

العدد السابع عشر – 20/ ابريل 2017

## عزل وتعرف بكتيريا بحرية محللة للنفط الخام وقياس قدرتها على النمو في تراكيز مختلفة من النفط الخام والملحية وإمكانية تكوين مستحلب

\* أ. فايز عبد الحميد محمد، \*\* أ. فرج محمد شعيب.

( \* عضو هيئة تدريس - قسم علوم البيئة - كلية الموارد الطبيعية وعلوم البيئة - جامعة طبرق - ليبيا  
\*\* عضو هيئة تدريس - قسم علم النبات - كلية العلوم - جامعة عمر المختار - البيضاء - ليبيا )



## عزل وتعرف بكتيريا بحرية محللة للنفط الخام وقياس قدرتها على النمو في تراكيز مختلفة من النفط الخام والملحية وإمكانية تكوين مستحلب

### المخلص:

قد أدت الدراسات والأبحاث في مجال معالجة التلوث النفطي ومشتقاته إلى أن الكائنات الحية الدقيقة لها دور كبير في معالجة ذلك التلوث البيئي، وبالتالي الإسهام في التوازن البيئي حيث أن لها القدرة على الاستفادة من الهيدروكربونات كمصدر كربوني وحيد. ويستعرض هذا البحث إمكانية عزل البكتيريا المحللة للنفط الخام من مصفاة ومرسى الحريقة النفطي الخاص بتصدير النفط الخام، ومرسى شركة البريقة النفطي الخاص بتصدير المشتقات النفطية ومحطتي توليد الكهرباء وتحليه مياه البحر واللتان تستخدمان الوقود الثقيل في عمليات التشغيل بمدينة طبرق، والتي نتج عنها عزل 22 عزلة بكتيرية، تم زراعتها جميعا في أوساط غذائية سائلة مدعومة بالنفط الخام كمصدر وحيد للكربون والطاقة. ومن ثم تم تنمية العزلات في خمس تراكيز مختلفة من النفط الخام 1% ، 5% ، 10% ، 25% ، 50% وقد أظهرت بعض العزلات (W1Cb , W2Aa , W2Ab , W2Ca , W3Ba , W3C , W4Aa) قدرة على النمو بشكل متفاوت حتى تركيز 50% ، وكذلك تم تنمية العزلات في أربع تراكيز مختلفة من الملحية 1.2% ، 2.4% ، 3.6% ، 5% لتحديد التركيز الملائم لنمو هذه البكتيريا البحرية ولوحظ من خلال النتائج أن أفضل النماوات خلال تراكيز 2.4% ، 3.6% والمقارب لنسبة الملح في مياه البحر المتوسط والمقدر بـ 35 جرام للتر الواحد حسب العديد من الأبحاث السابقة . ثم تم اختبار قابلية العزلات على إنتاج المستحلبات الحيوية على مركبي الهكسان والتلوين ومن خلال النتائج اتضح أن العزلات القادرة على إنتاج مستحلب حيوي قادرة على تكسير الركييزة التي أنتجت عليها مستحلب حيوي. ومن ثم تم تعريف العزلات البكتيرية المنتخبة عن طريق طريقة 16S rRNA European Nucleotide Archive على التوالي وهي : (W2Aa , W2Ca , W3Ba , W3C , W4Aa)

العدد السابع عشر – 20/ ابريل 2017

## Marinobacter hydrocarbonoclasticus , Vibrio hepatarius , Vibrio alginolyticus , Vibrio parahaemolyticus and Eubacterium combesii

### Abstract

This work aimed at isolating oil-degrading bacteria from EL-Harika port in Tobruk city. Twenty-two bacterial isolates from EL-Harika port were grown on Liquid medium contained crude oil as a sole carbon source. The isolates were then grown in five different oil concentrations which were (1%, 5%, 10%, 25% and 50%). Some of the isolates (W1Cb, W2Aa, W2Ab, W2Ca, W3Ba, W3C and W4Aa) exhibited differential abilities of growth up to 50% oil. Moreover, these isolates were grown in four levels of salinity, which were: 1.2%, 2.4%, 3.6% and 5.0% to determine the suitable salinity level for growth of these marine bacteria. It was found out that best growth occurred at 2.4% or 3.6% salinity which are nearer to the salinity of the Mediterranean. Ability of the isolates for production of bioemulsifiers was also tested on hexane and toluene, and the results have shown that the isolates which could produce bioemulsifiers. These selected bacterial isolates (W2Aa, W2Ca, W3Ba, W3C and W4Aa) were identified using the 16S rRNA methodology in the European Nucleotide as *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Vibrio hepatarius*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Eubacterium combesii*, respectively.

**Key words:** Isolation, Identification, Biodegradation, crude oil.

إن حقول النفط، هي ليست متجانسة التوزيع في العالم، ولكنها محدودة في مناطق مثل الخليج العربي. إن الإنتاج العربي من النفط الخام هو أكثر من 3 مليارات طن سنويا، وان نصف هذه المادة تنقل بحريا. نتيجة لذلك فإن النقل البحري العالمي بواسطة حاملات النفط هو شائع، وينتج عن ذلك تلويث للبيئة البحرية لعدة أسباب منها، الحوادث العديدة التي أدت إلى غرق الحاملات مثل حادثة اكسون فالديز في الاسكا، وقد أثرت بشكل كبير على البيئة البحرية وان الحفر والتنقيب عن النفط ومصادرة يخلف تلوث بحري شديد. (Harayama et al., 1999) حيث وجد ان طريقة المعالجة البيولوجية تعتمد على استخدام أنواع من الأحياء الدقيقة القادرة على استخلاص أو تفكيك الكثير من الملوثات المتواجدة في الماء. حيث إن البكتيريا لها القدرة على تفكيك الكثير من الملوثات والمركبات النفطية إلى جزيئات اقل وزنا وتركيبا وخطورة لتسهل عملية ذوبانها في الماء مما يحولها من مواد خطيرة ذات ضرر إلى مواد أقل خطورة وأقل ضرر حيث تعتمد البكتيريا على هذه المركبات كمصدر وحيد للكربون والطاقة.

يعتبر التلوث النفطي من اخطر ملوثات البحار والمحيطات نظرا لقدرته على الانتشار السريع تبعا لسرعة واتجاه الرياح والتيارات البحرية، حيث يصل إلى مسافة تزيد عن 300 كيلو من مصدر التلوث، كما يشكل النفط المتسرب طبقة رقيقة فوق سطح الماء، وتنتشر قطرة واحدة من النفط على مساحة قد يصل قطرها إلى أكثر من 30cm، كما يغطي الطن الواحد من النفط مساحة قدرها 12km كما يكون الزيت البترولي طبقة فوق سطح الماء يصل سمكها ما بين أجزاء من الميكرومتر إلى 2cm ( عبد الحميد و عبد المجيد، 1996 ).

ومع زيادة النمو السكاني وانتشار العمليات الصناعية الأساسية شهدت البشرية ظهور حضارة بدأ يكون لها اكبر تأثير جماعي على المناطق المحيطة بها، كان من المتوقع أن تحدث بدايات الوعي البيئي في الثقافات الأكثر تقدما، وخاصة في المراكز الحضرية الأكثر كثافة ويأتي النفط في مقدمة الملوثات الخطرة، حيث تدل الدراسات على أن 200 ألف طن من النفط كافية لتحويل بحر البلطيق من الناحية البيولوجية إلى صحراء قاحلة لا تعيش فيها الكائنات الحية، وكذلك من مصادر التلوث البحري عملية تنظيف صهاريج البواخر وناقلات النفط والتي تسبب تسرب 10 مليون طن من النفط إلى البحر، ويكون تركيز النفط عاليا بشكل خاص في المناطق الساحلية، وتشكو البحار المغلقة من مشكلة التلوث، وهناك تحذير من قبل العلماء بتحويل البحر الأبيض المتوسط إلى بحر ميت إذا بقيت معدلات التلوث بهذا الشكل خصوصا من قبل فرنسا وإيطاليا وإسبانيا، لذا كانت السواحل الفرنسية والإيطالية والإسبانية أكثر تضررا من تلوث البحر الأبيض المتوسط (United States Environmental Protection Agency, 2/8/2006).

تعرف المستحلبات الحيوية بأنها نواتج حيوية ذات فعالية على مستوى الشد السطحي Biosurfactants لطورين هما طور كاره للماء (غير ذائب فيه) وطور محب للماء (ذائب فيه) إذ تمتلك هذه المواد قطاعات كارهة للماء وأخرى محبة للماء وبالإمكان أن تتداخل مع المواد القطبية وغير القطبية، وتدعى هذه الظاهرة بالاستحلاب البيولوجي Bioemulsification Kiyohara et al, 1982 والتي تلجا إليها الأحياء المجهرية عندما تنمو في أوساط كارهة للماء فتقلل من الشد السطحي بين هذين الطورين مؤدية إلى تكوين تجمعات صغيرة من الجزيئات الكارهة للماء داخل الطور المحب للماء فتزداد المساحة السطحية المتاحة للتداخل الميكروبي أي الجاهزية الحيوية Bioavailability لتلك الجزيئات فيزداد استهلاكها ( Scott, 2000 ).

### العدد السابع عشر – 20/ ابريل 2017

تنتج المستحلبات الحيوية من قبل الكثير من الأحياء المجهرية لاسيما البكتيريا في ظروف هوائية بكميات كبيرة وبأنواع مختلفة ومعظمها عبارة عن معقدات دهنية خارج خلوية أما أن تبقى ملتصقة على سطح الخلية او ان تطرح إلى الوسط الزراعي (Macdonald *et al.* , 1981).

منذ مطلع التسعينات في القرن الماضي ارتبط مفهوم الإصلاح البيولوجي *bioremediation* (هو تعزيز العمليات البيولوجية للتجزئة طبيعياً) مع تلوث البيئة بالهيدروكربونات النفطية إذ أصبح التلوث النفطي يمثل مشكلة كبيرة في الوقت الحاضر (Leahy and Colwell , 1990).

تعد آلية الاستحلاب البيولوجي احدي الوسائل الكفوءة للإصلاح البيولوجي للتلوث النفطي فهي بمثابة البديل عن الوسائل الكيميائية والفيزيائية المتبعة لإزالة الملوثات الخطيرة من البيئة فضلاً عن كونها غير مكلفة اقتصادياً وأمنه صحياً ولا تشكل عبئاً جديداً على البيئة المثقلة بالملوثات (Edelvio *et al.* , 2009 ; Paul , 2007).

الميكروبات المتحملة لدرجات عالية من الملوحة يمكنها أن تتحمل الملوحة حتى 50% والبكتيريا والفطريات المحبة للملوحة تحتاج إلى نسبة من الملوحة للنمو ( 2.5-4% ) ولا يمكن أن تنمو جيداً بغير هذه الملوحة ( أبو سعده , 2000 ). وتعتبر الملوحة من العوامل الكيميائية التي تثبط نمو الكائنات الحية الدقيقة ونادراً ما تتواجد ميكروبات تستطيع تحمل الظروف البيئية الصعبة بجانب قدرتها على استهلاك المواد الهيدروكربونية في نفس الوقت , ويلعب كلوريد الصوديوم ( المركب الدال على الملوحة ) دوراً هاماً في تقليل معدل عملية الايض وكبح عملية التخمر ( زكي والقشغري , 1998 ).

أما بالنسبة للكائنات المحبة للملوحة فيستعمل ايون الكلور في المحافظة على التوازن الأيوني أثناء إنتاج الطاقة بالتعاون مع ايون الصوديوم وبالنسبة لبيئة البحار والمحيطات فان بعض العمليات الحيوية في الخلايا مثل أكسدة المواد العضوية وإنتاج بروتين أحادي الخلية والسكريات والاندول يتم تشجيعها بالتركيز العالي من الملوحة كما أن بعض الأنظمة الإنزيمية تحتاج الى زيادة ضعيفة في الضغط الاسموزي , ويلعب ايون الصوديوم دوراً هاماً في نقل المواد الغذائية من البيئة إلى داخل الخلية عبر الغشاء الخلوي ( الانتقال المباشر لجزيئات المواد الغذائية ) ( المنفي , 2007 ).

و درس Ajisebutu.,1988 تأثير تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم تتراوح ما بين 0.5-1.5% (وزن/حجم) على تحلل النفط الخام بواسطة البكتيريا *Aeromonas* وذكر ان تناقص التحلل يترافق مع زيادة تركيز كلوريد الصوديوم , ودرس ( زكي والقشغري , 1998 ) تأثير الملوحة على الايض النيتروجيني والاحماض الامينية في البيئة الغذائية عند تحلل النفط الخام بواسطة البكتيريا *Pseudomonas spp* بتراكيز تتراوح ما بين 3 – 7.5% من كلوريد الصوديوم . واستخدم Baraniecki *et al.* ,2002 تراكيز منخفضة من كلوريد الصوديوم عند دراسة التحلل الحيوي لوقود الديزل , واختير Diaz *et al.* ,2002 تحلل الهيدروكربونات في المياه تحت ظروف ملوحة عالية ( 0-180 جم/لتر ) فيما درس Mukherji *et al.* ,2004 التحلل الحيوي لوقود الديزل بواسطة مزارع بكتيرية معزولة من رواسب بحر العرب تتحمل الملوحة التي تزيد تركيزها عن 3.5% وتتأقلم معها .

وعلى وجه العموم تعتمد السمية على مركبات النفط وتركيزاتها , يعتبر النفط المكرر أكثر سمية على النباتات عن النفط الخام وتحدث السمية الحادة عن طريق المركبات ذات الوزن الجزيئي القليل والالكانات والمركبات الأروماتية . بينما تحدث السمية المزمنة عن طريق الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات (PAH) وتحدث السمية عند درجة حرارة مرتفعة حيث ان كميات كبيرة من المركبات السامة تفقد سميتها من خلال تغيرات الظروف الجوية , وعندما يحدث تبريد للنفط في الأجواء الباردة تختصر السلسلة السمية للالكانات وتزداد درجة الذوبان في الماء بالإضافة إلى ذلك تزداد المركبات

### العدد السابع عشر – 20/ ابريل 2017

الهيدروكربونية , وتستطيع الميكروبات أن تحلل الملوثات عندما يكون تركيزها اقل من معدل السمية ويكون نموها وحيويتها محدودة , وعندما يكون التلوث عالي والسمية مرتفعة يكون النمو البكتيري محدود وحيويتها قليلة . عندما يكون التلوث قاتل للميكروبات ولا يحدث تحلل حيوي كامل هنا نحتاج طرق هندسية وإجراء عمليات تخفيف للتركيزات المرتفعة قبل إجراء عملية التحلل الحيوي ( Si- ) ( Zhong et al.,2009 )

وسندرس في هذه الورقة عزل وتعريف سلالات بكتيرية من منطقة الدراسة ( ميناء الحريقة النفطي – ميناء البريقة النفطي – شاطئ محطة توليد الكهرباء وتحليه مياه البحر). والتي لها قدرة طبيعية على تكسير وتحليل المركبات الهيدروكربونية. ودراسة بعض العوامل على العزلات مثل : تراكيز مختلفة من النفط الخام وتراكيز مختلفة من الملح والمواد الكيميائية وإمكانية تكوين مستحلب .

#### - المواد وطرق البحث:

##### موقع الدراسة:

تقع منطقة الدراسة في الجزء الجنوبي الشرقي من خليج طبرق والواقع شمال شرق ليبيا , كما يوجد بالقرب من منطقة الدراسة ممر ملاحى يستخدم لحركة السفن والناقلات النفطية يمتد طوله من بداية الخليج إلى مسافة تبلغ حوالي 2 ميل بحري داخل حدود الخليج وعرضه حوالي 0.5 ميل بحري ويبلغ متوسط عمق المياه في هذا الممر حوالي 16 متر .

وتحتوي منطقة الدراسة على العديد من المنشآت النفطية والتي تقع في الجهة الجنوبية الشرقية من الخليج والمتمثلة في مصفاة ومرسى الحريقة النفطي الخاص بتصدير النفط الخام , ومرسى شركة البريقة النفطي الخاص بتصدير المشتقات النفطية , ومحطتي توليد الكهرباء وتحليه مياه البحر واللذان تستخدمان الوقود الثقيل في عمليات التشغيل , هذه المنشآت من الممكن أن تتسبب في تلوث المياه بالمخلفات النفطية ومشتقاتها نتيجة لما قد يتسرب منها أثناء عمليات تحميل النفط الخام ومشتقاته أو إلقاء مياه الموازنة من الناقلات النفطية أو نتيجة لإلقاء مياه المخلفات التي تحتوي على الوقود الثقيل الناتج من التسربات وعمليات الصيانة في محطتي توليد الكهرباء وتحليه مياه .

##### جمع العينات:

تم جمع 12 عينة من أربع مواقع مختلفة داخل منطقة الدراسة كل ثلاث عينات من موقع مختلف كما بالصور (2,1) والشكل (1) وتشمل هذه العينات مياه بحر على عمق حوالي 1متر في زجاجات معقمة سعة 100 مليلتر قاتمة اللون وتم حفظها باردة حتى وصولها إلى المعمل وإجراء التجارب المعملية عليها , وتم تسميتها على النحو التالي الموقع الأول : (W1A, W1B, W1C) الموقع الثاني (W2A, W2B, W2C) الموقع الثالث (W3A, W3B, W3C) الموقع الرابع (W4A, W4B, W4C) .

العدد السابع عشر – 20/ ابريل 2017



(2)



(1)

صورة ( 1 ، 2 ) أماكن جمع العينات



شكل (1) أماكن جمع العينات

- عزل البكتيريا المحللة للنفط الخام من منطقة الدراسة:

تم تحضير وسط البيزل (Basal Media) ووضع 9 مليلتر منها داخل قناني زجاجية وتم إضافة 0.1% (v/v) ملي نفط خام كمصدر وحيد للكربون إلى الوسط ومن ثم تعقيم الزجاجات بمحتوياتها في المعقم عند درجة حرارة 121م لمدة 15 دقيقة ساعة هذه القناني 25مليلتر .

- مكونات وسط البيزل التي تم تحضيرها (g/l):

0.5 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , 1.5 NH<sub>4</sub>Cl , 2.0 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> , 2.0 KNO<sub>3</sub> , 0.2 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 35 Na Cl

ومن ثم تم إضافة 1 مليلتر من العينات المجمعة من مياه البحر إلى القناني الزجاجية المحضرة سابقا الموجود بها وسط البيزل والنفط الخام , وتم عمل زجاجة واحدة لكل عينة من 12 عينة المجمعة

### العدد السابع عشر – 20/ ابريل 2017

والمراد دراستها بحيث أصبح العدد 12 زجاجة , وكانت تسميتها الموقع الأول : (W1A, W1B, W1C) (الموقع الثاني (W2A, W2B, W2C) الموقع الثالث (W3A, W3B, W3C) الموقع الرابع (W4A, W4B, W4C) وتم وضع زجاجتين ككنترول لم يضاف لها 1 مليلتر من عينة مياه البحر و يضاف لها 0.1% من النفط الخام , وتم وضعها في الحاضنة عند درجة حرارة 30-32م ومراقبة النمو البكتيري لمدة سبعة أيام على التوالي .

#### - تنقية السلالات البكتيرية المعزولة :

بعد انتهاء الفترة اللازمة للتحضين (7 أيام) تم اخذ 0.1 ملي (بطريقة معقمة) من القناني حيث أن جميعها أعطت نموات بكتيرية وزرعها بواسطة النشر على وسط البشنل هاز حيث حضر هذا الوسط وأضيف إليه 1%(v/v) من النفط الخام كمصدر وحيد للكربون و (3.5 g/l % Na Cl) ويعتبر هذا الوسط اختياري ويستخدم لمعرفة أي من هذه العزلات قادرة على النمو واستهلاك النفط الخام ووضعت الأطباق عند درجة حرارة 30-32م داخل الحاضنة لمدة 18-72 ساعة .

وبعد ذلك تم زرع البكتيريا والتي أعطت نموات على وسط البشنل - هاز على إطباق وسط الاجار المغذي ( Nutrient Agar ) ولم يحصل أي نمو على وسط الاجار المغذي , ثم تم إضافة ملح لوسط الاجار المغذي 3.5% فتحصلنا على نتائج وعلى نموات وحضنت بعد ذلك الأطباق عند درجة حرارة 30م داخل الحاضنة لمدة 18-24 ساعة للحصول على نموات بكتيرية نقية , بعد فترة التحضين أجريت زراعة فرعية أخرى لغرض تنقية السلالات البكتيرية النامية على وسط الاجار المغذي ونقلت على حسب اختلاف أشكالها الظاهرية.

#### - حفظ العزلات البكتيرية:

بعد ما تم زرع البكتيريا والتي أعطت نموات على وسط البشنل - هاز على إطباق وسط الاجار المغذي ( Nutrient Agar ) عند درجة حرارة 30م داخل الحاضنة لمدة 18-24 ساعة , بعد نموها تم تخطيطها على الاجار المائل (Slant agar) وحفظها عند درجة حرارة 30م لمدة 18-24 ساعة , بعد نمو العزلات تم حفظها باردة عند درجة حرارة اقل من 4م .

#### - قدرة البكتيريا المعزولة للنمو على تراكيز مختلفة من النفط الخام :

من اجل تحديد قدرة العزلات البكتيرية من النمو على تراكيز مختلفة من النفط الخام , أولا تم زرع البكتيريا المختارة على وسط الاجار المغذي ووضعها في الحاضنة عند درجة حرارة 32م لمدة 18 – 24 ساعة , وتم تحضير وسط البيزل ووضع 10 مليلتر منها داخل قناني زجاجية سعتها 25 مليلتر واطيف اليها تراكيز مختلفة من النفط الخام: 1% , 5% , 10% , 25% , 50% ووضع الوسط المحضر والمضاف إليه هذه التراكيز داخل المعقم وذلك من اجل تعقيمها ثم تم إضافة النموات البكتيرية المنماة سابقا إلى القناني الزجاجية المعقمة , ومن ثم وضعت داخل الحاضنة بدرجة حرارة 32م , لمدة سبعة أيام وتم مراقبة النمو لهذه العزلات من خلال مراقبة عكارة الوسط بالعين المجردة .

#### - انتخاب أفضل عزلات لها القدرة على تحلل تركيزات مختلفة من النفط الخام:

أنواع البكتيريا المعزولة والمنتقاة على أساس تقييم قدرتها على النمو في تراكيز مختلفة من النفط الخام استخدم كمصدر وحيد للكربون والطاقة , بعد تقييم النتائج تم انتقاء أفضل سبع عزلات من البكتيريا المعزولة واستخدامها لإجراء مزيدا من الدراسة وتعريفها .

### العدد السابع عشر – 20/ ابريل 2017

#### - تأثير تراكيز مختلفة من الملح على العزلات البكتيرية المنتقاة:

لتحديد قدرة العزلات البكتيرية التي تم اختيارها من التجربة السابقة على النمو في تراكيز مختلفة من الملح، تم تحضير وسط البيزل ووضع 10مليتر منها داخل قناني زجاجية وأضيف إليها تراكيز مختلفة من الملح: 1.2%، 2.4%، 3.6%، 5% ووضع الوسط المحضر والمضاف إليه هذه التراكيز داخل المعقم عند درجة حرارة 121م لمدة 15 دقيقة وذلك لأجل تعقيمها، وقبل ذلك يكون قد تم زرع البكتيريا المختارة على وسط الاجار المغذي ووضعها في الحاضنة عند درجة حرارة 30م لمدة 18-24 ساعة، تضاف كل من النوات البكتيرية إلى القناني الزجاجية المعقمة، ومن ثم وضعت داخل الحاضنة عند درجة حرارة 30م- 32م لمدة 6 أيام ومراقبة نمو هذه العزلات من خلال مراقبة عكارة الوسط بالعين المجردة.

#### - اختبار قابلية العزلات المحلية على إنتاج المستحلبات الحيوية:

تم زرع البكتيريا المنتقاة في وسط (Nutrient broth) وضعت في الحاضنة عند درجة حرارة 30م لمدة 24 ساعة، وبدرجة حرارة 25م رسبت الخلايا بنبذها مركزيا بسرعة 6000 دورة / دقيقة لمدة عشر دقائق وأهمل الراسب واخذ الراشح، ثم أضيف في زجاجيات معقمة 2مليتر من الراشح البكتيري لكل نوع عزلة على حده إلى 2مليتر من مركبات هيدروكربونية مختلفة (toluene, hexane) ومزجت المحتويات في الزجاجيات بجهاز المازج وبدرجة حرارة الغرفة ولأقصى سرعة لمدة دقيقتين، وتركت الزجاجيات لتستقر بدرجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة، ووضع كمنترول سالب يحتوي على المركبات الهيدروكربونية بدون إضافة راشح بكتيري ووضع كمنترول موجب يحتوي على 4ملي ماء مقطر ومادة (Tween 80)، ثم حسبت الفعالية الاستحلابية المثلى لإنتاج أعلى كمية من المستحلبات الحيوية وحسبت وفق المعادلة التالية:

$$E24 = \frac{\text{Height of emulsion formed}}{\text{Total height of the solution}} \times 100$$

#### - تعريف العزلات البكتيرية المنتخبة:

تم تعريف العزلات المنتقاة في European Nucleotide Archive بواسطة طريقة 16S rRNA وتم تسجيل العزلات في بنك الجين الأوربي كل عزلة تحت رقم كود معين وهي موجودة في الرابط الإلكتروني التالي:

<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/HG813106-HG813112>

#### - النتائج:

##### - عزل البكتيريا المحللة للنفط الخام:

بينت النتائج أن البكتيريا المعزولة من منطقة الدراسة والتي هي أربع مواقع كل موقع أخذت منه ثلاث عينات بحيث أصبح عدد العينات 12 عينة لها نشاط وقدرة على النمو في وسط يحتوي على النفط الخام يوضحها الجدول (1).

### العدد السابع عشر – 20/ ابريل 2017

أوضحت النتائج في جدول (1) أن جميع العزلات نمت دون استثناء، وأفضل وأسرع نمو في الموقع الأول، وأجزاء من المواقع الأخرى، حيث نشاهد من خلال الجدول أن الموقع الأول أعطت جميع العزلات نمو ممتاز (W1A, W1B, W1C) والموقع الثاني أعطت عينة واحدة نمو ممتاز (W2A) وعينة نمو جيد (W2B) وعينة أخرى نمو ضعيف (W2C)، في حين أن الموقع الثالث أظهرت عينة واحدة نمو ممتاز (W3A) وعينة نمو ضعيف (W3B) وعينة نمو جيد (W3C). كما أن الموقع الرابع أعطت جميع العينات نمو جيد (W4A, W4B, W4C).

### جدول (1) نمو العينات المجمعة على وسط البيزل والمضاف إليها تركيز 0.1% (v/v) من النفط الخام

العينة	اليوم الأول	اليوم الثاني	اليوم الثالث	اليوم الرابع	اليوم الخامس	اليوم السادس	اليوم السابع
W1A	+	+	+	+	+	++	+++
W1B	+	+	+	++	++	+++	+++
W1C	+	+	+	+	++	+++	+++
W2A	+	+	+	++	++	+++	+++
W2B	+	+	+	+	+	++	++
W2C	-	+	+	+	+	+	+
W3A	+	+	+	++	++	+++	+++
W3B	+	+	+	+	+	+	+
W3C	+	+	+	+	+	+	++
W4A	+	+	+	+	+	++	++
W4B	-	+	+	+	+	+	++
W4C	-	+	+	+	+	++	++
Con1	-	-	-	-	-	-	-
Con2	-	-	-	-	-	-	-

نمو البكتيريا المتحصل عليها على وسط البشئل- هاز المضاف إليها 1% (v/v) من النفط الخام + g/l) : Na Cl ( %3.5

بينت النتائج في جدول (2) أن تسع عزلات أعطت نمو ممتاز (W1A, W1B, W1C, W2A, W2B, W2C, W3A, W3B, W4A, W4B, W4C) وعزلة واحدة نمو جيد (W3C)، وعزلتان نمو ضعيف (W4B, W4C).

العدد السابع عشر - 20/ ابريل 2017

جدول (2) النموّات البكتيرية على بيئة البشنل- هاز+1%(v/v) نفط خام +3.5% NaCl g/l

العينة	24 ساعة	48 ساعة	72 ساعة
W1A	+	++	+++
W1B	+	++	+++
W1C	+	++	+++
W2A	+	++	+++
W2B	+	++	+++
W2C	+	++	+++
W3A	+	++	+++
W3B	+	++	+++
W3C	—	+	++
W4A	+	++	+++
W4B	+	+	+
W4C	—	—	+

نلاحظ نمو جميع العزلات البكتيرية من كل المواقع على بيئة البشنل -هاز+1% نفط خام , و ظهور النمو كثيف في اغلب المواقع.

- **حفظ العزلات البكتيرية النامية على وسط البشنل - هاز وتنقيتها بعد عزلها على الاجار المغذي:**  
بينت النتائج حدوث نمو كثيف للعزلات البكتيرية بعد تنقيتها على وسط الاجار المغذي في جميع المواقع باستثناء عينة من الموقع الرابع , وتم الحصول على 22 عزلة .

- **قدرة البكتيريا المعزولة للنمو على تراكيز مختلفة من النفط الخام :**

بعد اختيار الـ (22) عزلة والتي أعطت نمو على وسط البشنل هاز تم فحص قدرتها على النمو في تراكيز مختلفة من النفط الخام 1% , 5% , 10% , 25% , 50% كما تم ذكره في الفصل السابق الجدول (3) يبين حوالي ( 32% ) من العزلات أعطت نمو ممتاز ( W1Cb , W2Aa , W2Ab , W2Ca , W3Ba , W3C , W4Aa ) على تركيز 1% من النفط الخام , وكذلك نشاهد من الجدول نتائج نسبة النمو على تركيز 5% من النفط الخام أن حوالي (32%) من العزلات أعطت نمو ممتاز . ( W1Cb , W2Aa , W2Ab , W2Ca , W3Ba , W3C , W4Aa ) .

وكما نلاحظ نتائج النمو على تركيز 10% أن حوالي (27%) من العزلات أعطت نمو ممتاز (W1Cb , W2Aa , W2Ab , W2Ca , W3C , W4Aa) , وكما لوحظ نتائج النمو على تركيز 25% من النفط الخام ان تقريبا (9%) من العزلات ذات نمو ممتاز ( W2Aa , W3C ) .

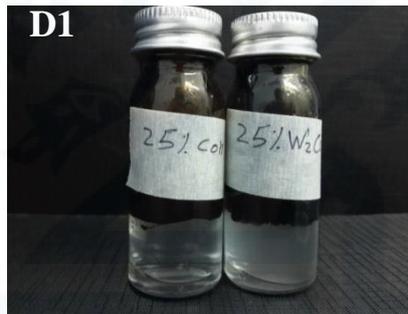
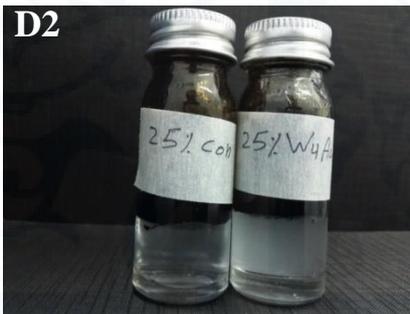
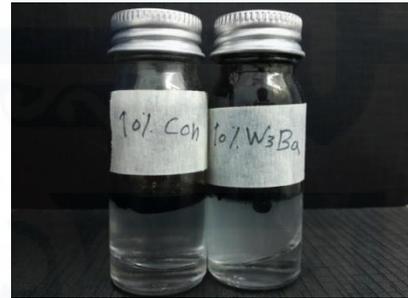
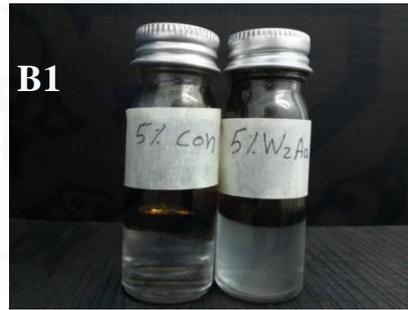
### العدد السابع عشر – 20/ ابريل 2017

وكذلك نلاحظ نتائج النمو على تركيز 50% أن حوالي نسبة (9%) من العزلات أعطت نمو ممتاز (W2Aa , W3C), وتقريبا (5%) من العزلات أعطت نمو جيد (W3Ba), وحوالي (23%) من العزلات أعطت نمو ضعيف (W1Ab , W1Ba , W1Cb , W2Ca , W4Aa) والنسبة الباقية لم تعطي نمو (W1Aa , W1Bb , W1Ca , W2Ab , W2Ba , W2Bb , W2Cb , W2Cc , W3Aa , W3Ab , W3Bb , W4Ab , W4Ba , W4Bb بالصورة (3).

### جدول (3) نمو العزلات على وسط البيزيل في تراكيز مختلفة من النفط الخام

ت	العينة	التراكيز المختلفة من النفط الخام				
		%50	%25	%10	%5	%1
1	W1Aa	—	—	+	+	+
2	W1Ab	+	+	+	+	+
3	W1Ba	+	+	+	+	+
4	W1Bb	—	—	—	—	+
5	W1Ca	—	—	—	—	+
6	W1Cb	+	++	+++	+++	+++
7	W2Aa	+++	+++	+++	+++	+++
8	W2Ab	—	—	+++	+++	+++
9	W2Ba	—	—	—	—	+
10	W2Bb	—	—	—	—	+
11	W2Ca	+	++	+++	+++	+++
12	W2Cb	—	—	—	—	+
13	W2Cc	—	+	+	+	+
14	W3Aa	—	—	—	—	+
15	W3Ab	—	—	—	—	+
16	W3Ba	++	++	++	+++	+++
17	W3Bb	—	—	—	—	+
18	W3C	+++	+++	+++	+++	+++
19	W4Aa	+	+	+++	+++	+++
20	W4Ab	—	—	—	—	+
21	W4Ba	—	—	—	—	+
22	W4Bb	—	—	—	—	+

العدد السابع عشر – 20 / ابريل 2017



صورة (3) نمو العزلات البكتيرية على تراكيز مختلفة من النفط الخام

### العدد السابع عشر – 20/ ابريل 2017

- (A1,A2) (W2Ca,W3C) أفضل العزلات البكتيرية التي أعطت نمو على تركيز (1%) من النفط الخام  
(B1,B2) (W2Aa,W2Ab) أفضل العزلات البكتيرية التي أعطت نمو على تركيز (5%) من النفط الخام  
(C1,C2) (W3Ba,W3C) أفضل العزلات البكتيرية التي أعطت نمو على تركيز (10%) من النفط الخام  
(D1,D2) (W2Ca,W4Aa) أفضل العزلات البكتيرية التي أعطت نمو على تركيز (25%) من النفط الخام  
(E1,E2) (W1Cb,W3C) أفضل العزلات البكتيرية التي أعطت نمو على تركيز (50%) من النفط الخام

#### - اتقاء أفضل بكتيريا معزولة:

أنواع البكتيريا الـ 22 المعزولة والتي تأقلمت بحيث تنمو على تركيبات مختلفة من النفط الخام واستخدامها للنفط الخام كمصدر وحيد للكربون والطاقة، بعد تقييم النتائج اختيرت سبعة أنواع من البكتيريا المعزولة وهي (W1Cb, W2Aa, W2Ab, W2Ca, W3Ba, W3C, W4Aa) وتم استخدامها لإجراء مزيداً من الدراسة، النتائج موضحة في الصورة (3).

#### - تأثير تراكيز مختلفة من الملح على العزلات البكتيرية المنتقاة :

بعد تمييز قدرة هذه العزلات المنتقاة على النمو في تراكيز مختلفة من النفط الخام، وقدرتها على تحلل مركبات هيدروكربونية مختلفة، كان لابد من دراسة مدى تأثير التراكيز المختلفة من الملح على هذه العزلات وتحديد أي تركيز من الملح أكثر ملائمة لنشاطها للتوصية به في دراسات مستقبلية.

نلاحظ من النتائج في الجدول (4) والصورة (4) أن حوالي نسبة 71% من العزلات أعطت نمو ممتاز (W1Cb, W2Ca, W3Ba, W3C, W4Aa) على تركيز 1.2% من الملح، وتقريباً 29% منها أعطت نمو جيد (W2Aa, W2Ab)، أما نشاطها على تركيز 2.4% من الملح فقد أعطت حوالي 86% من العزلات نمو ممتاز (W1Cb, W2Aa, W2Ca, W3Ba, W3C, W4Aa)، وتقريباً 14% منها نمو جيد (W2Aa)، وبالنسبة لنشاطها على تركيز 3.6% فقد أعطت العزلات حوالي نسبة 71% نمو ممتاز (W1Cb, W2Ca, W3Ba, W3C, W4Aa) وتقريباً 29% منها نمو ضعيف (W2Aa, W2Ab)، أما نشاطها على تركيز 5.0% من فقد أعطت حوالي 57% من العزلات نمو جيد (W1Cb, W2Ca, W3Ba, W4Aa) والنسبة الباقية نمو ضعيف (W2Aa, W2Ab, W3C) على نفس التركيز.

#### جدول (4) نمو العزلات على وسط البيزيل في تراكيز مختلفة من الملح

ت	العينة	تراكيز مختلفة من الملح			
		5.0%	3.6%	2.4%	1.2%
1	W1cb	++	+++	+++	+++
2	W2Aa	+	+	+++	++
3	W2Ab	+	+	++	++
4	W2Ca	++	+++	+++	+++
5	W3Ba	++	+++	+++	+++
6	W3C	+	+++	+++	+++

العدد السابع عشر – 20 / ابريل 2017

++	+++	+++	+++	W4Aa	7
-	-	-	-	Con	8



صورة (4) درجة العكارة الناتجة عن النشاط البكتيري على تراكيز مختلفة من الملح

- (A1,A2): نشاط اثنين من العزلات البكتيرية على تركيز (1.2%) من الملح (W1Cb, W2Aa)  
 (B1,B2): نشاط اثنين من العزلات البكتيرية على تركيز (2.4%) من الملح (W4Aa, W3C)  
 (C1,C2): نشاط اثنين من العزلات البكتيرية على تركيز (3.6%) من الملح (W3Ba, W2Aa)  
 (D1,D2): نشاط اثنين من العزلات البكتيرية على تركيز (5%) من الملح (W1Cb, W2Ca)

العدد السابع عشر – 20 / ابريل 2017

### الاستحلاب الحيوي Bioemulsification :

بينت النتائج في جدول (5) والصورة (5) أن W3C, W4Aa لها القدرة على إنتاج مستحلبات حيوية على التولوين ذات نشاط متوسط وكذلك أوضحت النتائج أن W2Aa, W2Ab, W2Ca, W3Ba لها القدرة على إنتاج مستحلبات حيوية ذات نشاط جيد , ووجد أن W1Cb لها القدرة على إنتاج مستحلبات حيوية ذات نشاط جيد جدا .

### جدول (5) الاستحلاب الحيوي في Toluene

Organisms	% of E24
W1cb	73
W2Aa	56
W2Ab	50
W2Ca	55
W3Ba	50
W3C	45
W4Aa	44
Con	0
Positive control	67

بينت النتائج في الجدول (6) والصورة (6) أن W2Aa, W2Ab لها القدرة على إنتاج مستحلبات حيوية على الهكسان ذات نشاط متوسط , وكذلك تبين أن W1Cb, W2Ca, W4Aa لها القدرة على إنتاج مستحلبات حيوية ذات نشاط جيد , وكما وجد أن W3Ba, W3C لها القدرة على إنتاج مستحلبات حيوية ذات نشاط جيد جدا .

### جدول (6) الاستحلاب الحيوي في Hexane

Organisms	% of E24
W1cb	50
W2Aa	30
W2Ab	44
W2Ca	56
W3Ba	63
W3C	67
W4Aa	55
Con	0
Positive control	67

العدد السابع عشر – 20/ ابريل 2017



صورة (5) إنتاج العزلات البكتيرية للمستحلبات الحيوية

(A1,A2,A3):(W2Aa,W2Ca,W1Cb) إنتاج ثلاث عزلات بكتيرية للمستحلب الحيوي على مركب التولوين .

(B1,B2,B3):(W4Aa,W2Ca,W2Aa) إنتاج ثلاث عزلات بكتيرية للمستحلب الحيوي على مركب الهكسان .

(C): الكنترول الموج

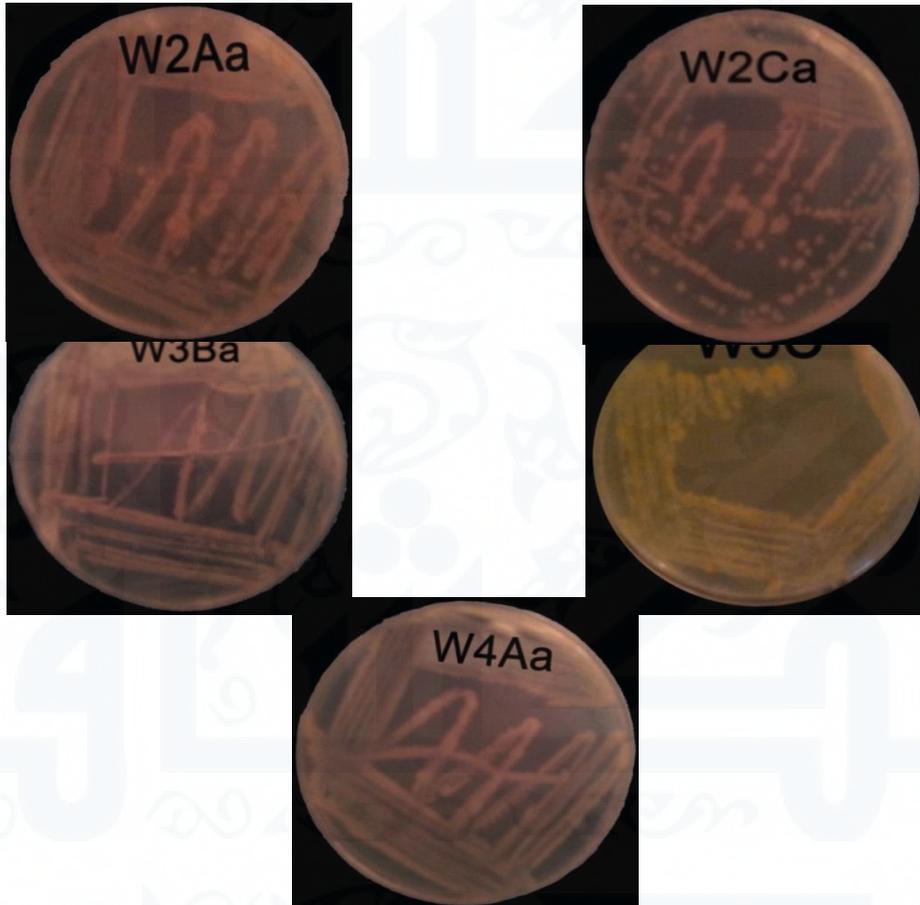
تعريف السلالات البكتيرية المعزولة والمنتخبة :

تم تعريف بعض العزلات البكتيرية المنتخبة كما بالصورة (6) عن طريق طريقة 16S rRNA في European Nucleotide Archive والجدول التالي (7) يوضح نتائج تعريف البكتيريا .

العدد السابع عشر – 20/ ابريل 2017

جدول (7) تعريف العزلات البكتيرية بواسطة طريقة 16S rRNA

العزلات البكتيرية	الرمز المسجل في بنك الجين الأوروبي	البكتيريا المعرّفة
W2Aa	HG813108	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>
W2Ca	HG813107	<i>Vibrio hepatarius</i>
W3Ba	HG813111	<i>Vibrio alginolyticus</i>
W3C	HG813110	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
W4Aa	HG813112	<i>Eubacterium combesii</i>



صورة (6) نموات العزلات البكتيرية المنتخبة على وسط الاجار المغذي

تم في هذه الدراسة عزل البكتيريا من أربع مواقع مختلفة في مياه خليج طبرق والمتمثلة في مصفاة ومرسى الحريفة النفطية ومرسى شركة البريقة ومحطتي توليد الكهرباء وتخليه مياه البحر، وكان عدد العينات المراد عزل البكتيريا منها 12 عينة كل ثلاث عينات من موقع مختلف، حيث تم إجراء التجارب المختلفة لغرض الحصول على أفضل بكتيريا معزولة يمكنها أن تساعد على التحلل الحيوي للنفط الخام.

كانت البكتيريا المعزولة من العينات والمضاف إليها تركيز 1%(v/v) من النفط الخام قد أعطت نتائج ايجابية حيث نمت العزلات بنسبة 42% نمو ممتاز، و 42% نمو جيد و 16% نمو ضعيف، وقد يعزى ذلك إلى تأقلم البكتيريا للبيئة الملوثة بالنفط الخام حيث أن النمو الميكروبي يعكس الارتباط بالتحلل الحيوي (Hazen *et al.*, 2003). بالإضافة إلى التركيز المنخفض من النفط الخام في الوسط الغذائي وهذا يتفق مع Rahman *et al.*, 2003. وقد وصلت البكتيريا المعزولة بعد زرعها على البشنل هاز وتنقيتها إلى 22 عذلة. وهذا يتفق مع العديد من الدراسات التي تم فيها عزل بكتيريا بحرية من أماكن ملوثة بالنفط الخام كانت قادرة على التحلل الحيوي للنفط الخام ففي دراسة تم عزل 272 نوع من البكتيريا المحللة للنفط الخام من عدة مواقع على طول الساحل الكويتي AL-Saleh *et al.*, 2008 وفي دراسة أخرى تم عزل 24 نوع من البكتيريا البحرية المحللة للنفط الخام من عدة مواقع في خليج المكسيك (Kostka *et al.*, 2011).

إن القدرة على نمو الـ 12 نوع سلالة بكتيرية معزولة على وسط اختياري أجريت باستخدام وسط البشنل هاز المضاف إليه 1%(v/v) من النفط الخام كمصدر وحيد للكربون والطاقة، وأظهرت النتائج أن 100% من العزلات قد نمت على وسط البشنل هاز الاختياري للبكتيريا المحللة للهيدروكربونات (Okoh *et al.*, 2001; Saieb and Elgazwani, 2008) بناء على النمو في الوسط الاختياري البشنل هاز تمت تنقيتها وتم الحصول على 22 عذلة حيث أجريت باقي الدراسات عليها.

أما عند دراسة إضافة تراكيز مختلفة من النفط الخام إلى وسط البيزل كمصدر وحيد للكربون والطاقة وتحديد مدى تأثيره على نمو البكتيريا تبين أن نمو البكتيريا قل مع زيادة تركيز النفط الخام وهذا يتفق مع (Antai, 1990)، ففي تركيز 50% أظهرت 8 أنواع فقط من البكتيريا نمو، وقد ذكر كلا من (Jia *et al.*, 2005; Johnsen *et al.*, 2005) أن معدل التحلل الحيوي مرتبط بشكل ايجابي ومباشر بتركيز الركيزة وهي المادة التي يعمل عليها الإنزيم، وكما أن مستويات المواد الكيميائية العضوية العالية جدا يمكن أن تكون معرقة أو سامة للتجمعات الجرثومية، وقد ذكر Willey *et al.*, 2008 أن في ظل ظروف معينة يمكن أن يحدث ظهور تراكيز عالية لا يحدث فيها أي تحلل للنفط الخام.

وقد أشارت دراسات سابقة عديدة إلى استخدام تراكيز مختلفة من النفط الخام. ففي دراسة Ijah and Antai, 2003a أشار إلى وجود تحلل حيوي كبير للنفط الخام بواسطة البكتيريا عند تراكيز 10%-20% مقارنة بالتركيزات 30%-40%. وكذلك أشارت دراسة Rahman *et al.*, 2003 بان نسبة التحلل بواسطة البكتيريا قل أو تناقص من 78% إلى 52% مع كل زيادة في النفط الخام من تركيزات 1% - 10% والسبب في انخفاض نسبة التحلل قد تعود إلى سمية النفط الخام للكائنات الدقيقة ويرجع كذلك للتركيزات العالية من النفط 5% - 10% والتي بدورها قد يكون لها تأثير سلبي على نشاط التحلل الحيوي للكائنات الدقيقة. وكما اتفقت دراسة Ijah and Rahman *et al.*, 2002; Antai, 2003b على أن التركيزات العالية من النفط الخام بإمكانها أن تكون مثبطة عند المراحل الأولى من نمو الكائنات الدقيقة.

### العدد السابع عشر - 20/ ابريل 2017

وبالنظر إلى نمو البكتيريا المعزولة على التركيزات المختلفة من الملحفة فقد اتضح ان البكتيريا المعزولة عند تركيزات الملحفة الأولى 1.2% إلى 3.6% كانت نسبة النمو ممتازة , وهذا يتفق مع العديد من الدراسات منها ( Przystas *et al.* , 2006 ; Karpenko *et al.* , 2006 ) وعندما زادت الملحفة إلى 50% كان النمو بطيء , وذلك بسبب زيادة الضغط الاسموزي وقلة نسبة الأكسجين المذاب ( Atlas , 2003 ; Van Beilen *et al.* , 1992 ; Finnerty , 1981 ) وبما أن البكتيريا المعزولة نمت على تركيز 3.6% فهذا يعني أنها بمقدورها النمو بمياه البحار ( Liu *et al.* , 2009 )

وبالنظر قدرة البكتيريا المعزولة على إنتاج مستحلبات حيوية أظهرت النتائج قدرة هذه العزلات على إنتاج المستحلبات الحيوية واستهلاك الهكسان والتلوين على وسط البيزل بتركيز 1%(v/v) كل على حده كمصدر وحيد للكربون والطاقة .

يتناسب إنتاج المستحلبات الحيوية تناسباً طردياً مع نمو المستعمرات وقطر الفقاعات , وعكسياً مع المعدل الزمني لظهور الفقاعات , وانعكس ذلك من خلال قياس قطر الفقاعات بالمليمتر حول المستعمرات النامية وقياس مساحة النمو في الخليط البكتيري لكل عذلة مع الركيزة في معدل زمني (يوم) لظهور تلك الفقاعات كان أفضل إنتاج عند استهلاك التلوين للعذلة ( W1Cb ) إذ بلغ نسبة 73% مقارنة ببقيّة العزلات عند معدل زمني يوم وعند مقارنة نمو هذه العذلة على التلوين عند نفس التركيز في وسط البيزل في التجربة السابقة وجد أنها قد أعطت نمو ممتاز , وقل إنتاج عند استهلاك التلوين كان للعذلة ( W4Aa ) بنسبة 44% عند معدل زمني يوم وعند مقارنة نمو هذه العذلة أيضاً في التجربة السابقة على التلوين عند نفس التركيز في وسط البيزل وجد أنها أعطت نمو ممتاز .

وكذلك أبدت البكتيريا المعزولة قابليتها على استهلاك الهكسان وإنتاج المستحلبات الحيوية , حيث كان أفضل إنتاج للعذلة ( W3C ) حيث بلغ معدل الفعالية الاستحلابية 67% وعند مقارنة نمو هذه العذلة على الهكسان عند نفس التركيز في وسط البيزل في التجربة السابقة وجد أنها قد أعطت نمو ممتاز , وقل إنتاج عند استهلاك الهكسان كان للعذلة ( W2Aa ) بنسبة 30% عند معدل زمني يوم وعند مقارنة نمو هذه العذلة أيضاً في التجربة السابقة على الهكسان عند نفس التركيز في وسط البيزل وجد أنها أعطت نمو ضعيف .

جاءت هذه النتائج لتطابق ما توصل اليه ( Ron and Rosenberg , 2002 ) إلى أن الأحياء المجهرية من أفضل الوسائل المحللة للهيدروكربونات المشبعة الداخلة في تركيب النفط الخام والذي يقود إلى مفهوم المعالجة الحيوية للتلوث النفطي , وتتوقف قابلية التحلل الحيوي على نوع المادة الهيدروكربونية الخاضعة وعلى نشاط المجتمع الميكروبي في إنتاج المستحلبات الحيوية . وكذلك أشارت دراسة ( عبدالرازق , 2012 ) إلى انه يحدث التحلل الحيوي بسرعة اكبر عندما يكون الملوث من النوع الذائب في الطور المائي , ولكن أكثر الهيدروكربونات هي عبارة عن مواد غير ذائبة في الماء , وان الجاهزية الحيوية للمركبات الهيدروكربونية ممكن أن تزداد للأحياء المجهرية ذات القابلية على إنتاج المستحلبات الحيوية حيث تعمل هذه المركبات على زيادة الانتشار المائي لتلك المركبات كما تعمل المستحلبات على تغيير الألفة بين خلايا الأحياء المجهرية والهيدروكربونات من خلال تحفيز وزيادة الصفات الكارهة للماء لسطوح الخلايا .

إن سبعة أنواع من البكتيريا المعزولة اختيرت من بين 22 نوع معزول بعد التنقية والتي تم فحصها لأجل اختيار البكتيريا الأكثر كفاءة على النمو في النفط الخام وتحلله وقد تم تعريف خمس عزلات منها وهي ( W2Aa , W2Ca , W3Ba , W3C , W4Aa ) كانت هي الأكثر كفاءة من بين الأنواع المعزولة حيث كانت قادرة على النمو في الأوساط المختلفة المختارة وفي النفط الخام حتى تركيز 50% وقادرة على التحلل الحيوي للنفط الخام وبعد تعريفها كانت هذه البكتيريا هي (*Marinobacter*)

### العدد السابع عشر – 20/ ابريل 2017

*hydrocarbonoclasticus* , *Vibrio hepatarius* , *Vibrio alginolyticus* , *Vibrio parahaemolyticus* , *Eubacterium combesii* ) على التوالي .

وقد استخدم جنس *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* في تحلل النفط الخام من قبل العديد من الباحثين ( Lattuati et al. , 2002 ; Doumenq et al. , 2001 ) .

وفي دراسة تم عزل 24 نوع من البكتيريا المحللة للنفط الخام من عدة مواقع في خليج المكسيك في بلدية بينساكولابيتش وتم إدراج من بين هذه الأنواع : (*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* , *Vibrio hepatarius* , *Vibrio alginolyticus* والتي تتفق مع السلالات المعزولة في هذه الدراسة ( Kostka et al. , 2011 ) .

وقد استخدم كذلك جنس (*Vibrio parahaemolyticus*) في تحلل النفط الخام من قبل العديد من الباحثين ( Smith et al. , 2012 ; Stephens et al. , 2013 )

وفي دراسة أخرى تم عزل 133 نوع من البكتيريا المحللة للنفط الخام من عدة مواقع على طول الساحل الكويتي وتم إدراج من بين هذه الأنواع بكتيريا (*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* , *Vibrio alginolyticus* , *Vibrio parahaemolyticus*) والتي تتفق مع السلالات المعزولة في هذه الدراسة ( AL-Awadhi et al. , 2012 ) .

وقد عزل ( AL-Dahash and Mahmoud , 2013 ) كثيرا من الكائنات الحية الدقيقة من مياه شمال الخليج العربي الملوثة بالنفط الخام ومشتقاته ومن تلك البكتيريا التي عزلت ووجد أنها تستطيع تحليل مخلفات النفط الخام مثل (*Vibrio alginolyticus* , *Vibrio parahaemolyticus*) وهذا يتفق أيضا مع نوعين من البكتيريا المعزولة في هذه الدراسة .

أما جنس *Eubacterium combesii* فلم يوجد أي دراسات سابقة على أنها تقول بتحليل النفط الخام , وقد تكون هذه الدراسة أول دراسة تبين أن هذه العزلة تقوم بتحليل النفط الخام ومشتقاته ولا زالت تحتاج العديد من الدراسات للتأكيد على أنها تقوم بالتحلل الحيوي للنفط الخام .

– بالرغم أن البكتيريا البحرية والتي لها المقدرة على تكسير هيدروكربونات البترول منتشرة , إلا أن هذه البكتيريا (*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* , *Vibrio hepatarius* , *Vibrio alginolyticus* , *Vibrio parahaemolyticus* , *Eubacterium combesii* .

والتي تم عزلها من منطقة ملوثة أصلا بالبترول لديها مقدرة عالية على التخلص من النفط الخام في الوسط البيئي والبيئات البحرية ولذلك يوصى بها في المعالجة الحيوية في البيئات الحيوية الملوثة .

العدد السابع عشر – 20/ ابريل 2017

### - المراجع العربية:

- 1- أبو سعده , محمد نجيب إبراهيم . (2000) . التلوث البيئي ودور الكائنات الدقيقة إيجابا وسلبا . دار الفكر العربي . القاهرة , مصر .
- 2- المنفي , هدى محمد مرغان . (2007). دراسة قدرة سلالات بكتيرية معزولة من شاطئ رأس المنقار على استهلاك النفط الخام وإنتاج بروتين أحادي الخلية . رسالة ماجستير . أكاديمية الدراسات العليا , بنغازي , ليبيا .
- 3- زكي, درية , ورقية القشقرى . (1998). دراسة تأثير تركيزات مختلفة من الملح والهيدروكربون على قدرة الكائنات الدقيقة على استهلاك الهيدروكربونات للتخلص من تلوث البحار وإنتاج البروتين وحيد الخلية . بحوث المؤتمر العربي الأول للكيمياء التطبيقية , القاهرة , مصر .
- 4- عبد الحميد, زيدان هندي ومحمد إبراهيم عبد المجيد . (1996) . الملوثات الكيميائية والبيئة . الدار العربية للنشر والتوزيع . القاهرة , مصر .
- 5- عبدالرازق , هالة عبدالحافظ . (2012). اختبار قابلية العزلة الملحية *Nocardia asteroides* على إنتاج المستحلبات الحيوية واستهلاك النفط الخام واستخدام تقنية التطهير بأشعة الليزر لتحسين كفاءتها . مجلة مركز بحوث التقنيات الاحيائية . المجلد السادس . العدد الثاني . كلية العلوم , جامعة المستنصرية . العراق .

### - المراجع الاجنبية:

- 1- Ajisebutu S.O. (1988). Effect of sodium chloride on biodegradation of crude oils by two species of Aeromonas. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28:203-208.
- 2- Al-Awadhi H. , Dashti N. , Kansour M. , Sorkhoh N and Radwan S.(2012). Hydrocarbon-utilizing bacteria associated with biofouling materials from offshore waters of the Arabian Gulf. International Biodeterioration and Biodegradation . 69:10-16.
- 3- Al-Dahash L. M. , Mahmoud H. M. (2013). Harboring oil-degrading bacteria: A potential mechanism of adaptation and survival in corals inhabiting oil-contaminated reefs. Marine Pollution Bulletin 72: 364-374.
- 4- AL-Saleh E. , Drobiva H and Obuekwe C. (2008). Predominant culturable crude oil degrading bacteria in the coast of Kuwait. International Biodeterioration and Biodegradation . 63:400-406.
- 5- Antai S. P. (1990). Biodegradation of Bonny light crude oil by *Bacillus sp.* and *Pseudomonas sp.* Waste Management. 10: 61-64.
- 6- Atlas R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons : an environmental perspective. Microbial. Rev. 45 :180 - 209.
- 7- Baraniecki C.A. , Aislable J and Foght J.M.(2002). Characterization of *Sphingomonas sp.* Ant 17, an aromatic hydrocarbon degradation bacterium isolated from Antarctic soil . Microbial Ecology. 43:44-54
- 8- Diaz M .P , Boyd ,K. G .Grigson ,S .J. W. ,and Grant - Burgess ,J.( 2002) . Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial

العدد السابع عشر – 20/ ابريل 2017

- consortium MPD-M immobilized onto polypropylene fibers. Inc. Biotechnol.Bioeng.79:145-153.
- 9- Doumenq P. , Aries E. , Asia L. , Acquaviva M. , Artaud J. , Gilewicz M. , Mille G and Bertrand J.C.(2001). Influence of n-Alkane and petroleum on fatty acid composition of a hydrocarbonoclastic bacterium: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain 617.Chemosphere.44:519-528.
- 10- Edelvio de. , Adriana B.G. , Rita de.U.S. , Maria de .C.M. , F. and Nei P.J.( 2009). Biodegradation of stored jet fuel by a Nocardia sp. Isolated from contaminated soil, Braz arch Boil technol. 52: 1516 – 1520.
- 11- Finnerty W.R. (1992).The biology and genetics of the Genus *Rhodococcus*, Annu. Rev.Microbiol. 46:193–218.
- 12- Harayama S. , Kishira H. , Kasai Y and Shutsubo K.(1999) . Petroleum Biodegradation in Marine Environments . Molec Microbiol . Rev 1:6370.
- 13- Hazen T.C. , Tien A.J. , Worsztynowicz A. , Altman D.J. , Ulfig K and Manko T.(2003). Biopiles for remediation of petroleum–contaminated soils :Apolish case study.Lawrence Berkeley national laboratory Institute for ecology of Industrial Areas.p:1-15.
- 14- Ijah U. J. J. , and Antai S. P. (2003a). Removal of Nigerian light crudeoil in soil over a 12-month period. Int. Biodeter. Biodegrad.51: 93-99.
- 15- Ijah U. J. J. and Antai S. P. (2003b). The potential use of chicken-drop micro-organisms for oil spill remediation. Enviro., 23: 89–95.
- 16- Jia L. Q. , Quz Z. Q. and Quyang Z. y. (2005). Exological behavior of linear ylbenzene sulfonate (LAS) in soil –plant systems . Pedosphere. 15:216-224.
- 17- Johnsen A. R. , Wick L. Y. and Harms H.(2005). Principles of microbial PAH degradation in soil . Encironmental pollution . 133: 71-84.
- 18- Karpenko E.V. , Vil'danova-Martsishin R.I. , Shcheglova N.S., Pirog T.P and Voloshina I.N. (2006). The prospects of using bacteria of the genus *Rhodococcus* and microbial surfactants for the degradation of oil pollutants, Appl. Biochem. Microbiol. 42:156–159.
- 19- Kostka J. E. , Prakash O. , Overholt W A. , Green S J. , Freyer G. , Canion A, Delgardio J. , Norton N. , Hazen T. C and Huettel M.(2011). Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill. Appl Environ Micrbiol. 77:7962–7974.
- 20- Lattuati A. , Metzger P. , Acquaviva M. , Bertrand J.C and Largeau C.(2002). n-Alkane degradation by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain SP 17 : long chain B-hydrox acids as indicators of bacterial activity. Organic Geochemistry.33:37-45.
- 21- Leahy J.C and Colwell R.P. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, Microbial Rev. 54: 305 – 315.

العدد السابع عشر – 20/ ابريل 2017

- 22- Liu C.W. , Chang W.N. , Liu H.S.(2009). Bioremediation of n-alkanes and the formation of bioflocules by *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 under various saline conditions and sea water. *Biochemical Engineering Journal*.45:69-75.
- 23- Macdonald C.R. , Cooper D.G and Zajic J.E. (1981). Surface-active lipids from *Nocardia erythropolis* grown on hydrocarbons, *Appl Environ Microbiol*. 41: 117 – 123.
- 24- Mukherji ,S., Jagadevan, S. ,Mohapatra, G. and Vijay ,A .( 2004 ) . Biodegradation of diesel oil by Arabian sea sediment culture isolated from the vicinity of an oil field . *Bioresource Technology*. 95:281-286.
- 25- Okoh A. , Ajisebutu S. , Babalola G. , and Trejo-Hernandez M. R.(2001). Potential of *Bukholderia cepacia* RQ1 in the biodegradation of heavy crude oil. *International microbiology*. 4:83-87.
- 26- Paul E.A.( 2007). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*, 3rd ed ., Academic press, USA. 250-261p.
- 27- Przystas W. , Pasadakis N and Kalogerakis N. (2006). Degradation of crude oil in seawater and sand by mixed bacterial cultures, *Arch. Environ*. 32:43–57.
- 28- Rahman K. S. M. , Rahman J .T. , Kourkoutas Y. , Petsas I. , Marchant R. , and Banat I. M. (2003). Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioreso.Techol*. 90:159–168.
- 29- Rahman K. S. M. , Rahman J .T. , Kourkoutas Y. , Petsas I. , Marchant R. , and Banat I. M. (2003). Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioreso.Techol*. 90:159–168.
- 30- Rahman K. S. M. , Rahman J. T. , Lakshmanaperumalsamy P. and Banat I. M. (2002). Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioreso. Technol*. 85: 257–261.
- 31- Ron E.S and Rosenberg E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation, *current Opinion Biotechnol*. 13: 249 – 252.
- 32- Saieb F. M and Elghazawani A. H. (2008). Isolation and Identification of Bacteria in Sarir Refinery Wastewater in Libya. *Delta Journal of Science*.33:1-13.
- 33- Scott M. (2000). The biodegradation of surfactants in the environment , *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1508: 235-251.
- 34- Si-Zhong Y. , Hui-Jun J. , Zhi W. , Rui-Xia H. , Yan-Jun J. , Xiu-Mei L and Shao-Peng Y.( 2009). Bioremediation of Oil Spills in Cold Environments . *Pedosphere* . 19: 371–381.
- 35- Smith C. B. , Johnson C. N and King G. M. (2012). Assessment of polyaromatic hydrocarbon degradation by potentially pathogenic environmental *Vibrio parahaemolyticus* isolates from coastal Louisiana, USA . *Marine Pollution Bulletin* 64:138–143.

**العدد السابع عشر – 20 / ابريل 2017**

- 36- Stephens E. L. , Molina V. , Cole K. M., Laws E and Johnson C. N. (2013). In situ and in vitro impacts of the Deepwater Horizon oil spill on *Vibrio parahaemolyticus*, Marine Pollution Bulletin 75: 90–97.
- 37- United States Environmental Protection Agency , 2/8/2006.
- 38- Van-Beilen J.B. , Li Z. , Duetz W.A. , Smits T.H.M and Witholt B. (2003). Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment, Oil Gas Sci. Technol. 58.427–440.
- 39- Willey T.M , Sherwood L. M. and Woolverton C. J.(2008). Prescott Harley and Kleins Microbiology . Mcraw Hill, New York.