مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (38) العدد (3) 2016
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (38) No. (3) 2016

كفاءة الشعّيّات المعزولة من بحيرتي قطينة وسد الروم في النمو في الأوساط الملوثة بالجفت والنفط الخام

الدكتور عدنان علي نظام*
هنادي عايد**

(تاريخ الإيداع 21 / 12 / 2015. قبل للنشر في 13 / 7 / 2016)

□ ملخّص □

يمتلك العديد من الجراثيم القدرة على المعالجة الحيوية للملوثات العضوية في البيئة المائية بما يمتلكه من مقدرة عالية على إنتاج الإنزيمات، ومن أهم هذه الملوّثات الجفت الناتج عن عصر الزيتون بسبب احتوائه مركبات فينولية، والنفط الخام الناتج عن حوادث التسرّب المتكررة بسبب صعوبة تفككه وقدرته على البقاء طويلاً، والتأثير السام لهذه الملوثات في البيئة، وهي من أكثر المشكلات البيئية حساسية واستمرارية في سورية.

اختُبرت في هذا البحث مقدرة الشعّيات المعزولة محلياً على النمو في الأوساط السائلة الملوثة بالجفت والنفط الخام بعد عزلها من بحيرتي قطينة وسد الروم، وتعريفها، على مدى ثلاثة أسابيع من خلال تغير الكثافة الضوئية والتعداد الكلي للجراثيم والرقم الهدروجيني pH في الوسط السائل الحاوي الملوّث العضوي والسلالة المختبرة.

إذ تم تعريف 9 سلالات تنتمي إلى أجناس الشعيّات الآتية: *Streptomyces (S1, S2, S3, S4, S5)* و *Micromonospora (M7, M8, M9)* و*Nocardia (N6)* بعد تحديد صفاتها المورفولوجية والحيوية الكيميائية، حيث أبدى معظم هذه السلالات المعزولة مقدرة على النمو على الأوساط الصلبة الحاوية الجفت والنفط الخام، كما تبين بأن قدرة السلالات المنتخبة على النمو في الأوساط السائلة الملوثة بالنفط الخام كانت أقل مقارنةً بنموها في تلك الحاوية الجفت ولاسيما في الأسبوع الثالث من الحضن، مع ملاحظة وجود انخفاض في قيم pH، وازدياد الكثافة الجرثومية في جميع الأوساط السائلة المختبرة مع زيادة فترة الحضن، مما يؤكد على أن هذه السلالات المعزولة قد تكون فعالة في عملية المعالجة الحيوية لهذين الملوثين.

الكلمات المفتاحية: الشعّيات، النفط الخام، الجفت، السموم العضوية، البيئة المائية.

* أستاذ _قسم علم الحياة النباتية _ كلية العلوم _ جامعة دمشق_ دمشق_ سورية.
** طالبة دراسات عليا (دكتوراه) _ قسم علم الحياة النباتية_ كلية العلوم _ جامعة دمشق _ دمشق_ سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (38) العدد (3) 2016
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (38) No. (3) 2016

Efficiency of Actinobacteria Isolated from Quateena and Roman bridge Lakes in Growth in media polluted by OMWW and crude oil.

Dr. Adnan Ali Nizam*
Hanady Ayed **

(Received 21 / 12 / 2015. Accepted 13 / 7 /2016)

□ ABSTRACT □

Many of bacteria have the ability to bioremediation organic contaminants in the aquatic environment because of their ability to produce many enzymes. Olive Mill Waste Water OMWW is one of the most important pollutant because its phenolic compounds, and crude oil resulting from repeated spill incidents revealed difficulty to decomposition, accumulate for long time, and toxicity effects, that make these two pollutants the most sensitivity and continuity environmental problems in Syria.

Many of local Actinobacteria strains were tested in this study for their ability to grow in liquid media contains OMWW and crude oil for three weeks, after isolated from Quttaineh and Roman bridge lakes and characterized, by detected the changes of optical density, total viable count and pH value in liquid medium containing organic pollutant and tested strain.

After determination the morphological and biochemical characteristics, 9 strains of Actinobacteria were defined as following genera: *Streptomyces* (S1, S2, S3, S4, S5), *Micromonospora* (M7, M8, M9) and *Nocardia* (N6), most of these strains were revealed ability to grow on solid media contain OMWW and crude oil, although selected strains were revealed ability to grow in liquid media polluted by crude oil were lower compared to their growth in that polluted by OMWW especially in the third week of incubation, with a decrease in pH values and increase in bacterial density, when the incubation period increased for all detected liquid media, which emphasizes that these isolates may be effective in the bioremediation of these pollutants.

Keywords: Actinobacteria, Crude oil, OMWW, Organic toxins, Aquatic environment.

***Professor, Department of Plant Biology, Faculty of Sciences, Damascus University , Damascus, Syria.**
****Postgraduate Student, Department of Plant Biology, Faculty of Sciences, Damascus University , Damascus, Syria.**

مقدمة

يعدّ التلوث بالمركبات الكيميائية العضوية في البيئات المائية ، مثل: الجفت أو المخلفات السائلة لعصر الزيتون Oil Mill Waste Water OMWW والنفط الخام من أكبر المشكلات في البيئات المائية التي تؤدي إلى تلوث المياه من خلال تأثيرها في الكثير من الوظائف البيئية، مثل دورة النتروجين، إضافة إلى ضررها الكبير بالبيئة والأحياء المائية (Schafer *et al.*, 2009)، فقد كانت حوادث تسرّب النفط الخام ولا تزال من أهم أسباب تلوث المياه، إذ إنها مشكلة بيئية جادة بسبب إمكان وصولها إلى التربة (Trindade *et al.*, 2005)؛ ما يؤدي إلى نتائج خطيرة على الصحة والبيئة (Vila *et al.*, 2001)، وكذلك قدرتها على البقاء طويلاً وصعوبة تفككها، إلى جانب تأثيرها في تكوين الدنا DNA والتحريض على حدوث الطفرات (Besaratinia and Ffeiffer, 2003)، وفيما يتعلّق بالجفت، فيعد من أكثر المشكلات البيئية المائية حساسية واستمرارية، إذ تنتشر صناعة زيت الزيتون عالمياً ولاسيما في دول شرقي المتوسط، وينتج عنها كميات كبيرة من الجفت الذي يحتوي العديد من العناصر السامة للبيئة والأحياء الموجودة فيها (Capasso *et al.*, 1995, Karpouzas *et al.*, 2010)، وتعود هذه السمية غالباً لوجود المركبات الفينولية التي تؤثر سلبياً في نشاط الأحياء المائية (Al-Malah *et al.*, 2000, El Hassani *et al.*, 2007)، وتُغير في الصفات الفيزيائية والكيميائية للمياه والتربة (Karpouzas *et al.*, 2010).

تؤكد غالبية الأبحاث على ضرورة البحث عن حلول غير الطرائق الكيميائية للتخلص من ملوثات الجفت والنفط الخام وتكون في الوقت نفسه أقل ضرراً بالبيئة وأكثر استدامة (Delille and Coulon 2008)، ومنها المعالجة الحيوية التي تعدّ من التقانات المناسبة إذ يجري فيها تحويل المركبات السامة إلى مركبات أقل سمّيّة أو غير سامة فالأحياء الدقيقة تستعملها كمصدر للكربون والطاقة (Catelani *et al.*,1970, Bayat *et al.*, 2005,)، وهناك أنواع من الأحياء الدقيقة تمتلك القدرة طبيعياً على التفكيك أو قد تكيفت مع ظروف بيئية جديدة واكتسبت هذه الصفة المفككة (Van Hamme *et al* . 2003)، ويمثّل التفكيك الحيوي للسموم العضوية بفعل الأحياء الدقيقة إحدى التقانات المستعملة للتخلص من الملوثات المختلفة من الهيدروكربونات في البيئات المائية (Rahman *et al.*, 2003, Bento *et al.,* 2005). وتعدّ الجراثيم من أكثر مجموعات الأحياء الدقيقة المفككة للمركبات الهيدروكربونية (Vila *et al.*, 2001, Rahman *et al.,* 2002)، وعلى نحو خاص تلك المجهزة بالإنزيمات ذات القدرة الكبيرة على تفكيك الهيدروكربونات واستقلابها (Margesin *et al.,* 2003, Neweke and Okpokwasili, 2003, Van Beilen *et al.*, 2004, Malkawi *et al.*, 2009, Zhang *et al.,* 2010).

إذ أكد العديد من الأبحاث قدرة بعض الأحياء الدقيقة على تخفيف سمية الجفت من خلال الأكسدة الحيوية باستعمال البيروكسيداز والماء الأكسجيني ومقاومتها للفينولات (Fadil *et al.*, 2003)، وتأتي في المقام الأول الشعّيات التي تقترن زيادة أعدادها بوضوح مع وجود الجفت في البيئة (Makki *et al.,* 2006, El Hassani *et al.*, 2007, Seong-Jae *et al.*, 2007, Karpouzas *et al.*, 2010)، فقد أُجريت بعض الدراسات المحلية التي تم فيها استعمال الجراثيم في المعالجة الحيوية للجفت، وتم التأكيد فيها على أهمية استعمال هذا النوع من المعالجات الحيوية في تخفيف الأثر السمي للجفت بأقل تكاليف وضرر على البيئة (كبيبو ورفاقه 2007، ناصر 2008).

كما تؤكد الأبحاث العلمية على الوجود الكبير للشعّيات في رواسب الأنهار الملوثة بالهيدروكربونات؛ وبالتالي دورها المميز في المعالجة الحيوية للمياه بما تقوم به من تفكيك للهيدروكربونات (Hamamura *et al.*, 2006, Harwati *et al.*, 2007, Björklöf *et al.*, 2009)،

تنتمي الشُّعّيات إلى رتبة الشُعَّاوات Actinomycetales، وهي جراثيم موجبة الغرام تحتوي نسبة عالية من G^+C، وتنتج مواد مفيدة في التطبيقات العملية، ما يكسبها أهمية كبيرة في مجالات التقانة الحيوية والبيئة والصحة، وتعد الموائل المائية من المصادر الهامة لعزل سلالات جديدة من الشعّيات ذات الأهمية في مجال التقانة الحيوية والتطبيقات المختلفة، وإن كانت واسعة الانتشار في التربة، إذ يمكن عزل أجناس الشُّعّيات من المياه ومن رواسب الأنهار والبحيرات، ومن أكثرها سيادة جنس *Streptomyces* (Brautaset *et al.*, 2000, Abou-Elela 2005, Ventura *et al.*, 2007, Arunachalam *et al.*, 2010).

أهمية البحث وأهدافه

تعود أهمية البحث الحالي إلى ضرورة التخلص من بعض المشكلات البيئية التي تواجه عدد من الدول بما فيها سورية، ولا سيما فيما يتعلق بالجفت، إذ تعد سورية من الدول المنتجة لزيت الزيتون بكميات كبيرة مما يزيد من أهمية مشكلة المخلفات الناتجة عن عصر الزيتون، إضافةً إلى حوادث تسرب النفط المتكررة التي تعد مشكلة عالمية، لذلك يهدف البحث إلى عزل سلالات جديدة ومحلية من الشعّيات من بحيرتي قطينة وسد الروم، ودراسة قدرتها على النمو في الأوساط السائلة الحاوية الملوثين المذكورين لاستعمالها في دراسات لاحقة أثناء إجراء عمليات المعالجة الحيوية لهذه الملوثات، وتخفيف الأثر السام لها على البيئة والأحياء.

طرائق البحث و موادهـ

تم إجراء البحث في جامعة دمشق، كلية العلوم، قسم علم الحياة النباتية، مختبر الدكتوراه، خلال العام 2014-2015.

1. جمع العينات

أمكن الحصول على عينات النفط الخام بالتعاون مع الشركة السورية للنفط، أما عينات الجفت فقد جُمعت من معمل لإنتاج زيت الزيتون في السويداء، وحُفظت مباشرة في الدرجة 4 مْ لحين الاستعمال. وأُخذت عينات المياه على عمق 15 – 20 سم من شاطئ بحيرتي قطينة وسدّ الروم بهدف عزل سلالات جديدة من الشعّيات، باستعمال عبوات زجاجية مغلقة سعتها 300 مل، نظيفة ومعقمة وحُفظت في الدرجة 4 مْ مباشرةً لحين الاستعمال.

2. عزل سلالات الشعّيات

أُجريت سلسلة من التمديدات حتى 10^{-4} لتسهيل عزل سلالات الشعّيات من العينات، وزُرع 10 µl من كل منها على الوسط الخاص بتنمية الشعّيات ISP2 (4 غ خلاصة خميرة، 10 غ خلاصة شعير، 4 غ غلوكوز، 20 غ آغار، 1 ل ماء مقطر)، وحُضنت في الدرجة 30 مْ مدة 3 أسابيع، وكُررت عملية الزرع أثناء مراحل الغربلة بعد كل يومين للحصول على سلالات نقية، ثم حُفظت السلالات في الدرجة 4° م لحين الاستعمال.

3. تحديد الخصائص المورفولوجية والفيزيولوجية للسلالات المعزولة

تم تحديد الصفات المورفولوجية لسلالات الشعّيات المعزولة باستعمال مجموعة من الأوساط الخاصة بتنمية الشعّيات ISP6 (10 غ Amidon، 1 غ K_2HPO_4، 1 غ $MgSO_4.7H_2O$، 1 غ NaCl، 2 غ $(NH4)2SO4$، 2 غ $CaCO3$، 1 مل Solution saline standard، 20 غ آغار، 1 ل ماء مقطر) و ISP7 (15 غ غليسيرول، 0.5 غ L–Tyrosine، 1 غ L–Asparagine، 1 غ K_2HPO_4، 0,5 غ $MgSO_4.7H_2O$، 0.01 غ $FeSO_4.7H20$، 0.5 غ NaCl، 20 غ آغار، 1 مل Solution saline standard، 1 ل ماء مقطر)، ومتابعة الفترة اللازمة لتنمية كل سلالة حتى مرحلة التبوغ، وظهور الاختلاف في اللون والمظهر ووجود الأقطورة الهوائية Aerial mycelium واللاهوائية Substrate mycelium، والصباغ المنحلة المفرزة في الوسط، والنمو في الوسط السائل ISP2، وشكل الخلايا تحت المجهر (يوسف وزملاؤه، 2004، Shirling and Gottlieb 1966, Qiu *et al.*, 2008)، وأجريت بعد ذلك الاختبارات الخاصة بتحديد الصفات الحيوية الكيميائية للسلالات بحسب دليل بيرجي (Bergy, 1989–2005) وباستعمال شريط **API 20E, API 32C** لتحديد الأجناس.

حيث يتضمن شريط API 20 E 20 أنبوباً صغيراً تحتوي أوساطاً جافة يجري تلقيحها بالمعلق الجرثومي الذي يعمل على إذابة هذه الأوساط، ويتغير لون هذه الأنابيب خلال مدة الحضن نتيجة لنمو الجراثيم، وهذا التغير في اللون إما أن يكون تلقائياً في بعض الاختبارات أو بعد إضافة الكواشف في اختبارات أخرى، أما شريط API 32 C فيحتوي 32 حفرة يجري تلقيحها بالمعلق الجرثومي ثم قياس العكارة مقارنةً بالحفرة المعيارية إما عيانياً أو باستعمال المطيافية الضوئية الخاص لهذا النوع من API، بعد الحضن في الدرجة 30 مْ، ثم تُقرأ نتيجة كل تفاعل وفقاً لجدول المطابقة ويجري تعريف الجنس الذي تنتمي إليه الشّعيات باستعمال دليل بيرجي 2005.

4. تحرّي سلالات الشعّيات المفككة للجفت والنفط الخام

في الأوساط الصلبة: استُعمل وسط mineral salt agar (MgSO4 0.2 g، CaCl2 0.20 g، KH2PO4 1g، K2HPO4 1g، NaNO3 1g أو (NH4)2SO4 وقطرتين من محلول FeCl3، 1000 مل ماء مقطر، آغار–آغار 18 غ) لاختبار قدرة السلالات المعزولة على تفكيك الجفت والنفط الخام، بتلقيح الوسط الصلب بالسلالات الحديثة التي لا يتجاوز عمرها 24 ساعة بطريقة الفرش، بعد ضبط الوسط على pH 7 ثم عمل 3 حفر بكل طبق وملء الحفرة بقطعة قطن معقمة ومبللة بالملوث المدروس بمقدار 0.5 مل، ثم حضن الأوساط في الدرجة 30 مْ مدة 7–10 أيام، إذ يعدّ وجود نمو حول الحفرة دليلاً على قدرة السلالة على التفكيك (Amund and Igiri 1990, Survery *et al* ., 2004).

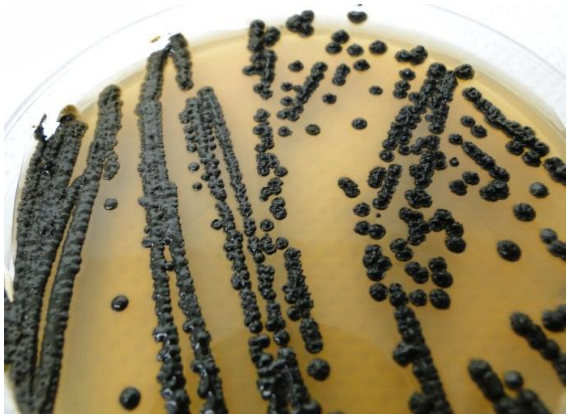
في الاوساط السائلة: اختُبرت قدرة السلالات التي أثبتت فعالية في التفكيك خلال التحري الأولي على التفكيك ضمن الوسط السائل باستعمال وسط mineral salt (MgSO4 0.2 g، CaCl2 0.20 g، KH2PO4 1g، K2HPO4 1g، NaNO3 1g أو (NH4)2SO4 وقطرتين من محلول FeCl3، 1000 مل ماء مقطر) (Mills *et al.*, 1978)، إذ أُضيف الوسط بمقدار 99 مل إلى حوجلات سعتها 250 مل، وأُضيف إلى كل منها 1 مل من الملوث المدروس، ثم لُقح الوسط بالسلالة المختبرة بمقدار 10^6 خلية/مل بعد تقدير المعامل الجرثومي لها، وحُضن الوسط بعد ذلك في الحاضنة الهزازة 120 rpm في درجة الحرارة 30 مْ، وأُخذت القياسات الآتية: الكثافة الضوئية على طول موجة 600 نانومتر OD600 باستخدام جهاز المطياف الضوئي لتقدير الكثافة الميكروبية ، والتعداد الكلي للجراثيم TVC (CFU/ml) بطريقة الأطباق، والرقم الهيدروجيني للوسط السائل علماً بأن قيم الرقم الهيدروجيني للوسط

قبل إضافة الملوث بلغت pH 7، مع المراقبة كل 7 أيام مدة 3 أسابيع (Amund and Igiri 1990, Oboh *et al.*, 2006).

النتائج والمناقشة

أمكن تحديد هوية 9 سلالات معزولة من الشعّيات اعتماداً على الصفات المورفولوجية والحيوية الكيميائية باستعمال **شريط** API20 E, API32C، وقد أظهرت النتائج الموضحة في الجدولين 1 و2 و3 أن السلالات المعزولة من مواقع الدراسة تنتمي إلى أجناس الشعيّات الآتية: *Streptomyces (S1, S2, S3, S4, S5)*, *Nocardia (N6)*, *Micromonospora (M7, M8, M9)*، وإن كان معظم السلالات المعزولة تنتمي إلى الجنس *Streptomyces*، وجميع السلالات موجبة الغرام، والأفطورة الهوائية موجودة في معظمها تقريباً مع ظهور صبغة الميلانين في الوسط المغذي عند بعض السلالات فقط (S2, S3, S4, N6).

حيث تباينت السلالات المعزولة بصفاتها المورفولوجية على الوسط المغذي الصلب إذ ظهرت سلالات *Streptomyces* بمظهر جلدي ولون كريمي قبل التبوغ، وكانت شديدة التمسك بالوسط المغذي الصلب وبعد التبوغ تحولت إلى مظهر شمعي مع لون أبيض أو أسود أو رمادي، أما السلالة التابعة للجنس *Nocardia* فكانت ذات مظهر جلدي أو مخاطي وأفطورة هوائية ومستعمرات مركزها محدب وأشكالها مجعدة، أما فيما يتعلق بسلالات الجنس *Micromonospora* فقد كانت مستعمراتها صغيرة جداً ذات مظهر حُبيبي وألوان مختلفة كالأرجواني أو الأسود أو البرتقالي مع تغيّر لون بعض السلالات بعد التبوغ وأفطورة لاهوائية في معظم السلالات (الشكل 1)، أمّا في الأوساط السائلة فظهر النمو في هيئة غشاء أو راسب أو بكليهما في بعض السلالات ، ومعظم السلالات أبدى مقدرة على إنتاج بعض الإنزيمات من خلال إجراء الإختبارات الحيوية الكيميائية الخاصة باستعمال شريط **API**، مثل: Gelatinase, Nitrate reductase, Esculine، وتفكيكها لمصادر الكربون، مثل: Amidon, Glucose, Indole, Mannitol, Ribose، ويتفق ذلك مع الصفات المورفولوجية والحيوية الكيميائية للأنواع التابعة للأجناس في دليل بيرجي (Bergy, 1989–2005)، وبعض الدراسات العالمية المماثلة (Muir and Pritchard 1997, Chitti *et al.* 2005, Vitězova 2013).



M8

S5

N6

الشكل (1) نمو بعض سلالات الشعّيات على الوسط المغذي الصلب ISP2.

الجدول (1) الخصائص المزرعية لمستعمرات سلالات الشعّيات المعزولة من بحيرتي قطينة وسد الروم.

السلالة	الصفات المورفولوجية			
	اللون	الشكل	الأفطورة الهوائية	الأفطورة اللاهوائية
S1	كريمي تحول إلى رمادي	جلدي	+	–
S2	كريمي تحول إلى أسود	شمعي	+	+
S3	أبيض	جلدي	–	–
S4	رمادي	حبيبي	+	+
S5	كريمي تحول إلى أبيض	شمعي	+	_
N6	كريمي	مجعد	+	–
M7	أرجواني	حبيبي	+	+
M8	برتقالي تحول إلى أسود	حبيبي	–	+
M9	أسود	حبيبي شمعي	+	+

الجدول (2) الصفات الحيوية الكيميائية (إنتاج الإنزيمات) لسلالات الشعّيات المعزولة من بحيرتي قطينة وسد الروم باستعمال شريط API 20E, 32C.

M9	M8	M7	N6	S5	S4	S3	S2	S1	
إنتاج الإنزيمات									
+	+	+	+	+	+	+	+	+	Gelatinase
+	–	–	+	–	–	–	+	–	Urease
+	+	+	+	+	+	+	+	+	Nitrate reductase
_	+	–	–	–	+	–	–	–	Milk casein
–	–	–	–	–	–	–	–	–	Citrate
+	+	+	+	+	+	+	+	+	Esculine

الجدول (3) الصفات الحيوية الكيميائية (استعمال مصادر الكربون) لسلالات الشعّيات المعزولة من بحيرتي قطينة وسد الروم باستعمال شريط API 20E, 32C.

مصادر الكربون	S1	S2	S3	S4	S5	N6	M7	M8	M9
Amidon	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amylose	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Arabinose	+	+	−	+	+	−	−	+	_
Celebiose	−	+	+	+	−	+	+	+	+
Erythritol	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Fructose	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Galactose	−	+	−	+	−	+	−	+	_
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	−	−	+	−	−	+	−	−
Lactose	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Maltose	+	−	−	+	+	+	−	−	−
Mannose	−	−	+	+	−	−	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	−	+	−	+	−	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	−	+	+	−
Palatinose	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Raffinose	−	+	−	+	−	+	−	−	−
Rhamnose	−	−	−	+	−	−	−	+	+
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Sorbitol	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Sorbose	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Trehalose	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Xylose	−	−	−	−	−	−	−	−	−

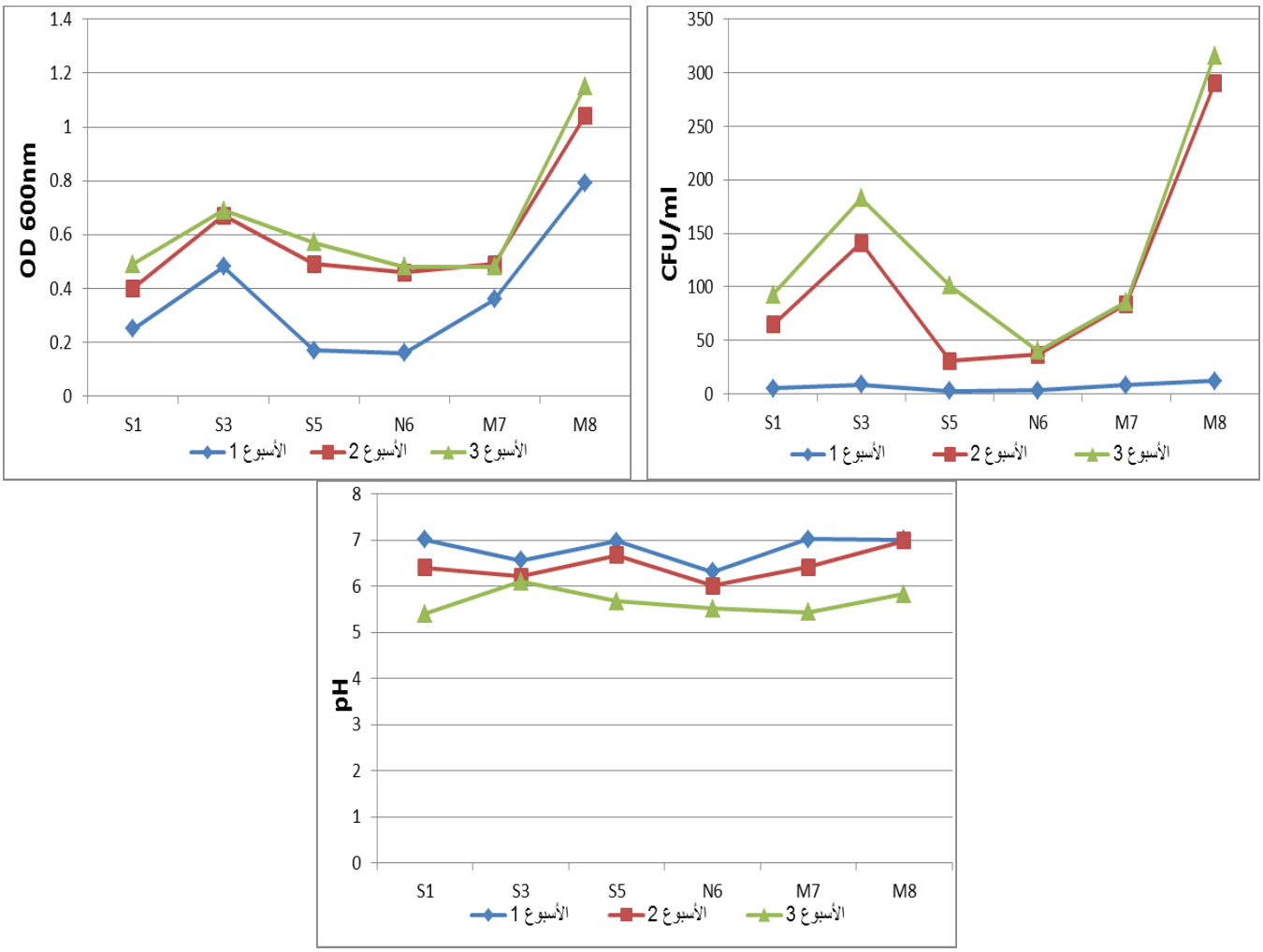
أظهرت معظم السلالات المعزولة مقدرة على النمو على الأوساط الصلبة الحاوية الجفت والنفط الخام، فقد أبدت 8 سلالات مقدرة على النمو على الأوساط الحاوية الجفت، وأظهرت 6 سلالات فقط مقدرة على النمو على الأوساط الحاوية النفط الخام، مما يؤكد قدرة السلالات على استعمال هذه الملوثات كمصدر وحيد للكربون والطاقة، وبالتالي إمكان استعمالها في التفكيك الحيوي لهذه المركبات.

ثم انتُخبت السلالات التي أبدت أكبر قدرة على النمو على الأوساط الصلبة الحاوية على الملوثات لإجراء الاختبارات اللاحقة لدراسة حركيتها في النمو ضمن الوسط السائل الحاوي المادة المختبرة، من خلال قياس الامتصاصية الضوئية OD 600nm والتعداد الكلي للجراثيم TVC (CFU/ml) والرقم الهدروجيني pH، إذ اختُيرت 3 سلالات تنتمي إلى جنس *Streptomyces* (S1,S3,S5)، وسلالة من الجنس *Nocardia* (N6) وسلالتين من الجنس *Micromonospora* (M7, M8) في حالة الجفت (الجدول 4، الشكل 2).

الجدول (4) تغيرات pH والعدد الكلي للجراثيم TVC (CFU/ml) والكثافة الضوئية (OD 600nm) في الوسط السائل الحاوي الجفت والسلالة المختبرة.

السلالة	الأسبوع الأول			الأسبوع الثاني			الأسبوع الثالث		
	pH	TVC (10^7*)	OD (600nm)	pH	TVC (10^7*)	OD (600nm)	pH	TVC (10^7*)	OD (600nm)
S1	7.01	5.4	0.25	6.40	65	0.40	5.40	93	0.49
S3	6.56	8.9	0.48	6.21	141	0.67	6.10	183	0.69
S5	6.98	2.6	0.17	6.67	31	0.49	5.67	101	0.57
N6	6.31	3.5	0.16	6.01	37	0.46	5.51	40	0.48
M7	7.02	8.3	0.36	6.41	84	0.49	5.44	86	0.48
M8	7.01	12.1	0.79	6.99	290	1.04	5.83	316	1.15

توضيح: OD: الكثافة الضوئية في طول موجة 600nm، TVC: التعداد الكلي للجراثيم (10^7*) مقدراً CFU/ml.



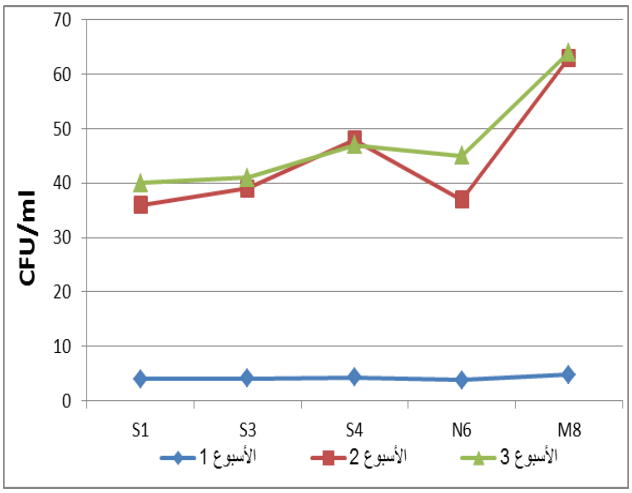
الشكل (2) تغيرات pH والعدد الكلي للجراثيم TVC (CFU/ml) والكثافة الضوئية (OD 600nm) على مدى ثلاثة أسابيع في الوسط السائل الحاوي الجفت والسلالة المختبرة.

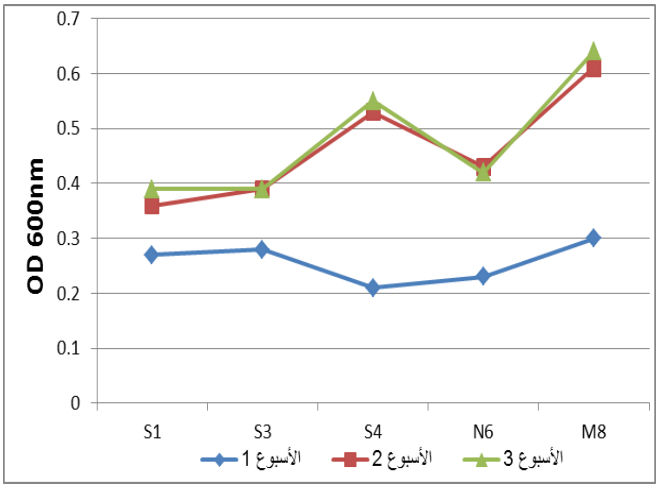
أما فيما يتعلق بالنفط الخام فقد اختُيرت 3 سلالات تابعة للجنس *Streptomyces* (S1,S3,S4) وسلالة من الجنس *Nocardia* (N6) وسلالة من الجنس *Micromonospora* (M8) (الجدول 5، والشكل 3).

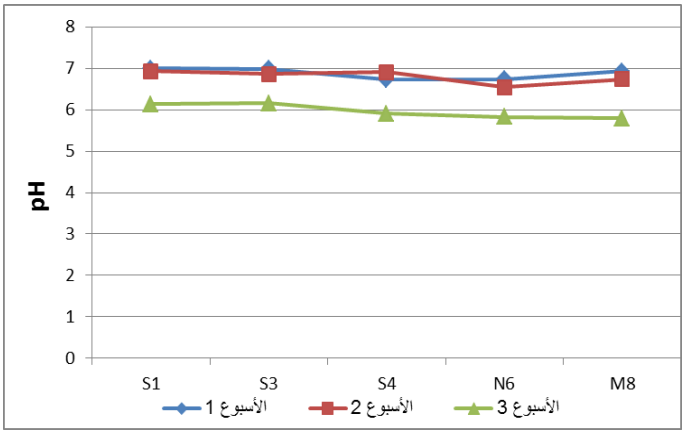
الجدول (5) تغيرات pH والعدد الكلي للجراثيم TVC (CFU/ml) والكثافة الضوئية (OD 600nm) في الوسط السائل الحاوي النفط الخام والسلالة المختبرة.

السلالة	الأسبوع الأول			الأسبوع الثاني			الأسبوع الثالث		
	pH	TVC (10^7*)	OD (600nm)	pH	TVC (10^7*)	OD (600nm)	pH	TVC (10^7*)	OD (600nm)
S1	7	4	0.27	6.93	36	0.36	6.13	40	0.39
S3	6.98	4.1	0.28	6.86	39	0.39	6.16	41	0.39
S4	6.72	4.3	0.21	6.9	48	0.53	5.9	47	0.55
N6	6.73	3.8	0.23	6.54	37	0.43	5.82	45	0.42
M8	6.93	4.8	0.3	6.74	63	0.61	5.79	64	0.64

توضيح: OD: الكثافة الضوئية في طول موجة 600nm، TVC: التعداد الكلي للجراثيم (10^7*) مقدراً CFU/ml.







الشكل (3) تغيرات pH والعدد الكلي للجراثيم TVC (CFU/ml) والكثافة الضوئية (OD 600nm) على مدى ثلاثة أسابيع في الوسط السائل الحاوي النفط الخام والسلالة المختبرة.

حيث أظهرت الدراسة مقدرة السلالات على النمو بوضوح ضمن الوسط السائل الحاوي الجفت كمصدر وحيد للكربون وهذا يتفق مع بعض الأبحاث التي أكدت وجود زيادة واضحة في نمو الأحياء الدقيقة بشكل عام والشعّيات بشكل خاص في حال وجود OMWW ضمن الوسط السائل (الجدول 4 والشكل 2) (Gamba *et al*., 2005, Makki *et al*., 2006)، وكانت مقدرة السلالات على النمو ضمن الوسط الحاوي النفط الخام أقل نسبياً، ومعظمها من الجنس *Streptomyces* (الجدول 4 والشكل 2)، حيث أظهر معظم السلالات قدرة كبيرة على النمو في الأوساط السائلة المدروسة خصوصاً في الأسبوع الثالث من الحضن، إذ تؤكد بعض الدراسات التي أجريت حول تأثير الجفت والهيدروكربونات على أن الجراثيم تدخل في البداية فترة كمون ثم تتطور قدرتها على التفكيك مع زيادة فترة الحضن بسبب الوقت الذي تتطلبه السلالة الجرثومية حتى تتكيف مع الإضافة الجديدة للوسط من المادة المختبرة والبدء بتفكيكها واستعمالها كمصدر للكربون والطاقة (Okerentugba and Ezeronye, 2003, Al-Awadhi *et al*., 2007, El Hassani *et al*., 2007)، ومن الممكن أن يعود ذلك لوجود الإنزيمات المسؤولة عن التفكيك في أوج نشاطها خلال هذه الفترة من النمو، كما تترافق زيادة النمو مع زيادة قدرة السلالات المختبرة على استعمال المادة المدروسة؛ وبالتالي زيادة كثافة الخلايا، حيث استعمل النمو الجرثومي كدالة على تطور مقدرة السلالات على استعمال المادة المدروسة، إذ أبدت السلالة M8 أكبر مقدرة على التفكيك فبلغ عدد الخلايا $316*10^7$ في حالة الجفت (الجدول 3، الشكل 1)، أما في حالة للنفط الخام فقد بلغ $64*10^7$ (الجدول 5، الشكل 3)، حيث تتفق هذه النتائج مع نتائج بعض الدراسات الأخرى التي أكدت على قدرة الجراثيم على تفكيك بعض الملوثات العضوية بسبب قدرتها على إنتاج الإنزيمات المفككة لهذه الملوثات (Malkawi *et al*., 2009)، كما انخفضت قيمة الرقم الهيدروجيني في الأوساط المدروسة، إذ انخفضت من 7.01 إلى 5.40 في السلالة S1 عند نموها في الوسط السائل الحاوي الجفت (الجدول 3، الشكل 1)، ومن 6.93 إلى 5.79 في السلالة M8 عند نموها في الوسط الحاوي النفط الخام (الجدول 4، الشكل 2)، حيث يؤكد الانخفاض في قيمة الرقم الهيدروجيني للوسط السائل المدروس على التغيرات الكيميائية التي طرأت على الوسط بفعل السلالات نتيجة تأثير الإنزيمات المفككة وبالتالي قدرة سلالات الشعّيات على التفكيك مما يتفق مع بعض الدراسات التي تؤكد على المدى الواسع الذي تتحمله سلالات الشعّيات من الرقم الهيدروجيني (Atlas and Bartha, 1972, Oboh *et al*., 2006, Al-Awadhi et al., 2007)، ففي حالة تفكيك النفط الخام بفعل الأحياء الدقيقة تتكوّن حموض عضوية ومستَقْلَبات أخرى يمكن أن تترك تأثيرها في قيمة الرقم الهدروجيني (Okpokwasili and James, 1995). وبذلك يتبين أن سلالات الشعّيات من الممكن أن تؤدي دور مهم جداً في تفكيك الجفت والنفط الخام (Björklöf *et al*.,2009, Karpouzas *et al*., 2010)، ويعود ذلك إما لقدرة موجودة أساساً لدى هذه الأحياء على التفكيك أو لتكيفها مع ظروف الوسط وتعرضها لمثل هذه المواد الكيميائية السامة (Survery *et al* ., 2004, Pizzul 2006, Kebria *et al.,* 2009).

الاستنتاجات والتوصيات

أكدت دراستنا على مقدرة الشعّيات على النمو في الأوساط السائلة الحاوية الجفت والنفط الخام بالتالي قدرة السلالات على استعمال هذه الملوثات كمصدر وحيد للكربون والطاقة، حيث استغرقت السلالات المختبرة فترة تصل إلى أسبوعين أو أكثر لتصل إلى كثافة مرتفعة من النمو، مما يؤكد على إمكان الاعتماد على هذه السلالات المحلية في التخلص من بعض الملوثات العضوية وحل مشكلات التلوث بالسموم العضوية، مثل الجفت والنفط الخام بكلفة قليلة

ودون أي آثار بيئية ضارة، ولا بدّ من استكمال مثل هذه الدراسات لعزل المزيد من السلالات ذات القدرة الكبيرة على النمو في الأوساط السائلة الملوثة بهذه المركبات للاستفادة منها لاحقاً، إضافةً إلى أن الفهم الجيد للعمليات الاستقلابية التي تقوم بها هذه الجراثيم يؤدي إلى زيادة مقدرتها على التفكيك؛ وبالتالي تسمح باستعمالها بسرعة وسهولة في تقانات المعالجة الحيوية للملوثات الصناعية.

المراجع

كبيبو، عيسى؛ شاهين، هيثم؛ نصور، عبد الله؛ ناصر؛ أميمة. معالجة المخلفات الناتجة عن معاصر الزيتون باستخدام الجراثيم، دمشق، مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية 2007.

ناصر، أميمة. مساهمة في دراسة المعالجة البيوكيميائية للمياه الناتجة عن معاصر الزيتون لإنتاج الغاز الحيوي، رسالة أعدت لنيل درجة الدكتوراه في البيئة المائية، أحياء دقيقة، جامعة تشرين، كلية العلوم، قسم علم الحياة النباتية، 2008.

يوسف، نهاد.؛ العلي، خليل.؛ بوشي، كندة. عزل جراثيم من رتبة منتجة لصادات حيوية من أتربة شمال سوريا. مجلة بحوث جامعة حلب، سلسلة العلوم الأساسية، 2004، العدد 41.

ABOU-ELELA, G. *Phenotypic characterization and numerical taxonomy of some Actinomycetes strains isolated from Burullos Lake*. Egyption Journal of Aquatic Research, , vol. 31 no. 2, 2005, 125-144.

Al-AWADHI, H.; SULAIMAN, R.; MAHMOUD, H. M.; RADWAN, S. S. *Alkaliphilic and halophilic hydrocarbon-utilizing bacteria from Kuwaiti coasts of the Arabian Gulf.* Appl Microbiol Biotechnol, 77, 2007, 183–186

Al-MALAH, K.; AZZAM, M.; ABOU-LAIL, N. *Olive Mills Effluent Wastewater Post-treatment Using Activated Clay*. Sep. Purif. Technol., 20, 2000, 225-234.

AMUND, O. O. & IGIRI, C. O. *Biodegradation of petroleum hydrocarbon under tropical estuarine conditions.* World J. Microbiol. Biotechnol., 6 (3), 1990, 255-262.

ARUNACHALAM, R.; WESELY, E.; GEORGE, J.; ANNADURAI, G. *Novel Approaches for identification of Streptomyces noboritoensis TBG-V20with cellulase production.* Curr. Res. Bacteriol. 3(1), 2010, 15-26.

ATLAS, R. M.; & BARTHA, R. *Degradation and mineralization of petroleum by two bacteria isolated from coastal waters*. Biotechnol Bioeng,14, 1972, 297-308

BAYAT, A.; AGHAMIRI, S. F.; MOHEB, A.; VAKILI-NEZHAAD, G. R. *Oil spill cleanup from sea water by sorbent materials*. Chemical Engineering & Technology 28, 2005, 1525-1528.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T. *Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation*. Bioresource Technology 96, 2005,1049-1055.

BERGY . *Bergy's manual of determining bacteriology*, 1989, 2005.

BESARATINIA, A. & FFEIFFER, G.P. *Enhancement of the mutagenicity of benzo (a) pyrene diolepoxid by a non-mutagenic dose of UVA radiation*. Cancer Res., 63, 2003, 8708-8716.

BJÖRKLÖF, K.; KARLSSON, S.; FROSTEGÄRD, A.; JØRGENSEN, K. *Presence of Actinobacterial and Fungal Communities in Clean and Petroleum Hydrocarbon Contaminated Subsurface Soil*. Microbiol J. 3, 2009, 75–86

BRAUTASET, T.; SEKUROVA, O. N.; SLETTA, H.; ELLINGSEN, T.E.; STRLM, A. R.; VALLA, S.; ZOTCHEY, S.B. *Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in Streptomyces noursei ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway*. Chem Biol. Jun;7(6), 2000, 395-403.

CAPASSO, R.; EYVIDNTE, A.; SCHIVO, L.; ORRU, G.; MARCIALES, M. A.; CRISTINZIO, R. *Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters.* J.Appl. Bacterial, 79, 1995, 393-398.

CATELANI, D.; MOSSEL, G.; NIENHANS, J.; TRECEANI, V. *Microbial degradation of aromatic hydrocarbons used as rector coolants*. Experimentia, 26, 1970, 922-925.

CHITTI, T.; SOMBOON, T.; TAKASHI, I.; KHANIT, S.; TAKUJI, K. *Micromonospora : isolation & purification.* J Gen Appl Microbiol, Aug ;51 (4), 2005, 229-34 16205030..

DELILLE, D. & COULON, F. *Comparative mesocosm study of biostimulation efficiency in two different oil-amended sub-Antarctic soils.* Microbial ecology 56, 2008, 243-252.

El HASSANI, F.Z.; ZINEDINE, A.; MDAGHRI A. S.; AISSAM, H.; ERRACHIDI, F.; MERZOUKI, M.; BENLEMLIH, M. *Effect of Olive Mill Vegetable Water Spreading on Soil Microbial Communities and Soil Properties.* Wourld Journal of Agricultural Sciences 3, (5), 2007, 663-669.

FADIL, K.; CHAHLAOUI, A.; OUAHBI, A.; ZAID, A.; BORJA, R. *Aerobic Biodegradation and Detoxification of Wastewaters from the Olive Oil Industry*. Int Biodeter Biodegr, 51, 2003, 37-41.

GAMBA, C.; PIOVANELLI, C.; PAPINI, R.; PEZZAROSSA, B.; CECCARINI, L.; BONARI, E. *Soil Microbial characterristics and mineral nitrogen availability as affected by olive oil waste water applied to cultivated soil*. Communications in Soil Sciences and Plant Analysis, 36, 2005, 937-950.

HAMAMURA, N.; OLSON, S.; WARD, D; INSKEEP, W. *Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils*. Appl Environ Microbiol, 72,63, 2006;16–24.

HARWATI, T. U.; KASAI, Y.; KODAMA, Y.; SUSILANINGSIH, D.; WATANABE, K. *Characterization of Diverse Hydrocarbon-Degrading Bacteria Isolated from Indonesian Seawater*. Indonesian Seawater Microbes Environ, 22, 2007, 412-415 .

KARPOUZAS, D. G.; NTOUGIAS, S.; ISKIDOU, E.; ROUSIDOU, C.; PAPADOPOULOU, K. K.; ZERVAKIS, G. I.; EHALIOTIS, C. *Olive mill wastewater affects the structure of soil bacterial communities*. Applied Soil Ecology ,Volume 45, Issue 2, June 2010, Pages 101-111

KEBRIA, Y.; KHODADADI, A.; GANJIDOUST, H.; BADKOUBI, A.; AMOOZEGAR M. A. *Isolation and characterization of a novel native Bacillus strain capable of degrading diesel fuel*, Int. J. Environ. Sci. Tech, 6 (3), 2009, 435-442,.

MAKKI, A.; DHOUIB, A.; SAYADI, S. *Changes in microbial and soil properties following amendment with treated and untreated olive mill waste water.* Microbial. Res., 161, Issue 2, 13, 2006, 93-101

MALKAWI, H. I.; JAHMANI, M. Y.; HUSSEIN, E. H.; AL-HORANI, F. A.; AL-DEEP, T. M. *Investigation on the ability of soil bacterial isolates to degrade petroleum hydrocarbons.* International Journal of Integrative Biology, Vol. 7, No. 2, 2009, 84- 93.

MARGESIN, R.; LABBE, D.; SCHINNER, F.; GRACER, C.W.; WHYTE, L.G. *Characterization of hydrocarbon degrading microbial population in contaminated and pristine alpine soil*. Appl. Environ. Microbiol., 69, 2003, 3085-3095.

MILLS, A.; BREUIL, C.; COLWELL, R. *Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method.* Canad J Microbiol, 24, 1978, 552-557.

MUIR, D. B. & PRITCHARD, R. C. *Use of the BioMerieux ID 32C Yeast Identification System for Identification of Aerobic Actinomycetes of Medical Importance,* Journal of Clinical Microbiology, Dec. 1997, p. 3240–3243.

NEWEKE, C.O. & OKPOKWASILI, G.O. *Drilling fluid base oil biodegradation potential of a soil Staphylococcus sp.* African J. Biotechnol., 2, 2003, 293-295.

OBOH, B. O.; ILORI, M. O.; AKINYEMI, J. O.; ADEBUSOYE, S. A. *Hydrocarbon degrading potential of bacteria isolated from Nigerian bitumen (Tarsand) deposit*. Nature and Science, 4(3), 2006,

OKERENTUGBA, P. & EZERONYE, OU. *Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria.* Afr J Biotechnol, 2, 2003, 288-292.

OKPOKWASILI, GC. & JAMES, WA. *Microbial contamination of kerosene, gasoline, and crude oil and their spoilage potentials.* Material u Organismen, 29, 1995, 147-156.

PIZZUL, L. *Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes.* Swedish University of Agricultural Sciences. Doctoral thesis, 2006.

QIU, D.; RUAN, J.; HUANG, Y. *Selective isolation and rapid identification of members of the Genus Micromonospora*. merican Society for Microbiology, 2008, p. 5593–5597.

RAHMAN, K. & RAHMAN T. *et al*., Occurance of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel stations. Microboil., 2002, 42: 286-293.

RAHMAN, K.; & RAHMAN, T.; *et al*., *Enhanced bioremediation of n-alkanes in petroleum sludge using consortium amended with rhamnolipids and micronutrients.* Bioresources Technol., 90, 2003, 159-168.

SCHAFER, A. N.; SNAPE, I.; SICILIANO, S. D. *Influence of Liquid Water and Soil Temperature on Petroleum Hydrocarbon Toxicity in Antarctic Soil.* Environmental Toxicology and Chemistry, 28, 2009, 1409-1415.

SEONG-JAE, K.; OHGEW, K.; RICHARD, C.; JAMES, P.; RICKY, D.; CARL, E. *Complete and Integrated Pyrene Degradation Pathway in Mycobacterium vanbaalenii PYR-1 Based on Systems Biology*. J. Bacteriol, vol. 189, no. 2, 2007, 464-472.

SHIRLING, E.B. & GOTTLIEB, D. *Methods for Characterization of Streptomyces Species.* INT. syst. Bact. 16, 1966, 313- 340.

SURVERY, S.; AHMAD, S.; ABDUS S. S.; AJAZ, M.; AJAZ R. S. *Hydrocarbon Degrading Bacteria from Pakistani Soil: Isolation, Identification, Screening and Genetical Studies*. Pakistan J ownal of Biological Sciences 7, (9), 2004, 1518-1522, 2004.

TRINDADE, P.; SOBRAL, L. G.; *et al*. *Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study*. Chemosphere, 58, 2005, 515-522.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P.; *Recent advances in petroleum microbiology.* Microbiology and Molecular Biology, Reviews 67, 2003, 503.

VAV BEILEN. J.; MARIN, M.; *et al*. *Characterization of two alkane hydroxylase genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium Alcanivorax borkumensis.* Environ. Microbiol, 6, 2004, 264-273.

VENTURA, M.; CANCHAYA, C.; TAUCH, A.; CHANDRA, G.; FITZGERALD, G.; CHATER, K.; SINDEREN, D. *Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2007, Vol. 71, No. 3, Vol. 71, No. 3, p. 495-548,.

VILA, J.; LOPEZ, Z.; *et al. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by Mycobacterium sp. Strain AP1: action of isolates on two and three-rings polycyclic aromatic hydrocarbons*. Appl. Environ. Microbiol., 67, 2001, 5497-5505.

VITĚZOYA, M. *Characterization of Actinomycetes Community From The Heavy Metals-Polluted Soil, Community From The Heavy Metales-Polluted Soil,* Acta Universitatis Agriculturae Et Silviculturae Medelianae Brunensis, 2013, Volume 163, 1471-1478.

ZHANG, Z.; SHEN, Q.; CISSOKO, N.; WO, J.; XU, X. *Catalytic dechlorination of 2,4- dichlorophenol by Pd/Fe bimetallic nanoparticles in the presence of humic acid.* Journal of Hazardous Materials, 182, 2010, 252-258.