

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

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

**ОКИСНЕННЯ ВУГЛЕВОДНІВ НАФТИ І  
ПРОДУКЦІЯ БІО-ПАР ГРУНТОВИМИ ШТАМАМИ  
*PSEUDOMONAS FLUORESCENS* ONU541 І *BACILLUS  
MEGATERIUM* ONU542**

**Мета.** Виявлення особливостей окиснення вуглеводнів нафти і продукції біо-ПАР ґрунтовими штамами мікроорганізмів роду *Pseudomonas fluorescens* ONU541, *Bacillus megaterium* ONU542. **Методи.** Видову приналежність досліджуваних мікроорганізмів визначали за спектрами жирних кислот їх клітинних ліпідів. Залишковий вміст вуглеводнів нафти визначали методом ІЧ-спектроскопії на "ІКС-29" в діапазоні 2700–3200 см<sup>-1</sup>. Про продукцію мікроорганізмами біосурфактантів судили по зниженню величини поверхневого натягу рідких культур бактерій та їх супернатантів та по емульгуювальній здатності (за індексом емульгування – Е24, %). **Результати.** Показано залежність між нафтодеструктивною здатністю досліджуваних штамів бактерій та їх здатністю продукувати біосурфактанти. Штам *P. fluorescens* ONU541 більшою мірою ніж штам *B. megaterium* ONU542 окиснює вуглеводні нафти (на 74,6%) та продукує поверхнево-активні метаболіти. Досліджувані штами *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542 здатні продукувати біосурфактанти за умови їх культивування протягом п'яти діб у живильному середовищі складу (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 3;  $\text{NaCl}$  – 5;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1; глюкоза – 2 (рН 7,0-7,2). **Висновок.** Встановлено нафтодеструктивну активність та здатність продукувати біосурфактанти ґрунтових штамів *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542. Доведено, що за сумісної присутності досліджуваних штамів мікроорганізмів ступінь деструкції нафти сягає 90% в жорстких умовах навколишнього середовища: при очищенні засолених ділянок ґрунту о. Зміїний з хронічним нафтовим забрудненням.

**Ключові слова:** *Pseudomonas fluorescens* ONU541, *Bacillus megaterium* ONU542, деструктори нафти, продуценти поверхнево-активних речовин.

Способи ліквідації хронічних нафтових забруднень, що ґрунтуються на розкладанні нафтопродуктів мікроорганізмами, визнані ефективними і екобезпечними. Ступінь очистки води або ґрунту від нафти при обробці їх біопрепаратом значно підвищується у разі продукції нафтоокиснювальними мікроорганізмами біосурфактантів (мікробних поверхнево-активних речовин (ПАР)). Вони сприяють утворенню високодисперсної емульсії, внаслідок чого полегшується контакт мікробних клітин з гідрофобним субстратом і прискорюється



процес окиснення важко засвоєваних нафтових фракцій вуглеводнів [5, 6]. Рациональне використання біосурфактантів залежить у першу чергу від економічної ефективності їх виробництва. Одним із способів здешевлення вартості технології отримання цих продуктів мікробного синтезу є використання дешевих субстратів – промислових відходів та спеціально підібраних компонентів живильного середовища (ЖС), здатних підтримувати рН очищувального середовища на рівні 7,0–7,2 [7, 16].

Мікробні ПАР характеризуються порівняно із синтетичними аналогами широким спектром функціональної активності і мають низку переваг, таких як: стабільність фізико-хімічних властивостей в широкому діапазоні температур і значень рН середовища, нетоксичність, здатність до біодеградації [6]. Мікробні ПАР поділяються на дві основні групи. До першої входять низькомолекулярні, власне біосурфактанти: гліколіпіди (глюколіпіди, рамноліпіди, трегалозоліпіди, софороліпіди) і ліпопептиди (сурфактин, стрептофактин, поліміксин, грамїцидин). До другої відносять високомолекулярні сполуки – емульсани або біоемульгатори [13], що представлені поліцукридами, ліпополіцукридами, протеїнами, ліпопротеїнами і їх комплексами. Перша група включає молекули, які ефективно знижують поверхневий і міжфазний натяг. Друга група об'єднує полімери, які більш ефективні для стабілізації емульсій типу «олія у воді» [12]. Із великої групи мікробних ПАР, які продукують представники родів *Pseudomonas* і *Bacillus*, особливу увагу приділяють рамноліпідам, ліпопептидам (сурфактину зокрема) та високомолекулярним екзополіцукридам [4, 8, 11]. Однак актуальною задачею екобіотехнології залишається пошук нових мікроорганізмів, що володіють нафтоокиснювальною та ПАР-продукуючою здатністю.

Мета роботи – виявлення особливостей окиснення вуглеводнів нафти і продукції біо-ПАР ґрунтовими штамми *Pseudomonas fluorescens* ONU541, *Bacillus megaterium* ONU542.

### Матеріали та методи

Об'єктами дослідження слугували штами бактерій, виділені із забрудненого нафтопродуктами ґрунту о. Зміїний, які за сукупністю морфологічних, культуральних і фізіолого-біохімічних ознак, визначених з використанням класичних бактеріологічних методів та тест-системи API 50 CHB Medium (bioMérieux, Франція) та порівняльним аналізом жирнокислотних профілів бактерій досліджуваних штамів за допомогою системи MIDI Sherlock з використанням бібліотек спектрів жирних кислот аеробних мікроорганізмів RSTBA6 6.2 віднесено до виду *Pseudomonas fluorescens* ONU541 і *Bacillus megaterium* ONU542 [2].

Залишковий вміст вуглеводнів нафти у контрольних і дослідних пробах (бактеріальних суспензіях) визначали методом ІЧ-спектрометрії, як було описано раніше [10]. Аналітичні сигнали реєстрували аналізатором “ІКС-29” в інфрачервоній зоні спектра в діапазоні хвильових чисел 2700–3200  $\text{cm}^{-1}$ , де фіксували валентні коливання  $\text{CH}_3$ - і  $\text{CH}_2$ - груп аліфатичних і аліциклічних сполук і бокових ланцюгів ароматичних вуглеводнів, а також вуглець-водневих зв'язків ароматичних сполук. Оскільки вуглеводні різних сортів нафти є



сумішшю сполук окремих класів, що мають відмінні між собою властивості, то перед вивченням нафтоокиснювальної активності ( $A$ , %) мікроорганізмів – ефективності біодеструкції, що оцінювали за формулою (1):

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

де  $K_H^0$ ;  $K_{H(\text{практ})}$  – вихідна і залишкова (практична) концентрації нафти (мг/л), встановили градуїзовану логарифмовану залежність різниці оптичних густин досліджуваного і контрольного розчинів ( $\Delta D$ ) від концентрації нафти ( $K_H$ ). Різницю  $\Delta D$  розраховували при хвильових числах, що відповідають максимуму і мінімуму смуги поглинання, за формулою (2):

$$\Delta D = - \ln (T_1/T_2), \quad (2)$$

де  $T_1$  – значення пропускання (%) в максимумі смуги поглинання при  $(2926 \pm 15) \text{ см}^{-1}$ ;  $T_2$  – значення пропускання (%) в мінімумі смуги поглинання при  $(2700 \pm 15) \text{ см}^{-1}$ .

Екстрагування вуглеводнів із проб здійснювали з використанням чотирьохлористого вуглецю марки “х.ч.”. Органічний розчинник об’ємом 25 мл змішували з відповідним об’ємом (до 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 сторонніх залишків, далі екстракт пропускали через хроматографічну колонку, заповнену оксидом алюмінію (ІІ ступеня активності по Брокману, ТУ 6-09-3916-75). Далі, користуючись градуїрованою залежністю ( $\Delta D$ ) від концентрації нафти ( $K_H$ ), визначали залишкову (або практичну) концентрацію нафти, яка пов’язана з залишковою вимірною концентрацією нафти рівнянням (3):

$$K_{H(\text{практ})} = \frac{K_{H(\text{вимір.})} \cdot \text{Об}_1 \cdot n}{\text{Об}_2} \quad (3)$$

де  $\text{Об}_1$  – об’єм чотирьохлористого вуглецю, взятого для екстракції;  $\text{Об}_2$  – об’єм проби;  $n$  – коефіцієнт розбавлення елюату.

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

Здатність мікроорганізмів продукувати біосурфактанти перевіряли залежно від органічних компонентів, що входили до складу живильного середовища (ЖС) М-9. Культивування мікроорганізмів здійснювали на інкубаторі шейкері New Brunswick Scientific Incubator Shaker INNOVA 43R у флаконах зі 100 мл середовища при 150 об/хв п’ять діб за температури 30 °С. Засів живильного середовища проводили добовою культурою, що виростає на МПБ у стаціонарних умовах (термостат) при температурі 30 °С. Об’єм посівного матеріалу склав 1,0% до об’єму середовища М-9 ЖС<sub>1</sub>, що містило компоненти (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 3;  $\text{NaCl}$  – 5;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1; глюкоза – 2; пептон – 10; дріжджовий екстракт – 5; (рН 7,0–7,2) та до об’єму живильного середовища М-9 ЖС<sub>2</sub> із п’ятьма компонентами (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 3;



NaCl – 5; NH<sub>4</sub>Cl – 1; глюкоза – 2 (рН 7,0–7,2). Обидва живильні середовища містили глюкозу у кількості 0,2%, яка, за даними літератури, підвищує синтез цільового поверхнево-активного продукту у 2–4 рази [7].

При проведенні скринінгу продуцентів мікробних ПАР серед колекційних культур бактерій здатність продукувати біосурфактанти оцінювали згідно з [14, 15] загальноприйнятими методами – по зниженню рівня поверхневого натягу і за появою емульгувальної активності рідких культур та їх безклітинних супернатантів, одержаних центрифугуванням. Визначали зниження величини поверхневого натягу [ $\sigma$ , мН/м] рідких культур бактерій (КБ) та їх безклітинних супернатантів (СП) відносно дистильованої води [ $\sigma$ (H<sub>2</sub>O), мН/м] та живильного середовища за відсутністю мікроорганізмів [ $\sigma$ (ЖС<sub>I</sub>) і  $\sigma$ (ЖС<sub>II</sub>), мН/м] та за емульгувальною здатністю їх супернатантів відносно соняшникової олії [15]. Значення поверхневого натягу ( $\sigma$ ) живильного середовища, бактеріальних культур та супернатантів вимірювали за температури 25±1 °С методом відриву пластинки з поверхні рідини (метод Вільгельмі), емульгувальну здатність оцінювали за індексом емульгування (E<sub>24</sub>, %) [15, 16].

Експерименти здійснювали в п'яти повторах. Статистичне опрацювання результатів досліджень проводили за допомогою комп'ютерної програми «Microsoft Office Excel 2003» із визначенням *t*-критерію Стьюдента. Статистично вірогідною вважали різницю при  $p < 0,05$ .

### Результати досліджень та їх обговорення

Експериментальна перевірка спроможності відібраних із нафтозабрудненого ґрунту о. Зміїний штамів *P. fluorescens* ONU541 і *B. megaterium* ONU542 до утилізації вуглеводнів нафти з вихідною концентрацією 1000 мг/л показала (табл. 1), що обидва штами при їх культивуванні у ЖС<sub>II</sub> із додаванням глюкози в кількості 2,0 г/л розкладають у стаціонарних умовах вуглеводні нафти протягом 60 діб при температурі 30 °С на 60,3–74,6% з урахуванням поправки на контрольні проби. За рахунок фізико-хімічного процесу випаровування легких фракцій нафти залишкова концентрація нафти у ЖС<sub>II</sub> без внесення бактеріальних культур протягом всього терміну експозиції, як і слід було очікувати, зменшувалася з 1000,0 до 885,0±57,0 мг/л (на 11,5%). На користь того, що штам *B. megaterium* ONU541 порівняно зі штамом *P. fluorescens* ONU542 продукував переважно екзогенні поверхнево-активні метаболіти свідчать дані щодо залишкового вмісту вуглеводнів нафти у емульгованому стані. Їх залишковий вміст у бактеріальних суспензіях із штамом *B. megaterium* ONU542 у 3,5 рази більший (56,0±5,0 мг/л) за залишковий вміст емульгованої нафти у бактеріальних суспензіях із штамом *P. fluorescens* ONU541 (16,0±2,0 мг/л).

Отримані дані дозволяють констатувати, що продукування штамом *P. fluorescens* ONU541 поверхнево-активних метаболітів змішаного типу більшою мірою призводить до деструкції вуглеводнів нафти – на 74,6% при залишковому вмісті важко окиснювальних фракцій нафти 225 мг/л.

Проведені пілотні випробування показали, що за сумісної присутності досліджуваних штамів мікроорганізмів ступінь деструкції нафти значно вищий і сягає 90% в жорстких реальних умовах навколишнього середовища: при очищенні засоленних ділянок ґрунту о. Зміїний з хронічним нафтовим забрудненням.



Це дало можливість припустити, що досліджувані штами *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542 є також продуцентами біосурфактантів.

Таблиця 1

**Деструкція вуглеводнів нафти штамами  
*P. fluorescens* ONU541 і *B. megaterium* ONU542\***

Table 1

**Degradation of petroleum hydrocarbons by the strains of  
*P. fluorescens* ONU 541 and *B. megaterium* ONU542\***

Штам	Залишковий вміст вуглеводнів нафти (мг/л)			Ступінь деструкції нафти, %
	на межі поділу фаз бактеріальна суспензія - повітря	в придонній плівці	в емульгованому стані	
<i>P. fluorescens</i> ONU541	204,0±20,0	5,0±0,5	16,0±2,0	74,6
<i>B. megaterium</i> ONU542	290,0±25,0	5,0±0,5	56,0±5,0	60,3

\*Примітка: вихідна концентрація вуглеводнів нафти у контролі – 1000,0 мг/л; ступінь втрати вуглеводнів нафти у контролі протягом 60 діб за рахунок фізико-хімічних процесів – 11,5% (залишкова концентрація вуглеводнів нафти 885,0±57,0 мг/л)

\* Note: the initial concentration of hydrocarbons of oil in the control – 1000,0 mg/l; The degree of loss of petroleum hydrocarbons in control for 60 days due to the physico-chemical processes – 11,5% (residual concentration of petroleum hydrocarbons 885,0 ± 57,0 mg/l)

Тому друга частина роботи була спрямована на дослідження здатності цих бактерій продукувати поверхнево-активні метаболіти залежно від умов культивування і складу живильного середовища М-9. Експериментально встановлено, що досліджувані мікроорганізми у середовищі ЖС<sub>I</sub> за температури 30 °С протягом трьох діб практично не продукують біосурфактанти: значення поверхневого натягу бактеріальних культур з урахуванням похибки методу Вільгельмі (±0,5 мН/м) знаходилися на рівні значення поверхневого натягу середовища за відсутності мікроорганізмів  $\sigma(\text{ЖС}_I)$  51,2 мН/м. І лише на п'яту добу мікроорганізми виділяли у середовище метаболіти із слабо помітними поверхнево-активними властивостями. Рівноважні значення поверхневого натягу [ $\sigma$ , мН/м] культур бактерій *P. fluorescens* ONU541 і *B. megaterium* ONU542, культивованих впродовж різних проміжків часу, встановлювалися за температури 25±2 °С не менше 2-х годин.

Результати по тензіометричному дослідженню поверхнево-активних властивостей рідких культур бактерій *P. fluorescens* ONU541 і *B. megaterium* ONU542 та отриманих їх супернатантів (СП) наведені в таблиці 2.

Як видно із наведених у таблиці 2 даних, при дослідженні поверхневих властивостей бактеріальних культур і їх супернатантів необхідно враховувати поправку на живильне середовище за відсутністю мікроорганізмів, оскільки за наявності значної кількості органічних речовин поверхневий натяг розчинів по відношенню до дистильованої води теж зменшується:  $\sigma(\text{ЖС}_I) = 51,2 \pm 2,0$  мН/м;  $\sigma(\text{ЖС}_{II}) = 67,9 \pm 2,0$  мН/м.





Таблиця 2

Поверхнево-активні властивості рідких культур досліджуваних бактерій\* та їх супернатантів при рості у середовищах різного складу

Table 2

Surface-active properties of liquid cultures of bacteria\* and the supernatant with growth in various media

Штам/ середовище	Значення поверхневого натягу ( $\sigma$ ), мН/м					
	$\sigma_{\text{КБ}}$	$\sigma_{\text{СП}}$	$\sigma_{\text{ЖС}} - \sigma_{\text{КБ}}$	$\sigma_{\text{ЖС}} - \sigma_{\text{СП}}$	$\sigma_{\text{води}} - \sigma_{\text{КБ}}$	$\sigma_{\text{води}} - \sigma_{\text{СП}}$
<i>P. fluorescens</i> ONU541/(ЖС <sub>I</sub> )**	45,0±2,2	47,6±2,5	6,2	3,6	27,0	24,4
<i>B. megaterium</i> ONU542/(ЖС <sub>I</sub> )**	42,4±1,8	46,4±2,4	8,8	4,8	29,6	25,6
<i>P. fluorescens</i> ONU541/(ЖС <sub>II</sub> )***	48,3±2,1	56,3±2,5	19,6	11,6	23,7	15,7
<i>B. megaterium</i> ONU542/(ЖС <sub>II</sub> )***	48,9±2,2	50,2±2,7	19,0	17,7	23,1	21,8

Примітки: \* - культивування бактерій 5 діб за температури 28±2 ° С;

\*\* – ЖС<sub>I</sub> за відсутності бактерій (Контроль 1),  $\sigma(\text{ЖС}_I) = 51,2 \pm 2,0$  мН/м;

\*\*\* – ЖС<sub>II</sub> за відсутності бактерій (Контроль 2),  $\sigma(\text{ЖС}_{II}) = 67,9 \pm 2,0$  мН/м

Notes: \* – cultivation of bacteria for 5 days at temperature 28 ± 2 ° C;

\*\* – NMI in the absence of bacteria (Control 1),  $\sigma(\text{NM}_I) = 51.2 \pm 2.0$  mN/m;

\*\*\* – NMII in the absence of bacteria (Control 2),  $\sigma(\text{NM}_{II}) = 67.9 \pm 2.0$  mN/m

При культивуванні штаму *B. megaterium* ONU542 у збагаченому пептоном і дріжджовим екстрактом ЖС<sub>I</sub> значення  $\sigma(\text{КБ})$  і  $\sigma(\text{СП})$  знижувалося по відношенню до контролю 1 (ЖС<sub>I</sub>), відповідно, з 51,2±2,0 до 42,4±1,8 і 46,4±2,4 мН/м. Це вказує на помірну здатність цих бактерій продукувати у ЖС<sub>I</sub> біосурфактанти. Меншу здатність продукувати у ЖС<sub>I</sub> біосурфактанти виявляв штам *P. fluorescens* ONU541: значення  $\sigma(\text{КБ})$  і  $\sigma(\text{СП})$  знижувалося порівняно з ЖС<sub>I</sub> з 51,2±2,0 до 45,0±2,2 і 47,6±2,5 мН/м.

За відсутності пептону, дріжджового екстракту та мікроорганізмів поверхневий натяг середовища ЖС<sub>II</sub> зменшувався з 73 мН/м (для дистильованої води) [експериментальна стала  $K(\text{H}_2\text{O})^{25}=0,2028$ ] до 67,9 мН/м.

Перевірка здатності досліджуваних бактерій продукувати біосурфактанти у середовищі ЖС<sub>II</sub> показала дещо інші результати (табл. 2, рис. 1). Продукція поверхнево-активних речовин досліджуваних культур та їх супернатантів зростала у ЖС<sub>II</sub>. Різниця [ $\sigma_{\text{ЖС}} - \sigma_{\text{КБ}}$ ] і [ $\sigma_{\text{ЖС}} - \sigma_{\text{СП}}$ ] збільшувалася для ґрунтових штамів *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542 – у 2,2–3,7 рази: від 6,2–8,8 до 19,0–19,6 і від 3,6–4,8 до 11,6–17,7 одиниць  $\sigma$ . Слід зазначити, що аналогічні дані по здатності продукувати біосурфактанти у живильному середовищі з невеликою кількістю нітрогену та мікроелементів за присутності глюкози було встановлено [3] для штаму *P. aeruginosa* DSM2659. Відомо, що особливістю нітрогенного і карбонового харчування для більшості видів бактерій роду *Pseudomonas* є те, що вони не потребують чинників росту і здатні асимілювати мінеральні форми азоту як єдиного джерела живлення [9], продукування біосурфактантів може відбуватися у ЖС з невеликою кількістю нітрогену та мікроелементів за присутності глюкози [3], при цьому екзополі



цукриди мікроорганізмів не тільки відіграють особливу роль у підтримці сприятливих умов для їх продуцентів і можуть використовуватися як джерело карбону. Відомо [7], що глюкоза є екзогенним попередником біосинтезу ПАР.

Вважається [15], що перспективними як продуценти біо-ПАР є мікроорганізми, в середовищі культивування яких спостерігається зниження значення поверхневого натягу нижче 40–50 мН/м.

Оцінка здатності мікроорганізмів, виділених із забрудненого нафтопродуктами ґрунту о. Зміїний *P. fluorescens* ONU541 та *B. megaterium* ONU542, представлена на діаграмі (рис. 1), яка добре демонструє, що для мікроорганізмів обох мікроорганізмів оптимальним живильним середовищем із досліджених є ЖС<sub>II</sub>.

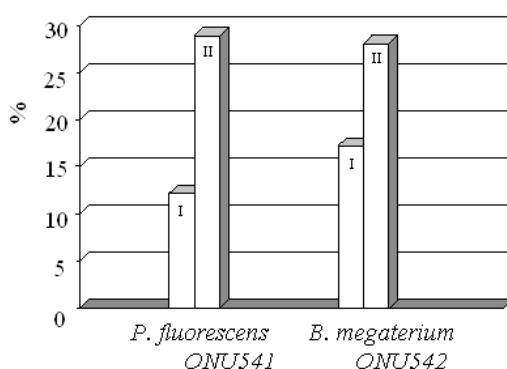


Рис. 1. Здатність *P. fluorescens* ONU541 і *B. megaterium* ONU542 продукувати біосурфактанти у живильних середовищах I - ЖС<sub>I</sub>, II - ЖС<sub>II</sub>

Fig. 1. The ability *P. fluorescens* ONU541 and *B. megaterium* ONU542 to produce biosurfactants in nutrient media I - NM<sub>I</sub>, II - NM<sub>II</sub>

Необхідно зазначити, що на основі такого компонентного складу ЖС, здатного підтримувати рН середовища на рівні 7,0–7,2, у попередній роботі [16] нами запропоновано виготовляти поверхнево-активні біопрепарати для очищення навколишнього середовища від хронічних нафтових забруднень. Штами *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542 у середовищі ЖС<sub>II</sub> за відсутності у його складі органічних компонентів дещо більше продукують метаболіти з поверхнево-активними властивостями. Слід зазначити, що іншими дослідниками теж виявлена ймовірність появи біосурфактантів на гідрофільному живильному середовищі у деяких штамів *B. subtilis*. У трьох продуцентів біосурфактантів – *B. subtilis* ІБ-17, *B. subtilis* ІБ-18 і *B. subtilis* ІБ-19 на середовищі, яке містило крохмаль, було встановлено інтенсивне утворення поверхнево-активних речовин, що відбувалося в логарифмічній фазі росту бактерій [1].

Емульгувальні властивості одержаних із бактеріальних культур супернатантів, оцінені за індексом емульгування ( $E_{24}$ ), були досить високими по відношенню до соняшникової олії ( $E_{24} > 60\%$ ).

Таким чином, в даній роботі встановлено нафтодеструктивну активність та здатність продукувати біосурфактанти ґрунтових штамів *P. fluorescens*

ONU541, *B. megaterium* ONU542. Досліджувані штами найбільш активно продукували біосурфактанти за умов їх культивування за температури 30 °С протягом п'яти діб у живильному середовищі ЖС<sub>II</sub>, що відрізняється тим, що як мінеральні компоненти використовують (у г/л води):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 3,0;  $\text{NaCl}$  – 5,0;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1,0; а як органічний компонент – глюкозу в кількості 2,0 г/л. Цей компонентний склад живильного середовища ЖС<sub>II</sub> є перспективним при виготовленні нафтоокиснювального поверхнево-активного біопрепарату, призначеного для ремедіації ґрунту. За сумісної присутності досліджуваних штамів мікроорганізмів ступінь деструкції нафти сягає 90% в жорстких умовах навколишнього середовища: при очищенні засолених ділянок ґрунту о. Зміїний з хронічним нафтовим забрудненням.

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

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина;  
тел.: +38(068) 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

## **ОКИСЛЕНИЕ УГЛЕВОДОРОДОВ НЕФТИ И ПРОДУКЦИЯ БИО-ПАВ ШТАММАМИ *P. FLUORESCENS* ONU541 И *B. MEGATERIUM* ONU542**

### **Реферат**

**Цель.** Обнаружение особенностей окисления нефти и продукции био-ПАВ ґрунтовыми штаммами микроорганизмов рода *Pseudomonas fluorescens* ONU541, *Bacillus megaterium* ONU542. **Методы.** Видовую принадлежность исследуемых микроорганизмов определяли по спектрам жирных кислот их клеточных липидов. Остаточное содержание углеводородов нефти определяли методом ИК-спектрометрии на "ИКС-29" в диапазоне 2700–3200 см<sup>-1</sup>. О продукции микроорганизмами биосурфактантов судили по снижению величины поверхностного натяжения жидких культур бактерий и их супернатантов и по эмульгирующей способности (по индексу эмульгирования – E24, %). **Результаты.** Показана зависимость между нефтеструктивной способностью исследуемых штаммов бактерий и их способностью продуцировать биосурфактанты. Штамм *P. fluorescens* ONU541 в большей степени по сравнению со штаммом *B. megaterium* ONU542 окисляет нефть (на 74,6%) и продуцирует поверхностно-активные метаболиты. Исследуемые штаммы *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542 способны продуцировать биосурфактанты при условии их культивирования в течение пяти суток в питательной среде (ПС) состава (г/л):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,5;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 3;  $\text{NaCl}$  – 5;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – 1; глюкоза – 2 (рН 7,0–7,2). **Вывод.** Установлены нефтеструктивная активность и способность продуцировать биосурфактанты ґрунтовых штаммов *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542. Доказано, что при совместном присутствии исследуемых штаммов микроорганизмов степень деструкции нефти достигает 90% в жестких условиях окружающей среды: при очистке засоленных участков ґрунта острова Зміїний с хроническим нефтяным загрязнением.

**Ключевые слова:** *Pseudomonas fluorescens* ONU541, *Bacillus megaterium* ONU542, деструкторы нефти, продуценты поверхностно-активных веществ.





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

Odesa National I.I. Mechnykov University,  
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine;  
tel.: +38(068) 259 33 08, e-mail: tgudzenko@ukr.net

## **OIL OXIDIZATION AND BIO-SAFACTANTS PRODUCTION BY STRAINS OF *P. FLUORESCENS* ONU541 AND *B. MEGATERIUM* ONU542**

### **Summary**

**Aim.** Detection of the peculiarities of oil oxidation and bio-surfactant production by soil strains of microorganisms of the genus *Pseudomonas fluorescens* ONU541, *Bacillus megaterium* ONU542. **Methods.** Species belonging to the investigated microorganisms were determined from the spectra of fatty acids of their cellular lipids. The residual content of petroleum hydrocarbons was determined by IR-spectrometry on "IKS-29" in the range of 2700–3200 cm<sup>-1</sup>. The products of microorganisms of biosurfactants were determined by the decrease in the surface tension of liquid cultures of bacteria and their supernatants and by their emulsifying ability (by the emulsification index – E24,%). **Results.** The dependence between the oil destructive ability of the strains of bacteria studied and their ability to produce biosurfactants is shown. The *P. fluorescens* ONU541 strain is more than the *B. megaterium* strain ONU542 oxidizes oil (by 74.6%) and produces surface-active metabolites. The studied strains of *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542 are able to produce biosurfactants provided they are cultivated for five days in a nutrient medium (NM) of composition (g/l): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>–1.5; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>–3; NaCl–5; NH<sub>4</sub>Cl–1; glucose–2 (pH 7.0–7.2). **Conclusion.** Oil destructive activity and the ability to produce biosurfactants of soil strains of *P. fluorescens* ONU541, *B. megaterium* ONU542 have been determined. It has been proved that in the joint presence of the investigated strains of microorganisms, the degree of destruction of oil reaches 90% under harsh environmental conditions: during cleaning of saline soil sections of the Zmeiny Island with chronic oil contamination.

*Key words:* *Pseudomonas fluorescens* ONU541, *Bacillus megaterium* ONU542, oil destructors, producers of surfactants

### **СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Іванисько О.В. Біосинтез поверхнево-активних речовин бактеріями роду *Bacillus* // Проблеми екологічної біотехнології. – 2013. – № 2. – С. 8–14.
2. Іваниця В.О., Горшкова О.Г., Коротаєва Н.В., Волювач О.В., Гудзенко Т.В., Остапчук А.М. Склад жирних кислот ліпідів штаму *Bacillus sp.* ОЗ-5, виділеного із забрудненого нафтою ґрунту о. Зміїний // Мікробіологія і біотехнологія. – 2015. – № 4 (32). – С. 28–35.
3. Кузьменко А.В. Біосинтез поверхнево-активних речовин представниками роду *Pseudomonas* // Проблеми екологічної біотехнології. – 2013. – № 1. – С. 17–32.
4. Мухліс Абедалабас, Галкін М.Б., Пахомова Є.Ю., Філіпова Т.О. Вплив екзогенних аутоіндукторів Quorum Sensing на синтез рамноліпідів *Pseudomonas Aeruginosa* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 4. – С. 38–45.



5. *Нгуен Виет Тиен*. Гетеротрофные бактерии техногенных субстратов как основа биопрепаратов-деструкторов нефтяных углеводородов и поверхностно-активных веществ: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. Ульяновск, 2013. – 174 с.
6. *Петриков К.В.* Биологические поверхностно-активные вещества, продуцируемые микроорганизмами-нефтедеструкторами родов *Pseudomonas* и *Rhodococcus*: Автореф. дис. ...канд. хим. наук. Москва, 2011. – 23 с.
7. *Пирог Т.П., Софилканич А.П., Покора К.А., Шевчук Т.А., Иутинская Г.А.* Синтез поверхностно-активных веществ *Rhodococcus Erythropolis* As-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 и *Nocardia vaccine* IMB B-7405 на промышленных отходах // *Мікробіол. журн.* – 2014. – Т. 76, № 2. – С. 17–23.
8. *Покинъброта Т.Я.* Технология получения и свойства рамнолипидных поверхностно-активных веществ бактерий рода *Pseudomonas*: Автореф. дис. ...канд. техн. наук. Киев, 2009 – 21 с.
9. *Смирнов В.В., Киприанова Е.А.* Бактерии рода *Pseudomonas*. – Киев: Наук. думка, 1990. – 264 с.
10. *Gudzenko T.V., Voliuvach O.V., Belyaeva T.O., Puzyreva I.V., Lisyutin G.V., Gorshkova O.G., Ivanytsia V.O.* Oil oxidative activity of some strains of bacteria of *Pseudomonas* genus // *Microbiology&Biotechnology*. – 2013. – № 4 (24). – P. 72–80.
11. *Kumar M., León V., Materano A., Sisto De, Ilzins O.A., Luis L.* Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2008. – 24, № 7. – P. 1047–1057.
12. *Perfumo A., Rancich I., Banat I.M.* Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – 672. – P. 135–145.
13. *Sheppard J.D., Mulligan C.C.N.* The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 1987. – 27 – P. 110–116.
14. *Willumsen P.A., Karlson U.* Screening of bacteria, isolated from contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers // *Biodegradation*. 1997. – 7. – P. 415–423.
15. *Патент RU № 2320715, МПК C12N 1/20, C12N 1/26, C12Q 1/02, C12Q1/04.* Способ отбора нефтеокисляющих бактерий-продуцентов биосурфактантов / Волченко Н.Н., Карасева Э.В., Самков А.А. (Российская Федерация). – № 2320715; заявл. 02.05.2006; опубл. 27.03.2008, Бюл. № ...
16. *Патент України на корисну модель № 102337. МПК C12N 1/02 (2006.1), C12R 1/38 (2006.1).* Склад поживного середовища для продукування поверхнево-активних речовин нафтоокиснювальними мікроорганізмами / Іваниця В.О., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Горшкова О.Г., Беляєва Т.О., Коноп І.П. (Україна). – № 102337; 2015р. заявл. ... ; опубл. 26.10.2015, Бюл. № 20.

## References

1. *Ivanysko OV.* Biosynthesis of surfactants bacteria of the genus *Bacillus*. *Problems of environmental biotechnology*. 2013;(2):8–14.



2. Ivanytsia VO, Gorshkova OG, Korotaeva NV, Voliuvach OV, Gudzenko TV, Ostapchuk AM. Fatty acid composition of lipids of strain *Bacillus* sp. O3-5 isolated from oil-contaminated soil of the Zmiiny island. *Microbiology and biotechnology*. 2015;(4):28–35.

3. Kuzmenko AV. Biosynthesis of surfactants representatives of the genus *Pseudomonas*. *Problems of environmental biotechnology*. 2013;(1):17–32.

4. Muhlis Abedalabas, Galkin MB, Pakhomov EY, Filipova T. Effect of exogenous autoinduktoriv Quorum Sensing synthesis ramnolipidiv *Pseudomonas Aeruginosa*. *Microbiology and biotechnology*. 2013;(4):38–45.

5. Nguyen Viet Tien. Heterotrophic bacteria technogenic substrates as a base of biopreparation-destroyer of oil hydrocarbons and surfactants. PhD thesis, Ulyanovsk, 2013: 174.

6. Petrikov LV. Biological surfactants produced by microorganisms, oil destructors of the genus *Pseudomonas* and *Rhodococcus*. PhD thesis, Moscow, 2011: 23.

7. Pirog TP, Sofilkanich AP, Pokora KA, Shevchuk TA, Iutinskaya GA. Synthesis of surfactants by *Rhodococcus Erythropolis* As-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 and *Nocardia vaccine* IMV B-7405 on industrial waste. *Microbiol. J.* 2014;76(2):17–23.

8. Pokinbroda TY. Technology and properties ramnolipidnyh surfactants bacteria of the genus *Pseudomonas*. PhD thesis, Kiev, 2009: 21.

9. Cmirnov VV, Kiprianova EA. Bakterii roda *Pseudomonas*. – Kiev: Nauk. dumka, 1990. 264.

10. Gudzenko TV, Voliuvach OV, Belyaeva TO, Puzyreva IV, Lisyutin GV, Gorshkova OG, Ivanytsia VO. Oil oxidative activity of some strains of bacteria of *Pseudomonas* genus. *Microbiology and biotechnology*. 2013;4 (24):72–80.

11. Kumar M, León V, Materano A, Sisto De, Ilzins OA, Luis L. Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008; 24(7):1047–1057.

12. Perfumo A, Rancich I, Banat IM. Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010;(672):135–145.

13. Sheppard JD, Mulligan CCN. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1987;(2):110–116.

14. Willumsen PA, Karlson U. Screening of bacteria, isolated from contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*. 1997;(7):415–423.

15. Patent RU № 2320715/2006, MBI C12N 1/20, C12N1/26, C12Q 1/02, C12Q1 / 04. The method of selection of oil-oxidizing bacteria producing biosurfactants. Volchenko NN, Karasev EV, Samkov AA. (Russian Federation). - N 2320715; zayavl. 02.05.2006; opubl. 27.03.2008, Byul. N 7.

16. Patent of Ukraine N 102337/2015, MBI C12N 1/02, C12R 1/38. The composition of the nutrient medium for production of surfactants by oil-oxidizing microorganisms. Ivanytsia VO, Gudzenko TV, Voliuvach OV, Gorshkova OG, Belyaeva TO, Konup IP. (UA). - N 102337; zayavl. 15.08.2014; opubl. 26.10.2015, Byul. N 20.

Стаття надійшла до редакції 19.04.2016 р.

