

**ISOLATION OF BIOSURFACTANT-PRODUCING BACTERIA RELATING  
TO THE ACTIVITY OF OIL RECOVERY**

Sarawut Paisanjit

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science  
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University  
in Academic Partnership with  
The University of Michigan, The University of Oklahoma,  
Case Western Reserve University and Institut Français du Pétrole

2006

ISBN 974-9937-55-4

**Thesis Title:** Isolation of Biosurfactant-Producing Bacteria Relating to the Activity of Oil Recovery  
**By:** Sarawut Paisanjit  
**Program:** Petroleum Technology  
**Thesis Advisors:** Asst. Prof. Ratana Rujiravanit  
Prof. Masahiko Abe  
Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej

---

Accepted by the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master of Science.

*Nantaya Yanumet*  
..... College Director  
(Assoc. Prof. Nantaya Yanumet)

**Thesis Committee:**

*Ratana Rujiravanit*  
.....  
(Asst. Prof. Ratana Rujiravanit)

*Masahiko Abe*  
.....  
(Prof. Masahiko Abe)

*Sumaeth Chavadej*  
.....  
(Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej)

*Pramoch Rangsunvigit*  
.....  
(Assoc. Prof. Pramoch Rangsunvigit)

*Pun W.*  
.....  
(Dr. Punjaporn Weschayanwiwat)

## ABSTRACT

4773017063: Petroleum Technology Program

Sarawut Paisanjit: Isolation of Biosurfactant-Producing Bacteria Relating to the Activity of Oil Recovery.

Thesis Advisors: Asst. Prof. Ratana Rujiravanit, Prof. Masahiko Abe, and Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej, 74pp. ISBN 974-9937-55-4

Keywords: Biosurfactant/ *Pseudomonas aeruginosa*/ Oil recovery

A biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* SP4, was isolated from petroleum-contaminated soil. The surface tension, percentage reduction of surface tension and diameter of oil displacement activity of a supernatant from cell culture obtained after cultivation for 24 hours of the strain SP4 in nutrient broth containing 2% palm oil were determined to be 28.7 mN/m, 38.9 % and 19.6 cm<sup>2</sup>, respectively. The critical micelle concentration (CMC) of the supernatant after cultivation for 48 hours was determined to be 3.6 % v/v or 61 mg/L, corresponding to the surface tension of 28.3 mN/m. The production of biosurfactant by the strain SP4 was found to be growth-associated production. Crude biosurfactant was separated from culture broth after cultivation for 48 hours by performing the procedure that included acidic precipitation at pH 2, extraction by chloroform-ethanol mixture solvent, and vacuum evaporation to remove the organic solvent. The result from analytical thin layer chromatography revealed that crude biosurfactant consisted of four components. The oil recovery by the supernatant of cell-free culture of the strain SP4 was 76.37%.

## บทคัดย่อ

นายสรารุช ไพศาลจิต : การคัดแยกและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* SP4 สัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการดึงน้ำมันดิบ (Isolation of Biosurfactant-Producing Bacteria Relating to the Activity of Oil Recovery) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. ดร.รัตนา รุจิรวนิช, ศ. ดร.มาชาฮิโกะ อาเบะ และรศ. ھر.สุเมธ ชวเดช 74 หน้า ISBN 974-9937-55-4

จุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* SP4 ที่ใช้สำหรับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ทำการคัดแยกมาจากแหล่งปิโตรเลียมที่มีดินปนเปื้อนน้ำมันเป็นเวลานาน ค่าแรงตึงผิว, เปอร์เซนต์การลดลงของแรงตึงผิวเมื่อเทียบกับน้ำ และ ค่าการกระจายตัวของน้ำมัน ของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* SP4 หลังจากการเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลว NB โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีค่าดังนี้ 28.7 mN/m, 38.9 %, และ 19.6 cm<sup>2</sup>ตามลำดับ ค่าความเข้มข้นของกาเกิดไมเซลล์ (CMC) ที่วัดจากส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* SP4 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ค่าเท่ากับ 3.6 %v/v หรือ 61 mg/L ซึ่งมีค่าแรงตึงผิว ณ จุด CMC เท่ากับ 28.3 mN/m และเมื่อศึกษาการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* SP4 เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของจุลินทรีย์ชนิดนี้เป็นการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพควบคู่กับการเจริญเติบโตของเซลล์ (Growth associated production) สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการนำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* SP4 มาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาตกตะกอนด้วยกรดที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 2 หลังจากนั้นทำการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยสารละลายผสมระหว่าง คลอโรฟอร์มและเอทานอลแล้วนำไประเหยภายใต้สูญญากาศที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเมื่อวิเคราะห์ด้วย TLC พบว่ามีส่วนประกอบอยู่ 4 ค่าที่มีค่า Rf เท่ากับ 0.982, 0.912, 0.716 และ 0.062ตามลำดับ ขั้นสุดท้ายได้ทำการศึกษา ออย์รีคเวอรี (Oil recovery) โดยใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่อยู่ในส่วนใสซึ่งได้จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ *Pseudomonas aeruginosa* SP4 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปอร์เซนต์การดึงน้ำมันกลับมาใช้ (Oil recovery) เท่ากับ 76.37%

## ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to thank many people who have contributed to my education over the past 2 years and specifically to this research work.

I would like to express my grateful appreciation to Asst. Prof. Ratana Rujiravanit and Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej, initiated this research thesis topic, for their support, guidance through this research work and served as the thesis advisors. It has been privilege to work with such a dedicated and resourceful people.

I am grateful for the partial scholarship and partial funding of the thesis work provided by Postgraduate Education and Research Programs in Petroleum and Petrochemical Technology (PPT Consortium). And The Research Unit of Applied Surfactants for Separation and Polution Control under the Ratchadapisek Somphot Fund, Chulalongkorn University.

I would like to thank all staff of the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University for their assistance.

I feel fortunate to have spent 2 years with collection of graduated students who not only made the experience bearable, but also quite pleasant. Therefore, I simply say thanks to friends who made the two years such a memorable experience.

Special thanks to Ms. Suthirak Niyomrith and Mr. Koji Tsuchiya, for their kindness in giving me useful information and recommendations and also to all Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University' s staff for their assistance.

Finally, I would like to thank my family for their love, spirit and understanding during my studies and research work.

## TABLE OF CONTENTS

	<b>PAGE</b>
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Contents	vi
List of Tables	x
List of Figures	xii
 <b>CHAPTER</b>	
<b>I INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
 <b>II LITERATURE REVIEW</b>	 <b>3</b>
 <b>III EXPERIMENTAL</b>	 <b>18</b>
3.1 Materials	18
3.1.1 Sources of Screening Samples	18
3.1.2 Media Used and Chemical Reagents	18
3.1.3 Instrument and Apparatus	19
3.2 Methodology	19
3.2.1 Measurement of Surface Properties and Cell Growth	19
3.2.1.1 Surface Tension Measurement	19
3.2.1.2 Oil Displacement Test	19
3.2.1.3 Dry Weight Cell Measurement	20
3.2.1.4 pH Measurement	20
3.2.1.5 Critical Micelle Concentration Measurement	20
3.2.2 Isolation of Biosurfactant Producing Microorganisms	20
3.2.3 Determination of Biosurfactant-Producing Bacteria Activity	 20

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
3.2.4 Microorganism Identification	21
3.2.5 Optimization of Culture Medium for Biosurfactant Production	21
3.2.6 Microbial Growth Determination	21
3.2.7 Determination of Optimum Inoculums	21
3.2.8 Growth Curve of Biosurfactant-Producing Bacteria	21
3.2.9 Extraction of Biosurfactants and Biosurfactant Analysis by Thin Layer Chromatography (TLC)	22
3.2.9 Preliminary Test of Biosurfactants in Free-Cell Broth for Oil Recovery from Ottawa Sand	22
<b>IV RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>24</b>
4.1 Isolation of Biosurfactant-Producing Microorganism	24
4.1.1 Isolation of Biosurfactant Producers on Nutrient Agar	24
4.2 Determination of Biosurfactant-Producing Bacteria Activity	25
4.3 Microorganism Identification	28
4.4 Optimization of Culture Medium for Biosurfactant Production	30
4.5 Microbial Growth Determination	32
4.6 Determination of Optimum Inoculums	33
4.7 Growth Curve of Biosurfactant-Producing Bacteria	34
4.8 Extraction of Biosurfactants and Analysis of Biosurfactants by Thin Layer Chromatography (TLC)	36
4.9 Preliminary Test of Biosurfactants in Free-Cell Broth for Oil Recovery from Ottawa Sand	39
<b>V CONCLUSIONS</b>	<b>41</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>43</b>
<b>APPENDIX</b>	<b>49</b>

**CHAPTER****PAGE****CURRICULUM VITAE****62**



## LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Some biosurfactants and their applications	16
4.1	Summary of isolated culture that can produce biosurfactants.	25
4.2	Surface tension and the percentage reduction of surface tension of the culture supernatant from 16 isolates in NB containing 2% palm oil and incubated at 37°C in a shaking incubator at 200 rpm for 24 hours	27
4.3	Surface tension, the percentage reduction of surface tension, and oil displacement test of the culture supernatant from the 4 isolated cultures (SP4, SP10, SP12, and SP40) in NB containing 2% palm oil and incubated at 37°C in a shaking incubator at 200 rpm for 24 hours	28
4.4	Determination taxonomy of microorganism SP4 from Bergey's Manual. (Holt <i>et al.</i> , 1994)	28
4.5	Comparison of 3 culture mediums for the percentage reduction of surface tension and oil displacement test after cultivation in NB, BM, and DM containing 2% palm oil and incubation at 37°C in a shaking incubator at 200 rpm for 72 hours	30
4.6	Comparison of 3 culture mediums for the percentage reduction of surface tension and oil displacement test after cultivation in NB, BM, and DM containing 4% palm oil and incubation at 37°C in a shaking incubator at 200 rpm for 72 hours	30

TABLE	PAGE
4.7 Comparison of 3 culture mediums for the percentage reduction of surface tension and oil displacement test after cultivation in NB, BM, and DM containing 6% palm oil and incubation at 37°C in a shaking incubator at 200 rpm for 72 hours	31
4.8 Comparison of 3 culture mediums for the percentage reduction of surface tension and oil displacement test after cultivation in NB, BM, and DM containing 8% palm oil and incubation at 37°C in a shaking incubator at 200 rpm for 72 hours	31
4.9 Comparison of 3 culture mediums for the percentage reduction of surface tension and oil displacement test after cultivation in NB, BM, and DM containing 10% palm oil and incubation at 37°C in a shaking incubator at 200 rpm for 72 hours	31
4.10 Comparison of the percentage reduction of surface tension of nutrient broth containing 2%, 4%, 6%, 8%, and 10% palm oil	32
4.11 Comparison of the oil displacement test of nutrient broth containing 2%, 4%, 6%, 8%, and 10% palm oil	32
4.12 Comparison of the percentage inoculums after culturing in nutrient broth containing 2% palm oil and incubating at 37°C in a shaking incubator at 200 rpm	34
4.13 Rate of flow (Rf value) of biosurfactants	37
4.14 The comparison of biosurfactant and chemical surfactant for oil recovery from Ottawa sand	40
5.1 Comparison of the critical micelle concentration (CMC) of biosurfactant ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4) with other surfactants	42

## LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	A glycolipid produced by a <i>Pseudomonas</i> strain	5
2.2	A phospholipids and Phosphatidylethanolamine produced by <i>Acinetobacter</i>	6
2.3	A lipopeptide structure (surfactin) produced by <i>Bacillus subtilis</i>	6
2.4	Emulsan structure (Gross <i>et al.</i> , 2001)	6
3.1	A cylinder packed with Ottawa sand and all equipments	23
4.1	Emulsified halo around a bacterial colony that can produce biosurfactant	24
4.2	Oil displacement test & the appearance of clear zone of 16 bacterial colonies	25
4.3	Surface properties of bacteria SP4	26
4.4	Activity of biosurfactant-producing bacteria for oil displacement test	26
4.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4 under microscope	29
4.6	Microbial growth determination of absorbance of culture medium at 600 nm after culturing <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4 in nutrient broth and nutrient broth containing 0.02% glucose and incubation at 37°C in a shaking incubator at 200 rpm	33
4.7	Growth curve of biosurfactant-producing bacteria.	35
4.8	The Critical Micelle Concentration (CMC) of the culture broth which produces biosurfactants from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4	36
4.9	The separation of biosurfactants on a TLC plate	37
4.10	The critical micelle concentration of biosurfactants from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4	38

FIGURE	PAGE
4.11 The micelle size of biosurfactants from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4 at 39.1 mg/L	38
4.12 The recovered oil curve from total organic carbon analyzer (TOC)	39