Annals of Agric. Sci., Moshtohor **ISSN 1110-0419**
Vol. 52(3) (2014), 419–432 **http://annagricmoshj.com**

العوامل المؤثرة على التحلل الحيوى للهيدروكربونات النفطية بواسطة العزلات البكتيرية السائدة فى الترب الملوثة

أيمان الصادق منصور الحمادى
قسم التربة والمياه، كلية الزراعة، جامعة طرابلس، ليبيا
Corresponding author: emanbensaeed@gmail.com

الملخص

أجريت هذه الدراسة لاختبار تأثير الظروف البيئية المختلفة على كفاءة بعض العزلات البكتيرية المحلية المكونة وغير المكونة للأبواغ والسائدة فى الترب الملوثة على استهلاك النفط الخام ومشتقاته وإنتاج المستحلبات الحيوية من خلال قياس نسبة استهلاك الهيدروكربونات و تركيز المستحلب الحيوى المنتج من قبل هذه البكتيريا بتنميتها على هذه المركبات عند درجات حرارة مختلفة 30 و37 و 42˚س وقيم مختلفة من الأس الهيدروجيني pH 6 و 7 و 8 وبتركيزات 30، 3، 0.3 % من كلوريد الصوديوم . وأظهرت النتائج أن الظروف المثالية لاستهلاك الهيدروكربونات من قبل هذه البكتيريا هي عند الأس الهيدروجيني 7 وبإضافة النيتروجين والفوسفور كمغذيات بينما pH 6 ، 8 فقد أدت الى انخفاض في معدلات تحلل هذه المركبات . واختلفت درجات الحرارة المثالية بين البكتيريا فكانت بين 30˚س و 37 ˚س ، كما أثرت زيادة تركيز الأملاح على كمية التحلل وإنتاج المستحلبات حيث وصل الى قيم منخفضة جدا عند 3% و 30% . تم تحديد تأثير هذه العوامل مع وبدون إضافة المغذيات واتضح ان الظروف البيئية المثلى من درجة pH المتعادلة والحرارة المتوسطة بدون تركيزات عالية من الأملاح ومع إضافة المغذيات زاد النشاط التحليلى وإنتاج المستحلبات لهذه المجموعات البكتيرية والتغيرات عن الظروف المثلى لم يساعد البكتيريا فى الاستفادة من المغذيات المضافة ، فظهر الانحدار فى نشاطها وانخفضت كمية المستحلبات المنتجة لإزالة هذه المركبات . وبذلك نستنتج من هذه الدراسة ان الظروف البيئية من أهم المؤثرات على فعالية عملية التحلل الحيوى وازالة الملوثات من مواقع التلوث فى التربة .

المقدمة

ان ازدياد عمليات إنتاج واستهلاك النفط زاد من مخاطر التلوث البيئي الذي وصل إلى السطوح المائية والترب ويعد التلوث النفطى من اخطر أنواع التلوث بسبب الكميات الهائلة التي تلقى من النفط الخام ومنتجاته الى المحيط الحيوي وما يحتويه من مركبات سامة وضارة و يحدث سنويا ما يقارب 14000 حالة تدفق للنفط الخام الى المحيط الحيوي(الخفاف وخضير، 2000) تصل بطرق مختلفة مباشرة وغير مباشرة ومنها وسائل شحن النفط الخام، مراحل الخزن والتنقية، الحوادث العرضية والتلقائية، التطبيقات الخاطئة للتخلص من البقايا والترسبات المتراكمة من النفط الخام في مستودعات الخزن (Juteau *et al*, 2003 و Phillips, 2003) وتمتد التأثيرات السامة للهيدروكاربونات النفط الخام إلى النباتات وديدان الارض والى كل صور الحياة (Wilson *et al,* 2002) . ان 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 تعتمد سمية النفط الخام على الخواص الكيميائية والفيزيائية له وعلى كميته وفصول السنة وعوامل بيئية أخرى . تعد التربة بيئة ملائمة لنمو وتكاثر انواع كثيرة من الكائنات الحية الدقيقة ومنها البكتيريا والتى تلعب دورا في تحليل المركبات الكيميائية وفي دورات العناصر في الطبيعة وإعادتها الى التربة ،وتتأثر هذه البكتيريا بعوامل عدة منها درجات الحرارة والرطوبة ووفرة المغذيات والأس الهيدروجيني pH للتربة وان درجة التهوية تحدد الاحياء المجهرية فيها (Alexander, 1997). وانواع من هذه الاجناس البكتيرية عزلت من المناطق الملوثة بالنفط الخام ومشتقاته وتم دراسة قابليتها على تحليل المركبات الهيدروكربونية وهذه الاجناس تعد من انواع البكتيريا الصديقة للبيئة حيث تعمل على تحويل أو معدنة المركبات العضوية الملوثة للبيئة مثل النفط الخام ومشتقاته إلى مواد اقل ضررا على البيئة حيث تدخل هذه المواد بعد تحليلها إلى الدورة البيوكيميائية ولهذا استخدمت التقنيات البيولوجية التي يطلق عليها عملية التحلل الحيويBioremediation في ازالة هذه الملوثات وتخليص البيئة منها .
(Jacobucci *et al*,2001 و Singh andWard2004 و Fritsche and Hofrichter2000) .

قابلية المركبات الهيدروكربونية للتحلل الحيوى Bioavailability

تحصل المعالجة الحيوية Bioremediation عند وصول الأحياء المجهرية إلى الملوثات بالوسط ، ولكن عندما تقل الجاهزية الحيوية لهذه الملوثات بسبب أو لأخر فأنها تعرقل بشكل كبير إزالتها من موقع التلوث (Guerina and Boyd 1992). وهنالك ظاهرتان تعملان على جعل الهيدروكربونات في التربة غير جاهزة للأحياء المحللة لها، وهما الادمصاص (Adsorption) والية النقل الفعال (Active transport) لجلب المركبات الكيميائية باتجاه سطح الخلية الميكروبية (Alexander 1991). وأشار يانجو ومشاركوه (Yang *et al*., 1995) فى دراستهم التفكيك

الحيوى في التربة ، الى أن فعاليته تقل بزيادة مدة تواجد المواد الكيميائية في التربة مما يؤدي إلى ادمصاصها على دقائق الطين ، وبالتالى فان هذه المواد تتراكم في التربة وتصبح غير جاهزة للأحياء ، وبهذا تعد مقاومة للتفكيك الحيوي وهناك بعض العوامل يعتقد بأنها تؤثر على ادمصاص المركبات الكيميائية في التربة ، ومن اهمها المجموعات التالية (1) تركيب التربة ، ومحتواها من المادة العضوية، والرطوبة، و pH . (2) قوة الارتباط بين دقائق الطين والمواد الكيميائية. (3) المركبات التي ترتبط مع دبال التربة والتي عادة تكون صعبة التفكيك الحيوي من احياء التربة الدقيقة (Mihelcic *et al*., 1995 و Atlas and Creniglia, 1995) .

العوامل الفيزيائية المؤثرة على تحلل الهيدروكربونات :

تعد الملوحة من العوامل المهمة في التحلل الحيوى ، وان نشاط كثير من الأحياء يكون عالياً عند تراكيز منخفضة من الملوحة، مقارنة بالملوحة العالية التي تسبب اختزالاً في معدل التحلل الحيوى (Leahy and Colwell, 1990 و Minai-Tehrani *et al*,2009). وعند دراسة معدل تمثيل المركبات الهيدروكربونية في درجات من الملوحة تراوحت بين 3 إلى 30 % (وزن/حجم) وجد ان هناك علاقة عكسية بين تمثيل المركبات الهيدروكربونية والملوحة، وان معدل التمثيل لهذه المركبات يقل بزيادة الملوحة بالرغم من توفر الأوكسجين والمغذيات ، وان الاختلاف في تراكيز الملوحة يؤثر في نفاذية جدار الخلية مما ينعكس على قدرتها في تمثيل هذه المركبات (Ward & Brock, 197 و yang *et al* .,2000) . تبين أن معدلات استخدام االهيدروكربونات النفطية تبدأ في الانخفاض بشكل ملحوظ في نطاق الملوحة 3.3 % حتى 28.4% ومع ذلك هناك العديد من الدراسات عن الكائنات الدقيقة أنها قادرة على أكسدة المواد الهيدروكربونية البترولية حتى في وجود 30% كلوريد الصوديوم،وأكدها ريكر وويفر (Rhyker and Weaver 1995).

ومن بين هي البكتيريا الخيطية *Streptomyces albiaxialis* كذلك وجد مارجسين وشنزر(Margesin & Schinner ، 2001) ان زيادة الملوحة تعمل على خفض ذائبية المركبات الاروماتية متعددة الحلقات مثل البايرين في كثير من الترسبات ، إذ تعمل على زيادة ادمصاص هذه المركبات على دقائق الترسبات الطينية ، وبالنتيجة فان هذه المواد تتراكم في التربة وتصبح غير جاهزة حيويا ومقاومة للتحلل. وللملوحة تأثير على فعالية المستحلبات الحيوية (Ilori *et al*, 2005) . إذ تتفاعل هذه المستحلبات مع الهيدروكربونات النفطية وتعمل على زيادة ذائبيتها في الماء وأيضا زيادة الجاهزية الحيوية لها، كما أن وجود الأملاح تزيد من ادمصاص هذه المركبات فى التربة وتعرقل وصول المركبات الى سطح الخلايا المحللة (Banerjee *et al*.,1995) . ويحدث التحلل الحيوى للهيدروكربونات في بيئات التربة في مدى حراري يتراوح من 30-40 °س وأى زيادة عن ذلك قد تؤدى لتثبيط التحلل الحيوى لهذه المواد، ودرجة الحرارة تحدد أنواع الكائنات الحية الدقيقة في موقع التلوث، وتؤثر على معدل نمو البكتيريا كما ان النشاط البكتيري يتضاعف لكل زيادة من 10 °س في درجة الحرارة ضمن مدى من درجات الحرارة بين 5 إلى38 °س (Fiorenza *et al.,* 1991) . تؤثر درجة الحرارة على الحالة الفيزيائية للهيدروكربونات ففي الظروف الباردة ، تصبح الهيدروكاربونات السائلة شمعية صلبة ، والهيدروكربونات الذائبة تترسب وذائبيتها تنخفض بشكل ملحوظ ، وهذه التغيرات في الحالة الفيزيائية تقلل من الجاهزية الحيوية لهذه المركبات وبالتالي تقلل من تحللها الحيوى . كما أن لدرجة الحرارة تأثير على فعالية المستحلبات الحيوية(Ilori *et al*, 2005 و Inakollu *et al*, 2004). ولاحظ فوتكنهاور ومشاركوه (Feitkenhauer *et al*., 2012) أن معدل التحلل الحيوى يكون بطيئاً جداً في درجات الحرارة المنخفضة ويعتقد انه بسبب انخفاض النشاط الأنزيمى، ويزداد كلما زادت درجات الحرارة ،وارتفاعها يعزز معدلات الأيض الهيدروكربونى، إذ وجد أن تفكيك النفثالين يزداد بمقدار عشر مرات عند زيادة درجة الحرارة من 20 إلى35 °س .

العوامل الكيميائية

وجد ان التفكيك الحيوي للهيدروكربونات يزداد مع زيادة الرقم الهيدروجيني pH لغاية رقم 8 (Hambrick *et al*., 1980). وأن الرقم الهيدروجيني يؤثر على فعالية المستحلبات الحيوية. وأشار ديبل وبرثا (Dibble and Bartha1979) إلى أن معدل التحلل ينخفض إذا كان الرقم الهيدروجيني للوسط اقل أو أكثر من الرقم الهيدروجيني المتعادل بشكل كبير. وان الرقم الهيدروجيني الأمثل يكون بين 6 و 8 لتفكيك الهيدروكربونات في التربة. وبين إلورى ومشاركوه (Ilori *et al*. 2005) الى أن ال pH يؤثر في انتاج الانزيمات المفككة للهيدروكربونات من الاحياء المجهرية اذ وجد ان الرقم الهيدروجيني الامثل لإنتاج الانزيم المفكك للدهون lipase كان عند 7. وأشار باور (Pawar.2012) الى أن افضل تفكيك حيوى للفينول من قبل بكيتريا *Pseudomonas pictorum* كان عند الرقم الهيدروجيني الامثل بين 6.8 و7 وبدرجة حرارة 30 °س وباستخدام الفينول كمصدر للطاقة بتركيز0.2 غم/لتر ووجد أيضاً اكبوكوسل وأتن (Okpokwasili and Oton2006) بأن الرقم الهيدروجيني الامثل لتفكيك حمأة النفط oily sludge يقع بين 6.5 و 8.5 وبدرجة حرارة 29-31 °س .

المستحلبات الحيوية أو المركبات الفعالة سطحياً (Biosurfactants)

المستحلبات الحيوية عبارة عن مركبات ذات طبيعة Amphiphilic وغالباً ماتوجد على سطوح الخلايا الميكروبية مباشرة . (Karanth *et al*., 1999 و Rahman*et al*.,2003). وهى جزيئات فعالة سطحياً تفرزها الخلايا لتسهيل اخذ المركبات غير الذائبة في الماء تنتج على سطوح الخلايا أو تفرز إلى خارج الخلية وتحتوي على جزء محب للماء وجزء كاره للماء، والذي يعمل على خفض الشد السطحي (Tang *et al*, 2005 و Ilori*et al*, 2005) وبشكل عام هناك آليتان تعمل من خلالهما المستحلبات الحيويةعلى زيادة تفكيك المركبات الهيدروكربونية قليلة الذوبان في الماء. الإلية الأولى يعمل من خلالها المستحلب على إذابة المركب الكاره للماء في داخل جزئيات صغيرة تسمى المايسيل Micelle التي تعمل على زيادة المساحة السطحية للمهاجمة الميكروبية وتسمح بزيادة ذوبانية المركبات وجاهزيتها للأخذ من قبل الخلايا. أما الإلية الثانية يعمل من خلالها المستحلب على جعل سطوح الخلايا أكثر كراهية للماء، مما يؤدي إلى زيادة الاتصال المباشر بين الخلايا والمركبات قليلة الذوبان في الماء . وأشارت الدراسات إلى ان معظم المستحلبات الحيوية المعروفة ذات منشأ بكتيري، وعدد قليل من هذه المستحلبات تنتجها الخمائر والفطريات (Banat *et al*., 2000). ولاحظ تليفا ومشاركوه (Tuleva *et al*., 2005) إنتاج المستحلبات الحيوية من *Pseudomonas* spp عند نموها على الهكساديكان كمصدر وحيد للكربون والطاقة، وأدى إنتاج المستحلب الى خفض الشد السطحى والحصول على مستحلب ثابت ومتماسك وبفعالية استحلاب 69 ، كما تبين أن بكتريا *Bacillus* spp قادرة على النمو على المركبات المذكورة. وأن العوامل البيئية تؤثر في إنتاج المستحلبات الحيوية إما بأن تزيد إنتاجه أو تثبطه مثل درجة الحرارة والملوحة والأس الهيدروجيني والمغذيات . (Raza *et al*.,2007 و Rahman2003) . وتعد إضافة العناصر المغذية من المحفزات الحيوية Biostimulators والمحددة لعمليات التفكيك الحيوى نظراً لأهمية هذه العناصر في نمو الإنزيمات وبنائها التي تستخدمها الكائنات الحية الدقيقة في تكسير الهيدروكربونات. ويضيف التلوث النفطي باستمرار الكربون إلى البيئة والذي تستهلكه الكائنات الحية كمصدر للكربون ، ولكن نمو الكائنات الحية يتطلب عناصر مغذية أخرى فضلاً عن الكربون . ومن أهم هذه العناصر النيتروجين والفسفور واللذان تحتاجهما الأحياء المجهرية بتركيزات عالية الى جانب تركيزات قليلة من الكبريت والحديد والمغنسيوم والكالسيوم والصوديوم وعناصر أخرى تحتاجها الأحياء الدقيقة لعملية النمو(Chaineau *et al*.,2005 و Atlas1984) وان تركيز المغذيات المفرطة يودي الى عملية تثبيط حيوي وقد أشارت العديد من المصادر إلى الآثار السلبية نتيجة لارتفاع مستويات النتروجين على تحلل المواد الهيدروكربونية وخاصة على المركبات العطرية. (Oudot; *et al*, 1998 و Chaineau *et al*;2005 و Okolo *et al*;2005) .

اهداف البحث

تحديد الظروف البيئية المثلى لبعض أنواع البكتيريا المعزولة من الترب الملوثة بالنفط الخام ومشتقاته لاستهلاك الملوثات وإزالة التلوث ،فى حالة منفردة ومشتركة مع إضافة مغذيات وبدونها .

المواد وطرق البحث

العزلات البكتيرية المكونة وغير المكونة للأبواغ التى تم عزلها من عينات التربة الملوثة وهى 18 عزلة . الأنواع البكتيرية غير المكونة للأبواغ وتضم كل من ، *Micrococcus* sp , *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida* ، *Nocardia* sp , ومكونة *Actinomyces* sp، *Staphylococcus epidermidis*، *Arthrobacter* sp،*Acinetobacter* sp , *Corynebacterium* **s**p, للأبواغ وتضم 9 انواع من بكتريا*Bacillus* spp

وهى ،*brevis*، *(cereus , mycoides)*، *macerans*، *megaterium* ، *badius* ، *lichenformis* ، *firmus* ، *subtilis* ، *polymyxa*

تنمية البكتريا المعزولة على النفط الخام والمشتقات النفطية

يتم ذلك كما جاء فى (عويد 2008 و Traxler and Philips 1963 و Bartha1986 و Margesin and Schinner,2001 و Leahy and Colwell1990) بعمل خليط من العزلات البكتيرية ذات القدرة على النمو ,وتحليل الهيدروكربونات وهي غير المكونة للأبواغ وشملت ، *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, , Nocardia* sp، *Acinetobacter* sp , *Arthrobacter* sp ، *Micrococcus* sp, *Corynebacterium*، *Actinomyces* sp وقد استبعدت *Staphylococcus epidermidis* بعد ثبات عدم قدرتها على النمو واستهلاك الهيدروكربونات .

والمكونة للأبواغ وشملت 9 انواع من جنس*Bacillus* sp، *brevis*، *(cereus , mycoides)*، *firmus* ، *macerans*، *megaterium* ، *badius* ، *lichenformis*، *subtilis* ، *polymyxa* وتمت تنميتها بشكل مشترك ، وباستخدام وسط Trypticase soy broth المجهزة من شركة Oxoid ، CM0129B حيث تم توزيع 50 مل من الوسط فى دوارق مخروطية سعة 250 مل وبعدها عقم وبرد

الوسط ثم أضيف كل من / النفط الخام _ والمشتقات النفطية (البنزين ، الديزل ، زيت المحرك) بنسبة 1% (حجم / حجم)ثم 0.23 ملليلتر من تسع عزلات مكونة للابواغ و 0.25 ملليلتر من ثمانية عزلات مكونة للابواغ ليكون معلق بحجم 2 مل من خليط العزلات البكتيرية يحتوى كل ميلليتر منه على تركيز ($10x1^{8}$ CFU/ مل) أضيفت إلى الوسط. من نفس البيئة السابقة وزعت 50 ملليلتر أخرى في دوارق مخروطية سعة 250 ملليليتر ويكمل الوسط بإضافة 1% من نترات الصوديوم وأيضا 0.8% من فوسفات بوتاسيوم أحادي الهيدروجين عقم وبرد الوسط ثم أضيفت نفس المكونات السابقة. وبذلك تم تجهيز وسط الأملاح المعدنية لكل مجموعة بكتيرية بدون ومع إضافة مغذيات ثم دراسة تأثير تغيرات pH، الحرارة ، الملوحة على استهلاك الهيدروكربونات فالمجموعة الأولى التي درست فيها تأثير درجات الحرارة المختلفة 30 ،37 ، 42°س على نمو الأنواع البكتيرية قيد الدراسة، تم تثبيت درجة التفاعل على pH =7 باستخدام الأملاح المنظمة والقياس باستخدام جهاز pH وهى نفس pH الأوساط الغذائية التى نمت عليها هذه العزلات ، أما المجموعة الثانية من البيئات التي استعملت لغرض اختبار تأثير قيم مختلفة من الpH 6 و 7و 8 فقد تم تعديل الpH لكل مجموعة وتم تحضينها في درجة 30°س لمدة 21يوم .ولدراسة تركيز الأملاح أضيف على التوالى 10 و 1 و 0.1 مل من محلول كلوريد الصوديوم تركيزه 30 % الى وسط الأملاح المعدنية بدون ومع وجود المغذيات على pH =7 للحصول على التركيزات التالية ، 0.3 ، 3 ، 30 % وعقم وبرد الوسط تم أضيفت نفس المكونات السابقة وتم تحضينها في درجة 30°م لمدة 21يوم وهى نفس مدة التحضين التى استخدمت لهذه البكتيريا عند تنميتها على النفط الخام ومشتقاته لاختبار مدى قدرتها على النمو والتحلل فى بداية التجربة .

النسبة المئوية لتحلل النفط الخام ومشتقاته بفعل العزلات المشتركة

قياس معدل تحلل النفط الخام ومشتقاته باستخدام الطريقة الوزنية المستعملة فى حساب نسبة استهلاك الهيدروكربونات (Arafa 2003 و عويد 2008) وذلك عن طريق قياس الفرق بين وزن كمية النفط الخام ومشتقاته المضافة الى الوسط الزرعي المستخدم قبل وبعد تنمية العزلات البكتيرية المستخدمة. من خلال حساب كمية المتبقى من الهيدروكربونات (تحت ظروف التعقيم) وذلك عن طريق أخذ ورقة ترشيح معقمة وتجفيفها بفرن التجفيف مدة 24 ساعة ووزنها ، تم رشح الوسط بورقة ترشيح وبعدها بفرن التجفيف لمدة 24 ساعة بدرجة 45 °س ثم وزن لمعرفة الفرق بالوزن قبل وبعد الترشيح اذ ان الراسب يمثل المتبقى من الهيدروكربونات حسب القانون التالى :- R= (A−B/A) x100% −حيث أن :−

R = نسبة المستهلك من الهيدروكربونات

A = كمية الهيدروكربونات المضافة (2مل)

B = كمية المتبقى من الهيدروكربونات

حساب تركيز المستحلب الحيوى المنتج

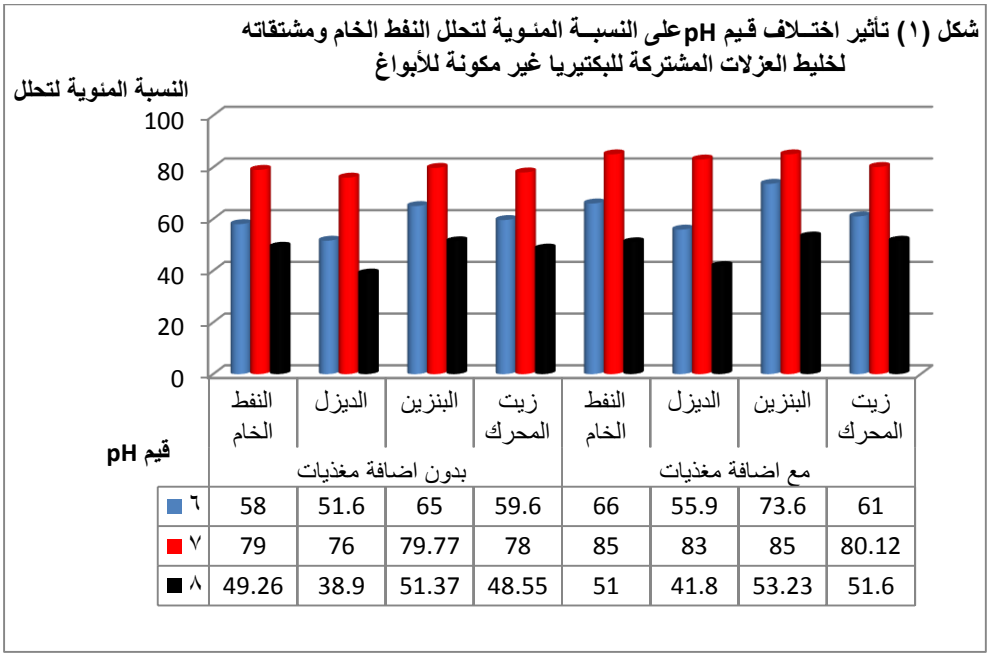
درست قابلية العزلات البكتيرية المشتركة على انتاج المستحلبات الحيوية فقد تم حساب كمية المستحلب الحيوى وفقاً لمصادر متخصصة (Cooper and Paddock 1983 و Singh and Goswami 1991) وذلك بأخذ حجم واحد من راشح المزرعة البكتيرية مع ثلاثة حجوم من الاسيتون(1:3) (V:V) في كأس زجاجى معقم حجم 10 مل جاف وموزون ثم يوضع في الثلاجة عند درجة حرارة 4°س لمدة 10 ساعات. نلاحظ تكون راسب في قعر الكأس بعد تبخير الأسيتون ويوزن الكأس مع الراسب والفرق بين وزن الكأس وهو فارغ ووزنه مع الراسب يمثل المستحلب الحيوى .

النتـائج والمناقشـة

بعدما تبيّنت قدرة العزلات البكتيرية المحلية والمعزولة من الترب الملوثة على استهلاك الهيدروكربونات كمصدر وحيد للكاربون والطاقة من دارستنا السابقة لها(الحمادى 2015) ، وتم تحديد مدى كفاءة العزلات المشتركة للبكيتريا المكونة للابواغ وغير مكونة للابواغ على تحليل الهيدروكربونات تحت ظروف بيئية مختلفة وذلك من خلال قياس نسبة استهلاك الهيدروكربونات بالنمو في درجات حرارة مختلفة (30 و37 و 42)°س وقيم مختلفة من الpH (6 و 7 و 8) وتراكيز (0.3 و 3 و 30 %ملح كلوريد الصوديوم) مع وبدون أضافة المغذيات من النيتروجين والفوسفور . وتركيز المستحلب الحيوى Biosurfactant بالملي غرام/ لتر (mg/L) المنتج من قبل هذه العزلات عند تنميتها على هذه المركبات .وتبين من النتائج عند اختبار تأثير قيم مختلفة من الpH على كفاءة العزلات البكتيرية في استهلاك الهيدروكربونات كما فى (شكل1 ، 2) أنّ قيمة pH 7 هي المثالية لنمو وكفاءة البكيتريا في الاستهلاك وإنتاج المستحلبات الحيوية مع وبدون مغذيات تلتها قيمة pH 6 أما قيمة pH 8 فقد أدت الى انخفاض في معدل التحلل و كفاءة استهلاك هذه المركبات. وهذا يتفق مع برثا وديبا (Bartha and Dibblea 1979) إلى أن معدل التفكيك الحيوى ينخفض إذا كان الpH اقل أو أكثر من الpH المتعادل بشكل كبير. وان الpH الأمثل يكون بين 6 و8 لتفكيك الهيدروكربونات في التربة. وباستعمال درجات حرارة مختلفة فقد تراوحت الدرجة المثالية فى استهلاك المركبات الهيدروكربونية للمجموعات البكيترية بين 30° و37 °س مع وبدون مغذيات(شكل3 ، 4) واتضح ان الاختلاف الطفيف فى درجة الحرارة المثلى راجع الى نوع المشتقات النفطية النامية عليها هذه

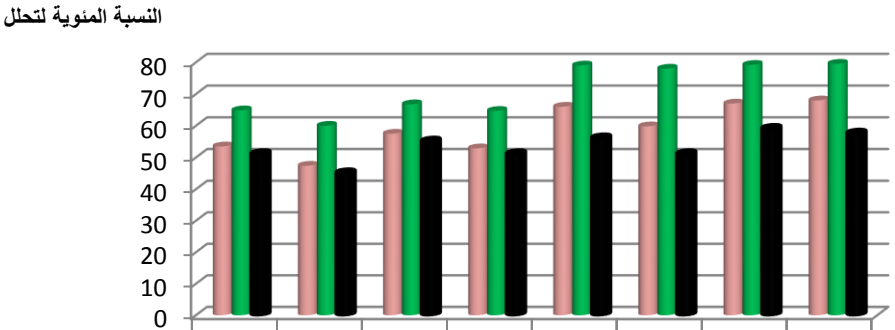
المجموعات فالدرجة المثلى لتحلل هذه المجموعات كان 37 °س على النفط الخام والبنزين و 30°س على الديزل وزيت المحرك ، وهذا ينطبق مع ماشار اليه فيورنزا ومشاركوه (Fiorenza *et al.*, 1991) فالتفكيك الحيوي يحدث في بيئات التربة في مدى حراري يتراوح من30°س الى 40 °س. وإن درجة الحرارة تؤثر على معدل نمو البكتيريا، فانخفاض او ارتفاع درجات الحرارة عن هذا المدى يؤدى الى انخفاض معدل التحلل الحيوى(Ilori *et .al*,2006 و2005 ,Tang *et al.*) . ويختلف تأثير درجة الحرارة باختلاف التركيب الكيميائي للمخلفات الهيدروكربونية (Manilal and Alexander 1991) أما بالنسبة لتركيزات المضافة من كلوريد الصوديوم فقد تراجعت كمية التحلل وإنتاج المستحلبات بزيادة التركيز المضاف فوصلت الى قيم منخفضة جدا عند 3% ثم 30% (شكل 5 ، 6) ,وبذلك يتأكد أن نشاط كثير من الأحياء يكون عالياً عند تركيزات منخفضة من الملوحة، مقارنة بالملوحة العالية التي تسبب اختزالاً في معدل التحلل الحيوى (Leahy and Colwell, 1990 و Minai–Tehrani *et al*,2009) . وان معدل التمثيل لهذه المركبات يقل بزيادة الملوحة (Ward & Brock, 1978)، كذلك معدلات استخدام االهيدروكربونات النفطية تبدأ في الانخفاض بشكل ملحوظ في نطاق الملوحة 3.3 % حتى 28.4% (Rhykerd and Weaver 1995) كما تبين أن البكيتريا غير المكونة للأبواغ كانت أكثر كفاءة فى استهلاك المركبات الهيدروكربونية وإنتاج المستحلبات عند pH 7 ،وبين 30 ° و37°س مع وبدون مغذيات وأن الزيادة والانخفاض فى قيم العوامل السابقة ادى الى انخفاض واضح فى نشاطها التحليلى وبالتالى كانت أكثر تأثرا بالتغيرات فى هذه القيم (Rahman *et al.*, 2003 و Raza *et al.* 2007) وتأثرت البكتيريا المكونة للأبواغ ايضا بتغيرات هذه القيم وظهر انحدار فى نسب التحلل وإنتاج المستحلبات الحيوية عند ارتفاع pH والحرارة وزيادة تركيزات الأملاح . سجلت البكيتريا المكونة للأبواغ كفاءة فى معدل التحليل عند pH 7 ،ومع 30°س و 37 °س مع وبدون مغذيات. تبين ايضا إن العوامل البيئية تؤثر في إنتاج المستحلبات الحيوية فهى تزيد من إنتاجه عند pH 7 ، ومع 30°س و 37 °س ومع المغذيات وبدون وجود تراكيز عالية من الأملاح و تثبيطه عند pH 6 و8 والملوحة و الحرارة العالية (Tulevaa *et al* .,2005) . كما اتضح ان الظروف البيئية المثلى من pH المتعادلة والحرارة المتوسطة بدون تركيزات عالية من الأملاح ومع إضافة المغذيات زاد النشاط التحليلى وإنتاج المستحلبات لهذه المجموعات البكتيرية والانحراف عن هذه الظروف لم يساعد البكيتريا فى الاستفادة من المغذيات حتى مع زيادة تركيزها فظهر الانحدار فى نشاطها وانخفضت كمية المستحلبات المنتجة وتتفق هذه النتائج مع أخرين (Atlas 1984 و Chaineau *et al.*,2006 و Chaillan *et al* ., 2004). ومن هنا نخلص الى أن إضافة العناصر المغذية من المحفزات الحيوية الهامة والمحددة لعمليات التحلل الحيوى نظراً لأهمية هذه العناصر في نمو الأنزيمات وبنائها التي تستخدمها الكائنات الحية الدقيقة في تكسير الهيدروكربونات ، ونمو هذه الكائنات يتطلب عناصر مغذية أخرى فضلاً عن الكربون ، ومن أهم هذه العناصر النيتروجين والفسفور واللذان تحتاجهما الأحياء الدقيقة بتركيزات عالية.

شكل (١) تأثير اختلاف قيم pH على النسبة المئوية لتحلل النفط الخام ومشتقاته لخليط العزلات المشتركة للبكتيريا غير مكونة للأبواغ



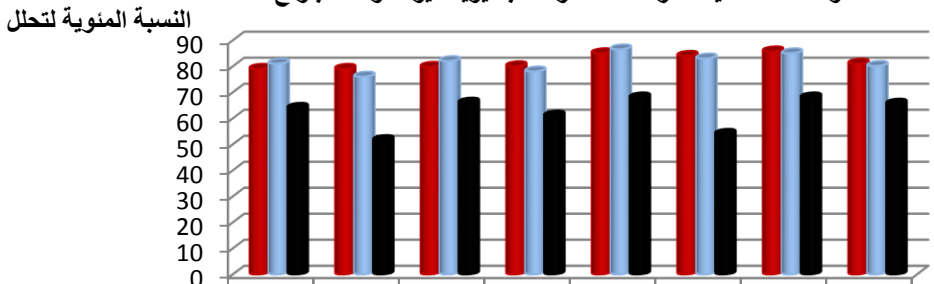
قيم pH	بدون اضافة مغذيات				مع اضافة مغذيات			
	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك
٦	58	51.6	65	59.6	66	55.9	73.6	61
٧	79	76	79.77	78	85	83	85	80.12
٨	49.26	38.9	51.37	48.55	51	41.8	53.23	51.6

شكل(٢) تأثير اختلاف قيم PH على النسبة المئوية لتحلل النفط الخام ومشتقاته لخليط العزلات المشتركة للبكتيريا المكونة للأبواغ



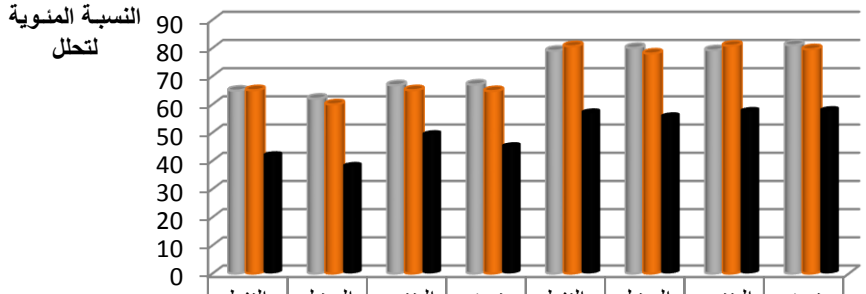
قيم pH	بدون اضافة مغذيات				مع اضافة مغذيات			
	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك
6	53.49	47.4	57.5	52.89	66	59.82	67	68
7	64.86	60	66.76	64.69	79	78	79.19	79.53
8	51	45	55	51	56	51	59	57.5

شكل(٣) تأثير اختلاف قيم درجات الحرارة على النسبة المئوية لتحلل النفط الخام ومشتقاته لخليط العزلات المشتركة للبكتيريا غير مكونة للأبواغ



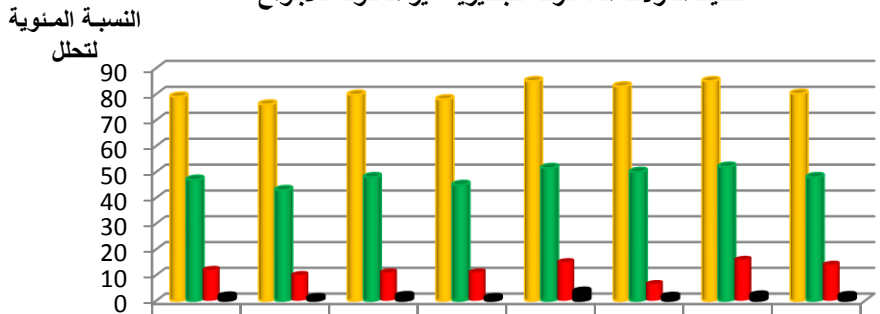
قيم درجات الحرارة	بدون اضافة مغذيات				مع اضافة مغذيات			
	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك
درجة الحرارة ٣٠	79	79	79.77	80	85	84	85.7	81
درجة الحرارة ٣٧	81	76	82	78	86.5	83	85	80.12
درجة الحرارة ٤٢	64	51.6	66	61	68	54	68	65.6

شكل (٤) تأثير اختلاف قيم درجات الحرارة على النسبة المئوية لتحلل النفط الخام ومشتقاته لخليط العزلات المشتركة للبكتيريا المكونة للأبواغ



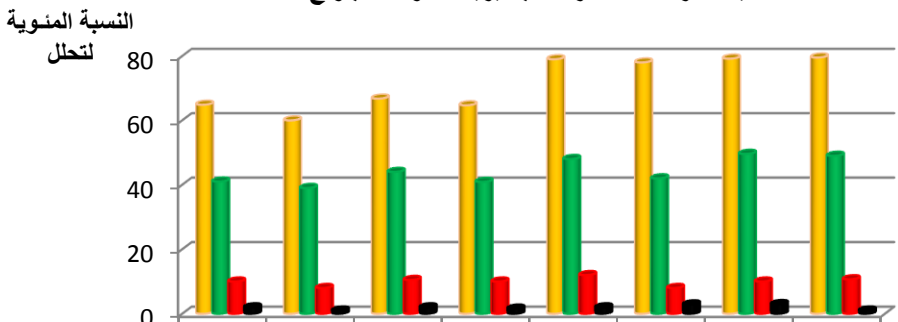
قيم درجات الحرارة	بدون اضافة مغذيات				مع اضافة مغذيات			
	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك
درجة حرارة ٣٠	64.86	62	66.76	67	79	80	79.19	81
درجة حرارة ٣٧	65	60	65	64.69	80.6	78	80.8	79.53
درجة حرارة ٤٢	41.8	38	49.26	45	57	55.6	57.5	57.8

شكل(٥) تأثير تركيز الأملاح على النسبة المئوية لتحلل النفط الخام ومشتقاته لخليط العزلات المشتركة للبكتيريا غير المكونة للابواغ



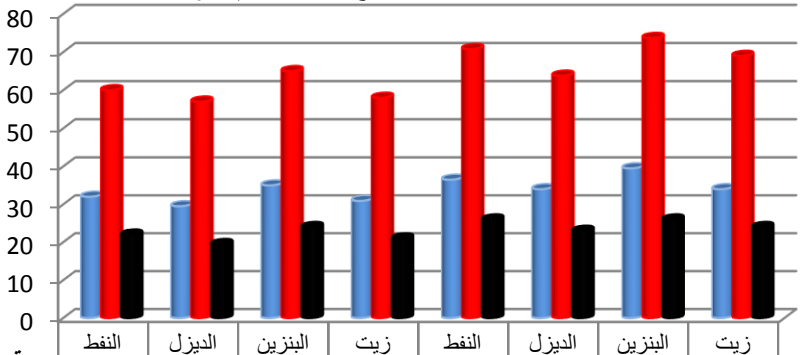
تركيز ملح كلوريد الصوديوم	بدون اضافة مغذيات				مع اضافة مغذيات			
	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك
0%	79	76	79.77	78	85	83	85	80.12
0.30%	47	43	48	45	51.5	50	52	48
3%	12	10	11	11	15	6.5	15.9	14
30%	1.6	1	1.8	1	3.5	1.5	2	1.8

شكل (6) تأثير تركيز الأملاح على النسبة المئوية لتحلل النفط الخام ومشتقاته لخليط العزلات المشتركة للبكتيريا المكونة للأبواغ



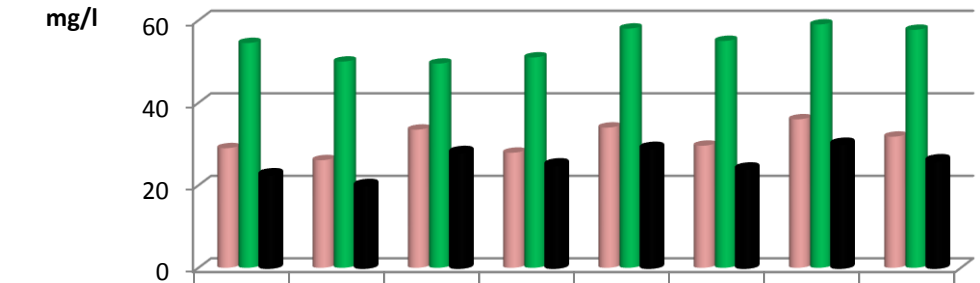
تركيز ملح كلوريد الصوديوم	بدون اضافة مغذيات				مع اضافة مغذيات			
	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك
%٠	64.86	60	66.76	64.69	79	78	79.19	79.53
%٠.٣	41	39	44	40.9	48	42	49.6	49
%٣	10	8	10.5	10	12	8	10	10.7
%٣٠	2	1	2	1.6	2	2.9	3	1

شكل (7) تركيز المستحلب الحيوى المنتج فى النفط الخام ومشتقاته من خليط العزلات المشتركة للبكتيريا غير مكونة للأبواغ عند تغير قيم pH



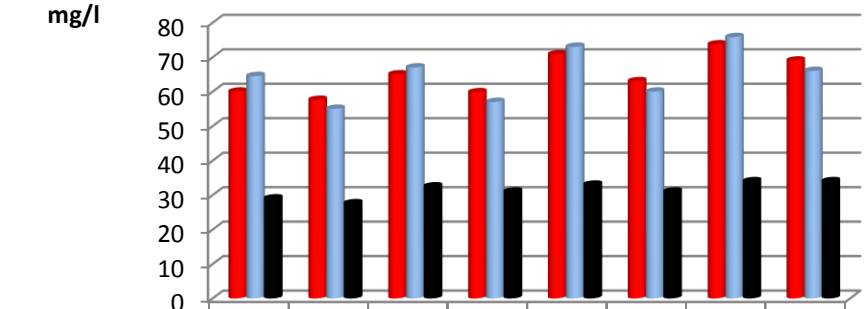
قيم pH	بدون اضافة مغذيات				مع اضافة مغذيات			
	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك
6	32	29.5	35	30.9	36.5	34	39.5	34
7	60	57	65	58	70.8	63.8	73.7	69
8	22	19.5	24	21	26	23	26	24

شكل (8) تركيز المستحلب الحيوى المنتج فى النفط الخام ومشتقاته من خليط العزلات المشتركة للبكتيريا المكونة للأبواغ عند تغير قيم pH



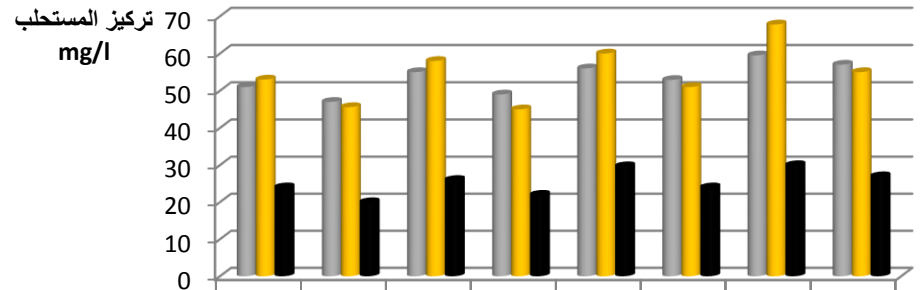
قيم pH	بدون اضافة مغذيات				مع اضافة مغذيات			
	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك
٦	29	26.1	33.5	27.9	34	29.6	36	31.8
٧	54.5	50	49.5	51	58	55	59	57.7
٨	22.6	20	28	25	29	24	30	26

شكل (٩) تركيز المستحلب الحيوى المنتج فى النفط الخام ومشتقاته من خليط العزلات المشتركة للبكتيريا غير مكونة للأبواغ عند درجات حرارة مختلفة



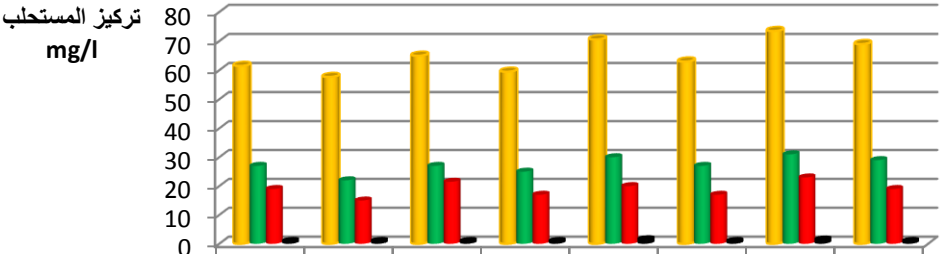
قيم درجات الحرارة	بدون اضافة مغذيات				مع اضافة مغذيات			
	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك
درجة الحرارة ٣٠	60	57.6	65	59.8	70.8	63	73.7	69
درجة الحرارة ٣٧	64.5	55	67	57	73	60	75.8	66
درجة الحرارة ٤٢	29	27.6	32.5	31	33	31	34	34

شكل (١٠) تركيز المستحلب الحيوى المنتج فى النفط الخام ومشتقاته من خليط العزلات المشتركة للبكتيريا المكونة للأواغ عند درجات حرارة مختلفة



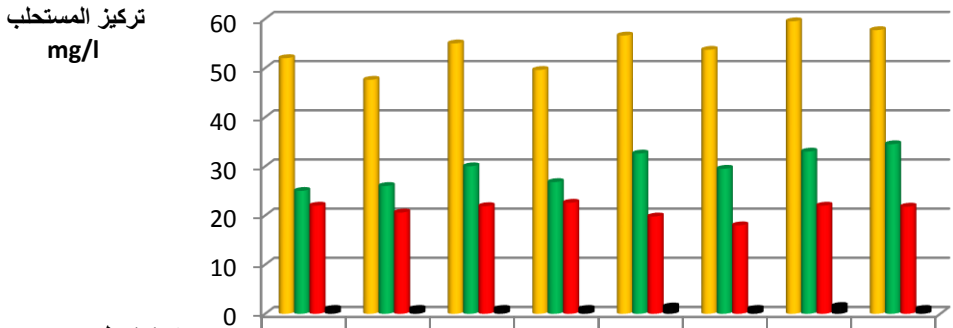
قيم درجات الحرارة	بدون اضافة مغذيات				مع اضافة مغذيات			
	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك
درجة الحرارة ٣٠	51	47	55	49	56	52.9	59.5	57
درجة الحرارة ٣٧	53	45.6	58	45	60	51	67.8	55
درجة الحرارة ٤٢	24	20	26	22	29.7	24	30	27

(١١) تركيز المستحلب الحيوى المنتج فى النفط الخام ومشتقاته من خليط العزلات المشتركة للبكتيريا غير مكونة للأبواغ عند تركيزات مختلفة من الأملاح



تركيز ملح كلوريد الصوديوم	بدون اضافة مغذيات				مع اضافة مغذيات			
	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك
0%	61.5	57.7	65	59.5	70.6	63	73.5	69
0.3%	27	22	27	25	30	27	31	29
3%	19	15	21.5	17	20	17	23	19
30%	1	1	1	1	1.6	1	1.5	1

شكل (١٢) تركيز المستحلب الحيوى المنتج فى النفط الخام ومشتقاته من خليط العزلات المشتركة للبكتيريا المكونة للأبواغ عند تركيزات مختلفة من الأملاح



تركيز ملح كلوريد الصوديوم	بدون اضافة مغذيات				مع اضافة مغذيات			
	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك
0%	52	47.6	55	49.6	56.6	53.7	59.5	57.7
0.3%	25	26	30	26.8	32.6	29.5	33	34.5
3%	22	20.6	21.9	22.6	19.8	18	22	21.8
30%	1	1	1	1	1.5	1	1.6	1

المـراجـع

الحمادى، إيمان الصادق منصور 2015. قدرة العزلات البكتيرية السائدة فى الترب الماوثة بالمشتقات النفطية على التحلل الحيوى . حوليات مشتهر للعلوم الزراعية ، مجلد 52 العدد 3 ، ص 403 _ 414

الخفاف، عبد علي ، ثعبان كاظم خضير. 2000 الطاقة وتلوث البيئة .الفصل الثاني، تلوث البيئة، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، الطبعة الأولى، عمان، الأردن، 61 صفحة.

عويد، ياسين محمد . 2008 الفعل الانفرادي والمشترك لبعض العزلات البكتيرية على التحلل الحيوي –2 لنفط خام كركوك المتوسط .مجلة علوم الرافدين . المجلد 19 : العدد 4، ص 101_115.

Alexander, M .1999. Biodegradation and bioremediation, 2nd edn. Academic Press, London .

Alexander, M. 1991. Research needs in bioremediation. Environ. Sci. Technol. 25:1972-1973.

Atlas, R. M. 1984, Petroleum Microbiology, Macmillan publishing Co., New York, USA.P:61

Atlas, R.M , Cerniglia, C.E. 1995. Bioremediation of petroleum pollutions: diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. Biological Science, 45(5) :332-338.

Atlas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbial. Rev. 45: 180-209.

Arafa, .M . 2003. Biodegradation of some aromatic hydrocarbons (BTEXs) by a bacterial consortium isolated from polluted site in Saudi Arabia. Pak. J. Biol. Sci. 6(17): 1482-1486.

Banat, I. M., Makkar, R. S, and Cameotra, S. S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53:495-508.

Banerjee, D. K., Fedora, P. M., Hashimoto, A., Masliyah, J. H., Pickard, M.A. and Gray, M. R., 1995. Monitoring the biological treatment of anthracite-contaminated soil in a rotating –drum bioreactor. Appl. Microbial. Biotechnol., 43: 521-528.

Bartha, R. 1986. Bio/Technology of petroleum pollutant biodegradation . Microb. Ecol. 12:155-172

Chaîneau, C. H., Rougeux, G., Yéprémian, C. and Oudot, J. 2005. "Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil," soil biology and biochemistry. 37: 1490–1497

Chaillan, F. , Chaîneau, C. H., Point, V., Saliot, A., and Oudot , J. 2006. "Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered soils and drill cuttings, " Environmental Pollution. 1: 255–265

Cooper, D.G, Paddock, D. A.1983 . Torulopsis petrophilum and surface activity. Appl. Environ Microbiol. 46(6) : 1426–1429.

Dibble, J.T, Bartha , R.1979.Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge .Appl.Environ.Microbiol. 37: 729-739.

Feitkenhauer,H.,Muller,R.,Markl,H.2003 Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60_70°C by *Thermus* and *Bacillus* spp.Biodegradation 14:367_372.

Fiorenza, S., Duston, K. L., & Ward, C. H. 1991. Decision making - Is bioremediation a viable option? J. of Hazardous materials, 28: 171-183

Fritsche ,W. ,Hofrichter, M. 2000 .Aerobic degradation by microorganisms ,*In* Environmental processes- Soil decontamination, J. Klein, Ed., 146–155, Wiley-VCH, Weinheim, Germany,.

Goswami,. and Singh, 1991. Biosurfactants production, applications of surfactant. science series. Biotechnol. & Bioeng. 37: 1-11.

Guerin, W.F., Boyd, S.A., 1992, Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene of two bacterial species, Appl. Environ. Microbiol. 58: 1142–1152.

Goswami, P. ,Singh, H.D. 1991. Different modes of hydrocarbons uptake by two *Pseudomonas* species. Biotech. and Bioengine, 37: 1-11

Hambrick,G.A.,De Laune,R.D,Patrick, J.R.1980.Effect of estuarine sediment pH and oxidation_reduction potential on microbial hydrocarbon degradation .Appl Environ .Microbiol 40(2):365_369.

Inakollu S., Hung H.C., and Shreve, G.S . 2004. Biosurfactant enhancement of microbial degradation of various structural classes of hydrocarbon in mixed water systems. Environ .Engin Sci 21: 463-469

Ilori, M.O., Amobi, C.J.,Odocha, A.C. 2005. Factors effecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. isolated from tropical environment. Chemosphere. 61: 985-992.

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 contaminated soil sediment and water .8(1):31-34

Juteau, P., Bisaillon, J.G., Lepine, F., Ratheau, V., Beaudet, 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. Bioremediation.14: 31-40

Karanth, N.G.K., Deo, P.G. and Veenanadig. N.K. 1999. Microbial production of biosurfactants and their importance. Current Science, 77**:**116 – 126

Leahy, J. G. and Colwell ,R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons In the environment . Microbiol .Rev. 54(3): 305-315.

Manilal, L.B. and M. Alexander, 1991. Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. Appl. Microbiol. Biotech., 35: 401-405.

Margesin, R., Schinner, F.2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. Appl . Microbiol Biotechnol . 56:650-663.

Minai-Tehrani, D., Minuoi, S., Herfatmanesh, A. 2009 .Effect of salinity on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of heavy crude oil in soil. Bull. Environ. contam. Toxicol. ;82:179–184

Mihelcic, J.R., Pritschow, A. and Lueking, D.R. 1995 Uptake of dissolved and oil phase organic chemicals by bacteria. Ground Water Monit. Rev. 15: 100–106.

Oudot, J., Merlin ,F.X. and Pinvidic, P.1998. Weathering rates of oil components in a bioremediation experiment in estuarine sediments. Mar. Environ. Res. 45: 113-125.

Okpokwasili, G.C. and Oton, N.S. 2006. Comparative applications of bioreactor and shake- flask systems in the laboratory treatment of oily sludge. Int. J. Environ w. manag. 1(1) : 49-60.

Okolo,J. C., . Amadi .E. N, and . Oduk. C. T. I, 2005. Effects of soil treatments containing poultry manure on crude oil degradation in a sandy loam soil. A ppl. Ecol. and Environ. Res. 1: 47–53.

Philips,U.A. and Traxler, R.W. 1963 . Microbial degradation of asphalt. Appl. Microbiol. 11: 235-238.

Phillips, C. 2003. Oil and Environment. crude energy. teaching guide. oil and the Environment.Hand-book of environmental fluid dymanics ,CRC Press,Ny , USA. Technol Advanced. 1-4.

Pawar, R.M. 2012.he effect of soil pH on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).Ph.D thesis .

Rahman, K.S.M., Rahman, T.J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R. & Banat, I.M. 2003. Enhanced bioremediation of n–alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients, Biores Techn. 90. 2: 159–168.

Raza, Z.A , Rehman, A. M.S., and Khalid,Z.M. 2007. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. Biodegrad, 18: 115-121.

Rhykerd, R. L. ,Weaver, R. W. (1995). Influence of salinity on bioremediation of oil in soil. Environ. Poll. 90(1): 127-130

Singh, A., Ward, O.P., 2004. Biodegradation and bioremediation, series: Soil biology, Springer-Verlag Ny.USA

Tulevaa, B., Christovaa, N., Jordanovb B., Damyanovab B.N., and Petrovc P.2005. Naphthalene degradation and biosurfactant activity by *Bacillus cereus* 28BN .z, Naturforsch . 60c:577-582.

Tang, L., Tang, X.Y., Zhu, Y.G., Zheng, M.H. and Miao,Q.L. 2005. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban soils in Beijing, China. Environ. Int. 31: 822-828.

Ward, D.M., Brock, T.D. 1978.Hydrocarbon degradation in hypersaline environments. Appl. Environ. Microbiol.35(2):353–359

Wilson, J.J., Hatcher, J.F. and Goudey, J.S. 2002. Exotoxicological endpoints for contaminated site remedation. hydroqual laboratories ltd, calgary. Ann 1st Super Sanit. 38: 143–147.

Yang, L., Lai ,C. T., and Shieh ,W. K.**.** 2000. Biodegradation of dispersed diesel fuel under high salinity conditions. Water Res. 34**:**3303-3314.

Yang, X., Erickson, L. E., ***8*** Fan, L. T. 1995. A study of aie dissolution rate-limited bioremediation of soils contaminated by residual hydrocarbons. J. Hazard Mater. 41:299-313.

Zhu, X., Venosa, A.D., Suidan, M.T. and Lee, K., 2004. Guidelines for the bioremedation of oil–contaminated salt marshes. national risk management research laboratory. office of research and development U. S. Environ Protection Agency, Cincinnati. 68: 1-57.

Factors influencing on biodegradation of oil hydrocarbons by bacterial isolates prevailing in contaminated soils

Abstract

This study was performed to assess the effect of different environmental conditions on the efficiency of the bacterial isolated forming and non-forming spores of local and prevailing in contaminated soils on utilize derivatives crude oil . Biosurfactant production by those isolates was obtained by measuring the ratio of hydrocarbons consumption . Parameters was measured at different temperatures (30, 37, 42 ˚C) , pH (6, 7, 8) and concentrations of salts (0.3 , 3, 30 %) . Optimal conditions for the consumption of hydrocarbons with nutrients was at pH 7 while at 8 the efficiency and degradation decreased . Optimum temperature was between 30˚C and 37˚C .The increase in salt decreased biodegradation at 3%, and 30% as a result of influence on solubility. The impact of those factors determined with and without added nutrients and optimum environmental conditions were at neutral pH, medium temperature, without high salts and with nutrients. Degradation increased with emulsifiers production, changes those conditions did not help the bacteria to benefit from the nutrients and showed adecline in activity and emulsion producer. It is concluded that the environmental conditions are very effective on biodegradation and removal of contaminants in the soils.