Abstract

Project Code : BGJ4580012

Project Title : Evaluation of a mixed microbial consortium addition to stimulate *in situ* bioremediation of lubricant-contaminated soil

Investigator : Miss Savaporn Supaphol, Department of Soil Science, Faculty of Agricultural, Kasetsart University

E-mail Address : orn478@yahoo.com

Project Period : December 2002 – November 2004

The resultant 193 bp amplicons were resolved using DGGE and the banding patterns analyzed using stepwise discriminant function analysis (SDA). . Further statistical analysis showed that the number of bands needed to recover the difference between replicates over time could be reduced from the initial 11 bands for the 16S rRNA transcript to 3 bands for each analysis. Sequences originating from the rRNA gels (16S rRNA transcripts) were recovered in clades containing known cultured isolates of *Bacillus marisflavi*, *Microbacterium oxydans*, and *Pseudomonas oleovorans*. A second microcosms experiment was carried out in which pure cultures were selectively isolated on mineral salts medium containing lubricant oil as the sole carbon source. Using morphology as a primary screen a total of 317 bacterial cultures were selected from the microcosms during the incubation period. Analysis of these cultures using determinative tests for *Bacillus*, *Microbacterium*, and *Pseudomonas* showed that of the cultured isolates 77 were identified as *Bacillus*, 35 as *Microbacterium* and 9 as *Pseudomonas*. This accounted for just over 38% of the culture collection. To verify their identities, the full 16S rRNA gene of 17 selected strains assigned to the genus *Bacillus*, *Microbacterium*, and *Pseudomonas* was sequenced. These analyses revealed the limitations of the determinative tests with only 9 of the 17 isolates confirmed as either *Bacillus* (6 strains), *Microbacterium* (1 strain), or *Pseudomonas* (2 strains). Importantly, 3 of the cultured isolated showed high sequence similarity (>96%) with the 16S rRNA transcripts identified using SDA as being important in differentiating between bacterial communities over time. The SDA selected consortium (3 isolates) and consortium 2 (11 isolates from culture isolation) were compared for their capacity to degrade petroleum hydrocarbons by

monitoring their degradative abilities over 7 days in liquid medium and over 49 days in sterile sand contaminated with lubricant. Total petroleum hydrocarbon (TPH) remaining was assessed using gas chromatography and degradation was shown to increase significantly over an *E. coil* and a "no-amendment" control when augmented with either consortium. Importantly consortium 1 augmented degradation better than consortium 2 in lubricant contaminated sterile sand.

Keywords : Bioremediation, Bioaugmentation, Lubricant-contaminated soil

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : BGJ4580012

ชื่อโครงการ : การศึกษาอัตราการเกิด Bioremediation และการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในดินที่มีการปนเปื้อนด้วยน้ำมันหล่อลื่นเมื่อใช้ Bioremediation เทคนิค

ชื่อนักวิจัย : นางสาวศวพร ศุภผล ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail Address : orn478@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: ธันวาคม พ.ศ. 2545 ถึง พฤศจิกายน พ.ศ. 2547

การศึกษาผลจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA ด้วยวิธี SDA แสดงให้เห็นว่า ลายพิมพ์ DNA ที่ใช้ 16S rRNA เป็นต้นแบบสารพันธุกรรมมีDNAสำคัญ 3 แถบเป็นตัวบ่งบอกการมีชีวิตให้ผลของลายพิมพ์เหมือนหรือคล้ายคลึงกับ *Bacillus marisflavi* *Microbacterium oxydans* และ *Pseudomonas oleovorans* ซึ่งกำลังมีบทบาทในตัวอย่างดินขณะนั้น จากนั้นทำการคัดแยกแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันหล่อลื่นเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการสุ่มเลือกแบคทีเรียจำนวน 317 โคโลนีโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วทำการศึกษาทางชีวเคมีเพื่อจัดกลุ่มแบคทีเรียในแต่ละ genus ผลการศึกษามี genus *Bacillus* จำนวน 77 ไอโซเลท เป็น genus *Microbacterium* จำนวน 35 ไอโซเลท และเป็น genus *Pseudomonas* จำนวน 9 ไอโซเลท คิดเป็น 38 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมดที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการศึกษา 16S identification ของแบคทีเรียจำนวน 17 ไอโซเลตสามารถยืนยันผลว่าอยู่ใน genus *Bacillus* จำนวน 6 ชนิด เป็น genus *Microbacterium* จำนวน 1 ชนิด และ เป็น genus *Pseudomonas* จำนวน 2 ชนิด ผลจาก phylogenetic relationship พบว่าลายพิมพ์ DNA ของแบคทีเรีย 3 ชนิดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีความเหมือนกับลายพิมพ์ DNA ของแถบ DNA ที่มีความสำคัญ จาก 16S rRNA มากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันหล่อลื่นของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาจากการคัดเลือกด้วยวิธี SDA จำนวน 3 ไอโซเลตเพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันหล่อลื่นจำนวน 11 ไอโซเลตซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยง โดยทำการทดลองใน 2 สภาวะคือ บ่ม 7 วันในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว และบ่ม 49 วันในทรายที่มีการปนเปื้อนด้วยน้ำ

มันหล่อลื่นในสภาวะปลอดเชื้อ ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันที่เหลือตกค้างโดยใช้ gas chromatography ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม มีความสามารถในการย่อยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนในน้ำมันหล่อลื่น เมื่อเปรียบเทียบกับ ตำหรับการทดลองที่ไม่ใส่เชื้อ และตำหรับการทดลองที่ใส่เชื้อ *E. coli* นอกจากนั้นกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาจากการคัดเลือกด้วยวิธี SDA มีประสิทธิภาพในการย่อยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนดีที่สุดในสภาวะที่ทำการทดลองในทรายที่มีการปนเปื้อนด้วยน้ำมันหล่อลื่น

คำสำคัญ : Bioremediation, Bioaugmentation, Lubricant-contaminated soil