The application of bioreactor to treat contaminated water with petroleum hydrocarbons using some isolated and genetically diagnosed bacteria produced biosurfactant compounds

A thesis submitted to
The Council of College of Science, University of Basrah,
In:
A partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science in Ecology
(Environmental Pollution)
By

Farah Dhiyea Bader

Supervised by:

Prof Dr. Asia Fadhile Al-Mansoory

Asst. Dr. Wijdan Hussein Abdul-sahib

January2021

تطبيق المفاعل الحيوي لمعالجة المياه الملوثة بالهيدروكربونات النفطية باستعمال بعض أنواع البكتريا المعزولة والمشخصة جينياً المنتجة للمركبات الحيوية الخافضة للشد السطحي

رسالة مقدمة إلى

كلية العلوم / جامعة البصرة

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علم البيئة

(التلوث البيئي)

تقدمت بها

فرح ضياء بدر

بكلوريوس علم البيئة

بإشراف

أ.د. اسيا فاضل عبد الله

أ.م.د وجدان حسين عبد الصاحب

رجب ١٤٤٢هـ **شباط ٢٠٢١م**

Summary

The current study, included collection of two samples from soil and water contaminated with petroleum hydrocarbons. Fifteen purified bacterial species, 9 species isolated from soil and 6 from water. These isolates identified at the level of the 16S-rRNA ribosome gene using polymerase chain reaction. Preliminary screening experiments performed to test the ability of these isolates of producing biosurfactants (hemolysis and drop collapsing, emulsification, oil spreading, and foam production tests).

Six isolates selected as the strongest from these tests for further study of the ability to degrade petroleum hydrocarbons. The isolates most effective in degrading chosen for biological treatment in bioreactors that treated with bacteria and biosurfactants produced from these bacteria after their extraction and study the change in pH, biological oxygen demand, and degradation of aliphatic and aromatic compounds which determined by gas chromatography device.

The 16S rRNA results, show similarity to (*Acinetobacter radioresistens* strain GH16092, *Bacillus subtilis* strain NJ1, *Burkholderia multivorans* strain FDAARGOS_624, *Bacillus oceanisediminis* strain SLA-350, *Acinetobacter radioresistens* strain NBH, *Exiguobacterium mexicanum* strain HH-3, *Acinetobacter radioresistens* strain 209-a etp, *Bacillus firmus* strain T1 and *Kocuria rhizophila* strain JGTA-S2) (%99.79, %99.93, %99.81 , %98.52, %95.69 , %99.32 , %100 , %99.84 , %92.41) respectively, Isolated from contaminated soil. Also six isolates show similarity to (*Pseudomonas anguilliseptica* strain VITEPRRL6, *Aeromonas hydrophila* strain D7, *Aeromonas caviae* strain J5, *Aeromonas aquariorum* strain B5-18, *Enterobacter*

kobei strain PB51 and *Aeromonas caviae* 204) (%99.11 , %94.53 , 100% , %99.86 , %99.86 , %99.58) respectively, Isolated from water.

The results of the preliminary screening for the ability of isolates to produce biosurfactants showed that the highest value of the drop collapsing test was recorded for the isolate (*Acinetobacter radioresistens* strain GH16092) and (*Bacillus oceanisediminis* strain SLA-350) and the isolate (*Burkholderia multivorans* strain FDAARGOS_624) recorded the highest value for the elusification test. (*Aeromonas hydrophila* strain D7) had the highest value for the oil-spreading test, and the isolate (*Acinetobacter radioresistens* 209-a etp) recorded the highest value for the foam test, while no isolate recorded hemolysis activity.

The two isolates (*Kocuria rhizophila* strain JGTA-S2 16S) and (*Exiguobacterium mexicanum* strain HH-3) showed the highest rates of crude oil degradation ability at (79.66%) and (76.73%), respectively. While the biosurfactant production show (0.955) g/L and (0.68) g/L for the two isolates respectively, which is the highest compared with other isolates.

The bioreactors results show decrease in the pH value within 14 days from 6.9 to 6.8 in the bioreactor with selected bacteria, from 7.08 to 7.4 in the biosurfactants bioreactor, while the pH values ranged between (7-7.3) in the control reactor.

Biological oxygen demand was 5.3 mg /L in industrial water. It increased after 14 days in the bioreactor with selected bacteria to 142 mg /L and 110 mg /L in the biosurfactants bioreactor, compared with control reactor, which increased to 48 mg /L.

The biological treatment of contaminated water in bioreactors show a decrease in the total alkane concentration after 14 days, from 200.44 to 0.94 mg /L in the bioreactor with selected bacteria, from 286.101 to 36.26 mg /L in

biosurfactants bioreactor, compared to control reactor which decrease from 245.5979 to 49.255 mg /L.

The results of aromatic compounds in the bacterium bioreactor, showed the highest (100%) degradation of Phenanthrene, Fluoranthene, Pyrene, Benzo (a) pyrene and (90.79%) of 2-methyl naphthalene and (85%) for each of Naphthalene and Acenaphthlene, and the percentage of (79.72%) for 1-methyl naphthalene and (77.50%) to Acenaphthene. While the lowest degradation ratios were (58.52%, 45.08%, 33.98% and 18.05%) for compounds (Fluorene, Benzo (k) fluoranthene, Anthracene, Benzo (b) fluoranthene) respectively.

In the biosurfactant treated bioreactor, the highest degradation rates (83.71%, 82.04% and 72.42%) (Naphthalene, 2-methyl naphthalene and 1-methyl naphthalene) respectively, while the lowest (68.75%, 60.90% and 46.05%). In addition, 45.04% for (Acenaphthlene, Acenaphthene, Fluorene, and Phenanthrene) compounds respectively, compared to the control reactor, which showed a decrease in degradation rates ranged from (13.69%, 8.99%, 10.18%, 19.42%, 18.62%, 30.31% and 26.85) For (Naphthalene, 2-methyl naphthalene, 1-methyl naphthalene, Acenaphthlene, Acenaphthene, Fluorene, and Anthracene) compounds.

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية جمع عينتين من التربة والمياه الملوثة بالهيدروكربونات النفطية تم تنقية ١٥ نوع من البكتيريا ٩ من التربة، و ٦ من الماء. شخصت هذه العزلات جينياً على مستوى الجين الرايبوسومي 16S- rRNA باستخدام التفاعل التسلسلي للبلمرة وأجريت تجارب الغربلة الأولية لاختبار قابلية العزلات على انتاج المواد الخافضة لشد السطحي (تحلل الدم وانهيار القطرة والاستحلاب وانتشار الزيت وانتاج الرغوة).

اختيرت ستة عزلات كانت الأقوى في هذه الاختبارات لإجراء التكسير الحيوي للهيدروكربونات النفطية. العزلات الأكثر فعالية في التكسير اختيرت للمعالجة الحيوية في المفاعل الحيوي المعامل بالبكتيريا والمفاعل الحيوي المعامل بالمركبات الحيوية الخافضة للشد السطحي المنتجة من هذه البكتيريا بعد استخلاصها وتم دراسة التغير في عامل الاس الهيدروجيني pH والمتطلب الحيوي للأوكسجين BOD_5 وتحلل المركبات الأليفاتية والأروماتية والتي تم تشخيصها باستخدام جهاز كروماتوغرافيا الغاز Gas Chromatography GC.

واظهرت نتائج التشخيص الجيني للأنواع التسعة المعزولة من التربة الملوثة كانت تعود للأنواع *Acinetobacter radioresistens* strain GH16092 و *Bacillus subtilis* strain NJ1 و *Burkholderia multivorans* strain FDAARGOS_624 و *Bacillus oceanisediminis* strain SLA-350 و *Acinetobacter radioresistens* strain NBH و *Exiguobacterium mexicanum* strain HH-3 و *Acinetobacter radioresistens* strain 209-a etp و *Bacillus* firmus strain T1 و *Kocuria rhizophila* strain JGTA-S2 16S بنسبة تطابق ٩٩,٧٩% و ٩٩,٩٣% و ٩٩,٨١% و ٩٨,٥٢% و ٩٥,٦٩% و ٩٩,٣٢% و ١٠٠% و ٩٩,٨٤% و ٩٢,٤١% على التوالي و ستة أنواع معزولة من المياه الملوثة تحت الانواع *Pseudomonas anguilliseptica* strain VITEPRRL6 و *Aeromonas hydrophila* strain D7 و

Aeromonas caviae strain J5 و *Aeromonas aquariorum* strain S5-18 و *Enterobacter kobei* strain PB51 و *Aeromonas caviae* strain 204-b blu المعزولة من المياه بنسب تشابه ٩٩,١١% و ٩٤,٥٣% و ١٠٠% و ٩٩,٨٦% و ٩٩,٨٦% و ٩٩,٥٨% على التوالي.

كما أظهرت نتائج الغربلة الأولية لقابلية العزلات على انتاج المواد الخافضة للشد السطحي ان اعلى قيمة لاختبار انهيار القطرة سجل للعزلة *Acinetobacter radioresistens* strain GH16092 و *Bacillus oceanisediminis* strain SLA-350 كما سجلت العزلة *Burkholderia multivorans* strain FDAARGOS_624 اعلى قيمة لاختبار الاستحلاب والعزلة *Aeromonas hydrophila* strain D7 اعلى قيمة لاختبار انتشار الزيت و سجلت العزلة *Acinetobacter radioresistens* 209-a etp اعلى قيمة لاختبار الرغوة بينما لم تسجل أي عزلة تحللا للدم.

وقد أظهرت العزلتين *Kocuria rhizophila* strain JGTA-S2 16S و *Exiguobacterium mexicanum* strain HH-3 اعلى معدلات لتكسير النفط الخام بنسبة 79.66% و 76.73% على التوالي كما سجلت اعلى محصول للمواد الحيوية الخافضة للشد السطحي بقيمة ٠,٩٥٥ غم/لتر و ٠,٦٨ غم/لتر للعزلتين على التوالي وهو الأعلى بالمقارنة مع العزلات الأخرى.

كما أظهرت نتائج تطبيق المفاعلات الحيوية انخفاضا في قيمة الاس الهيدروجيني خلال ١٤ يوم من ٦,٩ الى ٦,٨ في المفاعل الحاوي على البكتيريا ومن ٧,٠٨ الى ٧,٤ في المفاعل الحاوي على المركبات الحيوية الخافضة للشد السطحي في حين تراوحت قيم الاس الهيدروجيني في مفاعل السيطرة بين (٧,٣-٧).

اما المتطلب الحيوي للأوكسجين فقد كان ٥,٣ ملغم/لتر للمياه الصناعية وارتفع بعد مرور ١٤ يوم على بدء التجربة في مفاعل البكتيريا الى ١٤٢ ملغم/لتر و110 ملغم/لتر لمفاعل المركبات الخافضة للشد السطحي وبالمقارنة مع مفاعل السيطرة الذي ارتفع المحتوى الحيوي للأوكسجين له بقيمة ٤٨ ملغم/لتر.

واظهرت نتائج المعالجة الحيوية للمياه الملوثة في المفاعلات الحيوية انخفاضا في تركيز الألكانات الكلية بعد مرور ١٤ يوم من 200.44 الى 0.94 ملغم/لتر في المفاعل المعامل بالبكتيريا ومن 286.101 الى 36.26 ملغم/لتر في المفاعل المعامل بالمركبات الحيوية الخافضة للشد السطحي مقارنة مع مفاعل السيطرة الذي انخفضت فيه التراكيز من 245.5979 الى 49.255 ملغم/لتر.

اما نتائج تحلل المركبات الأروماتية في مفاعل البكتيريا فقد أظهرت اعلى تحلل بنسبة ١٠٠% للمركبات Phenanthrene و Fluoranthene وPyrene وBenzo(a)pyrene و90.79% لمركب 2-methyl naphthalene و 85% لكل من Naphthalene و Acenaphthlene ونسبة تحلل 79.72% لمركب 1-methyl naphthalene و تحلل Acenaphthene بنسبة 77.50% في حين كانت ادنى نسب تحلل 58.52% و 45.08% و 33.98% و 18.05% للمركبات Fluorene و Benzo(k)fluoranthene و Anthracene و Benzo(b)fluoranthene على التوالي.

وفي المفاعل الحيوي المعامل بالمواد الحيوية الخافضة للشد السطحي فقد كانت اعلى نسب تحلل ٨٣,٧١% و ٨٢,٠٤% و٧٢,٤٢% للمركبات Naphthalene و ٢-methyl naphthalene و١-methyl naphthalene على التوالي وادناها ٦٨,٧٥% و٦٠,٩٠% و٤٦,٠٥% و٤٥,٠٤% للمركبات Acenaphthlene و Acenaphthene و Fluorene وPhenanthrene على التوالي مقارنة مع مفاعل السيطرة الذي اظهر انخفاضا بنسب التكسير تراوحت من ١٣,٦٩% و ٨,٩٩%

و١٠,١٨% و١٩,٤٢% و١٨,٦٢% و٣٠,٣١% و٢٦,٨٥% للمركبات Naphthalene و 2-methyl naphthalene و1-methyl naphthalene و Acenaphthlene و Acenaphthene و Fluorene و Anthracene على التوالي.