



UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA

**BIODEGRADATION OF DIESEL OIL BY *RHODOCOCCUS* SP. STRAIN
SeAG1**

SHAFINAZ BINTI ABD GANI

FBSB 2011 15

Abstract of thesis was presented to the Senate of Universiti Putra Malaysia in fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science

BIODEGRADATION OF DIESEL OIL BY *RHODOCOCCLUS* SP. STRAIN SeAG1

By

SHAFINAZ BINTI ABD GANI

JUNE 2011

Chairman : Professor Mohd Arif Syed, PhD

Faculty : Biotechnology and Biomolecular Sciences

The occurrence of diesel oil contamination in Malaysia's environment is very common. Many come from accidental spillage during extraction and transportation. The oil contains high levels of persistent hydrocarbons which can negatively influence the ecosystems. The use of microorganisms for the biodegradation of hydrocarbons present in the diesel oil has been suggested as the best approach for the elimination of diesel oil from the environment because this method is very cost effective and safe. To date, there are very few studies on bacteria that possess the ability to survive in high concentrations of hydrocarbons, salt, heavy metals and pesticides. Therefore the isolation and characterization of a potential diesel oil-degrading bacterium from hydrocarbon contaminated sites is crucial in this research. The technique on cell immobilization was employed to evaluate the efficiency of entrapped cells as well as the effect on shielding the cells from high levels of hydrocarbons, metals and pesticides. A total of six isolates was obtained from 50 sample sites contaminated with hydrocarbon. Isolate P2C, the best diesel oil-degrading bacterium was isolated from a hydrocarbon contaminated soil from Pulau Pangkor. 16S rRNA gene analysis, show that

Isolate P2C has high similarity to *Rhodococcus* sp., and was designated as *Rhodococcus* sp. strain SeAG1. This bacterium exhibited optimum growth and diesel oil degradation at 30°C in the medium containing 10% (v/v) diesel oil, and was able to degrade 64.4% of diesel oil after 30 days of incubation. The optimum nitrogen source was sodium nitrate (NaNO₃) at 0.7% (w/v). The optimum pH for bacterial growth and diesel oil degradation was pH 7.5 using phosphate buffer. *Rhodococcus* sp. strain SeAG1 was then immobilized in gellan gum using optimized parameters. The optimized parameters for cell immobilization were; 4 mm bead size; 250 bead/100 ml for initial cell loading; 0.75 % (v/w) of gellan gum with addition of 7% (v/v) hexadecane. Degradation of diesel oil using freely-suspended cells and immobilized cell was monitored weekly by using gas chromatography equipped with flame ionization detector (GC-FID). The free cells of strain SeAG1 can resist up to 50% (v/v) diesel oil with 5.4% of degradation compared to immobilized cells can degrade 50% (v/v) of diesel oil up to 23.6%, which was the maximum concentration tested in this study within 30 days. The effects of various salinity, heavy metals and pesticides on the degradation of diesel oil were tested for both on free and immobilized cells. Based on the results obtained, immobilized cell can resist higher concentrations of diesel oil and exhibited a higher degradation rate compared to free cells. Free cells can only tolerate up to 5% (w/v) salinity, while immobilized cells can withstand up to 10% (w/v) salinity. Chromium (Cr), Argentum (Ag) and Mercury (Hg) decreased diesel oil degradation in free cells but the effect was much lower on the immobilized cells. Similar results were obtained for pesticides where 3 of the tested pesticides which is carbofuran, paraquat dichloride and atrazine. This compound slightly lowered diesel oil degradation activity by free cells and none of the tested pesticides lowered diesel oil degradation activity by immobilized cells. Therefore the immobilization method has been proven to be an effective system for the bioremediation of diesel oil compared to free cells.

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Putra Malaysia sebagai memenuhi keperluan untuk Ijazah Master Sains

BIODEGRADASI MINYAK DIESEL OLEH *RHODOCOCCUS* SP. STRAIN SeAG1

Oleh

SHAFINAZ BINTI ABD GANI

JUN 2011

Pengerusi : Profesor Mohd Arif Syed, PhD

Fakulti : Bioteknologi dan Sains Biomolekul

Kejadian pencemaran minyak diesel dalam persekitaran Malaysia merupakan perkara biasa. Kebanyakannya yang datang dari tumpahan minyak akibat kemalangan semasa pengekstrakan, dan pengangkutan. Minyak ini mengandungi hidrokarbon yang rentan yang boleh memberi kesan negatif kepada ekosistem. Penggunaan mikroorganisma untuk biopenguraian minyak diesel adalah pendekatan terbaik untuk menghapuskan minyak diesel dari alam sekitar kerana kaedah ini murah dan selamat. Sehingga kini, tidak banyak kajian yang dilakukan ke atas bakteria yang mempunyai keupayaan untuk hidup pada kepekatan hidrokarbon, garam, logam berat dan racun perosak yang tinggi. Oleh itu, pemencilan dan pencirian bakteria pengurai minyak diesel yang berpotensi daripada 50 tapak yang dicemari oleh hidrokarbon amat penting dalam penyelidikan ini. Teknik sekat-gerak digunakan untuk menilai kecekapan sel sekat-gerak serta kesan perlindungan sel daripada tahap hidrokarbon, logam, garam dan pestisid yang tinggi. Sebanyak 6 isolat telah dipencilkan dari 50 tapak yang dicemari hidrokarbon. Isolat P2C, bakteria pengurai minyak diesel yang terbaik telah

dipencilkan daripada tanah tercemar dari Pulau Pangkor. Analisis gen 16S rRNA, Isolat P2C telah menunjukkan persamaan yang tinggi dengan *Rhodococcus* sp., dan telah diidentifikasi sebagai *Rhodococcus* sp. strain SeAG1. Isolat ini telah menunjukkan pertumbuhan serta penguraian minyak diesel yang optimum pada 30°C di dalam media yang mengandungi 10% (v/v) minyak diesel, dan ia dapat menguraikan 64.4% minyak diesel setelah 30 hari tempoh penderaman. Sumber nitrogen yang optimum adalah natrium nitrat (NaNO₃) pada 0.7% (w/v). pH optimum bagi pertumbuhan bakteria dan penguraian minyak diesel adalah pada pH 7.5 menggunakan larutan penimbal fosfat. *Rhodococcus* sp. strain SeAG1 ini kemudiannya disekat-gerak menggunakan kesemua parameter yang telah dioptimumkan. Parameter optimum bagi disekat-gerak sel adalah seperti berikut; 4 mm bagi saiz granul(bead); 250 granul(bead)/100 ml bagi amalan sel; 0.7 % (v/w) bagi kepekatan gam gellan dengan penambahan 7% (v/v) heksadekana. Penguraian minyak diesel menggunakan sel bebas dan sel yang disekat-gerak dipantau setiap minggu. Penguraian minyak diesel ini ditentukan menggunakan kromatografi gas yang dilengkapi dengan pengesanan nyalaan ion. Sel bebas bagi strain SeAG1 dapat menahan sehingga 50% (v/v) kepekatan minyak diesel dengan degradasi sebanyak 5.4%. dibandingkan dengan sel sekat-gerak yang boleh menahan sehingga 50% (v/v) kepekatan minyak diesel dengan degradasi sebanyak 23.6%, yang mana merupakan kepekatan yang maksimum diuji bagi ujikaji ini dalam tempoh 30 hari. Kesan kemasinan, beberapa logam berat serta racun perosak terhadap degradasi minyak diesel oleh sel bebas dan sel yang disekat-gerak telah diuji di dalam kajian ini. Berdasarkan keputusan yang didapati, sel yang disekat-gerak mampu menahan kepekatan diesel yang tinggi dan mempamerkan kadar penguraian yang tinggi berbanding sel bebas. Sel bebas hanya dapat menahan sehingga 5% (w/v) kemasinan manakala sel yang telah disekat-gerak dapat menahan sehingga 10% (w/v) kemasinan. Kromium (Cr), Argentum (Ag) and Merkuri (Hg) didapati mengurangkan penguraian minyak diesel oleh sel bebas tetapi kesannya terhadap sel

yang disekat-gerak adalah lebih rendah. Pemerhatian yang sama diperolehi bagi kesan racun perosak di mana 3 daripada racun perosak yang diuji iaitu carbofuran, paraquat diklorida dan atrazin. Bahan-bahan ini mengurangkan aktiviti penguraian minyak diesel oleh sel bebas dan degradasi minyak diesel oleh sel yang disekat-gerak didapati tidak terjejas oleh semua racun-racun perosak yang diuji. Oleh itu kaedah sekat-gerak ini telah terbukti sebagai satu sistem yang berkesan bagi bioremediasi minyak diesel berbanding sel bebas.

