

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет имени  
К.И. Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела им. К. Турысова

Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»

Артемов Алексей Сергеевич

«Изучение культуральных свойств бактерий рода *Pseudomonas*, используемых в  
деструкции углеводов»

**ДИПЛОМНАЯ РАБОТА**

Специальность 5В070100 – «Биотехнология»

Алматы - 2022

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет имени  
К.И. Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела им. К. Турысова

Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»



ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

На тему: «Изучение культуральных свойств бактерий рода  
*Pseudomonas*, используемых в деструкции углеводов»

по специальности 5В070100 – «Биотехнология»

Выполнил

Артемов Алексей Сергеевич

Рецензент

Научный руководитель

к.б.н.

канд. с.-х. наук,

профессор кафедры биотехнологии

доцент,

факультета биологии и биотехнологии

ассоц. профессор

КазНУ им Аль-Фараби

Атамбаева Ш.А.  
подпись

" 30 " мая 2022 г

Джамалова Г.А.  
подпись

" 30 " мая 2022 г.

Консультант  
магистр техники и технологии,

Сериков Т.А.  
подпись

" 30 " мая 2022 г.

Алматы 2022

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет имени  
К.И. Сатпаева

Институт геологии и нефтегазового дела им. К. Турысова

Кафедра «Химическая и биохимическая инженерия»

5B070100 – «Биотехнология»

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой «ХиБИ»  
Доктор Ph.D.  
Амитова А.А.  
" 30 " мая 2022г



**ЗАДАНИЕ**  
на выполнение дипломной работы

Обучающемуся Артемов Алексей Сергеевич

Тема: «Изучение культуральных свойств бактерий рода *Pseudomonas*, используемых в деструкции углеводов»

Утверждена приказом Ректора Университета № 489-п от "24" декабря 2021 г.

Срок сдачи законченной работы " 9 " 06 2022г.

Исходные данные к дипломной работе: Культуральные свойства бактерий рода *Pseudomonas*

Краткое содержание дипломной работы:

- а) Количественный учет микроорганизмов;
- б) Изучение культуральных свойств бактерий рода *Pseudomonas*, выращенных на плотной питательной среде;
- в) Изучение культуральных свойств бактерий рода *Pseudomonas*, выращенных на жидкой питательной среде;

Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей): представлены 10 слайдов презентации работы.

Рекомендуемая основная литература: из 60 наименований

## ГРАФИК

подготовки дипломной работы (проекта)

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю	Примечание
Введение. Обзор литературы	Февраль, 2022	Теоретические исследования выполнены с соблюдением требований ГОСТ 7.32-2017
Объект, материал и методика исследований	Март 2022	Методика исследований проводилась с соблюдением требований ГОСТ 17.4.4.02-84; ГОСТ ISO 7218-2015
Результаты исследований	Май, 2022	Исследования проводились с соблюдением требований Приказа МЗ РК от 15.10.2021 г. № ҚР ДСМ-105

## Подписи

консультантов и нормоконтролера на законченную дипломную работу (проект) с указанием относящихся к ним разделов работы (проекта)

Наименования разделов	Консультанты, И.О.Ф. (уч. степень, звание)	Дата подписания	Подпись
Дипломная работа	Джамалова Г.А., к.с.х.н., доцент, ассоц. проф.	 30.05.22	
Объект, материал и методика исследований	Сериков Т.А., магистр техники и технологии, тьютор	 30.05.22	
Нормоконтролер	Джамалова Г.А., к.с.х.н., доцент, ассоц. проф.	 30.05.22	

Научный руководитель



Джамалова Г.А.

Задание принял к исполнению обучающийся



Артемов А. С.

Дата

"30" мая 2022 г.

## АННОТАЦИЯ

Дипломная работа выполнена на бумажном носителе в объеме 30 страниц (3,55 Мб на электронном носителе). Диплом включает введение (1 стр.), 3 раздела (13 стр.), заключение и выводы (1 стр.), библиографический список литературы из 60 наименований, 4 таблицы, 5 рисунков.

Влияние антропогенной активности в большинстве случаев существенно и наносит значительный урон окружающей среде. Соединения химической природы, не способные синтезироваться в обычных условиях, имеют малый показатель деградальности. С низкой скоростью, но данные соединения природой подвержены распаду – биодegradации. В данной работе рассматриваются бактерии рода *Pseudomonas*. Изучение культуральных свойств выделенных штаммов бактерий рода *Pseudomonas* позволяет, используя собранные данные, стать предпосылкой для проведения испытаний по изучению биодegradационной способности. Основой для принятия решения по изучению культуральных свойств бактерий рода *Pseudomonas* стали поллютанты углеводородной природы, образующиеся на предприятиях нефтяной промышленности.

Целью исследования было изучение культуральных свойств бактерий рода *Pseudomonas*, используемых в деструкции углеводородов, выделенные из почв, загрязненных нефтепродуктами.

Научная и практическая ценность работы заключалась в сборе и систематизации культуральных свойств выделенных штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, обладающих способностью к биодegradации углеводородов.

Для выполнения поставленных задач были изучены необходимые микробиологические методы исследования по ГОСТу и ISO. Были отобраны пробы почв, загрязнённые нефтепродуктами, с которыми проведены микробиологические исследования: подсчет обсеменённости, определение характера роста бактерий, описание макроморфологии.

Изучены особенности роста на плотных и жидких питательных средах и исследованы культуральные свойства бактерий рода *Pseudomonas*. Данная работа направлена на сбор данных и систематизацию по бактериям, выделенным из почв, загрязненных нефтепродуктами, *Pseudomonas*.

Ключевые слова: культуральные свойства, биоремедиация, нефть, почва, *Pseudomonas*.

## АҢДАТПА

Дипломдық жұмыс 30 бет көлемінде қағаз тасығышта орындалды (электрондық тасығыштағы 3,55 Мб). Диплом кіріспе (1 бет), 3 бөлім (13 бет), және қорытынды (1 бет), 60 атаудан тұратын әдебиеттердің библиографиялық тізімін, 4 кестені, 5 суреттерді.

Антропогендік белсенділіктің әсері көп жағдайда қоршаған ортаға айтарлықтай зиян келтіреді. Қалыпты жағдайда синтездеме алмайтын химиялық сипаттағы қосылыстар төмен деградацияға ие. Төмен жылдамдықта, бірақ бұл қосылыстар табиғатта ыдырауға ұшырайды-биодеградация. Бұл жұмыста *Pseudomonas* тектес бактериялар қарастырылады. *Pseudomonas* тектес бактериялардың таңдалған штамдарының культуралық қасиеттерін зерттеу жиналған деректерді пайдалану арқылы биодеградациялық қабілеттілікті зерттеу бойынша сынақтар жүргізудің алғышарты болуға мүмкіндік береді. *Pseudomonas* тектес бактериялардың культуралық қасиеттерін зерттеу бойынша шешім қабылдауға мұнай өнеркәсібі кәсіпорындарында пайда болатын көмірсутекті сипаттағы поллютанттар негіз болды.

Зерттеудің мақсаты мұнай өнімдерімен ластанған топырақтан оқшауланған көмірсутектерді жоюда қолданылатын *Pseudomonas* тектес бактериялардың культуралық қасиеттерін зерттеу болды.

Жұмыстың ғылыми және практикалық құндылығы көмірсутектерді биодеградациялау қабілеті бар *Pseudomonas* тектес бактериялардың таңдалған штамдарының дақылдық қасиеттерін жинау және жүйелеу болды.

Қойылған міндеттерді орындау үшін ГОСТ және ISO бойынша қажетті микробиологиялық зерттеу әдістері зерттелді. Мұнай өнімдерімен ластанған топырақ сынамалары алынды, олармен микробиологиялық зерттеулер жүргізілді: ластануды есептеу, бактериялардың өсу сипатын анықтау, макроморфологияны сипаттау.

*Pseudomonas* бактерияларының культуралық қасиеттері зерттелді және тығыз және сұйық қоректік орталарда өсу ерекшеліктері зерттелді. Бұл жұмыс *Pseudomonas* мұнай өнімдерімен ластанған топырақтан оқшауланған бактериялар бойынша мәліметтер жинауға және жүйелеуге бағытталған.

Түйінді сөздер: дақылдық қасиеттер, биоремедиация, мұнай, топырақ, *Pseudomonas*.

## ANNOTATION

The thesis is written on paper in the amount of 30 pages (3,55 Mb on electronic media). The diploma includes an introduction (1 pages), 3 sections (13 pages), a conclusion and conclusions (1 page), a bibliographic list of references from 60 titles, 4 tables, 5 drawings.

The impact of anthropogenic activity in most cases is significant and causes significant damage to the environment. Compounds of a chemical nature that cannot be synthesized under normal conditions have a low degradability index. At a low rate, but these compounds are naturally subject to decay - biodegradation. In this work, bacteria of the genus *Pseudomonas* are studied. The study of the cultural properties of the isolated strains of bacteria of the genus *Pseudomonas* makes it possible, using the collected data, to become a prerequisite for conducting tests to study the biodegradation ability. The decision to study the cultural properties of bacteria of the genus *Pseudomonas* was based on the pollutants of a hydrocarbon nature, which are formed at the enterprises of the oil industry.

The aim of the study was to study the cultural properties of bacteria of the genus *Pseudomonas* used in the destruction of hydrocarbons, isolated from soils contaminated with oil products.

The scientific and practical value of the work consisted in the collection and systematization of the cultural properties of the isolated strains of bacteria of the genus *Pseudomonas*, which have the ability to biodegrade hydrocarbons.

To accomplish the tasks set, the necessary microbiological research methods were studied according to GOST and ISO. Soil samples, polluted with oil products, were taken, with which microbiological studies were carried out: calculation of seeding, determination of the character of bacterial growth, description of macromorphology.

The features of growth on solid and liquid nutrient media and the cultural properties of *Pseudomonas* bacteria were studied. This work is aimed at collecting data and systematizing the bacterium isolated from soil contaminated with oil products, *Pseudomonas*.

Keywords: cultural properties, bioremediation, oil, soil, *Pseudomonas*.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение	9
1 Обзор литературы	10
1.1 Биология бактерий рода <i>Pseudomonas</i>	10
1.2 Культуральные свойства бактерий рода <i>Pseudomonas</i>	11
1.3 Биодegradационные свойства бактерий рода <i>Pseudomonas</i>	12
2 Объект, материалы и методика исследований	15
2.1 Объект и предмет исследования	15
2.2 Методы исследования	15
2.3 Материалы исследования	16
3 Результаты исследования	18
3.1 Отбор проб почвы	18
3.2 Посев на плотную питательную среду	18
3.3 Изучение культуральных свойств бактерий рода <i>Pseudomonas</i> , выращенных на плотной питательной среде	18
3.4 Перевод культуры в жидкую питательную среду	20
3.5 Изучение культуральных свойств бактерий рода <i>Pseudomonas</i> , выращенных на жидкой питательной среде	21
Заключение и выводы	23
Библиографический список литературы	24

## ВВЕДЕНИЕ

*Актуальность.* Антропогенная активность оказывает существенное влияние на состояние природной среды, являясь источником образования и аккумуляции различных ксенобиотиков, например, поллютантов углеводородной природы, которые, как известно, образуются на предприятиях нефтяной промышленности. Очевидность негативного воздействия поллютантов углеводородной природы на объекты окружающей среды послужило основой для принятия решения, направленного на изучение культуральных свойств выделенных штаммов бактерий рода *Pseudomonas*. Исследования, направленные на изучение и последующую систематизацию культуральных свойств у выделенных штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, актуальны, т.к. такие исследования являются предпосылкой для проведения испытаний по изучению у исследуемых штаммов биодegradационной способности.

*Объект исследования.* Бактерии рода *Pseudomonas*, выделенные из почв, загрязненные нефтепродуктами.

*Цель исследования.* Изучение культуральных свойств бактерий рода *Pseudomonas*, используемых в деструкции углеводородов.

Задачи исследования направлены:

- 1) на изучение микробиологических методов исследования:
  - 1.1) метода предельного разведения,
  - 1.2) метода посева на плотные питательные среды,
  - 1.3) метода изучения культуральных свойств;
- 2) на подсчет колоний (количественный учет колоний), выросших на питательной среде *Pseudomonas Isolation Agar Base*;
- 3) на определение характера роста бактерий рода *Pseudomonas* на плотной питательной среде:
  - 3.1) учёт формы, размера, контура, структуры и рельефа колоний,
  - 3.2) учёт поверхности, цвета и консистенции колоний.

*Научная и практическая значимость.* Изучение и последующая систематизация культуральных свойств выделенных штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, обладающих способностью к биодegradации углеводородов.

Результаты работы позволят, во-первых, облегчить лабораторные исследования, во-вторых, повысить эффективность промышленного применения бактерий рода *Pseudomonas*. Кроме того, полученные результаты могут быть использованы при подготовке академических занятий по теме «Изучение культуральных свойств бактерий рода *Pseudomonas*, используемых в деструкции углеводородов».

Структура и объем дипломной работы. Дипломная работа по теме «Изучение культуральных свойств бактерий рода *Pseudomonas*, используемых в деструкции углеводородов» подготовлена на 30 страницах машинописного текста, включает 5 рисунков, 4 таблицы, 60 научных литературных источников.

## 1 Обзор литературы

### 1.1 Биология и экология бактерий рода *Pseudomonas*

#### 1.1.1 Краткая характеристика бактерий рода *Pseudomonas*

*Pseudomonas* — это подвижные, не образующие спор грамотрицательные палочковидные бактерии, принадлежащие к классу гаммапротеобактерий [1]. Обладают строгим аэробным дыхательным метаболизмом с использованием кислорода, в некоторых случаях в качестве альтернативы используются нитраты для обеспечения анаэробного роста [2]. Другие характеристики, связанные с видами *Pseudomonas* (за некоторыми исключениями), включают секрецию пиовердина и флуоресцентного желто-зеленого сидерофора в условиях дефицита железа [3]. Некоторые виды могут продуцировать дополнительные типы сидерофоров, такие как пиоцианин (*Pseudomonas aeruginosa*) и тиохинолобактин (*Pseudomonas fluorescens*) [4]. Способны колонизировать и процветать в разнообразных экологических нишах [1].

подавляющее большинство являются комменсалами, но также могут использоваться в качестве агентов биоремедиации, биостимуляции и биоконтроля [5]. Являются выдающимися продуцентами биоактивных вторичных метаболитов, которые часто поддерживают их образ жизни (удаление железа, роевая подвижность, образование биопленок, патогенность, кооперацию, антагонизм) [6, 7].

#### 1.1.2 Таксономия бактерий рода *Pseudomonas*

Род *Pseudomonas* — большая и сложная гетерогенная группа микроорганизмов, принадлежащих к семейству *Pseudomonadaceae*, включает 211 описанных видов, которые объединены в семь групп и линий на основе ограниченного набора локусов, 56 из которых реклассифицированы в другие роды. Постоянно подвергаются непрерывному таксономическому пересмотру в связи с усовершенствованием методологий идентификации видов [2, 8, 9].

#### 1.1.3 Видовое разнообразие бактерий рода *Pseudomonas* [10]

Ряд видов хорошо изучен в силу своей патогенности для человека и растений, например, *P. aeruginosa* или *P. syringae*, либо потому, что они считаются безвредными и обладают интересными свойствами биодеградациии, в то время как другие могут продуцировать вторичные метаболиты с антимикробным действием. *P. putida* KT2440 признан безопасным (сертифицирован GRAS) для экспрессии гетерологичных генов и преобразован в генетически доступную лабораторную и промышленную «рабочую лошадку».

На данное время общедоступны полные и предварительные геномы 432 штаммов, распределенных по 33 видам.

## 1.2 Культуральные свойства бактерий рода *Pseudomonas*

### 1.2.1 Характеристика колоний бактерий рода *Pseudomonas*

Бактерии рода *Pseudomonas* образует большие, непрозрачные, плоские колонии с неровными краями и колонии с отчетливым фруктовым запахом. Изоляты из образца почвы и воды образуют небольшие круглые колонии [11].

1.2.2 Характеристики штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, используемые для идентификации видов рода [12]:

#### а) Традиционные свойства:

- Морфология (форма, размер клеток) и расположение (отдельные клетки, клетки парами и/или цепочками);
  - Подвижность и, если она присутствует, исследования жгутиков (количество, вставка, длина, длина волны);
  - Химические свойства запасных веществ, если они есть;
  - Пигменты (связанные с клетками или диффундирующие, проявляющиеся под действием УФ-излучения с низкой длиной волны);
  - Температурный режим;
  - Требования к фактору роста;
  - Оксидазная реакция;
  - Гидролиз желатина, крахмала, твина 80, лецитина (желтковая реакция);
  - Образование левана из сахарозы;
  - Аргининдигидролазная реакция;
  - Кольцевые механизмы деления;
  - Использование источников углерода;
  - Использование источников азота, снижение содержания нитратов, денитрификация;
  - Метаболические пути;
  - Регуляторные механизмы;
- #### б) Молекулярная характеристика:
- Базовый состав ДНК;
  - Гибридизация нуклеиновых кислот (ДНК-ДНК, рРНК-ДНК);
  - Последовательности нуклеиновых кислот;
  - Аминокислотная последовательность белков.

При обычном анализе бактерий этого рода исследуются не все эти свойства, а в ряде случаев наиболее существенные достаточны для ориентировки и последующей характеристики. Например, внешний вид колоний многих штаммов *Pseudomonas stutzeri* или образование диффундирующего зеленоватого пигмента организмами группы флуоресцирующих [13, 14, 15, 16].

*Характер пигментации.* Характер пигментации имеет важное место среди диагностических признаков некоторых видов. Пигментация является одним из самых неустойчивых из всех фенотипических признаков [17, 18].

Диффундирующие пигменты, которые флуоресцируют под действием ультрафиолетового (УФ) излучения с короткой длиной волны (около 254 нм), в совокупности называются «флуоресцентными пигментами» и характеризуют виды, помещенные в флуоресцентную группу. Другие распространенные пигменты (синий, красный, желтый или зеленый) относятся к химическому семейству феназинов; некоторые из них нерастворимы, а другие диффундируют в среду. Некоторые растворимые феназиновые пигменты флуоресцируют под действием длинноволнового УФ-излучения (около 350 нм), что является важным отличием от «настоящих» флуоресцентных пигментов, описанных ранее [19].

*Особенности питательных сред для роста.* Все хорошо охарактеризованные виды этого рода не зависят от особых потребностей в питании и могут расти на простых средах, содержащих фосфат при рН, близком к нейтральному, сульфат магния, хлорид аммония и следовые количества железа и кальция, обычно обеспечиваемые смесью цитрат железа(III)-аммония и хлорида кальция. К этой среде следует добавить источник углерода, идеально в концентрации от 0,1 до 0,2% (об. /вес.) [13]. Некоторые субстраты токсичны при указанных концентрациях, но рост можно обнаружить при концентрациях в десять-двадцать раз меньших [18]. Хорошо растут на стандартных бульонах и плотных средах, таких как кровяной агар, шоколадный агар и агар МакКонки. Селективный агар, содержащий ингибиторы, такие как цетримид, также можно использовать для выделения и предполагаемой идентификации [20].

*Оксидазная реакция.* Оксидазная реакция положительна для большинства видов *Pseudomonas*, но отрицательна для флуоресцентных патогенов растений. Положительная реакция связана с наличием цитохрома с в клетки [21].

*Образование левана из сахарозы.* Образование левана из сахарозы можно определить на различных средах с высокой концентрацией (4%) дисахарида. Это свойство обнаружено у некоторых биоваров *Pseudomonas fluorescens* [22].

*Реакция с аргининдигидролазой.* Реакция с аргининдигидролазой осуществляется в анаэробных условиях некоторыми видами, и ее можно проверить прямым химическим определением исчезновения аргинина или появления орнитина, а также, менее конкретно, изменением рН [23, 24]. Как таксономический признак, реакция очень удовлетворительно коррелирует со многими другими фенотипическими свойствами и поэтому представляется очень ценной [25].

Виды *Pseudomonas* обычно мезофильны; некоторые, такие как *P. fluorescens*, могут расти при 4°C и иногда могут быть идентифицированы в составе психрофильной флоры, ответственной за порчу пищевых продуктов [26].

### **1.3 Биодegradационные свойства бактерий рода *Pseudomonas***

#### **1.3.1 Краткая характеристика процесса биодegradации**

Биодegradация — технология биоремедиации органических загрязнителей, использующая метаболическую универсальность микроорганизмов для разложения опасных загрязнителей [27]. Бактериальная дегradация загрязняющих веществ предотвращает их сохранение в окружающей среде, а также загрязнение

водных ресурсов в результате выщелачивания [28]. Распространение бактерий и перенос массы субстрата считаются ключевыми факторами для эффективного биоразложения, поскольку оба процесса помогают преодолеть пространственное разделение, что приводит к увеличению вероятности контакта между бактериями и загрязняющими веществами в пространственно неоднородной среде, такой как почва [29]. Подвижные бактерии, например, могут активно диспергироваться в поровой воде и распространяться по плотным мицелиальным сетям, образованным грибами, что приводит к усилению биodeградации [30].

### 1.3.2 Биodeградационные свойства бактерий рода *Pseudomonas*

Способность к быстрому росту и деструкции поллютантов углеводородной природы обнаруживается у представителей рода *Pseudomonas*. Это можно объяснить присутствием у бактерий данного рода широкого набора биологических свойств, которые позволяют бактериям эффективно утилизировать данные соединения и использовать их в качестве источника углерода. Ключевые из них: ферментативный аппарат клетки бактерий (главным образом оксидаз), окисляющих углеводороды; при росте на углеводородах повышается уровень гидрофобности клеточной стенки; способность к синтезу ПАВ (поверхностно-активные вещества) [31-39].

### 1.3.3 Генетические основы биodeградационных свойств бактерий рода *Pseudomonas*

Бактерии рода *Pseudomonas* имеют гены, обладающие биodeградационными свойствами (разлагают различные органические вещества, в т.ч. n-алканов, гетероциклических соединений, моно- и полициклических ароматических углеводородов), адаптированные к изменяющимся условиям окружающей среды (осуществляют горизонтальный перенос генов, обеспечивая интенсификацию процессов биodeградации) и расположенные на хромосомах и плазмидах [40-44].

### 1.3.4 Некоторые биодеструкторы – представители рода *Pseudomonas*

В исследовании Джусуповой Д.Б. в Республике Казахстан из образцов нефтезагрязненных почв, портовых и сточных вод и активного ила были выделены бактерии видов *P.aeruginosa*, *P.alcaligenes*, *P.mallei*, *P.mendocina*, *P.pseudocalcaligenes*, *P.putida*, *P.stutzeri*, способные использовать углеводороды (при их концентрации в среде 2-10 г/л) в качестве единственного источника углерода и энергии. Наибольшей активностью обладали штаммы *P. aeruginosa* и *P. mendocina*, для которых степень разложения углеводородов находилось в интервале от 72,5-87,5 (нефть) до 85-86 (толуол) и 86-90 (дизельное топливо) % соответственно [45]. В исследовании Varjani S.J., штамм *P. aeruginosa* NCIM 5514, способный утилизировать сырую нефть в качестве единственного источника углерода и энергии, был изолирован из загрязненной нефтью почвы (штат Гуджарат, Индия). Микроорганизм является галотолерантным (растет при 5% NaCl) и продуцирует биосурфактант, который является смесью дирамнолипида и монорамнолипида [46, 47].

### 1.3.5 *Pseudomonas* – деструкторы ПАУ

Многие представители рода *Pseudomonas* способны к деструкции и очистке окружающей среды от ПАУ [48, 49, 50, 51, 52]. Показано, что при использовании штаммов вида *P. putida* для очистки почвы, загрязненной ПАУ после двух месяцев полевого эксперимента концентрация нафталина уменьшилась на 63,6%, а пирена – на 96,6% [53].

### 1.3.6 Психрофильные *Pseudomonas* – деструкторы

Многие псевдомонады-нефтедеструкторы функционируют в широком диапазоне температур (в т.ч. и при низких положительных, например, штамм *P. azotoformans* при +6°C) [54, 55] и обладают микостатической активностью к патогенным микроорганизмам [54, 55, 56].

## **2 Объект, материал и методика исследования**

### **2.1 Объект и предмет исследования**

Объект исследования. Бактерии рода *Pseudomonas*, выделенные из почв, загрязненных нефтепродуктами.

Предмет исследования. Культуральные свойства бактерий рода *Pseudomonas*, используемых в деструкции углеводородов, в частности:

- определение характера роста бактерий рода *Pseudomonas* на плотной и жидкой питательных средах;
- учёт формы, размера, контура, структуры и рельефа колоний;
- учёт поверхности, цвета и консистенции колоний;
- учёт степени помутнения, особенностей пленки, образования осадка (для жидкой питательной среды);
- измерение оптической плотности и коэффициента пропускания;
- количественный учет колоний.

### **2.2 Методы исследования.**

#### **2.2.1 Методика отбора образцов проб почвы.**

Отбор образцов почвы производили в соответствии с межгосударственным стандартом ГОСТ 17.4.4.02-2017. Отбор проб производили на пробной площадке методом конверта. Объединенная проба составлялась посредством смешивания трех точечных проб [57].

#### **2.2.2 Методики приготовления жидких и твердых питательных сред.**

Подготовку лабораторной посуды осуществляли в соответствии со стандартом ГОСТ ISO 7218—2015 [58].

Приготовление питательных сред производили в соответствии с инструкцией, предоставленной производителем. После разведения порошковой питательной среды дистиллированной водой производили паровую стерилизацию в автоклаве при температурном режиме 120°C согласно ГОСТ ISO 11133-2016 [59].

Разлив питательной среды в чашки Петри проводили предварительно перед посевом согласно ГОСТ ISO 7218-2015. Чашки помещали на холодную горизонтальную поверхность, чтобы дать время охладиться и затвердеть питательной среде [58].

#### **2.2.3 Методика посева на твердые питательные среды.**

Для подготовки посевного материала использовали метод разведения. Сущность метода: навеска почвы подвергается суспендированию в 100 мл. дистиллированной воды, после чего полученной суспензии необходимо дать отстояться.

Далее из полученной суспензии отбирают 1 мл. жидкости и переносят в пробирку, заполненную 9 мл. дистиллированной воды, после чего тщательно встряхивают (разведение 1:1000). Из пробирки с первым разведением отбирают 1 мл жидкости и переносят во вторую с 9 мл дистиллированной воды (разведение 1:10000). Разведение проводили согласно ГОСТ 26670-91 [60].

Посев на плотную питательную среду осуществляли поверхностным методом согласно ГОСТ-26670-91. Сущность метода: посев производится отдельно из второго и третьего разведений на две отдельные чашки Петри путем отбора суспензии в количестве 0.05 мл., нанесения на питательную среду и равномерного размазывания Т-образным шпателем [60]. Посеянные культуры переместили в термостат для дальнейшего культивирования.

#### 2.2.4 Методика посева на жидкие питательные среды.

Перевод культуры в жидкую питательную среду производили с применением бактериологической петли, соблюдая условия стерильности. Материал, внесенный в жидкую питательную среду, растирали по стенке колбы, после чего тщательно встряхивали. Посеянные культуры переместили в термостат для дальнейшего культивирования.

### 2.3 Материалы исследования.

Исследования осуществляли с применением лабораторного оборудования (ламинарного бокса, автоклава, спектрофотометра, термостата) и лабораторных приборов (стеклянная лабораторная посуда, спиртовая горелка, бактериологические петли, Т-образные шпатели). Перечень и технические характеристики лабораторного оборудования и приборов приведены в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Лабораторное оборудование и приборы

Наименование	Технические характеристики	Целевое назначение
1	2	3
Ламинарный бокс ВО-120-РР-В; II класс защиты	Уровень очистки - ISO 5 / CLASS 100. Фильтры - ULPA H15	Работа с био-объектами в стерильных условиях
Автоклав паровой ВК-75-01 модернизированная версия	Масса, кг – 120. Объем автоклавируемой камеры, л – 75. Режимы работ: t, °С; давление, Мпа; время, мин 132° - 0,2 – 20 и 120° - 0,11 – 45	Стерилизация

1	2	3
Термостат электрический сухо-воздушный ТС-1/80 СПУ	Максимальный температурный диапазон культивирования, °С - +5 - +60	Термостатирование
Спектрофотометр УФ и видимой области Nanon i3	Диапазон длин волн, нм - 190 – 1100. Ширина полосы, нм – 2	Измерение оптической плотности и коэффициента пропускания
Лабораторные приборы	1. Лабораторная стеклянная посуда: 1.1 Пробирки и колбы. 1.2 Мерные стаканы 2. Инструменты для манипуляции: 2.1 Бактериологическая петля. 2.2 Т-образный шпатель. 3. Инструменты для стерилизации: 3.1 Спиртовая горелка	Специализированные емкости и приспособления для микробиологических исследований
Питательные среды и реактивы:		
Глицерин	Трехатомный спирт.	Углеводородный субстрат для роста микроорганизмов
<i>Pseudomonas Isolation Agar Base</i> , г/л	Пептический перевар тканей животных 20,0 Хлорид магния 1,40 Сульфат калия 10,0 Триклозан (Иргасан) 0,025 Агар 13,600 Конечный рН (при 25°С) 7,0±0,2	Селективная среда для культивирования бактерий рода <i>Pseudomonas</i>
Nutrient Broth г/л	Пептон 5,0 Хлорид натрия 5,0 Пептон НМ В# 1,5 Экстракт дрожжей 1,5 Конечный рН (при 25°С) 7,4±0,2	Жидкая питательная среда для культивирования

### 3 Результаты исследования

#### 3.1 Отбор проб почвы

Отбор проб почвы, загрязненной нефтепродуктами, производили на объекте по предоставлению услуг технического обслуживания и ремонта автотранспорта. Отбор точечных проб производили методом конверта, с помощью стерильного шпателя, согласно ГОСТ 17.4.4.02-2017, с глубины 0-5 и 5-20 см. Объединенная проба составлялась из трех точечных проб массой 200 г. каждая [57].

#### 3.2 Посев на плотную питательную среду

Посевной материал подготовили путем суспендирования навески почвы массой 1 г. в 100 мл. дистиллированной воды согласно ГОСТ-26670-91 [60]. Последующие разведения (1:1000, 1:10000) проводили в стерильных условиях ламинарного бокса. Посев производили на плотную селективную питательную среду *Pseudomonas Isolation Agar Base* с добавлением глицерина в качестве углеводородного субстрата, обеспечивающего рост микроорганизмов (рисунок 3.1).

Посев проводили из каждого из двух разведений в стерильных условиях ламинарного бокса, после чего культуры были перенесены в термостат для культивирования при температуре 29°C. Время культивирования составило 20 часов.



Рисунок 3.1 – Питательная среда *Pseudomonas isolation agar base*

#### 3.3 Изучение культуральных свойств бактерий рода *Pseudomonas*, выращенных на плотной питательной среде

Рост на плотной питательной среде происходит с образованием небольших круглых колоний, соответствует характерному для представителей рода *Pseudomonas*, выделенных из почв. Наибольший рост демонстрирует посев из разведения 1:1000. Подсчет колоний производили через 20 часов после культивирования. Количество колоний для разведения 1:1000 составило 108, для разведения 1:10000 – 20 (рисунок 3.2).

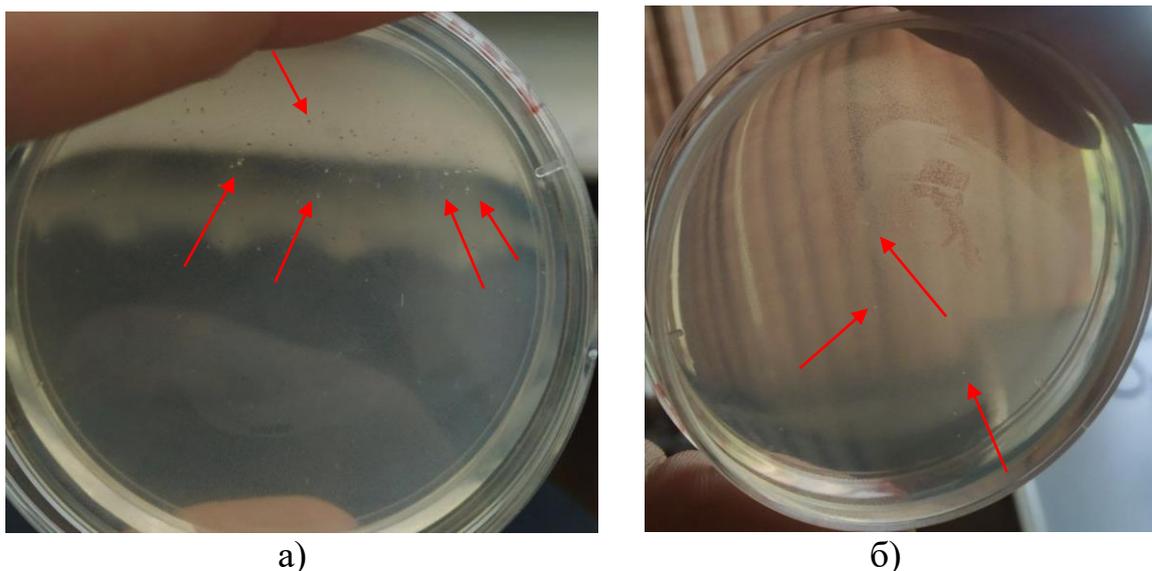


Рисунок 3.2 – Культивированные в течение 20 часов посевы из разведений:  
а) разведение 1:1000; б) разведение 1:10000

Расчет количества микроорганизмов в одном миллилитре суспензии провели на основе разведения 1:1000 согласно формуле (1):

$$N = \frac{a \cdot 10^n}{V} \quad (1)$$

Где  $N$  – количество микроорганизмов в 1 мл суспензии, КОЕ/мл;

$a$  – число колоний на чашке Петри;

$V$  – объем суспензии взятый для посева, мл;

$n$  – кратность разведения.

Результаты вычислений занесли в таблицу 3.3.

Таблица 3.3 – Расчет количества микроорганизмов в одном миллилитре суспензии

Число колоний на чашках Петри	Объем суспензии, взятый для посева, мл	Кратность разведения	Количество микроорганизмов в 1 мл суспензии, КОЕ/мл	$C_v$ , %
108	0,05	5	$(5,4 \pm 0,1) \cdot 10^6$	48

При пересчете в КОЕ/г количество микроорганизмов в одном грамме пробы почвы составило  $(5,4 \pm 0,1) \cdot 10^6$  КОЕ/г.

Культуральные свойства определяли посредством визуального осмотра, через 20 часов после начала культивирования. Рост на плотной питательной среде характеризуется отсутствием пигментации и образованием колоний, однородных по морфологии. Культуральные свойства приведены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Культуральные свойства полученных бактерий рода *Pseudomonas* на плотной питательной среде

Колонии через 20 часов после начала культивирования	Культуральные свойства	Описание
	Форма колоний	Круглая
	Размер	0,3 – 0,5 мм, точечный
	Прозрачность	Непрозрачные
	Контур края	Гладкий
	Профиль колоний	Плоский
	Поверхность колоний	Гладкая
	Цвет	Бесцветные
	Консистенция	Плотная
	Пигментация	Отсутствует

### 3.4 Перевод культуры в жидкую питательную среду

Перевод культуры в жидкую питательную среду Nutrient Broth, объемом 100 мл. (Рисунок 3.3) осуществляли в стерильных условиях ламинарного бокса, с применением микробиологической петли, предварительно стерилизованной прокаливанием в пламени спиртовой горелки. Посев произвели в две колбы. Для изучения культуральных свойств культуры в жидких питательных средах были помещены в термостаты для культивирования при температуре 28°C и 34°C.



Рисунок 3.3 – Питательная среда Nutrient Broth

### 3.5 Изучение культуральных свойств бактерий рода *Pseudomonas*, выращенных на жидкой питательной среде

Рост культуры на жидкой питательной среде сопровождается образованием серебристой пленки на поверхности, а также умеренным помутнением для питательной среды с температурой культивирования 28°C и сильным для среды с температурой 34°C (рисунок 3.4). Рост на жидких питательных средах соответствует характерному для представителей рода *Pseudomonas*.

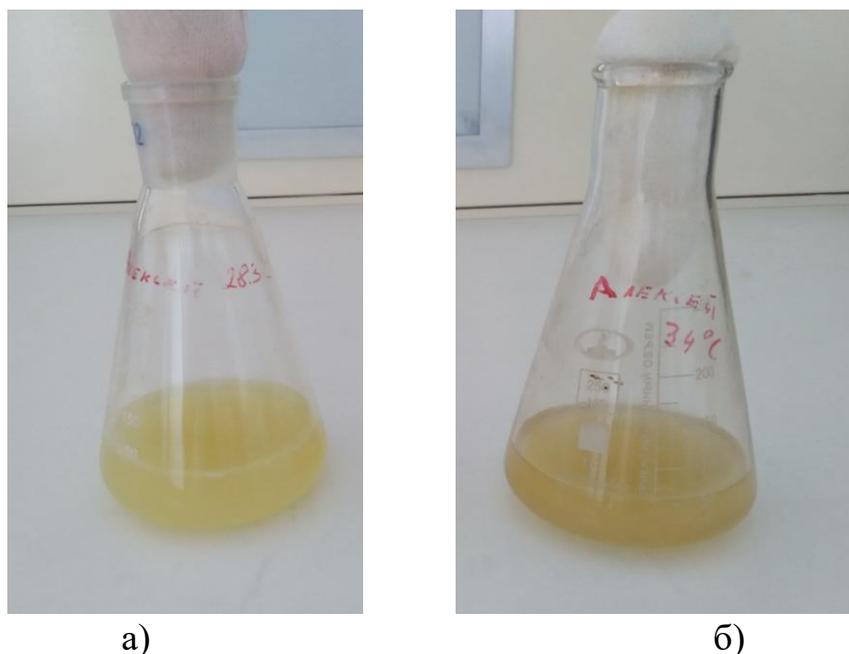


Рисунок 3.4 – Рост культуры на жидкой питательной среде при температуре культивирования: а) температура культивирования 28°C; б) температура культивирования 34°C

Таблица 3.5 – Показатели оптической плотности и коэффициента пропускания.

Время, час	Температура термостата, °C	Оптическая плотность	Коэффициент пропускания, %
24	28	1,014	9,64
	34	0,531	29,6
48	28	1,856	1,29
	34	1,813	1,51
72	28	1,962	1,09
	34	1,874	1,34

Для измерения оптической плотности и коэффициента пропускания был использован спектрофотометр УФ и видимой области Nanon i3. Данные показатели замеряли для выявления скорости роста культур, полученных на плотной питательной среде Pseudomonas Isolation Agar Base и переведенных в жидкую среду Nutrient Broth. Полученные результаты отражены в таблице 3.5 и в рисунке 3.5 в виде графика.

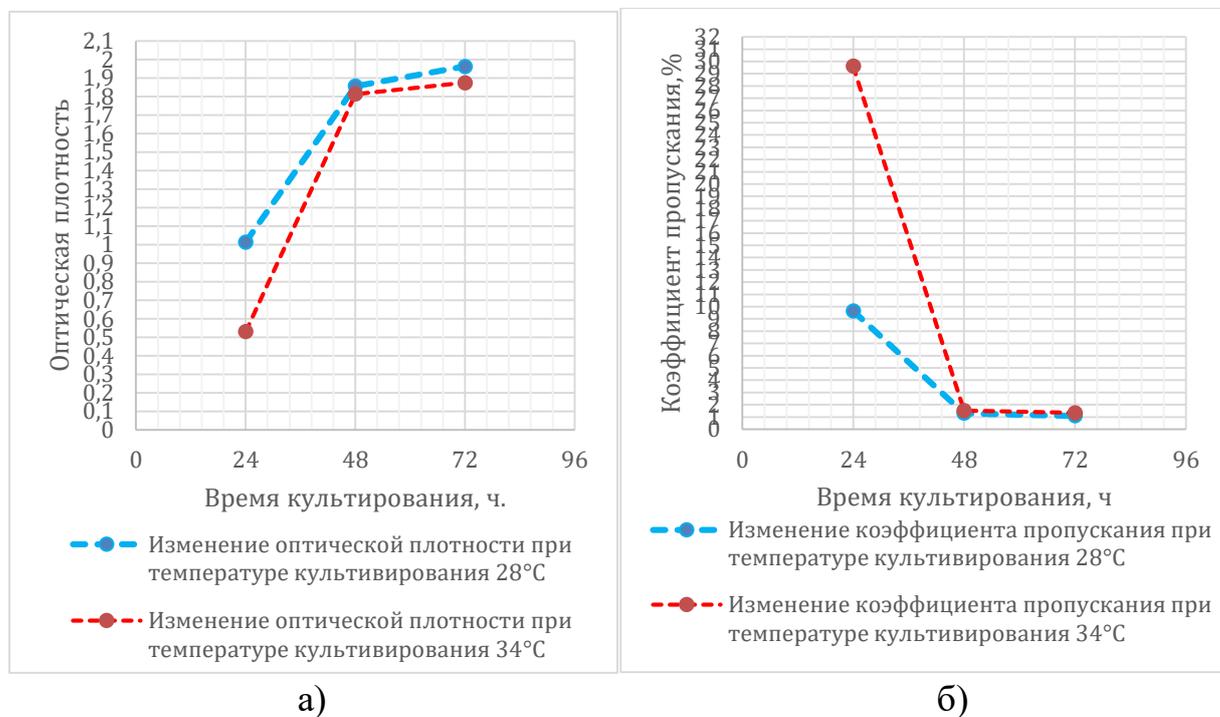


Рисунок 3.5 – График изменения в зависимости от времени культивирования: а) оптической плотности; б) коэффициента пропускания

По рисунку 3.5, судя по альтитуде графика, видно, что для культуры более оптимальной является температура в 28°C, чем в 34°C, несмотря на высокую динамику роста. Оба температурных режима благоприятны, так как спустя 24 часа оптическая плотность составляет 1,014 и 0,531 для 28°C и 34°C соответственно. На второй день динамика роста составляет +83% для режима 28°C, и + 241,4% для режима 34°C. В дальнейшем рост приостанавливается, динамика падает до 5,7% (28°C) и до 3,7% (34°C). Максимальная отметка роста с оптической плотностью в 1,962 принадлежит культуре, выросшей при температуре 28°C. Это на 4,6% больше, чем при режиме культивирования 34°C. Падение скорости роста обуславливается тем, что питательная среда при таком быстром росте становится недостаточной, то есть организмы находятся в стационарной фазе роста.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Исследованы культуральные свойства бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из почв, загрязненных нефтепродуктами.

Выводы:

- Культуральные свойства штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из почв, загрязненных нефтепродуктами, соответствуют характерным для представителей данного вида;
- Изучены особенности роста бактерий рода *Pseudomonas* на плотных и жидких питательных средах;
- Установлена оптимальная температура роста при культивировании бактерий в жидких средах, равная 28°C.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Cedar Hesse, Frederik Schulz, Carolee T. Bull, Brenda T. Shaffer, Qing Yan, Nicole Shapiro, Karl A. Hassan, Neha Varghese, Liam D.H. Elbourne, Ian T. Paulsen, Nikos Kyrpides, Tanja Woyke, Joyce E. Loper Genome-Based Evolutionary History of *Pseudomonas* Spp // *Environ. Microbiol.* - 2018. - № 20(6). - pp. 2142–2159. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14130>.
- 2 Versalovic J., Carroll K., Funke G., Jorgensen J., Landry M., Warnock D. *Manual of Clinical Microbiology 10<sup>th</sup> Edition* // Washington DC: ASM press. - 2011. – 2552 p.
- 3 Meyer J.M., Geoffroy V.A., Baida N., Gardan L., Izard D., Lemanceau P., Achouak W., Palleroni N.J. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads // *Appl Environ Microbiol.* - 2002. - №68(6). - pp. 2745-2753. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2745-2753.2002>.
- 4 Lau G.W., Hassett D.J., Ran H., Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection // *Trends Mol Med.* - 2004. - № 10(6). - pp. 599-606. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>.
- 5 Wasi S., Tabrez S., Ahmad M. Use of *Pseudomonas* spp. for the Bioremediation of Environmental Pollutants: A Review // *Environ. Monit. Assess.* - 2013. - № 185(10). - pp. 8147-8155. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3163-x>
- 6 Gross H., Loper, J.E. Genomics of Secondary Metabolite Production by *Pseudomonas* spp // *Nat. Prod. Rep.* - 2009. - № 26. - pp. 1408–1446. <https://doi.org/10.1039/b817075b>
- 7 Götze S., Stallforth P. Structure elucidation of bacterial nonribosomal lipopeptides // *Org. Biomol. Chem.* - 2020. - № 18(9). - pp. 1710–1727. <https://doi.org/10.1039/c9ob02539a>
- 8 Gillespie S.H., Hawkey P.M. *Principles and practice of clinical bacteriology.* – 2<sup>nd</sup> Edition. - Chichester, West Sussex, England; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2006. - 605 p.
- 9 LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature // URL: <https://www.bacterio.net/> (Accessed: 18.05.2022).
- 10 Loper J.E., Hassan K.A., Mavrodi D.V., Davis E.W. 2nd, Lim C.K., Shaffer B.T., Elbourne L.D., Stockwell V.O., Hartney S.L., Breakwell K., Henkels M.D., Tetu S.G., Rangel L.I., Kidarsa T.A., Wilson N.L., van de Mortel J.E., Song C., Blumhagen R., Radune D., Hostetler J.B., Brinkac L.M., Durkin A.S., Kluepfel D.A., Wechter W.P., Anderson A.J., Kim Y.C., Pierson L.S. 3rd, Pierson E.A., Lindow S.E., Kobayashi D.Y., Raaijmakers J.M., Weller D.M., Thomashow L.S., Allen A.E., Paulsen I.T. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions // *PLoS Genet.* - 2012. - № 8(7). – pp. 1-27. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002784>
- 11 Paushali, Tyagi M. Biopesticide formulation of pseudomonas for growth of tomato plant // *Biotechnology International.* - 2017. - № 10(3). - pp. 59-63.
- 12 Emanuel Goldman Lorrence H. *Green Practical handbook of microbiology.* – 2<sup>nd</sup> Edition // Boca Raton: CRC Press. - 2008. - 877 p.

13 Palleroni N.J., Doudoroff M.J. Some Properties and Taxonomic Sub-Divisions of the Genus *Pseudomonas* // Annual Review of Phytopathology. - 1972. - №10. - pp. 73-100.

14 Van Niel C.B., Allen M.B. A note on *Pseudomonas stutzeri* // Journal of Bacteriology. - 1952. - №64(3). - pp. 413-422. <https://doi.org/10.1128/jb.64.3.413-422.1952>

15 Jessen O. *Pseudomonas aeruginosa* and other green fluorescent pseudomonads. A taxonomic study // Copenhagen: Munksgaard, 1965. – 244 p.

16 Palleroni N.J., Doudoroff M., Stanier R.Y., Solánes R.E., Mandel M. Taxonomy of the aerobic pseudomonads: the properties of the *Pseudomonas stutzeri* group // Journal of general microbiology. - 1970. - № 60(2). - pp. 215-231. <https://doi.org/10.1099/00221287-60-2-215>

17 Sneath, P.H.A. A study of the bacterial genus *Chromobacterium* // Iowa State J. Sci. - 1960. - № 34(4). - pp. 245-500.

18 Stanier R.Y., Palleroni N.J., Doudoroff M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study // Journal of general microbiology. - 1966. - № 43(2). - pp. 159-271. <https://doi.org/10.1099/00221287-43-2-159>

19 Krieg N.R., Holt J.G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. -1<sup>st</sup> edition. - Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. - 718 p.

20 Standards Unit, Microbiology Services, PHE "UK Standards for Microbiology Investigations". Published 1 August 2014. URL: <https://www.gov.uk/government/collections/standards-for-microbiology-investigations-smi> (Accessed: 18.05.2022).

21 Buchanan R.E. A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria with Methods and Digests of Generic Characteristics.: Second Edition // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. - 1968. - №18(3). – pp. 276-278. <https://doi.org/10.1099/00207713-18-3-276>.

22 Fuchs A. On the synthesis and breakdown of levan by bacteria // Delft: Uitgeverij Waltman. - 1959. – 178 p.

23 Sherris J.C., Preston N.W., Shoosmith J.G. The influence of oxygen on the motility of a strain of *Pseudomonas* sp. // J. Gen. Microbiol. - 1957. - № 16(1). - pp. 86-96. <https://doi.org/10.1099/00221287-16-1-86>

24 Sherris J.C., Shoosmith J.G., Parker M.T., Breckon D. Tests for the rapid breakdown of arginine by bacteria: their use in the identification of pseudomonads // J. Gen. Microbiol. - 1959. - №21. - pp. 889-896.

25 Thornley M.J. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism // Journal of Applied Bacteriology. - 1960. - № 21. - pp. 389-396.

26 Коцофляк О. И. Новые представители рода *Pseudomonas* из почв антарктики // Укр. антаркт. журн. - 2006. - №4. - С. 214-218.

27 Alexander M. Biodegradation and Bioremediation. - 2<sup>nd</sup> edition // New York: Academic Press. - 1999. - 453 p.

28 Arias-Estévez M., López-Periágo E., Martínez-Carballo E., Simal-Gándara J., Mejuto J.-C., García-Río L. The mobility and degradation of pesticides in soils and

the pollution of groundwater resources // *Agriculture, Ecosystems & Environment*. - 2008. - № 123(4). - pp. 247-260.

29 Semple K.T., Doick K.J., Wick L.Y., Harms H. Microbial interactions with organic contaminants in soil: definitions, processes and measurement // *Environmental Pollution*. - 2007. - № 150(1). - pp. 166-176.

30 Wick L.Y., Remer R., Würz B., Reichenbach J., Braun S., Schäfer F., Harms H. Effect of fungal hyphae on the access of bacteria to phenanthrene in soil // *Environ. Sci. Technol.* - 2007. - № 41(2). - pp. 500-505.

31 Жубанова А.А., Ерназарова А.К., Кайырманова Г. К., Заядан Б.К., Савицкая И.С., Абдиева Г.Ж., Кистаубаева А.С., Акимбеков Н.Ш. Конструирование цианобактериального консорциума на основе аксеничных культур цианобактерий и гетеротрофных бактерий для биоремедиации нефтезагрязненных почв и водоемов // *Физиология растений*. - 2013. - № 60(4). - С. 588–595.

32 Панов А.В., Есикова Т.З., Соколов С.Л., Кошелева И.А., Боронин А.М. Влияние загрязнения почвы на состав микробного сообщества // *Микробиология*. - 2013. - № 82(2). - С. 239–246.

33 Беловежец Л.А., Макарова Л.Е., Третьякова М.С., Маркова Ю.А., Дударева Л.В., Семёнова Н.В. Возможные пути деструкции полиароматических углеводородов нефти некоторыми видами бактерий-нефтедеструкторов, выделенными из эндо- и ризосферы растений // *Прикладная биохимия и микробиология*. - 2017. - № 53(1). - С. 76–81.

34 Филонов А.Е., Пунтус И.Ф., Ахметов Л.И., Фунтикова Т.В., Делеган Я.А. Биотехнология очистки нефтезагрязненных территорий приаральского региона с использованием новых биопрепаратов. Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов. - Мат. 4-й Пущинской конф. - М.: ИД «Вода: химия и экология», 2017. - С. 109–111.

35 Gayathiri E., Bharathib B., Selvadhas S., Kalaikandhan R. Isolation, identification and molecular characterization of hydrocarbon degrading bacteria and its associated genes – a review. // *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* - 2017. - № 8(2). - pp. 1010-1019.

36 Ojewumi M.E., Okeniyi J.O., Ikotun J.O., Okeniyi E.O., Ejemen V.A., Popoola A.P.I. Bioremediation: Data on *Pseudomonas aeruginosa* effects on the bioremediation of crude oil polluted soil. // *Data in Brief*. - 2018. - №19. - pp. 101-113.

37 Гоголева О.А., Немцева Н.В. Углевородоокисляющие микроорганизмы природных экосистем // *Бюллетень Оренбургского науч. центра УрО РАН*. - 2012. - № 2. - С. 1-7.

38 Pandey P., Pathak H., Dave S. Microbial ecology of hydrocarbon degradation in the soil: A review. // *Res. J. Environ. Toxicol.* - 2016. - № 10(1). - pp. 1-15.

39 Koshlaf E., Ball A.S. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. // *AIMS Microbiol.* - 2017. - № 3(1). - pp. 25-49.

40 Филонов А.Е., Кошелева И.А., Самойленко В.А., Шкидченко А.Н., Нечаева И.А., Пунтус И.Ф., Гафаров А.Б., Якшина Т.В., Боронин А.М., Петриков К.В. Биопрепарат для очистки почв от загрязнений нефтью и нефтепродуктами, способ его получения и применения // Патент РФ № 2378060. Заявл. 05.07.2007; опубл. 10.01.2010. Бюл. № 1

41 Соколов С.Л., Гафаров А.Б., Сазонова О.И., Ветрова А.А., Иванова А.А., Кошелева И.А., Петриков К.В. Консорциум микроорганизмов для очистки поверхностных вод и седиментов Балтийского моря от нефти и нефтепродуктов // Патент РФ № 2688725. Заявл. 13.10.2017; опубл. 22.05.2019. Бюл. № 15.

42 Al-Gelawi M.H., Al-Saraf A.A., Al-Baldawi R.B. Role of plasmid of *Pseudomonas putida* S3A in nylon 6 degradation // *J. Biologic. Sci.* - 2013. - № 13(6). - pp. 555–558.

43 Sharma S., Pathak H. *Pseudomonas* in Biodegradation // *Int. J. Pure App. Biosci.* - 2014. - № 2(1). - pp. 213-222.

44 Kahlon R.S. *Pseudomonas: molecular and applied biology* - 1<sup>st</sup> edition// Switzerland: Springer - 2016. – 518 p.

45 Джусупова Д.Б. Биоремедиация объектов окружающей среды углеводородокисляющими микроорганизмами рода *Pseudomonas*: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.07, 03.00.16. Алматы, 2010.

46 Varjani S.J., Upasani V.N. Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant // *Bioresour. Technol.* - 2016. - № 221. - pp. 510-516.

47 Varjani S.J. Remediation processes for petroleum oil polluted soil // *Indian J. Biotechnol.* - 2017. - № 222. - pp. 195-201.

48 Farshid K., Sara R., Yaghoob T. Evaluation of bioremediation of naphthalene using native bacteria isolated from oil contaminated soils in Iran // *Ann. Biol. Res.* - 2011. - № 2(6). - pp. 610-616.

49 Kafilzadeh F., Pour F., Hoshyari T.Y., Azad H.N. Bioremediation of pyrene by isolated bacterial strains from the soil of the landfills in Shiraz, Iran // *Ann. Biol. Res.* - 2012. - № 3(1). - pp. 486-494.

50 Amenu D. Isolation of poly aromatic hydrocarbons (PAHs) degrading bacteria's // *Landmark Res. J. Med. Med. Sci.* - 2014. - № 1(1). - pp. 1-3.

51 Sharma S., Pathak H. *Pseudomonas* in Biodegradation // *Int. J. Pure App. Biosci.* - 2014. - № 2(1). - pp. 213-222.

52 Ghosal D., Ghosh S., Dutta T.K., Ahn Y. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review // *Front. Microbiol.* - 2016. - № 7. – pp. 1369. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>

53 Pizarro-Tobías P., Fernández M., Niqui J.L., Solano J., Duque E., Ramos J.-L., Roca A. Restoration of a mediterranean forest after a fire: bioremediation and rhizoremediation field-scale trial // *Microb. Biotechnol.* - 2015. - № 8(1). - pp. 77-92.

54 Щемелинина Т.Н., Анчугова Е.М., Маркарова М.Ю., Лаптева Е.М. Штамм бактерий *Pseudomonas azotoformans* для биоконверсии углеводов // *Экобиотех.* - 2020. - № 3(1). - С. 18-32.

55 Коршунова Т.Ю. и др. «Бактерии рода *Pseudomonas* для очистки окружающей среды от нефтяного загрязнения» 29 загрязненных нефтью и нефтепродуктами вод в источник биодизеля // Патент РФ № 2692629. Заявл. 2018.11.14; опубл. 2019.06.25. Бюл. № 18.

56 Бакаева М.Д., Смолова О.С., Логинов О.Н. Использование для биорекультивации микроорганизмов-деструкторов углеводов рода *Pseudomonas* с микостатической активностью // Биотехнология. - 2014. - № 6. - С. 62-72.

57 ГОСТ 17.4.4.02-2017. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа.

58 ГОСТ ISO 7218— 2015. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям.

59 ГОСТ ISO 11133-2016. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред.

60 ГОСТ 25570-91. Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов.

## РЕЦЕНЗИЯ

на дипломную работу

Артемова Алексея Сергеевича

5B070100 – «Биотехнология»

На тему: «Изучение культуральных свойств бактерий рода *Pseudomonas*, используемых в деструкции углеводов»

Выполнено:

- а) графическая часть на 2 листах
- б) пояснительная записка на 30 страницах

## ЗАМЕЧАНИЯ К РАБОТЕ

В работе выявлены стилистические ошибки и неточности.

## Оценка работы

Дипломная работа Артемова А.С. исследует актуальную научную тему изучения культуральных свойств бактерий рода *Pseudomonas*, используемых в деструкции углеводов. Структура рецензируемой работы соответствует требованиям, предъявляемым к выпускным работам бакалавриата. Дано описание ключевых культуральных свойств и биодegradационных способностей бактерий рода *Pseudomonas*. Исследованы макроморфология и особенности роста на плотных и жидких питательных средах выделенных штаммов микроорганизмов. Содержание работы соответствует выданному заданию. Материал работы изложен с соблюдением логических закономерностей.

Дипломная работа имеет практическое значение, установлен оптимальный температурный режим культивирования в жидкой среде для выделенных штаммов.

Работа выполнена в соответствии со стандартами ГОСТ, не имеет существенных недостатков. В связи с этим работа рекомендуется к защите, заслуживая оценки «отлично».

Рецензент  
к.б.н., профессор кафедры биотехнологии  
факультета биологии и биотехнологии КазНУ им Аль-Фараби

Атамбаева Ш. А.

« 30 » \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ф КазНУ 006-15-Рецензия



**ОТЗЫВ**

**НАУЧНОГО РУКОВОДИТЕЛЯ**

на дипломную работу

Артемова Алексея Сергеевича

5B070100 – «Биотехнология»

Тема: «Изучение культуральных свойств бактерий рода *Pseudomonas*, используемых в деструкции углеводов»

Одним из наиболее перспективных путей устранения углеводородных загрязнений является биodeградация, ключевую роль в процессе которой играют микроорганизмы, обладающие соответствующими свойствами. Способность эффективно утилизировать данные соединения обнаруживаются у бактерий рода *Pseudomonas* и обусловлена широким рядом биологических особенностей.

Изучению биodeградационных свойств предшествуют исследования, направленные на изучение культуральных свойств у выделенных штаммов бактерий. Дипломная работа Артемова А. направлена на изучение культуральных свойств у штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из почв, загрязненных нефтепродуктами.

Работа систематизирует данные и описывает культуральные свойства и механизмы биodeградации у бактерий рода *Pseudomonas*. Результаты работы демонстрируют изученные культуральные свойства у выделенных штаммов на плотных и жидких питательных средах, кроме того в ходе работы был установлен оптимальный температурный режим культивирования у выделенных штаммов в жидких средах. Полученные результаты могут быть использованы для последующих исследований в данном направлении.

В процессе подготовки дипломной работы Артемов А. продемонстрировал способности к систематизации и анализу библиографического материала, на хорошем уровне освоил методы проведения микробиологических исследований и способы обработки полученных данных.

Артемов А. допущен к защите дипломной работы с оценкой «отлично-98 %» и заслуживает присвоения академической степени «бакалавр техники и технологий».

**Научный руководитель**

канд. с.-х. наук, доцент, асоц. профессор

Джамалова Г.А.

(подпись)

«30» мая 2022 г.



## Метаданные

Название

**2022\_БАК\_Артемов Алексей.docx**

Автор

**Артемов Алексей**

Научный руководитель

**Гуля Джамалова**

Подразделение

**ИГИНГД**

## Список возможных попыток манипуляций с текстом

В этом разделе вы найдете информацию, касающуюся манипуляций в тексте, с целью изменить результаты проверки. Для того, кто оценивает работу на бумажном носителе или в электронном формате, манипуляции могут быть невидимы (может быть также целенаправленное вписывание ошибок). Следует оценить, являются ли изменения преднамеренными или нет.

Замена букв		3
Интервалы		0
Микропробелы		0
Белые знаки		0
Парафразы (SmartMarks)		12

## Объем найденных подоби

Обратите внимание! Высокие значения коэффициентов не означают плагиат. Отчет должен быть проанализирован экспертом.

**25**

Длина фразы для коэффициента подобия 2

**3967**

Количество слов

**32186**

Количество символов

## Подобия по списку источников

Просмотрите список и проанализируйте, в особенности, те фрагменты, которые превышают КП №2 (выделенные жирным шрифтом). Используйте ссылку «Обозначить фрагмент» и обратите внимание на то, являются ли выделенные фрагменты повторяющимися короткими фразами, разбросанными в документе (совпадающие сходства), многочисленными короткими фразами расположенные рядом друг с другом (парафразирование) или обширными фрагментами без указания источника ("криптоцитаты").

### 10 самых длинных фраз

Цвет текста

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ И АДРЕС ИСТОЧНИКА URL (НАЗВАНИЕ БАЗЫ)	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)	
1	<a href="http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf">http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf</a>	27	0.68 %
2	<a href="https://ruwiki.press/es/Pseudomonas">https://ruwiki.press/es/Pseudomonas</a>	23	0.58 %
3	<a href="http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf">http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf</a>	21	0.53 %
4	<a href="http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf">http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf</a>	15	0.38 %
5	<a href="http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf">http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf</a>	15	0.38 %
6	<a href="http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf">http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf</a>	14	0.35 %

7	<a href="http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf">http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf</a>	11	0.28 %
8	<a href="http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf">http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf</a>	10	0.25 %
9	<a href="http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf">http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf</a>	9	0.23 %
10	<a href="http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf">http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf</a>	8	0.20 %

#### из базы данных RefBooks (0.00 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---

#### из домашней базы данных (0.15 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
1	«Мониторинг чувствительности к антибактериальным препаратам бактерии Pseudomonas aeruginosa» 5/6/2019 Satbayev University (ИХИБТ)	6 (1) 0.15 %

#### из программы обмена базами данных (0.00 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	НАЗВАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	----------	---

#### из интернета (4.79 %)



ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	ИСТОЧНИК URL	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
1	<a href="http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf">http://ecobiotech-journal.ru/2020/pdf/ecbtch2001018.pdf</a>	148 (12) 3.73 %
2	<a href="https://ruwiki.press/es/Pseudomonas">https://ruwiki.press/es/Pseudomonas</a>	23 (1) 0.58 %
3	<a href="http://elibrary.sgu.ru/VKR/2016/020804_008.pdf">http://elibrary.sgu.ru/VKR/2016/020804_008.pdf</a>	13 (2) 0.33 %
4	<a href="https://ru.abcdef.wiki/wiki/Pseudomonas">https://ru.abcdef.wiki/wiki/Pseudomonas</a>	6 (1) 0.15 %

#### Список принятых фрагментов (нет принятых фрагментов)

ПОРЯДКОВЫЙ НОМЕР	СОДЕРЖАНИЕ	КОЛИЧЕСТВО ИДЕНТИЧНЫХ СЛОВ (ФРАГМЕНТОВ)
------------------	------------	---