

БІОТЕХНОЛОГІЯ

УДК 579.695

О. Г. ГОРШКОВА, Т. В. ГУДЗЕНКО, О. В. ВОЛЮВАЧ, І. П. КОНУП, Т. О. БЄЛЯЄВА,
М. О. ЧЕРНИШОВА

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082

ДЕСТРУКТИВНА ТА МЕТАЛ-АКУМУЛЮЮЧА ЗДАТНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ *PSEUDOMONAS*

Встановлено високу здатність непатогенних штамів бактерій *Pseudomonas cepacia* ONU-327 і *Pseudomonas fluorescens* ONU-328 до деструкції важкоокиснювальних циклічних ароматичних ксенобіотиків: фенолу, вуглеводнів нафти, N-цетилпіридинію бромистого, та сорбційно-акумулюючу здатність щодо Pb (II), Zn(II), Cr(VI). Виявлено помітний синергетичний ефект у процесі біодеструкції фенолу, вуглеводнів нафти і детоксикації води від Cr(VI) за її обробки асоціацією штамів *P. cepacia* ONU-327 і *P. fluorescens* ONU-328.

Ключові слова: *Pseudomonas cepacia* ONU-327, *Pseudomonas fluorescens* ONU-328, деструктори циклічних ароматичних ксенобіотиків, сорбенти іонів важких металів

Вступ. У більшості країн світу із відомих методів очистки води від токсичних поллютантів різної природи перевагу віддають мікробіологічним методам. Вони порівняно з фізико-хімічними методами екобезпечні, енергонезалежні, ефективні, не викликають вторинного забруднення. Актуальним залишається пошук нових біохімічно-активних непатогенних мікроорганізмів з поліфункціональною біотехнологічною здатністю: деструктивною щодо важкоокиснювальних циклічних ароматичних ксенобіотиків і сорбційно-акумулюючою щодо іонів важких металів (ІВМ).

Мета дослідження – запропонувати для використання в біотехнології очистки багатокомпонентних за складом стічних вод біохімічно-активні штами мікроорганізмів, що володіють поліфункціональною здатністю: деструктивною щодо важкоокиснювальних циклічних ароматичних ксенобіотиків (фенольних сполук, «біологічно жорстких» синтетичних поверхнево-активних речовин (ПАР) катіонного типу, вуглеводнів нафти) і сорбційно-акумулюючою щодо ІВМ.

Матеріал і методи досліджень

Як об'єкти дослідження використовували два біохімічно-активних штами мікроорганізмів, що за жирнокислотним складом ідентифіковані як *Pseudomonas cepacia* ONU-327 (виділений із ґрунту) і *Pseudomonas fluorescens* ONU-328 (виділений із морського середовища). Ці непатогенні штами зберігаються в колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова. Оцінку деструктивної та метал-акумулюючої здатності штамів та їх асоціації здійснювали за ступенем очистки водних розчинів від поллютантів: $\alpha = [(C_0 - C) / C_0] \times 100\%$, де C_0 і C – концентрації конкретного поллютанта до та після обробки. Для визначення концентрації фенолу у контрольних і дослідних пробах використовували фотометричний метод із використанням 4-аміноантипірину за присутності гексаціаноферату (III) при $pH = 10,0 \pm 0,2$ [3]; концентрацію «біологічно жорсткої» поверхнево-

активної речовини катіонного типу N-цетилпіридинію бромистого визначали екстракційно-колориметричним методом використанням метилоранжу [1]; вміст високотоксичних ароматичних вуглеводнів нафти і її аліфатичної фракції – методом інфрачервоної спектrometerії (аналітичні сигнали реєстрували FTIR-спектрометром Frontier фірми PerkinElmer у діапазоні хвильових чисел 3200-2700 cm^{-1}); концентрацію іонів важких металів (ІВМ: свинець, цинк, хром) – методом електротермічної ААС з використанням приладу «Сатурн-2» у полум'ї суміші «повітря-пропан-бутан» при відповідних довжинах хвиль. Результати оброблені за допомогою редактора MS Excel 2003.

Результати досліджень та їх обговорення

Експериментально підтверджено високу ефективність способу мікробіологічної очистки води від фенолу, який полягає в тому, що води, у складі яких присутній фенол, очищують реагентом, який відрізняється від [4] тим, що в якості реагенту використовують бактеріальну асоціацію штамів *P. seracia* ONU-327 і *P. fluorescens* ONU-328 (1:1 за об'ємом), що культивують протягом доби за температури +30 °С на МПА, далі бактеріальні клітини суспендують у мінеральне середовище М-9, що містить до 300 мг/л фенолу, і витримують протягом 10 діб (рис. 1). Раніше нами було встановлено, що при введенні до забрудненої води штаму *P. seracia* ONU-327 у кількості $7,5 \times 10^5$ КУО/мл ступінь очистки води від фенолу на 10 добу досягав ~ 45 % [2]. Використання штаму *P. fluorescens* ONU-328 підвищувало ефективність дефенолізації води до 78 % на 10 добу (рис. 1).

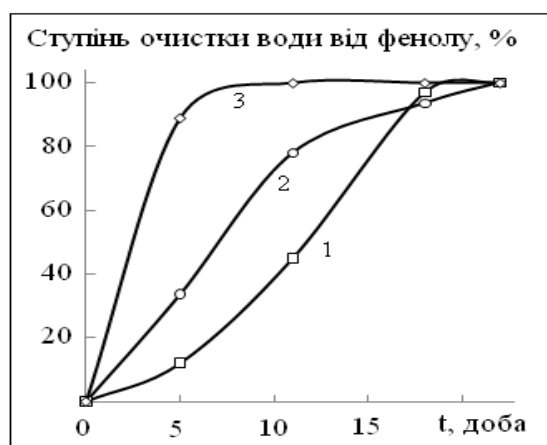


Рис. 1. Ступінь очистки води від фенолу (%) від часу (t, доба) за дії штамів *P. seracia* ONU-327 (1); *P. fluorescens* ONU-328 (2); їх асоціації 1:1 за об'ємом (3). Примітки: вихідна концентрація фенолу – 300 мг/л; концентрація бактеріальних клітин – $7,5 \times 10^5$ КУО/мл

Вперше встановлено, що використання бактеріальної асоціації штамів *P. seracia* ONU-327 і *P. fluorescens* ONU-328 (1:1 за об'ємом) за такий самий термін (10 діб) сприяє глибокій очистці води від фенолу – на 100%. Запропонований спосіб, порівняно з [4], дозволяє у 2,2 раза пришвидшити процес дефенолізації води.

Встановлено здатність штамів *P. seracia* ONU-327 і *P. fluorescens* ONU-328 до деструкції інших важкоокиснювальних ксенобіотиків – вуглеводнів нафти і «біологічно жорсткого» N-цетилпіридинію бромистого та виявлено синергетичну нафто- і ПАР-деструктивну здатність асоціації цих штамів в об'ємному співвідношенні 1:1 (рис. 2, рис. 3). Ступінь біодеструкції вуглеводнів нафти за дії використаних штамів, що культивували 48 год за температури +28±2 °С у збагаченому пептоном (10 г/л) і дріжджовим екстрактом (5 г/л) живильному середовищі М-9, протягом 10 діб експозиції досягав 62–73 % та був максимальним (82 %) за дії асоціації штамів. У присутності окремих штамів зі збільшенням терміну експозиції до 20 діб концентрація вуглеводнів нафти зменшувалася у 2,6–3,7 раза, а на тридцять добу – у 5 разів. За весь термін експозиції концентрація вуглеводнів нафти за дії асоціації штамів *P. seracia* ONU-327 і *P. fluorescens* ONU-328 зменшилась у 10-11 разів порівняно з вихідною концентрацією – 500 мг/л (рис. 2).

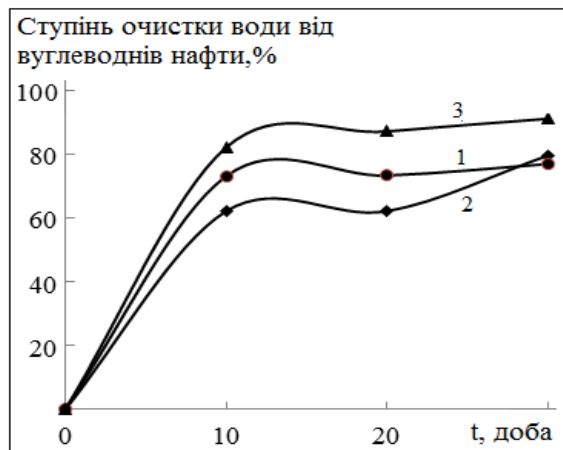


Рис. 2. Ступінь очищення води від вуглеводнів нафти (%) від часу (t, доба) за дії штамів *P. cepacia* ONU-327 (1), *P. fluorescens* ONU-328 (2) та їх асоціації (3).
Примітки: вихідна концентрація вуглеводнів нафти – 500 мг/л; концентрація бактеріальних клітин – 10^8 КУО/мл

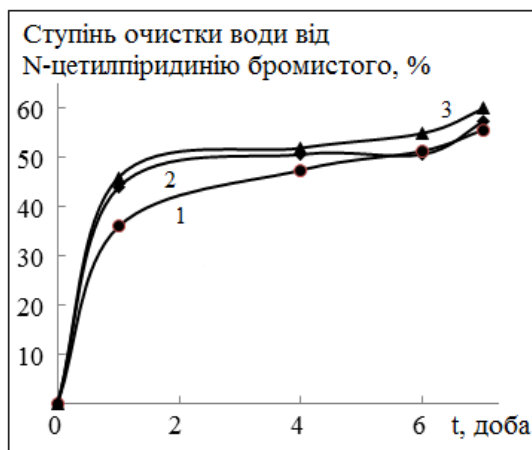


Рис. 3. Ступінь очищення води від N-ЦПБ (%) від часу (t, доба) за дії штамів *P. cepacia* ONU-327 (1), *P. fluorescens* ONU-328 (2) та їх асоціації (3). Примітки: вихідна концентрація N-ЦПБ – 20 мг/л; концентрація бактеріальних клітин – $(10 \times 10^4 - 5,0 \times 10^4)$ КУО/мл

Менш помітний синергізм деструктивних властивостей асоціації досліджуваних штамів спостерігався в процесі деструкції цетилпіридинію бромистого (N-ЦПБ): ступінь очищення води від N-ЦПБ на 7 добу складав 60 % (від його вихідної концентрації – 20 мг/л) при одноразовому введенні штамів *P. cepacia* ONU-327 і *P. fluorescens* ONU-328 (рис. 3). При додатковому введенні свіжих порцій асоціації непатогенних штамів *P. cepacia* ONU-327 і *P. fluorescens* ONU-328 або використанні більш високої стартової дози штамів-деструкторів ефективність очищення води від N-ЦПБ збільшується до 98 %, що відповідає нормі скидання обробленої води у каналізацію.

Обидва досліджувані штами бактерій роду *Pseudomonas* проявляли резистентність відносно високотоксичних іонів Pb(II), Zn(II), Cr(VI) та володіли особливо високою сорбційно-акумулюючою здатністю щодо IBM у катіонній формі. При детоксикації іонів Pb(II) і Zn(II) з їх вихідною концентрацією у модельних розчинах 60 мг/л і 20 мг/л ступінь очищення води вільними клітинами бактерій *P. cepacia* ONU-327 сягав 99,6 % і 84 %, відповідно; вільними клітинами бактерій *P. fluorescens* ONU-328 – 93,2 % і 53,5 %, відповідно. Процес очищення води від IBM підвищувався при використанні іммобілізованих у складі біофлокул клітин бактерій *P. cepacia* ONU-327, *P. fluorescens* ONU-328 та їх асоціації (1:1 за об'ємом), і це підвищення було особливо помітним для Cr(VI) – з 42,4 % (із використанням вільних бактеріальних клітин) до 93,0–99,9 % (із використанням іммобілізованих у складі біофлокул бактеріальних клітин) при вихідній «пороговій» концентрації Cr(VI) у водних розчинах 70 мг/л. При складанні нового біопрепарату на основі асоціації штамів *P. cepacia* ONU-327, *P. fluorescens* ONU-328 встановлено її синергетичну детоксикуючу дію щодо Cr(VI). Використання іммобілізованих у складі біофлокул (за присутністю перекису водню і хлориду кальцію) бактеріальних клітин *P. cepacia* ONU-327, *P. fluorescens* ONU-328 сприяло також пришвидшенню процесу очищення води у 6–8 разів для кожного із IBM, час обробки зменшувався з 90–120 хв до 20 хв.

Висновки

Встановлено здатність непатогенних штамів бактерій *P. cepacia* ONU-327, *P. fluorescens* ONU-328 до деструкції важкоокиснювальних циклічних ароматичних ксенобіотиків: фенолу,

вуглеводнів нафти, N-цетилпіридинію бромистого і сорбційно-акумулюючу здатність щодо іонів важких металів: Pb (II), Zn(II), Cr(VI). Виявлено помітний синергетичний ефект у процесі біодеструкції фенолу, вуглеводнів нафти і детоксикації води від Cr(VI) за її обробки асоціацією штамів *P. cepacia* ONU-327 і *P. fluorescens* ONU-328 (1:1 за об'ємом). Притаманна штамам *P. cepacia* ONU-327, *P. fluorescens* ONU-328 поліфункціональність біотехнологічних властивостей дозволяє рекомендувати їх до широкого використання в біотехнології очистки багатокомпонентних за складом стічних вод, що містять ІВМ, важкоокиснювальні циклічні ароматичні ксенобіотики.

1. *Абрамзон А.А.* Поверхностно-активные вещества / Абрамзон А.А., Зайченко Л.П., Файнгольд С.И. – Л.: Химия, 1988. — 200 с.
2. *Горшкова О.Г.* Біотехнологічні властивості штаму *Pseudomonas cepacia* ONU-327 — деструктора фенольних і важкоокиснювальних сполук / Горшкова О.Г., Гудзенко Т.В., Волювач О.В. // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія», 2017. — № 3 (70). — С. 60—64.
3. *Лурье Ю.Ю.* Аналитическая химия промышленных сточных вод / Лурье Ю.Ю. — М.: Химия, 1984. — 448 с.
4. *Пат.* 114829 Україна. С02F 1/24. Мікробіологічний спосіб очистки води від фенолу / Іваниця В.О., Горшкова О.Г., Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Конуп І.П., Беляєва Т.О.; заявл. 25.07.2016; опубл. 27.03.2017. Бюл. № 6.

Е. Г. Горшкова, Т. В. Гудзенко, О. В. Волювач, И. П. Конуп, Т. А. Беляева, М. А. Чернышова
Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова

ДЕСТРУКТИВНАЯ И МЕТАЛЛ-АККУМУЛИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ НЕПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

Установлена высокая способность непатогенных штаммов бактерий *Pseudomonas cepacia* ONU-327 и *Pseudomonas fluorescens* ONU-328 к деструкции трудноокисляемых циклических ароматических ксенобиотиков: фенола, углеводородов нефти, N-цетилпиридиния бромистого и сорбционно-аккумулирующую способность по отношению к Pb (II), Zn (II), Cr (VI). Обнаружен существенный синергетический эффект в процессе биодеструкции фенола, углеводородов нефти и детоксикации воды от Cr (VI) при обработке воды ассоциацией штаммов *Pseudomonas cepacia* ONU-327 и *Pseudomonas fluorescens* ONU-328.

Ключевые слова: *Pseudomonas cepacia* ONU-327, *Pseudomonas fluorescens* ONU-328, деструкторы циклических ароматических ксенобиотиков, сорбенты ионов тяжелых металлов

O. G. Gorshkova, T. V. Gudzenko, O. V. Voliuvach, I. P. Konup, T. O. Belyaeva, M. O. Chernyshova
I. I. Mechnikov Odessa National University, Odessa, Ukraine

DESTRUCTIVE AND METAL-ACCUMULATING ABILITY OF NON-PATHOGENIC BACTERIA OF THE GENUS *PSEUDOMONAS*

The high ability of non-pathogenic strains of bacteria *Pseudomonas cepacia* ONU-327 and *Pseudomonas fluorescens* ONU-328 to the destruction of difficultly oxidized cyclic aromatic xenobiotics: phenol, petroleum hydrocarbons, N-cetylpyridinium bromide and sorption-accumulating ability against Pb(II), Zn(II), Cr(VI), which was assessed by the degree of water purification from pollutants. When water was introduced into the contaminated water of strain *P. cepacia* ONU-327 in the amount of 7.5×10^5 CFU/ ml, the degree of water purification from phenol on day 10 reached ~ 45%, and under the action of strain *P. fluorescens* ONU-328, the water dephenolization efficiency was up to 78%. It was first established that the use of bacterial association of strains *P. cepacia* ONU-327 and *P. fluorescens* ONU-328 (1: 1 by volume) for the same period (10 days) promotes deep purification of water from phenol - by 100%. A synergistic oil- and surfactant-destructive ability of association of these strains of bacteria has been discovered. The degree of biodegradation of petroleum hydrocarbons by individual strains of *P. cepacia* ONU-327 and *P. fluorescens* ONU-328

reached 62.0-73.0% for 10 days and was maximum (82%) when using association strains. In the process of biodegradation of oil hydrocarbons by the association of strains of *P. cepacia* ONU-327 and *P. fluorescens* ONU-328 (1: 1 by volume), the concentration of oil hydrocarbons over the entire exposure time (30 days) decreased by 10-11 times compared to the initial concentration - 500 mg/l. Less noticeable synergism of the destructive properties of the association of the studied strains of microorganisms was observed during the destruction of the "biologically rigid" surfactant of the cationic type, N-cetylpyridinium bromide. The degree of purification of water from N-cetylpyridinium bromide on day 7 was 60% (from its initial concentration of 20 mg/l) with a single injection of strains *P. cepacia* ONU-327 and *P. fluorescens* ONU-328 in an amount (10.0×10^4 - 5.0×10^4) CFU/ml. Both strains of bacteria of the genus *Pseudomonas* showed resistance against highly toxic ions Pb(II), Zn(II), Cr(VI). In the detoxification of Pb(II) and Zn(II) ions with their initial concentration in solutions of 60 mg/l and 20 mg/l, the degree of water purification by free cells of bacteria *P. cepacia* ONU-327 reached 99.6% and 84.0% respectively; free cells of bacteria *P. fluorescens* ONU-328 - 93.2% and 53.5%, respectively. The efficiency of the process of water purification from heavy metal ions was increased by using immobilized cells of *P. cepacia* ONU-327, *P. fluorescens* ONU-328 and their associations (1: 1 by volume) in the bioflocula. This increase was especially noticeable for Cr(VI), from 42.4% (using free bacterial cells) to 93.0-99.9% (using bacterial cells immobilized in the biofloculum) at the initial "threshold" concentration of Cr(VI) in aqueous solutions 70 mg/l. The polyfunctionality of biotechnological properties inherent in the strains of *P. cepacia* ONU-327, *P. fluorescens* ONU-328 makes it possible to recommend them for widespread use in biotechnology of purification of multi-component wastewater containing ions of heavy metals, difficult to oxidize cyclic aromatic xenobiotics.

Key words: *Pseudomonas cepacia* ONU-327, *Pseudomonas fluorescens* ONU-328, destructors of cyclic aromatic xenobiotics, sorbents of heavy metal ions

Рекомендує до друку
Н. М. Дробик

Надійшла 24.01.2018

УДК 579.84:631.427.2:631.461:632:35:633/635

В. П. ПАТИКА

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143

МІКРОБІОМ РОСЛИН У БІОКОНТРОЛІ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ

Наведено результати дослідження кількісного та якісного складу мікробних угруповань ризосфери пшениці, сої, козлятника, люпину, ріпаку, перцю пряного. Дослідження амоніфікуючої та нітрифікуючої здатності ґрунту при вирощуванні досліджуваних рослин показали, що використання мінеральних добрив, а особливо біопрепаратів позитивно впливає на ці показники. Показано, що вирощування рослин без добрив порівняно з використанням мінеральних добрив і біопрепаратів сприяє збільшенню виділення CO₂ у 2 рази. Такі самі закономірності спостерігали і за визначення поглинання O₂. Дослідження безпосереднього впливу фільтратів культуральних рідин *Pseudomonas savastanoi* рв. *glycinea* (кутаста плямистість), *Xanthomonas axonopodis* рв. *glycines* (пустульний бактеріоз), *Pseudomonas syringae* рв. *tabaci* (дикий опік), – *Fusarium oxysporum* (фузаріозу), *Ascochyta sojaecola* Abramov