

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



## Πτυχιακή εργασία

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΕΟΥ ΣΤΕΛΕΓΧΟΥΣ  
*OSCHROBACTRUM* SP. D2 ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ  
ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΦΑΙΝΑΝΘΡΕΝΙΟΥ

Ραφαέλα Κωνσταντίνου

Λεμεσός 2015



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΗΣΗΣ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

## Πτυχιακή εργασία

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΕΟΥ ΣΤΕΛΕΓΧΟΥΣ  
*OCHROBACTRUM* SP. D2 ΜΕ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ  
ΒΙΟΔΙΑΣΠΑΣΗΣ ΦΑΙΝΑΝΘΡΕΝΙΟΥ

Ραφαέλα Κωνσταντίνου

Επιβλέπων καθηγητής  
Δρ. Ιωάννης Βυρίδης

Λεμεσός 2015

## **Πνευματικά δικαιώματα**

Copyright © Ραφαέλα Κωνσταντίνου, 2015

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επιβλέποντα Καθηγητή Δρ. Ιωάννη Βυρίδη, για την συνεχή στήριξη και καθοδήγηση του καθ' όλη την διάρκεια διεκπεραίωσης της πτυχιακής μου εργασίας. Επιπλέον τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου μέσα από την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και για την διδακτική εμπειρία που μου προσέφερε. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην διδακτορικό φοιτήτρια Έφη Δράκου για την πολύτιμη βοήθεια της, τόσο στην εργαστηριακή εκπόνηση της εργασίας όσο και στην βιβλιογραφική μελέτη. Η συνεργασία μαζί της μου έδωσε την δυνατότητα να αποκτήσω γνώσεις στον εργαστηριακό τομέα και συνέβαλλε ευχαρίστα στην ολοκλήρωση της εμπειρίας αυτής, καθιστώντας την εποικοδομητική. Τελειώνοντας, ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους όσους με στήριξαν άμεσα ή έμμεσα να εκπληρώσω τον στόχο της πτυχιακής εργασίας μου και να αντιμετωπίσω τις προκλήσεις.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία επικεντρώνει το ενδιαφέρον σε μια οργανική ουσία που ανήκει στην κατηγορία των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και χαρακτηρίζεται ως σημαντικό περιβαλλοντικό ρυπαντή, το φαινανθρένιο. Η αντιμετώπιση της ρύπανσης που προκαλεί η συγκεκριμένη ουσία και όμοιες της, προτείνεται να γίνεται με φυσικές μεθόδους όπως είναι η βιοαποδόμηση από μικροβιακούς πληθυσμούς.

Σκοπός της εργασίας είναι η απομόνωση μικροοργανισμού από ρυπασμένο με πετρελαιοειδή περιβαλλοντικό δείγμα και η εύρεση της βέλτιστης κυτταρικής ανάπτυξη του σε καλλιέργειες με μόνη πηγή άνθρακα φαινανθρένιο, επηρεαζόμενη από μεταβολές στο pH, την αλατότητα, την θερμοκρασία και τα θρεπτικά άλατα. Παράλληλα, διερευνήθηκε η διαδικασία βιοδιάσπασης του φαινανθρενίου και προσδιορίστηκε η μέγιστη ποσότητα που μπορεί να αποδομήσει ο μικροοργανισμός σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Για την επίτευξη του σκοπού αυτού ακολουθήθηκε διαδικασία μικροβιολογικής απομόνωσης και ταυτοποίηση του μικροβιακού στελέχους με την εξαγωγή δείγματος DNA. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα υγρών καλλιεργειών διάρκειας 4 ημερών, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των συνθηκών που ευνοούν την ανάπτυξη της κυτταρικής βιομάζας, με τις μετρήσεις να λαμβάνονται φασματοφωτομετρικά. Με την χρήση της HPLC για την μελέτη του χρόνου διάσπασης, προέκυψε η μεταβολή της συγκέντρωσης του φαινανθρενίου με την πάροδο του χρόνου, παρουσίας μικροοργανισμού. Επιπρόσθετα ήταν εφικτή η σύγκριση της εναπομένουσας ποσότητας φαινανθρενίου για κάθε χρονική στιγμή που λαμβάνονταν μετρήσεις.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ολοκλήρωση του πειραματικού μέρους, έδειξαν πως ο μικροοργανισμός που απομονώθηκε από περιβάλλον στο οποίο εκτελούνται μηχανουργικές εργασίες, ρυπασμένο με λάδια μηχανών και γράσα αυτοκίνητων, είναι στέλεχος του γένους *Ochrobactrum* με μεγαλύτερη ανάπτυξη σε pH 8.5, αλατότητα 10 g/L NaCl και θερμοκρασία 30 °C. Ο εν λόγω μικροοργανισμός παρουσίασε, επίσης ικανοποιητική ανάπτυξη και σε περιβάλλον με έλλειψη πηγής αζώτου. Όσον αφορά την βιοδιάσπαση, παρατηρήθηκε απομάκρυνση φαινανθρενίου από τον μικροοργανισμό σε ποσοστό 61.9 % σε διάστημα 144 ωρών με αρχική συγκέντρωση φαινανθρενίου 150 mg/L.

## ABSTRACT

This thesis focuses on phenanthrene, an organic substance that belongs to the category of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) and is characterized as a major environmental pollutant. Tackling the pollution caused by phenanthrene and other similar substances is proposed to be achieved by using physical methods, such as biodegradation by microbial populations.

The purpose of this paper is the isolation of a microorganism from an environmental sample that is polluted with petroleum and finding the optimum cell growth through changes applied in pH, salinity, temperature, and nutrient salts. Furthermore, the process of phenanthrene's biodegradation was investigated and the maximum quantity that can be departed by the microorganisms in a given period of time was determined as part of this thesis.

In order to achieve the isolation of the microorganism, a procedure was followed that is based on various microbiological processes followed by the identification of the strain, by extracting the DNA sample. In the quantitative determination of conditions that favor the development of cell biomass, it was necessary to use spectrophotometrical methods and take measurements in liquid crops for four continuous days.

Using the HPLC to study the decay time, results showed a variation in the concentration of phenanthrene by the isolated microorganism over time. Additionally, it became feasible to compare the remaining quantity of phenanthrene with the measurements were taken every time.

The results obtained after the completion of the experimental part of this thesis have shown that the isolated microorganism from environment that performed machining operations, polluted with engine oil and grease cars, is a strain of the genus *Ochrobactrum*, with greater growth in pH 8.5, salinity 10 g/L NaCl and temperature 30 °C. This specific microorganism also showed satisfactory development and in an environment with a lack of nitrogen source. Regarding biodegradation, it was observed that the removal of phenanthrene from the microorganism at a rate of 61.9% over 144 hours, with initial concentration of phenanthrene in 150 mg/L.