مجلة جامعة تشرين للدراسات و البحوث العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (27) العدد (2) 2005
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research - Biological Sciences Series Vol. (27) No (2) 2005

دراسة بيوتكنولوجية لتفكك النترات والنتريت باستخدام سلالات من بكتريا الـ *Pseudomonas* المعزولة من مياه الصرف الصحي لمدينة اللاذقية

الدكتور مفيد ياسين*
لمى جرعا**

(قبل للنشر في 2005/6/2)

□ الملخّص □

يحدث أثناء عملية تفكيك النترات والنتريت في مياه الصرف الصحي المأخوذة من مصبات قنوات الصرف في مدينة اللاذقية تغير في نوعية هذه المياه يعود إلى وجود بعض الأنواع من الأحياء الدقيقة ولا سيمّا (البكتريا والفطور والطحالب والبروتوزوا) التي تستخدم المواد العضوية (مثل السكريات والبروتيدات والمواد الدسمة ...الخ) كمواد مغذية وهذه المياه تلائم بكتريا تتبع لأجناس وأنواع كثيرة حيث يعتبر جنس الـ *Pseudomonas* هو الغالب.

يعتبر هذا الجنس ذh قيمة هامة في التطبيقات والمصادر البيوتكنولوجية وليس فقط من الناحية الباثوجينية وإنما أيضاً من حيث نشاطه الاستقلابي والفيزيولوجي فتستخدم هذه البكتريا وبفعالية كبيرة المواد العضوية ذات الوحدات الجزيئية الصغيرة مثل النترات والنتريت وغيرها من المركبات.

يمثل هذا العمل دراسة بحثية للتفكك الحيوي لملوثات الوسط وخاصة النترات والنتريت من قبل بكتريا تفكيك النترات مثل النوع *Pseudomonas sp* و *Pseudomonas aeruginosa* والتي تم عزلها واختبارها على العديد من الأوساط المخبرية والطبيعية من مياه الصرف من مختلف المناطق لمدينة اللاذقية والتي جمعت من ثلاث مصبات تجميع في مناطق شاطئية (أفاميا، الكورنيش الجنوبي، الرمل الجنوبي) وتم العمل في مختبر البيولوجيا في كلية العلوم – جامعة تشرين.

فقد تم عزل 12 سلالة تتبع للنوع *Pseudomonas aeruginosa* واثنتان للنوع *Pseudomonas*.sp من مياه الصرف الصحيّ، فوجد أن السلالات التي تنتمي للجنس *Pseudomonas* تخفض من 30-90% من النترات، و 50-90% من النتريت الموجودة في الأوساط المستخدمة خلال 48 ساعة وتحولها إلى بعض المركبات الآزوتية الأخرى باستخدام أنزيم النترات ريدوكتاز وأنزيم النتريت ريدوكتاز، وتبين أن السلالة *Pseudomonas aeruginosaLs2.4* تخفض 86.12% من النترات، و83.57 %من النتريت، والسلالة *Pseudomonas aeruginosa Lc1.5* تخفض 89.84% من الـ NO_3^-، و89.69 % من الـ NO_2^-، والسلالة *Pseudomonas aeruginosa La2.5* تخفض 87.67 % من الـNO_3^-، و 83.57 % من الـ NO_2^- والسلالة *Pseudomonas sp Ls8.2* تخفض 89.98% من النترات و88.58 % من النتريت.

* أستاذ مساعد في كلية الصيدلة– جامعة تشرين – اللاذقية– سوريا.
** طالبة ماجستير– قسم علم الحيوان– كلية العلوم– جامعة تشرين – اللاذقية– سوريا.

مجلة جامعة تشرين للدراسات و البحوث العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (27) العدد (2) 2005
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research - Biological Sciences Series Vol. (27) No (2) 2005

Biotechnological Study of Degradation of Nitrate and Nitrite by Isolated *Pseudomonas* from Lattakia Waste Water.

Dr. Moufid Yassine*
Lama Jaraa**

(Accepted 2/6/2005)

□ ABSTRACT □

During the denitrification of Lattakia waste water the quality of water changes due to the presence of some species of microorganisms (Bacteria, Fungi, Algae and Protozoa) which utilize the organic substances such as (Glucides, protides, lipids, …etc) as nutrients. It was found that the occurrence of the bacteria belonging to a wide rang of genus and species, with genus *Pseudomonas* predominating. This genus has a considerable and important value in biotechnological resources and applications, not only in their pathogenicity but also for their metabolism and physiological activity. These bacteria use much more efficiently the organic substances small molecules units such nitrate, nitrite and some other.

This work belongs to a research study on biodegradation of environmental pollutants with nitrate and nitrite, which studies denitrifying bacteria such *Pseudomonas sp* and *Pseudomonas aeruginosa.* They were tested in labs and naturally in waste water of deferent areas at Lattakia. (Afamia, south beach and south sand). Tests were done in biological labs in faculty of sciences at Tishreen University.

12 strains of *Pseudomonas aeruginosa* and two of *Pseudomonas. Spwere isolated* from waste water. It was found that strains of *Pseudomonas* were reduced of 30-90 % from NO_3^- and 50-90% from NO_2^- during 48 hours contained in used medium to some other nitrogenous compounds using the enzyme nitrate reductase and enzyme nitrite reductase. it was also found that strains *Pseudomonas aeruginosaLs2.4* removed of 86.12% from NO_3^- and 83.57% from NO_2^-, while with strains *Ps.aeruginosaLc1.5* were reduced 89.84% NO_3^- and 89.69 %NO_2^- and strains *Ps.aeruginosaLa2.5* removed of 87.67 %NO_3^- and 83.57 % NO_2^-, and strains *Pseudomonas sp8.2* 89.98 % NO_3^- and 88.58 % NO_2^-.

***Associate Professor- Faculty Of Pharmacy- Tishreen University-Lattakia, Syria**
**** Master Student, Zoological Department, Faculty Of Science - Tishreen University-Lattakia, Syria**

المقدمة:

يزداد بشكل مستمر حجم الماء الملوث من خلال الاستهلاك المنزلي والخدمي والصناعي والذي يؤثرعلى نوعية المياه الطبيعية وعلى التربة وبالتالي على صحة الإنسان و الكائنات الحية بشكل عام.

ماء الصرف الصحي Waste water عبارة عن ماء مستخدم في المنازل و يضاف إليه مياه الأمطار التي تسقط في الشوارع، وأيضاً بعض المياه الصناعية التي لا تحتوي على محطات معالجة خاصة في منشآتها والمجمعة في قنوات الصرف للمدن (Tchobanolous G.1996).

تحتوي هذه المياه على المواد العضوية من مصادر نباتية و حيوانية في حالة مواد خام (السكريات وهيميسللوز ونشاء وغليكوجين ومواد بروتينية وشحوم.....الخ) في مختلف درجات التحلل وكالعادة تحتوي هذه المياه أيضاً على الفضلات الصلبة للإنسان والحيوانات المنزلية والبولة وفضلات المنشآت الزراعية وتربية الدواجن بالإضافة إلى المنظفات والأملاح المعدنية والتي يمكن أن تتواجد ذائبة بشكل محاليل أو معلقات غروية أو دقائق صلبة كبيرة الحجم(Curtis et al. 1994).

إن محتوى هذه المياه بتلك المواد والمغذيات يؤدي إلى تواجد أعداد كبيرة من الأحياء الدقيقة المختلفة مثل *الفطور Fungi* والبكتريا*Bacteria* والطحالب *Algae* وغيرها والتي تضم عوامل ممرضة Pathogenic agents، ويمكن أن تحتوي على هيفات Hypha وأبواغ Spori وفيروسات *Viruses* وبعض البروتوزوا *Protozoa* و بشكل عام لا تنمو الأحياء الدقيقة الممرضة في هذه المياه ولا حتى في الأحواض الطبيعية وإنما تتواجد هناك بشروط حياتية مؤقتة (Bitton G.1994).

تقوم هذه الكائنات الحية سواء المتعايشة بشكل طبيعي بمياه الصرف الصحي أم غير المتعايشة باستهلاك المغذيات والمركبات الموجودة في هذه المياه، وتؤدي إلى بعض العمليات الكيميائية الحيوية وتفكيك هذه المركبات وتحللها في مسارات مختلفة للتخلص منها والحصول على مياه أقل تلوثاً أو محتوىً في المركبات والمواد التي تلعب دوراً في تلوث المياه بكافة أشكالها والتي بدورها تؤثر على الوسط المحيط بشكل كامل ومنها الإنسان (Fukui M.,et al.1999).

تطورت مع تقدم السنين سلسة من الطرق الفيزيائية والكيميائية في معالجة مياه الصرف والتي أصبح بعضها غير مقنع أو لا يملك جدوى اقتصادية من تطبيقه حيث فرضت بعض المشاكل إيجاد طرق متزامنة تكون أكثر فعالية والتي استبدلت بالطرق الحديثة كالطرق البيوتكنولوجية Biotechnological methods لمعالجة مياه الصرف الصحي، والذي أخذ بالحسبان التلوث بالنترات والنتريت كمؤشر تحذيري للانتباه وتفادي التلوث بهذه المواد (Ratledge R.2001).

أثبتت الدراسات أن الكثير من مياه الصرف في المناطق والمدن تحتوي على كميات كبيرة من النترات والنتريت تتجاوز الحدود المسموح بها (45 ملغ/ل من NO_3^-، 0.2 ملغ/ل من NO_2^-) وهذه الملوثات ترتشح إلى المياه الجوفية أو تصب في الأحواض المائية (أنهار، بحيرات، مستنقعات، بحار) فتؤدي إلى تلوث مصادر المياه الصالحة للاستخدام والشرب(Grigg N.S.1996).

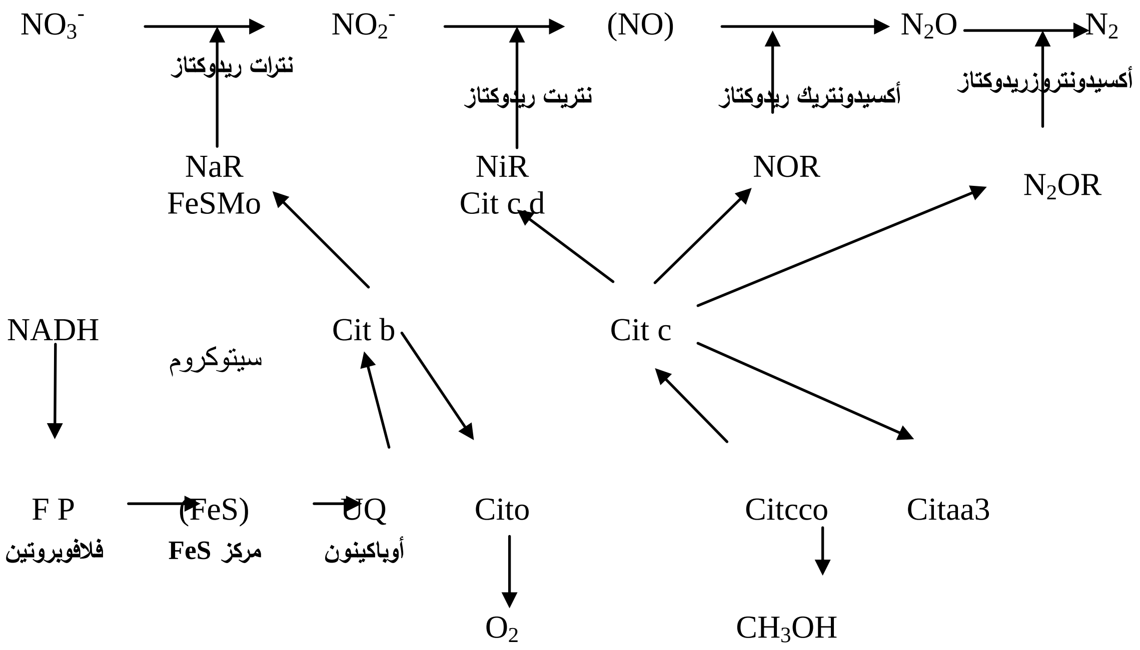
لذلك فإن أفضل طريقة لمعالجة المخلفات هو استخدام العمليات البيولوجية في الماء الآسن بعد تجميعه واستبعاد المواد الصلبة الموجودة في الحالة الغروية، بالإضافة إلى معرفة المحتويات العضوية واللاعضوية وتتم إما بوجود الأكسجين أو بغيابه (عمليات هوائية أو لا هوائية) وكل عملية تحتاج إلى أنظمة خاصة لاستخدام الأحياء

الدقيقة كما هي أو المثبتة (Immobilization) على حوامل بطرق مختلفة معروفة، حيث تعالج هذه المياه في محطات بيولوجية للتخلص من النترات والنتريت قبل طرحها في الطبيعة. (Tchobanoglous G,.1996)،(Doan H.D.,et al,2003).

عملية تفكيك النترات والنتريت Denitrification عبارة عن عملية بيولوجية منجزة لدى البكتريا حصراً، حيث تخفض مركبات النترات أو النتريت أو كلاهما بعد امتصاصها إلى أكاسيد غازية مثل أكسيد الآزوت NO أو ثاني أكسيد الآزوت N2O والذي يرجع إلى الآزوت الجزيئي N_2 ففي هذه العملية النترات أو منتجات إرجاعه تستخدم كمستقبل للإلكترونات من أجل أكسدة بعض المركبات العضوية واللاعضوية (المغذيات) مثل المواد السكرية والبروتينية والمركبات الكبريتية ....الخ التي تستخدمها لنموها ولإنتاج الطاقة فالمنتج النهائي لعملية الإرجاع يكون بأغلبه N_2 في الشروط الهوائية وأحياناً يترافق بمنتج الإرجاع الجزيئي N_2O في الشروط اللاهوائية كما هو موضح في التفاعل النهائي لعملية تفكيك النترات (Michael J.,et al.,2002)

$$NO_3^- \longrightarrow NO_2^- \longrightarrow (NO) \longrightarrow N_2O \longrightarrow N_2$$

$$\text{Glucose} + 4,8NO_3^- + 4,8H^+ \longrightarrow 6CO_2 + 2,4N_2 + 8,4H_2O$$



الشكل(1) يوضح عملية تفكيك النترات و النتريت Denitrification

تشكل بكتريا الـ Denitrification مجموعة بيوكيميائية وتصنيفية متغايرة التغذية وتفضل استخدام O_2 كمستقبل نهائي للإلكترونات فهي قادرة على العيش في الشروط الهوائية (Knowles R. 1990).

ومن هذه البكتريا أجناس مثل *Pseudomonas, Flavobacterium, Micrococcus, Alcaligenes*...الخ، ويعتبر الجنس *Pseudomonas* الذي يضم الكثير من الأنواع الهامة بيوتكنولوجياً وليس فقط من الناحية الباثوجينية Pathogene وإنما في نشاطه الاستقلابي والفيزيولوجي باحتوائه على العديد من الأنزيمات

المفككة للسكريات ولمركبات الكلوريدات وللنترات والنتريت، واحتوائه على مختلف البلاسميدات التي تستخدم في نقل مختلف الوظائف الحيوية وراثياً (Schmid R.D.2003)(Kristensen,G.H.,et al. 992).

تعتبر مدينة اللاذقية من المدن الزراعية والاستهلاكية وشبه الصناعية وتعتبر مياه الصرف الصحي الناتجة عن قنوات المدينة ومناطقها غنية بالنترات والنتريت من مصادر الأسمدة الزراعية ومخلفات الإنسان والحيوانات الداجنة و ورشات التصنيع المحلية والمنشآت الصناعية والتي تطرح في هذه القنوات بدون وجود محطات معالجة محلية أو على مستوى المحافظة.

تمثل مياه الصرف المجمعة خليط من المواد الصلبة والسائلة التي تأتي من مصادر منزلية أو صناعية أو الصرف المطري ومع استبعاد أيّة معالجة أو مراقبة لنوعية الماء الناتج والذي يصرف بكامله في مناطق شاطئية مسكونة أو قريبة من السكن أو سياحية مما يؤثر على التنوع الحيوي في المصبات (الأنهار، السواقي، البحر) وعلى نوعية المياه السطحية والجوفية ويؤدي إلى اختلال في التوازن البيئي للمنطقة الساحلية وتشكل الكثير من المركبات الطيارة وغير الطيارة الملوثة للوسط المحيط.

وتم عزل وتقدير بعض السلالات من هذه المياه بزراعتها على أوساط عادية أو أوساط اصطناعية ومن ثم دراسة عملية تخفيض المركبات الآزوتية، مع العلم بأن الدراسة تمت في مخابر كلية العلوم في جامعة تشرين من العام2004– 2005.

المواد و الطرائق:

1– عينات المياه Sampling of waste water

تم أخذ العينات في تواريخ نظامية شهرية من مناطق مختلفة لمصبات قنوات الصرف الصحيّ في مدينة اللاذقية (من مصب أفاميا ومصب الكورنيش الجنوبي ومصب الرمل الجنوبي) حيث تجمع فيها مياه الصرف المنزلية والخدمية والصناعية، بالإضافة إلى بعض المزارع في ضواحي البلد والتي جميعها تصب في البحر بدون معالجة وتتصف هذه المياه بغناها بالمواد الآزوتية أكثر من الحدود المسموح بها والتي تتجاوز 300 ملغ/ل للنترات و0.4 ملغ/ل للنتريت.

تم اختيار المواقع الثلاثة بسبب الاختلافات في توريد مياه الصرف إليها، نظراً للكثافة السكانية المتغيرة في تلك المناطق بين فصول العام المختلفة بالإضافة للنشاطات المتنوعة في كل منطقة، جمعت العينات المستخدمة في هذه الدراسة اعتباراً من شهر أيار عام 2004 وحتى شهر نيسان 2005 واستخدمت لعزل ودراسة البكتريا المفككة للنترات والنتريت.

2–الأوساط الزرعية المستخدمة و الأحياء الدقيقة Microorganisms and Cultural medium

لقد تم استخدام عدة أوساط للزراعة والعزل والتنقية منها أوساط اختيارية Selective وأخرى تفريقية (انتقائية)Differential ومغذية Enrichment وأوساط طبيعية من مياه الصرف الصحيّ كما يلي:

<u>**1– الأوساط الطبيعية Natural medium**</u> وهي الأوساط المأخوذة من مياه الصرف الصحي في مدينة اللاذقية والتي تم عليها العمل المخبري بدراسة وتحديد الخواص الفيزيوكيميائية و الميكروبيولوجية لها.

<u>**2 – أوساط العزل و التنقية Isolated and selective medium**</u> تم عزل وتنقية الأنواع المدروسة ودراسة الصفات المورفولوجية والفيزيولوجية على الأوساط التالية:

– وسط الستراميد آغار (Scharlau)Cetrimide agar (Pseudomonas selective agar) وهو وسط جامد لانتقاء وعزل الـ *Ps.aeruginosa* ويتركب من (Gelatin peptone,$MgCl_2$, K_2SO_4,Agar,Cetiltri methyl-Ammonium Bromide,Glycerol)

– وسط الأست أميد Acetamide medium (Scharlau):وهو وسط مغذي وتأكيدي لوجود الـ *Ps.aeruginosa* وهو يتركب من (Acetamide, $MgSO_4$, NaCl, $FeSo_4$, K_2HPO_4, Na_2MoO_4).

– وسط (King B agar) F(Scharlau): وهو وسط جامد مميز للأنواع التابعة لجنس الـ *Pseudomonas* والتي تملك القدرة على إنتاج أصبغة الفلورسين Fluorescein ويتركب من (Meat peptone ,Casein peptone , K_2HPO_4,$MgSO_4$ Agar).

– وسط دراسة شروط النمو يتركب من ($FeCl_3$, CH_3COONa, KH_2PO_4, $_2HPO_4$ $NaNO_2$, $CuSO_4$ (Glucose $MgSO_4$,NH_4NO_3

3– الأوساط المغذية Nutritional medium

– وسط Nutrient agar (LAB M): وهو وسط جامد مغذٍ عام يتركب من (Meat extract, yeast extract ,peptone, NaCl, Agar).

– وسط النترات بروث Nitrate broth(Scharlau): وسط سائل لتنمية الأحياء الدقيقة التي تعمل على تحويل النترات إلى الآزوت الجزيئي ويتركب من ($Peptone,Meatextract,KNO_3$).

– وسط نتريت بروث Nitrite broth (Scharlau): وسط سائل لتنمية الأحياء الدقيقة التي تعمل على تحويل النتريت إلى آزوت جزيئي ويتركب من (Peptone,Meat extract,$NaNO_2$).

4– الأحياء الدقيقة المعزولة Selected Microorganism تم عزل 12سلالة من الـ *Pseudomonas aeruginosa* وسلالتين من الـ *Pseudomonas sp.* كما هو مبين في الجدول رقم(1) ينتمي الجنس المدروس *Pseudomonas* إلى فصيلة Pseudomonadaceae ورتبة Pseudomonadales وهو بكتريا وحيدة الخليّة تنتمي لمجموعة غرام السالبة، متحركة بسوط واحد أو أكثر قطبي، كل الأنواع قادرة على إنتاج أصبغة الفلوريسين Fluorescent pigments في وسط يحوي الحديد إلا أن بعضها غير قادر على ذلك مثل سلالات الـ *Ps.syringae*. إن الأنواع التابعة لهذا الجنس قادرة على النمو في وسط K B medium الخاص بتمييز الأنواع المنتجة للفلوريسين (Holt J.G.,et al.1994) ويضم هذا الجنس أكثر من 950 نوعاً والكثير من الأنواع التابعة له قادرة على النمو في أوساط تحوي ملوثات ومركبات تعتبر سامة عند وجودها بتراكيز أكثر من الحد المسموح به مثل الكادميوم والفضة والرصاص والزئبق والكروم(Ackerley D.F., et al. 2004)، ومركبات عضوية أخرى حيث تستخدمها كمصدر للكربون أو للآزوت(Grimm A.C. et al. 1995, Aneez P.Y.A. et al.1996,). ينتشر النوع *Pseudomonas aeruginosa* بشكل واسع جداً في الطبيعة حيث يلاحظ في جميع الأنظمة المائية وعلى أسطح النباتات وفي التربة وعلى أعضاء الحيوانات (Michael J.,et al.2002) ويعتبر هذا النوع الوحيد المعروف حالياً المنتج للبيوسيانين وهو يتحرك بسوط قطبي وحيد ، يخمر الغلوكوز ولا يخمر المالتوز، موجب اختبار الكاتالاز، وأهم ميزاته أنه يستطيع النمو بدرجة حرارة 42 درجة مئوية، ولا ينمو بدرجة 4 مئوية ويتميز بقدرته على استهلاك مركبات كثيرة واستخدامها كمصدر للكربون والآزوت (Desh M.M.,et al,2001) نظراً لاحتوائه على الأنزيمات التي تسمح له بذلك وأهم هذه الأنزيمات نترات ريدوكتاز ونتريت ريدوكتاز (Hasegawa N.M.,ET AL.2003, Burlat B., et al.2005).

3- طرق التحليل Analytical methods

*** الأجهزة و الأدوات المستخدمة:**

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

*** المواد و الكواشف المستخدمة Materials and reactives**

وسط السترامید آغار(Scharlau)، وسط الأست اميد (Scharlau)، وسط نترات بروث(Scharlau)، وسط نتريت بروث(Scharlau)، وسط F-agar(Scharlau) والمواد الكيميائية التالية: HCl (Merck)، $MgCl_2$ (Himedia)، $H2SO_4$ (BDH)، EDTA (Merck)، $KmnO_4$ (LGC)، NaCl (Himedia)، كلوروفورم (Merck)، ثيوسلفات الصوديوم (BDH)، NaOH (EKA chemicals)، C_2H_5OH (وطني)، غليسيرول(وطني)، $NaHCO_3$(Pro labo)، Na_2CO_3 (Pro labo)، حمض الساليسيليك (BDH)، حمض السلفانيليك (BDH)، حمض الكالكوكربونيك (BDH)، KI (BDH)، HgI (BDH)، طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم (Medex)، KNO_3(Merck)، $BaCl_2$ (Himedia)، ألفا نفتالامين (BDH)، $NaNO_2$ (Merck), غلوكوز، فركتوز، سكروز، لاكتوز، نشاء(BDH)..... وغيرها.

*** التحاليل التي تم إجراؤها**

- تحديد درجة الحرارة بواسطة ميزان حرارة زئبقي.
- تحديد قيمة درجة الحموضة بوساطة جهاز الـ pH.
- تعداد الخلايا البكتيرية للأنواع المدروسة بطريقة التمديد بالأنابيب والزرع بأطباق بتري.
- تقدير كمية الأكسجين المنحل: باستخدام طريقة وينكلر Winkler (Rodier J.1978).
- تقدير كمية متطلب الأكسجين الحيوي BOD_5: باستخدام طريقة وينكلر Winkler (Rodier J.1978).
- تقدير كمية المتطلب الكيميائي للأكسجين COD: بالمعايرة ببرمنغنات البوتاسيوم (Rodier J.1978).
- العيار القلوي T.A: باستخدام المعايرة بحمض الكبريت N/50 بوجود مشعر الفينول فيتالئين
- العيار القلوي الكامل T.A.C: باستخدام المعايرة بحمض الكبريت N/50 بوجود مشعر الهليانتين
- القساوة الكليّة والقساوة الكلسية: بإضافة المعقد الثلاثي EDTA ,N/50 (Rodier J.1978).
- تقدير تركيز النترات NO_3^-: باستخدام طريقة ساليسيلات الصوديوم (Rodier J.1978).
- تقدير تركيز النتريت NO_2^-: باستخدام كواشف غريس (Griess A,Griess B)(Rodier J.1978).
- تقدير تركيز الأمونيا NH_4^+: باستخدام كاشف نسلر Nessler(Rodier J.1978).

النتائج و المناقشة:

1. صفات مياه الصرف الصحي المستخدم في الاختبارات

عند إجراء التحاليل المخبرية على مياه الصرف الصحي الناتجة عن الاستخدام في مدينة اللاذقية تميزت هذه المياه بالخواص التالية: حيث كان متوسط كمية الـ COD= 154.95 ملغ O_2/ل، ومتوسط BOD_5 =86.82 ملغO_2/ل، وشوارد الأمونيا تجاوزت 50 ملغ/ل، وشوارد NO_3^- بتركيز يتراوح بين 300-330 ملغ/ل، وشوارد NO_2^- بتركيز0.3 – 0.43 ملغ/ل، ومتوسط العيار القلوي T.A =0.36 ومتوسط القلوي الكامل T.A.C =0.35 ومتوسط

الحموضة pH= 7.3 ومتوسط القساوة الكلية = 19.62 ومتوسط القساوة الكلسية = 11.8 ومتوسط القساوة المغنزيومية = 7.61 ومتوسط كمية الأكسجين المنحل =5.1 ملغ/ل بالإضافة إلى اللون الذي يميل إلى العكر ورائحته مشابهة لرائحة البيض الفاسد.

2. عزل و تنقية الأحياء الدقيقة المفككة للنتراتDenitrifying microbial isolation and screening

1.2-عزل انتقائي و تأكيدي لسلالات الـ *Pseudomonas* من مياه الصرف تم جمع العينات المدروسة من مياه الصرف الصحيّ waste water المستخدمة في مدينة اللاذقية والتي تحتوي وبشكل طبيعي على نظم حيوية Biosystems وهي غنية بالمغذيات والمواد الكيميائية التي تساعدها في عملية التفكك الحيوي Biodegradation للمواد الموجودة في مياه الصرف الصحي.

تمت دراسة عملية العزل والتنقية بزرع العينات التي تم جمعها في أطباق بتري تحوي وسط ستراميد آغار وذلك بعد التخفيف بأنابيب تحوي وسط سائل مغذي ومن ثم عزلت ولعدة مرات على وسط ستراميد آغار حتى الحصول على مزارع معزولة بشكل نقي وحفظت في أطباق بتري ثم نقلت إلى أنابيب تحوي الوسط المذكور وذلك بعد التأكد منها وتصنيفها بإجراء الاختبارات المناسبة إلى عدد من السلالات التي تتبع للنوع *Pseudomonas aeruginosa* والنوع *Pseudomonas sp* ووضعت تحت اسم La وLc وLs حيث أن الرمز L يدل على محافظة اللاذقية والرموز s,c,a تدل على المناطق التي أخذت منها العينات وهي على الترتيب أفامياAfamia، الكورنيش الجنوبي South coast ، والرمل الجنوبي South sand، مع رقمين يدل الأول على شهر العزل والثاني علىالرقم المتسلسل للطبق، كما هو موضح في الجدول رقم (1).

نلاحظ من الجدول(1) انتشار أنواع كثيرة تتبع للجنس *Pseudomonas* وخاصةً النوع *Ps.aeruginosa* في مياه الصرف الصحي في مدينة اللاذقية، وأن اللون المرئي للمزارع كان مختلفاً قليلاً مع فروق في النمو على أوساط المقارنة و التأكيدية.

الجدول رقم (1) يوضح سلالات الـ *Pseudomonas* المعزولة من مياه الصرف الصحي في مدينة اللاذقية

رقم العينة	رقم العزلة	الكائن الحي الدقيق	رمز السلالة	شكل المستعمرة	لون المزرعة على وسط الستراميد	لون المزرعة على وسط F- agar	اختبار الأست اميد	مكان الجمع	ملاحظات
1	3	*Ps.aeruginosa*	Ls3.1	مسننة	أبيض	+	+	الرمل الجنوبي	* أبيض مخضر ** أخضر
2	3	*Ps.aeruginosa*	Ls3.6	مسننة	أبيض	+	+	الرمل الجنوبي	*أبيض مصفر ** بلون أصفر
3	1	*Ps.aeruginosa*	La1.3	دائرية	أبيض	–	+	أفاميا	*لون أبيض **بيض مخضر
4	1	*Ps.aeruginosa*	La1.4	مسننة	أبيض مصفر	–	+	أفاميا	**أصفر مخضر
5	1	*Ps.aeruginosa*	Lc1.1	مسننة	شفاف	–	+	الكورنيش الجنوبي	**أبيض مصفر
6	1	*Ps.aeruginosa*	Lc1.5	دائرية	أبيض	+	+	الكورنيش الجنوبي	*أصفر مخضر ** أصفر مخضر

7	2	*Ps.aeruginosa*	Ls2.2	مسننة	أبيض	+	+	الرمل الجنوبي	*أبيض مصفر **أصفر مخضر
8	2	*Ps.aeruginosa*	Ls2.4	دائرية	أبيض	−	+	الرمل الجنوبي	*أبيض مصفر **أبيض مصفر
9	2	*Ps.aeruginosa*	Ls2.6	مسننة	أبيض مصفر	−	+	الرمل الجنوبي	*أبيض مصفر ** أبيض مصفر واختلفت عن Ls2.4 بعدم تجاوزها للدرجة30 ^{o}م.
10	2	*Ps.aeruginosa*	La2.4	مسننة	أبيض	−	+	أفاميا	* أصفر غامق ** أصفر مخضر
11	2	*Ps.aeruginosa*	La2.5	مسننة	أبيض	−	+	أفاميا	*أبيض مصفر **أصفر مخضر
12	2	*Ps.aeruginosa*	La2.6	مسننة	أبيض مصفر	−	+	أفاميا	* شفاف **أبيض مصفر
13	8	*Pseudomonas sp*	Ls8.2	مسننة	أبيض مصفر	+	−	الرمل الجنوبي	**أصفر مخضر ونمت حتى درجة 30^o م.
14	8	*Pseudomonas sp*	Lc8.2	مسننة	أبيض مصفر	+	−	الكورنيش الجنوبي	**أبيض مصفر ونمت حتى درجة 35 ^{o} م

*الوسط المغذي الذي يتركب من (ببتون، خلاصة لحم)، ** في الوسط الحاوي على بنزوات الصوديوم والذي يتركب من (ببتون، خلاصة لحم و بنزوات الصوديوم).

2.2- انتقاء سلالات الـ*Pseudomonas* العالية التفكيك للنترات و النتريت

Screening of *Pseudomonas* strains which nitrate and nitrite optimal degradation

تمت دراسة انتقاء السلالات عالية التفكيك للنترات والنتريت كلٍّ على حده في أرلينات سعة 250مل تحوي 100 مل من الأوساط السائلة المركبة من ($MgSO_4$, NH_4NO_3, K_2HPO_4, KH_2PO_4, CH_3COONa, $FeCl_3$, $CuSO_4$, KNO_3, Glucose) وبعد التعقيم بدرجة حرارة 120^{o}م لمدة 15 دقيقة وإعطاء البادئ تم الحضن على الدرجة 30-35 ^{o}م لمدة 48 ساعة على الشكل الآتي:

أ- دراسة تفكيك النترات بوساطة السلالات المعزولة في وسط صنعي

تم زراعة جميع المزارع الجرثومية المعزولة في وسط صنعي سائل وكان التركيز الأولي لنترات البوتاسيوم في هذا الوسط مساوياً لـ 1غ/ل، وبعد إعطاء البادئ من السلالات المعزولة وحضنها على درجة حرارة 30-35 ^{o}م لمدة 48 ساعة تم إجراء القياسات الكلية للنترات في الوسط وبشكل يومي كما هو موضح في الجدول (2).

ب- دراسة استقلاب النتريت باستخدام السلالات المعزولة في وسط صنعي

مع زراعة المزارع السابقة كلها في وسط صنعي سائل يحتوي على نتريت الصوديوم بدلاً من نترات البوتاسيوم وباتباع الطريقة نفسها في العمل في استقلاب النترات تم تحديد النتريت في الوسط الزرعي كل 24 ساعة كما هو موضح في الجدول رقم (3)

الجدول رقم(2) يبين النسبة المئوية لتخفيض النترات من قبل السلالات المعزولة

المزرعة	النسبة المئوية لانخفاض النترات	
	بعد 24 ساعة	بعد 48ساعة
La2.4	14.377	21.1
La2.5	18.414	87.665
La2.6	0.53	31.557
La1.3	24.364	65.777
La1.4	68.881	81.154
Ls2.2	64.104	64.603
Ls2.4	43.647	86.119
Ls2.6	72.226	72.435
Ls8.2	30.605	89.981
Ls3.1	9.794	17.915
Ls3.6	1.537	6.159
Lc1.1	2.601	31.75
Lc8.2	57.462	63.509
Lc1.5	22.274	89.836

الجدول رقم(3) يبين النسبة المئوية لتخفيض النتريت من قبل السلالات المعزولة

المزرعة	النسبة المئوية لانخفاض النتريت	
	بعد 24 ساعة	بعد 48 ساعة
La2.4	18.385	67.131
La2.5	31.198	83.566
La2.6	20.056	33.427
La1.3	18.106	38.162
La1.4	60.725	64.903
Ls2.2	34.541	62.117
Ls2.4	21.728	83.566
Ls2.6	20.613	59.053
Ls8.2	16.992	88.58
Ls3.1	37.884	64.624
Ls3.6	37.326	64.346
Lc1.1	33.984	51.254
Lc8.2	15.878	79.666
Lc1.5	45.404	89.694

نلاحظ من النتائج في الجداول (2) (3) أن السلالات المعزولة والمختبرة على النترات والنتريت تم استهلاكها بنسبة 1-72% و 16–60% على الترتيب خلال الـ 24 ساعة الأولى من الزرع وأصبحت 6-90% و34–90% على الترتيب بعد الـ 24 ساعة الثانية وكانت النسب مختلفة حسب السلالات وأن بعض السلالات أعطت قيماً عالية في التخفيض للنترات بين 64-90% على الترتيب Lc8.2 , Lc1.5 , Ls2.4 , La2.5 ,La1.4 ,Ls2.6 ,La1.3 , Ls8.2 ، وأن السلالات(Lc1.5, Ls8.2, Ls2.4, La2.5, Lc8.2) أعطت انخفاضاً عالياً في النتريت ليتراوح بين 62-90% خلال 48 ساعة من الزرع وكانت نسب التخفيض مختلفة ولكنها متقاربة وأن بعض السلالات المفككة جيداً للنترات أيضاً استقلبت النتريت بشكل مماثل، وكذلك بعضها الآخر التي لم تفكك النترات بشكل جيد فإنها تستطيع أن تخفض النتريت بنسب عالية وبالعكس وبالتالي تم اختيار أربع سلالات (Lc1.5, Ls8.2, Ls2.4, La2.5)فعالة استخدمت لدراسة الشروط المثالية لتفكيك النترات والنتريت.

3– الدراسة الاستقلابية للنترات والنتريت من قبل السلالات المنتقاة

Nitrate and nitrite metabolism by selected strains

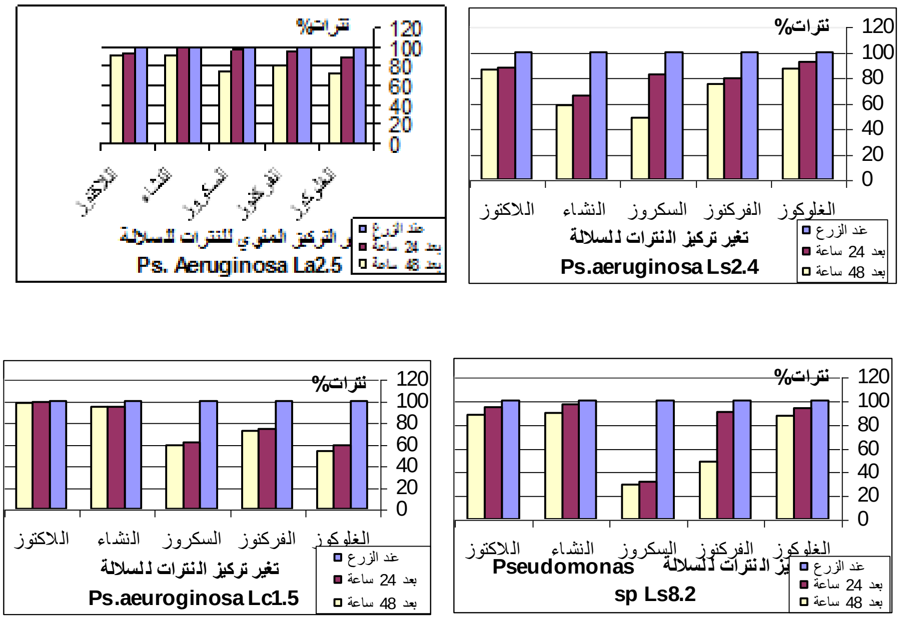
تمت دراسة الشروط المثالية لتفكيك النترات والنتريت بشكل مستقل من قبل سلالات الـ *Pseudomonas* المعزولة على أوساط صنعية سائلة ساكنة باستخدام البارامترات (تركيز النترات، تركيزالنتريت، تغير تركيز النترات والنتريت، مصدر الكربون، تغير تركيز الغلوكوز، درجة الحرارة، درجة الحموضة)، تمت زراعة السلالات المعزولة في أرلينات سعة 250 مل تحتوي 100 مل وسط محضر مخبرياً ومعقم (121^{o}م لمدة 15 دقيقة) مركب من ($MgSO_4$, NH_4NO_3, K_2HPO_4, KH_2PO_4, CH_3COONa, $FeCl_3$, $CuSO_4$, KNO_3, Glucose) وإعطاء 2 مل من البادئ الذي يحتوي على 5 x 10^6 خلية/1مل وحضنها لمدة 48 ساعة ثم دراسة الشروط الزرعية التالية:

<u>1– دراسة تفكك النترات والنتريت على أوساط صنعية مختلفة مصدر الكربون</u>

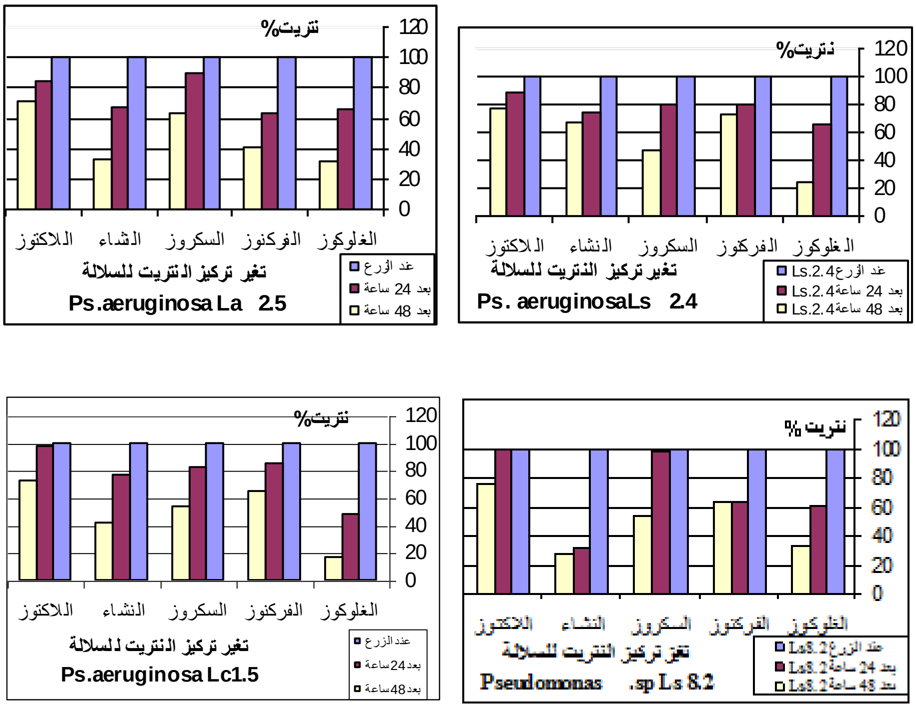
تم أخذ المزارع الأربعة المنتقاة وزرعت في أرلينات تحوي أوساط لها نفس التركيب من الأملاح مع تغيير مصدر الكربون على شكل مجموعتين:

أ – الزراعة الأولى مع أوساط صنعيّة سائلة تحتوي على نترات البوتاسيوم 1 غ/لتر مع تغير مصدر الكربون على الترتيب غلوكوز، فركتوز، سكروز، نشاء ولاكتوز.

ب– الزراعة الثانية مع نفس الوسط المحتوي على نتريت الصوديوم بدلاً من نترات البوتاسيوم مع تغير مصدر الكربون وبعد إعطاء البادئ حضنت الزراعتان لمدة 48 ساعة في درجة حرارة 30-35^{o}م وتم تحديد انخفاض النترات والنتريت كما هو موضح في الشكل (2) والشكل (3).



الشكل (2) يبين نسب تخفيض النترات عند الزراعة للسلالات المعزولة في أوساط سائلة مع تغيير مصدر الكربون في درجة حرارة 30–35^{o}م ولمدة 48 ساعة.



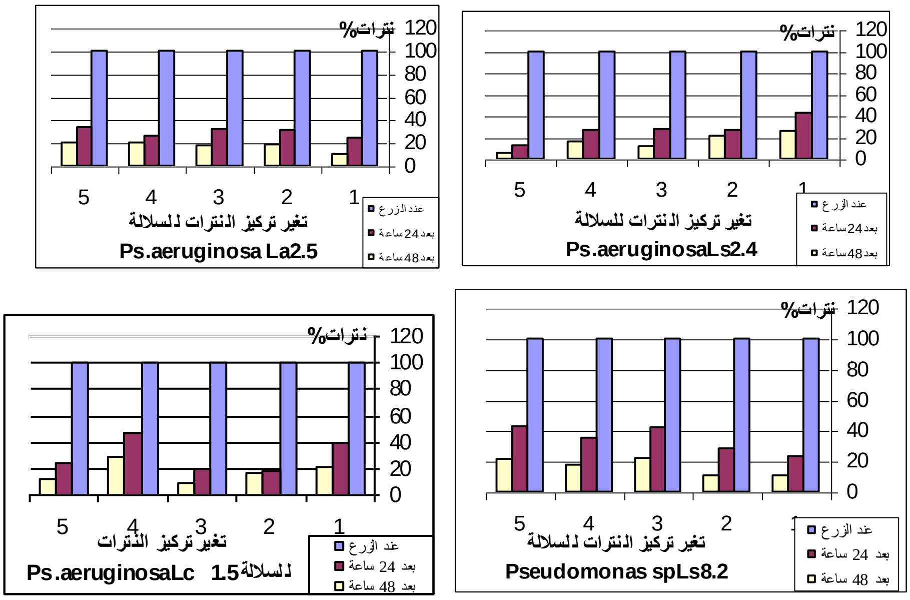
الشكل (3) يبين نسب تخفيض النتريت عند الزراعة للسلالات المعزولة في أوساط سائلة مع تغير مصدر الكربون في درجة حرارة 30–35^{o}م لمدة 48 ساعة.

تفسر المخططات في الشكل(2) أن السلالتين *Ps.aeruginosa* Ls2.4 ،*Ps. aeruginosa* La2.5 خفضتا النترات حوالي 10–50% و 10–25% على الترتيب في الأوساط جميعها وأن السلالة *Pseudomonas* .sp Ls8.2 قد استهلكت النترات بحدود 70% في وسط يحوي السكروز ووصل إلى حدود 50% في وسط يحوي فركتوز، و10% في وسط النشاء واللاكتوز كل على حدة بينما السلالة *Ps. aeruginosa*Lc1.5 فككت بنسبة40–45% من النترات خلال 24 ساعة الأولى فقط ولم تتجاوزها خلال الساعات الـ24 التالية وذلك في الوسط الحاوي على الغلوكوز والسكروز وبنسبة 35% في وسط الفركتوز.

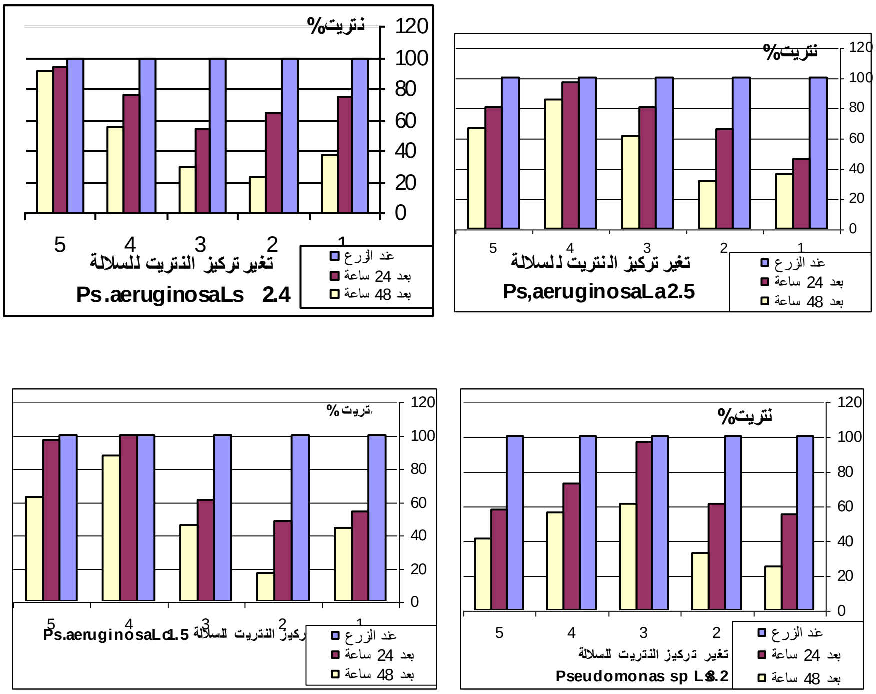
ويفسر الشكل(3) بأن السلالتين *Ps. aeruginosa* La2.5 و *Pseudomonas* .spLs8.2 استهلكتا النتريت بشكل جيد في مختلف مصادر الكربون بحدود 70 % وليصل 80% للسلالة *Ps. aeruginosa*Ls2.4 ويتجاوز الـ 83% عند السلالة *Ps. aeruginosa*Lc1.5 في وسط يحوي الغلوكوز بعد 48 ساعة من الزرع وقد أعطت السلالات جميعها نتائج جيدة في وسط يحوي النشاء كمصدر للكربون وكانت النسبة حوالي 60% وأن السلالة Pseudomonas .spLs8.2 خفضت النتريت إلى 75% في وسط يحوي النشاء بينما التخفيض كان ضعيفاً في وسط يحتوي على اللاكتوز وبشكل عام تملك السلالات المختبرة قدرة كبيرة على تخفيض النترات والنتريت في وسط يستخدم فيه الغلوكوز و الفركتوز و السكروز و النشاء بنسب عالية يليها بشكل أقل في وسط يحوي على اللاكتوز مما يدل على أن السلالات تملك نشاط أنزيمي عالي لاستخدام السكريات الموجودة في مياه الصرف الصحي كمصدر للكربون.

2– دراسة استقلاب النترات والنتريت في أوساط تحوي تراكيز مختلفة من سكر الغلوكوز

تم زراعة المزارع الأربعة المعزولة في الوسط السائل الذي يحتوي على تراكيز مختلفة من سكر الغلوكوز تراوحت بين(2.5,2,1.5,1,0.5) غ/لتر، وذلك في الاختبار الأول مع النترات ، وفي الاختبار الثاني مع النتريت حيث استبدل KNO_3 بـ $NaNO_2$ وبعد إعطاء البادئ حضنت لمدة 48 ساعة في درجة حرارة 30-35 ^{o}م كما هو موضحاً في الشكلين (4) و(5)



الشكل(4) يبين تغير تراكيز النترات في زراعة السلالات *Pseudomonas* المعزولة على وسط متغير التراكيز بالغلوكوز لمدة 48 ساعة في درجة حرارة 30–35^{o}م



الشكل(5) يبين تغير تراكيز النتريت في زراعة السلالات *Pseudomonas* المعزولة على وسط متغير التراكيز بالغلوكوز لمدة 48 ساعة في درجة حرارة 30–35 ^{o}م

يلاحظ من المخططات في الشكل (4) أن جميع السلالات المدروسة تمتص النترات بين (80–98%) في جميع تراكيز الغلوكوز المستخدمة خلال 48 ساعة من الزرع.

أما المخططات في الشكل (5) توضح تفكك النتريت من قبل السلالات المنتقاة وأن تركيز النتريت في الوسط تأثر كثيراً بالتراكيز العالية من الغلوكوز حيث أعطت أفضل النتائج مع التراكيز المنخفضة للغلوكوز، وكان الانخفاض بالنتريت بين 60–82% في تراكيز (0.5 و1.5) غ/ل غلوكوز عند جميع السلالات أما في التراكيز العالية فكان الانخفاض ضعيفاً باستثناء السلالة *Pseudomonas* .sp Ls8.2 الذي وصل انخفاض النتريت عندها إلى 60% في التراكيز المرتفعة من الغلوكوز، ويستنتج من ذلك بأنه في التراكيز المنخفضة للغلوكوز يتم تفكيك النترات والنتريت عند جميع السلالات باستثناء السلالة *Pseudomonas* .sp Ls8.2 التي أعطت انخفاضاً بهما عند جميع التراكيز للغلوكوز.

3– دراسة تفكك النترات والنتريت في أوساط مختلفة درجة الحرارة

تم العمل بالطريقة السابقة ومع الوسط القياسي (بوجود1 غ/ل نترات البوتاسيوم في السلسلة الأولى، و1غ/ل نتريت الصوديوم في السلسلة الثانية) وحضنت الزراعات بدرجات مختلفة من الحرارة (10-20-30-40-50) ^{0}م وتم تحديد النترات والنتريت كل 24 ساعة والنتائج موضحة في الجداول (6)(7)

الجدول رقم(6) يوضح تغير تركيز النترات مع تغير درجة حرارة الوسط السائل الذي زرعت فيه السلالات المعزولة

درجة الحرارة ^{o}م	تركيز النترات عند الزرع %	السلالة *Ps.aeruginosa*La2.5		السلالة *Ps.aeruginosa*Ls2.4		السلالة *Pseudomonas*Ls8.2		السلالة *Ps.aeruginosa*Lc1.5	
		تركيز النترات %		تركيز النترات %		تركيز النترات %		تركيز النترات %	
		24 ساعة	48 ساعة	24 ساعة	48 ساعة	24 ساعة	48 ساعة	24 ساعة	48 ساعة
10	100	21.404	6.458	99.29	96.906	99.8	99.235	61.793	58.374
20	100	94.941	93.591	94.519	89.541	89.787	74.98	68.694	72.829
30	100	94.705	66.238	91.554	86.876	88.04	79.82	63.396	56.481
40	100	73.098	59.179	91.955	74.778	99.962	99.931	92.573	80.02
50	100	95.94	92.151	99.745	99.526	99.963	99.945	90.703	87.871

الجدول رقم(7) يوضح تغير تركيز النترات مع تغير درجة حرارة الوسط السائل الذي زرعت فيه السلالات المعزولة

درجة الحرارة ^{o}م	تركيز النتريت عند الزرع %	السلالة *Ps.aeruginosa*La2.5		السلالة *Ps.aeruginosa*Ls2.4		السلالة *Pseudomonas*Ls8.2		السلالة *Ps.aeruginosa*Lc1.5	
		تركيز النتريت %		تركيز النتريت %		تركيز النتريت %		تركيز النتريت%	
		24 ساعة	48 ساعة	24 ساعة	48 ساعة	24 ساعة	48 ساعة	24 ساعة	48 ساعة
10	100	66.288	53.541	44.475	16.997	32.861	24.079	41.643	21.529
20	100	53.541	34.844	50.708	33.994	49.575	26.121	50.708	20.396
30	100	65.722	31.444	65.09	23.796	60.906	32.861	48.158	16.546
40	100	65.722	24.929	68.271	35.977	35.127	30.311	51.274	7.365
50	100	69.971	38.81	98.016	94.617	86.402	71.104	69.971	47.875

يلاحظ من الجدولين (6)(7) بأن تركيز النترات و النتريت في الأوساط المختلفة درجات الحرارة المزروعة بسلالات من الـ *Pseudomonas* تختلف درجة تخفيضها لهذه التراكيز حسب درجة الحرارة فعند السلالة *Ps. aeruginosa*La2.5 كان التخفيض 94% في النترات عند درجة الحرارة 10^{o}م ووصل إلى 75% في النتريت عند الدرجة 40^{o}م، بينما عند السلالة *Ps. aeruginosa*Ls2.4 لم يتجاوز التخفيض الـ 25% في النترات إلى الدرجة40^{o}م و75–85% في النتريت بين 10–30^{o}م، أما عند السلالة *Pseudomonas*.spLs8.2 فقد وصل التخفيض بين 65–68% في النتريت بين 10–40^{o}م ولم يصل إلا إلى 25% في النترات عند الدرجة 20^{o}م أما السلالة *Ps.aeruginosa*Lc1.5 فقد وصل التخفيض عندها إلى 93% في النتريت عند 40^{o}م وإلى 45% في النترات عند 30^{o}م. بشكل عام يلاحظ اختلاف التغير في تركيز النترات والنتريت الممتصة من قبل السلالات المعزولة لهذه البكتريا حسب درجات الحرارة المدروسة وبالتالي هذا ينعكس على نشاط هذه السلالات المختلف حسب الشروط المناخية وبالأخص درجة الحرارة الملائمة لنموها وهذا ما يدل على وجود سلالات من هذه البكتريا متأقلمة للنشاط في كل أشهر السنة.

4– دراسة استقلاب النترات والنتريت في أوساط صنعية مختلفة بدرجة الـ pH

تم أخذ الوسط الحاوي على الغلوكوز كمصدر للكربون والأملاح المعدنية كوسط قياسي(مع1غ/ل نترات البوتاسيوم في السلسلة الأولى،ومع1 غ/ل نتريت الصوديوم في السلسلة الثانية) وحضّر منه عدد من الأوساط مختلفة درجة الحموضة مع القيم التالية(6، 6.5، 7، 7.5، 8) وزعت بالسلالات المعزولة على درجة حرارة 30–33^{o}م وتم إجراء التحاليل للنترات والنتريت يومياً ولمدة 48 ساعة والنتائج مدونة في الجداول رقم (8)(9)

الجدول رقم(8) يوضح اختلاف تراكيز النترات أثناء زراعة السلالات المعزولة من الـ *Pseudomonas* في أوساط مختلفة درجة الحموضة في حرارة 30-35 ^{o} م لمدة 48 ساعة

درجة الحموضة الـ pH	تركيز النترات عند الزرع %	السلالة *Ps.aeruginosa*La2.5 تركيز النترات % 24 ساعة	48 ساعة	السلالة *Ps.aeruginosa*Ls2.4 تركيز النترات % 24 ساعة	48 ساعة	السلالة *Pseudomonas*Ls8.2 تركيز النترات % 24 ساعة	48 ساعة	السلالة *Ps.aeruginosa*Lc1.5 تركيز النترات % 24 ساعة	48 ساعة
6	100	79.224	67	79.284	77.77	44.182	31.928	75.148	54.331
6.5	100	78.993	39.271	50.599	38.788	40.459	36.091	68.502	68.246
7	100	68.611	44	60.665	52.418	59.21	24.342	42.213	37.567
7.5	100	68.115	59.157	41.623	35.49	57.027	50.161	58.204	50.223
8	100	70.697	75.218	69.265	57.138	68.635	62.318	53.279	52.85

الجدول رقم(9) يوضح اختلاف تراكيز النتريت أثناء زراعة السلالات المعزولة من الـ *Pseudomonas* في أوساط مختلفة درجة الحموضة في حرارة 30-35 ^{o} م لمدة 48 ساعة

درجة الحموضة الـ pH	تركيز النتريت عند الزرع %	السلالة *Ps.aeruginosa*La2.5 تركيز النتريت % 24 ساعة	48 ساعة	السلالة *Ps.aeruginosa*Ls2.4 تركيز النتريت % 24 ساعة	48 ساعة	السلالة *Pseudomonas*Ls8.2 تركيز النتريت % 24 ساعة	48 ساعة	السلالة *Ps.aeruginosa*Lc1.5 تركيز النتريت% 24 ساعة	48 ساعة
6	100	66.288	53.541	44.475	16.997	32.861	24.079	41.643	21.529
6.5	100	53.541	34.844	50.708	33.994	49.575	26.121	50.708	20.396
7	100	65.722	31.444	65.09	23.796	60.906	32.861	48.158	16.546
7.5	100	65.722	24.929	68.271	35.977	35.127	30.311	51.274	7.365
8	100	69.971	38.81	98.016	94.617	86.402	71.104	69.971	47.875

نلاحظ من الجدول (8) بأن السلالة *Ps.aeruginosa*La2.5 تعمل بفعالية جيدة إلىpH تتراوح بين 6.5-7 فقد خفضت النترات بحدود55-60% خلال 48 ساعة لتصل إلى65% عند السلالة*Ps.aeruginosa*Ls2.4 عند pH = 7.5 وتبلغ حدود 65-75 % عند pH من (6 -7) و ذلك عند السلالة sp8.2 *Pseudomonas*، بينما التخفيض وصل إلى 63 % للسلالة *Ps.aeruginosa*Lc1.5 عند p H = 7. أما الجدول (9) يوضح أن تخفيض النتريت قد وصل إلى75% باستخدام السلالة *Ps.aeruginosa*La2.5 و ذلك عند pH =7.5 و 84% عند السلالة *Ps.aeruginosa*Ls2.4 وذلك عند pH = 6 و76% للسلالة sp8.2 *Pseudomonas* لـpH تتراوح بين 6-6.5 ليبلغ التخفيض في النتريت 84-93% عند السلالة *Ps.aeruginosa*Lc1.5 وذلك عند pH تتراوح بين 7-7.5 وبالتالي فإن سلالات الـ *Pseudomonas* تستطيع النمو و الحياة في أوساط مختلفة الـ pH، وأعطت أفضل القيم في تخفيض النترات و النتريت بين قيم من الـ pH = 6.5 -7.5 أي في الأوساط المعتدلة وهذا ما يلائمها في الوسط الطبيعي في مياه الصرف حيث الـ pH =6-7.5.

<u>5- دراسة تفكك النترات والنتريت في أوساط تحوي تراكيز مختلفة من النترات والنتريت</u>

بنفس الطريقة السابقة تم إجراء الاختبار الأول الخاص بالنترات والاختبار الثاني الخاص بالنتريت وذلك بوجود تراكيز مختلفة (0.5، 1، 1.5، 2، 2.5) غ/لتر من كل منهما وتم قياس تغير النترات و النتريت يومياً و لمدة 48

ساعة بعد زرعها بالسلالات المعزولة وحضنها على درجة حرارة 30-35°م و pH =7 تم الحصول على النتائج المدونة في الجداول (10)(11):

الجدول(10) يبين تغير تراكيز النترات باستخدام السلالات المنتقاة من الـ *Pseudomonas* مع تغير التراكيز بالنترات المضافة إلى وسط الزرع مع الحضن في درجة حرارة 30-35 ° م لمدة 48 ساعة

تغير تركيز نترات البوتاسيوم غ/ل	تركيز النترات عند الزرع %	السلالة *Ps.aeruginosa*La2.5		السلالة *Ps.aeruginosa*Ls2.4		السلالة *Pseudomonas*Ls8.2		السلالة *Ps.aeruginosa*Lc1.5	
		تركيز النترات %		تركيز النترات %		تركيز النترات %		تركيز النترات %	
		24 ساعة	48 ساعة	24 ساعة	48 ساعة	24 ساعة	48 ساعة	24 ساعة	48 ساعة
$0.5NO_3^-$	100	55.862	18.081	98.968	32.66	90.748	75.34	98.098	57.501
$1NO_3^-$	100	85.551	19.964	84.716	47.479	92.052	69.161	58.48	52.144
$1.5NO_3^-$	100	54.592	14.731	50.956	15.8	87.104	48.113	98.825	47.23
$2NO_3^-$	100	71.836	43.31	89.251	44.639	67.667	25.299	65.492	46.321
$2.5NO_3^-$	100	52.313	22.2	56.454	20.06	73.847	52.511	68.737	74.168

الجدول (11) يبين تغير تراكيز النتريت باستخدام السلالات المنتقاة من الـ *Pseudomonas* مع تغير التراكيز بالنتريت المضافة إلى وسط الزرع مع الحضن في درجة حرارة 30-35 ° م لمدة 48 ساعة

تغير تركيز نتريت الصوديوم غ/ل	تركيز النتريت عند الزرع %	السلالة *Ps.aeruginosa*La2.5		السلالة *Ps.aeruginosa*Ls2.4		السلالة *Pseudomonas*Ls8.2		السلالة *Ps.aeruginosa*Lc1.5	
		تركيز النتريت %		تركيز النتريت %		تركيز النتريت %		تركيز النتريت%	
		24 ساعة	48 ساعة	24 ساعة	48 ساعة	24 ساعة	48 ساعة	24 ساعة	48 ساعة
$0.5NO_2^-$	100	96.142	77.151	83.086	38.872	72.403	37.982	96.735	40.059
$1NO_2^-$	100	65.722	31.444	65.09	23.796	60.906	32.861	48.158	16.546
$1.5NO_2^-$	100	40.175	35.19	65.395	34.604	53.079	43.695	76.539	48.387
$2NO_2^-$	100	94.339	81.761	76.729	75.471	74.213	54.716	66.666	42.138
$2.5NO_2^-$	100	90.254	62.711	78.389	44.491	66.949	54.237	79.237	55.932

يتبين من الجداول (10) (11) أن السلالات المزروعة استطاعت أن تنمو بشكل جيد في أوساط تحتوي على تراكيز 1- 2 غ/ل من النترات حيث خفضته إلى نسبة 85% في تراكيز 1.5 غ/ل عند السلالتين *Ps. aeruginosa*La2.5 و *Ps.aeruginosa*Ls2.4 وتصل 55-75% عند السلالتين *Ps.aeruginosa*Lc1.5 و*Pseudomonas* Ls8.2 على الترتيب في تركيز 2 غ/ل من النترات.

أما في امتصاص النتريت فكانت أفضل النتائج في التخفيض عند التركيز 1غ/ل من النتريت بين 72-84% وأن بعض السلالات استطاعت أن تخفض النترات والنتريت سواء في الأوساط منخفضة أو المرتفعة التركيز بهما لكن بنسب مختلفة.

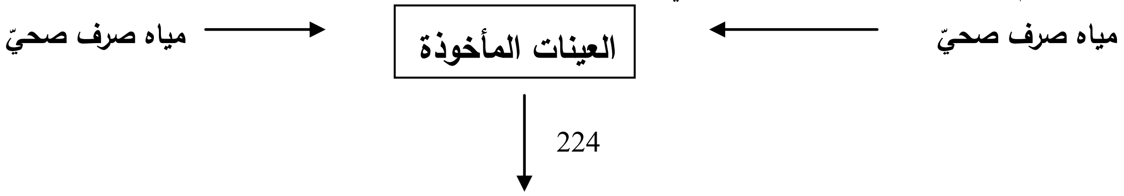
الاستنتاجات:

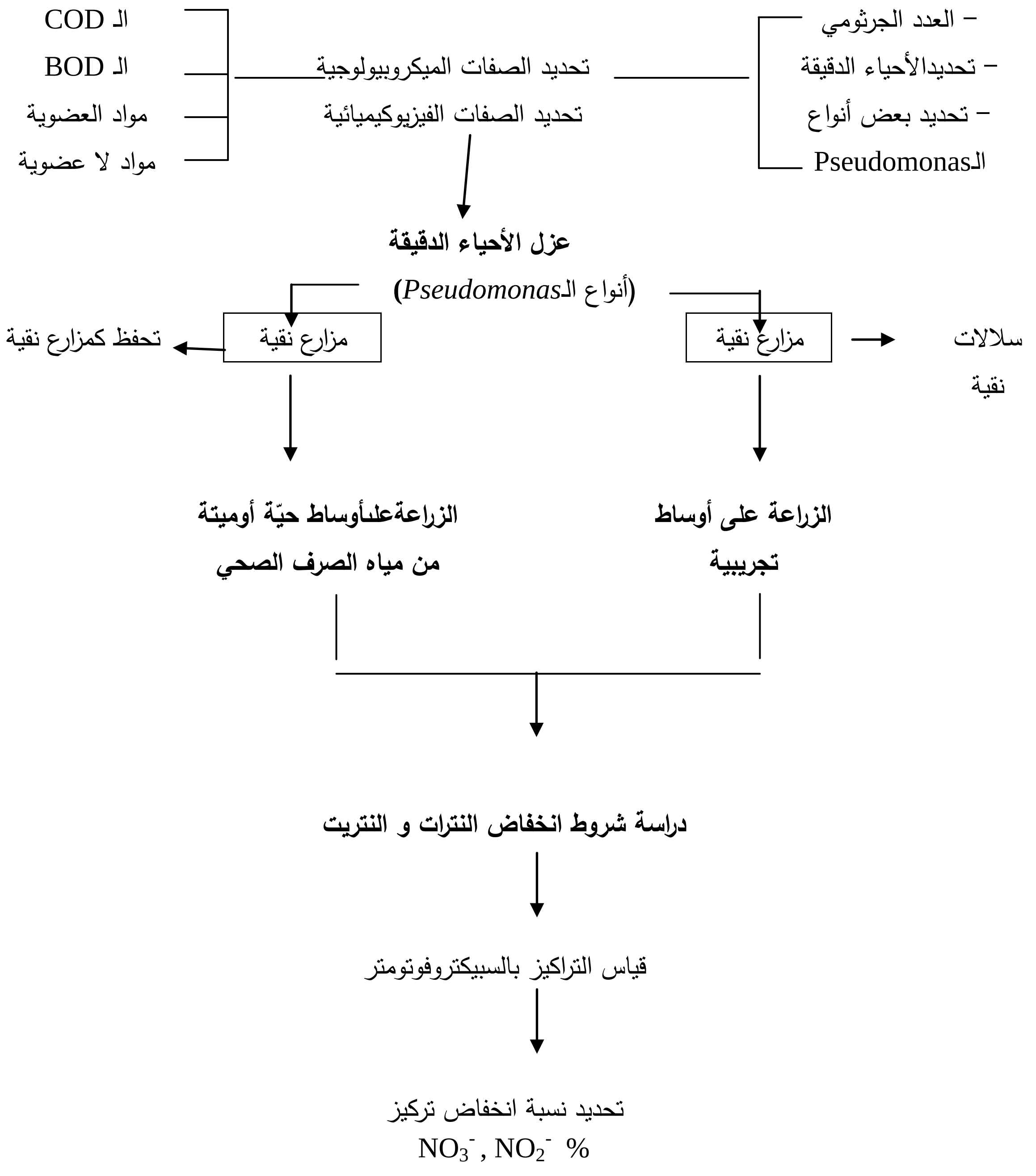
- تبين الدراسة أن مياه الصرف الصحيّ المستخدم في مدينة اللاذقية متنوعة حيوياً و يمكن الاستفادة منها في عملية التفكك الحيوي Bio degradation للملوثات والمواد الموجودة في هذه المياه بشكل طبيعي أو تطبيقي.
- تم عزل أربع عشرة(14) مزرعة جرثومية منتقاة من مياه الصرف الصحي وصنفت كسلالات تابعة لجنس الـ *Pseudomonas* وحفظت تحت رموز La,Lc,Ls حيث أن L تدل على اللاذقية و a,c,s هي Afamia ,South coast, South sand، مع أرقام تدل على شهر العزل و الرقم التسلسلي للمزارع.
- تمت دراسة ثلاث مزارع تابعة للنوع *Ps.aeruginosa* و واحدة تتبع للنوع *Pseudomonas sp* على أوساط صنعية وأخرى طبيعية أعطت نسب انخفاض في النترات بين 30-90%، و50-90% في النتريت.
- أعطت السلالة *Pseudomonas aeruginosaLs2.4* أفضل النتائج فخفضت 86.12% من النترات، و83.57 %من النتريت في الأوساط الحاوية عليها، وعند السلالة *Ps. aeruginosa Lc1.* كان التخفيض 89.84% من الـ NO_3^-، و89.69 % من الـ NO_2-، وعند السلالة *Ps.aeruginosa La2.5* كانت نسبة التخفيض87.67 % من الـNO_3^-، و 83.57 % من الـ NO_2^- أما عند دراسة السلالة *Pseudomonas sp Ls8.2* فإن أفضل تخفيض في تركيز النترات و النتريت الموجودة في الوسط كان 89.98% و88.58 % على الترتيب.
- عند دراسة تأثير مصدر الكربون تبين أن أفضل النتائج كانت في الوسط الذي يحتوي على الغلوكوز وأن هذه السلالات استطاعت النمو في أوساط مختلفة مصدر الكربون مما يدل على وجود جهاز أنزيمي متنوع وهذا يلائم نمو هذه البكتريا في مياه الصرف الصحيّ حيث تتوافر تراكيز كبيرة من السكريات.
- عند دراسة تأثير تغير تركيز الغلوكوز كمصدر للكربون تبين أن أغلب السلالات المختبرة أعطت نتائج عالية في تفكيك النترات لتتراوح (80–98%) في كل تراكيز الغلوكوز أما تفكيك النتريت فقد كان بين (60–82%) في التراكيز المنخفضة للغلوكوز باستثناء السلالة Pseudomonas .sp Ls8.2 التي أعطت انخفاضاً عند جميع التراكيز للغلوكوز.
- أعطت السلالات المعزولة نتائج جيدة في تخفيض النترات والنتريت (65–94%) لكليهما في مختلف درجات الحرارة سواء المنخفضة أو المرتفعة مما يدل على تنوع السلالات لهذا الجنس حسب درجات حرارة الوسط المحيط و أنها تتأقلم في كل الفصول.
- تبين عند دراسة تأثير درجة الحموضة أن أفضل النتائج في تخفيض النترات والنتريت (55–75%) و(75–93%) على الترتيب وكانت بين درجة p H 6 -7.5 لكافة السلالات وهذا ما يلائمها في الوسط الطبيعي في مياه الصرف الذي يملك نفس درجة الحموضة.
- تبين عند دراسة تأثير تغير تركيز المصدر الآزوتي (النترات أو النتريت) أن السلالات المعزولة استطاعت أن تنمو بشكل جيد في أوساط تحتوي على تراكيز 1– 2 غ/ل من النترات وتعمل على تخفيضه بنسبة 55–85% وأن هذه السلالات خفضت النترات بحدود 72–84% في التركيز 1غ/ل منه

وأن بعض السلالات استطاعت أن تخفض في النترات و النتريت في أوساط منخفضة أو مرتفعة التركيز بهما لكن بحدود مختلفة وبالتالي تتنوع هذه السلالات حسب تركيز النترات والنتريت وهذا يوافق عمل هذه السلالات في الوسط الطبيعي.

الخلاصة:

تقدم النتائج التي تم الحصول عليها بهذه الدراسة أنه يمكن استخدام المزارع المعزولة لتخفيض تركيز النترات و النتريت الموجودة في مياه الصرف الصحي الناتج عن مدينة اللاذقية إما بشكل طبيعي أو بإنشاء محطات معالجة بيولوجية تحتوي على هذه البكتريا كما هي أو بوساطة تثبيتها على حوامل بما تحتويه من صفات نوعية وتنوعها الملائم على مدار السنة حيث أنها قادرة على التأقلم حسب التغيرات الداخلية والخارجية في هذه المياه.





الشكل(6) مخطط عام يوضح خطوات عزل وزراعة الأحياء الدقيقة المخفضة للنترات و النتريت.

المراجع:

1- **Ackerley,D.F.,et.al.** 2004.Chromate reducing properties of soluble flavoproteins from Pseudomonas putida and Escherichia coli.*Applied &Environmental Microbiology* **70**(2):873-882.
2- **Aneez,P.Y.A.&Kunhi.A.A.M**.(1996)."Degradation of phenol through ortho-cleavage pathwayby*PseudomonasStutzeriStrain SPC2*." *Letters in Applied Microbiology*. **22**,26-29.
3- **Bitton, G.** (1994) Wastewater Microbiology. John Wiley & Sons, Inc.,Publication; USA. **3** 63-65.
4- **Burlat, B., Clarke,T.,et.al.(**2005)"Cytochrome c nitrite reductase: from structural to physicochemicalanalysis."*Biochemical Society Transactions*,33, 137-140.
5- **Curtis et al.**,(1994)"Management of water and wastewater solids for the 21st century". *Water Environment Federation*,pp.757-765
6- **Desh,M.M.,et.al.**(2001)"Plasmid-mediated dimethoate degradation in *Pseudomonas aeruginosa MCMB-427". Letters in Applied Microbiology*,Vol.**33**,pp.275-279.
7- **Doan, H.D.,et.al**.(2003). Biological and electrochemical treatment of wastewater. Vol. 78,No. **6**, pp. 632-641.
8- **Fukui, M.,et.al(**1999)."Anaerobic degradation of oil hydrocarbons by sulfate-reducing and nitrate-reducing bacteria." *Atlantic Canada Society for Microbial Ecology*, Halifax, Canada.
9- **Grigg,N.S.**(1996).Water Resources Management, Principles ,Regulations and Cases. McGraw-Hill, Inc. U.S.A.
10- **Grimm.A.C.& Harwood,C.S**.(1997)"Chemotaxis of *Pseudomonas spp*.to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene."*J. Appl .Environ .Microbial*. Vol.**63, No.**10,pp.4111-4115.
11- **Hasegawa,N.M.,et.al**.(2003) Need for cytochrome b c 1complex for dissimilatory nitrite reduction *Pseudomonas aeruginosa. Bio.Sci.Biotechnal.Biochem*,Vol. **67,No.**1,pp. 121-126.
12- **Holt, J.G.,et.al.**(1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Ed., Williams and Wilkins, Baltimore, U.S.A.
13- **Knowles, R.(**1990) "Acetylene Inhibition Technique: Development, Advantages, and Potential Problems", pp. 151-166, In: N.P. Revsbech and J. Sorensen (eds.) Denitrification in Soil and Sediment, Plenum Press, NewYork.
14- **Kristensen,G.H.,et.al** (1992) Characterization of functional microorganisms groups and substrate in activated sludge and wastewater by AUR, NUR and OUR. *Water Sci. Technol.***25** (6) 43-57.
15- **Michael,J.,et.al.**(2002) "Microbiology" TAT McGraw-Hill, New Delhi, India
16- **Ratledge, R.et.al.** (2001) Basic Biotechnology. Cambridge University Press, UK.
17- **Rodier j.**(1978)L,analyse de l,eau.Dunod, Paris, France.
18- **Schmid.R.D**(2003).Pocket Guide to Biotechnology and Genetic Engineering,1. Edi. John Wiley & Sons, Inc.,Publication; USA.
19- **Tchobanolous,G.**(1996) "Waste water treatment" Water Resources Hand Book.Edi. McGraw-Hill .U.S.A.