

Bakteriële populasieprofiel vanaf diesel verkry by vulstasies



Authors:

Eduard Venter¹
Phumzile Sibisi¹
Natasha van de Haar¹
Adriaana Jacobs²

Affiliations:

¹Department of Botany and Plant Biotechnology, University of Johannesburg, South Africa

²Agriculture Research Council, Plant Protection Research, South Africa

Corresponding author and email:

Eduard Venter
eduardv@uj.ac.za

Dates:

Received: 22 July 2015
Accepted: 27 Oct. 2015
Published: 11 Feb. 2016

How to cite this article:

Venter, E., Sibisi, P., Van de Haar, N. & Jacobs, A., 2016, 'Bakteriële populasieprofiel vanaf diesel verkry by vulstasies', *Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Natuurwetenskap en Tegnologie* 35(1), Art. #1359, 7 pages.
<http://dx.doi.org/10.4102/satnt.v35i1.1359>

Copyright:

© 2016. The Authors.
Licensee: AOSIS. This work is licensed under the Creative Commons Attribution License.

Mikrobiële groei kan plaasvind in opgebergde dieselbrandstof. Hierdie groei kan die latere benutting van die brandstof in voertuie en noodkragopwekkers beïnvloed deurdat dit brandstoffilters verstop. Verder kan 'n mutualistiese mikrobegemeenskap ontwikkel wat polisikliese aromatiese koolwaterstowwe (PAK) kan afbreek tot voordeel van mekaar. Dié projek se doelstelling was om die bakteriële gemeenskapsprofiel van gestoorde diesel te bepaal deur gebruik te maak van tegnieke wat beide die kweekbare en nie-kweekbare fraksies van die populasie bestudeer. Bakteriële en totale DNS is geïsoleer vanaf diesel en bestudeer deur gebruik te maak van denatureringsgradiënt gelelektroforese (DGGE) van die 16S ribosomale DNS (rDNS). Ses bakteriële stamme, afkomstig uit twee verskillende genera (verwant aan *Bacillus* en *Lysinibacillus*), is geïsoleer en kon as suiwer kulture groei met diesel as die enigste koolstofbron. Die DGGE-profiel het aangedui dat daar 'n verdere agt genera in die diesel voorkom. Beide die tegnieke het bakteriële geïdentifiseer wat verwant is aan *Bacillus pumilus*. *Bacillus pumilus* was die mees dominante spesie (50%) wat vanaf die kweekbare fraksie geïsoleer is. Die isolering van bakteriële wat voorkom in kommersieel verkrygte diesel kan gebruik word om die graad van diesel afbraak tydens die berging daarvan te bepaal. Dit kan ook verder gebruik word om bioremediëring van diesel besoedeling te bewerkstellig.

Bacterial population profiling from diesel obtained from fuel stations. Microbial growth develops in stored diesel fuel. This can influence later use in emergency backup generators and vehicles through the clogging of fuel filters by the development of biomass. A mutualistic microbial community can develop in stored fuel products that degrade polycyclic aromatic hydrocarbons to the benefit of one another. This project aimed to study the bacterial community profile of diesel obtained from commercial fuel stations using culture dependent and independent methods. Bacteria and total DNA were isolated from the diesel and the community was studied using denaturing gradient gel electrophoresis of the 16S rDNA region. This resulted in the isolation of six bacterial species from two different genera (related to *Bacillus* and *Lysinibacillus*) that could grow in pure culture with diesel as carbon source. The denaturing gradient gel electrophoresis analysis indicated the occurrence of an additional eight genera in the sampled diesel. Both methods identified bacteria related to *Bacillus pumilus* occurring in the samples. *Bacillus pumilus* was the predominant species (50%) isolated from diesel samples using culture media. The identification of bacteria occurring in commercial diesel samples can be useful in determining the degree of degradation occurring during the storage of the product and also possible bioremediation agents in diesel fuels spills.

Inleiding

Mikrobiële verwerking is die afbraak van substrate deur mikroörganismes (Bento *et al.* 2005). Tydens die stoor van enige produk kan dit gekontamineer word deur mikroörganismes. Hierdie mikroörganismes is afkomstig vanaf die grond, lug, besoedelde waswater, asook tydens die vorming van biofilms in die tenks wat vir opberging gebruik word (Gaylarde, Bento & Kelley 1999). Hierdie tipe mikrobekontaminasie verminder die lewensduurperk van toerusting en kan lei tot die ontwikkeling van afsakels, of slyk, wat die produk se kwaliteit nadelig beïnvloed. Dit breek verder metaal af deur etsing, wat nadelig kan wees in opbergingstenks en pype in verskeie industrieë, soos byvoorbeeld brandstofferaffinaderye (Gaylarde *et al.* 1999).

Al hierdie genoemde eienskappe maak dit duidelik dat die groei en ontwikkeling van mikroörganismes in gestoorde brandstofprodukte bestudeer moet word. Wanneer die probleem gesien word in die huidige omstandighede waar gereelde kragonderbrekings en wisselende brandstofpryse gekoppel word aan pogings om brandstofgebruik te verminder, kan hierdie studie 'n bydrae maak tot die beter langtermynopberging van diesel.

Read online:



Scan this QR code with your smart phone or mobile device to read online.

Diesel is 'n meer omgewingsvriendelike brandstof as petrol vanweë 'n hoër energie inhoud. Die hoeveelheid energie wat vrygestel word tydens ontbranding van diesel is hoër as dié van die ekwivalente petrolvolume. Dit beteken dat dieselaangedrewe voertuie verder kan ry met 'n liter brandstof. 'n Nadeel van diesel is dat dit afgebreek word tydens langtermynopberging wat die kwaliteit en werksverrigting daarvan beïnvloed. Die afbraak van diesel kan te wyte wees aan biotiese (mikrobiële groei) of abiotiese afbraak (oksidering, sameklompings, emulsievorming, ens.). Diesel is 'n vermenging van paraffien en aromatiese koolwaterstowwe en die afbraak daarvan vind gewoonlik plaas deur mikrobiële populasies wat meewerk om die komplekse voedselbron te benut (Richard & Vogel 1999). Dit lei tot bykomende beskikbare water in die gestoorde diesel en veroorsaak dat die afbraak vinniger gebeur aangesien mikrobiële groei toeneem. Hierdie groei breek die diesel af en verminder die potensiële gebruik daarvan as brandstof. Die langtermynopberging van diesel is 'n algemene verskynsel in plattelandse omgewings en noodkragopwekkersisteme wat nie gereeld gebruik word nie.

Langtermynopberging van diesel kan die stabiliteit van die brandstof laat afneem (Stavinoha, Westbrook & LePera 1981). Hierdie afname in stabiliteit kan toegeskryf word aan die oliesamestelling en die produksiemetodes wat gebruik is om die brandstof te vervaardig. Tesame dra hierdie eienskappe by tot die vatbaarheid van die geproduseerde diesel vir afbraak deur mikrobies. Die klimaat waaronder die brandstof opgeberg word, dra verder by tot die afbraak wat kan plaasvind. Warm en klam omgewings bevorder vinniger mikrobiële groei en is die ideale omgewing om die afbraak van die brandstof te bespoedig. Die brandstof kan te enige tyd met mikrobies besoedel word, hetsy tydens die produksie, vervoer of opberging daarvan. Alhoewel verskeie voorkomende stappe geneem kan word om die brandstof te beskerm teen mikrobiële groei, lei dit tot verhoogde kostes tydens die produksie van die brandstof. Stabiliseerders en biosiede kan bygevoeg word om mikrobiële groei en afbraak te vertraag. Verdere verwydering van water uit die brandstof en gereelde skoonmaak van die opbergingstenks kan groei vertraag en die brandstof beskerm teen afbraak (Bento *et al.* 2005).

'n Sleuteleienskap van mikrobiële groei is die teenwoordigheid van water. Dit kan voorkom as 'n film op die oppervlak of verspreid binne die diesel of olie (Littman 1981) wees. Water kan maklik vanuit die atmosfeer in 'n opbergingstenk insypel as die kondisies reg is. Dit veroorsaak die vinnige groei van mikroörganismes wat die kwaliteit van die diesel vinnig laat afneem. Verder kan sel-metabolisme ook tot die vorming van meer water bydra indien koolwaterstowwe tot koolsuurgas en water afgebreek word. Die groei kan eksponensieel toeneem en dus die gestoorde dieselaafbraak vinniger laat plaasvind (Gaylarde *et al.* 1999). Die verdere teenwoordigheid van water is, naas die versnelde mikrobiële groei ook 'n groot probleem, aangesien beide filters kan verstopt en 'n dieselenjin se werksverrigting kan laat afneem. Dieselolie se oplosbaarheid in die gevormde

vrye water sal toeneem wanneer die verhouding van water tot diesel groter is as die oplosbaarheid by die spesifieke temperatuur (Du *et al.* 2001). Alhoewel diesel nie redelik maklik in water oplos nie, sal verhoogde temperature sodanige oplosbaarheid verhoog. Faktore wat verder bydra tot hierdie probleem is dat dieselopberging gewoonlik buite plaasvind en die opbergingstenks aan temperatuur- en humiditeitskommeling blootgestel word, wat verdere vorming van vrye water in die gestoorde diesel bevorder.

Om die nie-kweekbare mikrobies in enige monster te bestudeer is dit nodig om na die DNS-profiel te kyk om verskillende spesies van mekaar te onderskei. Die gebruik van sogenaamde volgendegenerasie-DNS-basisvolgordebepaling vergemaklik die proses, maar dit vereis bioinformatika-ondersteuning wat duur is om te bekom. Verskeie tegnieke bestaan wat op meer tradisionele molekulêre tegnieke gebaseer is. Polimerasekettingreaksie-afbrekingsgradiënt-jelektroforese (PKR-DGGE) (Muyzer, De Waal & Uitterlinden 1993) is 'n tegniek wat baie goed werk om spesies vanuit verskillende omgewingsmonsters met mekaar te vergelyk. Die verskille tussen profiele is 'n direkte verteenwoordiging van die verskille tussen die monsters. As daar dus geen verskille in die populasieprofiel is nie, kan dit aandui dat daar geen verskil is tussen die onderskeie populasiesamestellings nie (Muyzer *et al.* 1993). Wanneer dit waargeneem word in dieselaafbraak kan daar dus aangeneem word dat 'n spesifieke groep mikrobies die diesel afbreek en wanneer dit 'n spesifieke populasiedigtheid bereik, die populasie in relatiewe ewewig is totdat die diesel afgebreek is.

Die identifikasie van mikrobies wat teenwoordig is in diesel sal help om dieselaafbraak te voorkom deur strategieë te ontwikkel wat dieselaafbraak kan voorkom. In hierdie studie word na beide die kweekbare en nie-kweekbare mikrobefraksies van kommersiële diesel, afkomstig vanaf verskillende vulstasies, gekyk. DGGE is gebruik om die nie-kweekbare fraksie te ondersoek vir bakterieë wat oorleef in die diesel en moontlik ook kan aanwas. Hierdie studie kan bydra tot die kennis van bakteriële spesies wat gebruik kan word om bioremediëring van dieselbesoedelde grond in die toekoms aan te vul.

Materiaal en metodes

Nie-kweekbare populasie-analise deur denatureringsgradiënt jelektroforese-profiel te gebruik

Diesel is verkry vanaf ses verskillende vulstasies rondom die Universiteit van Johannesburg. Die vulstasies berg elkeen van verskillende handelsmerke diesel. Om voldoende hoeveelhede bakteriële selle te bekom vir totale DNS-ekstraksie, is hoeveelhede van een liter volumes van die 500 dele per miljoen (dpm) swawelbevattende diesel gesentrifugeer in 'n Biofuge Stratos sentrifuge (Heraeus Instruments) teen $10\,000 \times g$ vir 20 min. Al die diesel is afgepipeteer en die totale DNS geëkstraheer deur gebruik

te maak van die ZR Grondmikrobe-DNS-ekstraksiestel (Zymo Research) volgens hulle aanduidings. Die bakteriële populasie diversiteit is bepaal deur DGGE (Muyzer *et al.* 1993). Die 16S deel van die ribosomale DNS (rDNS) is geamplifiseer in 'n 20 μL volume waarin 20 ng templaar DNS, 0.2 M van elke dNTP, 0.1 eenhede (U) Exsel Taq DNS polimerase (JMR holdings), 1 x Exsel reaksiebuffer, en 0.25 μM inleier K (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Siciliano *et al.* 2003) en inleier M (5'-CGCCCGCCGCGCGCGG CCGGCGGGGCGGGGACGGGGGAGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3') (Fjellbirkeland, Torsvik & Øvreås 2001) gebruik is. DNS-amplifisering is gedoen in 'n Mini-Opticon (Biorad) en het bestaan uit 'n aanvanklike denaturering van 10 min teen 95 °C, gevolg deur 38 siklusse van 30 s teen 94 °C, 30 s teen 58 °C, en 60 s teen 72 °C. Aan die einde van die program is daar 'n stap van 10 min teen 72 °C om al die produkte volledig te amplifiseer. Die geproduseerde PKR-produkte is op 'n 1.5% agarose jel teen 1 V s⁻¹ geskei om te verseker dat die reaksies gewerk het. Daarna is die produkte geskei deur DGGE waarvan die gradiënt 40% – 60% was (MicroSci Consultants). 'n Eenvoudigesoortgelyke-koëffisiëntanalise is uitgevoer om die profiele met mekaar te vergelyk deur gebruik te maak van die Gel2k-program (<http://folk.uib.no/nimsn/gel2k/>). In hierdie analise dra beide die teenwoordigheid en die afwesigheid van bande in die profiel ewe veel inligting by. Verteenwoordige bande van die profiele is uit die jel uitgesny en die basisvolgorde daarvan is bepaal deur gebruik te maak van inleier K. Eerstens is die bande in water oornag deur diffusie vanuit die jel onttrek en daarna is die DNS-basisvolgorde bepaal. Hierdie reaksies is gedoen volgens die 'BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing'-handleiding en die produkte is op 'n 'ABI 3130XL Genetic Analyzer' by die Universiteit van Johannesburg se basisvolgordebepalingsfasiliteit geskei.

Mikrobiese steekproef en groeitoestand

Die steekproefneming is geskoei op klassieke studies wat monsters uit besoedelde grond geneem het. Bakterieë is direk geïsoleer vanuit 500 dele per miljoen (dpm) swawelbevattende diesel, asook deur reeksverduunnings (1 x 10⁻⁵ finale verdunning in 0.7% fisiologiese soutoplossing, FSO) van die diesel. Vir die neem van die direkte monsters is hoeveelhede van een liter van die diesel gesentrifugeer in 'n Biofuge Stratos sentrifuge teen 10 000 x g vir 20 min. Die gekompakteerde sediment is gehersuspendeer in 1000 μL FSO en 500 μL volumes uitgeplaar op GPY medium (Glukose 5 g l⁻¹; pepton, 10 g l⁻¹; gisekstrak 5 g l⁻¹; NaCl 5 g l⁻¹; agar 15 g l⁻¹; pH 7.2). Na die plate by kamertemperatuur geïnkubeer is (25 °C), is die kolonies wat visueel verskillend gelyk het, opgetel en weer uitgestreep op GPY plate om reinkulture te verkry vir die opvolgende studies. GPY plate is gebruik om alle bakterieë te isoleer.

DNS-ekstrahering en filogenetiese analise van die kweekbare bakteriële stamme

DNS is geïsoleer vanuit die bakterieë deur gebruik te maak van die Bloed-en- Weefselstel (Qiagen) sonder enige

aanpassings van die protokol. Daarna is die DNS gebruik as templaar in 'n reaksie waarin 'n deel van die 16S rDNS-geen vermeerder is met die gekonserveerde inleiers 16F27 (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') en 16R1485 (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCA-3') (Ben-Haim *et al.* 2003). Die reaksies het plaasgevind in 20 μL volumes waarin 20 ng DNS as templaar geplaas is, saam met 0.2 M van elke dNTP, 0.1 U Exsel Taq DNS polimerase, 1 x Exsel reaksiebuffer, en 0.25 μM van elke inleier. Die reaksie is voltooi in 'n MyCycler (BioRad) en het bestaan uit 'n reeks stappe waarin die aanvanklike inkubasiestap vir 5 min teen 94 °C geduur het. Dit is gevolg deur 35 siklusse van 30 s teen 94 °C, 30 s teen 55 °C, 90 s teen 72 °C, met 'n finale inkubasiestap van 7 min teen 72 °C. Vyf mikroliter van elke produk is op 'n 1% agarose jel geskei soos verduidelik in 'n voorafgaande afdeling. Die geamplifiseerde produk in die oorblywende 15 μL is skoongemaak deur dit met 96% etanol te presipiteer (twee volumes etanol, 0.1 volume 3 M natriumasetaat, pH 4.6). Die produkte se basisvolgordes is in beide rigtings bepaal deur afsonderlike reaksies op te stel met óf inleier 16F27 óf 16R1485 soos in die voorafgaande afdeling beskryf.

Die basisvolgordes is geanaliseer teen die NCBI GenBank databasis deur 'n BLAST-analise te doen. Hierdeur is die datastel opgestel wat gebruik word om die filogenetiese verwantskappe van die verskillende bakteriële stamme te bepaal. Veelvoudige basisvolgordegroepering is gedoen met behulp van die MAFFT weergawe 5-program (Katoh *et al.* 2005). Spasies is as ontbrekende data in die analise gehanteer. Die filogenetiese analise is gebaseer op parsimonie deur gebruik te maak van die PAUP 4.0*-program (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony* and Other Methods version 4*) (Swofford 2002). Heuristiese soektogte is uitgevoer met die lukrake byvoeging van basisvolgordes (100 herhalings), boom halvering-herkoppelingtakuitruiling (TBR), MULPAR gestel om effektief bydraend te wees, terwyl die MaxTrees-parameter gestel is om outomaties toe te neem. Die egaligheidsindeks (CI) en die terughoudingsindeks (RI) is ook vir die datastel bepaal. Die filogenetiese boom is gewortel met *Escherichia coli* as die monofiletiese sustersbuitegroep van die res van die taksa. Steekproef-hersteekproefnemings is gedoen om die vertakkingspunte se herhaalbaarheid te bepaal (per 1000 herhalings) vir die mees parsimoniese boom wat getrek is gebaseer op die datastel.

Bakteriële groei met diesel as die enigste koolstofbron

Die groei van ses bakteriële stamme is bepaal as staande kulture met diesel as die enigste koolstofbron. Dit is gedoen in 300 mL Bushnell-Haas media (0.20 g l⁻¹ MgSO₄, 0.02 g l⁻¹ mM CaCl₂, 1 g l⁻¹ KH₂PO₄, 1 g l⁻¹ K₂HPO₄, 1 g l⁻¹ NH₄NO₃, 0.05 g l⁻¹ FeCl₃, pH 7) (Bushnell & Haas 1941) wat aangevul is met filtergesteriliseerde diesel. Die flesse is geïnkubeer deur 1 ml selle wat 'n seldigheid van 1 OD₆₀₀ gehad het, by te voeg. Die groei van die bakterieë is bepaal deur spektrofotometrie onderskeidelik 5, 14, 21, en 28 dae ná inokulasie. Die negatiewe kontrole het geen koolstofbron bevat nie, en die positiewe kontrole het 5 g l⁻¹ glukose bevat. Die eksperiment is drie keer herhaal.

Resultate

Nie-kweekbare populasie-analise deur denatureringsgradiënt jelektroforese-profiele

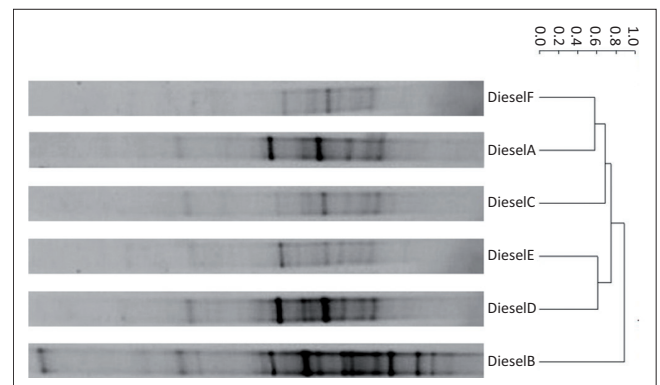
Die amplifisering van die 16S rDNS PKR het amplifiseringsprodukte met die verwagte lengtes opgelewer (ca. 500 basispare, bp) vir al ses van die dieselsonsters. Die fragmente is geskei deur middel van DGGE om die verskillende profiele vir die onderskeie dieselsonsters waar te neem (Figuur 1). Hierdie analise het aangedui dat daar 'n diverse bakteriële populasie in al die dieselsonsters teenwoordig was. Die profiele het tussen elf (monster F) en negentien (monster B) bande vertoon. Verskeie van die helderder bande tussen monsters is gedeel, maar die meeste bande is uniek tot elke monster gewees. Vyf van die monsters (A, C, D, E en F) het baie ooreenstemming getoon tussen die verskillende profiele en beskik moontlik oor baie ooreenstemmende populasiestrukture. Monster B het die meeste variasie getoon en het ook die meeste bande in die profiel gehad. Die eenvoudigesoortgelyke-koëffisiëntanalise het die verskillende profiele gegroep volgens gedeelde ooreenkomste (Figuur 1). Hierdie analise het aangedui dat die profiele van monsters A en F, asook D en E nader gegroep het aan mekaar as aan die ander monsters. Monster C het basaal gegroep tot die profiele van monsters A en F, en monster B het heeltemal apart van die ander monsters gegroep. Bande wat duidelik onderskei kon word van ander bande is uitgesoek vir basisvolgordebepaling. Bande wat gedeel is tussen profiele is slegs vanuit een profiel geïsoleer vir bogenoemde analise. Dit het tot gevolg gehad dat 'n totaal van sestien bande geselekteer is. Een van die geïsoleerde bande het as dubbelband vertoon na die aanvanklike amplifisering, en is dus nie verder gekarakteriseer nie. Vyf van die ander bande se volgordebepalings het gefaal deurdat dit geblyk het dat hulle veelvuldige volgordes het. Hierdie bande is ook nie verder gekarakteriseer nie. Dus is tien volgordes teen die GenBank databasis geëvalueer (Tabel 1). Hierdie bande het almal hulle oorsprong in monsters A, B of D gehad en dus is monsters C, E en F nie verder verteenwoordig as die gedeelde bande tussen die verskillende monsters nie. Drie van die geïsoleerde bande vanaf monster B, het hoë homologie gehad met onkweekbare bakterieë, twee fragmente het homologie gedeel met die *Massilia*-spesies, en een met *Bosea minatitlanensis*. Twee van die nie-kweekbare ooreenstemmings was met dieselfde basisvolgorde (KJ809406) beskik, maar

hulle E-waardes het verskil. Dit is ook waar gewees vir die *Massilia*-spesie ooreenkomste.

Kweekbare fraksie en groeistudie

Ses bakteriële stamme is vanuit die dieselsonsters geïsoleer. Hierdie stamme is gesuiwer om reinkulture te verkry en is verder gekarakteriseer ten opsigte van die 16S rDNS operon. Dit het basisvolgorde data gelewer wat vergelyking met die GenBank- databasis moontlik gemaak het om die voorlopige identifikasie van die stamme te bewerkstellig (Tabel 2). Dié voorlopige identifikasie is gebaseer op basisvolgorde ooreenkomste en is gebruik in 'n filogenetiese analise om hulle finale verwantskap met ander bakteriële spesies te bepaal. Drie van die geïsoleerde stamme het sterk verwantskap getoon aan verskillende stamme van *Bacillus pumilus* (Tabel 2). Twee stamme het sterk verwantskap getoon met die *Bacillus* spesies wat na verwant is aan *B. pumilus*, en een het sterk verwantskap getoon met *Staphylococcus epidermidis*. Die basisvolgorde data vir die stamme is verder gebruik in die filogenetiese analise om 'n beter beeld te skep van hulle verwantskap binne die die Proteobakterieë populasie.

Die ses stamme is ook verder ondersoek vir hulle groei op diesel as enigste koolstofbron. Al die stamme, buiten stam A, het dieselfde groeipatroon vertoon (Figuur 2). Dit het ingesluit dat hulle almal aktiewe groei oor die 28 dae van die studie getoon het. Slegs stam A het na dag 21 al 'n afname in groei getoon.



Nota: Laan (1) Dieselsonster A, (2) Dieselsonster B, (3) Dieselsonster C, (4) Dieselsonster D, (5) Dieselsonster E, (6) Dieselsonster F. Vyf van die dieselsonsters het baie ooreenstemmende profiele geproduseer. Monster B toon die meeste variasie met die ander monsters, gebaseer op die eenvoudigesoortgelyke-koëffisiëntanalise.

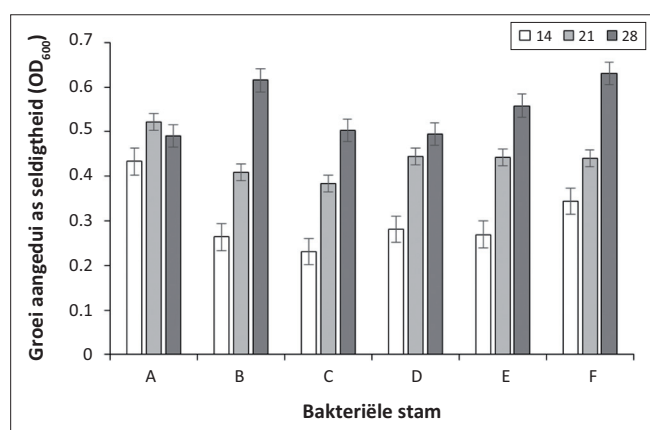
FIGUUR 1: Denatureringsgradiënt jelektroforese-profiel van die 16S rDNS-operon wat geamplifiseer is van totale DNS geïsoleer vanuit die ses dieselsonsters.

TABEL 1: Voorlopige identifikasie van die denatureringsgradiënt jelektroforese-bande. Die identifikasie is gebaseer op die basisvolgordes van die bande wat deur die nBLAST-funksie teen die GenBank databasis gesif is.

Band	Monster	Voorlopige identifikasie	E-waarde	Persentasie-homologie
1	A	KF805450 – Ongekweekte <i>Ralstonia</i> sp.	0	100
2	A	KJ437449 – <i>Bacillus pumilus</i> stam K9	0	100
3	B	KF479594 – <i>Massilia</i> sp. B48	5.00E-137	88
4	B	KF479594 – <i>Massilia</i> sp. B48	0	98
5	B	KC606193 – Ongekweekte bakteriële kloon CS biofilm	0	97
6	B	KJ809406 – Ongekweekte bakteriële kloon BVES15G114	4.00E-167	92
7	B	KJ809406 – Ongekweekte bakteriële kloon BVES15G114	0	98
8	B	NR_028787 – <i>Bosea minatitlanensis</i>	2.00E-165	98
9	D	AB698715 – <i>Methylobacterium komagatae</i>	0	99
10	B	JF905621 – <i>Micromonospora</i> sp. 6	4.00E-120	100

TABEL 2: Voorlopige identifikasie van die geïsoleerde bakteriële stamme gebaseer op die nBLAST-analise van die GenBank databasis.

Stam	Voorlopige identifikasie	E-waarde	Persentasie-homologie
A	KC153292 – <i>Staphylococcus epidermidis</i> G2-17	0	98
B	AB301015 – <i>Bacillus pumilus</i>	0	99
C	DQ298259 – Ongekweekte bakterium	0	100
D	EU327994 – <i>Bacillus pumilus</i> stam xian-1	0	99
E	DQ979413 – <i>Bacillus</i> sp. HRB-1C	0	99
F	AB244484 – <i>Bacillus pumilus</i>	0	99



FIGUUR 2: Groei van die geïsoleerde bakteriële op diesel as enigste koolstofbron. Groei word vir 14, 21, en 28 dae na inokulasie aangedui. Die standaardfout word deur die balkies aangedui, data word voorgedra van drie herhalings van die eksperiment.

As die groei oor die totale tyd in ag geneem word dui dit aan dat stam A teen 'n baie vinniger tempo as die ander stamme getoon het. Die stam se groei het al teen dag 14 dieselfde seldigheid bereik as wat die ander stamme teen dag 21 bereik het. Die ander stamme het relatief teen dieselfde tempo gegroei en stamme B en F het die meeste biomassa opgebou teen dag 28. Daar is geen groei waargeneem deur die optiese digtheid van die selle teen dag vyf te meet nie. Die rede vir die afname in groei na 28 dae kan toegeskryf word aan die opbou van metaboliese neweprodukte en die uitputting van die koolstofbron.

Filogenetiese analise

'n Parsimonie-analise van die saamgevoegde basisvolgordes van die 16S rDNS is gedoen om die filogenetiese verwantskappe tussen die geïsoleerde stamme en data afkomstig vanaf GenBank te bepaal. Basisvolgordegroepering van die 53 taksa het gelei tot die insluiting van 1628 parsimonies-insiggewende karakters in die analise en het verder gelei tot die opstel van 100 mees parsimoniese bome vir die datastel. Een hiervan word voorgestel (CI: 0.5962, homoplasie-indeks, HI: 0.4038, RI: 0.8357) (Figuur 3). Die lae RI-waarde het aangedui dat die vlakke van homoplasie laag is en dat die verwantskappe, wat deur die analise aangedui word, noemenswaardig is. Die filogenetiese analises het die voorlopige basisvolgorde-analises ondersteun vir beide die kweekbare en nie-kweekbare fraksies. Die filogenetiese analise het aangedui dat die bakteriële diversiteit van die populase oor verskeie fila versprei is.

Dit het bakteriële van die α - en die β -Proteobakteriële ingesluit. 'n Enkele nie-kweekbare stam het gegroep met

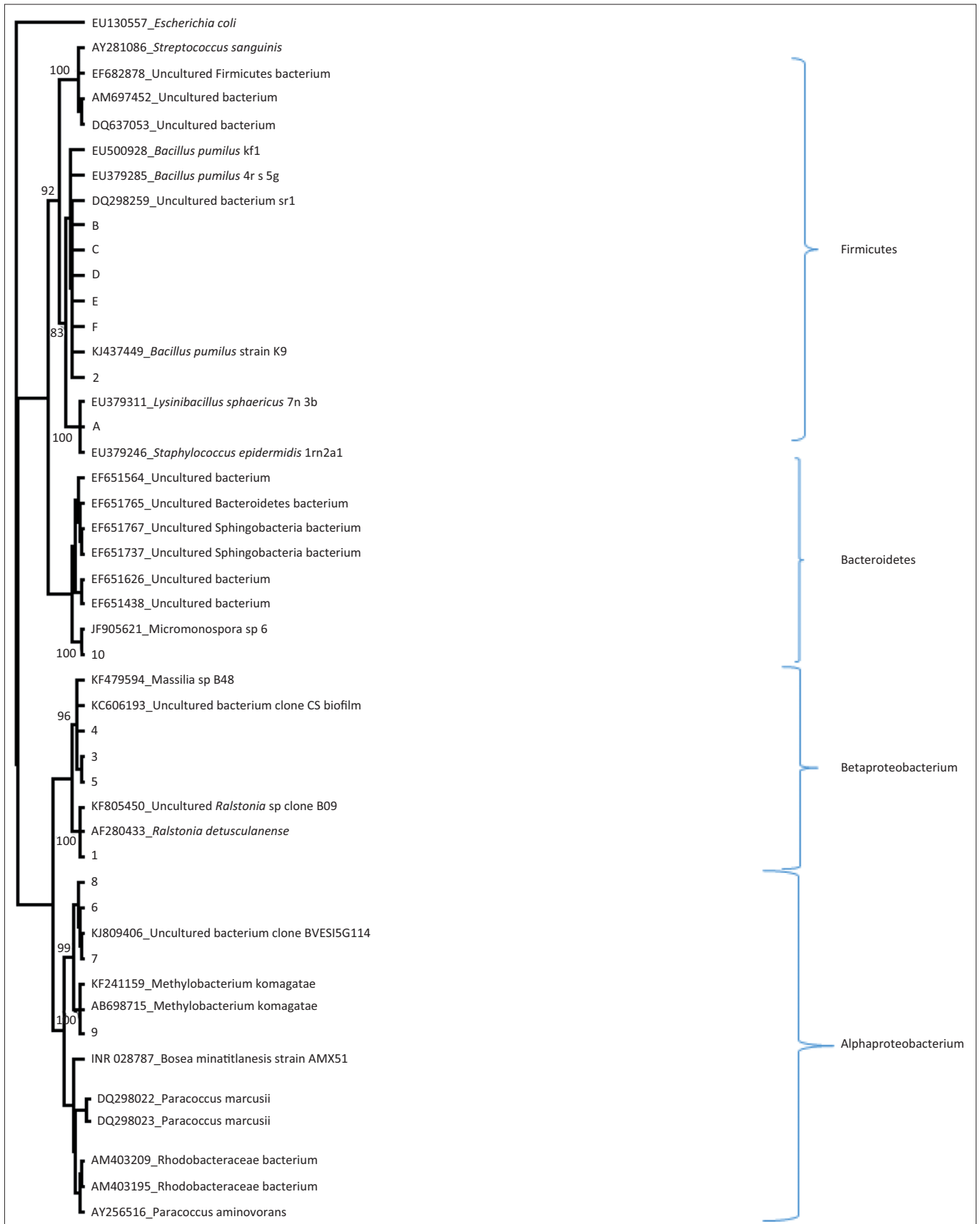
Micromonospora in die filum bakteriodetes. Verder is daar geen dominansie tussen die α - en die β -Proteobakteriële nie, en vier nie-kweekbare stamme het in elke groep geval. Die meerderheid van die α -Proteobakteriële-geïdentifiseerde stamme kon gekoppel word aan *Massilia* en een stam aan *Ralstonia*. Die meerderheid van die β -Proteobakteriële is gekoppel aan 'n nie-kweekbare stam wat na verwant is aan *Massilia* terwyl een stam na verwant gewees aan *Methylobacterium* is.

Bespreking

In hierdie studie is bakteriële geïsoleer vanuit gestoorde kommersiële diesel om die populase samestelling te bepaal. Ses stamme is geïsoleer vanuit die kweekbare deel en 'n verdere tien stamme geïdentifiseer vanuit die nie-kweekbare studie van die diesel. Die lae getalle bakteriële stamme wat in die studie geïsoleer is stem ooreen met ander studies wat op dieselsbesoedelde omgewings gedoen is (Al-Mailem, Kansour & Radwan 2014; Richard & Vogel 1999; Shukor *et al.* 2009). In dié betrokke studie is die bakteriële groei bepaal direk vanaf diesel gestoor by vulstasies. Aangesien die omgewing uit 'n komplekse mengsel van PAK bestaan as enigste koolstofbron, kan dit verwag word dat daar baie sterk seleksie is vir mikroorganismes wat hierdie koolstofbron kan benut. Die meeste van die geïsoleerde stamme is verwant aan *Bacillus*, spesifiek *B. pumilus*. *Bacillus* spesies is voorheen geïdentifiseer vanaf diesel- en naftavervoerende pyplyne waar hulle geassosieer word met die afbraak en oksidering van PAK (Rajasekar *et al.* 2005, 2007). *Bacillus pumilus* is verder ook welbekend as 'n biofilmvormende bakterium (Dusane *et al.* 2010; Korenblum *et al.* 2008). Hierdie eienskap help die bakterium om aan die wande van houers en ander materiaal vas te heg en PAK afbraak te bespoedig wat ook kan lei tot die verwerking van metale (Korenblum *et al.* 2008).

Die gebruik van DGGE om die populase samestelling van bakteriële in diesel te bepaal het tot meer inligting gelei as om net die kweekbare fraksie te bekom. Verskeie bande het as dubbelbande uitgekome tydens die amplifisering daarvan nadat dit uit die jel gesny is. Dit dui dus wel dat skeiding nie gelei het tot volledige bepaling van die populasiestruktuur nie. Hierdie faktor tesame met die ooreenstemming van verskeie bande tussen die profiele dui dus op 'n onderbepaling van die populase in diesel gevind. Dit sal dus waardevol wees om van die dieselmonsters te onderwerp aan volgende generasie volgordebepaling om die omvang van die populase beter te bepaal. 'n Nadeel van so 'n studie is natuurlik die inleierpartydigheid tydens omgewingsmonsters se amplifisering met behulp van PKR (Bokulich & Mills 2013).

Die verskille tussen die DGGE-profiel kan nie verduidelik word aan die hand van 'n enkele veranderlike nie. Geografiese ligging van die brandstofverkopers, byvoegings tot die verskillende handelsmerke diesel, asook die gebruik van onderskeie vervoermaatskappye (en moontlik verskillende tenkwaens van dieselfde maatskappy) om die brandstof vanaf die raffinaderye in Suid-Afrika te vervoer kan alles bydra tot die vestiging



FIGUUR 3: Maksimum parsimoniese analise van die 16S rDNS-operon vir beide die kweekbare en nie-kweekbare fraksies. Steekproefhersteekproefnemings word aangedui bo die takke in vetdruk. Subfilums word aangedui deur die hakies langs aan die boom.

van bakteriële populasies. Dus kan hierdie veranderlikes die vestiging van mikrobe populasies net soveel beïnvloed as wat die stoortydperk daarvan by die eindpuntvulstasie of opbergingstenk kan doen. Dit sal interessant wees om diesel van dieselfde handelsmerk en raffinadery aan te koop by vulstasies wat vër verwyder is, om die invloed van die eersgenoemde veranderlikes te bestudeer. Dit mag nuwe lig werp op die verandering in die populasiesamestelling en kan aandui wat die invloed van die geografiese ligging van die eindpuntvulstasie of die vervoer en oorsprong van die diesel bydra tot hierdie verskillende profiele. Geografiese ligging het die meeste bygedra tot populasiesamestelling in petroleum PAK gekontameneerde grond (Juck *et al.* 2000).

Die oorgrote meerderheid van bakteriële groei kan waargeneem word as slyk op die bodem van opbergingstenks. Hierdie groei vind plaas by lae suurstofkonsentrasies, aangesien opbergingstenkse nie ontwerp is om gasuitruiling tussen die omgewing en dietenk te bevorder nie. Lae suurstofoplosbaarheid is 'n verdere hindernis vir aerobe mikrobiële groei in opbergingstenks. Suurstof kan redelik maklik oplos in beide diesel en water en dit kan mikrobe groei bevorder as die vlakke daarvan voldoende is. In lae suurstofkonsentrasies sal dit die groei van anaerobe en fakultatiewe anaerobe ook bevorder. Slegs aerobe en fakultatiewe anaerobewasanaerobe is met DGGE bespeur en dit dui moontlik daarop dat voldoende suurstof in die diesel opgelos is om dié soort groei aan te moedig. Die voorkoms van die soort mikrobe in petrochemiese brandstof is welbekend en dra by tot die oksidering van brandstof en die opbergingstenk wat die gehalte verlaag (Chesneau 1987). Verder sal slegs aerobe respirasie tot die vorming van water lei.

Slot

Verskillende bakteriële stamme is vanuit die diesel geïsoleer, of hulle identiteit is deur DGGE en basisvolgordebepaling bevestig. Hierdie analyses het lig gewerp op die populasiesamestellings van beide die kweekbare en nie-kweekbare bakteriële fraksies van die diesel. Die feit dat al die geïsoleerde bakterieë wel op diesel as enigste koolstofbron kan groei dui aan dat hulle wel kan bydra tot die biotiese afbraak van diesel tydens opberging. Selfs al vind die afbraak stelsmatig plaas, kan dit die werksverrigting van dieselenjins nadelig beïnvloed. Die vinnige groei van stam A op diesel as koolstofbron sal verder ondersoek moet word, aangesien dit 'n moontlike rol sal kan speel in die bioremediëring van dieselsbesoedeling.

Erkenning

Die outeurs erken finansiële ondersteuning van Eskom Holdings Bpk.

Mededingende belange

Die outeurs verklaar dat hulle geen finansiële of persoonlike verhouding(s) het wat hulle op 'n voordelige of nadelige wyse by die skryf van die artikel beïnvloed het nie.

Outeursbydrae

E.V. was die projekteier, E.V. en A.J. het die eksperimentele ontwerp en data-analises gedoen, terwyl P.S. en N.v.d.H. verantwoordelik vir eksperimentele uitvoering en data-insameling was.

Literatuurverwysings

- Al-Mailem, D.M., Kansour, M.K. & Radwan, S.S., 2014, 'Hydrocarbonoclastic biofilms based on sewage microorganisms and their application in hydrocarbon removal in liquid wastes', *Canadian Journal of Microbiology* 60, 477–486.
- Ben-Haim, Y., Thompson, F.L., Thompson, C.C., Cnockaert, M.C., Hoste, B., Swings, J. & Rosenberg, E., 2003, '*Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 309–315.
- Bento, F.M., Beech, I.B., Gaylarde, C.C., Englert, G.E. & Muller, I.L., 2005, 'Degradation and corrosive activities of fungi in a diesel-mild steel-aqueous system', *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21, 135–142.
- Bokulich, N.A. & Mills, D.A., 2013, 'Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities', *Applied and Environmental Microbiology* 79, 2519–2526.
- Bushnell, L.D. & Haas, H.F., 1941, 'The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms', *Journal of Bacteriology* 41, 653–673.
- Chesneau, H.L., 1987, 'Fuel system contaminants: An introduction', in H.L. Chesneau & M.M. Dorris (eds.), *Distillate fuel: Contamination, storage, and handling*, ASTM STP 1005, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA., pp. 1–5.
- Du, Y., Mamishev, A.V., Lesieutre, B.C., Zahn, M. & Kang, S.H., 2001, 'Moisture solubility for differently conditioned transformer oils', *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* 8, 805–811.
- Dusane, D.H., Nancharaiyah, Y.V., Zinjarde, S.S. & Venugopalan, V.P., 2010, 'Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms', *Colloids and Surfaces B* 81, 242–248.
- Fjellbirkeland, A., Torsvik, V. & Øvreås, L., 2001, 'Methanotrophic diversity in an agricultural soil as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis profiles of *pmoA*, *mxhF* and 16S rDNA sequences', *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 79, 209–217.
- Gaylarde, C.C., Bento, F.M. & Kelley, J., 1999, 'Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control', *Revista de Microbiologia* 30, 1–10.
- Juck, D., Charles, T., Whyte, L.G. & Greer, C.W., 2000, 'Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities', *FEMS Microbiology Ecology* 33, 241–249.
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H. & Miyata, T., 2005, 'MAFFT version 5: Improvement in accuracy of multiple sequence alignment', *Nucleic Acids Research* 33, 511–518.
- Korenblum, E., Sebastián, G.V., Paiva, M.M., Coutinho, C.M.L.M., Magalhães, F.C.M., Peyton B.M. & Seldin, L., 2008, 'Action of antimicrobial substances produced by different oil reservoir *Bacillus* strains against biofilm formation', *Applied Microbiology and Biotechnology* 79, 97–103.
- Littman, E.S., 1981, 'Microbiological contamination of fuels during storage', in L.L. Stavinoha & C.P. Henry (eds.), *Distillate fuel stability and cleanliness*, ASTM STP 751, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA., pp. 136–144.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G., 1993, 'Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA', *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695–700.
- Rajasekar, A., Babu, T.G., Pandian, S.T.K., Maruthamuthu, S., Palaniswamy, N., & Rajendran A., 2007, 'Role of *Serratia marcescens* ACE2 on diesel degradation and its influence on corrosion', *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology* 34, 589–598.
- Rajasekar, A., Maruthamuthu, S., Muthukumar, N., Mohanan, S., Subramanian, P. & Palaniswamy N., 2005, 'Bacterial degradation of naphtha and its influence on corrosion', *Corrosion Science* 47, 257–271.
- Richard, J.Y. & Vogel, T.M., 1999, 'Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel', *International Biodeterioration and Biodegradation* 44, 93–100.
- Shukor, M.Y., Dahalan, F.D., Jusoh, A.Z., Muse, R., Shamaan, N.A. & Syed, M.A., 2009, 'Characterization of a diesel-degrading strain isolated from a hydrocarbon-contaminated site', *Journal of Environmental Biology* 30, 145–150.
- Siciliano, S.D., Germida, J.J., Banks, K. & Greer, C.W., 2003, 'Changes in microbial community composition and function during a polycyclic aromatic hydrocarbon phytoremediation field trial', *Applied and Environmental Microbiology* 69, 483–489.
- Stavinoha, L.L., Westbrook, S.R. & LePera, M.E., 1981, 'Army needs for diesel fuel stability and cleanliness', in L.L. Stavinoha & C.P. Henry (eds.), *Distillate fuel stability and cleanliness*, ASTM STP 751, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA., pp. 103–105.
- Swofford, D.L., 2002, 'PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other Methods), Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, M.A.