استخدام البكتريا والفطريات في تحلل الهيدروكاربونات النفطية

أمل علي حسين
قسم العلوم التطبيقية / الجامعة التكنولوجية

الخلاصة

تم عزل ثمانية عشر عزلة كانت اربع عشرة عزلة منها محللة للهيدروكاربونات النفطية ثلاث عزلات بكتيرية تعود الى Serratia marcescens , Proteus vulgaris, Acinetobacter واحدى عشر عزلة فطرية تعود الى Aspergillus flavus , Penicillium notatum,Mucor,Rhizopus, Penicillium ابدت كفاءتها في استهلاك زيت المحركات عند اضافته الى وسط الاملاح المعدنية الصلب وتبين بعد تلقيح وسط الاملاح المعدنية السائل ووقود الديزل مصدرا وحيدا للكاربون والطاقة ان البكتريا كانت الاكفأ في استهلاك وقود الديزل قياساً ببقية العزلات البكتيرية اما فطر Penicillium فكان هو الاكفأ من بقية العزلات الفطرية .ومن خلال اجراء مقارنة بين البكتريا والفطريات في استهلاكها لوقود الديزل تبين ان البكتريا كانت الاكفأ .

المقدمة

تعد الهيدروكربونات النفطية من اهم الملوثات البيئية اذ تسبب مشاكل للبيئة التي توجد فيها كونها سامة للكائنات الحية فضلا عن ان بعضها مواد مسرطنة (carcinogenic) ولها قابلية الانتقال الى السلسلة الغذائية . بدأ الاهتمام بدور الأحياء المجهرية في استهلاك وتفكيك المخلفات النفطية ومشتقاتها مع زيادة انتاج النفط الخام ،وتم عزل وتشخيص الأحياء المجهرية ذات القابلية على استهلاك أنواع مختلفة من المركبات الهيدروكربونية والتي تعود الى أنواع مختلفة وكانت أكثرها استخداماً هي البكتريا السالبة لصبغة كرام (Gram stain)ذات الأشكال العصوية والكروية (1). ومن اهمها *Pseudomonas* و*Bacillus* و *Acinetobacter* (2و3) كما تميز جنس *Serratia* بقابلية جيدة في استهلاك المركبات الهيدروكربونية النفطية وانتاج المستحلبات الحيوية (Biosurfactants)(4و5) والفطريات (6) واكثرها شيوعا الاجناس *Aspergillus* و *Penicillium* و *Verticillium* والطحالب الخضر المزرقة (7و8). ويعد جنس *Candida* من ابرز الخمائر التي لها القدرة على استهلاك المركبات الهيدروكاربونية (9).

ان الهدف من هذا البحث هو الحصول على سلالات من البكتريا والفطريات لها القابلية على استهلاك المخلفات الهيدروكاربونية واستخدامها في معالجة مياه المخلفات الصناعية الحاوية على المركبات الهيدروكاربونية وتحديد السلالة الاكفأ في استهلاك تلك المركبات واجراء مقارنة بين البكتريا والفطريات من خلال استخدام مطيافية الاشعة فوق البنفسجية UV.spectrophotometry

المواد وطرائق العمل

1- نماذج العزل

جمعت العينات من ترب معرضة لتلوث مستمر بالنفط الخام ومشتقاته ومن اماكن تواجد مولدات الطاقة الكهربائية (Generators) بالقرب من الاقسام الداخلية التابعة للجامعة التكنولوجية ومن كراجات تصليح السيارات القريبة من الجامعة في شارع الصناعة.

2- عزل وتشخيص الاحياء المجهرية المحللة للهيدروكربونات.

أ- البكتريا

تم عزل البكتريا المستهلكة للهيدروكربونات النفطية باضافة 0.5غم من التربة الملوثة بالنفط الخام ومشتقاته الى 4.5 ملليلتر ماء مقطر معقم وتم مزجها جيدا ثم اخذ بوساطة عروة ناقل معقمة ونشرت على وسط الاكار المغذي وبعدها نقلت المستعمرات النامية الى وسط الاملاح المعدنية الصلب(10و11) بعد اضافة زيت المحركات اليه بنسبة 1% (حجم/ حجم) مصدرا وحيدا للكربون والطاقة، وحضنت بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 7 ايام. ثم نقلت المستعمرات النامية على هذا الوسط وزرعت على وسط الاكار المغذي وبعدها تم انتقاء المستعمرات النامية وتكرر زرعها للحصول على مستعمرات نقية. تم تشخيص العزلات بأستخدام عدة فحوصات مظهرية وبايوكيميائية (12).وزع وسط الاملاح المعدنية السائل في دوارق سعة(250) مليلتر,وبعد تعقيمه تم اضافة وقود الديزل اليه بنسبة 1%(حجم/حجم) مصدراً وحيدا للكاربون والطاقة.لقحت الدوارق بعالق البكتريا المنشطة (1) مليلتر وبواقع مكررين لكل بكتريا مع عمل نماذج سيطرة (بدون تلقيح) وحضنت بدرجة حرارة37 مئوية لمدة 30 يوم ثم فحصت بواسطة جهاز مطيافية الاشعة فوق البنفسجية (UV-1650pc SHIMATZA) العائد لوزارة العلوم والتكنولوجيا.

ب- الفطريات

بعد عمل عالق التربة الملوثة بالنفط الخام ومشتقاته اخذ بوساطة عروة ناقل معقمة ونشرت على وسط اكار البطاطا PDA وبعدها نقل جزء من الهايفات الفطرية النامية وزرعت

على وسط الاملاح المعدنية الصلب وزيت المحركات وحضنت بدرجة حرارة 25 مئوية لمدة 7 ايام . زرعت الفطريات النقية على سطح مائل من اكار البطاطا.تم اخذ جزء من الخيوط الفطرية بوساطة عروة ناقل معقم ولقح به وسط الاملاح المعدنية السائل المضاف اليه وقود الديزل مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة وحضنت الدوارق بدرجة حرارة 25 مئوية لمدة 30 يوم ،ثم فحصت بواسطة جهاز مطيافية الاشعة فوق البنفسجية السابق الذكر.

النتائج والمناقشة

تم الحصول على ثمانية عشر عزلة بكتيرية وفطرية من نماذج التربة الملوثة بالنفط الخام ومشتقاته كانت اربع عشر عزلة منها محللة للهيدروكاربونات النفطية ثلاث عزلات بكتيرية واحدى عشر عزلة فطرية مستهلكة اياها مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة، أذ نمت هذه العزلات بشكل جيد في الوسط الملحي الصلب الحاوي على زيت المحركات كمصدر وحيد للكاربون بعد تلقيحه بعالق التربة الملوثة بالنفط الخام ومشتقاته .وقد تبين بعد فترة الحضن وجود مناطق شفافة حول بعض المستعمرات البكتيرية كما يظهر في الشكلين (2,1)ونمو الهايفات الفطرية وتغير لون الوسط مما يدل على استهلاكها للمصدر الكربوني الموجود في الوسط كما في الاشكال (5,4,3).

وقد بينت النتائج ،من خلال اجراء بعض الفحوصات البايوكيميائية ،ان العزلات البكتيرية كانت عصوية الشكل سالبة لصبغة كرام وتعود الى الانواع , *Serratia marcescens* *Proteus vulgaris, Acinetobacter* وهذا يتفق مع اكثر الباحثين في كون البكتريا السالبة هي السائدة في استهلاك الهيدروكاربونات النفطية (13).

أما العزلات الفطرية والتي تم تشخيصها في مختبرات قسم علوم الحياة – جامعة بغداد، فقد تبين انها تعود الى الانواع *Penicillium* , *Aspergillus flavus* *notatum,Mucor,Rhizopus, Penicillium* .

وقد تم مقارنة الطول الموجي للمركبات التي يحتويها نموذج السيطرة (غير الملقح بالاحياء المجهرية) مع الطول الموجي للمواد الهيدروكاربونية المتبقية بعد تنمية الاحياء المجهرية عليها والامتصاصية لكل طول موجي وتبين ان نموذج السيطرة يحتوي على ثلاث مركبات اطوالها الموجية (397.50 ,387.50, 249.50)نانوميتركما تظهرفي الشكل (6).والجدول(1) يبين قيم الامتصاص لهذه المركبات الهيدروكاربونية. وعند تلقيح وسط الاملاح المعدنية السائل بواسطة بكتريا *Proteus vulgaris* استطاعت البكتريا استهلاك كل المركبات الموجودة في نموذج السيطرة وانتجت مركبات ابسط تركيباً ذات اطوال موجية (381.00 ,224.00)نانوميتركما في

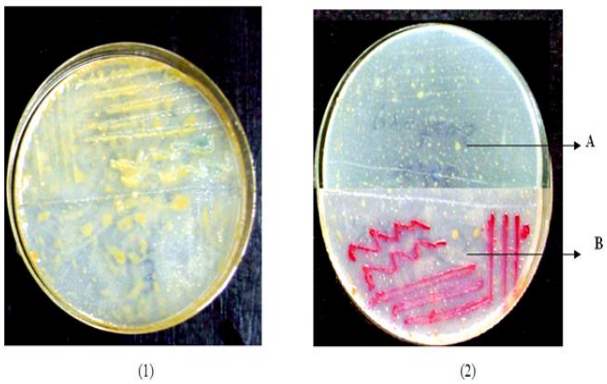
الشكل(7)والجدول (2). اما بكتريا *Serratia marcescens* فقد استهلكت المركبات الموجودة في نموذج السيطرة وانتجت مواد بسيطة التركيب اطوالها الموجية (385.50 , 233.50) نانوميتر كما في الشكل (8)والجدول(3). .بينما بكتريا *Acinetobacter* استهلكت كل المركبات الهيدروكاربونية الموجودة في نموذج السيطرة ولم تنتج اي مركب جديد كما في الشكل (9).

اما بالنسبة للفطريات فقد استطاع فطر *Penicillium* استهلاك المركبات الموجودة في نموذج السيطرة وانتج مركبات بسيطة التركيب ذات اطوال موجية (383.50 ,234.50) نانوميتر كما في الشكل(10)الجدول(4). بينما فطر *Penicillium notatum* لم يستطع استهلاك المركبات الموجودة في نموذج السيطرة واعطى نفس الاطوال الموجية (397.50 , 387.50 ,249.50) نانوميتر كما في الشكل (11)الجدول(5). فطر*Mucor* استهلك المركبات الموجودة في نموذج السيطرة وانتج مركبات بسيطة التركيب ذات اطوال موجية (386.00, 312.50, 235.00)نانوميتر كما في الشكل(12)الجدول(6). أما فطر *Aspergillus flavus* فقد استطاع استهلاك المركبات الموجودة في نموذج السيطرة وانتج مركبات ذات اطوال موجية (383.00, 236.00)نانوميتر كما في الشكل (13)والجدول(7). بينما فطر *Rhizopus* فقد استطاع استهلاك المركبات الموجودة في نموذج السيطرة وحولها الى مركبات ابسط تركيباً وذات اطوال موجية (384.00, 308.50, 231.50) نانوميتر كما في الشكل (14)والجدول(8).

الاستنتاجات

من خلال النتائج يمكن الاستنتاج بأن بكتريا *Acinetobacter* كانت الاكفأ في استهلاك المصدر الكربوني الوحيد الموجود في الوسط الزرعي مقارنة ببكتريا *Serratia marcescens* و*Proteus vulgaris* كذلك فأن بكتريا *Proteus vulgaris* كانت اكفأ من بكتريا *Serratia marcescens* في استهلاك وقود الديزل وانتاج مركبات بسيطة التركيب .

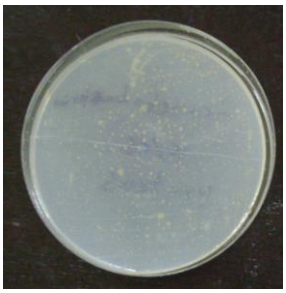
اما بالنسبة للفطريات فكان فطر *Penicillium* هو الاكفأ من بين الاجناس الاخرى في استهلاك وقود الديزل وانتاج مركبات ابسط تركيباً . كذلك و من خلال النتائج تبين بان البكتريا على العموم كانت افضل مقارنة بالفطريات في استهلاكها للمصدر الكربوني الوحيد الموجود في الوسط الملحي السائل(وقود الديزل) وانتاجها مركبات ابسط تركيباً من تلك التي انتجتها الفطريات.



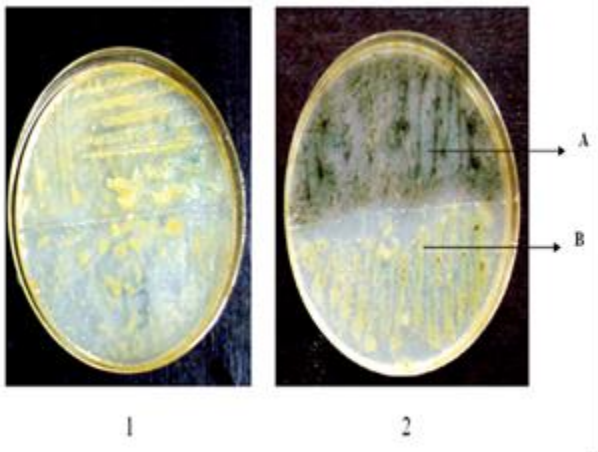
الشكل(1):1- نموذج السيطرة(وسط الاملاح المعدنية الصلب مع زيت المحركات) غير الملقح.

A- نمو بكتريا *Proteus vulgaris* على وسط الاملاح المعدنية والهيدروكاربون بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 7 ايام.

B- نمو بكتريا*Serratia marcescens* على وسط الاملاح المعدنية والهيدروكاربون بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 7 ايام.



الشكل(2): نمو بكتريا *Acinetobacter* على وسط الاملاح المعدنية والهيدروكاربون بدرجة حـــرارة 37 مئوية لمدة 7 ايام.

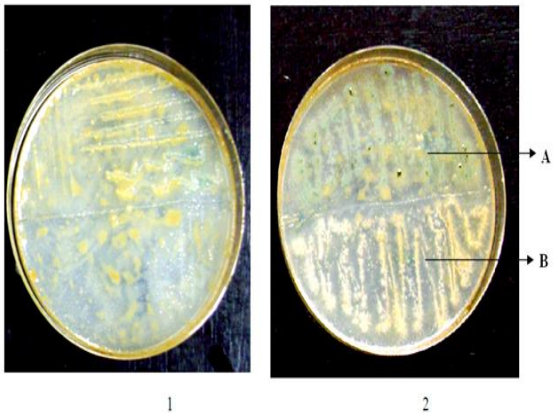


الشكل(3): نمو العزلات الفطرية على وسط الاملاح المعدنية وزيت المحركات بدرجة حرارة 25-27 مئوية لمدة 7 ايام.

1- نموذج السيطرة (غير الملقح).

2- A فطر *Penicillium*

B فطر *Penicillium notatum*

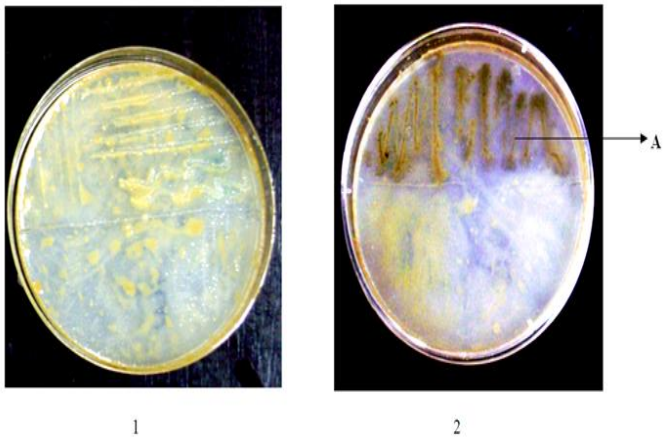


الشكل(4): نمو العزلات الفطرية على وسط الاملاح المعدنية وزيت المحركات بدرجة حرارة 25-27 مئوية لمدة 7 ايام.

1- نموذج السيطرة (غير الملقح).

2- A - فطر *Aspergillus flavus*

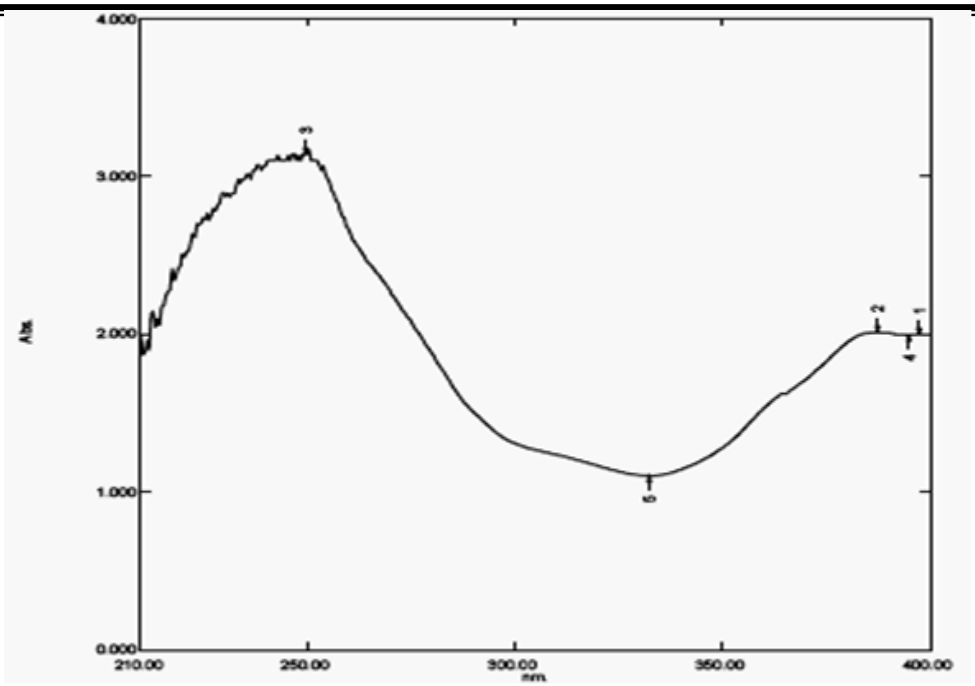
B- فطر *Mucor*



الشكل(5): نمو العزلات الفطرية على وسط الاملاح المعدنية وزيت المحركات بدرجة حرارة 25-27 مئوية لمدة 7 ايام.

1 - نموذج السيطرة (غير الملقح).

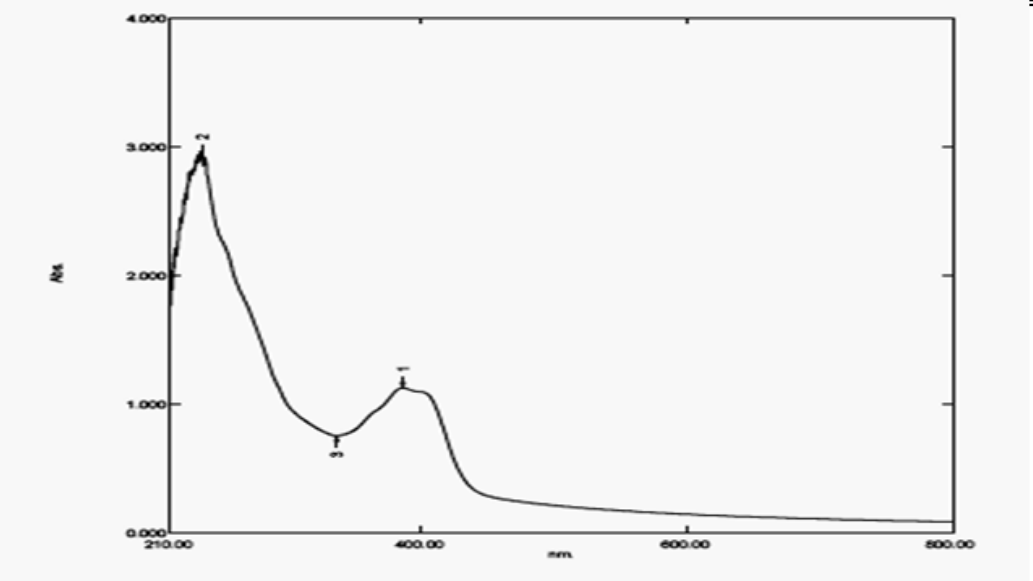
2- فطر *Rhizopus*



الشكل(6): طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لوسط الاملاح المعدنية الحاوي على المصدر الهيدروكاربوني(وقود الديزل) السائل وغير الملقح بالاحياء المجهرية بعد حضنه بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 30 يوماً(نموذج سيطرة).

الجدول(1): طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لمعدل استهلاك المصدر الهيدروكاربوني (وقود الديزل).

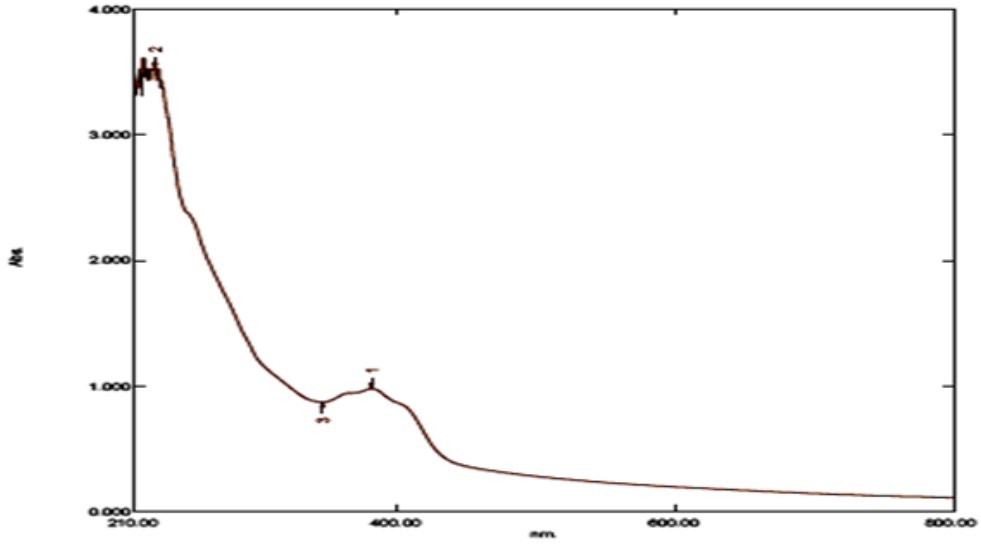
No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	397.50	1.988
2	↑	387.50	2.012
3	↑	249.50	3.134
4	↓	395.00	1.988
5	↓	332.50	1.103



الشكل(8):طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لوسط الاملاح المعدنية الحاوي على المصدر الهيدروكاربوني(وقود الديزل) السائل و الملقح ببكتريا *Serratia marcescens* بعد حضنه بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 30 يوماً.

الجدول(3): طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لمعدل استهلاك المصدر الهيدروكاربوني (وقود الديزل) الملقح ببكتريا Serratia marcescens

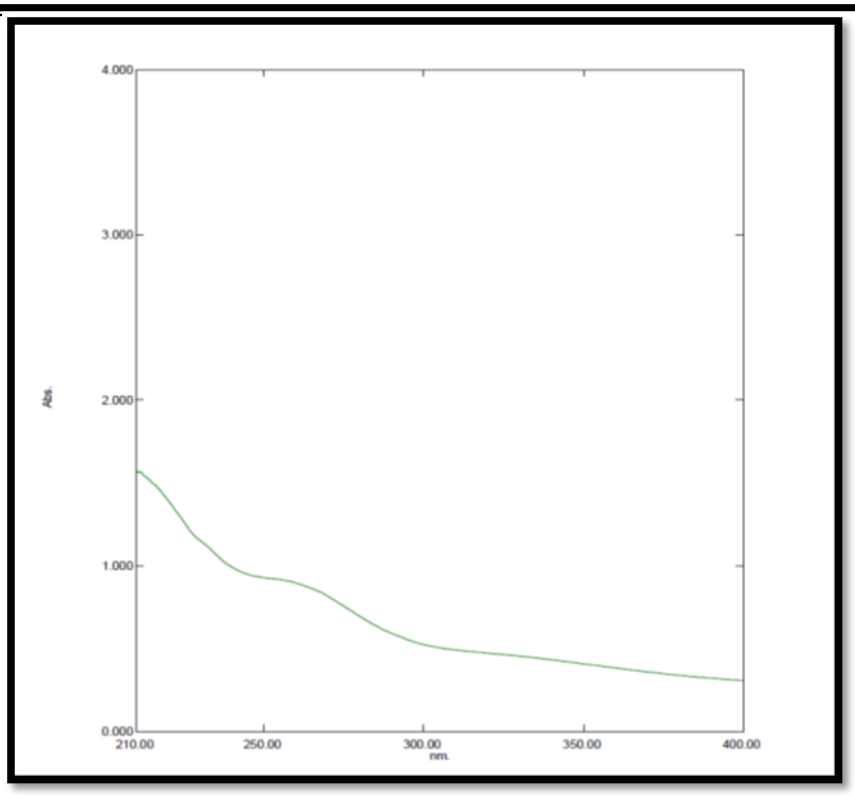
No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	385.50	1.124
2	↑	233.50	2.926
3	↓	335.50	0.753



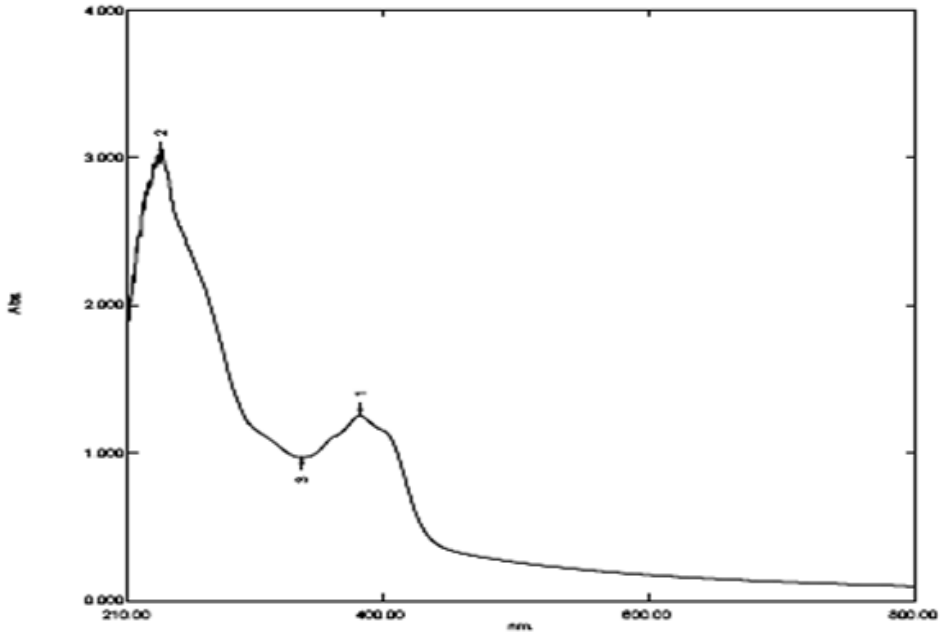
الشكل(7):طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لوسط الاملاح المعدنية الحاوي على المصدر الهيدروكاربوني(وقود الديزل) السائل و الملقح ببكتريا*Proteus vulgaris* بعد حضنه بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 30 يوماً.

الجدول(2): طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لمعدل استهلاك المصدر الهيدروكاربوني (وقود الديزل) الملقح ببكتريا *Proteus vulgaris*

No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	381.00	0.977
2	↑	224.00	3.531
3	↓	345.00	0.872



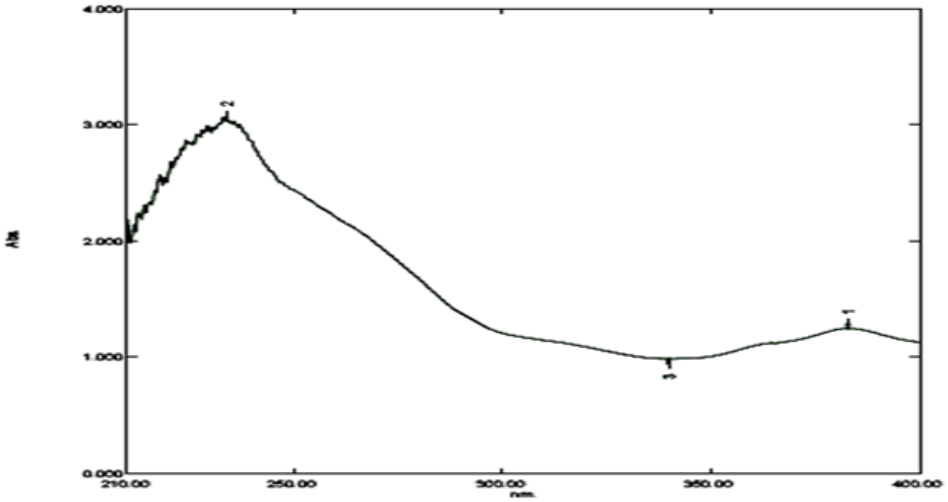
الشكل(9):طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لوسط الاملاح المعدنية الحاوي على المصدر الهيدروكاربوني(وقود الديزل) السائل و الملقح ببكتريا*Acinetobacter* بعد حضنه بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 30 يوماً.



الشكل(10):طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لوسط الاملاح المعدنية الحاوي على المصدر الهيدروكاربوني(وقود الديزل) السائل و الملقح بفطر *Penicillium*بعد حضنه بدرجة حرارة 25-27 مئوية لمدة 30 يوماً.

الجدول(4): طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لمعدل استهلاك المصدر الهيدروكاربوني (وقود الديزل) الملقح بفطر *Penicillium*

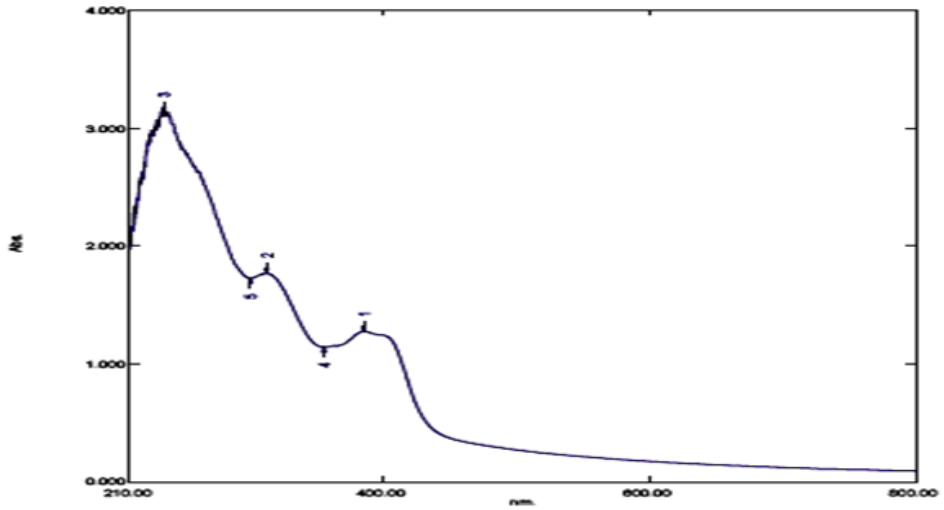
No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	383.50	1.252
2	↑	234.50	3.016
3	↓	340.00	0.970



الشكل(11):طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لوسط الاملاح المعدنية الحاوي على المصدر الهيدروكاربوني(وقود الديزل) السائل و الملقح بفطر *Pencillium notatam* بعد حضنه بدرجة حرارة 27–25 مئوية لمدة 30 يوماً.

الجدول(5): طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لمعدل استهلاك المصدر الهيدروكاربوني (وقود الديزل) الملقح بفطر *Pencillium notatam*

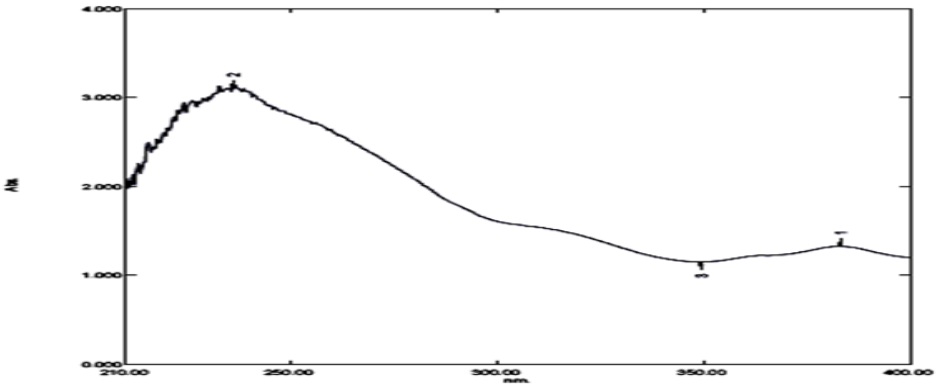
No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	397.50	1.999
2	↑	387.50	2.012
3	↑	249.50	3.134
4	↓	395.00	1.998
5	↓	332.50	1.103



الشكل(12):طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لوسط الاملاح المعدنية الحاوي على المصدر الهيدروكاربوني(وقود الديزل) السائل و الملقح بفطر *Mucor* بعد حضنه بدرجة حرارة 25-27 مئوية لمدة 30 يوماً.

الجدول(6): طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لمعدل استهلاك المصدر الهيدروكاربوني (وقود الديزل) الملقح بفطر *Mucor*

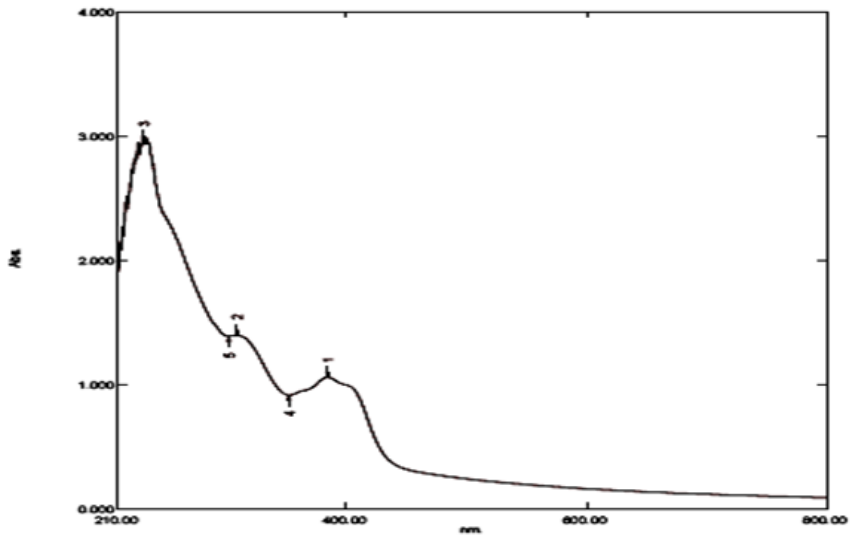
No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	386.00	1.276
2	↑	312.50	1.767
3	↑	235.00	3.133
4	↓	355.50	1.142
5	↓	300.50	1.729



الشكل(13):طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لوسط الاملاح المعدنية الحاوي على المصدر الهيدروكاربوني(وقود الديزل) السائل و الملقح *بفطر Aspergillus flavus* بعد حضنه بدرجة حرارة 25-27 مئوية لمدة 30 يوماً.

الجدول(7): طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لمعدل استهلاك المصدر الهيدروكاربوني (وقود الديزل) الملقح بفطر *Aspergillus flavus*

No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	383.00	1.328
2	↑	236.00	3.109
3	↓	349.50	1.154



الشكل(14):طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لوسط الاملاح المعدنية الحاوي على المصدر الهيدروكاربوني(وقود الديزل) السائل و الملقح بفطر Rhizopusبعد حضنه بدرجة حرارة 25-27 مئوية لمدة 30 يوماً.

الجدول(8): طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لمعدل استهلاك المصدر الهيدروكاربوني (وقود الديزل) الملقح بفطر Rhizopus

No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	↑	384.00	1.058
2	↑	308.50	1.395
3	↑	231.50	2.963
4	↓	352.50	0.916
5	↓	302.00	1.391

References المصادر

1.Boulton, C.A. and Ratledge, C. (1984). The physiology of hydrocarbon-utilizing microorganisms. In "Topics in enzyme and fermentation biotechnology". New York, P:11-77

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

3.Austin,B. ; Calomiris,J.J. ; Walker,J.D. & Colwell,R.R. (1977) . Numerical taxonomy and ecology of Petroleum - Degrading Bacteria

4.Herman, D.C; Lenhard, R.J. and Miller, R.M. (1997). Formation and removal of Hydrocarbon residual in porous media effect of attached bacteria and biosurfactant. Environ. Sci. Technol. 31: 1290 – 1294

5.العبيدي، امل علي (2005). العوامل المؤثرة في التحلل الحيوي لمياه مخلفات وحدة المعالجة في مصفى الدورة – بغداد.رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد.

6.الدوسري ، مصطفى عبد الوهاب نجم (1998) .قابلية بعض الفطريات المعزولة من رسوبيات شط العرب وشمال غرب الخليج العربي على تكسير المركبات الهيدروكاربونية الاروماتية المتعددة النوى .رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة البصرة

7.العبيدي ، اياد محمدعلي فاضل (1990).تأثير النفط الخام على بعض الفعاليات الفسلجية للسيانوبكتريا المكونة للحويصلات المغايرة واثره على نمو وانبات الرز.رسالة ماجستير. كلية العلوم . جامعة بغداد

8 .الموسوي ، سمية عبد الرزاق علي (1999) .قابلية الطحالب الخضر المزرقة (للسيانوبكتريا) على تكسير بعض مركبات النفط الخام مع دراسة بعض التغيرات الحاصلة لها بتأثير النفط . رسالة ماجستير . كلية التربية . جامعة البصرة .

9.Vrdoljak,M.M. ; Marinkovic,G. ; Pavusek,I. & Johanides,V. (1992) . Periodicum Biologorum 94(3) : 169 - 177

10.Herman,D.C. ; Lenhard,R.J. & Miller,R.M. (1997) . Formation and removal of hydrocarbon residual in porous media :effect of attached Environ. Sci. Technol. 31 : 1290-1294 .

11 . Walker, J.D. and R.R.Colwell.(1974). Microbial petroleum degradation : use of mixed hydrocarbon substrates. Appl. Microbiol. 27(6) : 1053-1060.

12. Macfaddin,J.F. (2000) . Biochemical tests for identification of medical bacteria .(3rd) ed., M.G.Lawrence (ed.). Lippincott & Williams, NewYork.

13.Okerentugba, P.O. and Ezeronye,O.U. (2003). Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. African J. Biotechnology. 2(9): 288 - 292.

Using Bacteria and Fungi to degradate Petroleum Hydrocarbons.

Amal Ali Hussien

Biotechnology branche-Deparatment of Applied Sciences, University of Technology

Abstract

In this work eighteen strains, have been isolated and been used to degredate the diesel oil. It have been found that only fourteen of them, three kinds of bacteria refers to species and eleven kinds of fungi have the efficiency to degredate the petroleum hydrocarbons when added to mineral salt agar medium. It is also found that , bacteria Acinetobacter more efficient when inoculate the liquid mineral salts medium, while Penicillium has more efficiency than other kinds of fungi strains. In general , it is found that bacteria is better than fungi to degradate petroleum hydrocarbons.