

А/р  
1224

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова

(повне найменування вищого навчального закладу)

Біологічний факультет

(повне найменування інституту/факультету)

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

(повна назва кафедри)

**Дипломна робота**


**спеціаліст**

(ступень вищої освіти)

на тему: «**Біологічні властивості бактерій роду *Pseudomonas*, що використовуються у технологіях очищення води та ґрунту від нафтопродуктів**»


«**Biological properties of bacteria of the genus *Pseudomonas* used in technologies for cleaning water and soil from oil products**»


Виконала: студентка денної форми навчання  
спеціальність 7.04010202 Мікробіологія  
Піддубна Світлана Олексіївна

Керівник к.б.н., доцент Гудзенко Т.В.   
Рецензент к.б.н., доцент Сьомік Л.І.

Рекомендовано до захисту:  
Протокол засідання кафедри  
№ 11 від 21.04 2016 р.

Захищено на засіданні ЕК <sup>1</sup>  
протокол № 16 від 31.05 2016 р.  
Оцінка вирн. 1 А 1 91  
(за національною шкалою, шкалою  
ECTS, бали)

Завідувач кафедри  
  
(підпис) Філіпова Т.О.

Голова ЕК  
  
(підпис) Філіпова Т.О.

Одеса – 2016

779422

## АНОТАЦІЯ

Проведено комплексне дослідження біологічних властивостей бактерій роду *Pseudomonas*, що використовуються у природоохоронних технологіях. Для створення нового препарату, призначеного для комплексного очищення водного середовища, були відібрані біохімічно-активні штами бактерій-деструкторів вуглеводнів нафти *Pseudomonas fluorescens* ONU328, *Pseudomonas cepacia* ONU327 та *Pseudomonas maltophilia* ONU329-антагоністи широкого спектру дії - пригнічували ріст санітарно-показових умовно-патогених грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів.

Роботу викладено на 53 сторінках, вона містить 6 таблиць та 5 рисунків. Наведено посилання на 51 джерело літератури (34 кирилицею та 17 латиницею).

**Ключові слова:** біологічні властивості, колекційні штами, бактерій-деструктори вуглеводнів нафти роду *Pseudomonas*, антагоністична активність, біотехнологія

Conducted a comprehensive study of the biological properties of bacteria of the genus *Pseudomonas* used in the environmental technologies. To create a new product designed for comprehensive cleansing of the water environment, were selected biochemically active bacterial strains-degraders of oil hydrocarbons ONU328 *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas maltophilia* ONU327 ONU329 - antagonists broad-spectrum - inhibited the growth of sanitary-indicative conditional pathogenic gram-positive and gram-negative microorganisms.

Diploma thesis is expounded on 53 pages, it contains 6 tables and 5 figures. It provides links to 51 references (34 cyrillic and 17 latinic).

**Key words:** biological properties of rare strains, bacteria-destructors of oil hydrocarbons in *Pseudomonas*, antagonistic activity, biotechnology

## ЗМІСТ

	стор.
ВСТУП.....	4
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1. Біотехнології очищення навколишнього середовища від вуглеводнів нафти.....	6
1.1.1. Видовий склад бактерій, що використовують у біотехнологіях очищення навколишнього середовища від вуглеводнів нафти.....	7
1.1.2. Систематичне положення і біологічні властивості бактерій роду <i>Pseudomonas</i> .....	8
1.2. Біодеградація вуглеводнів нафти бактеріями роду <i>Pseudomonas</i> ...	18
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	23
2.1. Визначення біологічних властивостей бактерій–деструкторів вуглеводнів нафти.....	23
2.2. Методика визначення деструктивної активності бактерій.....	26
2.3. Методика визначення антагоністичної активності бактерій–деструкторів.....	29
2.4. Методи статистичної обробки результатів досліджень.....	29
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	31
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	45
ВИСНОВКИ.....	47
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	48
ДОДАТОК А. Охорона праці та безпека у надзвичайних ситуаціях.....	54

## ВСТУП

Проблема боротьби із забрудненням природного середовища нафтою і нафтопродуктами на сучасному етапі розвитку технічного прогресу має важливе соціальне і економічне значення. Нафта і нафтопродукти є могутнім, постійно діючим екологічним чинником, що негативно впливає на водні екосистеми. Нафта належить до найбільш поширених і небезпечних речовин, що забруднюють морські і прісні води. Вона шкідливо впливає на багато живих організмів і на всі ланки трофічного ланцюга. Нафта шкідливо впливає на біохімічні, фізіологічні, генетичні процеси в організмі біологічних об'єктів [3, 7]. Потрапляючи у водне середовище, нафта і нафтопродукти призводять до локального і глобального забруднення, порушують хід біологічних процесів, руйнують природні біоценози [11, 16].

Мікробне руйнування нафтових забруднень - один з найважливіших процесів, що сприяє їх елімінації з екосистем. Здатність розкласти або хімічно перетворювати молекули вуглеводнів властива численним мікроорганізмам, які широко поширені в природі. Тому перспективними для очищення ґрунту і води є мікробіологічні методи [7].

Відомо широкий спектр гетеротрофних мікроорганізмів, наприклад, представники родів *Acinetobacter*, *Arhtrobacter*, *Arenimonas*, *Bacillus*, *Desulfobacterium*, *Rhodococcus* та інші, які здатні утилізувати нафту та її похідні [3, 10]. Різноманітна і рухлива ферментативна система, що дозволяє досить швидко перемикатися на споживання з одних на інші джерела вуглецю та енергії, висока пластичність обмінних процесів, швидка адаптація до умов існування дозволяє нафтоокиснюючим бактеріям активно утилізувати нафту і нафтопродукти [1, 7, 9].

Мікроорганізми здатні використовувати вуглеводні нафти в процесі енергетичного і конструктивного метаболізму і руйнувати їх завдяки поліфункціональній ензиматичній активності, яка в свою чергу обумовлена

особливою організацією мікробної клітини [11]. Встановлено, що практично всі вуглеводні нафтового походження підлягають дії мікробних ферментів які в свою чергу є адаптивними ензимами, окиснення можливе у присутності молекулярного кисню. Але існує і медичний аспект цієї проблеми, тому що серед деструкторів вуглеводнів нафти є велика кількість патогенних мікроорганізмів, використання яких з екологічною метою може призвести до негативних наслідків. Важливим є створення непатогенних мікробних препаратів нового покоління, які володіють сорбційною і деструктивною активністю у відношенні вуглеводнів нафти, є антагоністами умовно-патогенних санітарно-показових бактерій, сприяють оздоровленню навколишнього середовища [8]. До найбільш перспективних у цьому плані відносяться бактерії роду *Pseudomonas* – типичні хемоорганогетеротрофи, які здатні засвоювати нафту та її похідні в якості єдиного джерела вуглецю та енергії [3, 12, 15].

Тому метою роботи було вивчення біологічних властивостей бактерій роду *Pseudomonas* після тривалого зберігання, що використовуються у біотехнологіях очищення води і ґрунту від нафтопродуктів.

В задачі досліджень входило:

- здійснити відбір бактерій–деструкторів вуглеводнів нафти серед штамів, що зберігаються у філії Національної колекції культур мікроорганізмів та провести їх видову ідентифікацію;
- провести оцінку нафтоокиснювальної активності бактерій-деструкторів вуглеводнів нафти після тривалого зберігання;
- визначити антагоністичну активність бактерій-деструкторів по відношенню до умовно-патогенних і санітарно-показових мікроорганізмів.

**Об'єкт дослідження** – мікробні технології очищення води і ґрунту від вуглеводнів нафти.

**Предмет дослідження** - біологічні властивості бактерій-деструкторів вуглеводнів нафти.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ

З колекції культур мікроорганізмів Одеського національного університету ім. І. І. Мечникова, що має статус Національного надбання та є філією Національної колекції культур мікроорганізмів, було відібрано 3 штами бактерій-деструкторів вуглеводнів нафти, що зберігалися на протязі 3 років.

Для підтвердження їх родової та видової приналежності були вивчені їх біологічні властивості. За морфологічними, тінкториальними, культуральними та біохімічними властивостями штами були ідентифіковані як *Pseudomonas fluorescens* ONU328, *Pseudomonas cepacia* ONU327 та *Pseudomonas maltophilia* ONU329.

Проведено порівняльний аналіз нафтоокислювальної активності колекційних штамів після тривалого зберігання - на протязі більш ніж 3 років. Встановлено, що всі штами добре росли на агаризованому середовищі МКД, що містить як єдине джерело вуглецю нафту в концентраціях від 0,05 до 15%. Найбільше активними за ростовими показниками були штами *Pseudomonas fluorescens* ONU328 і *Pseudomonas cepacia* ONU327.

Морфологічні особливості росту вказаних культур не залежали від концентрації вуглеводнів нафти – збільшення концентрації до 15% не приводило до вираженої затримки росту мікроорганізмів, навпроти, збільшення змісту вуглеводнів нафти посилювало приріст біомаси культури *Pseudomonas fluorescens* ONU328.

Найбільш активними деструкторами були *Pseudomonas fluorescens* ONU328 та *Pseudomonas maltophilia* ONU329. На 10-30 добу вони викликали руйнування нафтової плями, що супроводжувалося появою бактеріальних плівок під нижнім шаром нафти, збільшення оптичної щільності середовища, утворення пластівців у товщі середовища.

Хімічний аналіз показав, що через 30 діб вони приводили до зменшення кількісного вмісту нафти у середовищі на 80,0 %.

З даними літератури відомо, що біохімічні процеси деградації нафти за участю мікроорганізмів включають декілька типів ферментативних реакцій на основі оксигеназ, дегідрогеназ і гідролаз, які здійснюють ароматичне і аліфатичне гідроксилування, окислювальне дезамінування, гідроліз та інші біохімічні процеси [23].

Для створення нового препарату, призначеного для комплексного очищення водного середовища, нами були відібрані біохімічно-активні штами бактерій-деструкторів вуглеводнів нафти *P.fluorescens* ONU328, *Pseudomonas maltophilia* ONU329 та *Pseudomonas cepacia* ONU327. Вони були антагоністами широкого спектру дії - пригнічували ріст санітарно-показових умовно-патогених грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів. Найбільш виражена затримка росту спостерігалась у тест-культур *Pseudomonas aeruginosa* 395, 2 культур рода *Enterobacter* sp, *Micrococcus luteus* 41-42 і *Micrococcus varians* 72.

Ці штами, відібрані з колекції культур мікроорганізмів Одеського національного університету ім. І. І. Мечникова, що має статус Національного надбання та є філією Національної колекції культур мікроорганізмів, володіють необхідними біотехнологічними властивостями і можуть бути рекомендовані для використання як основа при створенні нового препарату, призначеного для очистки води і ґрунту від нафтопродуктів.

## ВИСНОВКИ

1. Після довготривалого зберігання колекційні штами добре росли на агаризованому середовищі М-9, що містило як єдине джерело вуглецю нафту в концентраціях від 0,05 до 15,0 %. Найбільше активними за ростовим показникам були штами *Pseudomonas fluorescens* ONU328 і *Pseudomonas cepacia* ONU327.

2. Найбільш активними деструкторами вуглеводнів нафти були штами *Pseudomonas fluorescens* ONU328 та *Pseudomonas maltophilia* ONU329.

3. Штами бактерій-деструкторів вуглеводнів нафти *P. fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 і *P. cepacia* ONU327 були антагоністами широкого спектру дії; найбільш виражена затримка росту спостерігалась у тест-культур *P. aeruginosa* 395, *Micrococcus luteus* 41-42, *Micrococcus varians* 72, *Enterobacter* sp.

4. Для створення нового препарату, призначеного для комплексного очищення водного середовища, можна рекомендувати біохімічно активні бактерії-деструктори вуглеводнів нафти *Pseudomonas fluorescens* ONU328, *P. maltophilia* ONU329 і *P. cepacia* ONU327, що є антагоністами широкого спектру дії.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Андерсон Р. К.* Биотехнические методы ликвидации загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами // ВНИИОЭНГ.- 1993. - С. 34-42.
2. *Андерсон Р. К., Калимуллин А. А.* и др. Использование биопрепаратов для очистки и рекультивации нефтезагрязненных почв //НТЖ. Нефтепромысловое дело. – 2008. - № 6. - С.23-26.
3. *Бириштейн Э.* Нефтяная микробиология. - М.: Наука, 1957. - 120 с.
4. *Бондаренко В.М.* Общий анализ представлений о патогенных и условно патогенных бактериях // Журн. микробиол. - 2007. - № 4. - С. 20-25.
5. *Борисов Л.Б.* Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. - М.: Медицина, 2002. - 735 с.
6. *Борисова Е. В.* Иммуносупрессивные компоненты экстрацеллюлярного липополисахарида клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* //Журнал микробиологии. - 2000. - № 6. - С. 23 - 34.
7. *Ворошилова А. А., Дианова О. В.* Окисляющие нефть бактерии – показатели интенсивности биологического окисления нефти в природных условиях //Микробиология. - 1992.- Т. 21, вып. 4.- С.96-99.
8. *Гудзенко Т. В., Васильева Т. В.* Оценка биологических свойств бактерий-деструкторов, предназначенных для биотехнологического использования // Микробиол. журн. - 1994. - Т 56, №2. - С.49-51.
9. *Дульгеров О. М., Качур Т. Л., Нудьга А. Ю.* Біотехнологія очищення ґрунтів, забруднених вуглеводнями нафти і нафтопродуктів препаратом “Десна” / Проблеми сбора, переработки и утилизации отходов. // Сб. научн. статей.- Одесса: ОЦНТЭИ, 2000. - С. 254-257.
10. *Дядечко В. Н., Толстокорова Л.Е., Морозова Т.Н.* Штам *Pseudomonas putida* 36, використований для очищення води і ґрунту від нафти і нафтопродуктів. Патент SU 1076446 //Б.И. - 1984. - № 8.- С. 3.

11. Журавлёв П. В., Цацка А. А., Влодавец В. В., Головина С. В. Сравнительная оценка методов выделения синегнойной палочки из воды открытых водоёмов // Гигиена и санитария. - 1991. - №5. - С.78-79.

11. Квасників Є. І., Ключникова Т. М. Мікроорганізми - деструктори нафти у водяних басейнах. – К.: Наукова думка, 1981. - 132 с.

12. Кожанова Г. А. Спосіб одержання бактеріального препарату для сорбції та деструкції органічних речовин / Патент України № 43394, 2001 р.

13. Кожанова Г. А., Васильева Т. В., Бобрешова Н. С., Беляева Т. А., Гудзенко Т. В. Нефтяные загрязнения, их биологическая активность и проблемы ликвидации // Микробиол. журн. - 1994. - Т.56, №2. - С. 68.

14. Кожанова Г. А., Гудзенко Т. В., Бобрешова Н. С. Новые биотехнологии для предупреждения и ликвидации нефтяного загрязнения воды и почвы // Вісник Українського Будинку економічних та науково-технічних знань. - 1998. - №7. - С. 86-87.

15. Кожанова Г. А., Руденко А. В. Бактерии-деструкторы с широким спектром биологической активности для интродукции в природные биоценозы // Микробиол. журн. - 1994. - Т.56, №2. - С. 69 - 72.

16. Лизунов А. Б., Янкевич М. И., Яковлев В. И. Деструкция тяжелых фракций нефти ассоциациями алканотрофов // Сборник материалов Всероссийской конференции "Экологические проблемы биодegradации промышленных, строительных материалов и отходов производств", 20-21 октября 1998, Пенза. - С.57-58.

17. Марченко А. И., Воробьев А. В., Герхардт М., Боровик Р. В. Хемотаксическая реакция штамма *Pseudomonas fluorescens* – деструктора полициклических ароматических углеводов // Микробиологический журнал. - 1994. - Т.49, №4. - С.27-32.

18. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига и др. - М.: Мир, 1997. - 432 с.

19. Патент № 4415662, США МКИ С12 11/14. Способ разложения нефти и нефтепродуктов с использованием микроорганизмов /Опубл.1983.- Бюл. Т. 1098.

20. Патент №2033965. Россия. Способ получения бактериального препарата для очистки водной среды от загрязнения нефтепродуктами / Кожанова Г.А. Опубл.1995.

21. Покровский В.И. Медицинская микробиология. - М.: ГЭОТАР Мед., 2001. - С. 414-418 с.

22. Рекомендации по использованию биопрепарата «Деворойл» для очистки объектов железнодорожного транспорта от загрязнения нефтепродуктами. -М., 1999. – 49 с.

23. Руднов В. А. Современное клиническое значение синегнойной инфекции и возможности ее терапии у пациентов отделений реанимации // Инфекции и антимикробная терапия. – 2002. – Т. 4, № 6. – С. 19 – 32.

24. Самсонова А. С., Алещенкова З. М., Томсон А. Э. и др. Использование препарата «Родобел-Т» в очистке водной поверхности от нефти / Проблемы микробиологии и биотехнологии. - Минск : БИМ, 1998.-С. 190-191.

25. Соловійов В. І., Кожанова Г. А., Гудзенко Т. В., Беляева Т. О. Медичні та екологічні аспекти використання біопрепаратів для ліквідації нафтового забруднення / X з'їзд Товариства мікробіологів України. Тези доповідей. 15-17 вересня 2005 р. – Одеса: ОНУ, 2005. - 238 с.

26. Суржко Л. Ф., Финкельштейн З. И., Янкевич М. И., Головлева Л. А. Утилизация нефти в почве и воде микробными клетками //Микробиология.- 1995.- т.64, 3.- С.393-398.

27. Суржко Л. Ф., Хадеева В. В., Янкевич М. И., Авсюкевич А. П. Биотехнологические способы очистки нефтезагрязненных почв. // Тез. докладов международной конференции "Новые технологии для очистки нефтезагрязненных вод, почв, переработки и утилизации нефтешламов", Москва, 10-11 декабря 2001. - С.99-100.

28. *Цыбань А.В.* Распространение и микробное окисление канцерогенных углеводородов (на примере бенз/а/пирена) в некоторых районах Мирового океана. / Экологические последствия загрязнения океана. - Л.: Гидрометиздат, 1985. - С. 88-112.

29. *Ягафарова Г. Г., Гатауллина Э. М.* Испытания биопрепарата "Родотрин" для ликвидации нефтяных загрязнений // Башкирский химический журнал. - 1995. - Т.2, № 3 - 4. - С.69-70.

30. *Ягафарова Г. Г., Спивак А. И., Мавлютов М. Р.* Биодеструкция нефти и полимеров в отходах буровых растворов // Нефтяное хозяйство. - 2006. - №4. - С. 67-68.

31. *Ягафарова Г. Г., Гатауллина Э. М., Мавлютов М. Р.* и др. Способ очистки буровых шламов от нефти и полимерных реагентов // Международная научно-техническая конференция «Проблемы нефтегазового комплекса России», посвященная 50-летию УГНТУ. - Уфа, 2008. - С.31-42.

32. *Ягафарова Г. Г., Мавлютов М. Р., Гатауллина Э. М.* Биодеструкция нефти и полимеров в отходах буровых растворов // Нефтяное хозяйство. - 2010. - №4. - С. 86-87.

33. *Янкевич М. И., Хадеева В. В., Яненко А. С.* Технология очистки нефтезагрязненных территорий с помощью биопрепаратов // Тез. докл. 3 Междунар. конф. "Освоение Севера и проблемы рекультивации". - Сыктывкар, 1996. - С. 236-237.

34. *Basta T, Buerger S & Stolz A* Structural and replicative diversity of large plasmids from sphingomonads that degrade polycyclic aromatic compounds and xenobiotics // *Micribiology*. - 2005.- V. 151.- P. 2025 – 2037.

35. *Basu A., Apte Д., Phale P.* Preferential utilization of aromatic compounds over glucose by *Pseudomonas putida* CSV86 c // *Appl Environ Microbiol.* - 2006.- V.72.- P. 2226 – 2230.

36. Basu, A., Shrivastava R., Basu B. Modulation of glucose transport causes preferential utilization of aromatic compounds in *Pseudomonas putida* CSV86 // J Bacteriol. – 2007.- V. 4.- P.7556 – 7562.

37. Basu A., Phale P. Inducible uptake and metabolism of glucose by the phosphorylative pathway in *Pseudomonas putida* CSV86 // FEMS Microbiol Lett. – 2006.- V. 259.-P. 311 – 316.

38. Boukfaoui Rnidiri Nadia, Bitar Hassanc, Mille Gilbert, Sergent Michele. Biodegradation des hydrocarbures petroliers //C.r. Acad. Sci. Ser. 2. - 1993. - №7. - P.905-910.

39. Braun Peter, de Groot Arjan, Bitter Wilbert, Tommassen Jan. Secretion of elastinolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol.- 1998.- V.180, N 13.- P. 3467-3469.

40. Budau F., Tozo K. Gergely L. Microbiological degradation of oil Pollution in soil // Soil. Biol. and Conserv. Biosphere, 1984. - V.I. - P. 307-315.

41. Jerakova H., Kralova B., Krejen V. Use of polyurethane foam for the biodegradation of n-alkanes by immobilised cells of *Pseudomonas* // Biotechnol. Techn. - 1997. -V.I , № 6. -P.391-394.

42. Kvitko K., Dmitrieva I., Iankevitch M., Khadeeva V., Avsukevisch A. Photosynthetic organisms as novel biotechnology agents in the phytoremediation of surface waters and soils after oil spills // Abstracts of ISEB'97-Meeting, "Bioremediation", Leipzig, 1997. - P.103.

43. Lyzunov A.B, Iankevitch M.I, Iakovlev V.I. Biotechnology in processes of soil remediation after oil spills. // Abstracts of ISEB-97-Meeting "Bioremediation" 24-27 September 1997, Leipzig, Germany. – 1997. - P.106.

44. Oberbremer A., Multer-Hurtig R. Aerobic step wise hydrocarbon degradation and formation of biosurfactans by organical soil population in a stirred reactor // Appl. Microbiol. and Biotechnol. - 1999. - V. 31, №5 -P. 582-589.

45. *Osuji L., Ozioma A.* Environmental degradation of polluting aromatic and aliphatic hydrocarbons: a case study // *Chem. Biodivers.* – 2007. – Vol. 4. – P. 424–430.
46. *Rocha C., Infante C.* Enhanced oil sludge bioremediation by a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* USB-CS1 // 10-th Int. Conf. Glob. Impacts Appl. Microbiol. and Biotechnol., Elsinore, 6-12 Aug. 1995. -P. 115.
47. *Saxon V. M., Kuznetsov S. A., Boikova I. V., Novicova I. I.* The employment of oil degrading bacteria in bioremediation of contaminated soil and water // Proc. of the Intern. Conference "Ecological Effects of Microorganism Action". - Vilnius, Lithuania, Oct. 1-4, 1997. - P. 475 - 478.
48. *Singh M.* Oil soil management possible role of biotechnology // *Chemical age of India.*-1989/1990.-Vol. 40, N 10. - P. 29-31.
49. *Solans A.M., Pares R.* Degradation of aromatic petroleum hydrocarbons by pure microbial cultures // *Chemosphere.* - 1984. - V. 13, №5. -P. 593-601.
50. *Stewart R. S., Emmons C., Porfirio D, Wiggers R. J.* Distribution of multiple oil tolerant and oil degrading bacteria around a site of natural crude oil seepage // *Tex. J. Sci.* - 1997. - V.49, №4. - P. 339-344.
51. *Sutton N.B., Maphosa F., Morillo J.A., Abu Al-Soud W., Langenhoff A.A., Grotenhuis T., Rijnaarts H.H., Smidt H.* Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure // *Appl Environ Microbiol.* – 2013. – Vol. 79, № 2. – P. 619–630.

25.04.16<sub>2</sub>

*J. C. C. S. -*