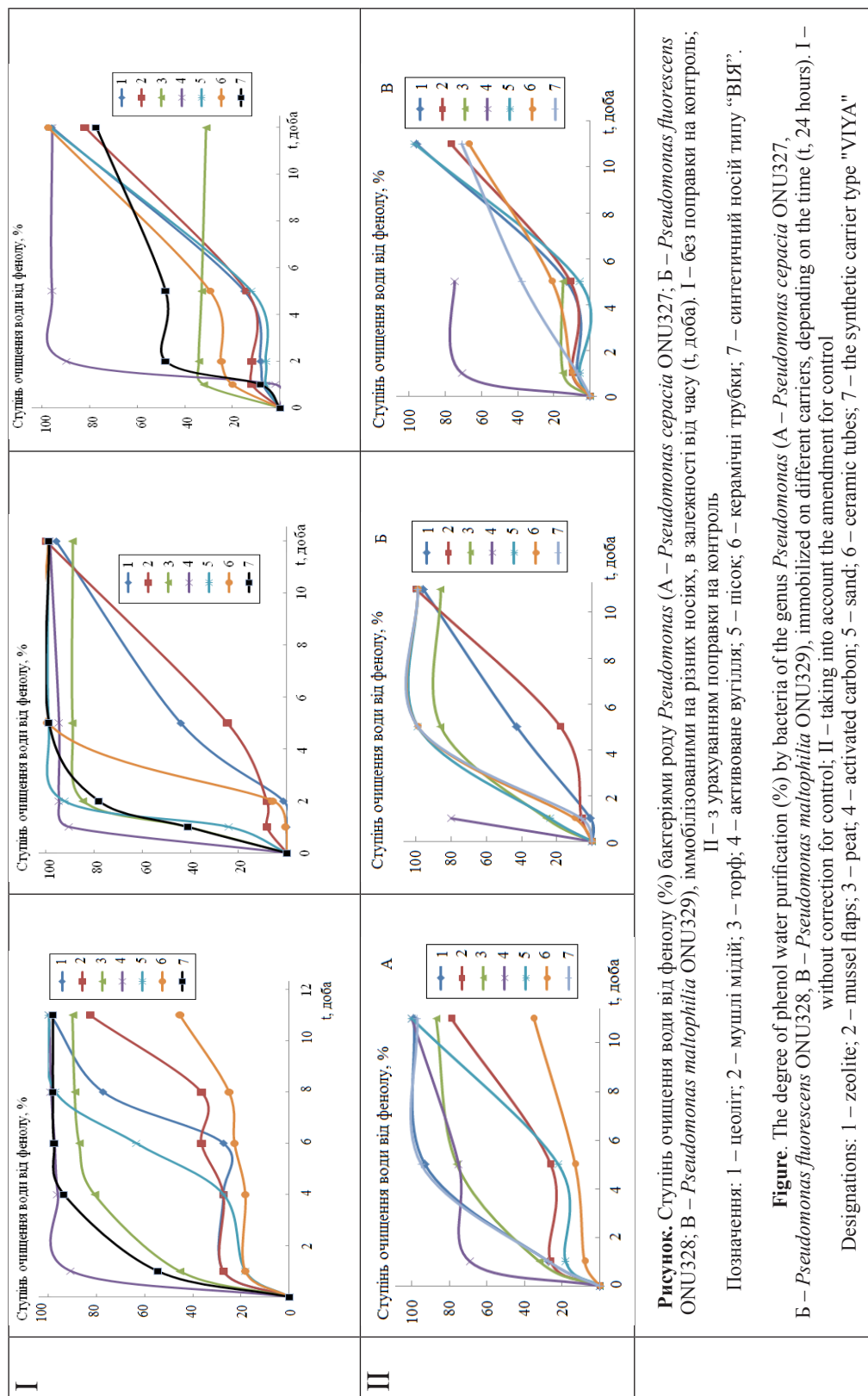
Нами експериментально оцінено здатність цеоліту, подрібнених мушлів мідій, піску, активованого вугілля, торфу верхового, керамічних трубок та синтетичного носія типу "ВІЯ" сорбувати фенол із водних розчинів з концентрацією 200 мг/л за умов: присутності мінеральних компонентів М-9, рН ~ 7 , температури 18 ± 2 °С (таблиця). Як видно з таблиці, випробувані нативні носії слабо адсорбують фенол, за винятком активованого вугілля (що, як відомо [15], має питому поверхню ~ 26 м²/г. З'ясовано, що за відсутності біологічної модифікації верховий торф і волокниста насадка типу "ВІЯ" характеризуються помірною адсорбційною здатністю. Протягом перших 24 годин сорбції концентрація фенолу у воді зменшувалася з 200 мг/л до $90 \pm 8,7$ мг/л при використанні активованого вугілля (ступінь очищення води від фенолу (α) сягав 55%); до $125 \pm 10,5$ мг/л – при використанні волокнистої насадки типу "ВІЯ" ($\alpha=38\%$) та до $160 \pm 15,2$ мг/л – при використанні верхового торфу ($\alpha=20\%$) (рисунок, таблиця).

Ефективність процесу сорбції фенолу із води на четверту добу сягала близько 84% при використанні активованого вугілля (залишкова концентрація фенолу у воді складала $32,0 \pm 2,4$ мг/л); практично не змінювалася для верхового торфу і була на рівні 20–22% (залишкова концентрація фенолу у воді складала $157 \pm 14,5$ мг/л) та, мабуть, внаслідок процесу десорбції зменшувалася до 17% для волокнистої насадки типу "ВІЯ".

З подальшим продовженням процесу обробки води вищенаведеними нативними сорбентами до 11 діб ефективність сорбції фенолу із водних розчинів збільшувалася лише за використання активованого вугілля (залишкова концентрація фенолу у воді складала $6,0 \pm 0,5$ мг/л; $\alpha=97\%$) та залишалася практично незмінною за використання волокнистої насадки типу "ВІЯ" та верхового торфу (рисунок, таблиця).

Практично інертними до фенолу були цеоліт, мушлі мідій та річковий пісок. Ступінь вилучення фенолу із води вищезгаданими нативними





Таблиця
TableЕфективність очищення води від фенолу іммобілізованими клітинами бактерій роду *Pseudomonas*Efficiency of phenol water purification by immobilized cells of bacteria of the genus *Pseudomonas*

Носій з іммобілізованими бактеріями	Залишкова концентрація фенолу у воді після обробки, мг/л														
	<i>P. serasia ONU327</i>						<i>P. fluorescens ONU328</i>						<i>P. maltophilia ONU329</i>		
	1		II		5		1		5		II		1	5	II
цеоліт	145,0±11,4	145,0±11,0	2,0±0,14	197,0±17,7	112,0±10,8	8,0±0,95	186,0±16,7	170,0±11,0	8,0±0,95	176,0±14,8	162,0±15,8	134,0±11,5	8,0±0,72	6,0±0,55	5,5±0,25
мушлі мідій	145,0±11,8	135,0±10,7	34,0±3,1	183,5±15,7	150,0±14,1	0,001±0,0001	118,0±10,8	22,0±1,7	22,0±1,7	22,0±1,7	22,0±1,7	26,0±1,5	8,0±0,64	8,0±0,72	---
торф	109,0±10,8	38,0±3,5	20,0±1,7	118,0±10,8	10,0±0,79	3,0±0,27	18,0±1,2	152,0±13,8	2,0±0,15	2,0±0,15	1,0±0,12	160,0±15,2	141,0±12,7	104,0±9,5	46,0±3,2
актив. вугілля	28,0±1,2	8,0±0,75	0,001±0,0001	18,0±1,2	10,0±0,79	3,0±0,27	18,0±1,2	152,0±13,8	2,0±0,15	2,0±0,15	1,0±0,12	160,0±15,2	141,0±12,7	104,0±9,5	46,0±3,2
пісок	163,5±15,6	146,0±14,3	0,001±0,0001	152,0±13,8	2,0±0,15	2,0±0,15	199,0±17,6	118,0±12,4	4,0±0,038	4,0±0,038	4,0±0,038	183,5±17,1	183,5±17,1	183,5±17,1	183,5±17,1
керамічні трубки	163,5±15,5	155,0±14,1	109,0±9,8	199,0±17,6	1,0±0,12	1,0±0,12	199,0±17,6	118,0±12,4	4,0±0,038	4,0±0,038	4,0±0,038	183,5±17,1	183,5±17,1	183,5±17,1	183,5±17,1
носій "ВІЯ"	91,0±8,5	5,0±0,45	4,0±0,038	118,0±12,4	2,0±0,15	2,0±0,15	118,0±12,4	118,0±12,4	2,0±0,15	2,0±0,15	2,0±0,15	183,5±17,1	183,5±17,1	183,5±17,1	183,5±17,1

Примітка: "—" не визначено; концентрація фенолу у воді до очищення – 200,0 мг/л; концентрація бактеріальних клітин – 10×10^9 КУО/мл; рН 6,8–7,2

Note: " ---" undefined; concentration of phenol in water for purification – 200,0 mg/l; concentration of bacterial cells is 10×10^9 CFU/ml; рН 6,8–7,2



сорбентами складав ~2–3% на 1–2 добу обробки. Однак, не зважаючи на ці показники ефективності обробки, дані матеріали були “біологічно позитивними” для утворення біоплівки клітинами бактерій роду *Pseudomonas* –деструкторів фенолу. Цікавим виявився той факт, що вже через добу з використанням іммобілізованих на піску клітин бактерій штаму *P. fluorescens* ONU328 концентрація фенолу у воді зменшувалася з 200 мг/л до $152 \pm 13,8$ мг/л, що складало 24% вилучення фенолу із води. Прикріплення клітин штаму *P. ceracia* ONU327 на цеоліті та мушлях мідій сприяло процесу біодеструкції фенолу на 26–27%. Слід зазначити, що найефективніше процес очищення води від фенолу протягом першої доби протікав у разі використання для іммобілізації клітин бактерій роду *Pseudomonas* активованого вугілля. Ступінь очищення води від фенолу (з урахуванням поправки на контроль – активоване вугілля за відсутності мікроорганізмів) сягав 69%, 80% і 71% при використанні штамів *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329, що відповідало залишковій концентрації фенолу у воді $28,0 \pm 1,2$ мг/л; $18,0 \pm 1,2$ мг/л і $26,0 \pm 1,5$ мг/л (рисунок, таблиця).

Адгезія клітин штамів бактерій *P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 до цеоліту та річкового піску сприяла протягом всього терміну обробки води біодеструкції фенолу на 96–100% (залежно від обраного штаму бактерій). Залишкова концентрація фенолу у воді за її обробки (протягом 11 діб) іммобілізованими на цеоліті клітинами штаму *P. fluorescens* ONU328 або штаму *P. maltophilia* ONU329 зменшувалася з 200 мг/л до $8,0 \pm 0,95$ мг/л (ступінь очищення води від фенолу (α)-96%) і до $2,0 \pm 0,14$ мг/л (α =99%) – у разі використання іммобілізованих клітин штаму *P. ceracia* ONU327. Встановлено, що при використанні іммобілізованих на піску річковому мікроорганізмів-деструкторів залишкова концентрація фенолу у воді на 11 добу обробки складала $6,0 \pm 0,55$ мг/л (α =97%) і $2,0 \pm 0,14$ мг/л (α =99%) – відповідно для штамів *P. maltophilia* ONU329 і *P. fluorescens* ONU328; та сягала рівня ГДК (0,001 мг/л) – у разі іммобілізованих (на піску річковому) клітин штаму *P. ceracia* ONU327.

Показано (дані таблиці), що за рахунок іммобілізації клітин бактерій роду *Pseudomonas* на носіях, зокрема на волокнистій насадці типу “ВІЯ” сорбційно-фенол-деструктивна система набувала стабільності, тобто не відбувалося процесу десорбції фенолу, як наприклад, у разі використання синтетичного носія типу “ВІЯ”. В кожному конкретному випадку активність штамів бактерій роду *Pseudomonas*, іммобілізованих на різних носіях, оцінювали за ступенем очищення води від фенолу.

Прискорення очищення води від фенолу відбувалося за умови використання клітин бактерій роду *Pseudomonas* (*P. ceracia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328) іммобілізованих на керамічних трубках і волокнистій насадці типу «ВІЯ». Протягом 5-ти діб експозиції ступінь очищення води від фенолу іммобілізованими на волокнистій насадці типу «ВІЯ» мікроорганізмами-деструкторами з урахуванням поправки на контроль (нативний немодифікований сорбент «ВІЯ») сягав 97% – за дії штаму *P. ceracia* ONU327; та 99% – за дії штаму *P. fluorescens* ONU328.

Експериментально підтверджено, що через 11 діб використання



імобілізованих на активованому вугіллі, піску клітин бактерій *P. cepacia* ONU327 або імобілізованих на мушлях мідій клітин бактерій *P. fluorescens* ONU328 відбувалося зниження концентрації фенолу до рівня гранично-допустимої концентрації (ГДК) (ГДК для водних об'єктів господарсько-питного та культурно-побутового користування складає 0,001 мг/л) [1].

Із експериментальних даних, представлених у таблиці і на рисунку видно, що застосування окремих імобілізованих штамів бактерій роду *Pseudomonas* для очищення водних розчинів від фенолу (з концентрацією 200 мг/л) дозволяє при використанні певного носія досягти необхідної глибини очищення (96–100%). Високою швидкістю розкладання фенолу володіють клітини штаму *P. fluorescens* ONU328, імобілізовані на піску та на синтетичних носіях – керамічних трубках, волокнистій насадці типу «ВІЯ». В результаті біотехнологічної обробки води бактеріями *P. fluorescens* ONU328-деструкторами, імобілізованими або на піску, або на керамічних трубках, або на волокнистій насадці типу «ВІЯ» ступінь біодеструкції фенолу вже на 5-ту добу експерименту однаковий і сягає 99% (залишкова концентрація фенолу у воді з поправкою на контроль складає $1,0 \pm 0,12$ мг/л і $2,0 \pm 0,15$ мг/л, відповідно).

Таким чином, біохімічно-активні штами *P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329 можуть бути рекомендовані для широкого використання в біотехнології очищення стічних вод хімічних, фармацевтичних виробництв, нафтохімічного комплексу, медичних установ від токсичних органічних забруднювачів, зокрема від фенолу. Основні переваги пропонованої технології очищення води від фенолу бактеріями-деструкторами роду *Pseudomonas*, імобілізованими на природних (цеоліт, мушлі мідій, пісок, активоване вугілля, верховий торф) і синтетичних (волокниста насадка типу «ВІЯ», керамічні трубки) носіях є: екобезпека, ефективність, простота здійснення, відсутність вторинного забруднення.

Експериментально встановлено здатність штамів *P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328 і *P. maltophilia* ONU329 окиснювати фенол (рН 6,8–7,2; температура 28 ± 1 °С). Ступінь очищення води від фенолу дії вільних клітин бактерій у кількості $7,5 \times 10^5$ КУО/мл протягом 10 діб експозиції сягав 45% – при використанні штаму *P. cepacia* ONU327, 78% – штаму *P. fluorescens* ONU328 і 93% – при використанні штаму *P. maltophilia* ONU329.

Експериментально підтверджено, що через 11 діб використання імобілізованих на активованому вугіллі, піску клітин бактерій *P. cepacia* ONU327 або імобілізованих на мушлях мідій клітин бактерій *P. fluorescens* ONU328 відбувалося зниження концентрації фенолу з 200 мг/л до рівня гранично-допустимої концентрації (ГДК для водних об'єктів господарсько-питного та культурно-побутового користування складає 0,001 мг/л)

Прискорення очищення води від фенолу відбувається за умови використання клітин бактерій роду *Pseudomonas* (*P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328), імобілізованих на керамічних трубках і волокнистій насадці типу «ВІЯ». Протягом 5-ти діб експозиції ступінь очищення води від фенолу імобілізованими на волокнистій насадці типу «ВІЯ» мікроорганізмами-деструкторами з урахуванням поправки на контроль



(нативный немодифицированный сорбент «ВИЯ») сягав 97% – за дії штаму *P. serasia* ONU327; та 99% – за дії штаму *P. fluorescens* ONU328.

**Т.В. Гудзенко, В.А. Иваньця, И.П. Конуп, Е.Г. Горшкова,
О.В. Волювач, 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

ОЧИСТКА ВОДЫ ОТ ФЕНОЛА БАКТЕРИЯМИ РОДА *PSEUDOMONAS*, ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ НА ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЯХ

Реферат

Цель. Оптимизация процесса очистки воды от фенола с использованием бактерий рода *Pseudomonas* (*P. serasia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329), иммобилизованных на природных и синтетических носителях. **Методы.** Концентрацию фенола в воде определяли экстракционно-фотометрическим методом с использованием 4-аминоантипирина. Для очистки воды от фенола (с концентрацией 200 мг/л) использовано непатогенные отдельные штаммы бактерий *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. serasia* ONU327, иммобилизованные на носителях различной природы (цеолит, створки мидий, речной песок, керамические кольца, активированный уголь, верховой торф, синтетический носитель типа «ВИЯ»). **Результаты.** Экспериментально подтверждено, что адгезия клеток штаммов бактерий *P. serasia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 к цеолиту, речному песку (которые практически не сорбируют фенол) способствовала эффективной биодеструкции фенола на 96–100% (в зависимости от выбранного штамма бактерий). Остаточная концентрация фенола в воде при ее обработке (в течение 11 суток) иммобилизованными на цеолите клетками штамма *P. fluorescens* ONU328 или штамма *P. maltophilia* ONU329 уменьшалась с 200 мг/л до $8,0 \pm 0,95$ мг/л (степень очистки воды от фенола (α) – 96%) и до $2,0 \pm 0,14$ мг/л (α = 99%) – при использовании иммобилизованных клеток штамма *P. serasia* ONU327. Установлено, что при использовании иммобилизованных на песке речном микроорганизмов-деструкторов остаточная концентрация фенола в воде на 11-е сутки обработки составляла $6,0 \pm 0,55$ мг/л (α = 97%) и $2,0 \pm 0,14$ мг/л (α = 99%) – соответственно для штаммов *P. maltophilia* ONU329 и *P. fluorescens* ONU328; и достигала уровня предельно-допустимой концентрации (ПДК=0,001 мг/л) – в случае иммобилизованных на песке речном клеток штамма *P. serasia* ONU327. Экспериментально установлено, что ускорение очистки воды от фенола происходило при использовании клеток бактерий рода *Pseudomonas* (*P. serasia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328), иммобилизованных на керамических трубках и волокнистой насадке типа «ВИЯ». В течение 5-ти суток экспозиции степень очистки воды от фенола иммобилизованными на волокнистой насадке типа «ВИЯ» микроорганизмами-деструкторами с учетом поправки на контроль (нативный немодифицированный сорбент типа «ВИЯ») достигала 97% – в результате действия штамма *P. serasia* ONU327; и 99% – в результате действия штамма *P. fluorescens* ONU328. **Вывод.** Для



ускорения очистки воды от фенола (в течение 5 суток) на 97–99% рекомендуется использовать штаммы бактерий *P. cepacia* ONU327 и *P. fluorescens* ONU328, иммобилизованные на волокнистой насадке типа "ВИЯ". Полное обесфеноливание воды наблюдается при ее обработке штаммами бактерий *P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, отдельно иммобилизованных на активированном угле, речном песке (для штамма *P. cepacia* ONU327) и на створках мидий (для штамма *P. fluorescens* ONU328) соответственно.

Ключевые слова: очистка воды, фенол, сорбенты, иммобилизованные клетки бактерии рода *Pseudomonas*.

**T.V. Gudzenko, V.O. Ivanytsia, I.P. Konup, O.G. Gorshkova,
O.V. Voliuvach, 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

PURIFICATION OF WATER FROM PHENOL BY BACTERIA OF THE GENUS *PSEUDOMONAS* IMMOBILIZED ON NATURAL AND SYNTHETIC CARRIERS

Summary

Aim. Optimization of the process of water purification from phenol using bacteria of the genus *Pseudomonas* (*P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329) immobilized on natural and synthetic carriers. **Methods.** The concentration of phenol in water was determined by extraction-photometric method using 4-aminoantipyrin. For purification of water from phenol (with a concentration of 200 mg / l) non-pathogenic individual strains of bacteria *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329, *P. cepacia* ONU327, immobilized on carriers of different nature (zeolite, mussel doors, river sand, ceramic rings, activated carbon, high peat, synthetic carrier type "VIYA"). **Results.** There were experimentally confirmed that adhesion of cells of the bacterial strains of *P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 to zeolite, river sand (which practically do not sorb phenol) contributed to the effective biodegradation of phenol by 96–100% (depending on the selected strain bacteria). The residual concentration of phenol in water during its treatment (for 11 days) by cells of *P. fluorescens* ONU328 strain or *P. maltophilia* ONU329 strain immobilized on zeolite decreased from 200 mg / l to 8.0 ± 0.95 mg / l (water purification from phenol (α) – 96%) and up to 2.0 ± 0.14 mg / l (α = 99%) – when using immobilized cells of the strain *P. cepacia* ONU327. It was established that when river microorganisms-destroyers were immobilized on the river sand, the residual concentration of phenol in water on the 11th day of treatment was 6.0 ± 0.55 mg / l (α = 97%) and 2.0 ± 0.14 mg / l (α = 99%) – respectively for the strains of *P. maltophilia* ONU329 and *P. fluorescens* ONU328; and reached the level of maximum permissible concentration (MPC = 0.001 mg / l) – in the case of river cells of strain *P. cepacia* ONU327 immobilized in the sand of the river. It was established experimentally that the acceleration of water purification from phenol occurred when using cells of bacteria of the genus *Pseudomonas* (*P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens*



ONU328) immobilized on ceramic tubes and a fibrous nozzle of the "VIYA" type. Within 5 days of exposure, the degree of water purification from phenol immobilized on the fibrous attachment of the VIYA type by destructive microorganisms, taking into account the control correction (native unmodified sorbent of the VIA type) reached 97% – as a result of the action of the strain *P. cepacia* ONU327; and 99% – as a result of the strain *P. fluorescens* ONU328. **Conclusion.** To accelerate the purification of water from phenol (for 5 days) by 97–99%, it is recommended to use the strains of the bacteria *P. cepacia* ONU327 and *P. fluorescens* ONU328 immobilized on a fibrous nozzle of the type "VIYA". Full dephenolization of water is observed when it is treated with the strains of bacteria *P. cepacia* ONU327, *P. fluorescens* ONU328, which are immobilized separately on activated carbon, river sand (for the strain *P. cepacia* ONU327) and on the mussel doors (for the strain *P. fluorescens* ONU328), respectively.

Key words: water purification, phenol, sorbents, immobilized cells of bacteria of the genus *Pseudomonas*.

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. Галимова Р.З. Очистка фенолсодержащих сточных вод нативными и модифицированными адсорбционными материалами на основе отходов сельскохозяйственного и промышленного производства: Автореф. дис. к.т.н. 03.02.08-экология. – Казань: Казанский нац. исследов. ун-т, 2017. – 23.
4. Гвоздяк П.И., Могилевич Н.Ф., Куликов Н.И., Романова Е.А., Нездоимин В.И. Очистка фенолсодержащих сточных вод закрепленными микроорганизмами // Химия и технология воды. – 1989. – Вып. 1. – С. 73–75.
5. Горшикова О.Г., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Конуп І.П., Беляева Т.О. Очищення води від фенолу та йонів важких металів асоціацією бактерій роду *Pseudomonas* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2018. – № 2. – С. 70–80. DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2\(42\).134293](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2(42).134293)
6. Горшикова О.Г., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляева Т.О., Конуп І.П., Чернишова М.О. Деструктивна та метал-акумулююча здатність бактерій роду *Pseudomonas* // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія» – 2018. – № 2(73). – С. 49–53.
7. Корженевич В.И. Микробная очистка фенолсодержащих сточных вод : Автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.07 : Саратов, 2003. – 23 с.
8. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. М.: Химия, 1984. – 448 с.
9. Путилина Н.Т, Квитницкая Н.Н., Костовецкий Я.И. Микробный метод обесфеноливания сточных вод. – Киев: Здоровье, 1964. – 87 с.
10. Самсонова А. Биоремедиация природных и производственных сред // Наука и инновации. – 2011. – № 11(105). – С. 66–70.



11. Часова Э.В. Эколого-химические характеристики и методы защиты окружающей среды от фенола / Э.В. Часова, В.В. Ивчук // Вестник Криворожского национального университета. – 2013. – №34(1). – С. 209–213.

12. 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.

13. Gudzenko Tatyana, Wolodymyr Iwanycja, Olga Woljuwacz, Boris Gal-kin, Olga Zuk, Elena Gorszkowa. Biodegradacja fenoli i nnych cyklicznych związków aromatycznych. – Publisher: GlobeEdit is a trademark of International Book Market Service Ltd., member of OmniScriptum Publishing Group, 17 Meldrum Street, Beau Bassin 71504, Mauritius. (ISBN: 978-613-8-25347-1). – 85 p.

14. Патент України на винахід № 116299. Спосіб здійснення дефенолізації промислових стоків / Іваниця В.О., Горшкова О.Г., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Конуп І.П., Беляєва Т.О. Номер заявки № а201608635 від 25.07.2016 р. Опубл. 26.02.2018, Бюл. № 4.

15. Патент України на винахід №116058. Спосіб біологічного очищення поверхневих вод / Гвоздяк П.І., Капарник А.І., Домбровський К.О., Рильський О.Ф., Болгова О.С. Опубл. 25.01.2018., Бюл. №2

References

1. Bespamjatkov GP. Maximum permissible concentrations of chemicals in the environment / G.P. Bespamjatkov, Ju.A. Krotov. L.: Himija, 1985:585. [in Russian].

2. Bykova GS, Shatalaev IF, Voronin AV. The phytomass of finely serrated mollusk in the post-treatment of phenogenic contaminated waters of pharmaceutical industries. Medicinskij al'manah. 2014;1(31):102–105. [in Russian].

3. Galimova RZ. Purification of phenol-containing wastewater using native and modified adsorption materials based on agricultural and industrial waste: Avtoref. dis. k.t.n. 03.02.08-jekologija. – Kazan': Kazanskij nac. issledov. un-t, 2017:23. [in Russian].

4. Gvozdyak PI, Mogilevich NF, Kulikov NI, Romanova EA, Nezdojminov VI. Treatment of phenol-containing wastewater with fixed microorganisms. Himija i tehnologija vody. 1989;1:73–75. [in Russian].

5. Gorshkova OG, Gudzenko TV, Voljuvach OV, Konup IP, Beljaeva TO. Purification of water from phenol and heavy metal ions by association of bacteria of the genus *Pseudomonas*. Microbiology&Biotechnology. 2018;2:70–80. DOI: [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2\(42\).134293](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2018.2(42).134293) [in Ukrainian].

6. Gorshkova OG, Gudzenko TV, Voljuvach OV, Beljaeva TO, Konup IP, Chernishova MO. Destructive and metal-storage capacity of bacteria of the genus *Pseudomonas*. Naukovi zapiski Ternopil's'kogo nacional'nogo pedagogichnogo universitetu imeni Volodimira Gnatjuka. Serija: Biologija». 2018;2(73):49-53. [in Ukrainian].

7. Korzhenevich VI. Microbial treatment of phenol-containing wastewater: Avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk : 03.00.07 : Saratov, 2003:23. [in Russian].



8. Lur'e JuJu. Analytical chemistry of industrial wastewater. M.: Himija, 1984:448. [in Russian].
9. Putilina NT, Kvitnickaja HH, Kostoveckij JaI. Microbial method of wastewater defenolization. K: Zdorov'ja, 1964:87. [in Russian].
10. Samsonova A. Bioremediation of natural and industrial environments. Nauka i innovacii. 2011;11(105):66-70. [in Russian].
11. Chasova JeV. Ecological and chemical characteristics and methods of protecting the environment from phenol / Je.V. Chasova, V.V. Ivchuk. Vestnik Krivorozhskogo nacional'nogo universiteta. 2013;34(1):209-213. [in Russian].
12. 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. [in English]
13. *Gudzenko Tatyana, Wolodymyr Iwanycja, Olga Woljuwacz, Boris Galkin, Olga Zuk, Elena Gorszkowa.* Biodegradacja fenoli i nnych cyklicznych związków aromatycznych. – Publisher: GlobeEdit is a trademark of International Book Market Service Ltd., member of OmniScriptum Publishing Group, 17 Meldrum Street, Beau Bassin 71504, Mauritius. (ISBN: 978-613-8-25347-1). – 85 p. [in Polish]
14. Patent Ukrai'ny na vynahid № 116299. Method of defenolization of industrial effluents / Ivanycja V.O., Gorshkova O.G., Gudzenko T.V., Voljuvach O.V., Konup I.P., Bjeljajeva T.O. Nomer zajavky № a201608635 vid 25.07.2016 r. Opubl. 26.02.2018, Bjul. № 4. [in Ukrainian].
15. Patent Ukrai'ny na vynahid №116058. Method of biological treatment of surface water / Gvozdyak P.I., Kaparnyk A.I., Dombrovs'kyj K.O., Ryl's'kyj O.F., Bolgova O.S. Opubl. 25.01.2018., Bjul. №2. [in Ukrainian].

Стаття надійшла до редакції 05.12.2019 р.

