

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

**Дипломна робота
бакалавра**

**на тему: “Біодеградація п-нітрофенолу колекційними та морськими
штамами *Pseudomonas aeruginosa*”**

**“Biodegradation of p-nitrophenol by collection and marine strains of
Pseudomonas aeruginosa”**

Виконав: студент IV курсу
спеціальності 162 Біотехнології
та біоінженерія,
денної форми навчання
Пріщенко Іван Вікторович

Науковий керівник
доктор біологічних наук, професор
Філіпова Тетяна Олегівна

Рецензент
кандидат біологічних наук, доцент
Майкова Ганна Вікторівна

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри
№ 10 від «25» 05 2020 р.

Завідувач кафедри
_____ Філіпова Т.О.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Захищено на засіданні ЕК № 2
Протокол № _____ від «___» _____ р.
Оцінка _____ / _____ / _____
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал)

Голова ЕК
_____ Галкін Б.М.
(підпис) (прізвище та ініціали)

Одеса 2020

АНОТАЦІЯ

Встановлено, що усі досліджені штами *P. aeruginosa* здатні до росту у мінімальному сольовому середовищі з пептоном у присутності пара-нітрофенолу, але кількість клітин є суттєво меншою ніж у контрольних культурах. Показано, що за рівнем біодеструкції ксенобіотика досліджені штами розташовуються у наступний ряд: *P. aeruginosa* M4 > *P. aeruginosa* pJN2133 >> *P. aeruginosa* PA01 > *P. aeruginosa* M1 = *P. aeruginosa* M3. Штам *P. aeruginosa* ΔwspF виявився не активним. Візуально деколоризація культур *P. aeruginosa* M4 і *P. aeruginosa* pJN2133 була помітна вже через три доби. У динаміці дослідження рівень розкладання пара-нітрофенолу штамами *P. aeruginosa* M4, *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* pJN2133 постійно зростає. У разі штамів *P. aeruginosa* M1 і M3 він не змінювався після п'ятої доби. Найбільш активні штами за 7 діб культивування розклали 100% та 88,5% пара-нітрофенолу, відповідно.

Курсову роботу викладено на 34 сторінках друкованого тексту, вона включає 9 рисунків. В роботі наведено посилання на 46 публікацій, з них 11 кирилицею та 35 латиницею.

Ключові слова: *P. aeruginosa*, біодеградація, пара-нітрофенол

SUMMARY

It was found that all studied strains of *P. aeruginosa* are able to grow in minimal salt medium with peptone in the presence of para-nitrophenol, but the number of cells is significantly less than in control cultures. It is shown that according to the level of biodegradation of the xenobiotic, the studied strains are located in the following row: *P. aeruginosa* M4 > *P. aeruginosa* pJN2133 >> *P. aeruginosa* PA01 > *P. aeruginosa* M1 = *P. aeruginosa* M3. The *P. aeruginosa* strain ΔwspF was not active. Visually, the decolorization of cultures of *P. aeruginosa* M4 and *P. aeruginosa* pJN2133 was noticeable after three days. In the dynamics of the study, the level of para-nitrophenol decomposition by strains of *P. aeruginosa* M4, *P. aeruginosa* PA01 and *P. aeruginosa* pJN2133 was constantly increasing. In the case of *P. aeruginosa* strains M1 and M3, it did not change after the fifth day. The most active strains in 7 days of cultivation decomposed 100% and 88.5% of para-nitrophenol, respectively.

The course work is presented on 34 pages of printed text, it includes 9 figures. The paper links to 46 publications, including 11 in Cyrillic and 35 in Latin.

Key words: *P. aeruginosa*, biodegradation, para-nitrophenol

ЗМІСТ

	Стор.
СПИСОК СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Характеристика бактерій <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
1.2. Нітрофеноли і шляхи їх біодеградації	10
1.5. Гени деградації пара-нітрофенолу та їх регуляція	14
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	16
2.1. Штами та поживні середовища	16
2.2. Культивування штамів <i>P. aeruginosa</i>	16
2.3. Визначення кількості клітин	17
2.4. Визначення вмісту пара-нітрофенолу	17
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	9
3.1. Технологічна схема біодеградації пара-нітрофенолу	19
3.2. Біодеградації пара-нітрофенолу	20
3.2.1. Вплив пара-нітрофенолу на вміст клітин у динаміці культивування	21
3.2.2. Визначення змін вмісту пара-нітрофенолу впродовж культивування досліджуваних штамів <i>P. aeruginosa</i>	23
ВИСНОВКИ	28
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	29

ВСТУП

З розвитком хімічної промисловості в біосферу почало надходити більше тисячі різних ксенобіотиків і токсикантів, які в значній мірі забруднюють навколишнє середовище. Відомо, що сполуки, що вносяться людиною в навколишнє середовище останнім часом (інсектициди, гербіциди, детергенти, нафта, нітрофеноли та інші ксенобіотики) крім того, що дуже токсичні, ще й стійкі в середовищі (що становить небезпеку для людини і тварин) [Головлева, 2007]. В даний час навантаження на природні процеси самоочищення біосфери є надлишковою, і паралельно з деструкцією забруднень йде їх поступове накопичення в навколишньому середовищі.

Можливості мікробних спільнот щодо деградації багатьох токсичних сполук значні. Доведено, що при повторному попаданні в середовище багатьох хімічних сполук адаптаційний період мікроорганізмів до даного субстрату значно коротше, у порівнянні з першим попаданням цієї сполуки [Horvath, 1972]. Протягом цього періоду мікроорганізми селектуються за здатністю деградувати даний субстрат. В результаті природним шляхом виникають мікробні популяції, здатні зберігатися в ґрунті протягом декількох місяців після повної деградації токсиканту [Jeffries et al., 2018]. Тому до початку нового надходження цієї речовини в ґрунт в ньому вже присутні адаптовані мікроорганізми, здатні розкласти токсикант. Підвищення деградуючої здатності можливо також в результаті стимуляції природної ґрунтової мікробіоти, вже адаптованої до токсикантів. Таким чином, деградація ксенобіотиків мікроорганізмами є однією з важливих проблем захисту біосфери.

Нітрофеноли (НФ) - це нітровані ароматичні циклічні структури, що складаються з бензольних кілець, гідроксильних (-ОН) та нітро (-NO₂) груп. До них відносяться мононітрофеноли, галонітрофеноли, полінітрофеноли, метилнітрофеноли та амінонітрофеноли. Ці сполуки широко використовуються для виготовлення барвників, лікарських засобів,

пестицидів, гербіцидів, фунгіцидів, фарб та вибухових речовин [Arora et al., 2012].

НФ були викинуті у навколишнє середовище у великих кількостях через неправильну практику утилізації відходів, використання сільського господарства, медичне застосування та побутову діяльність. Ці сполуки були виявлені у ґрунті сільського господарства, ґрунтових, поверхневих, дощових вод, активного мулу, повітря та промислових стоків [Asman et al., 2005; Rubio et al., 2012]. Люди можуть піддаватися впливу НФ у навколишньому середовищі через дихання забрудненим повітрям, питну воду, що містить НФ, харчові речовини, що містять НФ, та від контакту шкіри з НФ [Agency..., 1992]. НФ можуть переходити в потік крові через наші легені, дихаючи, зі шлунку при ковтанні та через шкіру шляхом всмоктування [Agency..., 1995]. Коли НФ потрапляють всередину організму, кров може переносити їх до різних органів і тканин, включаючи нирки, печінку, мозок, очі, де вони можуть пройти процес трансформації (шляхом відновлення та окиснення) та кон'югації з глюкуроною та сірчаною кислотами [Agency..., 1995].

НФ привернули увагу завдяки їх токсичним профілям та їх значному поширенню в навколишньому середовищі. Агентство охорони навколишнього природного середовища США вказало кілька НФ, як «пріоритетні забруднювачі». Для видалення НФ зі стічних вод було використано низку фізико-хімічних методів [Yao et al., 2012], але жоден з них не забезпечує повної мінералізації НФ. Бактеріальна рекультивація може бути використана, як ефективна технологія для видалення НФ з навколишнього середовища, оскільки деякі бактерії мають можливість використовувати НФ, як єдине джерело вуглецю та енергії.

За останні кілька років у декількох оглядах було розглянуто питання про бактеріальну деградацію нітроароматичних сполук, хлорованих нітроароматичних сполук та хлорофенолів [Yu et al., 2009; Ju et al., 2010].

Метою даної роботи було встановлення здатності колекційних штамів і морських ізолятів *Pseudomonas aeruginosa* до біодеградації пара-нітрофенолу.

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні задачі:

1. Розробити технологічну схему біодеградації пара-нітрофенолу бактеріями *Pseudomonas aeruginosa*
2. З'ясувати здатність колекційних штамів (*P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* pJN2133, *P. aeruginosa* ΔwspF1) і виділених з Чорного моря штамів *P. aeruginosa* (M1, M3 і M4) до росту у присутності пара-нітрофенолу.
3. Дослідити вміст клітин у контрольних і дослідних культурах в динаміці.
4. Встановити здатність досліджуваних штамів до біодеградації пара-нітрофенолу у динаміці культивування.
5. Порівняти біодеградабельну активність колекційних і морських штамів *P. aeruginosa*.

Об'єкт дослідження – біодеградація ксенобіотиків бактеріями.

Предмет дослідження – біодеградація пара-нітрофенолу колекційними і морськими штамами *P. aeruginosa*.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено технологічну схему утилізації пара-нітрофенолу бактеріями *Pseudomonas aeruginosa* в лабораторних умовах.
2. Встановлено, що усі досліджені штами *P. aeruginosa* здатні до росту у мінімальному сольовому середовищі з пептоном у присутності пара-нітрофенолу, але кількість клітин є суттєво меншою ніж у контрольних культурах.
3. Показано, що за рівнем біодеструкції пара-нітрофенолу досліджені штами розташовуються у наступний ряд: *P. aeruginosa* M4 > *P. aeruginosa* pJN2133 >> *P. aeruginosa* PA01 > *P. aeruginosa* M1 = *P. aeruginosa* M3. Штам *P. aeruginosa* ΔwspF виявився не активним.
4. Візуально деколоризація культур *P. aeruginosa* M4 і *P. aeruginosa* pJN2133 була помітна вже через три доби.
5. У динаміці дослідження рівень розкладання пара-нітрофенолу штамми *P. aeruginosa* M4, *P. aeruginosa* PA01 і *P. aeruginosa* pJN2133 постійно зростав. У разі штамів *P. aeruginosa* M1 і M3 він не змінювався після п'ятої доби.
6. Найбільш активні штами за 7 діб культивування розклали 100% та 88,5% пара-нітрофенолу, відповідно

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гостев В. В. Бактериальные биопленки и инфекции / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – № 3. – С. 4–14.
2. Гудзь С. П. Мікробіологія: підручник: [для студ. вищ. навч. закл.] / С. П. Гудзь, С. О. Гнатуш, І. С. Білінська // Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка. – 2009. – 360 с.
3. Коротяев А. И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: Учебник для медицинских вузов: Род *Pseudomonas* / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев // СПб.: СпецЛит. – 2008. – 767 с.
4. Лапач, С.Н., Чубенко, А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2001. – 260 с.
5. Несмеянов А.Н. Начала органической химии. В 2-х томах. – М.: «Химия», 1970. –Т. 2. – 824 с.
6. Орлова Е. Ю. Химия и технология бризантных взрывчатых веществ // Изд. второе, перер. и доп. – Л.: «Химия», 1972. – 688 с.
7. Сидоренко С. В. Госпитальные инфекции, вызванные *Pseudomonas aeruginosa*. Распространение и клиническое значение антибиотикорезистентности / С. В. Сидоренко, С. П. Резван, Г. А. Стерхова, С. А. Грудинина // Антибиотики и химиотерапия – 1999. – № 3.– С. 25–34.
8. Травень В. Ф. Органическая химия. Учебник для вузов // М.: ИКЦ «Академкнига». – 2006. – Т. 2. – С. 63– 69.
9. Физико–биохимические основы бактериальной деградации ксенобиотиков / Л.А. Головлева [и др.] // Международная научная конференция «Микроорганизмы и биосфера»: тезисы. – М.: ИНМИ РАН– 2007. – С. 31–36.

10. Фурсова П. В. Культивирование диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* в условиях заданного лимитирования / П. В. Фурсова, Е. С. Милько, А. П. Левич // Микробиология. – 2008. – Т. 77, № 1. – С. 1–6.
11. Чирва В. Я. Органічна хімія / В. Я. Чирва, С. М. Ярмолюк, Н. В. Толкачова, О. Є. Земляков. – Львів : БаК. – 2009. – 996 с.
12. Advanced high-performance liquid chromatography method for highly polar nitroaromatic compounds in ground water samples from ammunition waste sites / A. Preiss, A. Bauer, H.M. Berstermann, S. Gerling, R. Haas, A. Joos, A. Lehmann, L. Schmalz, K. Steinbach // J. Chromatogr. A. – 2009. – Vol. 1216. – P. 4968–4975.
13. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Toxicological Profile for Dinitrophenols, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, 1995.
14. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Toxicological Profile for Nitrophenols: 2-Nitrophenol and 4-Nitrophenol, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, 1992.
15. Arora P.K. Bacterial degradation of nitrophenols and their derivatives / P. K. Arora, A. Srivastava, V. P. Singh // Journal of Hazardous Materials. – 2014. – Vol. 266. – P. 42–59.
16. Arora P.K. Metabolism of para-nitrophenol in *Arthrobacter sp.* SPG / P.K. Arora // J. Environ. Res. Manage. – 2012. – Vol. 3. – P. 52–57.
17. Arora P.K. Degradation of chlorinated nitroaromatic compounds / P.K. Arora, C. Sasikala, C.V. Ramana // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – Vol. 93. – P. 2265–2277.
18. Asman W.A.H. Wet deposition of pesticides and nitrophenols at two sites in Denmark: measurements and contributions from regional sources / W.A.H. Asman, A. Jorgensen, R. Bossi, K.V. et al. // Chemosphere. – 2005. – Vol. 59. – P. 1023–1031.
19. Chauhan A. Plasmid-encoded degradation of p-nitrophenol and 4-nitrocatechol by *Arthrobacter protophormiae* / A. Chauhan, A.K. Chakraborti,

- R.K. Jain // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2000. – Vol. 270. – P. 733–740.
20. Goossens H. Susceptibility of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units: results from the European MYSTIC study group // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2003. – № 9. – P. 980–983.
 21. Hanne L.F. Degradation and induction specificity in actinomycetes that degrade p-nitrophenol / L.F. Hanne, L.L. Kirk, S.M. Appel, A.D. Narayan, K.K. Bains // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – Vol. 59. – P. 3505–3508.
 22. Harrison M.A.J. Nitrated phenols in the atmosphere: a review / M.A.J. Harrison, S. Barra, D. Borghesi, D. Vione, C. Arsene, R.L. Olariu // *Atmos. Environ.* – 2005. – Vol. 39. – P. 231–248.
 23. Huang Y. PnpB involvement in the regulation of temperature-sensitive para-nitrophenol degradation in *Pseudomonas putida* MT54 via PnpA / Y.Huang, H.Tu, W.Zheng // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 2018. – Vol. 503 (3). – P. 1575–1580.
 24. Identification of highly polar nitroaromatic compounds in leachate and ground water samples from a TNT-contaminated waste site by LC–MS, LC–NMR, and off-line NMR and MS investigations / A. Preiss, M. Elend, S. Gerling, E. Berger-Preiss, K. Steinbach // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2007. – Vol. 389. – P. 1979–1988.
 25. Jain R.K. Biodegradation of p-nitrophenol via 1,2,4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. / R.K. Jain, J.H. Dreisbach, J.C. Spain // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – Vol. 60. – P. 3030–3032.
 26. Jeffries T.C. Metagenomic Functional Potential Predicts Degradation Rates of a Model Organophosphorus Xenobiotic in Pesticide Contaminated Soils / T.C. Jeffries, S. Rayu, U.N. Nielsen, K. Lai // *Front. Microbiol.*, 2018. – Vol. 9. – P. 147–150.
 27. Ju K.S. Nitroaromatic compounds, from synthesis to biodegradation / K.S. Ju, R.E. Parales // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2010. – Vol. 74. – P. 250–272.

28. Kadiyala V. A two-component monooxygenase catalyzes both the hydroxylation of p-nitrophenol and the oxidative release of nitrite from 4-nitrocatechol in *Bacillus sphaericus* JS905 / V. Kadiyala, J.C. Spain // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. – Vol. 64. – P. 2479–2484.
29. Myers R. L. *The 100 Most Important Chemical Compounds.* – Westport, CT: Greenwood Press, 2007. – 214 p.
30. Nitrophenols in air and rainwater / R. Belloli, E. Bolzacchini, L. Clerici, B. Rindone, G. Sesana, V. Librando // *Environ. Eng. Sci.* – 2006. – Vol. 23. – P. 405–415.
31. Pakala S.B. Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol: evidence for the presence of p-nitrophenol 2-hydroxylase in a Gram-negative *Serratia* sp. strain DS001 / S.B. Pakala, P. Gorla, A.B. Pinjari, et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2007. – Vol. 73. – P. 1452–1462.
32. Pyomelanin-producing *Pseudomonas aeruginosa* selected during chronic infections have a large chromosomal deletion which confers resistance to pyocins / D. Hocquet, M. Petitjean, L. Rohmer et al. // *Environmental Microbiology.* – 2016. – Vol.18. – P. 3482–3493.
33. Raymond D.G.M. Microbial metabolism and cometabolism of nitrophenols, / D.G.M. Raymond, M. Alexander // *Pest. Biochem. Physiol.* – 1971. – Vol. 1. – P. 123–130.
34. Römling, U. Cyclic di-GMP: The first 25 years of a universal bacterial second messenger / U. Römling, M.Y. Galperin, M. Gomelsky // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2013. – V. 77. – P. 1–52
35. Rubio M.A. Phenol and nitrophenols in the air and dew waters of Santiago de Chile / M.A. Rubio, E. Lissi, N. Herrera, V. Perez, N. Fuentes // *Chemosphere.* – 2012. – Vol. 86. – P. 1035–1039.
36. Schwarzbauer J. Quantitation of nonextractable anthropogenic contaminants released from Teltow Canal sediments after chemical degradation / J. Schwarzbauer, M. Ricking, R. Littke // *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* – 2004. – Vol. 31. – P. 469–481.

37. Solís-González C.J. Alicyclophilus: current knowledge and potential for bioremediation of xenobiotics / C.J. Solís-González, H. LozaTavera // Journal of Applied Microbiology. – 2019. – Vol. 126. – P.1643-1656.
38. Spain J.C. Biodegradation of nitroaromatic compounds / J.C. Spain // Annu. Rev. Microbiol. – 1995. – Vol. 49. – P. 523–555.
39. Spain J.C. Pathway for biodegradation of p-nitrophenol in a *Moraxella sp.* / J.C. Spain, D.T. Gibson // Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – Vol. 57. – P. 812–819.
40. Unell M. Degradation of mixtures of phenolic compounds by *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 / M. Unell, K. Nordin, C. Jernberg et al. // Biodegradation. – 2008. – Vol. 19. – P. 495–505.
41. Valentini, M., Filloux, A. Biofilms and cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria / M. Valentini, A., Filloux // J. Biol. Chem. – 2016. – V. 291. – P. 12547–12555.
42. Yao G.P. Efficient visible photodegradation of 4-nitrophenol in the presence of H₂O₂ by using a new copper(II) porphyrin-TiO₂ photocatalyst / G.P. Yao, J. Li, Y. Luo, W.J. Sun // J. Mol. Catal. A: Chem. – 2012. – Vol. 361. – P. 29–35.
43. Yin Y. Characterization of MnpC, a hydroquinone dioxygenaselikely involved in the meta-nitrophenol degradation by *Cupriavidus necator* JMP134 / Y. Yin, N.Y. Zhou // Curr. Microbiol. – 2010. – Vol. 61. – P. 471–476.
44. Yu H.Q. Microbial degradation of nitroaromatic compounds / H.Q. Yu, S.X. Teng, G.P. Sheng, X.W. Liu, S.G. Wang // Prog. Chem. – 2009. – Vol. 21. – P. 534–539.
45. Zhang J.J. Identification and characterization of catabolic para-nitrophenol 4-monooxygenase and para-benzoquinone reductase from *Pseudomonas sp.* strain WBC-3 / J. J. Zhang, H. Liu, Y. Xiao, X. E. Zhang, N. Y. Zhou // J. Bacteriol. – 2009. – Vol. 191. – P. 2703–2710.

46. Zhang, S., Sun, W., Xu, L. et al. Identification of the para-nitrophenol catabolic pathway, and characterization of three enzymes involved in the hydroquinone pathway, in *Pseudomonas* sp. 1-7 / S. Zhang, W. Sun, L. Xu et al. // BMC Microbiol. – 2012. – V. 12(27). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-27>