أختبارقابلية العزلة المحلية *Nocardia asteroids* على أنتاج المستحلبات الحيوية وأستهلاك النفط الخام واستخدام تقنية التطفير باشعة الليزر لتحسين كفائتها

Assessment of the Local Isolate ability *Nocardia asteroids* for roduction of biosurfactants and utilize Crude Oil and use mutation technology by Laser Irradiation for enhancement of their efficiency

هاله عبد الحافظ عبد الرزاق
كلية العلوم / الجامعة المستنصرية
Hala Abdul-Hafudh Abdul-Razak
College of Science/ University Al-Mustansiriyah

المستخلص

اجريت الدراسة الحالية لاختبار قابلية العزلة المحلية *Nocardia asteroides* على انتاج المستحلبات الحيوية واستهلاك النفط الخام بثلاثة تراكيز (0.5،1،2)% في الوسط الملحي الازرق الصلب والوسط الملحي السائل بأستخدام أربعة مؤشرات هي قطر الحلقة الزرقاء الداكنة حول المستعمرات النامية ، الوقت اللازم لظهورها ، الفعالية الأستحلابية لراشح الخلايا ، الصفة الكارهة للماء لسطوح الخلايا للعالق الخلوي ، أخضعت العزلة المحلية للتطفير باشعة الليزر ولاوقات تعريض مختلفة (12,10,8,6,4,2) دقيقة ، كما تم دراسة قابلية العزلة المحلية غير المطفرة والمطفرة على انتاج المستحلبات الحيوية واستهلاك النفط الخام في نمو ذج التربة خلال ستة اسابيع ، جاءت النتائج كالآتي : تمكنت العزلة المحلية من استحلاب النفط الخام كمصدر وحيد للكاربون والطاقة بالية الاستحلاب الحياتي ، بلغت اعلى قيمة لأنتاج المستحلبات الحيوية عند استهلاك النفط الخام بتركيز 2% بدلالة المؤشرات الأربعة . حدثت زيادة معنوية في معدل انتاج المستحلبات الحيوية بعد التعرض لاشعة الليزر وبلغ اعلى قيمة له بعد مرور 6 دقائق بدلالة المؤشرات الأربعة . حدثت زيادة معنوية في العدد الكلي للخلايا في نموذج التربة الملوث بالنفط الخام بلغ اعلى قيمة له بعد اضافة الراشح البكتير ي سواء للعزلة المحلية غير المطفرة او المطفرة .

Abstract

The present study was performed to assess the ability of local isolate *Nocardia asteroids* to produce bioemulisifers and utilize crude oil at three concentrations (0.5,1,2) % on blue mineral salt agar and mineral salt broth. Four parameters were used to detect the production of the bioemulisifers: Diameter of dark blue halo around the colonies, the time of appearance, emulisification activity of supernatant, hydrophobicity of cell surface of suspension.The local isolate was subjected to mutation by laser irradiation at different exposure times (2,4,6,8,10,12)minutes. In this study the ability of both non mutated and mutated local isolate had been tested to utilize crude oil in soil sample was monitored through six weeks Results obtaind could be summarized as follows: The local isolate has shown the ability to emulsify crude oil as the sole carbon and energy source by bioemulisification, depending on four parameters, bioemulisifers production reaching maximum after utilizing 2% crude oil. Significant increase in production of bioemulisifers reaching maximum after, (6) minutes from exposure to Laser, depending on four parameters. Significant increase in total number of the cells in soil sample contaminated with 2% crude oil after the addition of bacterial filtrate of non mutated and mutated of local isolate.

المقدمة

تعرف المستحلبات الحيوية bioemulisifers بانها نواتج حيوية ذات فعالية على مستوى الشد السطحي biosurfactants لطورين هما طور كاره للماء (غير ذائب فيه) وطور محب للماء (ذائب فيه) ، اذ تمتلك هذه المواد مقاطعات كارهة للماء و اخرى محبة للماء وبالامكان ان تتداخل مع المواد القطبية وغير القطبية ، وتدعى هذه الظاهرة بالاستحلاب البايولوجي bioemulisification [1] التي تلجا اليها الاحياء المجهرية عندما تنمو في اوساط كارهة للماء فتقلل من الشد السطحي بين هذين الطورين مؤدية الى تكوين تجمعات صغيرة من الجزيئات الكارهة للماء داخل الطور ا لمحب للماء فتزداد المساحة السطحية المتاحة للتداخل المكروبي أي الجاهزية الحيوية bioavialability لتلك الجزيئات فيزداد استهلاكها [2] .

تنتج المستحلبات الحيوية من قبل الكثير من الاحياء المجهرية لا سيما البكتريا في ظروف هوائية بكميات كبيرة وبانواع مختلفة ومعظم ها عبارة عن معقدات دهنية خارج خلوية اما ان تبقى ملتصقة على سطح الخلية او ان تطرح الى الوسط الزرعي [3] . تقسم المستحلبات الحيوية اعتمادا على اوزانها الجزيئية الى نوعين :

ذات الاوزان الجزيئية الواطئة وتشمل :

Glycolipids (Trehalose lipids , rhamnolipids , sophorolipids)

Lipopeptides (gramicidin , surfactin , polymyxin)

ذات الاوزان الجزيئية العالية وتشمل:

Amphipathic polysaccharides , proteins , lipopolysaccharide , lipoproteins , complex mixture of these biopolymers [4]

حظيت المستحلبات الحيوية باهتمام متزايد ف ي السنوات الاخيرة ، اذ اصبحت هي السائدة في كثير من الاستخدامات الصناعية والتطبيقات البيئية بدلا عن المستحلبات الصناعية للاسباب : (1) قدرتها على التجزئة البايولوجية للمركبات المعقدة biodegradability (2) سميتها واطئة عموما (3) ملائمتها من الناحية البايولوجية وقابلة للهضم biocompatibility and digestibility ، لذا تستخدم في صناعة الادوية والاغذية ومساحيق التجميل (4) موادها الاساس هي مواد خام رخيصة ومتوفرة بكثرة كالكربوهيدرات والدهنيات والهيدروكاربونات (5) امتلاكها لمجاميع فعالة مختلفة في تركيبها الكيميائي جعل لها خصوصية في عملها (6) تؤثر حتى في الظروف البيئية القاسية كارتفاع درجات الحرارة والحموضة والملوحة [5] .

منذ مطلع التسعينات من القرن الماضي ارتبط مفهوم الاصلاح البايولوجي bioremediation (هو تعزيز العمليات البايولوجية للتجزئة طبيعيا) مع تلوث البيئة بالهيدروكاربونات النفطية اذ اصبح تراكم النفط الخام في التربة باستمرار يمثل مشكلة كبيرة في الوقت الحاضر [6] .

تعد الية الاستحلاب البايولوجي احدى الوسائل الكفوءة للاصلاح البايولوجي للتربة الملو ثة بالنفط فهي بمثابة البديل عن الوسائل الكيميائية والفيزيائية المتبعة لازالة الملوثات الخطيرة من البيئة فضلا عن كونها غير مكلفة اقتصاديا وامنة صحيا ولا تشكل عبئا جديدا على البيئة المثقلة بالملوثات[7،8] .

واجهت تقنية الأصلاح البايولوجي للهلوثات النفطية العد يد من المشكلات ألا وهي صعوبة تحلل بعض الهيدروكاربونات النفطية والبعض الأخر غير قابل للتحلل بفعل الاحياء المجهرية اذ تتناسب درجة التحلل طرديا مع درجة ذوبان الهيدروكاربونات النفطية في الماء [9] لذا طورت طرائق الأصلاح البايولوجي لتاخذ اتجاه التطوير الوراثي لسلا لات من الاحياء المجهرية المنتجة للمستحلبات الحيوية وخاصة البكتريا المستوطنة autochthonous في مناطق التلوث والتي اكدت الدراسات انها ذات كفاءة جيدة في استهلاك الهيدروكاربونات المختلفة وذلك بأستخدام تقنيات الهندسة الوراثية المتمثلة بالتطفير باشعة الليزر[10] .

ونتيجة لتعرض تربة العراق الى التلوث بالنفط ال مراق عليها نتيجة الحوادث العرضية وغير العرضية التي تتعرض اليها ناقلات النفط وانابيب نقل النفط ومرورها عبر الاراضي الزراعية وقرب المنشأة النفطية ومصانع التكرير من تلك الاراضي جاءت هذه الدراسة لتقديم العزلة الم حلية بكتريا *N.asteroides* المعزولة اصلا من التربة الملوثة بالنفط الخام كنموذج مقترح للاصلاح البايولوجي لتلك التربة و كمحاولة لتحسين كفاءة العزلة استخدمت تقنية التطفير باشعة الليزر لتحقيق الغرض اعلاه .

المواد وطرائق العمل

أ. المواد:

النفط الخام المستخرج من حقول كركوك والمعد للتصدير من مصفى الدورة والمحفوظ في اوعية محكمة الاغلاق بدرجة حرارة 4 م لحين الاستخدام .

تربة ذات نسجة غرينية رملية جمعت من المناطق الزراعية المحيطة بمصفى الدورة / بغداد خلال شهر نيسان /2010 بمقدار 5كغم من عمق 10-15 سم تحت سطح الارض ووضعت الترب داخل اكياس نايلون معقمة غير مستعملة ونقلت الى المختبر ، جففت هوائيا وبسرعة وطحنت ثم نخلت بمنخل ذي فتحات 3ملم وخزنت في درجة حرارة الغرفة .

ب. الأوساط:

وسط مستخلص التربة Soil extract medium

المحضر من المكونات الاتية وفق ما ورد في[11] :-

1. مستخلص التربة Soil extract

تضاف 1 كغم من تربة غرينية رملية الى 1 لتر من الماء المقطر ومزجت جيدا بقضيب زجاجي وعقمت في جهاز الموصدة لمدة 10 دقائق ثم ورشحت بقمع زجاجي مزود بورقتي ترشيح وتركت لمدة 24 ساعة لتتخمر وأضيف 10 غرام من كاربونات الكالسيوم CaCo3 ثم عدل الرقم الهيدروجيني الى حد pH=7.0 ثم عقمت بالموصدة .

2. وسط مستخلص التربة السائل Soil extract broth

وزن 1غم كلوكوز و 0.5غرام فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين k_2HPO_4 و 0.1غرام نترات البوتاسيوم KNO_3 اذيبت جميع المكونات في 900 مليلتر من الماء المقطر عدل الرقم الهيدروجيني الى حد pH=7-6.8 ثم اكمل الحجم الى 1لتر باضافة 100مليلتر من مستخلص التربة،ثم عقم بالموصدة .

وسط مستخلص التربة الصلب Soil extract agar حضر باضافة 18غرام من الاكار لكل لتر الى الوسط السائل أعلاه، ثم يعقم بالموصدة .

ج. عزلة من بكتريا *N.asteroids*

تم الحصول عليها من مختبرات الدراسات العليا / قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بغداد المعزولة اصلا من الترب الزراعية المحيطة بمصفى الدورة . تم التاكد من تشخيصها باجراء الفحوصات الكيموحياتية حسب ما ورد في [12] ، حضر مزروع بكتيري بعمر (18-24) ساعة ليحتوي على ما معدله $17x10^8$ خلية/مليلتر في وسط مستخلص التربة السائل ، تم معايرة اعداد الخلايا باستخدام انبوبة مكفرلاند .

د. ليزر النتروجين النبضي Pulsed Nitrogen Laser

استعمل لغرض التطفير في معهد الليزر للدراسات العليا / جامعة بغداد اذ يكون الاشعاع المنبعث من هذا الليزر في منطقة الاشعة فوق البنفسجية من الطيف الكهرومغناطيسي بطول موجي مقداره 337.1 نانومتر، يعمل هذا الجهاز بتكرار نبضات repetition rate تتراوح بين (1-50) نبضة بالثانية وتبلغ طاقة النبضة pulse energy 1.5 ملي جول ، ويبلغ تردد النبضة pulse width 10 نانو ثانية ، الوسط الفعال في هذا الليزر هو غاز النتروجين بنقاوة عالية .

ه-. اختبار قابلية العزلة المحلية على انتاج المستحلبات الحيوية

ه-.1. انتاج الحلقة الزرقاء الداكنة dark blue halo

حضر الوسط الزرعي الملحي الازرق الصلب blue agar من المكونات الاتية وفق ما ورد في [13] بوزن مجموعة من الاملاح المعدنية وهي 2غم كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ ، 6غم فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجينkH_2PO_4 ، 0.1غرام كبريتات المغنيسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$ ، (1) غم كلوريد الصوديوم NaCl، (1) غرام فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين Na_2HPO_4 ، 0.5 غم نترات الامونيوم NH_4NO_3 ، 0.02غم كلوريد الكالسيوم المائي $CaCl_2.2H_2O$ ، 0.002غم كلوريد الحديديك Fecl3 ، 0.002 غم كبريتات المنغنيز المائية $MnSO_4.2H_2O$ ، 1.5 %اكار- اكار ، 0.2 ملي غم / مليلتر Cetyltrimethyl (CTAB) ammonium bromide$CH_3(CH_2)_{15}N(CH_3)_3Br$ ، 5مايكروغرام/مليلترصبغة الميثلين الازرق ، اذيبت جميع المكونات في 1 لتر من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى حد pH7 ، وزع الوسط الزرعي بواقع 100 مليلتر في دوارق مخروطية سعة 250 مليلتر عقمت بالموصدة واضيف اليها النفط الخام المعقم بالترشيح

خلال مرشحات غشائية 0.22 مايكرومتر بالتراكيز (2,1,0.5)% (حجم/حجم) وبثلاثة مكررات لكل تركيز من النفط الخام لقحت الاوساط الزرعية بالمزروع البكتيري بطريقة الصب بالاطباق Pour– plate حضنت الاطباق بدرجة حرارة 28م ولمدة(20-40)يوم في جو مشبع بالرطوبة (بوضع اناء حاوي على الماء المقطر المعقم في الحاضنة طيلة فترة الحضانه) لحين ظهور الحلقة الزرقاء حول المستعمرات النامية تم تحديد التركيز الامثل للنفط الخام لانتاج اعلى كمية من المستحلبات الحيوية اعتمادا على قياس قطر الحلقة الزرقاء (ملم) والمعدل الزمني للظهور (يوم) .

ه- .2. الفعالية الاستحلابية Emulsifying activity

حضر الوسط الملحي السائل Mineral salt broth وفق [14] بوزن مجموعة الاملاح المعدنية السالفة الذكر في الفقرة (ه- 1)، وزع الوسط الزرعي بواقع 40 مليلتر في دوارق مخروطية سعة 300 مليلتر عقمت بالموصدة واضيف اليها النفط الخام المعقم بالترشيح وبالتراكيز (2,1,0.5)% (حجم/حجم) لقحت الدوارق بـ1 مليلتر من المزروع البكتيري بثلاثة مكررات لكل تركيز ، حضنت الدوارق في حاضنة هزازة و بسرعة 130 دورة/دقيقة ولمدة 16 يوم وبدرجة حرارة 25م رسبت الخلايا بنبذها مركزيا بسرعة 3000 دورة/دقيقة فصل الراشح البكتيري واضيف 0.2 مليلتر منه الى انبوبة اختبار حاوية على مزيج مكون من 0.5 مليلتر من محلول دارئ TM المحضر من($MgSO_4$ 10mM ,pH=7.0 Tris Hcl 20mM) ،0.1 مليلتر من النفط الخام مزجت الانابيب بجهاز المازج بدرجة حرارة الغرفة ولاقصى سرعة لمدة دقيقة واحدة وتركت الانابيب لتستقر لمدة دقيقة واحدة قيست العكورة للطور المائي على طول موجي 550 نانومتر لتقدير الفعالية الاستحلابية المثلى لانتاج اعلى كمية من المستحلبات الحيوية اذ ان الوحدة الاستحلابية لكل مليلتر ويرمز لها EU/ml تعرف على انها كمية المادة المستحلبة التي تنتج امتصاصية مقدارها 1 عند طول موجي 550 نانومتر .

ه- .3. الصفة الكارهة للماء لسطوح الخلايا Hydrophobicity

استخدم راسب الخلايا لكل تركيز من النفط الخام والمعد وفق الفقرة(هـ-2) لاختبار قابلية العزلة البكتيرية المحلية على الالتصاق مع الهيدروكاربون أي زيادة الصفة الكارهة للماء لسطوح الخلايا وفقا لما ورد في [14] اذ علقت الخلايا في 10 مليلتر من محلول دارئ PUM بوتاسيوم – يوريا – مغنيسيوم المحضر من 22.2غم فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين المائية $K_2HPO_4.3H_2O$ ، 7.26غم فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 ، 1.8 غرام يوريا ، 0.2 غم كبريتات المغنيسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$ ذوبت جميعها في 1لتر من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني لحد pH7.1 سجلت القراءة الاولية لعالق الخلايا عند طول موجي 420 نانومتر وتكون ضمن المدى 0.6- 0.5 أضيف 1.2 مليلتر من عالق الخلايا الى 0.2 مليلتر من النفط الخام ومزجت المحتويات بجهاز المازج على اقصى سرعة لمدة 2 دقيقة وبدرجة حرارة الغرفة وتركت لساعة واحدة بعدها فصل الجزء السفلي (المائي) من الانبوب بعناية وقيست الامتصاصية له لتحديد النسبة المئويةالمثلى للصفة الكارهة للماء لسطوح الخلايالانتاج اعلى كمية من المستحلبات الحيوية وحسبت وفق المعادلة الاتية:

$$\text{الصفة الكارهة للماء}(\%) = 1 - \frac{\text{قراءة الكثافة الضوئية للطور المائي}}{\text{قراءة الكثافة الضوئية الاولية لعالق الخلايا}} \times 100$$

و. التطفير باستعمال الليزر

وفقا لما ورد في [15] نبذت مركزيا 5 مليلتر من المزروع البكتيري المحضرفي مستخلص التربة السائل ورسبت الخلايا بسرعة 3000 دورة/دقيقة ولمدة (15-20 دقيقة) اهمل الراشح واخذ الراسب غسلت الخلايا المترسبة ثلاث مرات بالمحلول الملحي pH7 والمحضر من اذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في كمية من الماء المقطر واكمل الحجم الى 100 مليلتر عقم في الموصدة ثم حفظ بدرجة حرارة 4م لحين الاستعمال لاغراض التخفيف ، علقت الخلايا بمحلول (TrisHcl 2M,pH=7) ونقل 1 مليلتر من المحلول المعلق الى انبوبة ابندورف ، تم تطفير العزلة المحلية *N.asteroides* بتعريض النموذج الى اشعة ليزر النتروجين النبضي بمعدل 6 نبضات/ثانية وباوقات تعريض مختلفة (12,10,8,6,4,2) دقيقة عرضت 10^8x17 خلية /مليلتر من بكتيريا *N.asteroides* يعد هذا العدد من الخلايا مناسبا لمثل هذه الدراسات ، بعد التعريض رسبت الخلايا ، اضيف 5 مليلتر من الوسط الزرعي مستخلص التربة السائل المعقم الى الخلايا المترسبة لكل من النماذج المشعة ونموذج السيطرة وحضنت بدرجة حرارة 28م لمدة 24 ساعة لتحديد وقت التعريض الامثل لانتاج

اكبر كمية من المستحلبات الحيوية عند تركيز 2 % نفط خام اعتمادا على انتاج الحلقة الزرقاء الداكنة بزرع العزلة المحلية المطفرة على الوسط الزرعي الازرق الصلب ، واعتمادا على قياس الفعالية الاستحلابية والصفة الكارهة للماء لسطوح الخلايا بزرع العزلة المحلية المطفرة في الوسط الملحي السائل ، في بداية التجربة تم حساب العدد الحي باستعمال طريقة عد الاطباق أذ زرعت الخلايا المترسبة على وسط مستخلص التربة الصلب لأحتساب نسبة التثبيط (%) لتحديد منحني مدة البقاء (Survival curve) لبقاء العزلة الحية بعد التعريض على وفق المعادلة الاتية : نسبة التثبيط % = (عدد الخلايا/مل في معاملة السيطرة – عدد الخلايا /مل بعد التطفير) /(عدد الخلايا /مل في معاملة السيطرة)X 100% .

ملاحظة :عدت نسبة البقاء 100% لمعاملة السيطرة .

ز. استهلاك النفط الخام في التربة

تم اختبار قابلية العزلة المحلية الغير مطفرة والمطفرة على استهلاك النفط الخام في التربة بتحوير الطريقة المذكورة في [16] اذ حضر 18 دورق مخروطي سعة 1000 مليلتر وقسمت الى ستة مجاميع اخذت التسلسلات الاتية: (6,5,4,3,2,1) ضمت كل مجموعة على ثلاث دوارق للتكرار،زودت ب250غم تربة (فقرة -2) عقمت الدوارق بالموصدة لمدة ساعة واحدة يوميا ولغاية 3 ايام تركت الدوارق لتبرد بعد التعقيم لقحت بـ 10% من المزروع البكتيري لكل من العزلة غير المطفرة والمطفرة في الدوارق ذات التسلسلات (5,3,1) للعزلة غير المطفرة و (6,4,2) للعزلة المطفرة اضيف 2% من النفط الخام (حجم/وزن) والمعقم بالترشيح للدوارق ذات التسلسلات (6,5,4,3) اضيف 5% من الراشح البكتيري (حجم/وزن) والمعقم بالترشيح للعزلة غير المطفرة والمطفرة (اذ تم تنمية الخلايا في الوسط الملحي السائل المزود بـ 2% نفط خام) الى الدورق ذي التسلسل 5 للعزلة غير المطفرة والدورق ذي التسلسل 6 للعزلة المطفرة حضنت الدوارق بدرجة حرارة 28م ولمدة 6 اسابيع وتم خلالها تقدير الكثافة العددية للبكتريا أسبوعيا اعتمادا على طريقة عد الاطباق على وسط مستخلص التربة الصلب ،في كل مدة قياس تم اخذ 1 غرام تربة ، كما تم المحافظة على المحتوى الرطوبي تحت جميع المعاملات باضافة الماء المقطر المعقم اليها.

ي. التحليل الاحصائي

تم تطبيق تحليل التباين الاحادي One way Analysis of Variance /ANOVA للمقارنة بين المعالجات جميعا ولاختبار معنوية الفروق فيما بينها وتم تطبيق اختبار المقارنات المتعددة Multiple comparisons باستخدام طريقة الفرق المعنوي الاصغر Last Significant Difference LSD/ في حالة وجود فروقات معنوية بين المعالجات بأعتبار الأحتمالية أقل من (0.05) ، وثبتت النتائج بشكل(المتوسط الحسابي(Mean(M ± الانحراف المعياري(Standard deviation(SD) .

النتائج والمناقشة

اظهرت النتائج الموضحة في جدول (1) قدرة العزلة المحلية *N. asteroids* على انتاج المستحلبات الحيوية واستهلاك النفط الخام على وسط الاملاح المعدنية الازرق الصلب المضاف اليه تراكيز مختلفة من النفط الخام (2,1,0.5)% كل على حده كمصدر وحيد للكاربون والطاقة.

تناسب انتاج المستحلبات الحيوية تناسبا طرديا مع نمو المستعمرات وقطر الحلقة الزرقاء وعكسيا مع المعدل الزمني لظهور الحلقة بازدياد تراكيز النفط الخام ،انعكس ذلك من خلال قياس قطر الحلقات الزرقاء (ملم) حول المستعمرات النامية والمعدل الزمني (يوم) لظهور تلك الحلقات على الوسط الازرق الصلب صورة (1) ، كان افضل انتاج عند استهلاك النفط الخام بتركيز 2% اذ بلغ معدل قطر الحلقة الزرقاء 14.6مليمتر واستغرقت اقل معدل زمني للظهور 27 يوم بالمقارنة مع استهلاك بقية التراكيز للنفط الخام وبفروق معنوية عند مستوى احتمالية $P<0.05$ حيث تدنى انتاج المستحلبات الحيوية اذ بلغ معدل قطر الحلقة الزرقاء 12.4مليمتر واستغرق المعدل الزمني للظهور 30 يوم عند تركيز 1% من النفط الخام في حين بلغ معدل قطر الحلقة الزرقاء 6.3مليمتر واستغرق المعدل الزمني للظهور 34 يوم عند تركيز 0.5% .

ابدت العزلة المحلية قابليتها على استهلاك النفط الخام وانتاج المستحلبات الحيوية عند التنمية على وسط الاملاح المعدنية السائل المضاف اليه تراكيز مختلفة من النفط الخام (2,1,0.5)% كمصدر وحيد للكاربون والطاقة ، تتناسب طرديا مع ازدياد تراكيز النفط الخام انعكس ذلك على الفعالية الاستحلابية والصفة الكارهة للماء ، كان افضل انتاج عند تركيز 2 % للنفط الخام فقد بلغ اعلى معدل للفعالية الاستحلابية 1.11 وحدة استحلاب/مليلتر واعلى صفة كارهة للماء 45.11% بالمقارنة مع استهلاك بقية التراكيز للنفط الخام وبفروق معنوية عند

احتمالية P<0.05 فقد تدنى انتاج المستحلبات الحيوية اذ بلغ معدلي ا لفعالية الاستحلابية(0.96 , 0.149) وحدة استحلاب/مليلتر ومعدلي الصفة الكارهة للماء (15 , 55 .3) % عند التركيزيين 1, 0.5 % للنفط الخام على التوالي .

اوضحت النتائج بان العزلة المحلية *N.asteroids* قد استهلكت النفط الخام وبكفاءة كمصدر وحيد للكاربون والطاقة بالية الاستحلاب الحياتي في الوسط الازرق الصلب الذي يعد بمثابة تشخيص شبه نوعي وكمي للمستحلبات الحيوية المنتجة فقد كانت من نوع اللبيدات السكرية glycolipids بدلالة ظهور الحلقات الزرقاء الداكنة حول المستعمرات النامية كما كان افرازها الى الوسط الزرعي بكميات كبيرة بدلالة تزايد اقطار الحلقات وان قصر المعدل الزمني للظهور يعد مؤشرا لسرعة الاستحلاب [13] .

ادى نمو العزلة المحلية *N.asteroids* في الوسط الملحي السائل المضاف اليه النفط الخام كمصدر وحيد للكاربون والطاقة الى امتزاجه مع مكونات الوسط الزرعي أي استحلب وبمدة قصيرة والذي يعزى الى افراز البكتريا لمواد مستحلبة خارج خلوية بدلالة الفعالية الاستحلابية والصفة الكارهة للماء لسطوح الخلايا التي ادت الى تزايد الفة الخلايا للنفط الخام وتقليل لزوجته ومزجه مع الطور المائي [14] .

اشار [3] الى ان الهيدروكاربونات النفطية وما تحويه من احماض دهنية تمثل نقطة البداية لانتاج المستحلبات الحيوية من نوع اللبيدات السكرية اذ تكون السلسلة الهيدروكاربونية بطول (12-18) ذرة كاربون اما مشبعة او حاوية على مجموعة او اكثر غير مشبعة وهذا التعدد الوظيفي للجزيئة ممكن ان يؤدي الى تكوين معقدات فعالة للسطوح .

لاحظ [17] في دراسة عن قابلية تفكيك الاحياء المجهرية للمخلفات النفطية الماخوذة من الاحواض التي تسبق المعالجة الحيوية للنفط تحول معظمها الى اجسام كروية منتظمة على طبقة النفط الخام الموج ودة ضمن الوسط الزرعي السائل والذي عزي الى افراز مواد مستحلبة تؤدي الى خفض قيمة الشد السطحي وانفصال جزء من النفط مما يؤدي الى استحلابه بفعل احياء مجهرية مختلفة من بينها البكتريا *N.asteroids* .

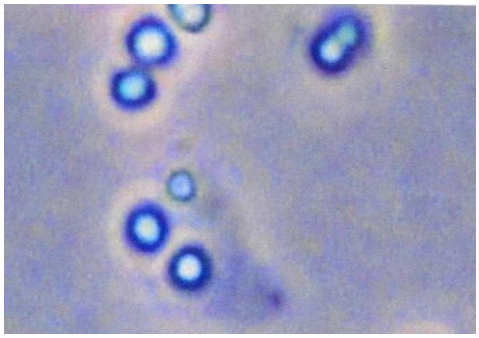
جاءت هذه النتائج لتطابق ما توصل اليه [18] الى ان الاحياء المجهرية من افضل الوسائل المحللة للهيدروكاربونات المشبعة الداخله في تركيب النفط الخام الذي يقود الى مفهوم المعالجة الحيوية للتلوث النفطي وتتوقف قابلية التحلل الحيوي على نوع المادة الهيدروكاربونية الخاضعة وعلى نشاط المجتمع المكروبي .

جدول(1):المؤشرات الاربعة لاستهلاك النفط الخام بتراكيز (2,1,0.5) % بآلية الاستحلاب الحياتي

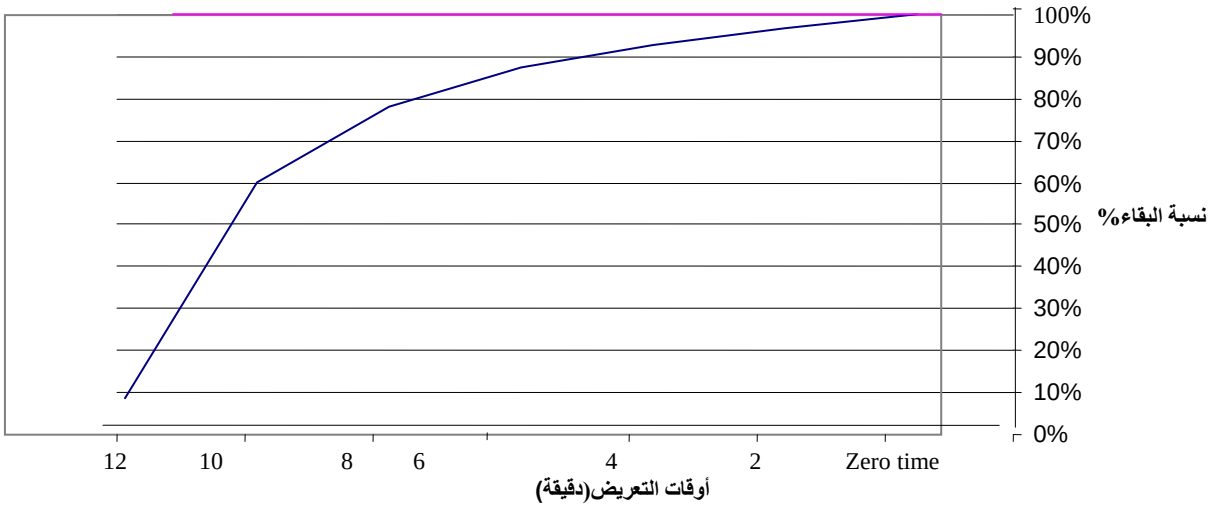
تراكيز النفط الخام%	قطر الحلقة الزرقاء (ملم)	زمن الظهور (يوم)	الفعالية الاستحلابية EU/ml	الصفة الكارهة للماء %
a	bc	bc	bc	bc
0.5	6.3±0.503	34±0.00	0.149±0.11	3.55±0.00
b	ac	ac	ac	ac
1	12.4±0.907	30 ±0.1	0.96 ±0.21	15 ±0.00
c	ab	ab	ab	ab
2	14.6±0.502	27±0.00	1.11 ±0.48	45.11±0.00

عبر عن النتائج M±SD

ملاحظة : يمثل كل رقم معدل ثلاثة مكررات،تمثل الأحرف a,b,c وجود فروق معنوية بمستوى P<0.05 بين المعاملات الحاملة لهذه الأحرف.



صورة (1) : الحلقات الزرقاء الداكنة حول مستعمرات بكتريا*N. asteroides* النامية على وسط الازرق الصلب المضاف اليه 2% نفط خام بعد مرور 27 يوم



شكل(1) : المنحني البياني لبقاء بكتريا *N.asteroides* حية بعد تعريضهاالأشعة الليزر لمدد زمنية مختلفة

يتضح من شكل (1) انخفاض اعداد البكتريا الحية للعزلة المحلية لاكثر من النصف بعد التعريض لأشعة الليزرلمدة 6 دقائق وكان عددها يقل كلما زادت مدة التعريض وصولا الى نسبة البقاء 9 % بعد التعريض لمدة 12 دقيقة.

توضح نتائج جدول (2) ازدياد قدرة العزلة المحلية بعد التعريض الى اشعة ليزر لانتاج المستحلبات الحيوية واستهلاك النفط الخام بتركيز 2 % كمصدر وحيد للكاربون والطاقة على الوسط الازرق الصلب ذو الاملاح المعدنية اذ حصلت زيادة معنوية عند مستوى احتمالية $P<0.05$ في كمية الانتاج، انعكس ذلك من خلال قياس قطر الحلقة الزرقاء (ملم) والمعدل الزمني للظهور (يوم) حول المستعمرات النامية، فقد تناسبت كمية انتاج المستحلبات الحيوية تناسبا طرديا مع اقطار الحلقات الزرقاء وعكسيا مع المعدلات الزمنية للظهور بازدياد اوقات التعريض لاشعة الليزر فقد بلغ اقصى معدل لقطر الحلقة الزرقاء 23 ملم واستغرقت اقل وقت لظهو رها 5 يوم بعد مرور 6 دقائق من التعريض بالمقارنة مع وقت التعريض عند بداية التجربة أي الزمن صفر فقد بلغ قطر الحلقة الزرقاء 14.5ملم ومعدل ظهورها الزمني 38.2يوم في حين تدنت معدلات اقطار الحلقات الزرقاء بعد مرور اوقات التعريض (12,10,8,4,2) دقيقة فقد بلغت (15.6,17,21,20,17) ملم على التوالي ومعدلات ظهورها (15, 10.41, 19,17,9.6) يوم على التوالي بالمقارنة مع نظيراتها عند وقت التعريض 6 دقائق .

يوضح الجدول السابق حصول زيادة معنوية عند مستوى احتمالية $P<0.05$ في كمية انتاج المستحلبات الحيوية واستهلاك النفط الخام بتركيز 2% في الوسط الملحي السائل وذلك بعد تعريض العزلة المحلية *N.asteroides* الى اشعة ليزر لفترات زمنية مختلفة (12,10,8,6,4,2) دقيقة انعكس ذلك من خلال قيم الفعالية الاستحلابية للراشح الخلوي و الصفة الكا رهة للماء للعالق الخلوي فقد بلغت اقصى معدلات الانتاج بعد مرور 6 دقائق من التعريض اذ كانت اقصى فعالية استحلابية 4.33 وحدة استحلاب /مليلتر واقصى صفة كارهة للماء 90.96 % بالمقارنه مع وقت الصفر فقد بلغت الفعالية الاستحلابية 1.21 وحدة استحلاب/ مليلتر والصفة الكارهة للماء 48.44 % ، في حين تدنت معدلات انتاج المستحلبات الحيوية بعد تعريض العزلة المحلية *N.asteroides* لاشعة ليزر باوقات تعريض (2,4,8،10،12)دقيقة فقد بلغت الفعالية الاستحلابية (2.15, 3.11, 3.21, 2.42, 1.91) وحدة استحلاب /ملليتر على التوالي والصفة الكارهة للماء (55.22,60.11,70.5,80.11,74.22) % على التوالي وذلك بالمقارنه مع نظيرتها عند وقت التعرض 6 دقائق .

يسبب ليزر النتروجين تاثيرا محفزا نتيجة لأثارة جزيئة Nicotinamide adenine (NADH) dinucleotide phosphate التي تؤدي الى زيادة في تفاعلات الاكسدة والاختزال ويمكن ان تحدث طاقة عالية من سيل من الالكترونات خلال السلسلة التنفسية مؤدية الى انتاج طاقة عالية بوساطة جزيئات (ATP) Adenosine Triphosphate وبذلك تزيد مثل هذه النتيجة من فعالية الخلية [10] .

فقد حصل[15] على عزلات من بكتريا *N.asteroides* اتصفت بكونها ذات كفاءة عالية في انتاج المستحلبات الحيوية مقارنه بالعزلات الام بعد معاملتها بطاقة قليلة من اشعة الليزر نيتروجين .

أظهرت النتائج الموضحة في جدول (3) قابلية العزلة المحلية *N.asteroides* سواء غير المطفرة والمطفرة على استهلاك النفط الخام بتركيز 2 % في التربة انعكس ذلك من خلال حصول زيادة معنوية عند مستوى احتمالية $P<0.05$ لمعدلات لوغاريتم العدد الكلي للخلايا الحية لكل غرام تربة بعد تنمية العزلة غير المطفرة والمطفرة في نموذج التربة 6,5 على التوالي اذ اخذت الاعداد بالتزايد ابتداء من الاسبوع الاول واستمرت الزيادة لغاية الاسبوع الرابع منذ بدء التجربة (أي الزمن صفر) وبتفوق معدلات نمو العزلة المطفرة فقد بلغ اقصى معدل للعزلة غير المطفرة والمطفرة (9.8,9.7) بالمقارنة مع معدلي نظيرتهما للعزلة المحلية فـي نموذج التربة رقم 3،4 فقد بدات الزيادة من الاسبوع الثاني واستمرت لغاية الاسبوع الرابع اذ بلغ اقصى معدل لهما (9.5,9.4) على التوالي وبالمقارنة مع معدلي نظيرتهما في نموذجي التربة 1،2 للعزلة غير المطفرة والمطفرة فقد بلغ اقصى معدل لهما (9.3,9.2) على التوالي اذ استمرت الزيادة في اعداد البكتريا لغاية الاسبوع الثاني فقط منذ بدء التجربة .

اظهرت النتائج الموضحة في ذات الجدول حصول انخفاض معنوي عند مستوى احتمالية $P<0.05$ في معدلات لوغاريتم العدد الكلي للخلايا لكل غرام تربة بلغ ادناها بعد مرور 6 اسابيع منذ بدء التجربة بعد تنمية العزلة غير المطفرة والمطفرة في نموذجي التربة 2،1 فقد بلغ(3.8,3.2) على التوالي بالمقارنة مع معدل نظيرتي العزلة المحلية غير المطفرة والمطفرة بعد التنمية في نموذجي التربة رقم 4،3 بعد مرور اسبوع واحد منذ بدء التجربة فقد بلغ معدلي العزلة المحلية غير المطفرة والمطفرة (6.4,6.1) على التوالي بالمقارنة مع معدليهما (7.3,7.1) على التوالي بعد مرور 6 اسابيع منذ بدء التجربة في نموذجي التربة 6،5 .

يعزى سبب زيادة اعداد البكتريا في التربة الملوثة بالنفط الخام سواء المضاف اليها الراشح البكتيري او بدون اضافة الراشح الى زيادة تركيز المادة العضوية خصوصا الدبال Humus بعد اضافة النفط الخام فضلا عن كون التربة بمثابة البيئة الصالحة لنمو الاحياء المجهرية عموم ا والمستوطنة خصوصا لاحتواء التربة على مواد معدنية ومواد عضوية كمصادر كاربون وطاقة [8] .

حدثت زيادة سريعة في اعداد البكتريا في التربة الملوثة بالنفط الخام بعد اضافة الراشح البكتيري سواء للعزلة غير المطفرة او المطفرة بمعدلات تفوق نظيرتهما في التربة الملوثة بالنفط الخام فقط (أي دون اضافة الراشح) وذلك لاحتواء الراشح البكتيري على مواد استحلاب تشجع على التصاق البكتريا مع الهيدروكاربون وتختصر الوقت اللازم الذي تستغرقه البكتريا لانتاج تلك المستحلبات ومن ثم استهلاك النفط الخام [2] .

ان حدوث الهبوط الابتدائي الفجا ئي في اعداد البكتريا في التربة الملوثة بالنفط الخام فقط (دون اضافة الراشح) خلال الاسبوع الاول يعود الى الفعل المعقم لبعض المواد الطيارة التي تدخل في تركيب النفط الخام [9] .

يعود انخفاض اعداد البكتريا في التربة الملوثة بالنفط الخام سواء المضاف اليها الراشح او بدون اضافة الراشح خلال الاسبوعين الخامس والسادس الى نفاذ المواد الهيدروكاربونية البسيطة في الاسابيع الاولى وبقاء المواد المتأيضة الصعبة الاستهلاك والسامة مثل الاحماض الدهنيةوالكحولات الدهنية التي تعمل على غلق مواقع عمل الانزيمات وتثبيط التفاعلات الايضية وأنعدام الاوكسجين وانخفاض الرقم الهيدروجيني نتيجة تزايد اعداد الخلايا بشكل كبير[19,16] .

هذا وقد ما ثلت نتائج الدراسة الحالية نتائج دراسة اجراها [15] كمقارنة بين نموذجي تربة ملوثتين بزيت تشحيم السيارات ، لقح النموذج الاول ببكتريا *N.asteroides* وراشحها البكتيري ولقح النموذج الثاني بعزله مطفرة باشعة الليزر للبكتريا نفسها وراشحها البكتيري ، لاحظ تفوق اعداد العزلة المطفرة بالمقارنه مع اعداد العزلة الام فقد بلغ معدل لوغارتم العدد الحي الكلي لكل غرام تربة للعزلة المطفرة 10.9 وللعزلة الام 10.8 بعد مرور 8 اسابيع منذ بدء التجربة و عزي ذلك ان التطفير باشعة الليزر قد ادى الى زيادة قابلية العزلة على انتاج المستحلبات الحيوية فضلا عن استخدام الراشح البكتيري اللذان كان لهما الاثر الواضح في تعزيز التجزئة البايولوجية لزيت التشحيم في التربة .

اشار [20] الى ان التربة الملوثة بالنفط المراق تحتوي على سائل الطور الغير مائي المنفصل non – aqueous phase liquide (NAPL) والذي يوجد على هيئة قطيرات او رقائق على سطح التربة ، يتقيد الاصلاح البايولوجي عند وجود ملوثات كارهة للماء اقل جاهزية ويحدث التحلل البايولوجي بسرعة اكبر عندما يكون الملوث من النوع الذائب في الطور المائي ولكن اكثر الهيدروكاربونات هي عبارة عن مواد غير ذائبة في

الماء وتبقى منفصلة او محجوزة في NAPL وان الجاهزية الحيوية للمركبات الهيدروكاربونية ممكن ان تزداد للاحياء المجهرية ذات القابلية على انتاج المستحل بات الحيوية حيث تعمل هذه المركبات على زيادة الانتشار المائي لتلك المركبات كما تعمل المستحلبات على تغير الالفة بين خلايا الاحياء المجهرية والهيدروكاربونات من خلال تحفيز وزيادة الصفات الكارهة للماء لسطوح الخلايا .

اكد [21]على ان اضافة المستحلب الحياتي المنتج من قبل العزلة *Pseudomonas aeruginosa* الى تربة ملوثة بخليط من الهيدروكاربونات مثل methynaphthalene ,tetradecane , hexadecane , pristane - 2 يعزز التجزئة لجميع هذه الهيدروكاربونات بعد مرور شهرين من الحضانة .

جاءت هذه النتائج متماشية[21] مع فقد توصل الى ان اضافة المستحلب الحياتيRhamnolipid بتركيز 5غم /لتر المرتج من قبل *P. aeruginosa* الى تربة طمى رملية وتربة طمى غرينية قد ادى الى زيادة نسبة الازالة للهيدروكاربون فقد بلغت اعلى قيمة لها(40-80)% وبنسبة(25-70)% لنوعي التربة على التوالي .

المصادر

1. Kiyohara H.; Nagoa, K. and Yana, K. 1982. Rapid screen for bacteria degradation water – insoluble, solid hydrocarbons on agar plates", Appl Environ Microbiol. 43: 454-457.
2. Scott, M. 2000. "The biodegradation of surfactants in the environment", Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes. 1508: 235-251.
3. Macdonald, C.R; Cooper, D.G.and Zajic, J.E. 1981." Surface-active lipids from *Nocardia erythropolis* grown on hydrocarbons", Appl Environ Micrbiol. 41: 117 – 123.
4. Herman, D.C; Zhang, Y. and Miller, R.M. 1997. "Rhamnolipid (Biosurfactant) effect on cell agreement and biodegradation of residual hexadecane under saturated flow conditions", Appl Environ Microbiol. 63: 3622 – 3627.
5. Rosen, MJ. 2004. "Surfactants and interfacial phenomena", 3rd ed., Hoboken, New Jersey, John Wiley and Sons. p54-60.
6. Leahy, J.C. and Colwell, R.P. 1990. "Microbial degradation of hydrocarbons in the environment", Microbial Rev. 54: 305 – 315.
7. Edelvio de, B.G.; Adriana, U.S.; Rita de, C.M.; Maria de, F. and Nei, P.J. 2009. "Biodegradation of stored jet fuel by a Nocardia sp. Isolated from contaminated soil", Braz arch Boil technol. 52 (5): 1516 – 1520.
8. Paul, E.A. 2007. "Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry", 3rd ed., Academic press, USA. 250-261p.
9. Jobson, A.F. and Westlake, D.W. 2005. "Microbial utilization of crude oil," Appl Microbiol. 32: 1208-1215.
10. Leitz, G.; Weber, G.; Seeger, S.andGreulich, K.O. 1994. "The Laser microbeam trap as anoptical tool for living cells," Physical Chem Phys Med Nmr. 26(1):69-88.
11. Atlas, R.M.; Parks, L.C. and Brown, A.E. 1995." Laboratory Manual of Experimental Microbiology", Mosby – Year Book, Inc. p876-878.
12. Forbes, B.A.; Saham, D.F. and Weissfeld, A.S. 2002." Diagnostic microbiology", 10th ed., Mosby, Inc. USA. p443- 444.
13. Sastoque-Cala, L.; Cotes – Prado, A.M.; Rodriquez-Vazquz, R. and Pedroza – Rodriquez, A.M. 2010. "Effect of nutrients and fermentation conditions on the production of biosurfactants using rhizobacteria isolated from fique plants", Vniresitas Scientiarum. 15(3): 251-264.

14. Vasileva-Tonkova, E. and Victoria, G. 2004. "Potential for biodegradation of hydrocarbons by microorganisms isolated from Antarctic soils", Znaturforsch. 59: 140 – 145.

15. Jeevan, A. and kripke, M. 2008. "Effect of N_2 Laser irradiation on biosurfactants production by *Nocardia asteroids* in soil", Int J. Radiate Boil. 59 (3): 323 – 330.

16. Mulligan, C.N.; Yang, R.N. and Gibbs, B.F. 2001." Surfactant – enhanced remediation of contaminated soil", Eng Geol. 60: 371 – 380.

17. Ron, E.Z. and Rosenberg, E. 2001." Natural roles of biosurfactants", Environ Microbiol. 3:229 – 236.

18. Ron, E.S. and Rosenberg, E. 2002." Biosurfactants and oil bioremediation", current Opinion Biotechnol. 13: 249 – 252.

19. Nweke, C.O. and Okpokwasili, G.C. 2003. "Drilling fluid base oil biodegradation potential of soil Staphylococcus species", Afr J Biotechnol. 2(9):293-295.

20. Kosaric, N. 2001. "Biosurfactants and their application for bioremediation", Food Technol Biotechnol. 39 (4): 295-304.

21. Torrents, A.; Mata- Sandoval, J. and karns, C. 2001."Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UG2", Microbiology Research. 133: 492-498.

22. Soberon – Chavez, G.; Lepine, F. and Deziel, E. 2005. "Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*", Appl Microbiol Biotechnol. 68(2):718-725.