

قدرة العزلات البكتيرية السائدة في التربة الملوثة بالمشتقات النفطية على التحلل الحيوي

أيمن الصادق منصور الحمادي

قسم التربة والمياه، كلية الزراعة، جامعة طرابلس، ليبيا

Corresponding author: emanbensaeed@gmail.com

المخلص

الهدف من البحث الحصول على عزلات بكتيرية ذات كفاءة عالية في تحليل المواد الهيدروكربونية، إذ تم أخذ عينات من التربة من مناطق مختلفة ملوثة بمواد هيدروكربونية متمثلة في مشتقات نفطية وعينة نفط خام نوع خفيف شملت تربة أنابيب البترول التي ترشح، محطات البنزين والديزل و أماكن تغيير زيوت السيارات والتشحيم وضمت المحطات التالية (تاجوراء - الهضبة الشرقية - غوط الشعال - جنزور - حقل الفيل)، وتم الحصول على 18 عزلة على مستوى الجنس والنوع ودرست الصفات المظهرية والمجهريّة لهذه العزلات باستخدام بعض الأوساط المزرعية وبعض الإختبارات الحيوية، كذلك تم اختبار قدرة هذه العزلات المستوطنة طبيعياً في البيئات الملوثة نفطياً على النمو على المواد الهيدروكربونية المختلفة وتحديد قابليتها على استهلاكها ودرجات الهضم للمشتقات النفطية خلال نموها على الأوساط المزرعية السائلة الحاوية على تركيز 1% من النفط الخام ومشتقاته وذلك في الحالة الانفرادية والمشاركة بين العزلات. وأظهرت النتائج أن لمعظم العزلات البكتيرية المكونة وغير المكونة للأبواغ القدرة على النمو على هذه الأوساط وإن تفاوتت أعدادها وكمية تحليلها، كما تبين كفاءة التحليل في البكتيريا غير مكونة للأبواغ عن تلك الأخرى المكونة للأبواغ مع أو بدون إضافة المغذيات، كما وجد أن استخدام خليط من العزلات المشتركة كانت الأفضل إذ بلغ تحلل النفط الخام ومشتقاته أكثر من 80% في العزلات غير مكونة للأبواغ وفي حدود 80% في المكونة للأبواغ مع إضافة المغذيات مقارنة بالحالة الانفرادية لهذه العزلات، كانت النسبة (40_80)% بدون إضافة المغذيات في العزلات غير المكونة للأبواغ وأقل من 70% عند استخدام العزلات المكونة للأبواغ نستنتج من ذلك أنه يمكننا استخدام هذه العزلات في معالجة التلوث البيئي الناتج عن المخلفات الهيدروكربونية لقابليتها العالية على استهلاك واستخدام المواد النفطية كمصدر للكربون والطاقة.

المقدمة

أدى تطور التكنولوجيا في القرن العشرين إلى زيادة حادة في استهلاك النفط في العالم. إذ يتم استخراج النفط بكميات هائلة من باطن الأرض، ثم ينقل النفط المستخرج بواسطة وسائل نقل برية أو بحرية أو بواسطة أنابيب طويلة إلى مناطق مختلفة حيث يتم استغلاله كمصدراً للطاقة ومادة خام أساسية في صناعات مختلفة للعديد من المركبات والمنتجات الكيميائية، وأثناء المراحل المختلفة من التعامل مع النفط من استخراج ونقل ومعالجة واستعمال قد تحصل أخطاء تؤدي إلى تلويث البيئة. ويستحوذ التلوث النفطي على اهتمام كبير وذلك لأنه يكون ظاهراً للعيان حيث من الممكن رؤيته مباشرة إضافة إلى انتشاره اليوم في كل مكان، مثل تلوث رمال شواطئ كثير من المدن الساحلية حيث تختلط بعض هذه المخلفات السوداء بالرمال الناعمة فتفسد جمالها وهو من أكثر أنواع التلوث خطورة على البيئة. وتقف الصناعة النفطية وراء العديد من المشاكل البيئية التي تتعرض لها التربة والنتيجة عن انسكاب وتلوث أسطح التربة بالمواد النفطية. لقد أدى إهمال الإنسان وسعيه وراء التكنولوجيا الحديثة إلى الإخلال بالتوازن الطبيعي للبيئة المحيطة به، فساعد بذلك على تلوث الماء والهواء وأفسد التربة الزراعية، وقضى في بعض الأحيان على مظاهر الحياة في كثير من الأماكن. وهذا ماجعل التفكير في إيجاد حلول للتخلص من خطورة هذا التلوث وبطريقة صحية من الأمور الهامة لضمان صحة وسلامة البيئة وقد وجد أنّ أنجح طريقة لتحليل النفط هي بواسطة بكتيريا لها القدرة على استغلال مركبات الكربون الموجودة في النفط كمصدر للطاقة اللازمة لها بدلاً من المعالجة الكيميائية، حيث يمكن استخدام البكتيريا للتخلص من التلوث النفطي للتربة مثل استعمالها في البقع النفطية البحرية، وهناك الكثير من أنواع البكتيريا لديها القدرة الإنزيمية لاستخدام الهيدروكربونات النفطية كمواد غذائية حيث تقوم باستهلاك جزء من المواد الهيدروكربونية وتحويلها إلى غاز ثاني أكسيد الكربون وماء، إلى جانب المواد الخلوية، مثل البروتينات والأحماض النووية، وبذلك يتم تفكك هيدروكربونات النفط الخام وتحللها مما يعد فائدة عظيمة لتحويلها إلى أصناف أخرى أقل سمية وأقل خطراً على البيئة.

المخاطر الناجمة عن التلوث بالنفط الخام ومشتقاته

مع ازدياد عمليات إنتاج واستهلاك النفط زادت مخاطر التلوث البيئي الذي وصل إلى السطوح المائية والترب ، والتلوث النفطي من أشد أنواع التلوث خطورة بسبب الكميات الهائلة التي تلقى من النفط الخام ومنتجاته إلى المحيط الحيوي وما يحتويه من مركبات سامة وضارة (الخفاف وخضير ، 2000) بطرق مختلفة ومنها وسائل شحن النفط الخام، مراحل الخزن والتتقية، الحوادث العرضية والتفانية، التطبيقات الخاطئة للتخلص من البقايا والترسبات المتراكمة من النفط الخام في مستودعات الخزن (Juteau *et al.*, 2003). يحدث سنويا ما يقارب 14000 حالة تدفق للنفط الخام إلى المحيط الحيوي وهذا يعكس حجم المخاطر البيئية الناجمة عن وصول كميات هائلة من النفط الخام إلى المحيط الحيوي . (Phillips,2003). إن درجة تأثير النفط الخام المتدفق على الوضع الطبيعي للتربة تعتمد على عدة عوامل منها حجم ونوع النفط المتدفق، مدى تغطية النفط للتربة، الفصل السنوي الذي حصل فيه التدفق (Zhu *et al.*, 2004) ، كما تعتمدسمية النفط الخام على الخواص الكيميائية والفيزيائية له وعلى كميته ووصول السنة وعوامل بيئية أخرى ، وتمتد التأثيرات السامة للهيدروكربونات النفط الخام إلى النباتات وديدان الأرض (Wilson *et al.*, 2002) .

طرق إزالة الملوثات النفطية من البيئات المختلفة

إن الإكتشافات المستمرة للنفط الخام وعمليات تكريره وزيادة شبكة الأنابيب الناقلة والحوادث التي تتعرض لها أدت إلى زيادة التلوث في اليابسة والماء (Al-Dobouni1977؛ Al-Sayigh,1978)، لذلك استخدمت طرق أو تقنيات عديدة للسيطرة على هذه الملوثات ومنها الكيميائية والفيزيائية والبيولوجية ومن أنجحها التقنيات البيولوجية التي يطلق عليها عملية التحليل الحيوي. في الطريقة الكيميائية يتم استعمال مواد كيميائية تعمل على ترسيبها أو مذيبيات كيميائية لاستخلاصها من البيئات المختلفة أو مواد قابلة للاتصاق بها، الطريقة الفيزيائية ويتم بالتخلص من البقع النفطية باستعمال مواد لها القابلية لادمصاص هذه البقع ، الطريقة البيولوجية وتسمى التحلل الحيوي Bioremediation تعد هذه الطريقة من الطرق البديلة والناجحة على نطاق واسع في إزالة الملوثات وأضرارها قليلة على البيئة ، وهي تعتمد على عوامل عديدة منها تركيب وتركيز النفط الخام ومشتقاته (Koren *et al.*, 2003) ، فهيدروكربونات النفط الخام مواد كارهة للماء hydrophobic ويتحدد تحللها بوجود مادة النفط الخام ومدى التلامس الحاصل بين الأحياء المجهرية وسطح النفط الخام . وتحدث عملية التحلل الحيوي بثلاث خطوات أساسية تشمل ، حدوث تغير صغير وبسيط في هذه المركبات العضوية ، تجزئة السلاسل الهيدروكربونية إلى أجزاء مع الاحتفاظ بالتركيب الكيميائي للمركب الأساسي قبل التجزئة ، معدنة الأجزاء العضوية وتغير تركيبها من جزيئات عضوية إلى جزيئات لاعضوية ، ومن الجدير بالذكر أن الأحياء المجهرية المحللة للمركبات الهيدروكربونية تشكل أقل من 1% من المجتمع الميكروبي للتربة وتزداد هذه الأعداد عند التلوث لتصل إلى 10% من المجموع الكلي وأن البكتيريا المحللة قد تنتج بعض المواد المؤثرة في الشد السطحي والتي تعمل على تفكيك وتحليل البقع النفطية (Jaccobocci *et al.*, 2001). وبين الكسندر (Alexander, 1997) أن أغلب الأجناس البكتيرية في التربة تكون كيميائية غير ذاتية التغذية (متباينة) إذ أنها تستعمل الأجزاء النباتية والحيوانية الميتة في غذائها وبالتالي تلعب دور مهم في تحليل المركبات الهيدروكربونية إذ إنها تستخدمها مصدراً للطاقة والكربون . وأن هناك أجناساً بكتيرية عديدة تم عزلها من المناطق الملوثة بالنفط الخام ومشتقاته وتم دراسة قابليتها لتحليل المركبات الهيدروكربونية وهذه الأجناس من أنواع البكتيريا الصديقة للبيئة حيث تعمل على تخليص البيئة من هذه الملوثات سواء على سطح الماء أو التربة، وتوفر خيار آمن لمعالجة التلوث مما يؤكد أهميتها في الحفاظ على البيوسفير من التلوث (Ojo, 2006) . كما وصفها أطلس (Atlas 1981) و عزيز (2012) والرازق (2012) بأنها تمتاز بقدرتها على تفكيك معظم مكونات النفط، ومستقرة وراثياً ، ولها القدرة على التكاثف بسرعة ، وتمتلك إنزيمات التفكك والقدرة على منافسة الأحياء الأخرى الموجودة طبيعياً في موقع التلوث وأخيراً تمتاز بعدم أحداث تأثيرات جانبية سلبية وغير مرضية او منتجة لمواد أضرية سامة . ولقد أشارت بحوث عديدة إلى إمكانية عزل وتشخيص أنواع مختلفة من البكتيريا لها القابلية على تمثيل أنواع مختلفة من المركبات الهيدروكربونية (أكثرها تعود إلى البكتيريا السالبة لصبغة جرام) ومن هذه الأنواع *Pseudomonas putida*,

Sphingomonas spritivorum, *Flaobacterium breve*, *Aeromonas media*, *Serratia liquifaciens*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebseilla oxytoca* (جار الله، 2008). واستطاع سانشيز وآخرون (Sanchez *et al.*, 2006) عزل كثير من البكتيريا الهوائية واللاهوائية الأختيارية والبكتيريا اللاهوائية الأجارية في مواقع التلوث النفطي وفي الآبار وكذلك من التربة الملوثة بالهيدروكربونات، وفي بيئة البحار باستخدام التقنيات الجزيئية والتقنيات المعتمدة على المزارع. وفي دراسة أخرى وجد رهمان وآخرون (Rahman *et al.*, 2002) أن أنواع من جنس *Bacillus* والتي لها القدرة على تكوين الأبواغ بأنها ذات كفاءة عالية في التحلل في البيئات الملوثة بالنفط وتحتمل درجات الحرارة والملوحة العاليتين، إضافة إلى عزل أنواع مختلفة من جنس *Bacillus* من مناطق عميقة من مياه البحار الملوثة وفي ترسبات البحار والتربة.

العوامل المحددة للتحلل الحيوي للنفط الخام ومشتقاته

وتشمل الأتي ،

أولاً: العوامل المتعلقة بالتربة والظروف البيئية ، تعد التربة بيئة ملائمة لنمو وتكاثر أنواع كثيرة من الكائنات الحية والتي تشمل 5 مجاميع رئيسية هي البكتيريا (Bacteria) والفطريات (Fungi) والفيروسات (Viruses) والطحالب (Algae) والابتدائيات (Protozoa)، ولكل منها استراتيجية خاصة للعيش في هذه البيئة وتتواجد أغلب الأجناس البكتيرية على السطح الخارجي للتربة لوفرة الأوكسجين والمغذيات ، كل جرام من التربة الجافة يحتوي على 10^8-10^9 خلية بكتيرية. هذه البكتيريا تؤدي دورا في تحليل المركبات الكيميائية وفي دورات العناصر في الطبيعة وإعادتها إلى التربة مثل دورات الكربون والنيتروجين والفسفور والكبريت وتتأثر هذه البكتيريا بعوامل عدة منها، درجات الحرارة والرطوبة ووفرة المغذيات والأس الهيدروجيني للتربة ودرجة التهوية. فالعوامل البيئية تلعب دورا مهما في عملية التحلل الحيوي لهذه الملوثات ومنها وفرة الأوكسجين والأس الهيدروجيني ودرجات الحرارة وتركيز وتركيب المواد الهيدروكربونية الملوثة والرطوبة النسبية والأملاح المعدنية. وفي دراسة يلاحظ قدرة عزلات بكتيريا *Micrococcus roseus* على النمو على الديزل وذلك من خلال قياس الأعداد الحية والامتصاصية الضوئية لهذه العزلات وباستعمال طريقة التخافيف (Song and Bartha, 1990) ، تمت التجربة تحت الظروف الهوائية نظراً لاحتياج عزلات هذا النوع إلى الأوكسجين لعملية التحلل الحيوي ، كل العزلات التي أظهرت نمواً متزايداً من البداية وإلى نهاية التحضين والعزلات التي تذبذبت في النمو خلال أوقات التجربة عند نموها على الديزل فإن ذلك قد يعود إلى تيسر المركبات الهيدروكربونية الخاضعة للتحلل والتي تعد مواداً مغذية لها أو إلى تأقلمها للنمو وأن ازدياد أعداد البكتيريا يعكس مقدرة البكتيريا واستهلاكها بمصدرها للطاقة والكربون وأكده أيضا اخرون (Hazen et al. 1993 و Wright et al. 2003 و Boboye et al., 2010)

ثانياً:- العوامل المتعلقة بالأحياء المجهرية، تعتمد آلية التحلل الحيوي على وجود البكتيريا ذات القابلية للنمو والتكاثر في المناطق الملوثة واعتمادا على وفرة المغذيات اللازمة لنموها وعلى قابلية البكتيريا لتحليل الهيدروكربونات الملوثة للتربة بالإضافة إلى العوامل البيئية في المنطقة ، والعامل الآخر المؤثر هو احتواء البكتيريا على البلازميدات التي تحمل الجينات المسؤولة عن عملية التحلل الحيوي اذ تزداد قابلية البكتيريا لتحليلها بازدياد أعداد البلازميدات. وفي بعض الدراسات (Mittal and Singh 2009) تم تقييم اثر إضافة المغذيات وعامل التهوية على التحلل الحيوي للهيدروكربونات الأروماتية المتعددة الحلقات باستعمال خليط من البكتيريا. وتوصلوا إلى أن التهوية وإضافة المغذيات ووجود الخليط البكتيري زاد من التحلل الحيوي للنفط الخام. لوحظ أن نسبة التحلل باستعمال المغذيات والنفط لوحدها كانت قليلة نسبياً وكذلك نسبة التحلل باستعمال بكتيريا متوطنة Indigenus microflora مع النفط. أما إذا كان النفط لوحده فإن نسبة التحلل قليلة جداً حتى بعد مرور مدة طويلة جداً. وفي دراسة اخرى (الشناوى ، 2010) تم اختبار كفاءة الأحياء الدقيقة في تحليل الملوثات النفطية وذلك بدراسة المعالجة البيولوجية للملوثات النفطية والتي تعتمد على فعالية الأحياء الدقيقة والمستوطنة طبيعياً في البيئات النفطية ، باستعمال ثلاث أنواع تربة غير ملوثة ، تربة ملوثة ، تربة منطقة الجنور وتم عزل وتعريف 72 سلالة ميكروبية ممثلة إلى مستوى الجنس؛ أظهرت هذه السلالات بوضوح قدرتها المتميزة على تحليل مشتقات الزيت الخام ، وقد استطاعت هضم 80.8 % من النفط الخام خلال 21 يوم عند تركيز الأيون الهيدروجيني وبكافى 7.2 وفي وجود المخصلات النيتروجينية 1% من نترات الصوديوم وأيضاً المخصلات الفسفورية 0.8% من فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين. وفي تجربة تطبيقية و التي صممت على تربة صحراوية تم تلويثها 2% من الزيت الخام و اختبرت كفاءة التحلل البيولوجي لهذه الملوثات عند الحقن الميكروبي بواسطة البكتيريا النشطة الجديدة Bact.No.4 و أيضا الحقن بمزرعة مختلطة من بكتيريا Bact.No.4 و فطر White rot وإستريتومييسيس وأيضاً تم تقدير التحلل البيولوجي عند الحقن الميكروبي بالفلورا الميكروبية الكاملة حيث تمكنت من إزالة 99% من الزيت الخام . كما توصل كل من الشناوى وآخرون 2010 في دراسة لتربة تم تلويثها بتركيزات مختلفة من زيت البترول الخام بنسبة 2,5 الى 10%. لتعرف على قدرة المجتمعات الميكروبية في التربة الطينية على تحليل زيت البترول الخام ومشتقاته ، أظهرت النتائج أن التحلل البيولوجي لهذه الملوثات النفطية يزداد بازدياد الفترة التحضيرية ويتواجد مركبات الفوسفور والنيتروجين وقد نجحت هذه المجتمعات الميكروبية عند نهاية 300 يوم في إزالة 42.5-51. كما بينت التجارب تأثير الفعل المشترك بين العزلات البكتيرية في عملية التحلل الحيوي مقارنة بالفعل الأنفرادى ، في دراسة للتعرف على قابلية العزلات البكتيرية *Bacillus, subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Actinomyces spp.* على تحليل نفط خام كركوك المتوسط بصورة منفردة وكذلك بالخلط بين العزلات الثلاث(عويد، 2008) أظهرت النتائج أن نسبة تحلل النفط الخام لمخلوط العزلات الثلاث كانت الأفضل اذ بلغ أكثر من 82% أما العزلة المفردة لكل من *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa* أظهرت تحلل مقارباً جداً ليبلغ 65 % و 68 % على التوالي فيما كانت عزلة *Actinomyces spp* الأضعف في قدرتها على تحليل نفط خام كركوك المتوسط إذ وصل إلى 45% ، كذلك وجد اخرون (Lai et al., 2001) أن الفعل المشترك لخمس سلالات بكتيرية على تحليل النفط الخام والترسبات النفطية واختبرها تحت الظروف المختبرية والحقلية أن 96.2% ، 90.6% ، 90.3% من الترسبات النفطية قد تحللت بفعل هذا التشارك مقارنة بتحلل 14.3 % من النفط الخام في مجموعة المقارنة .

أهداف البحث

تحديد قدرة بعض الكائنات الحية الدقيقة في حالتها المنفردة والمشاركة وعند ظروف محددة على التحلل الحيوي وإزالة التلوث بالتربة كذلك معرفة درجات هضم زيت البترول الخام ومشتقاته المختلفة بفعل الكائنات الدقيقة المعزولة.

المواد وطرق البحث

(1) جمع العينات، جمعت تربة ملوثة بالبترول ومشتقاته من المواقع التالية ، تربة أنابيب البترول التي ترشح ، محطات البنزين والديزل و أماكن تغيير زيوت السيارات والتشحيم وضمت المحطات التالية (تاجوراء - الهضبة الشرقية - غوط الشعال - جنزور) ، عينات النفط الخام من حقل الفيل نوع (نطف خفيف) . وجمعت على مستوى قريب من سطح التربة ، وكان نوع عينات التربة طمية رملية .

(2) عزل البكتيريا من عينات التربة الملوثة كما أوضح كل من ،

(Philips; 2013 Olukunle و Traxler 1963 و عويد 2008)

(3)البيئات المستخدمة

Trypticase Soya Agar ، Trypticase Soya broth

Blood Agar, تم أخذ 1 جرام من التربة وأضيف الى 100مل من وسط Trypticase soya broth وحضن لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م° ، ثم نقلت بإبرة تلقح وزرعت على وسط أجار الدم بطريقة التخطيط التتابعي وحضنت لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م° ، بعد التحضين تم تنقية البكتيريا النامية على وسط أجار الدم بالنقل التتابعي لثلاث مرات للمستعمرة المفردة. ثم أجريت بعد ذلك العزلات البكتيرية اختبارات التعريف والتصنيف البكتيري .

(4)التعريف على العزلات البكتيرية

أجريت الاختبارات التشخيصية للعزلات قيد الدراسة حسب ماجاء في مصادر مختلفة (Cruickshank *et al.*, 1975; Murray *et al.*, 2003) (Collee, *et al.*, 1996; Macfaddin 2000; Olukunle, 2013) وتم الاعتماد على الصفات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية على النحو الاتي :-
الصفات المظهرية سُخصت العزلات تشخيصاً أولاً اعتماداً على الصفات المظهرية للمستعمرات على الأوساط المزرعية والمتضمنة حجم المستعمرات وحافتها وارتفاعها ولونها ، ثم صبغت الخلايا بصبغة جرام ، صبغ الأبواغ ، الصبغ المقاوم للأحماض ، الحركة ولوحظت الصفات المظهرية للخلايا تحت المجهر الضوئي المركب والمتضمنة شكل الخلايا وحجمها وطريقة تجمعها ونتيجة تفاعل صبغة جرام . أما الاختبارات الحيوية (الكاتاليز _ أكسيديز _ أنتاج كبريتيد الهيدروجين _ أكسدة وتخمر السكريات [مواد الأساس التي تستخدم كمصدر للكربون والنيتروجين] _ السترات _ اختزال النترات _ النمو على بيئات أجار الدم _ أجار المغذى _ أجار الماكونكي _ أجار الحديد الثلاثي السكر _ أجار الجيلاتين) .
تم بعد ذلك تم حفظ المستعمرات المعزولة على مرق الوسط الزرعي Trypticase Soya broth في درجة حرارة الثلاجة

(5)عينة النفط الخام

تم الحصول على عينة نطف خام من خزانات حقل الفيل نوع (نطف خفيف) واستخدمت لجمع العينات قنينات زجاجية حجم 100 مليلتر معقمة ومظلمة (بنية اللون) .

تم عزل وتشخيص البكتريا المحللة للنفط الخام المستخدمة في هذه الدراسة طبقاً لمراجع مختلفة لكل من ، (Olukunle 2013 ; Philips 2003 ; Traxler 1963 و عويد 2008) استخدم مرق الوسط الزرعي Trypticase soya broth ، حيث وزع 50 مليلتر من الوسط في دوارق مخروطية سعة 250 مليلتر، عقم وبرد الوسط وأضيف النفط الخام بنسبة 1 % (حجم/ حجم) ، وحضنت الدوارق على درجة حرارة 30م° لمدة 21 يوماً ، ثم نقلت بإبرة تلقح وزرعت على وسط أجار الدم بطريقة التخطيط التتابعي وحضنت لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م° ، بعد التحضين تم تنقية البكتريا النامية على وسط أجار الدم بنقل كل مستعمرة بإبرة تلقح معقمة وزرعها بطريقة التخطيط ايضا على نفس الوسط ثم تكرار الزراعة على بيئة أجار الدم Blood Agar ، بعدها عزلت المستعمرات المختلفة في الصفات المظهرية على أطباق بتري في نفس الوسط وثبتت صفاتها من حيث الشكل ونوع استجابتها لصبغة جرام واختبار الحركة ، بعدها سُخصت العزلات ثم حفظت العينات المعزولة على مرق الوسط الزرعي Trypticase soya broth في درجة حرارة الثلاجة لحين الاستخدام .

تتمية البكتريا المعزولة على النفط الخام والمشتقات النفطية

تم تتمية العزلات البكتيرية بشكل منفرد ومشارك ، واستخدام وسط Trypticase soya broth لتتمية هذه العزلات حيث تم توزيع 50 مل من الوسط في دوارق مخروطية سعة 250 مل وبعدها عقم وبرد الوسط ثم أضف كل من / النفط الخام _ والمشتقات النفطية (البنزين، الديزل ، زيت المحرك) بنسبة 1% (حجم / حجم) وأضيف 2 مل من المعلق البكتيريا الذي يحتوى كل ميليلتر منه على تركيز (10x1⁸ خلية / مل) لكل عذلة على حدة ومخلوط العزلات إلى الوسط ثم حضنت الدوارق على درجة حرارة 30° م لمدة 28 يوماً.

(5)دراسة أحد العوامل التي تؤثرعلى النشاط التحليلي لهذه العزلات ، من نفس البيئة السابقة وزع 50 مليلتر في دوارق مخروطية سعة 250 مليلتر ثم إضافة 1% من نترات الصوديوم وأيضاً 0.8% من فوسفات بوتاسيوم أحادية الهيدروجين لكل دورق .عقم وبرد الوسط ثم أضيفت نفس المكونات السابقة وحضنت الدوارق على درجة حرارة 30° م لمدة 28 يوماً . وتم حساب مايلي :

النسبة المئوية لتحلل النفط الخام ومشتقاته في عينات الدراسة

قياس معدل تحلل النفط الخام ومشتقاته باستخدام الطريقة الوزنية المستعملة في حساب نسبة استهلاك الهيدروكربونات من خلال حساب كمية المتبقى من الهيدروكربونات (تحت ظروف التعقيم) وذلك عن طريق قياس الفرق بين وزن كمية النفط الخام ومشتقاته المضافة إلى الوسط الزراعي المستخدم قبل وبعد تتمية العزلات البكتيرية المستخدمة. حسب ، (Arafa 2003 و عويد 2008) وتم قياس النسبة المئوية لمعدل تحلل النفط الخام ومشتقاته بفعل كل عذلة على حدة والمشارك بين العزلات .تم اجراء التحليلات الأحصائية اللازمة .

النتائج والمناقشة

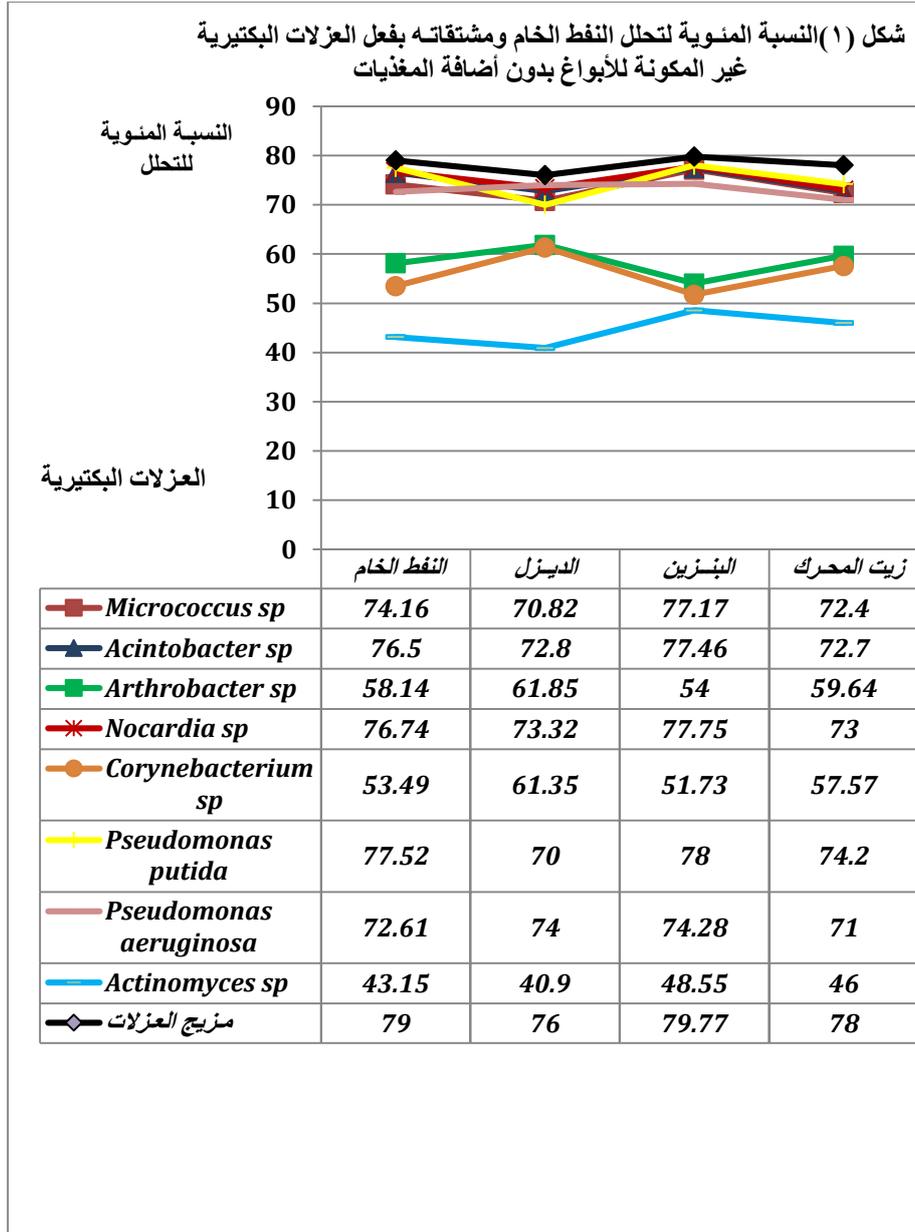
تم جمع 7 عينات من التربة المحلية الملوثة بالمشتقات النفطية وعينة تمثل النفط الخام من النوع الخفيف عزلت منها 18عذلة بكتيرية مختلفة تمثل بكتيريا غير مكونة للأبواغ أربعة منها موجبة لصبغة جرام ، وثلاثة سالبة لصبغة جرام ، ونوعان متغيرة لصبغة جرام . وأخرى بكتيريا مكونة للأبواغ خمسة منها موجبة لصبغة جرام ، وأربعة متغيرة لجرام . تم تنقية هذه العزلات على وسط أجار الدم لعدة مرات للحصول على مستعمرات مفردة نقية. وبعد ذلك تم تشخيصها بالإعتماد على الصفات المورفولوجية والمجهريّة والخواص الحيوية وقد أظهرت نتائج التشخيص أنها تعود الى الأنواع البكتيرية التالية : *Arthrobacter sp* ، *Acinetobacter sp* ، *Pseudomonas putida* ، *Micrococcus sp* ، *Staphylococcus* ، *Actinomyces sp* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Corynebacterium sp* ، *Nocardia sp epidermidis* وأنواع من البكتيريا *Bacillus sp* بعد ذلك تم تحديد قابلية هذه العزلات البكتيرية المستوطنة طبيعياً للتربة ملوثة على إستهلاك الهيدروكربونات وأظهرت النتائج قابلية العزلات البكتيرية على إستهلاك الهيدروكربونات في الأوساط النامية عليها والحاوية على 1% من النفط الخام ومشتقاته كمصدر وحيد للكربون والطاقة عن طريق حساب النسبة المئوية لتحلل المشتقات النفطية بدون ومع وجود أحد العوامل التي تؤثر على النشاط التحليلي لهذه العزلات والمتمثلة في وجود المغنيسات المعدنية من مركبات النيروجين والفوسفور بنسبة 1% من نترات الصوديوم و 0.8% من فوسفات بوتاسيوم أحادية الهيدروجين، ولقد أوضحنا النتائج أن معظم العزلات البكتيرية الغير مكونة للأبواغ والمكونة للأبواغ نمت على النفط الخام ومشتقاته بدلا من أعداد البكتيريا الحية الذي لوحظ في حالة عدم إضافة المغذيات ثم زيادة أعداد البكتيريا الحية في حالة إضافة المغذيات ومن خلال تتبع النسبة المئوية لاستهلاك الهيدروكربونات لوحظ ارتفاع نسب التحلل مع ازدياد أعداد هذه البكتيريا خاصة مع وجود المغذيات مقارنة بنسب التحلل التي سجلت مع تلك العزلات بدون إضافة المغذيات ، وتتفق هذه النتائج مع دراسات اخرى(Atlas ،1981) من أن إضافة العناصر المغذية من المحفزات الحيوية (Biostimulants) والمحددة لعمليات التحلل الحيوي نظراً لأهمية هذه العناصر في تكوين الأثريمات وبنائها والتي تستخدمها الكائنات الحية الدقيقة في تكسير الهيدروكربونات. فالتلوث بالنفط ومشتقاته يضيف باستمرار الكربون إلى البيئة والذي تستهلكه الكائنات الحية الدقيقة كمصدر للكربون ، ولكن نمو هذه الكائنات يتطلب عناصر مغذية أخرى فضلاً عن الكربون . ومن أهم هذه العناصر النيروجين والفوسفور واللذان تحتاجهما الأحياء الدقيقة بتركيزات عالية . وتبين من النتائج أن جميع العزلات البكتيرية المكونة وكذلك غير المكونة للأبواغ تمكنت من النمو على النفط الخام ومشتقاته وإن تفاوتت أعدادها وكفاءة تحللها لهذه المواد ، ولم تستطع بكتيريا *Staphylococcus epidermidis* النمو في وسط الأملاح المعدنية ، كذلك تبين كفاءة التحليل في البكتيريا غير مكونة للأبواغ عن المكونة للأبواغ مع وبدون إضافة المغذيات كما في شكل(1، 2، 3، 4). كذلك وجد أن البكتيريا السالبة لجرام كانت من أكثر البكتيريا أعدادا ونسبة تحلل عن العزلات الموجبة والمتغيرة لجرام

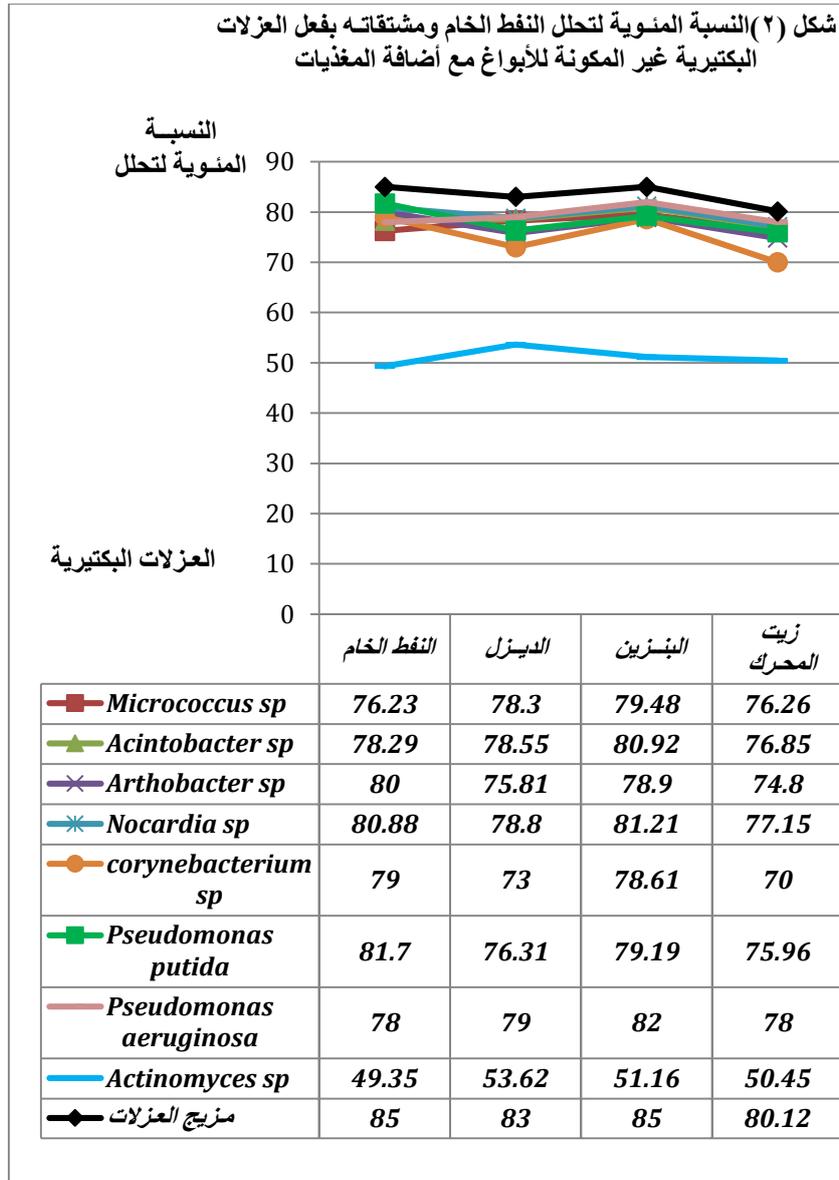
التي كانت متقاربة في نتائجها بينما كانت *Actinomyces sp* أقل أعدادا وتحليلاً وقد يرجع ذلك الى زمن التحلل الذي تحتاجه أو طبيعة المواد النامية عليها ، وهذا ما أشار اليه دراسات اخرى ايضا (الراوي والعكدي 1999 و عويد 2008) . بالنسبة للعزلات البكتيرية المكونة للأبواغ

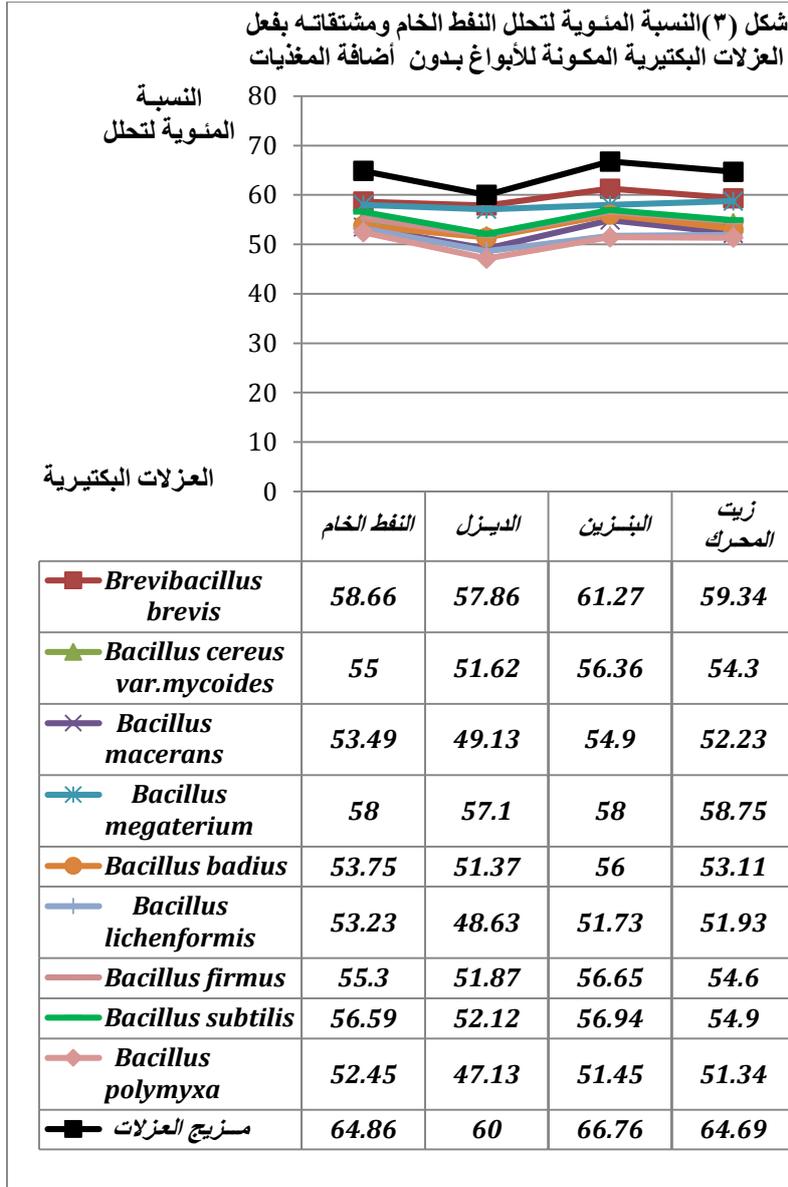
فقد كانت أكثر في الأعداد ونسب التحلل مثل *Brevibacillus. brevis* و *B. megaterium* و *B. subtilis* في حين أن أنواع العزلات الأخرى كانت متقاربة . لوحظ أيضا من خلال النتائج قابلية البكتيريا للنمو على النفط الخام ومشتقاته وأظهرت أغلب العزلات نمو وتحلل أعلى على البنزين بينما كانت أقل في النمو وقدرة التحلل على الديزل وهذا يتماشى مع دراسات اخرى (Stavanger and Edinburgh, 1999) من أن النفط الأخف يكون أكثر قابلية للتحلل الحيوي بفعل البكتيريا من النفط الأثقل، وأيضا مع اخرين (Atlas and Cerniglia 1995) من أن العديد من الأحياء الدقيقة قادرة على استهلاك الهيدروكربونات النفطية كمصدر للكربون والطاقة وهي واسعة الإنتشار في الطبيعة ، وأن استهلاك الهيدروكربونات النفطية يعتمد بشكل كبير على النظام الجيني للبكتيريا وعلى الطبيعة الكيميائية للمركبات التي تحللها والعوامل البيئية . كذلك تم دراسة قدرة مزيج العزلات البكتيرية على النمو على النفط الخام ومشتقاته بدون ومع إضافة المغذيات بعد دراسة كل عذلة على حده وتبين ارتفاع أعداد البكتيريا وكمية المواد التي تحللها مقارنة بالعزلات الانفرادية وكان لإضافة المغذيات تأثيرا أكبر على أعداد البكتيريا ونسب تحلل المواد النفطية ، فالنسبة المئوية للتحلل كحد أعلى لها وصل في العزلات غيرالمكونة للأبواغ الى 80% بدون إضافة مغذيات وإلى 85% بإضافة المغذيات ، بينما العزلات المكونة للأبواغ فقد بلغت نسبة التحلل كحد أعلى الى 67% بدون إضافة مغذيات وإلى 80% بإضافة المغذيات ، أما العزلات الأنفرادية فقد بينت النتائج أن نسب التحلل باستخدام العزلات غير المكونة للأبواغ تراوحت بين 40-78% بينما تراوحت نسبة التحلل عند استخدام العزلات المكونة للأبواغ بين 51 - 61% بدون إضافة المغذيات بينما ارتفعت إلى ما بين 54 _ 82 % في العزلات غير المكونة للأبواغ وفي المكونة للأبواغ إلى (55-77%)، وهذه النتائج تتفق مع آخرين (Okoh, 2003 و عويد 2008) والذين أكدوا أن مزيج العزلات البكتيرية كان الأكفا في تحليل مركبات النفط الخام . من خلال التحليل الإحصائي وإجراء تحليل التباين الأحادي (ANOVA) ، اتضح أن هناك فروق معنوية بين المعاملات المتمثلة في المغذيات والمشتقات النفطية والتداخل بينهما عند مستوى معنوية 0.05 ، حيث حدثت زيادة معنوية في نسب تحليل واستهلاك المشتقات النفطية بواسطة العزلات البكتيرية غير المكونة للأبواغ والمكونة للأبواغ بإضافة المغذيات عن المعاملات الأخرى بدون إضافة المغذيات ، وقد ظهرت بشكل خاص فروق عالية المعنوية بين المعاملات في العزلات المكونة للأبواغ مع المغذيات. وبذلك فأن عملية النمو واستهلاك أنواع المشتقات النفطية المختلفة بواسطة العزلات البكتيرية تأثرت بإضافة المغذيات النيتروجينية والفسفاتيية .

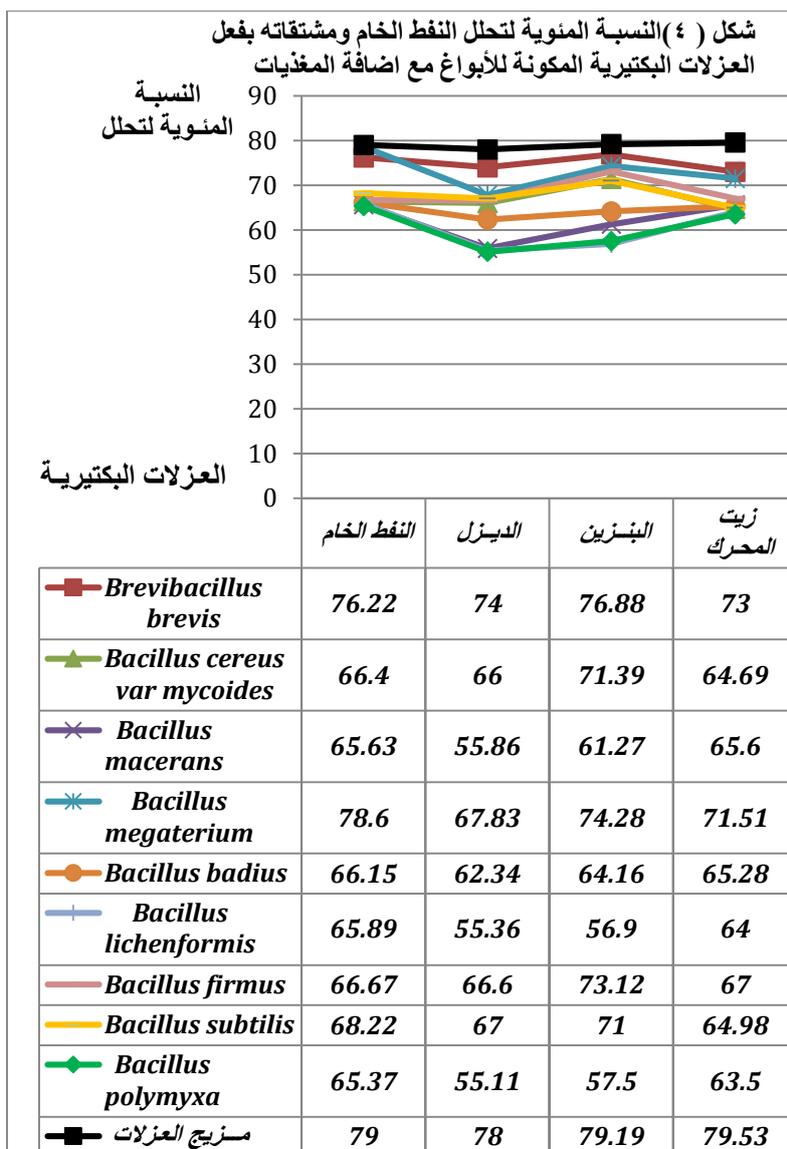
التوصيات Recommendations

مما سبق ، يمكن القول بأن التربة الزراعية في طرابلس غنية بالعزلات البكتيرية التي تستطيع أن تحلل النفط ومشتقاته ، حيث يمكن أن تستخدم هذه البكتيريا في صورة لقاحات لإزالة أو التخلص من التلوث النفطى مع الأخذ في الاعتبار أن أفضل استخدام لها يكون في حالة مختلطة مع إضافة المغذيات النيتروجينية والفسفاتيية المطلوبة لإتمام عملية التحلل بنجاح وكفاءة عالية .









المراجع

اولا: المراجع العربية

- الخفاف، عبد علي وخضير، ثعبان كاظم . 2000. الطاقة وتلوث البيئة . الفصل الثاني، تلوث البيئة، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، الطبعة الأولى، عمان، الأردن، 61 صفحة.
- الشناوي ، كوثر السيد فهمي . 2010. المعالجة البيولوجية للملوثات النفطية في بعض شواطئ المملكة العربية السعودية . كلية العلوم للبنات . جامعة الملك عبد العزيز .
- الشناوي ، كوثر السيد فهمي ؛ علي ناصر حسن ؛ ايمن نياي ؛ مجدى مداور و محمد المنيرى . 2010. قدرة المجتمعات الميكروبية فى التربة الطفالية المصرية على التحلل البيولوجي لزيت البترول . جامعة عين شمس - معهد الدراسات والبحوث البيئية - جامعة عين شمس - كلية العلوم مركز بحوث الصحراء .
- الراوي، أميرة محمود؛ حسن خالد العكيدي ومحسن أيوب، . 1999 التحلل الحيوي لأنواع من النفط الخام بفعل البكتيريا *Bacillus subtilis* مجلة التربية والعلم، العدد . 37
- عبد الرازق ، هالة عبد الحافظ . 2012 . اختبار قابلية العزلة المحلية *Nocardia asteroides* على انتاج المستحلبات الحياتية واستهلاك النفط الخام . مجلة مركز بحوث التقنيات الأحيائية ، المجلد السادس - العدد الثاني . العراق

- عزيز ، ايمان محمد ؛ أدبية يونس شريف . 2012 قابلية أنواع بكتيريا *Micrococcus* المعزولة من التربة على تحليل مركب الديزل - الموصل . رسالة ماجستير . كلية العلوم ، قسم علوم الحياة ، جامعة الموصل .
- عويد، ياسين محمد . 2008 الفعل الانفرادي والمشارك لبعض العزلات البكتيرية على التحلل الحيوي -2 لنفط خام كركوك المتوسط . مجلة علوم الرافدين . المجلد 19 : العدد 4، ص 101-115.
- جارالله، إيمان محمد . 2008. بكتيريا مكسرة للهيدروكربونات المعزولة من تربة ملوثة بالمشتقات النفطية . ماجستير . كلية العلوم . جامعة بابل .
ثانيا :- المراجع الأجنبية
- Alexander, M. 1997 "Biodegradation and Bioremediation". 2nd ed. Academic Press, London. pp.88-90.
- Atlas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbial. Rev.* 45: 180-209.
- Al-Dobouni, I. A. K. 1977. Qaiyarah crude oil studies to assess potentials. A thesis of Master of Science. Department of Chemistry. College of Science-University of Mosul-Iraq.
- Arafa, 2003 . Microbial degradation of hydrocarbons in the environment." *Microbiological Reviews* 54(3): 305-315.
- Al-Sayigh, H.Y. 1978. Studies on Q ai y arach crude oil fractionation of crude oil and thermal cracking of its heavy constituent. A thesis of Master of Science. Department of Chemistry, College of Science, University of Mousal-Iraq.
- Atlas ,R.Cerniglia,C.1995.Bioremediation of Petroleum pollutants, *Bioscience* 45,332_339
- Boboye, B., O.F. Olukunle and F.C. Adetuyi, 2010. Degradative activity of bacteria isolated from hydrocarbon-polluted site in Ilaje, Ondo State, Nigeria. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4: 2484-2491.
- Collee , J.G, Miles, R.S ,Wan, B. 1996 Tests for the identification of bacteria. In: Mackie and Mc Cartney *Practical Medical Microbiology*. Eds. Collee JG, Fraser AG, Marmion BP & Simmons A. 14th ed. Edinburg: Churchill Livingstone. pp: 131-50.
- Cruickshank ,R.Daguid, j,marmion and Swain,R. 1975. *Medical microbiology churrchill living stone London .*
- Hazen,T.C., Tien, A.J., Worsztynowicz,A., Altman, D.J., Ulfig,K. and Manko,T. 2003. Biopiles for remediation of petroleum-contaminated soils.Apolish case stude.Lawrence Berkley national laboratory . Institute for ecology of industrial Areas PP: 1-15.Poland.
- Jacobucci, D.F.C., Vasconcelos, C.K., Matsuura, A.B., Falconi, F.A. and Durrant, L.R. 2001. Degradation of Diesel Oil by Biosurfactant – Producing Bacterial Strains. The Association for Environmental Health and Sciences. Food Engineering Faculty. Companies State University. Unicamp Companies – Brazil *Advanced Technology*. pp.1-8.
- Juteau, P., Bisailon, J.G., Lepine, F., Ratheau, V., Beudet, R. and Villemur, R., 2003. Improving the Biotreatment of Hydrocarbons – Contaminated Soils by Addition of Activated Sludge Taken from the Waste Water Treatment Facilities of an Oil Refinery, *Kluwer Academic Publishers. Bioremediation: Vol. 14*, pp. 31-40. Netherlands
- Koren, O.; Knezevic, V.; Eliora, Z.R.; Rosenberg, E., 2003 Petroleum pollution bioremediation using water-in soluble uric acid as a nitrogen source. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69,10, : 6337-6339.
- Lai, B., Mishra, S., Bhattacharya, D. and Sarma, P.M., 2001. Biotechnological Approach to Manage Oily Sludge. Proceedings of the 4th International Petroleum Conference and Exhibition 195 – 196. R and D Centre. Indian Oil Corporation Ltd. 280 p.
- MacFaddin, J. F. 2000. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3rd ed. Williams and willkins company. USA., pp. 912.
- Mittal, A., P. Singh, 2009. Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spill. *Indian J. Exp. Biol.*, 47: 760-765.
- Murray, P.R.,2003.*Manual of clinical Microbiology* .8th ed. Washington,chap,41.
- Olukunle ,O.F. , 2013. Characterization of Indigenous Microorganisms Associated with Crude Oil-polluted Soils and Water Using Traditional Techniques. *Microbiology Journal*, 3: 1-11.
- Ojo, O.A., 2006. Petroleum-Hydrocarbon Utilization by Native Bacterial Population from A waste Water Canal South West Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. 5:333:337
- Phillips, C., 2003. *Oil and Environment. Crude Energy. Teaching Guide. Oil and the Environment. Technology Advanced*, pp. 1-4.
- Philips, U.A. and Traxler,R.W1963 Microbial degradation of Asphalt Apple . *Microbiol.*11.PP:235-238.
- Rahman K.S, Rahman T, Lakshmanaperumalsamy P. , Banat, I.M .2002 .Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. *J Basic Microbiol* 42:284-291
- Song, H.C. ; Bartha, R. 1990. Effect of jet fuel spills on the microbial community of soil. *Appl. Environ. Microbiol*, 56, 6465.

- Stavanger and Edinburgh, 1999. Project 2.3: Natural Degradation and Estimated Recovery Time – Scales. Ukooa Drill Cuttings Initiative Research and Development Programme. Environment and Resource Technology. Rogaland Research. pp. 1 – 105.
- Sanchez ,O, Ferrera I, Vignes N, Garcia de Oteyza T, Grimalt JO, Mas J, 2006. Presence of Opportunistic Oil-Degrading Microorganisms Operating at the Initial Steps of Oil Extraction and Handling. International Microbiology 9: 119-24
- Wilson, J.J., Hatcher, J.F. and Goudey, J.S., 2002. Exotoxicological Endpoints for Contaminated Site Remediation. Hydroqual Laboratories Ltd, Calgary. Ann 1st Super Sanita. 38 :143–147. Alberta, Canada.
- Wright, M.A., Taylor, F., RandleS, S.J., Brown, D.E., Higgins, I.J. 1993Biodegradation of a synthetic lubricant by *Micrococcus roseus*. Applied Environmental Microbiology, 59 (4): 1072-1076.
- Zhu, X., Venosa, A.D., Suidan, M.T. and Lee, K., 2004. Guidelines for the Bioremediation of Oil–Contaminated Salt Marshes. National Risk Management Research Laboratory. Office of Research and Development U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, 68:1-57

Biodegradation, ability of bacterial isolates prevailing in contaminated soils with oil derivatives

Abstract

The goal of this research is to obtain of some bacterial isolates having high-efficiency in biodegradation of hydrocarbons culture media containing concentration of 1% of crude oil and its derivatives .Soil samples were taken from different areas with hydrocarbon contaminants of oil derivatives and a sample of light rude oil included oiled soil that filter pipes, gasoline, diesel stations and places where cars change oil and lubricants of the following stations :Tajura , Alshrkia El Hadaba , Got Alshall , Janzur and Haq- Elfeel .

Based on the morphological, microscopic characters and biochemical tests, 18bacterial isolates at the level of genus and/or species were obtained. The ability of these bacteria to consume as well as degrade petroleum products was determined during their growth on liquid cultures individually and as in combination with the others . Most bacterial isolates showed the ability to grow on the aforementioned media . An efficient degradation was found with or nonspore formers were used than those obtained when spore formers were used. These results were true when without addition to the media. Combination between the bacterial isolates of nonspore formers used were better in biodegrading the crude oil and its derivatives than those isolates of spore formers when the nutrients were added. When the nutrients were not used the percentage of the degradation ranged from 40 to 80 % when nonspore formers were used, and less than 70% when spore formers were used. It could be recommended that soil polluted with oil derivatives in Tarabols (Libya) is rich with bacterial isolation. Therefore, using of these bacterial isolates is recommended for eliminating oil pollutants in soil.