Journal of Environmental Studies [JES] 2013. 11: 59-61
Original Paper

إنتاج المستحلبات الحياتية من قبل عزلات بكتيرية محلية لتفكيك المركبات الهيدروكاربونية

إيمان هندي كاطع، سعد حسين خضير العبيدي، صلاح هادي خلف ونبراس محمد زيارة
دائرة بحوث البيئة والمياه، وزارة العلوم والتكنولوجيا_بغداد، العراق.

استلام: ٥ يناير، ٢٠١٢ قبول: ٢١ فبراير ٢٠١٢

الخـــلاصة
يهدف البحث إلى الحصول على عزلات بكتيرية محلية منتجة للمستحلبات الحياتية وكفؤة في تفكيك المركبات الهيدروكاربونية غير الذائبة في الماء لغرض تحويلها إلى مواد صديقة للبيئة وإزالة سميتها حيث تم عزل تسع عزلات بكتيرية من نماذج مختلفة لترب ملوثة بالمشتقات النفطية من مناطق متفرقة ,حيث زرعت نماذج التربة على وسط زرعي خاص مضافا إليه المصدر الكربوني (سايكلوهكسان) هيدروكربون حلقي .أعطت العزلات (SD1, SG3, SD4, SB2) أعلى تشتت للوسط ألزرعي، وعليه تم اختيارها للقياسات اللاحقة تم اختيار كفاءة العزلات على أساس النمو بدلالة الامتصاصية على طول موجي 600 nm ,وقياس الشد السطحي لفترات حضن تتراوح بين (١٢-٧٢) ساعة. حيث لوحظ أن أفضل عزلة هي SD4 والتي أثبتت الفحوصات أنها عصيات سالبة لصبغة كرام.

الكلمات المفتاحية: البكتريا، الهيدروكربونات، تلوث المياه، المستحلبات.

المقــدمة:

إن عملية تفكيك الهيدروكاربونات بواسطة الأحياء المجهرية غالبا ما تكون مصحوبة بإفراز مواد مستحلبة ذات نشاط على مستوى الشد السطحي إلى البيئة أو الوسط الغذائي، وبصورة عامة يكون إنتاج هذه المواد مستحث باستخدام الالكانات كمصدر كربوني، (Abbas, *et al.*, 2000) حيث استخدمت العديد من الهيدروكربونات كمادة أساس لتشجيع إنتاج المستحلبات الحياتية ميكروبيا إذ أشارت معظم البحوث المتعلقة بإنتاج هذه المواد إلى العلاقة الوثيقة بينها وبين تمثيل الالكانات بواسطة الخمائر والبكتريا والتي يبدو إن تأثيرها الفسلجي لم يحدد تفصيليا. (Shafeeq, *et al.*, 1989; Naim Kosaric, 2001).

يعرف المستحلب بأنه نظام متكون من نوعين من السوائل غير المتجانسة احدهما ينتشر عبر الأخر بشكل قطيرات صغيرة جدا، (Cerniglia, 1992) أما المواد المستحلبة فهي مواد ذات فعالية على مستوى الشد السطحي لها القابلية على زيادة المساحة السطحية المتاحة للأحياء المجهرية والقدرة على خفض الشد السطحي والبيني والتي سوف تؤدي إلى تسهيل انتقال الهيدروكاربونات إلى داخل الخلية وبالتالي تحفيز أكثر لنمو الأحياء المجهرية (ألعبيدي وأخرون ٢٠٠١، Volkering, 1996).

المـواد وطـرائق العمل:

☼ **. النماذج:**

تم اخذ عينات من التربة من مناطق مختلفة من مواقف المركبات ومن مصفى الدورة وأعطيت الأرقام التالية:

١. النموذج الأول (Sample1) من مصفى الدورة (SD).

٢. النموذج الثاني (Sample2) من موقف المركبات في منطقة جسر ديالى (SG).

٣. النموذج الثالث(Sample3) من موقف المركبات في منطقة بغداد الجديدة.(SB).

هذه النماذج ملوثة بالنفط ومشتقاته بحكم المكان الذي أخذت منه. تم أجراء عدة عمليات على هذه النماذج للحصول على البكتريا المطلوبة.

١. وسط العزل:

Mineral Salt medium (M .S. M.)

NH_2NO_3 (4gm), $MgSO_4.7H_2O$ (0.2gm), $CaCL_2$. 2H2O (0.01 gm) Yeast Extract (0.1 gm) D.W (1 L) pH 7.0±0.2

٢. وسط التنقية: يضاف المصدر الكاربوني ١ بنسبة١.٠ بعد قياس .PH

L – Agar

Tryptone (10gm), Yeast extract (5gm), Glucose (1gm), Agar (20gm), Nacl (1gm).

١- حضر وسط الأملاح المعدنية وعقم في دوارق سعة كل منها (250ml) ،ثم أضيفت له مادة السايكلوهكسان وتلقيح هذه دوارق بالنماذج المأخوذة من المناطق المختارة وبمعدل ٣ مكررات لكل نموذج.

٢- تم حضن دوارق بحاضنة هزازة بدرجة حرارة c٥٣٠ وبسرعة ١٥٠ دورة في الدقيقة ولمدة تتراوح من ٢٤-٧٢ ساعة لحين ظهور النمو وحصول تحلل في الوسط ألزرعي.

٣- بعد ذلك أخذ النمو ألزرعي ولقح في وسط زرعي صلب لغرض الحصول على عزلات متعددة ومن ثم تنقيتها.

٤. استخدام نفس الوسط السابق M. S. M. بإضافة السايكلوهكسان إلى الوسط بعد التعقيم وزرع النماذج بنفس الطريقة السابقة وبنفس الظروف البيئية السابقة.

٥. تم حضن الوسط ألزرعي في ظروف الحضن المثالية 30 c٥ لمدة ٤٨ ساعة لحين الحصول على نمو زرعي.

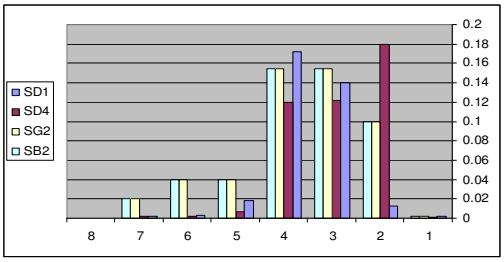
٦. تمت مراقبة النمو والتغير في الوسط ألزرعي من خلال ملاحظة حدوث ظاهرة التشتت (Hamza, *et al*., 1994).
٧. اختيرت أربعة عزلات لإكمال التجارب المتبقية.
٨. حضر وسط العزل مرة أخرى و بإضافة السايكوهكسان بعد التعقيم وتلقيحه بالبكتريا النامية على أطباق العزل النقية وبمعدل مكررين لكل عزلة في دوارق سعة ٢٥٠ ملليلتر وحضنها بحاضنة هزازة بسرعة ١٥٠ دورة في الدقيقة وبدرجة حرارة 30c° ولمدة ٧٢ ساعة.
٩. قياس النمو ألزرعي في الدوارق بواسطة جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer بمعدل مرتين يوميا وذلك لملاحظة التغير في نمو كل عزلة بكتيرية ورسم منحنى لنمو لها.
١٠. تم قياس الشد السطحي لكل وسط زرعي لفترات حضن ١٢-٧٢ ساعة كدليل على إنتاج المستحلب الحياتي.

النتـــائج والمنـــاقـشة:

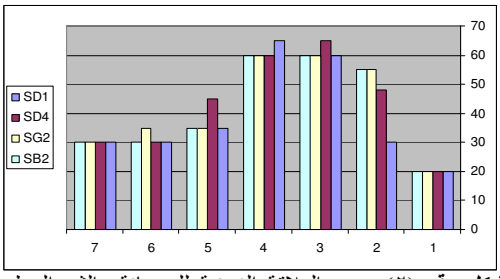
بينت النتائج تواجد البكتريا بصورة واضحة في المناطق الملوثة بالمشتقات النفطية. حيث عزلت تسع عزلات بكتيرية من النماذج المختارة SD,SG,SB والتي جلبت من موقف مركبات مختلفة إضافة إلى نموذج تربة من مصفى الدورة.
بعد تنقية العزلات تم اختبارها كل على حده في استهلاك المصدر الهيدروكربوني (السايكلوهكسان) بطريقة قياس التشتت.أظهرت النتائج (جدول ١) تفوق العزلات الأربعة SB2,SD1,SD4,SG3 بعد ٤٨ ساعة من النمو ،تترافق عملية تفكيك الهيدروكاربون عادة بإنتاج المستحلب الحياتي مما يسهل عملية تفكيكه (*et al*., 1997; Lang, *et al*.,) Rogier Meulenberg 1987). تعمل البكتريا على تكسير جزيئات الهيدروكربوني مما يسبب مزجه مع الوسط ألزرعي ويظهر بشكل مشتت، والناتجة عن ظاهرة الاستحلاب الحياتي المكون من الهيدروكاربون والسائل المحيط به والمستحلب الحياتي ،معظم المستحلبات الحياتية معقدات لبيدية ذات وزن جزيئي عالي يتحفز إنتاجه من قبل البكتريا بتواجد المركبات الهيدروكاربونية غير الذائبة في الماء(Volkering, 1996) .
أشارت النتائج إلى أن العزلة SD4 هي الأكفأ في التفكيك من خلال تسارع النمو حيث بلغ ٠.١٨ خلال ١٢ ساعة من النمو (شكل ١) مع زيادة في الشد السطحي بمقدار 68 mn\Diene.أما العزلات الثلاث الأخرى SD1, SG3, SB2قد اختلفت قدرتها على خفض الشد السطحي وسرعة النمو (شكل)٢.لكن بصورة عامة فقد كان أحسن نمو لها بعد 36 ساعة ورافقه انخفاض بالشد السطحي وصل إلى 65 mn\Diene.فحصت العزلة SD4 تحت المجهر حيث تبين أنها عصيات سالبة لصبغة كرام.

التشتت	العزلات
+ + +	S D 1
+	S D 2
+ +	S D 3
+ + + +	S D 4
+ +	S G 1
+	S G 2
+ + +	S G 3
+ +	S B 1
+ + +	S B 2

جدول رقم (١): يبين مقدار التشتت للوسط ألزرعي بعد نمو العزلات لمدة ٤٨ ساعة بدرجة حرارة ٣٠ مئوية.



شكل رقم (١) : يبين علاقة الفترة الزمنية للحضانة والامتصاصية) (المحور السيني يمثل الوقت /ساعة، والمحور الصادي يمثل الامتصاصية).



شكل رقم (٢): يبين العلاقة الزمنية للحضانة والشد السطحي (المحور السيني يمثل الزمن /ساعة، والمحور الصادي يمثل الشد السطحي).

المصادر:

ألعبيدي، سعد حسين خضير، صلاح هادي خلف، هديل قيس حسن، سحر ضمد كاظم، إيمان هندي كاطع وعلاء شريف عباس (٢٠٠١). تصميم منظومة مختبريه للمعالجة البيولوجية للمياه الملوثة بالمخلفات الهيدروكاربونية. مجلة جامعة صدام، مجلد ٥، العدد١، ص:١-١٢.

Abbas, A.S., Al-Khazaly, E.H., Ali, N.A.H. and Rasheed, H.R. (2000). Characterization of *Pseudomonas* local isolates, degrading hydrocarbons, producing bioemulsifiers. 1st. National conference about pollutions and

Kosaric, N., Cairs, W.L., Gray, N.C.C. Biosufactants and Biotechnology, Marcel Dekker, New York (1987).

Rogier Meulenberg, Huub H.M. Rijnaarts, Hans, J. Doddema, Jim, A. Field, (1997). (Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability) FEMS Microbiology Letters 152 pp. 45 -49.

Lang, S. Wagner, F. In: Biosurfactants and biotechnology,n. Kosaric *et al.*, (Eds.), Marcel Dekker, New York (1987). pp. 21 – 45.

Volkering, F. (1996). Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Ph.D. Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen.

means of protection. Baghdad 5-6th. Nov., P. 1-9.

Cerniglia, C.E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodergradtion 3, 351 – 368.

Hamza, S.J., Abbas, A.S. and Halob, A.A. (1994). Production of surface active lipids
by *Saccharomyces uvarum* grown on decane. J. Islamic Academy Sci. 7: 13-19

Shafeeq, M., Kokub, D., Khalid, Z.M., Khan, A.M., Malik, K.A., *MIRCEN J.* Appl. Microbiol. Biotech. 5 (1989). 505-510.

Naim Kosaric (2001). Biosufactants and their application for soil bioremediation university of western Ontario, Canda pp: 1 – 10.

Abstract

Production of bio-emulsifier using hydrocarbon degrading local bacterial isolates

Iman H. Qatia & Saad H. AL-Obaidy, Salah KH. A-zuhairy and Nibras M. ziara.

Ministry of science &technology –Iraq.

The goal of this research is to obtain local bacterial isolates producing bioemulsifiere and have the ability to degrade insoluble hydrocarbons, which must be treated and detoxified. Nine bacterial strains were isolated from different soils contaminated with oil derivatives after culturing soil sample on special medium that contain of cyclohexane as hydrocarbon source. The isolates SD1, SD4, SG3 and SB2 showed an obvious dispersion of oil. Selected isolates were tested with Spectrophotometer at 660nm to determine growth of selected isolates as well as there efficiency to increase surface tension of the medium after (12-72 h). Result showed that the isolate SD4 has high ability to produce emulsifier and growing with insoluble hydrocarbon. Result show that all isolates belong *to pseudomonas aeruginosa species.*