

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
бакалавра
(ступень вищої освіти)

на тему: «Застосування бактерій роду *Pseudomonas* і *Bacillus* в
біотехнологіях очищення ґрунту від вуглеводнів нафти»

«The use of bacteria of the genus *Pseudomonas* and *Bacillus* in
biotechnologies of purification of soil from petroleum hydrocarbons»

Виконал студент денної форми навчання
Напряму підготовки 6.051401 Біотехнологія
Самофалов Михайло Олександрович

Керівник к.б.н., доцент Гудзенко Т.В.
Рецензент к.б.н., доцент Гладкій Т.В.

Рекомендовано до захисту: Захищено на засіданні ЕК № 4
Протокол засідання кафедри протокол № 4 від 17 серпня 2016 р.
№ 12 від 17.05 2016 р. Оцінка вирішно 1 А 1 Б 1
Завідувач кафедри (за національною шкалою, шкалою
ECTS, бали)

Голова ЕК
Філіпова Т. О. / Мазуренко І. К.
(підпис) (підпис)

Одеса – 2016

779602

АНОТАЦІЯ

Виділені з нафтозабрудненого ґрунту штами бактерій ідентифіковані за жирнокислотним складом як *Bacillus megaterium* 2₂ і *Pseudomonas fluorescens* 1₇, володіли нафтоокиснювальною активністю. Використання їх у біотехнології сприяло очищенню ґрунту від нафтопродуктів - через 150 діб після початку випробувань зміст нафтопродуктів у ґрунті знизився до $4,005 \pm 0,11$ г/кг ґрунту, на 96,42 % від початкового рівня $41,54 \pm 2,23$ г/кг ґрунту.

Роботу викладено на 44 сторінках, вона містить 5 таблиць та 2 рисунка. Наведено посилання на 38 джерел літератури (36 кирилицею та 2 латиницею).

Ключові слова: біотехнологія очистки ґрунту, бактерії-деструктори роду *Pseudomonas* і *Bacillus*, нафтопродукти.

Isolated from oil contaminated soil bacterial strains identified by the fatty acid composition as *Bacillus megaterium* *Pseudomonas fluorescens* 22 and 17 had naftookysnyuvalnoyu activity. Their use in biotechnology helped clean soil from oil - 150 days after the start of testing oil content in soil decreased to $4,005 \pm 0,11$ g / kg soil (96.42%) from baseline $41,54 \pm 2,23$ g / kg soil.

The work contained on 44 pages, includes 5 tables and 2 figures. References 38 references (36 Cyrillic and 2 Latin).

Keywords: *Pseudomonas*, *Bacillus*, destruction, oil, cleaning.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Біологічні методи очищення ґрунту від нафтопродуктів.....	7
1.2. Загальна характеристика бактерій роду <i>Pseudomonas</i>	14
1.2.1. Деструктивна активність бактерій роду <i>Pseudomonas</i> у відношенні до вуглеводнів нафти.....	16
1.3. Загальна характеристика бактерій роду <i>Bacillus</i>	17
1.3.1. Роль бактерій роду <i>Bacillus</i> у біотехнології.....	19
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ.....	21
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	26
3.1. Біологічні властивості та ідентифікація нафтоокиснюючих бактерій, виділених з забрудненого нафтопродуктами ґрунту.....	26
3.2. Нафтоокиснювальна активність мікроорганізмів, виділених з нафтозабруднених ґрунтів о. Зміїний.....	32
3.3. Біотехнологія використання бактерій роду <i>Pseudomonas</i> і <i>Bacillus</i> для очищення ґрунту від вуглеводнів нафти.....	33
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	37
ВИСНОВКИ.....	39
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	40

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДДТ – Діхлордіфенол трихлоретан

ДНК – Дезоксірибонуклеїнова кислота

ПАР – Поверхнево-активні речовини

ІЧ спектроскопія – Інфрачервона спектроскопія

ВН – Вуглеводні нафти

ЖК – Жирні кислоти

МПА – М'ясопептонний агар

ВСТУП

Сучасні методи очищення ґрунту та води від нафти та нафтопродуктів часто розроблені із використанням бактерій-деструкторів вуглеводнів нафти. Серед таких деструкторів описані представники протеобактерій - *Bacillus*, *Rhizobium*, *Arthrobacter*, аскоміцетів - *Fusarium*, *Alternaria* та представників актинобактерій – *Rhodococcus* та *Microbacterium*. Висока пластичність метаболізму та швидка адаптація до агресивних умов існування дозволяє активно утилізувати вуглеводні, знижуючи вміст нафтопродуктів у ґрунті до фонових значень за низьких експлуатаційних витрат та невисокій технологічній складності здійснення процесу очищення забруднених ґрунтів [31].

Для очищення ґрунтів від нафтопродуктів використовують бактеріальні препарати "Деворойл", "Олеоворин", "Путидойл", "Сойлекс", "Фаерзайн", Суперкомпост "ПИКСА" та ін. Біопрепарати містять у своєму складі добрива й мікроорганізми, виділені із природних біоценозів, що володіють підвищеною окисною здатністю стосовно нафти, що пройшли адаптацію в природних умовах [30]. Використовують один штам, або суміш штамів вуглеводоокислюючих бактерій, в основному аеробів. Ці бактерії ефективні при температурі 15 - 28 °C і вимагають мінеральної підгодівлі (азот, фосфор), зволоження, розпушування [21].

Актуальним є розробка комплексних методів швидкої ліквідації нафтового забруднення ґрунту з застосуванням мікробіологічних біопрепаратів нового покоління-сорбентів та деструкторів вуглеводнів нафти, які забезпечують повне знешкодження шкідливої біологічної дії нафтового забруднення, також стимулюють природні процеси самоочищення, відновлення біоценозів і оздоровлення ґрунту [31].

На кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету створена низка природоохоронних біотехнологій, які передбачають використання високоактивних іммобілізо-

ваних на біологічно-позитивних носіях бактерій-деструкторів, здатних утилізувати нафту та нафтопродукти, органічні барвники, ПАР та ін. органічні біорезистентні сполуки.

Бактерії роду *Pseudomonas* і *Bacillus* використовуються у біотехнологіях очищення ґрунтів від вуглеводнів нафти. Штами бактерій-деструкторів зберігаються у колекції кафедри - філії Національної колекції культур мікроорганізмів, що отримала у 2004 р. статус Національного надбання.

Новизна роботи полягає у створенні нових біопрепаратів, головними компонентами яких будуть аборигенні штами мікроорганізмів-деструкторів роду *Pseudomonas* та *Bacillus*, що пристосовані до жорстких умов існування у конкретному регіоні.

В зв'язку з цим метою роботи була розробка біотехнології очищення ґрунту від вуглеводнів нафти з застосуванням бактерій роду *Pseudomonas* і *Bacillus*, виділених з забрудненого нафтопродуктами ґрунту острова Зміїний.

В задачі досліджень входило:

- з забрудненого нафтопродуктами ґрунту ізолювати штами біохімічно-активних бактерій, вивчити їх жирнокислотний склад і біологічні властивості та ідентифікувати;
- визначити нафтоокислювальну активність виділених штамів бактерій;
- розробити технологічну схему очищення ґрунту від нафтопродуктів і провести її лабораторне випробування.

Об'єкт дослідження – мікробні технології очищення ґрунту від вуглеводнів нафти

Предмет дослідження – застосування бактерій роду *Pseudomonas* і *Bacillus* у біотехнології очистки ґрунту.

ВИСНОВКИ

1. З нафтозабрудненого ґрунту о. Зміїний виділено 2 штами мікроорганізмів, здібних зростати на агаризованому середовищі М-9 з додаванням нафти.

2. За жирнокислотним складом клітинних ліпідів, морфологічними, культуральними та біохімічними властивостями віділені штами були ідентифіковані як *Bacillus megaterium* 2₂; *Pseudomonas fluorescens* 1₇.

3. Досліджувані штами мікроорганізмів володіли нафтоокиснювальною активністю - за 90 діб експозиції ступінь біодеструкції вуглеводнів нафти при використанні штамів *Bacillus megaterium* 2₂ ; *Pseudomonas fluorescens* 1₇ складав, відповідно, 63,5% і 76,4%

4. Розроблено технологічну схему очистки ґрунту від нафтопродуктів, яка включає переорювання ґрунту, нанесення шару сорбентів і біопрепарату; орошення рідкою культурою консорціума бактерій *Bacillus megaterium* 2₂ ; *Pseudomonas fluorescens* 1₇, засів ділянки трав'янистими рослинами та сидерацію.

5. Використання імобілізованих на природних субстратах бактерій-деструкторів *Bacillus megaterium* 2₂ і *Pseudomonas fluorescens* 1₇ сприяє очищенню ґрунту від нафтопродуктів - через 150 діб після початку випробувань зміст нафтопродуктів у ґрунті знизився до $4,005 \pm 0,11$ г/кг ґрунту на 96,42 % від початкового рівня $41,54 \pm 2,23$ г/кг ґрунту.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Ворошилова А. А., Дианова О. В.* Окисляющие нефть бактерии – показатели интенсивности биологического окисления нефти в природных условиях //Микробиология. - 1952.- Т. 21, вып. 4.- С. 96-99.
2. *Дядечко В. Н., Толстокорова Л.Е., Морозова Т.Н.* Штам *Pseudomonas putida* 36, використовуваний для очищення води і ґрунту від нафти і нафтопродуктів. Патент SU 1076446. //Б.И. - 1984.- № 8.
3. *Ильинский В. В., Семяняко М. Н., Юферова С. Г., Трошина Н. Н., Коронелли Т.В.* Азотно-фосфорные удобрения для стимуляции биodeградации нефтяных УВ в морской среде // Вестник МГУ. Сер. биол. 1991. - № 2. – С.67-123.
4. *Исмаилов Н. М., Паковский Ю. Ш.* Биодинамика загрязненных нефтью почв //Миграция загрязняющих веществ в почвах и сопредельных средах. -Л.: ЛГУ, 1985. - С.25-32
5. *Исмаилов Н. М.* Микробиологическая и ферментативная активность нефтезагрязненных почв // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. - М.: МГУ, 1988. – 25-26.
6. *Калачников И. Г.* Влияние нефтяного загрязнения на экологию почв и почвенных микроорганизмов // Экология и популяционная генетика микроорганизмов. –1987. - № 5. – С. 25-29.
7. *Квасників Є. І., Ключникова Т. М.* Мікроорганізми - деструктори нафти у водяних басейнах. – К.: Наукова думка, 1981. - 132 с.
8. *Киреева Н.А., Григориади А.С., Хайбулина Е.Ф.* Ассоциации углеводородокисляющих микроорганизмов для биоремедиации нефтезагрязнённых почв // Вестник Башкирского университета.- 2009. – Т.14, №2. – С. 391-394.

9. Кодина Л.А. Геохимическая диагностика нефтяного загрязнения почвы // Восстановление нефтезагрязнённых почвенных экосистем. – М.: Наука, 1988. – С. 112-122.
10. Кожанова Г. А., Гудзенко Т. В., Бобрешова Н. С. и др. Современные биотехнологии в защите акваторий портов и береговых объектов от нефтяного загрязнения // Нетрадиционные и возобновляемые источники энергии. – 1999. - №3. - С. 43-46.
11. 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.
12. 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.
13. Кормак Д. Борьба с загрязнением моря нефтью и химическими веществами. -М.: Транспорт, 1989.- .324 с.
14. Коронелли Т. В. Микробиологическая деградация углеводов и ее экологические последствия // Биол. науки. – 1982. - №3. - С. 5 - 13.
15. Коронелли Т. В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде // Прикладная биохимия и микробиология. - 1996. - Т. 32. - №6. - С. 579-585.
16. Кошелева И.А., Балашова Н.В., Измалкова Т.Ю., Филонов А.Е., Соколов С.Л., Слепенькин А.В., Боронин А.М. Деградация фенантрена мутантными штаммами – деструкторами нафталина //Микробиология.- 2000. - №6. – С. 783-789.
17. Ленёва Н.А., Коломьцева М.П., Баскунов Б.П., Головлёва Л.А. Деградация фенантрена и антрацена бактериями рода *Rhodococcus* // Прикладная биохимия и микробиология.- 2009. - №2. – С. 188-194.

18. Линкевич М. И., Хадесва В. В. и др. Биоремедиация нефтезагрязненных водоемов // Докл. научно-практической конференции "Промышленная экология-98". - СПб.: Наука, 1998. - С. 470.
19. Матенькова Е.А., Наплекова Н.Н. Состав микробных ассоциаций дерново-подзолистых почв с нефтяным загрязнением // Достижения науки и техники АПК.- 2009. - №4. – С. 20-21.
20. Милько Е.С., Мартынкина Л.П. Морфологические и физиолого-биохимические особенности *Pseudomonas aeruginosa* // Микробиология. – 1996. – Т. 65, № 5. – С. 352-356.
21. Новіков Ю. В. і Комзолова Н. В. Дослідження бактерійних препаратів призначеного для очищення водоймищ та ґрунтів від нафти // Водне господарство.- 1992. - N 2. - С. 121 – 123.
22. *Определитель бактерий Берджи* / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Смита, Дж. Стейли и С. Уилльямса. – М.: Мир, 1997. – 800 с.
23. Пиневиц А. У Микробиология прокариотов. — М.: ГОЭТАР–Медиа, 2008. — 350 с.
24. Плотникова Е. Г. Бактерии - деструкторы полициклических ароматических углеводородов, выделенные из почв и донных отложений района солеразработки // Микробиология. - 2001. - Т. 70, № 1. - С. - 61-69.
25. *Преобразование нефтей микроорганизмами* // Тр. ВНИГРИ. Под редакцией Б.Г. Хотимского и А.И. Акопиан. – Л.: ВНИГРИ, 1970. - 281с.
26. *Процессы биodeградации в нефтезагрязненных почвах. Теоретические подходы* / СИФиБР СО РАН, под ред. канд. биол. наук А. В. Колесниченко. - М.: Промэкобезопасность, 2004. - 194 с.
27. *Рекомендации по использованию биопрепарата «Деворойл» для очистки объектов железнодорожного транспорта от загрязнения нефтепродуктами.* М., 1999.
28. Розанова Е. П. Исследование деструкции углеводов микроорганизмами / Успехи микробиологии. – 1996. - Вып. № 4. - С. 61-74.

29. Розанова Е. П., Кузнецов С. И. Микрофлора нефтяных месторождений. - М.: Наука, 1974. - 89 с.

30. Rogozina E.A., Andreeva O.A., Zharkova S.I., Martynova D.A. Сравнительная характеристика отечественных биопрепаратов, предлагаемых для очистки почв и грунтов от загрязнений нефтью и нефтепродуктами // Нефтегазовая геология. Теория и практика. - 2010. - Т.5. - №4.- С.25-31.

31. Rogozina E.A., Шиманский В.К. Некоторые теоретические аспекты восстановления нефтезагрязнённых почвенных экосистем // Нефтегазовая геология. Теория и практика. - 2007. - Т.5. - №4.- С.15-18.

32. Рубцова С.И. Качественная характеристика нефтеокисляющих бактерий прибойной зоны Черного моря // Ученые записки Таврического Национального университета им. В. И. Вернадского / Серия "Биология. Химия". - 2003. - Т. 16 (55), № 1 - С. 46-51.

33. Рубцова С.И. Нефтеокисляющая микрофлора в прибойной зоне г. Севастополя // Ученые записки Таврического Национального университета им. В. И. Вернадского / Серия "Биология". - 2001. - Т. 14 (53), № 2 - С. 151-155.

34. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. - Киев: Наукова думка, 1990.- 262 с.

35. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах.Т. 1./ Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005. - 656 с.

36. 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.

37. Olszanowski A., Piechowiak K. The Use of an Electric Field to Enhance Bacterial Movement and Hydrocarbon Biodegradation in Soils: Original Research // Polish J. Environ. Stud. . -2006. - Vol. 15, No. 2. - P. 303-309.

38. Boopathy R. Factors limiting bioremediation technologies: Review paper // Bioresource Technology. - 2000. - I. 74. - P. 63-67.

16, 05. 2016 