

Т.В. Гудзенко, Н.В. Коротаєва, О.В. Волювач,
Т.О. Беляєва, О.Г. Горшкова, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082,
Україна, e-mail: korotaeva.n@onu.edu.ua

СКЛАД ЖИРНИХ КИСЛОТ ЛІПІДІВ НАФТООКИСНЮВАЛЬНИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *PSEUDOMONAS*

Мета. Визначення складу жирних кислот ліпідів та ідентифікація штамів бактерій роду *Pseudomonas*, що окиснюють нафту та нафтопродукти, за їх жирно-кислотним складом. *Методи.* Аналіз жирних кислот штамів *Pseudomonas* sp. ONU328 і *Pseudomonas* sp. ONU329 проводили методом газової хроматографії з використанням системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock (MIDI, USA). *Результати.* Аналіз результатів хроматографічних досліджень показав, що домінантними в жирно-кислотному профілі штамів *Pseudomonas* sp. ONU328 і *Pseudomonas* sp. ONU329 були довголанцюгові ненасичені та насичені жирні кислоти, а також їх розгалужені структурні ізомери. В профілях обох штамів виявлено гексадеканову ($C_{16}:0$) та гексадеценіву ($C_{16}:1w7c/C_{16}:1w6c$) жирні кислоти. На сумарну частку коротколанцюгових насичених гідроксикислот у штамі *Pseudomonas* sp. ONU328 припадало 12,6%, а у штамі *Pseudomonas* sp. ONU329 до 7% від загальної суми площ піків на хроматограмах складали розгалужені ізомери коротколанцюгових насичених гідроксикислот. Вперше встановлено, що штами близькоспоріднених видів псевдомонад чітко розмежовуються за наявністю циклогептадеканової *Pseudomonas* sp. ONU328 та 13-метилтетрадеканової ($C_{15}:0$ iso) і 12-метилтетрадеканової ($C_{15}:0$ anteiso) жирних кислот *Pseudomonas* sp. ONU329. Ознакою цих штамів також слугує показник ненасиченості жирних кислот. *Висновок.* За складом жирних кислот досліджувані штами *Pseudomonas* sp. ONU329 та *Pseudomonas* sp. ONU328 ідентифіковані, відповідно як *Pseudomonas maltophilia* ONU329 та *Pseudomonas fluorescens* ONU328. Відмічені особливості жирно-кислотного профілю досліджуваних мікроорганізмів систематизовані та можуть бути використані як допоміжний ключ для розмежовування бактерій цих видів.

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

Поширеним класичним методом ідентифікації мікроорганізмів є аналіз їх жирно-кислотного профілю в клітині. Жирні кислоти входять до складу фосфоліпідів, які є основними структурними складовими мембран. Часто їх якісний та кількісний склад є специфічною ознакою та використовується як хемотаксономічний маркер.

На сьогодні, при жирнокислотному аналізі широко застосовується система ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа.



Очевидними перевагами такої системи є наявність автоматичної ідентифікації досліджуваних мікроорганізмів з використанням бібліотек жирно-кислотних профілів. [6,7,10]. Такі дослідження можуть бути важливими не лише при вивченні нових та малодосліджених мікроорганізмів, а також бути необхідними для періодичної перевірки культур на чистоту у процесі виготовлення нафто-окиснювального біопрепарату для біоремедіації довкілля [12].

У попередніх дослідженнях показано, що два штами бактерій, виділені з морського середовища та попередньо ідентифіковані класичними методами за морфологічними, культуральними та фізіолого-біохімічними ознаками як *Pseudomonas sp. ONU328* і *Pseudomonas sp. ONU329*, за десять діб експозиції активно утилізують до 70% вуглеводнів сирої нафти з вихідною концентрацією 500 мг/дм³ [1], здатні до сорбції важких металів [4] та деструкції біорезистент-них органічних поверхнево-активних сполук [2].

Метою роботи було визначення складу жирних кислот клітинних ліпідів та ідентифікація штамів бактерій роду *Pseudomonas sp.*, що окиснюють нафту та нафтопродукти, за їх жирно-кислотним складом.

Матеріали і методи

Як об'єкти дослідження використовували два штами бактерій *Pseudomonas sp. ONU328* і *Pseudomonas sp. ONU329*, що зберігаються в колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Бактерії вирощували на середовищі Tryptic soy agar (Merck, Germany). Культивували при 28±1 °C впродовж 24 годин. Підготовку проб та хроматографічне розділення метилових ефірів жирних кислот здійснювали згідно стандартного протоколу. Одну повну петлю вологої біомаси поміщали в скляні віали для подальшого руйнування клітин та омилення ліпідів мікроорганізмів. Омилення проводили додаванням суміші метанолу та лугу, проби витримували впродовж 30 хв при температурі 95-100 °C. Метилювання жирних кислот проводили прогріванням реакційної суміші при 80 °C впродовж 10 хв після додавання розчину кислого метанолу. Екстраговані метилові ефіри жирних кислот нейтралізували 0,3 М розчином NaOH [9].

Хроматографічне розділення проводили на газовому хроматографі Agilent 7890 (Agilent Technologies, USA), колонка капілярна ULTRA 2 (25 м x 0,2 мм x 0,33 мкм), детектор полум'яно-іонізаційний. Пробу, об'ємом 2 мкл вводили в режимі split з коефіцієнтом 40:1, температура випаровувача 250 °C. Розділення проводили в режимі програмування температури - початкова температура 170 °C з наступним градієнтом 5 °C/хв до 270 °C. Вміст жирних кислот виражали у відсотках до загальної суми площ піків. Для ідентифікації досліджуваних штамів використовували бібліотеку RSTBA6 6.2.

Результати досліджень

Аналіз хроматограми, представленої нарис. 1, показав, що домінантними в жирнокислотному профілі досліджуваного штаму *Pseudomonas sp. ONU329*



були розгалужені ізомери насичених жирних кислот (42,0%), із яких 32,0% припадало на 13-метилтетрадеканову кислоту ($C_{15}:0$ iso). Частка 12-метилтетрадеканової кислоти ($C_{15}:0$ anteiso) від загальної площі піків складала 17,4%. Нерозгалужені насичені жирні кислоти склали 7,5%, що в 5,6 разів менше, ніж розгалужених ізомерів.

Частка жирних кислот з парною кількістю атомів вуглецю у вуглеводневому радикалі: тетрадеканової кислоти ($C_{14}:0$) та гексадеканової кислоти ($C_{16}:0$) склала відповідно 2,6% і 4,9%. Ізомерів гексадеценної кислоти виявлено 17,7%, з яких 13,5% припадає на 9-гексадеценну та 10-гексадеценну кислоти ($C_{16}:1$ w7c/ $C_{16}:1$ w6c) і 4,2% - на 15-метил-7-гексадеценну кислоту ($C_{17}:1$ iso w9c). Дещо в менших кількостях виявлені коротколанцюгові насичені гідроксикислоти $C_{12}:0$ 3ОН (2,8%) та розгалужені структурні ізомери насичених гідроксикислот $C_{11}:0$ iso 3ОН (1,7%), $C_{13}:0$ iso 3ОН (2,1%).

За жирнокислотним складом, який розшифровано з використанням бібліотечної бази даних RTSBA6 6.21 програми MIDI Sherlock, досліджуваний штам *Pseudomonas* sp. ONU329 ідентифіковано як *Pseudomonas maltophilia* з високим індексом схожості - 0,719 (табл. 1).

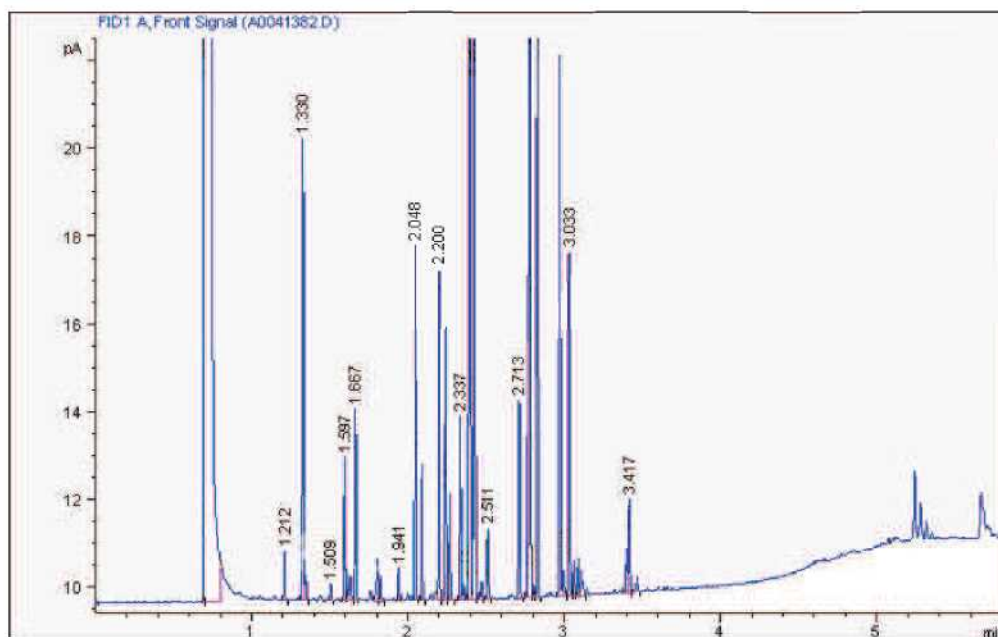


Рис. 1. Хроматограма жирних кислот загальних ліпідів штаму *Pseudomonas* sp. ONU329

Fig. 1. Chromatogram of fatty acids total lipids of strain *Pseudomonas* sp. ONU329

Особливістю другого досліджуваного штаму *Pseudomonas* sp. ONU328 є наявність у його жирнокислотному профілі циклогептадеканової кислоти ($C_{17}:0$ cyclo) - 2,2% та відсутність міристинової кислоти ($C_{14}:0$). Виявлено додеканову кислоту ($C_{12}:0$) в кількості 4,1% від загальної суми площ піків (рис. 2).

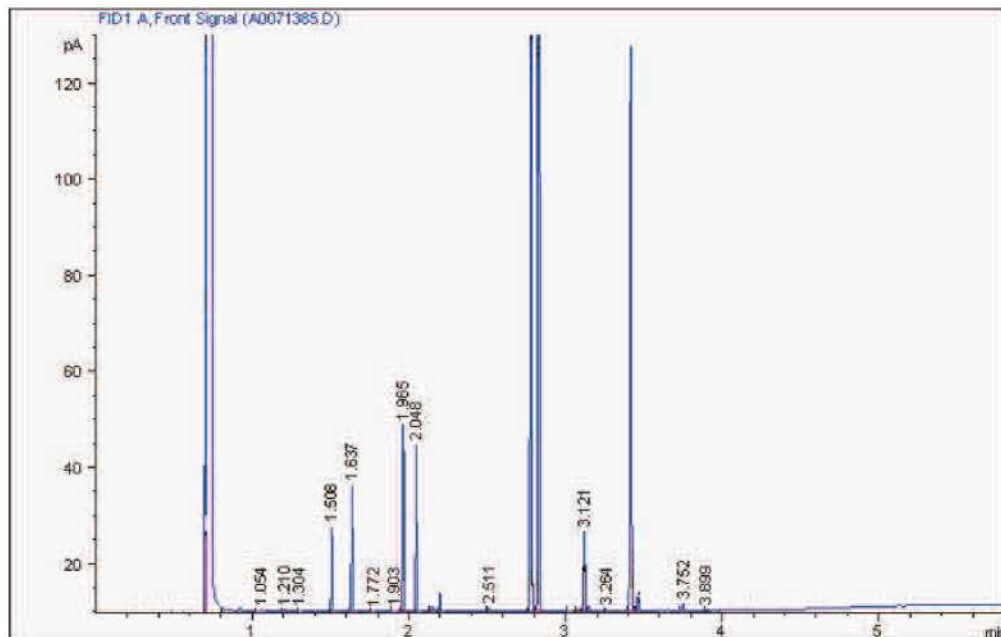


Рис. 2. Хроматограма жирних кислот загальних ліпідів штаму *Pseudomonas sp. ONU328*

Fig. 2. Chromatogram of fatty acids total lipids of strain *Pseudomonas sp. ONU328*

Частка пальмітинової кислоти ($C_{16}:0$) складала 4,9% для штаму *Pseudomonas sp. ONU329*, а для штаму *Pseudomonas sp. ONU328* - 28,0%, при загальному вмісті насичених жирних кислот з парним числом атомів вуглецю у вуглеводневому радикалі 7,5 і 32,0%, відповідно. В жирнокислотному профілі загальних ліпідів штаму *Pseudomonas sp. ONU328* порівняно зі штамом *Pseudomonas sp. ONU329* в 5,7 рази переважали довголанцюгові насичені, та не реєструвались розгалужені структурні ізомери насичених жирних кислот, на їх частку у складі штаму *Pseudomonas sp. ONU329* припадало близько 42,0%, з яких 32,0% - на 13-метилтетрадеканову кислоту ($C_{15}:0$ iso).

Встановлено більший вміст ізомерів гексадеценової жирної кислоти ($C_{16}:1$ w7c/ $C_{16}:1$ w6c), майже в 2,7 рази, в складі загальних ліпідів штаму *Pseudomonas sp. ONU328* (36,2%) порівняно зі штамом *Pseudomonas sp. ONU329*, та виявлено 11-октадеценову кислоту з ю ($C_{18}:1$ w7c) - 15,2%. При сумарному вмісті ненасичених жирних кислот - 51,4% у складі клітин штаму *Pseudomonas sp. ONU328* їх перебільшення щодо до насичених жирних кислот (32,0%) є більш помітним (табл. 1).

Порівняно з часткою насичених і ненасичених жирних кислот, як і в штамі *Pseudomonas sp. ONU329*, у малих кількостях виявлено коротколанцюгові насичені гідроксикислоти $C_{10}:0$ 3ОН (2,7%), $C_{12}:0$ 20Н (5,3%), $C_{12}:0$ 3ОН (4,6%) (табл. 2).



Таблиця 1

Основні жирні кислоти (%) *P. maltophilia* ONU329 та *P. fluorescens* ONU328

Table 1

The main fatty acids (%) of *P. maltophilia* ONU329 and *P. fluorescens* ONU328

Жирна кислота	<i>P. maltophilia</i> ONU329	<i>P. fluorescens</i> ONU328
C ₁₁ :0 iso	4,7	-
C ₁₂ :0	-	4,1
C ₁₄ :0	2,6	-
C ₁₅ :0 anteiso	17,4	-
C ₁₅ :0 iso	32,0	-
C ₁₆ :0	4,9	28,0
C ₁₆ :0 iso	1,5	-
C ₁₆ :1 w7c/ C ₁₆ :1 w6c	13,5	36,2
C ₁₆ :1 w9c	1,8	-
C ₁₇ :1 iso w9c	4,2	-
C ₁₇ :0 cyclo	-	2,2
C ₁₈ :1 w7c	0,4	15,2

Примітка: «-» – не виявлена

Note: «-» – not determined

Другий досліджуваний штам *Pseudomonas* sp. ONU328 ідентифіковано як *Pseudomonas fluorescens* з індексом схожості 0,780.

Таблиця 2

Гідроксикислоти (%) *P. maltophilia* ONU329 та *P. fluorescens* ONU328

Table 2

The hydroxy fatty acids (%) of *P. maltophilia* ONU329 and *P. fluorescens* ONU328

ОН-кислота	<i>P. maltophilia</i> ONU329	<i>P. fluorescens</i> ONU328
C ₁₀ :0 3ОН	-	2,7
C ₁₁ :0 iso3ОН	1,7	-
C ₁₂ :0 2ОН	-	5,3
C ₁₂ :0 iso3ОН	2,8	-
C ₁₂ :0 3ОН	-	4,6
C ₁₃ :0 2ОН	0,8	-
C ₁₃ :0 iso3ОН	2,1	-

Примітка: «-» – не виявлена

Note: «-» – not determined



З викладеного вище можна констатувати, що близькоспоріднені види чітко розмежовуються за характерними ознаками: наявністю в жирнокислотному складі загальних жирних кислот у *P. fluorescens* ONU328 циклогептадеканової кислоти, а у *P. maltophilia* ONU329 - 13-метилтетрадеканової кислоти ($C_{15}:0$ iso), 12-метилтетрадеканової кислоти ($C_{15}:0$ anteiso) та інших жирних кислот, що представлені в табл. 1. Іншим показником їх відмінності може слугувати показник ненасиченості ($K_{\text{ненасич}}$), що розраховується за співвідношенням загальних кількостей ненасичених і насичених жирних кислот, або за відсотками вміст пальмітинової ($C_{16}:0$) та пальмітолеїнової ($C_{16}:1$ w7c/ $C_{16}:1$ w6c) кислот. Так, для штаму *P. maltophilia* ONU329 показник ненасиченості з урахуванням насиченої розгалуженої жирної кислоти $C_{15}:0$ anteiso дорівнює 0,22 (15,4/71,1), а для штаму *P. fluorescens* ONU328 з урахуванням кислоти $C_{17}:0$ сусіо - 1,50 (51,4/34,3). Частка $C_{16}:0$ і $C_{16}:1$ w7c/ $C_{16}:1$ w6c при переході від штаму *P. maltophilia* ONU329 до штаму *P. fluorescens* ONU328 підвищується з 4,9 до 28,0% і від 13,5 до 36,2%.

У таблиці 3 наведено особливості жирнокислотного профілю досліджуваних мікроорганізмів, які можуть бути використані як допоміжний ключ для диференціації на видовому рівні (за результатами дослідження складу жирних кислот) бактерій роду *Pseudomonas*.

Таблиця 3

**Особливості складу жирних кислот досліджуваних штамів
P. maltophilia ONU329 та *P. fluorescens* ONU328**

Table 3

**Characteristics of fatty acid composition of the investigated strains
P. maltophilia ONU329 and *P. fluorescens* ONU328**

Штам	$K_{\text{ненасич}}$	Наявність ЖК			
		$C_{17}:0$ cyclo	$C_{15}:0$ anteiso та $C_{15}:0$ iso	$C_{17}:1$ iso w9c	$C_{12}:0$
<i>P. maltophilia</i> ONU329	0,22	-	+	+	-
<i>P. fluorescens</i> ONU328	1,50	+	-	-	+

Таким чином, при аналізі жирнокислотного складу з використанням системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock, досліджувані штами *Pseudomonas* sp. ONU329 та *Pseudomonas* sp. ONU328 ідентифіковані як *Pseudomonas maltophilia* ONU329 та *Pseudomonas fluorescens* ONU328, відповідно.



Т.В. Гудзенко, Н.В. Коротаєва, О.В. Волювач, Т.А. Беляева,
О.Г. Горшкова, В.А. Иваньця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
e-mail: korotaeva.n@onu.edu.ua

СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ЛИПИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*, ОКИСЛЯЮЩИХ НЕФТЕПРОДУКТЫ

Реферат

Цель. Определение состава жирных кислот клеточных липидов и идентификация штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, которые окисляют нефть и нефтепродукты. **Методы.** Жирно-кислотный анализ штаммов *Pseudomonas sp.* ONU328 и *Pseudomonas sp.* ONU329 проводили методом газовой хроматографии с использованием системы идентификации микроорганизмов MIDI Sherlock (MIDI, USA). **Результаты.** Анализ результатов хроматографических исследований показал, что доминантными в жирно-кислотном профиле штаммов *Pseudomonas sp.* ONU328 и *Pseudomonas sp.* ONU329 являлись длинноцепочечные ненасыщенные и насыщенные жирные кислоты, а также их разветвленные структурные изомеры. В профилях обоих штаммов были обнаружены гексадекановая ($C_{16}:0$) и гексадеценовая ($C_{16}:1\ w7c/C_{16}:1\ w6c$) жирные кислоты. На суммарную долю короткоцепочечных насыщенных гидроксикислот у штамма *Pseudomonas sp.* ONU328 приходилось 12,6%, а у штамма *Pseudomonas sp.* ONU329 до 7% от общей суммы площадей пиков на хроматограммах составляли разветвленные изомеры короткоцепочечных насыщенных гидроксикислот. Впервые установлено, что штаммы близкородственных видов псевдомонад четко разграничиваются по наличию циклогептадекановой у *Pseudomonas sp.* ONU328, а также 3-метилтетрадекановой ($C_{15}:0\ iso$) и 12-метилтетрадекановой ($C_{15}:0\ anteiso$) жирных кислот у *Pseudomonas sp.* Отличительным признаком этих штаммов является показатель ненасыщенноеTM жирных кислот. **Вывод.** По составу жирных кислот исследуемые штаммы *Pseudomonas sp.* ONU329 и *Pseudomonas sp.* ONU328 идентифицированы соответственно как *Pseudomonas maltophilia* ONU329 и *Pseudomonas fluorescens* ONU328. Отмеченные особенности жирно-кислотного профиля исследуемых микроорганизмов систематизированы и могут быть использованы в качестве вспомогательного ключа для разграничения бактерий этих видов.

Ключевые слова: состав жирных кислот, идентификация, *Pseudomonas*



FATTY ACID COMPOSITION OF LIPIDS OF BACTERIA OF THE GENUS *PSEUDOMONAS*, OXIDIZING PETROLEUM PRODUCTS

Summary

Aim. Determination of fatty acid composition of lipids and identification of strains of bacteria of the genus *Pseudomonas*, which oxidize crude oil and petroleum products. **Methods.** The fatty acid analysis of strains of *Pseudomonas* sp. ONU328 и *Pseudomonas* sp. ONU329 were carried out by gas chromatography using identification of microorganisms MIDI Sherlock (MIDI, USA). **Results.** The analysis of the results of gas chromatography showed that long-chain unsaturated and saturated fatty acids and branched structural isomers dominated in profile of fatty acid of the strains of *Pseudomonas* sp. ONU328 и *Pseudomonas* sp. ONU329. In the profiles of fatty acid of both strains there were detected hexadecanoic acid (C₁₆:0) and hexadecanoic acid (C₁₆:1 w7c/C₁₆:1 w6c). This short-chain saturated hydroxy acids of the strain of *Pseudomonas* sp. ONU328 accounted for 12.6%, and the branched structural isomers of short-chain saturated hydroxy acids of the strain of *Pseudomonas* sp. ONU329 - up to 7% of the total peak areas. For the first time there were established that the closely related species of *Pseudomonas* were distinguished by the presence of cycloheptadecanoic acid of *P. fluorescens* ONU328 and 13-methyltetradecane acid (C₁₅:0 iso), 12-methyltetradecane acid (C₁₅:0 anteiso) of *P. maltophilia* ONU329. A distinctive indicator of their separation is a measure of unsaturations. **Conclusion.** The fatty acid composition of the investigated strains of *Pseudomonas* sp. ONU328 и *Pseudomonas* sp. ONU329 identified as *Pseudomonas maltophilia* ONU329 and *Pseudomonas fluorescens* ONU328. The peculiarities of fatty acid profile of the studied microorganisms were systematized and can be used as an auxiliary key for differentiation at the species level (according to a study in cellular fatty acid composition of bacteria in these species).

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

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляєва Т. О., Пузирьова І.В., Лісютін Г.В., Горшкова О.Г., Іваниця В.О. Нафтоокиснювальна активність деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas* ІІ Мікробіологія і біотехнологія. - 2013. - № 4 (24). - С. 72-80.
2. Гудзенко Т.В., Волювач О.В., Беляєва Т. О., Горшкова О.Г., Пузирьова І.В., Іваниця В.О. Видалення броміду гексадецилпіридинію із водних розчинів з



СКЛАД ЖИРНИХ КИСЛОТ ЛІПІДІВ НАФТООКИСНЮВАЛЬНИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *EUDOMONAS*
бактеріями роду *Pseudomonas* за їх взаємодії з глинистим мінералом та хітоза- ном // Мікробіологія і біотехнологія. - 2014. - № 1 (25). - С. 72-78.

3. Жданов Р.И., Керн Д., Лоренц В., Ибрагимова М.Я. Жирнокислотный состав ДНК-связанных липидов *Pseudomonas aurantiaca* по данным масс- спектрометрии // Цитология. - 2014. - Т. 56, № 6. - С. 437—438.

4. Іваниця В.А., Бухтияров А.Е., Лисютин Г.В., Захарія А.Н., Гудзенко Т.В. Аккумуляция тяжелых металлов бактериями роц *Pseudomonas* II Мікробіологія і біотехнологія. - 2012. - № 4 (20). - С. 76-83.

5. Кейтс М. Техника липидологии. - М. : Мир, 1975. - 324 с.

6. Шмырина А. С. Жирнокислотный профиль и структурное моделирование ДНК-связанных липидов: Автореф. дис.... канд. биол. наук. М., 2005. - 21 с.

7. 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; doi: 10.3390/ molecules 19055570. - www.mdpi.com/journal/molecules.

8. Kunitsky C., Osterhout G., Sasser M. Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the MIDI Sherlock microbial identification system. In Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods; Miller M.I., Ed.; Davis Healthcare International Publishing, LLC: Baltimore, MD, USA. - 2005. - Vol. III.-P. 1-17.

9. MIS Operating Manual, www.midi-inc.com, September 2012.

10. Mukund Chandra Thakur, Arif Khan, Hiren Doshi. Isolation and Screening of Dye Degrading Microorganisms from the Effluents of Dye and Textile Industries at Surat // American Journal of Environmental Engineering. - 2012. - № 2 (6). - P. 152-159. doi: 10.5923/j.ajee.20120206.02 e-ISSN: 2166-465X.

11. Piotrowska-Seget Z., Mroziak A. Signature Lipid Biomarker (SLB) Analysis in Determining Changes in Community Structure of Soil Microorganisms // Polish Journal of Environmental Studies. - 2003. - Vol. 12, № 6. - P. 669-675.

12. Патент України № 95859 А. Біопрепарат для сорбції і деструкції вуглеводнів і спосіб очищення води та /або ґрунту від забруднень нафтою та нафтопродуктами / Іваниця В.О., Гудзенко Т.В., Беляева Т.О., Бобрешова Н.С., Кожанова Г.А., Кривицька Т.М., Конуп І.П., Баранов О.О. / Опубл. 12.09.2011. Бюл. № 17.

Стаття надійшла до редакції 08.08.2014 р.

