Final Report

Diversity analysis and molecular characterization of bacterial community in used lubricating oil contaminated soils

Investigator

Suppasil Maneerat

Department of Industrial Biotechnology
Faculty of Agro-Industry
Prince of Songkla University

This research project was supported by Prince of Songkla University, Thailand, for the fiscal year of 2016-2017 (Grant No. AGR590252S)

2017

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by Prince of Songkla University, Thailand, for the fiscal year of 2016-2017 (Grant No. AGR590252S).

Suppasil Maneerat

ABSTRACT

This study investigates the diversity of bacterial community in three used lubricating oil (ULO)-contaminated soil (soil A, B, and C) obtained from motorcycle mechanical workshops around Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla. The diversity of indigenous bacteria in soils contaminated with ULO and during the enrichment process was determined and compared using molecular analysis. The relationship between bacterial community structure, physiochemical soil parameters, and the ULO composition in three ULO-contaminated soils was also studied. The diversity of indigenous bacteria in ULO-contaminated soil were determined by both culturing and a combination of culture-independent methods of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and Illumina MiSeq. The results showed that MiSeq produced 3,449 OTUs of twenty-four phyla, including candidate divisions and DGGE produced 59 OTUs of three phyla from the three ULO-contaminated soils. Proteobacteria (esp. Gammaproteobacteria) was dominant in soil A and B while Actinobacteria and Firmicutes were dominant in soil C. The bacterial diversity and community structure of indigenous bacteria in three consecutive enrichment cultures of three soils contaminated with used ULO were analyzed using PCR-DGGE analysis within 3 weeks. The result indicated that this technique produced 278 OTUs of four main groups of Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes and Actinobacteria. Gammaproteobacteria was the dominant class in all enrichment cultures (enrichment culture A, B and C). The results from the diversity and community structure of indigenous bacteria in both soil and enrichment culture of three soils contaminated with ULO demonstrated that soil C had the highest diversity and richness of bacterial community than other soils. Because soil C had a greater concentration and fresher composition of ULO compared to either soil A or B, which had more weathered ULO.

Forty-five isolates of ULO-degrading bacteria were isolated after enrichment cultivation of ULO-contaminated soils. All isolates were screened for ability to grow and degraded *n*-hexadecane in mineral salt medium (MSM) for 3 days. The result showed that strain NM32 gave the highest *n*-hexadecane biodegradation activity (18.90%). Based on the results of 16S rRNA gene sequences comparison, the strain NM32 showed 99% homology with *Leucobacter chromiireducens*, and it was designated as *L. chromiireducens* NM32. *L. chromiireducens* NM32 was used for enhance the bioremediation of ULO-contaminated soil microcosms. *L. chromiireducens* NM32 with inorganic fertilizer (SNL) promoted soil indigenous bacteria activity to degrade ULO during bioremediation process. The result

revealed that the microcosm of SNL showed the highest activity to degrade ULO and counts of ULO-degrading bacteria up to 56.04% and 6.10 log CFU g^{-1}, respectively within 60 days of bioremediation experiment. Also, it presented the great potential for ULO biodegradation rate of 0.0137 day^{-1} and half-life of 50.61 days. The bioremediation of ULO therefore require 3.4 months to achieve a complete removal of ULO with this condition.

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้ศึกษาความหลากหลายของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว 3 แหล่ง คือ ดิน A, B และ C จากร้านซ่อมมอเตอร์ไซด์รอบ ๆ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยหาและเปรียบเทียบชนิดความหลากหลายของแบคทีเรียประจำถิ่นในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล ซึ่งจะศึกษาทั้งแบคทีเรียในดินโดยตรงและแบคทีเรียในดินระหว่างกระบวนการส่งเสริมการเจริญโดยการทำ Enrichment culture นอกจากนี้ยังศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย ปัจจัยทางด้านกายภาพ-เคมีของดินและองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว ความหลากหลายของแบคทีเรียประจำถิ่นสามารถหาได้ทั้งวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (culturing method) และการร่วมกันของวิธีที่ไม่ต้องเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture-independent methods) ด้วยเทคนิค DGGE และ Illumina MiSeq ผลการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียประจำถิ่นจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วโดยตรงทั้ง 3 แหล่งพบว่าเทคนิค MiSeq สามารถหาความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียได้ 24 ไฟลัม (รวม candidate divisions) จาก 3,449 OTUs และเทคนิค DGGE สามารถหาความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียได้ 3 ไฟลัมจาก 59 OTUs และจากผลการศึกษาดังกล่าวพบว่าแบคทีเรียไฟลัม Proteobacteria โดยเฉพาะอย่างยิ่งคลาส Gammaproteobacteria พบมากในดิน A และ B ส่วนไฟลัม Firmicutes และ Actinobacteria พบมากในดิน C จากการวิเคราะห์ความหลากหลายและลักษณะของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วยเทคนิค DGGE ในระหว่างกระบวนการส่งเสริมการเจริญโดยการทำ Enrichment culture 3 ครั้งอย่างต่อเนื่องภายใน 3 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าเทคนิค DGGE สามารถหาความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียในระหว่างการทำ Enrichment culture ได้ 4 ไฟลัมจาก 278 OTUs ได้แก่ Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes และ Actinobacteria ซึ่งคลาส Gammaproteobacteria เป็นคลาสที่พบมากทั้งใน enrichment culture A, B และ C จากผลการศึกษาความหลากหลายและคุณลักษณะของแบคทีเรียประจำถิ่นในดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วทั้งแบคทีเรียในดินโดยตรงและแบคทีเรียในดินระหว่างการส่งเสริมการเจริญโดยการทำ Enrichment culture พบว่าดิน C มีความหลากหลายและมีความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียมากที่สุด เนื่องจากดิน C มีความเข้มข้นของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ดีกว่าและมีองค์ประกอบของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ใหม่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับดิน A หรือ B ที่มีความซับซ้อนของน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วมากกว่า

หลังจากการทำการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วด้วยเทคนิค Enrichment culture สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้น้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนได้ทั้งหมด 45 สายพันธุ์ นำแบคทีเรียที่แยกได้ทุกสายพันธุ์มา

คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเจริญและสามารถย่อยสลาย *n*-hexadecane ในอาหาร MSM เป็นเวลา 3 วัน โดยพบว่าสายพันธุ์ NM32 มีความสามารถในการย่อยสลาย *n*-hexadecane สูงที่สุดได้เท่ากับ 18.90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปเทียบเคียงสายพันธุ์ด้วยวิธีเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน16S rDNA พบว่าสายพันธุ์ NM32 มีความใกล้เคียง กับ *Leucobacter chromiireducens* 99 เปอร์เซ็นต์ จึงให้ชื่อว่า *L. chromiireducens* NM32 นำแบคทีเรียสายพันธุ์ *L. chromiireducens* NM32 มาประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ปนเปื้อนในชุดดินทดลอง การเติม *L. chromiireducens* NM32 และ ปุ๋ยอนินทรีย์ในชุดการทดลอง SNL ช่วยส่งเสริมการทำงานของแบคทีเรียประจำถิ่นในดินในระหว่างการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้ว โดยให้ผลการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วสูงสุด 56.04 เปอร์เซ็นต์และมีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียสูงที่สุด 6.10 log CFU ต่อกรัมดินภายใน 60 วันของการทดลอง นอกจากนี้ชุดการทดลอง SNL ยังให้ผลอัตราการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วที่ดีที่สุด 0.0137 ต่อวัน ซึ่งมีค่าครึ่งชีวิตอยู่ 50.61 วัน จากการศึกษาการส่งเสริมการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วในครั้งนี้สรุปได้ว่าต้องใช้เวลา 3.4 เดือนในการย่อยสลายน้ำมันหล่อลื่นเครื่องยนต์ที่ใช้แล้วให้สมบูรณ์โดยการทำงานร่วมกันระหว่าง *L. chromiireducens* NM32 แบคทีเรียประจำถิ่นและปุ๋ยอนินทรีย์

CONTENTS

		Page
Acknowledgements ……		I
Abstract…….....		II
Contents……		VI
List of Tables……		VIII
List of Figures……		XI
Abbreviations……...		XIII
Chapter		
1	Introduction and literature review……..	1
	Introduction……..	1
	Literature review……...	3
	1. Lubricating oil……..	3
	2. Used lubricating oil……..	3
	3. Aerobic degradation of hydrocarbons……..	6
	4. Remediation technologies for hydrocarbon contamination.	12
	5. Techniques of studying soil microbial communities……	23
	Objectives…….....	42
2	Characterization of the bacterial community of tropical Thai soils contaminated with used lubricating oil using PCR-DGGE and Illumina MiSeq techniques……	43
	2.1 Abstract……..	43
	2.2 Introduction……	44
	2.3 Materials and Methods……	45
	2.4 Results…….	50
	2.5 Discussion……...	61
	2.6 Conclusion…….....	65
3	Assessment of the bacterial community of soils contaminated with used lubricating oil by PCR-DGGE……	66
	3.1 Abstract……...	66
	3.2 Introduction…….	67

CONTENTS (Continued)

Page

Chapter

3.3 Materials and Methods…… 68

3.4 Results……. 72

3.5 Discussion……... 82

3.6 Conclusion ……. 88

4 Bioremediation potential of *Leucobacter chromiireducens* NM32 amendments for used lubricating oil in Tropical Thai soil…… 89

4.1 Abstract……... 89

4.2 Introduction……. 90

4.3 Materials and Methods…… 92

4.4 Results……. 99

4.5 Discussion……... 110

4.6 Conclusion ……. 115

5 Conclusions and suggestions……. 116

References…… 118

Appendix…….. 172

Appendix A…….. 173

Appendix B…….. 176

Appendix C…….. 177

Appendix D…….. 179

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Components of car engine base oil……..	4
2.	Contaminants of potential concern in used oils……...	5
3.	GC-MS analysis of motorcycle used lubricating oil……	5
4.	Summary of bioremediation strategies…….	18
5.	Advantages and disadvantages of conventional and biochemical methods to study microbial diversity……...	26
6.	Molecular techniques to studying microbial communities in environmental ecology…….	35
7.	An overview of current NGS sequencing technologies……...	40
8.	An overview of DNA sequencing technologies……...	41
9.	Physico-chemical and microbiological characteristics of soil samples A, B and C……..	52
10.	16S rDNA-V3 sequence similarities to closest relatives of DNA recovered from the respective bands in DGGE gels……	56
11.	Alpha-diversity indices based on MiSeq Illumina sequencing data from soil samples…….	60
12.	16S rDNA-V3 sequence similarities to closest relatives of DNA recovered from the respective bands in DGGE gels……	75
13.	Characteristics of the different microcosms performed for ULO degradation test……	94
14.	Physico-chemical characteristics of soil sample……..	99
15.	The biodegradation rate constants (k) and half-life ($t_{1/2}$) time if used lubricating oil biodegradation in the various treatments……..	107
16.	Analysis of variance table for TPH degradation at day 15……..	179
17.	Duncan's multiple range test for the ULO degradation data at day 15	179
18.	Analysis of variance table for TPH degradation at day 30……..	180
19.	Duncan's multiple range test for the ULO degradation data at day 30	180
20.	Analysis of variance table for TPH degradation at day 45……..	181
21.	Duncan's multiple range test for the ULO degradation data at day 45	181

LIST OF TABLES (Continued)

Table		Page
22.	Analysis of variance table for TPH degradation at day 60……..	182
23.	Duncan's multiple range test for the ULO degradation data at day 60	182
24.	Analysis of variance table for heterotrophic total viable counts at day 0…….	183
25.	Duncan's multiple range test for the heterotrophic bacteria data at day 0…….	183
26.	Analysis of variance table for heterotrophic total viable counts at day15…….	184
27.	Duncan's multiple range test for the heterotrophic bacteria data at day 15…….	184
28.	Analysis of variance table for heterotrophic total viable counts at day 30…….	185
29.	Duncan's multiple range test for the heterotrophic bacteria data at day 30…….	185
30.	Analysis of variance table for heterotrophic total viable counts at day 45…….	186
31.	Duncan's multiple range test for the heterotrophic bacteria data at day 45…….	186
32.	Analysis of variance table for heterotrophic total viable counts at day 60…….	187
33.	Duncan's multiple range test for the heterotrophic bacteria data at day 60…….	187
34.	Analysis of variance table for ULO-degrading bacteria counts at day 0……	188
35.	Duncan's multiple range test for the ULO-degrading bacteria data at day 0…….	188
36.	Analysis of variance table for ULO-degrading bacteria counts at day 15……	189

LIST OF TABLES (Continued)

Table		Page
37.	Duncan's multiple range test for the ULO-degrading bacteria data at day 15…….	189
38.	Analysis of variance table for ULO-degrading bacteria counts at day 30……	190
39.	Duncan's multiple range test for the ULO-degrading bacteria data at day 30…….	190
40.	Analysis of variance table for ULO-degrading bacteria counts at day 45……	191
41.	Duncan's multiple range test for the ULO-degrading bacteria data at day 45…….	191
42.	Analysis of variance table for ULO-degrading bacteria counts at day 60……	192
43.	Duncan's multiple range test for the ULO-degrading bacteria data at day 60…….	192
44.	Analysis of variance table for pH at day 0……...	193
45.	Duncan's multiple range test for the pH data at day 0…….	193
46.	Analysis of variance table for pH at day 15…….	194
47.	Duncan's multiple range test for the pH data at day 15……..	194
48.	Analysis of variance table for pH at day 30…….	195
49.	Duncan's multiple range test for the pH data at day 30……..	195
50.	Analysis of variance table for pH at day 45…….	196
51.	Duncan's multiple range test for the pH data at day 45……..	196
52.	Analysis of variance table for pH at day 60…….	197
53.	Duncan's multiple range test for the pH data at day 60……...	197

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Color comparison of fresh and used lubricating oils (ULOs)……	4
2.	Main principle of aerobic degradation of hydrocarbons by microorganisms……..	7
3.	Peripheral pathways of alkane degradation……	9
4.	The two alternative pathways of aerobic degradation of aromatic compounds……..	11
5.	Chromatogram of ULO extracted from three soil samples (A, B, C).	53
6.	DGGE fingerprints of the bacterial 16S rRNA gene V3 region amplified from soil A, B, C……	55
7.	Relative abundances at phyla level, based on the classification of partial 16S rDNA sequences of bacteria from of three ULO-contaminated soils (A, B, C) derived from PCR-DGGE (A) and MiSeq (B)……..	58
8.	Rarefaction curves of V4 region of the bacterial 16S rRNA gene from three ULO-contaminated soils (A, B, C) derived from MiSeq..	59
9.	Principal coordinate analysis using Past3 with the different sequences of bacterial communities in ULO-contaminated soils (A, B, C) derived from PCR-DGGE (A) and MiSeq (B)…….	59
10.	Heterotrophic total viable counts from nutrient agar (A) and ULO degrading bacteria counts from MSM agar (B) in ULO enrichment cultures of soil A (NA, MA), soil B (NB, MB) and soil C (NC, MC)…….	73
11.	DGGE fingerprints of the bacterial 16S rRNA V3 region amplified from enrichment culture A in each individual enrichment culture step was taken on 3, 5 and 7 days for 3 weeks of incubation…….	77
12.	DGGE fingerprints of the bacterial 16S rRNA V3 region amplified from enrichment culture B in each individual enrichment culture step was taken on 3, 5 and 7 days for 3 weeks of incubation…….	78

LIST OF FIGURES (Continued)

Figure		Page
13.	DGGE fingerprints of the bacterial 16S rRNA V3 region amplified from enrichment culture C in each individual enrichment culture step was taken on 3, 5 and 7 days for 3 weeks of incubation…….	79
14.	Comparison of predominant bacterial community among soils based on 16S rRNA……	81
15.	Detrended correspondence analysis (DCA) of DGGE of 16S rRNA data from three enrichment cultures (A, B, C) of ULO-contaminated soils for three weeks…….	82
16.	Chromatogram of used lubricating oil (ULO)……	100
17.	*n*-Hexadecane degradation and total viable count of each bacteria after 3 days of incubation……	101
18.	Heterotrophic total viable counts (A) and ULO-degrading bacteria counts (B) in each experiment during soil incubation at room temperature for 60 days…….....	103
19.	Soil pH in each experiment during soil incubation at room temperature for 60 days……..	104
20.	Residual TPH (A) and TPH degradation (B) in each experiment during soil incubation at room temperature for 60 days……	106
21.	DGGE profiles of bacteria during soil incubation at room temperature for 60 days…….	109
22.	Cluster analysis (A) and Principal components analysis (B) at the OUT level using Past3 in different microcosms of ULO-contaminated soils at 0, 15, 30, 45 and 60 days of incubation derived from PCR-DGGE analysis…….	110
23.	Standard curve of used lubricating oil (ULO)……	176

ABBREVIATIONS

CEC	=	Cation Exchange Capacity
CFU	=	Colony Forming Unit
DGGE	=	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
GC-FID	=	Gas Chromotography-Flame Ionization Detector
GC-MS	=	Gas Chromotography-Mass Spectrometry
L.	=	*Leucobacter*
LO	=	Lubricating Oil
MSM	=	Mineral Salt Medium
OTUs	=	Operational Taxonomic Units
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
ULO	=	Used Lubricating Oil
TPH	=	Total Petroleum Hydrocarbons