مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية – سلسلة العلوم الأساسية المجلد (31) العدد (1) 2009
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Basic Sciences Series Vol. (31) No. (1) 2009

التفكيك الحيوي للهيدروكربونات البترولية الموجودة في تراكيز مختلفة من المازوت والغازولين باستخدام بعض الأحياء الدقيقة

الدكتور مفيد ياسين [*]
الدكتور أحمد قره علي [**]
تهامه حربا [***]

(تاريخ الإيداع 3 / 2 / 2009. قُبِل للنشر في 2009/4/6)

□ الملخّص □

طبقت هذه الدراسة المخبرية على بعض الأحياء الدقيقة القادرة على تفكيك تراكيز مختلفة من بعض الهيدروكربونات البترولية الموجودة في المازوت والغازولين.

تم عزل بعض الأنواع البكتيرية التابعة للأجناس *(Pseudomonas, Escherichia, Staphylococcus)* من عينات مائية بحرية جمعت من منطقة مرفأ اللاذقية، ومصب مصفاة بانياس في البحر والتي تكيفت للحياة في هذه الأوساط لما تحتوي من المغذيات بنسب مختلفة، حيث فككت السلالات المعزولة والمنتقاة التابعة لتلك الأجناس الهيدروكربونات البترولية بنسب مختلفة تتراوح بين**(99-2)%**.

استخدمت تقانة مطيافية الفلورة (UV- Florescence (Ultra Violent -Florescence لتحديد التراكيز الكلية للهيدروكربونية البترولية خاصة الفحوم الهيدروجينية متعددة الحلقات العطرية ال Poly Cyclic Aromatic Hydrocarbons الـ(PAH_S).

الكلمات المفتاحية: التفكيك الحيوي، التلوث المائي، الهيدروكربونات البترولية، الغازولين، الديزل.

[*] **أستاذ مساعد – كلية الصيدلة– جامعة تشرين – اللاذقية– سورية.**
[**] **مدرس– المعهد العالي للبحوث البحرية– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.**
[***] **طالبة دراسات عليا (ماجستير)– قسم بيولوجيا بحرية– المعهد العالي للبحوث البحرية – جامعة تشرين – اللاذقية– سورية.**

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية – سلسلة العلوم الأساسية المجلد (31) العدد (1) 2009
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Basic Sciences Series Vol. (31) No. (1) 2009

Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Gazoline and Diezel Oil using some microorganisms

Dr. Moufid Yassine*
Dr. Ahmad Kara Ali **
Touhama Harba ***

(Received 3 / 2 / 2009. Accepted 6/4/2009)

□ ABSTRACT □

This laboratory research has been carried out on some microorganisms capable of degrading poly-aromatic hydrocarbons in various concentrations of (DiezelOil,Gzoline).

Some bacteria strains that belong to *(Pseudomonas, Escherichia, Staphylococcus*) were isolated from water samples collected from Lattakia port and discharge point of Banias refinery sewage line, which adapted to live in these media because **of the** nutrients.

Strains which belong to those genus were degraded petroleum hydrocarbons in various property between (2-99)%.

We used UV-F (Ultraviolet -Florescence) to determine the total Petroleum hydrocarbons compounds and poly aromatic hydrocarbons in particular.

Key words: Biodegradation, Water pollution, Petroleum hydrocarbons, gasoline, diesel Oil.

* **Associate professor, Faculty of Pharmacy, Tishreen University,Lattakia, Syria.**
** **Assistant professor , High institute of marine researches, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
*** **Postgraduate student, Biological marine, High institute of marine researches , Tishreen University, Lattakia, Syria**

مقدمة:

تعد الملوثات الهيدروكربونية البترولية Petroleum hydrocarbons Pollutants من الملوثات الرئيسية في البيئة البحرية، حيث تحدث خللاً في النظام البيئي البحري من خلال انتشارها الواسع، وسلوكها المعقد في البيئة البحرية(Botello,et.al.1997).

توجد طرائق متعددة لمعالجة المياه الملوثة بالهيدروكربونات البترولية وتشمل (الطرق الميكانيكية، الطرق الكيميائية، الطرق الحيوية)، وتعتبر الطريقة الأخيرة أقل ضرراً على البيئة المائية وأقل كلفة اقتصادية (.Kim et. al., 2001).

تعتمد الطرائق البيولوجية على استخدام أنواع مختلفة من الأحياء وخصوصاً الدقيقة منها والقادرة على تفكيك العديد من الملوثات المتواجدة في التربة أو الماء، ومنها المركبات النفطية إلى جزيئات أبسط وتصبح أكثر انحلالاً في الماء وتحويلها من مواد خطيرة ذات ضرر إلى مواد أقل خطورة وضرراً بسبب استخدام هذه المركبات كمصدر للكربون والطاقة من قبل الأحياء الدقيقة المستقلبة لها.

Brain et.al.1998, Vidali.. 2001, Mamma.et.al. 2004, Emtiaze et.al, 2005))

تعتبر المعالجة البيوتكنولوجية طريقة واعدة باستخدام الأنزيمات والطرق الإستقلابية للأحياء الدقيقة التي تستخدم التفكك الحيوي Biodegradation حيث إن للاستقلاب الميكروبي أهمية في معالجه آمنه للتلوث البيئي، كما أن الأحياء الدقيقة قادرة على إستقلاب ملوثات نفطية كثيرة ومتنوعة وهذا ما يؤكد أهميتها في الحفاظ على المحيط الحيوي من التلوث وإمكانية التخلص من الملوثات المتراكمة في البيئة(Robert et al 2000).

إن النشاطات الميكروبية الطبيعية كانت نقطة البداية لكل التقانات الحديثة المطبقة عملياً، ووجد أن المركبات النفطية تملك أهمية كبيرة بسب انتشارها الواسع وتأثيراتها المؤذية والسامة على صحة الإنسان فأدى ذلك إلى الاهتمام بآليات التفكيك الحيوي للمركبات الهيدروكربونية العطرية الحلقية (PAHs)، والتي تشكل صنفاً كبيراً ومتنوعاً من المركبات العضوية، كما تصنف بالمرتبة الأولى من الملوثات الهامة في وكالة حماية البيئة الأميركية(EPA)، وبسبب طبيعتها الكارهة للماء والمحبة للدهون فإن لها إمكانية للتراكم في مستويات غذائية مختلفة. (Sotsky et al 1994;Peijun et al 2005).

تستخدم الأحياء الدقيقة في معالجة الهيدروكربونات البترولية وتفككها في الطبيعة، في معظم البيئات والأوساط المغذية الغنية، حيث تعزل الأحياء الدقيقة وتحدد إمكانية تفكيكها للملوثات النفطية، وتحتاج السلالات التي تقوم بذلك واحداً أوأكثر من تلك المركبات كمصدر للكربون والطاقة، يتم عزل تلك السلالات بشكل مباشر بتنميتها على أوساط مغذية تحوي مركبات محددة تقوم بتفكيكها ومعالجتها حيوي (Atlas.& Bartha. 1992; Margesim & Schinner.1999)

تعتبر عملية التفكك الحيوي من الطرق البيوتكنولوجية التي يمكن الاعتماد عليها وهي عبارة عن عملية تمثيل للمادة العضوية بوساطة أحياء دقيقة وتحولها لمواد أخرى يمكن أن تكون أقل سمية أو أكثر فائدة، وتعتبر معالجة التلوث البيئي باستخدام الأحياء الدقيقة والأنزيمات والطرق الاستقلابية، تكنولوجيا حديثة ومتطورة وتوفر خياراً آمناً لمعالجة هذا التلوث. (Dietmar H & Walter R.,2000)

أهمية البحث وأهدافه:

تاتي أهمية هذا البحث من المحافظة على التنوع الحيوي في البيئة البحرية السورية وتقليل التلوث الناتج عن الملوثات النفطية، وتتلخص أهدافه بما يلي:

- عزل وتنقية وتنمية بعض السلالات البكتيرية المفككة للنفط الموجودة في مياه البحر على أوساط اصطناعية.
- تحديد التراكيز المثلى لعمل الأحياء الدقيقة المستخدمة.
- دراسة عملية التفكيك الحيوي لبعض الملوثات النفطية مخبرياً باستخدام الأحياء الدقيقة المعزولة.

تمت الدراسة في مخابر المعهد العالي للبحوث البحرية وكلية العلوم وكلية الصيدلة في جامعة تشرين من العام 2007- 2008.

طرائق البحث ومواده:

-عينات المياه:

جمعت العينات الخاصة بالعزل البكتيري من منطقة المرفأ في محافظة اللاذقية ومن مصب مصفاة بانياس في شهري تموز وآب من عام2007، وتم اختيار تلك المواقع لاختلاف تراكيز المشتقات النفطية فيها، ولتباين النشاطات المتنوعة في كل منطقة، أما العينات المستخدمة أثناء عملية التفكيك الحيوي فقد حضرت مخبرياً.

- الأوساط الزرعية المستخدمة:

استخدمت عدة أوساط للزراعة والعزل والتنقية منها أوساط صنعية اختيارية (انتقائية) Selective وأخرى تفريقية Differential ومغذية Enrichment وأوساط طبيعية من عينات المياه التي تم جمعها من أماكن الدراسة.

1- الأوساط الطبيعية:

وهي الأوساط المأخوذة من مياه البحر في مرفأ اللاذقية، ومصب مصفاة بانياس والتي تم عزل الأحياء الدقيقة منها.

2- أوساط العزل و التنقية:

تم عزل الأنواع المدروسة وتنقيتها ودراسة صفاتها المورفولوجية والفيزيولوجية على الأوساط التالية:

- وسط الستراميد آغار (Pseudomonas selective agar) Cetrimide agar وهو وسط جامد لانتقاء وعزل الـ *Peudomonas aeruginosa* ويتركب من (Gelatin peptone, $MgCl_2$, K_2SO_4, Agar, Cetiltri methyl-Ammonium Bromide, Glycerol)
- وسط الأست أميد Acetamide medium :وهو وسط مغذٍ وتأكيدي لوجود الـ *Ps.aeruginosa* وهو يتكون من (Acetamide, $MgSO_4$, NaCl, $FeSo_4$, K_2HPO_4, Na_2MoO_4) يحضن هذا الوسط بدرجة حرارة 37^oم لمدة 24 ساعة حيث يقوم الـ *Peudomonas aeruginosa* باستهلاكه كمصدر وحيد للكربون.
- وسط (King B agar) F-agar: وهو وسط جامد مميز للأنواع التابعة لجنس الـ *Pseudomonas* والتي تملك القدرة على إنتاج أصبغة الفلورسين Fluorescein ويتكون من (Meat peptone ,Casein peptone , K_2HPO_4, $MgSO_4$ Agar).
- وسط Krystal Violet Lactose Agar: يستخدم لتمييز أنواع الـ *Staphylococci* يتكون من (Beef extract Lactose, crystal violet, Agar, Proteose peptone)

نلاحظ نمو *Escherichia Coli* وتكون مستعمراتها بلون زهري، كما نلاحظ نمو *Staphylococcus aureus* وتكون مستعمراته بلون أصفر، كما ينمو على هذا الوسط *Staphylococcus epidermidis* وتكون مستعمراته بلون أصفر فاتح جداً.

– وسط Lactose Broth: يتكون من (Meat peptone , Beef extract, Lactose) ونلاحظ أن الـ *Escherichia Coli* تعطي فقاعات غازية عند نموها في هذا الوسط، أما *Pseudomonas aeruginosa* فلا يعطي هذه الفقاعات الغازية.

– وسط Fuchsin Lactose Broth : يتكون من (Meat extract, peptone, Lactose, BasicFuchsin) نلاحظ عند استخدام هذا الوسط أن الـ *Escherichia Coli* تنتج كلاً من الغاز والحمض، أما الـ *Staphylococcus aureus* لا ينتج أي من الغاز أو الحمض ونستدل على الغاز من الفقاعات الغازية.

– وسط Boric Acid Broth: يستخدم من أجل تمييز الـ *Escherichia Coli* ويعتمد على قدرتها للنمو في درجة حرارة (43)درجة مئوية،وتشكيل الغاز من اللاكتوز بوجود حمض البور.

– وسط AcetoBacter Agar (Mannitol): يتكون من (Peptic digest of animal, Yeast extract, Mannitol, AGAR)

– وسط Kligler Iron Agar: يتكون من (Beef extract, Peptic digest of animal, Yest extract, Proteose peptone, Lactose, Dextrose, Ferrous sulphate, Sodium chloride, Sodium thio-sulphat, Phenol red ,Agar) نلاحظ في هذا الوسط أن الـ*Escherichia Coli* تنتج غازاً يستدل عليه من الفقاعات التي تتشكل في الوسط، و تلون الوسط بلون عفني مائل للأسود مما يدل على إنتاج غاز H_2S.

3– الأحياء الدقيقة المعزولة وخصائصها:

تم عزل ثلاثة أنواع بكتيرية تعود لثلاثة أجناس وتشمل ثماني سلالات وهي *Pseudomonas eauregenosa- 1* و *Pseudomonas eauregenosa-2* و *Pseudomonas eauregenosa- 3* و *Pseudomonas eauregenosa-4* و *Staphylococcus epidermidis-***1** و *Staphylococcus epidermidis-* **2** و *Escherichia Coli-1* و *Escherichia Coli-2*

تعتبر البكتريا (*Pseudomonas eauregenosa* و *Escherichia Coli.*) سالبة الغرام والبكتريا (*Staphylococcus epidermidis*) موجبة الغرام.

يعد النوع *Escherichia Coli* أكثر أنواع البكتريا المدروسة، وينتمي لبكتريا سالبة الغرام من العصيات اللاهوائية الاختيارية Gram-negative facultative anaerobic rods، فصيلة العصيات المعوية Enterobacteriaceae والجنس Escherichia وهو عصيات مستقيمة متحركة أو غير متحركة، يخمر الغلوكوز واللاكتوز مع إنتاج أحماض وغازات، ولا يفكك الجيلاتين والبولة، ويلاحظ على وسط EMB مع لمعة يودية، ودرجة الحرارة الملائمة هي 37^{o} م وهو حساس لدرجات الحرارة العالية.(Holt& Krieg 1994).

ويتميز النوع*Pseudomonas eauregenosa* بخواص حيوية استقلابية وفيزيولوجية، وله القدرة على النمو في أوساط تحوي الملوثات النفطية ، كما يتميز بوجود البلاسميدات التي تعطيه هذه القدرة الاستقلابية ينتمي هذا النوع لفصيلة *Pseudomonaeceae* ورتبة *Pseudomonal*es (Holt& Krieg, 1994)

أمـــا النـــوع *Staphylococcus epidermidis* فهـــو ينتمـــي للمكـــورات إيجابيـــة غـــرام Gram-positive coccoi وإلـى فصـيلة Micrococcaceae وجميـع الأنـواع التابعـة لهـا كيميائيـة التغذيـة العضـوية وبعض الأنـواع ممـرض مثـل *Staphylococcus aureus* وبعضـها الآخـر غيـر ممـرض مثـل النـوع المدروس حالياً (Holt.& Krieg1994).

الأجهزة وطرائق التحليل المستخدمة:

1-الأجهزة والأدوات المستخدمة:

-جهاز الـ pH، ميزان حرارة زئبقي، محم، حاضنة، مجاهر ضوئية، أوتوكلاف، غرفة عزل بكتيري، زجاجيات معقمة (أنابيب اختبار، أطباق بتري، .... الخ).

-جهاز مطيافية الفلورةSpectroFlorometer نوع Jasco نموذجFP-777

-أدوات استخلاص(أقماع فصل).

2-التحاليل المستخدمة:

- تحديد درجة الحموضة بوساطة جهاز الـ pH.
- تحديد درجة الحرارة.
- تعداد الخلايا البكتيرية للأنواع المدروسة بطريقة التمديد بالأنابيب والزرع بأطباق بتري.
-استخلاص الهيدروكربونات البترولية باستخدام (ن-هكسان، دي كلورميتان)
- تحديد كمية الهيدروكربونات باستخدام Ultra Violent -Florescence

طريقة العمل:

1-عزل وتنقية السلالات المفككة للهيدروكربونات البترولية الموجودة في المازوت والبنزين:

تمت عملية العزل والتنقية بزرع العينات في أطباق بتري تحوي وسطاً يتركب من آجار ونترات البوتاسيوم KNO_3 و كلور الصوديوم NaCl وفوسفات ثنائية البوتاسيوم K_2HPO_4 وفوسفات أحادية البوتاسيوم KH_2PO_4 وتراكيز مختلفة من البنزين والمازوت كمصدر وحيد للكربون والطاقة وذلك بعد التخفيف بأنابيب اختبار تحوي هذا الوسط بدون الآجار، ومن ثم عزلت ولعدة مرات على الوسط السابق حتى الحصول على مزارع نقية وحفظت في أطباق بتري ثم نقلت إلى أنابيب تحوي الوسط المغذي المذكور وذلك بعد التأكد منها وتصنيفها بإجراء الاختبارات التفريقية والتأكيدية المناسبة وفق المراجع المعتمدة.(Howard.1994, HiMedia, 1998).

عزلت ثماني سلالات من موقعي الدراسة (حوض المرفأ، ومصب مصفاة بانياس) وهي *Pseudomonas eauregenosa- 1* و *Pseudomonas eauregenosa-2* و *Pseudomonas eauregenosa- 3* و *Pseudomonas eauregenosa-4* و **1** -*Staphylococcus epidermidis* و *Staphylococcus epidermidis*- **2** و *Escherichia Coli-1* و *Escherichia Coli-2*

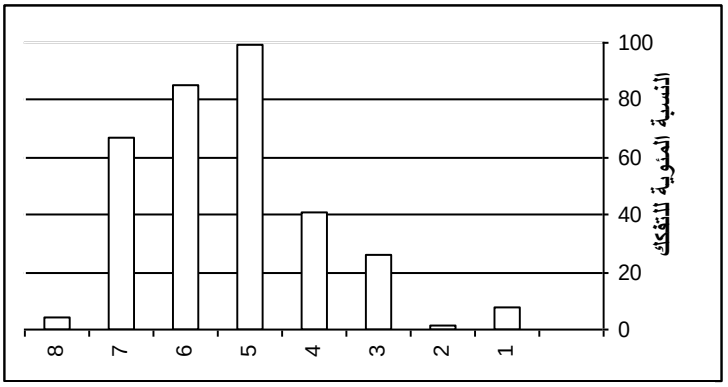
2-دراسة تغيرات تراكيز المازوت والغازولين في وسط يحويها كمصدر وحيد للكربون والطاقة:

تمت الزارعة على وسط سائل يحوي (1) غرام نترات الصوديوم $NaNO_3$ و(1) غرام فوسفات ثنائية البوتاسيوم K_2HPO_4 والتي تعتبر مصدر للمغذيات كما أضيفت أحجام مختلفة (0.5، 1، 1.5، 2، 2.5،3) مل من(المازوت

أوالغازولين) كمصدر وحيد للكربون والطاقة في هذه الدراسة بتراكيز (0.38، 0.57، 1.13، 1.5، 1.88، 2.25)غال بالنسبة للمازوت و(0.27، 0.54، 0.81، 1.08، 1.35، 1.62)غال بالنسبة للغازولين، ثم تم توزيع الوسط على ثماني أرلينات تحتوي كل منها 100 مل وتم زراعة 8 مزارع بكتيرية معزولة، بالمقارنة مع عينة شاهد (sampleplank)، ووضع الأرلينات على الهزاز (Shaker) لمدة 72 ساعة بدرجة حرارة 25 مئوية، بعدها أجريت عملية استخلاص للهيدروكربونات البترولية بطريقة سائل–سائل، باستخدام مزيج من المذيبات العضوية(ن–هكسان ودي كلور ميتان)(1:1)،تكرر عملية الاستخلاص مرتين وتجمع الخلاصتين معاً،تجفف من الرطوبة بواسطة كبريتات الصوديوم اللامائيةNa_2So_4 ثم تركز باستخدام المبخر الدوار،ثم يتم تجفيفها باستخدام تيار من الآزوت، ثم تقاس شدة الفلورة باستخدام جهاز مطيافية الفلورة Spectro Floro meter نوع Jasco نموذجFP-777 أجريت عملية القياس عند طول موجة تهيج λ_{Ex}=310nm وطول موجة إصدار λ_{EM}=360nm باستخدام خلايا من الكوارتز ذات مسار ضوئي قدره 1cm.تعايرالقياسات باستخدام محاليل قياسية من الكرايزين بتراكيز (0.1, 0.2, 0.5, 1, 1.5)mg\ml .
(UNEP.1995)

النتائج والمناقشة:

1–دراسة تغيرات تراكيز المازوت:

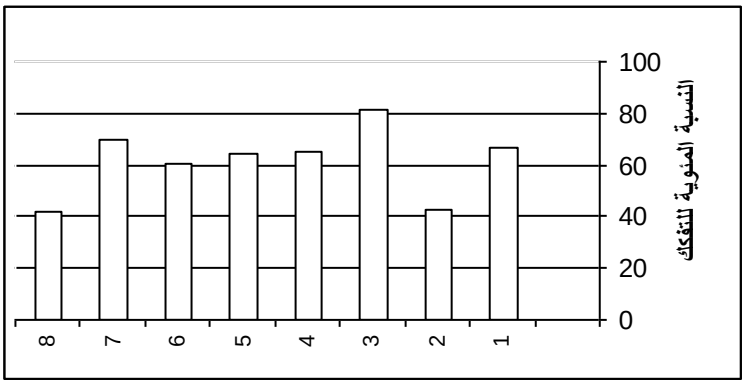


الشكل (1) النسبة المئوية المتوسطة لتغيرات تركيز المازوت في الوسط المدروس بتأثير الأحياء الدقيقة المستخدمة بدرجة حرارة 25م وتركيز0.38 غ/ل

series	strain
1	*Pseudomonas eauregenosa 1*
2	*Pseudomonas eauregenosa2*
3	*Pseudomonas eauregenosa3*
4	*Pseudomonas eauregenosa4*
5	*Escherichia Coli1*
6	*Escherichia Coli2*
7	*Staphylococcus epidermidis* **1**
8	*Staphylococcus epidermidis***2**

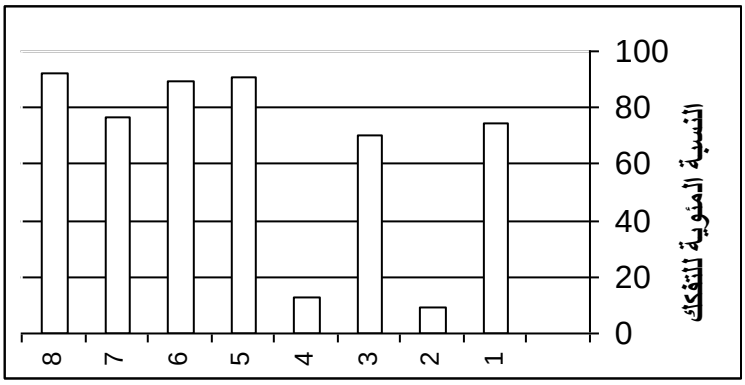
تم الحصول على أفضل النتائج عند استخدام السلالاتين *Esherchia.Coli-1* و *Esherchia.Coli2* حيث بلغت نسبة التفكيك 99.59%، 85.38% على الترتيب وأخفض قيمة عند السلالة المعزولة *من الـ Pseudomonaes eauregenosa-1- 2* *بنسبة* %(1-17) على الترتيب كما هو موضح بالشكل (1)

series	strain
1	*Pseudomonas eauregenosa 1*
2	*Pseudomonas eauregenosa2*
3	*Pseudomonas eauregenosa3*
4	*Pseudomonas eauregenosa4*
5	*Escherichia*



الشكل (2) النسبة المئوية المتوسطة لتغيرات تركيز المازوت في الوسط المدروس بتأثير الأحياء الدقيقة المستخدمة بدرجة حرارة 25 م وتركيز 0.75غ\ل

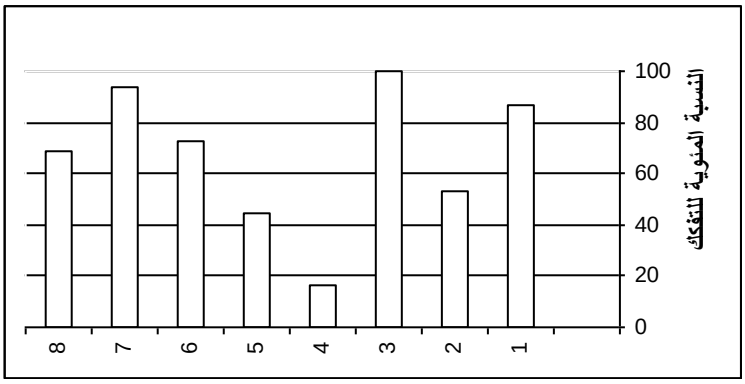
تم الحصول على أفضل النتائج عند استخدام السلالة *Pseudomonaes eauregenosa- 3* حيث بلغت نسبة التفكك 81.07% وأخفض قيمة عند السلالة*Staphylococcu epedirmes-2* حيث بلغت42.23% كما يوضح الشكل(2)



الشكل (3) النسبة المئوية المتوسطة لتغيرات تركيز المازوت في الوسط المدروس بتأثير الأحياء الدقيقة المستخدمة بدرجة حرارة 25م وتركيز1.13غ\ل

series	strain
1	*Pseudomonas eauregenosa 1*
2	*Pseudomonas eauregenosa2*
3	*Pseudomonas eauregenosa3*
4	*Pseudomonas eauregenosa4*
5	*Escherichia Coli1*
6	*Escherichia Coli2*
7	*Staphylococcus epidermidis* **1**
8	*Staphylococcus epidermidis***2**

نلاحظ أن السلالة *Staphylococcus epedirmes-2* فككت بنسبة 92.15% والسلالة *Esherchia.Coli-1* بنسبة 90.49% حيث سجلتا أفضل النتائج وكانت النسبة الأخفض عند السلالة *Pseudomonaes eauregenosa-2*حيث بلغت 9.091%كما يوضح الشكل(3)

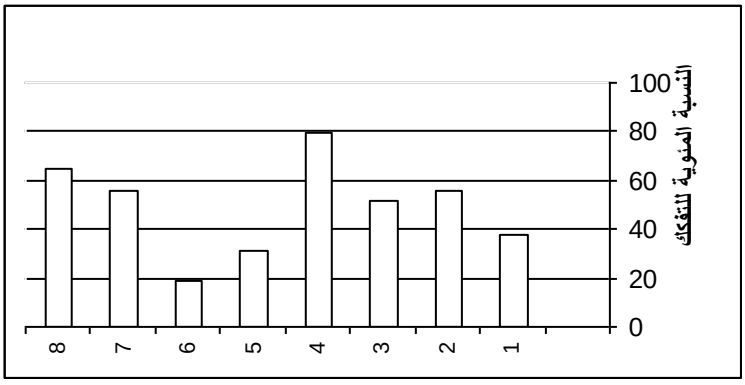


الشكل (4) النسبة المئوية المتوسطة لتغيرات تركيز المازوت في الوسط المدروس بتأثير الأحياء الدقيقة المستخدمة بدرجة حرارة 25م وتركيز1.5غ/ل

series	strain
1	*Pseudomonas eauregenosa 1*
2	*Pseudomonas eauregenosa2*
3	*Pseudomonas eauregenosa3*
4	*Pseudomonas eauregenosa4*
5	*Escherichia Coli1*
6	*Escherichia Coli2*
7	*Staphylococcus epidermidis* **1**
8	*Staphylococcus epidermidis***2**

بلغت النسبة الأفضل للتفكيك عند السلالاتين *Pseudomonaes eauregenosa-3* ,

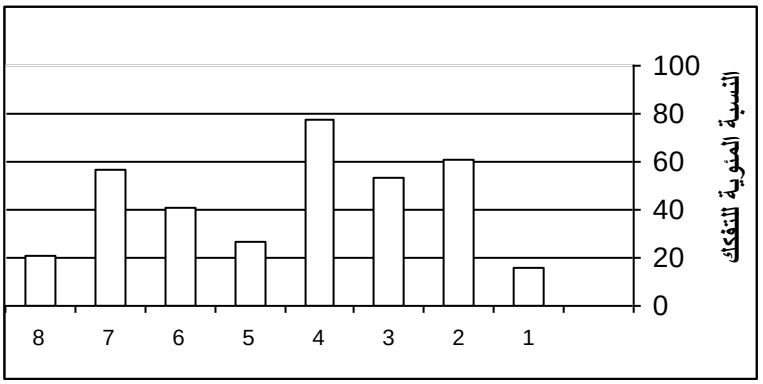
Staphylococcu epedirmes-1 حيث كانت(99.79 - 93.57) %على الترتيب، أما أخفض نسبة فلوحظت عند السلالة *Pseudomonaes eauregenosa4* حيث بلغت16.06% كما يبين الشكل(4)



الشكل (5) النسبة المئوية المتوسطة لتغيرات تركيز المازوت في الوسط المدروس بتأثير الأحياء الدقيقة المستخدمة بدرجة حرارة 25م وتركيز1.88غ/ل

series	strain
1	*Pseudomonas eauregenosa 1*
2	*Pseudomonas eauregenosa2*
3	*Pseudomonas eauregenosa3*
4	*Pseudomonas eauregenosa4*
5	*Escherichia Coli1*
6	*Escherichia Coli2*
7	*Staphylococcus epidermidis* **1**
8	*Staphylococcus epidermidis***2**

لوحظت النسبة الأفضل للتفكيك عند السلالة *Pseudomonaes eauregenosa-4* حيث بلغت 79.80% والنسبة الأخفض عند السلالة *Esherchia.Coli-2* حيث بلغت18.54% كما يبين الشكل(5)

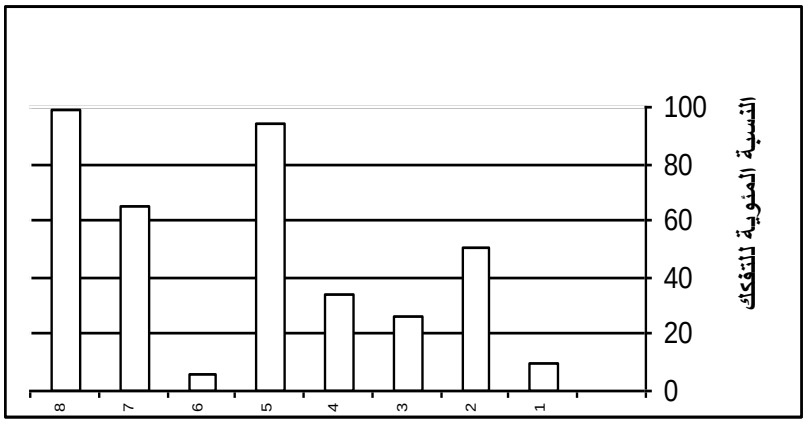


series	strain
1	*Pseudomonas eauregenosa 1*
2	*Pseudomonas eauregenosa2*
3	*Pseudomonas eauregenosa3*
4	*Pseudomonas eauregenosa4*
5	*Escherichia Coli1*
6	*Escherichia Coli2*
7	*Staphylococcus epidermidis* **1**
8	*Staphylococcus epidermidis***2**

الشكل (6) النسبة المئوية المتوسطة لتغيرات تركيز المازوت في الوسط المدروس بتأثير الأحياء الدقيقة المستخدمة بدرجة حرارة 25م وتركيز 2.25 غ/ل

بلغت نسبة التفكيك 77.17% عند السلالة *Pseudomonaes eauregenosa-4* حيث سجلت أعلى قيمة، أما النسبة الأخفض فلوحظت عند السلالة *Pseudomonaes eauregenosa-1* حيث بلغت15.43%كما هو موضح بالشكل(6)

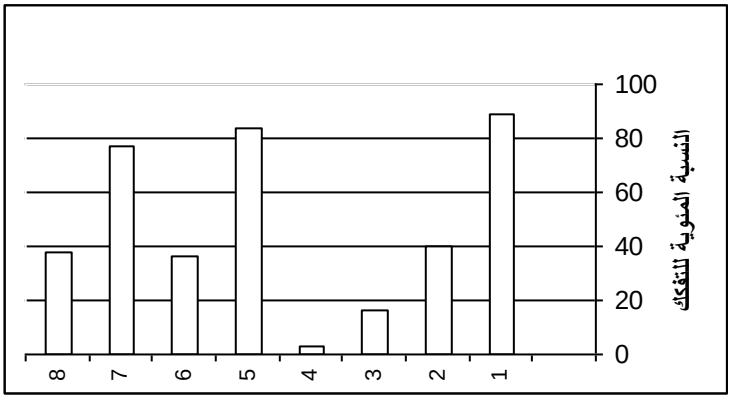
2 –دراسة تغيرات تراكيز الغازولين:



series	strain
1	*Pseudomonas eauregenosa 1*
2	*Pseudomonas eauregenosa2*
3	*Pseudomonas eauregenosa3*
4	*Pseudomonas eauregenosa4*
5	*Escherichia Coli1*
6	*Escherichia Coli2*
7	*Staphylococcus epidermidis* **1**
8	*Staphylococcus epidermidis***2**

الشكل (7) النسبة المئوية المتوسطة لتغيرات تركيز الغازولين في الوسط المدروس بتأثير الأحياء الدقيقة المستخدمة بدرجة حرارة 25م وتركيز 0.27غ/ل

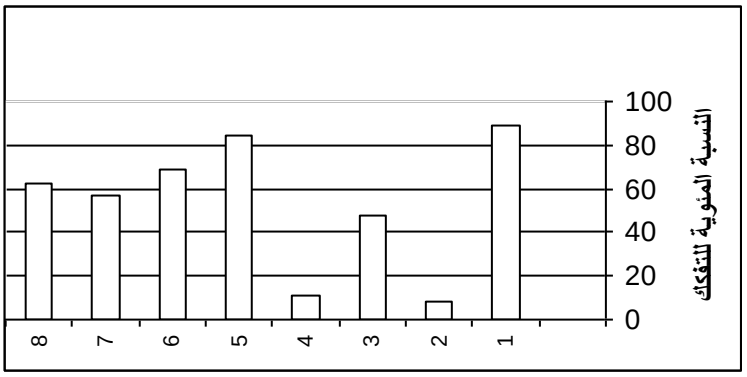
تم الحصول على أفضل النتائج عند استخدام السلالاتين *Staphylococcu epedirmes-2* و *Esherchia.Coli-1* بنسبة(99.21 – 94.5)% على التسلسل أما القيمة الأخفض فلوحظت عند السلالة *Esherchia.Coli2*حيث *بلغت* 5.88% كما هو موضح بالشكل (7)



الشكل (8) النسبة المئوية المتوسطة لتغيرات تركيز الغازولين في الوسط المدروس بتأثير الأحياء الدقيقة المستخدمة بدرجة حرارة 25م وتركيز0.54غ/ل

series	strain
1	*Pseudomonas eauregenosa 1*
2	*Pseudomonas eauregenosa2*
3	*Pseudomonas eauregenosa3*
4	*Pseudomonas eauregenosa4*
5	*Escherichia Coli1*
6	*Escherichia Coli2*
7	*Staphylococcus epidermidis* **1**
8	*Staphylococcus epidermidis***2**

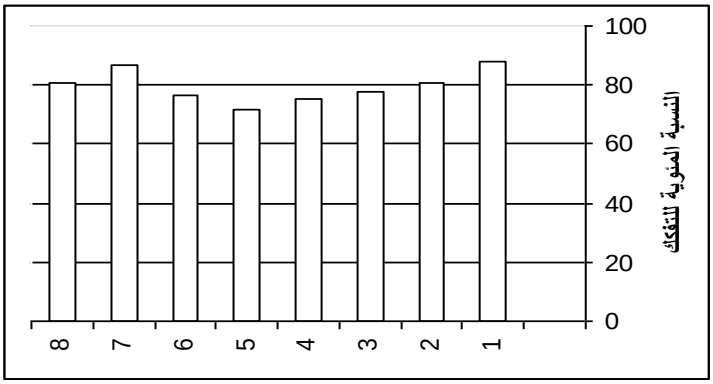
تم الحصول على أفضل النتائج عند استخدام السلالاتين *Pseudomonaes eauregenosa- 1* *Esherchia.Coli-1* بنسب تفكيك(98.03 –83.77)% على الترتيب أما النسبة الأخفض فلوحظت عند السلالة *Pseudomonaes eauregenosa4* وبلغت3.07% كما يبين الشكل(8)



الشكل (9) النسبة المئوية المتوسطة لتغيرات تركيز الغازولين في الوسط المدروس بتأثير الأحياء الدقيقة المستخدمة بدرجة حرارة 25م وتركيز0.81غ/ل

series	strain
1	*Pseudomonas eauregenosa 1*
2	*Pseudomonas eauregenosa2*
3	*Pseudomonas eauregenosa3*
4	*Pseudomonas eauregenosa4*
5	*Escherichia Coli1*
6	*Escherichia Coli2*
7	*Staphylococcus epidermidis* **1**
8	*Staphylococcus epidermidis***2**

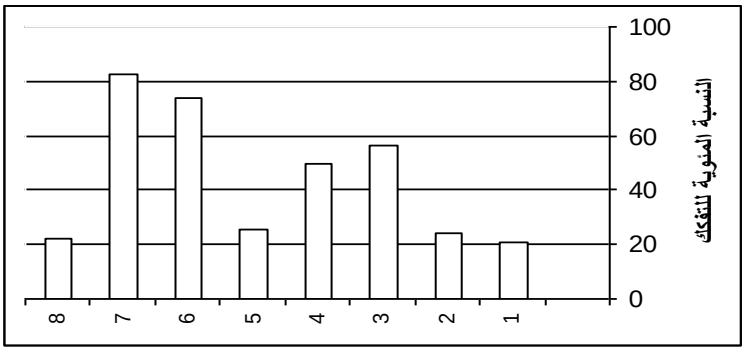
تم الحصول على أفضل النتائج عند استخدام السلالاتين *Pseudomonaes eauregenosa*-1 و *Esherchia.Coli-1* بنسب(89.32% و 84.58%)على الترتيب وأخفض نسبة عند السلالة *Pseudomonaes eauregenosa* -2 حيث بلغت8.3% كما يوضح الشكل(9)



الشكل (10) النسبة المئوية المتوسطة لتغيرات تركيز الغازولين في الوسط المدروس بتأثير الأحياء الدقيقة المستخدمة بدرجة حرارة 25م وتركيز1.08غ/ل

series	strain
1	*Pseudomonas eauregenosa 1*
2	*Pseudomonas eauregenosa2*
3	*Pseudomonas eauregenosa3*
4	*Pseudomonas eauregenosa4*
5	*Escherichia Coli1*
6	*Escherichia Coli2*
7	*Staphylococcus epidermidis* **1**
8	*Staphylococcus epidermidis***2**

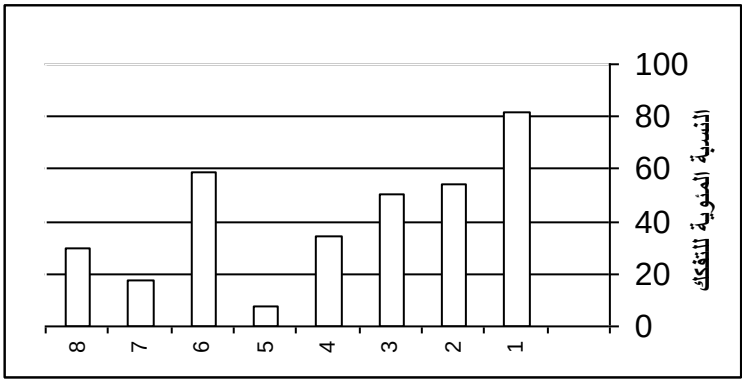
نلاحظ أن السلالات الأفضل في التفكيك السلالة *Pseudomonaes eauregenosa- 1* بنسبة 88.05% والسلالة*Staphylococcu epedirmes-1* بنسبة86.88% وأخفض نسبة عندالسلالة *Esherchia.Coli1* حيث بلغت71.67% كما يبين الشكل(10)



الشكل (11) النسبة المئوية المتوسطة لتغيرات تركيز الغازولين في الوسط المدروس بتأثير الأحياء الدقيقة المستخدمة بدرجة حرارة 25م وتركيز 1.35 غ/ل

series	strain
1	*Pseudomonas eauregenosa 1*
2	*Pseudomonas eauregenosa2*
3	*Pseudomonas eauregenosa3*
4	*Pseudomonas eauregenosa4*
5	*Escherichia Coli1*
6	*Escherichia Coli2*
7	*Staphylococcus epidermidis* **1**
8	*Staphylococcus epidermidis***2**

نلاحظ أن النسبة الأفضل للتفكيك كانت85.76% عند السلالة*Staphylococcu epedirmes-1* والنسبة الأخفض عند السلالة *Pseudomonaes eauregenosa- 1* حيث بلغت20.67% كما يبين الشكل(11)



الشكل (12) النسبة المئوية المتوسطة لتغيرات تركيز الغازولين في الوسط المدروس بتأثير الأحياء الدقيقة المستخدمة بدرجة حرارة 25مئوية وتركيز1.62غ/ل

series	strain
1	*Pseudomonas eauregenosa 1*
2	*Pseudomonas eauregenosa2*
3	*Pseudomonas eauregenosa3*
4	*Pseudomonas eauregenosa4*
5	*Escherichia Coli1*
6	*Escherichia Coli2*
7	*Staphylococcus epidermidis* **1**
8	*Staphylococcus epidermidis***2**

نلاحظ أن النسبة الأفضل للتفكك عند السلالة *Pseudomonaes eauregenosa-1* و بلغت82.03% أما القيمة الأخفض فلوحظت عند السلالة*Esherchia.Coli-1* بنسبة 7.31% كما يبين الشكل(12)

الاستنتاجات والتوصيات:

– تم عزل ثماني مزارع بكتيرية نقية من عينات مائية بحرية في مواقع ملوثة بالمركبات البترولية (حوض مرفأ اللاذقية، مصب مصفاة بانياس) وصنفت كسلالات تابعة للأجناس التالية *Escherichia Coli, Staphylococcus , Pseudomonas aeruginosa.*

– لوحظ أن السلالات المعزولة فككت تراكيز مختلفة من المازوت أو الغازولين وكانت نسبة التفكيك جيدة بشكل عام.

– كانت السلالات التابعة لـ *Pseudomonaes eauregenosa* أكثر فاعلية في عملية التفكيك.

– انتقاء وعزل بعض السلالات البكتيرية العالية الفعالية لتفكيك الملوثات النفطية والتي أعطت نتائج هامة في تفكيك المشتقات النفطية.

– تؤكد النتائج إمكانية استخدام المزارع المعزولة لتفكيك المركبات النفطية الموجودة في المياه من أجل المعالجة البيولوجية باستخدام وسائط وطرائق ميكانيكية خاصة.

المراجع:

1- ATLAS.R.S.and BARTHA.R., *Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremedation Adva Microb E.coli.* 1992,287-330.
2- BRAIN.P,eta.,*Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by a New Marine Bacterium, Neptunomonas naphthovorans gen.nov*.Sp.nov.1998.251-259
3- BOTELLO.AV,VILLANUEVA. S, DIAZ.G .*Petroleum Pollution in Gulf ofMexicoandCaribbeanSea..InstitutedeCienciasdelMaryLimnologia,UNAM,Mexico D.F.,Mexico.RevEnviron Contam Toxicol.*153:1997;91-118.
4- DIETMAR H PIEPER and WALTER REINEKE., *Engineering bacteria for bioremediation. Current Opinion in Biotechnology*, 11.2000,262–270
5- EMTIAZI, G., SHAKARAMI, H., NAHVI, I. and MIRDAMADIAN, S. H. *Utilization of petroleum hydrocarbons by Pseudomonas sp. and transformed Escherichia colAfrican Journal of Biotechnology* Vol. 4 ,2, 2005.172-176.
6- HIMEDIA,*TheHiMediaManualforMicrobiologyLaboratorypractice*.1998.524
7- HOLT, J.G. & KRIEG,N.R.S. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Ed.*, Williams and Wilkins, Baltimore, U.S.A.1994. 816.
8- HOWARD, B.J. Clinical and pathogenic microbiology,2nd ed.,mosby year book,inc.1994.942.
9- KIM.I,JONG-SUPPARC,KYONG-WOONGKIM.*Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic Surfacants in soil slurry.Applied Geochemistry* 16.2001.1419-1428.
10- MAMMA.D.&MACRIS,B.J. *Combinedphoto-assisted biologicaltreatment of industrial oily wastewater.JEnviron Sci Health part AtoxHarzad subst EnvironEng*.vol.39.N.3.2004.729-740.
11- MARGESIM .Rand SCHINNER F.*Biological degradation of oil spils in cold invironment .J.chem .technol .Biotechnol* .74 , .1999 1-9.
12- PEIJUN Li,XINWANG,FRANK STAGNITTI,LING LIH,AIRONG ZHANG,XI ANZHE XIONG&CHRIS AUSTIN *Degradation of Phenanthrene and Pyrene in Soil Slurry Reactors with Immobilized Bacteria Zoogloea sp*. Vol. 22, No. 3 :2005,390 -399
13- ROBERTA.KANALYand SHIGEAKI HARAYAMA. *Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria Marine Biotechnology Institute, Kamaishi Laboratories, Kamaishi City, Iwate 026-0001, Japan Journal of Bacteriology,* Vol. 182, No.8.2000.2059-2067
14- SOTSKY, J. B., C. W. GREER.S, and R. M. ATLAS. *Frequency of genes in aromatic and aliphatic hydrocarbon biodegradation pathways within bacterial populations from Alaskan sediments.* Can. J. Microbiol.40: 1994.981-985
15- VIDALI.M *Bioremediation. An overview. Pure Appl. Chem.*, Vol. 73, No. 7, 2001. 1163–117
16- UNEP\IOC\IAEA .*Reagent and laboratory-ware clean up producer for low level contamainant monitoring. References methods for marine pollution studies* No.65,1995.24