دراسة تأثير بكتريا Streptomyces على مكونات النفط الخام

نزار أدور ناصر ، قسم علوم الحياة – كلية العلوم – الجامعة المستنصرية

المقدمـــة

تتصف الاحياء المجهرية المختلفة بتنوع فعالياتها الحيوية وبعضها تعتبر صفات تشخيصية لتلك الكائنات المجهرية , وقد درس الانسان هذه الفعاليات وحاول أن يستفاد منها في حياته اليومية في مجال البيئة والصحة والصناعة والزراعة وغيرها احدى هذه المجالات هي مشاكل التلوث البيئي بانواعه الحيوي والكيمياوي والفيزيائي و كيفية تسخير فعاليات الاحياء المجهرية في معالجاتها .

احد انواع التلوث البيئي هو التلوث بالنفط الخام او احد مشتقاته , وقد لاحظ الباحثين قدرة بعض اجناس الاحياء المجهرية في تحليل المركبات الهيدروكربونية المكونة للنفط الخام وذلك كمصادر للكربون و الطاقة لنموها , والتي ينتج عنها مكونات بسيطة غير مؤثرة على البيئة , اولى هذه الدراسات اجريت من قبل (Al-Haidary, 1977) عندما لاحظ تحلل طبقة رقيقة من البارافين . بعده توالت الدراسات حول هذا الموضوع مثل (Wilhelms *et al.* 2001 ; Larter *et al.* 2003 ; Chaillan *et al.* 2004 ; Das and Mukherjee 2007) , حيـــث وجدوا أن للاحياء المجهرية القدرة على تحليل المركبات الهيدروكربونية , وفي نفس الوقت تكوين مركبات أخرى جديدة .

* GC : Gas Chromatography .

الخلاصة

استخدمت في هذه الدراسة عشرة عزلات بكتيرية من الجنس *Streptomyces* sp. حيث تم تنشيطها مختبريا على الوسط الزرعي كاوزا رقم / 1 , ثم نميت تلك العزلات على وسط زرعي مضافا اليه كمية من النفط الخام , حفظت في الحاضنة الهزازة في 28 مº م ولمدة 14 يوما , بعدها تم تحليل للمكونات المتبقية في الوسط الزرعي , وبالمقارنة مع عينة السيطرة باتباع طريقة الكروماتوكرافي الغازية , أظهرت هذه العزلات تباينا في أستهلاكها لمكونات النفط الخام بعمليات التحلل الحيوي أو بتكوين مركبات حيوية جديدة .

ABSTRACT

Ten bacterial isolates of the genus *Streptomyces* sp. , were reactiva- ted using Gauza no.1 medium , and grown on crude oil medium ,incubated at 28^0C for 14 days in a shaker incubator . Analysis of the remaining crude oil contents by these isolates in comparison with control sample by GC* , had shown differences in their ability to consume the components of crude oil as a result of biodegredation or biosythesis of new compounds .

بعدها تم مقارنة نتائج نمو العزلات من خلال تقدير درجة تعكر الوسط نسبة الى نموذج السيطرة , ثم تم استخلاص مكونات النفط الخام المتبقية في الوسط الزرعي باستخدام قمع الفصل وبواسطة مذيب ثنائي (بنزين- ايثانول 1 : 1) ثم تحليلها مع نموذج السيطرة بواسطة تقنية الاستشراب الغازي (GC) نوع (Shimadzu GC – 7A) والعمود الحاوي على 5% SE(3.1cm× 3.2m) ودرجة حرارة الحقن 300 مº فيما كانت درجة حرارة العمود 80 مº مبرمجة في معدل 4 مº / دقيقة . الغاز الحامل – النيتروجين (0.6 kg / cm) ومعدل الانسياب 30 مل/ دقيقة , المكشاف FID ونوع الحاسوب (Shimadzu – SR – 3A Chrompack) .

النتائج و المناقشة

تباينت معدلات نمو عزلات البكتريا على الوسط الزرعي الحاوي في مكوناته على النفط الخام (جدول رقم /1) حيث أن العزلات (2 و 3 و 4 و 9) كان نموها ضعيفا , تليها العزلات (1 و 5 و 6) بنمو جيد , ثم العزلات (7 و 8 و 10) حيث كان النمو جيد جدا , وهو دلالة على قدرة هذه العزلات باستهلاك مكونات الوسط وبضمنها مكونات النفط الخام عند مقارنتها بعينة السيطرة , وهو مطابق مع العديد من الباحثين اللذين أشاروا الى هذه الظاهرة مثل (Head *et al.*, ; Larter *et al.* , 2005) 2003).

تم تحليل متبقي النفط في الوسط الزرعي بعد تنمية العزلات المدروسة , وظهر تباينا واضحا في قدرتها على استهلاكه من خلال تركيز المواد الهيدروكربونية المشبعة حيث تراجعت تراكيزها في حالة العزلات (1 و 5 و 6 و 7 و 8 و 10) في

المواد المستعملة وطرائق العمل

نشطت عشرة عزلات من بكتريا sp. *Streptomyces* تم تجهيزها من مختبرات الدراسات العليا في قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة صلاح الدين على وسط كاوزا رقم /1 وحفظت في 28 مº ولمدة اسبوعين , ثم تم تلقح الوسط الزرعي Basal mineral salt agar (ناصر 1989) المضاف له النفط الخام المجهز من حقول نفط المنطقة الشمالية في العراق بمقدار 0,2 مل/100 مل في دوارق سعة كل منها 250 مل حسب طريقة (Pridham and Gottlieb, 1948) , بعدد مكافئ ماكفرلاند (1,5 × 10^8 ml/cfu((Baron and Finegold,1994) من مزارع فتية للعزلات قيد الدراسة و لكل دورق .

مكافئ ماكفرلاند القياسي يستخدم لتقدير اعداد البكتريا او تراكيزها , وتم تحضيره كما يأتي :

محلول رقم / 1 : باذابة (1,175 غم) من كلوريد الباريوم في (100 مل) من الماء المقطر .

محلول رقم / 2 : باضافة (1 مل) من حامض الكبريتيك المركز الى (100 مل) من الماء المقطر .

أضيف مقدار (0,5 مل) من محلول رقم (1) الى (99,5 مل) من محلول رقم (2) ومزج الخليط ثم حفظ في انابيب اختبار معقمة و محكمة الغلق في الظلام لحين الاستخدام لمعايرة عدد خلايا البكتريا والذي يعادل (1,5 × 10 ^{8} خلية/ مل) حيث يعطي طيف امتصاص (0,2 نانوميتر) عند قياسه بجهاز المطياف الضوئي على طول موجي (600 نانوميتر) . وقد تم تحضير عينة السيطرة وهي عبارة عن وسط غير ملقح بالبكتريا قيد الدراسة ومضافا اليه النفط الخام . وضعت الدوارق في الحاضنة الهزازة بسرعة (250 rpm)وبدرجة حرارة 28 مº ولمدة اسبوعين.

في حين أظهرت عزلات أخرى قابلية على التحليل الجزئي للمركبات الهيدروكربونية وذلك من خلال النقص الحاصل في مساحة القمم مقارنة مع عينة السيطرة . اما الزيادة الحاصلة في مساحة القمم فهو دليل على حصول تحول لبعض المركبات من شكل الى شكل آخر موجود أساسا في النفط الخام وكما هو ظاهر في عينة السيطرة حيث تتكون مركبات جديدة لها نفس زمن ا لاحتباس كما في عينة السيطرة . وقد وجد أن العزلات (2 و 3 و 4 و 9) هي الأكثر تأثيرا على مكونات النفط الخام .

دراسات لباحثين آخرين مثل (Larter *et al.*, 2006 , Das and Mukherjee, 2007 ; Adebusoye *et al.*, 2007 ; Brooijmans *et al.*, 2009) أستخدم فيها احياء مجهرية من اجناس أخرى كانت نتائجهم مقاربة جدا لنتائج هذه الدراسة التي استخدم فيها بكتريا الجنس *Streptomyces* sp. وهي التي أظهرت القدرة الواسعة في تحليل مكونات النفط الخام وامكانية استخدامها في مجال معالجة تلوث ا لبيئة بالنفط الخام الذي يحتوي عادة على الهيدروكربونات المشبعة واخرى أروماتية والتي تقبل التأكسد بدرجات متفاوتة بفعل انواع مختلفة من الاحياء المجهرية والتي تتصف بانتاجها للانزيمات المناسبة لهذه المركبات , حيث أشار (Head *et al.*, 2003) الى تكون مركبات عرضية خلال عمليات التأكسد هذه والتي تتضمن نواتج من الكينات وكحولات اولية وثانوية وكحولات ذات سلاسل متفرعة وحوامض دهنية ومركبات كيتونية و غيرها , وقد أكد (Larter *et al.* , 2005) على أن للاحياء المجهرية دور في زيادة نسبة الاسفلتينات في متبقي النفط الخام مقارنة مع البارافينات وقد تطابقت هذه النتائج مع (Tapilato *et al.* 2009) .

حين اظهرت العزلات (2 و 3 و 4 و 9) زيادة في ذلك مقارنة مع السيطرة .

من ناحية اخرى نجد أ ن في العزلات (1 و 5 و 6 و 7 و 8 و 10) أظهرت زيادة في نسبة تركيز الهيدروكربونات الاروماتية , بالمقابل انخفضت تراكيزها في العزلات (2 و 3 و 4 و 9) مقارنة مع عينة السيطرة (جدول رقم / 2) .

قيست مساحة القمم (Peaks area) بطريقة الكر وماتوكرافي الغازية لكل نموذج ولجميع العزلات , ثم تم مقارنتها مع مساحة قمم عينة السيطرة (control) كما موضح في جدول رقم /3 , حيث وجد أن بعض من مساحات القمم قد تقلصت عن مساحة القمم لنفس زمن الاحتباس (Retention time) أو ربما حصل فيها زيادة مقارنة مع عينة السيطرة .

وفي تحليل لنتائج احدى حالات قيد الدراسة , مثال مساحة القمم عند زمن الاحتباس 35,8 دقيقة تساوي 207,4 ملم^2 لعينة السيطرة , نجد أن مساحة القمم في العزلات (2 و 3 و 4 و 9) قد انخفضت وهي على التوالي (صفر و صفر و 29.8 و صفر) ملم^2 . بينما ازدادت مساحة القمم في العزلات (1 و 5 و 6 و 7 و 8 و 10) وهي على التوالي (231.5, و 264.1 و 244.9 و 263.5 و 240.9 و 245) ملم^2 كما لوحظ اختفاء بعض القمم كما هو حاصل في زمن الاحتباس 46,8 دقيقة حيث وجد أن الاختفاء كان في نماذج العزلات (1 و 6 و 7 و 9) .

وفي حالة نماذج العزلة رقم (9) نجد أن الاختفاء الكامل لمساحة القمم كان في أزمان الاحتباس (32 و 35,8 و 40,9 و 46,8 و 51,7) دقيقة .

بعض العزلات أظهرت القدرة على التحليل التام من خلال اختفاء القمم والتي تعني تحلل كامل للمركبات الهيدروكربونية الى مكوناتها الاولية وهي الماء وغاز ثاني اوكسيد الكربون .

جدول رقم / 1

معدلات نمو عزلات قيد الدراسة على الوسط الزرعي الحاوي على النفط الخام :

رقم العزلة	عينة السيطرة	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
درجة العكورة	-*	++	+	+	+	++	++	+++	+++	+	+++

* - : الوسط خالي من العكورة
+ : عكورة الوسط قليلة
++: عكورة الوسط متوسطة
+++: عكورة الوسط عالية

جدول رقم / 2

النسب المئوية للمركبات الهيدروكربونية المشبعة و الاروماتية المتبقية في الوسط الزرعي بعد نمو العزلات قيد الدراسة عليها :

رقم العزلة	% للهيدروكربونات المشبعة	% للهيدروكربونات الاروماتية
عينة السيطرة	73,5	26,5
1	70,5	29,5
2	87,4	12,6
3	82,7	17,3
4	79	21
5	68,6	31,4
6	70,3	29,7
7	61,5	38,5
8	54,3	45,7
9	76,2	23,8
10	58,1	41,9

جدول رقم / 3

مساحة القمم مقابل زمن احتباس القمم لنموذج السيطرة والعزلات المدروسة :
(مساحة القمم : ملم^2)

زمن الاحتباس (دقيقة)	2,31	26,9	32	35,8	40,9	46,8	51,7	59,1
عينة السيطرة	1423,5	109,3	264,4	207,4	188,9	150	118,7	88,3
ارقام العزلات:								
1	8857	101,2	267,1	231,5	175,2	-	114	94,6
2	1234,5	23,3	98,1	-	104,1	72,2	54,1	22
3	1244,3	20,9	101,5	-	-	86,4	-	19,2
4	8523,1	24,1	89,4	29,8	-	69,5	-	-
5	6565,1	169,7	273,5	264,1	149,1	146,2	122,4	78,7
6	2319,2	125,2	277,1	244,9	158,8	-	207,1	86,5
7	3511	188,5	268,2	263,5	172,2	-	184,4	81,8
8	4210,1	165,1	270,9	240,9	180,4	128,2	138,7	85,4
9	4798,2	21,7	-	-	-	-	-	16,8
10	5771	172,5	268,8	245	173,2	131,9	154,1	89,9

المصـــــــادر

1 – نـاصر, هادي أمين , (1989) : مسح ودراسة خواص البكتريا *Streptomyces* المعزولة من تـرب المحافظات الشمالية في العراق , رسالة ماجستير مقدمة الى كلية العلوم – جامعة صلاح الدين , ص. 25 , 38 .

2- Adebusoye , S.A. ; M.O. Ilori ; O.O. Amund ; O.D. Teniola and S.O. Olatope (2007) : Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream , World J. of Microbiology and Biotechnology , vol. 23 , no. 8 , p. 1149 – 59 .

3 – Al-Haidary,N.K. , (1977) : Microbiol. Spoilage of Hydraulic and bearing oils , Ph.D. thesis , univ. college Cardiff .

4- Baron,E.J. and S.M. Finegold, (1994) : Microorganisms encountered in U.T.I. in Baily & Scotts Diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby com. U.S.A.

5- Brooijmans, R.J.W.; M.I. Pastink and R.J. Siezen (2009) : Hydrocarbon – degrading bacteria : the oil spill clean up crew , J. Microbial. Biotechnology , vol. 2 , no. 6 , p. 587 – 94 .

6- Chaillan, F. ; A. Le Fleche ; E. Bury ; Y. H. Phantavong ; P. Grimont; A.Saliot and J.Oudot (2004): Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon – degrading microorganisms , J. Research in Microbiology , vol. 155 no. 7 , p. 587 – 95 .

7- Das, K. and A. K. Mukherjee (2007) : Crude petroleum – oil Biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum– oil contaminated soil from North – East India, J. Bioresource Technology , vol. 98, no. 7 , p. 1339 – 45 .

- Head, I. M. ; D. M. Jones and S. R.Larter (2003): Biological activity8 in the deep subsurface and the origin of heavy oil, J. Nature vol. 426 , p. 344 – 52 .

9- Larter, S. R. ; A. Wilhelms ; I. Head ; M. Koopmans ; A. Aplin ; R. Di Primio ; C. Zwach ; M. Erdmann and N. Telnaes (2003):

The controls on the composition of biodegraded oils in the deep subsurface , Part I : Biodegradation rates in petroleum reservoirs , J. organic chemistry , vol. 34 , p. 601 – 13 .

10- Larter , S.R. ; I.M. Head ; H. Huang ; B. Bennett ; M. Jones ; A.C. Aplin ; A.Murray; M. Erdmann; A.Wilhelms and R. Di Primio (2005): Biodegradation , gas destruction and methan generation in deep subsurface petroleum reservoirs , Proceeding of the 6th Petroleum Geology Conference , Geological Society (London) , p. 633 – 40 .

11- Larter,S.R.; H.Huang; J. Adams; B. Bennett;O. Jokanola ; T.Oldenburg ; M. Jones ; I. Head ; C. Riediger and M. Fowler (2006) :The controls on the composition of biodegraded oils on the deep subsurface ,Part II: Geological controls on the subsurface biodegradation fluxes and constraints on reservoir - fluid property prediction : AAPG Bulletin , vol. 90 , p. 921 – 38.

12– Pridham, T.G. and D. Gottlieb, (1948) : The utilization of some carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination, J. of Bacteriol. 56 : pp. 107 – 114 .

13 – Tapilatu , Y.; M. Acquaviva ; C. Guigue ; G. Miralles ; J. C. Bertrand

degrading bacteria and P. Cuny (2009) : Isolation of alkane – rom deep– sea Mediterranean sediments , Appl. Microbiology, f vol. 50 : 2 , pp. 234 – 36 .

14- Wilhelms , A. ; S.R. Larter ; I. Head ; P. Farrimond ; R. Di Primi and C. Zwach (2001) : Biodegradation of oil in uplifted basins prevented by deep – burial sterilization , J. Nature, vol. 411 , p. 1034 – 37 .

الاسم : نزار أدور ناصر جرجيس الصائغ

العنوان الوظيفي : استاذ مساعد

المواليد :1950 بصرة /العراق

موقع العمل :كلية العلوم / الجامعة المستنصرية

التحصيل الدراسي: دكتوراه فلسفة في علوم الحياة (احياء مجهرية) جامعة كوزا /مدينة ياش _ رومانيا

1984