

دراسة قدرة جراثيم المتقلبة الشائعة *Proteus vulgaris* على تفكيك سلاسل الألكانات في المركبات النفطية الملوثة للبيئة البحرية

الدكتورة اسمهان زينب*

الدكتورة أحمد قره علي**

محمد عيزوق***

(تاريخ الإيداع 20 / 9 / 2012. قُبِلَ للنشر في 27 / 2 / 2013)

□ ملخص □

تم عزل جراثيم عائدة لنوع المتقلبة الشائعة *Proteus vulgaris* من المياه الشاطئية لمدينة اللاذقية (المرفأ) الملوثة بالمواد النفطية الناتجة عن نشاط النقل البحري، واختبرت مقدرتها على تفكيك الألكانات النفطية الملوثة لهذه البيئة مخبرياً باستخدام تراكيز مختلفة من الملوثات النفطية. واستخدمت تقانة الكروماتوغرافيا الغازية (GC) لقياس تراكيز الألكانات النفطية.

بينت النتائج أن الجراثيم المعزولة قادرة على تفكيك السلاسل الألكانية المختلفة، حيث كانت نسبة تفكيك كل من C_{12} ، C_{16} ، C_{18} هي 96.7 %، 78.59 %، 97.27 % على التوالي، بينما بلغت نسبة التفكك الاجمالي للسلاسل الألكانية 77.14 % عند إضافة 10 ملغ/مل من الملوثات النفطية، بينما لم تتجاوز نسبة التفكك 17.26 % عند إضافة 75 ملغ/مل منها.

وبالتالي فإن القدرة العالية لجراثيم *Proteus vulgaris* على تفكيك السلاسل الألكانية الطويلة يؤهلها لتكون فاعلة في عملية المعالجة الحيوية Bioremediation للبيئة البحرية الملوثة.

الكلمات المفتاحية: الألكانات النفطية- جراثيم *P*- التفكك الحيوي- المياه البحرية.

*أستاذ مساعد - قسم الحياة النباتية - كلية العلوم - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية
**مدرس - قسم الكيمياء البحرية - المعهد العالي للبحوث البحرية - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية
***طالب دراسات عليا (ماجستير) - قسم البيولوجيا البحرية - المعهد العالي للبحوث البحرية - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية

Study Of Ability Of *Proteus vulgaris* To Degrade Petroleum Alkane Chains Of Compounds Polluting Marine Environment

Dr. Asmahan Zinab*
Dr. Ahmad Qara Ali**
Muhammad Aizouq***

(Received 20 / 9 / 2012. Accepted 27 / 2 / 2013)

□ ABSTRACT □

Proteus vulgaris was isolated from costal sea water of Lattakia city port, as it is contaminated with petroleum compositions coming from marine transportations activities. The ability of this bacteria to degrade the petroleum alkanes was studied by using different concentrations of petroleum as sole source of carbon and energy. The gas chromatography (GC) technique was used to measure the concentration of alkanes. Results showed that the isolated bacteria were able to degrade different alkanes chains. The ratio of biodegradation of C₁₂, C₁₆, C₁₈ were 96.75%, 78.59%, 97.27% respectively, while the rate of biodegradation of the entire amount of alkanes was 77.14% in 10 mg/ml polluting concentration. The percentage of biodegradation at concentration 75 mg/ml of petroleum was 17.26%.

Therefore, the high ability of *Proteus vulgaris* to degrade the long chains alkanes recommended it to be effective in the bioremediation process of the contaminated marine environments.

Key words: Petroleum alkanes, *Proteus vulgaris*, Biodegradation, marine environment.

* Assistant professor in department of Botany, Faculty of Science, Tishreen University, Lattakia, Syria.

** assistant professor department of Marine Chemistry, High Institute of Marine Researches, Tishreen University, Lattakia, Syria.

*** postgraduate Student, department of Marine Biology, High Institute of Marine Researches, Tishreen University, Lattakia, Syria.

المقدمة:

يقدر الإنتاج العالمي للنفط الخام بحوالي ثلاثة مليارات طن في العام، ينقل نصفها عبر البحار كل عام إما عبر أنابيب تمتد ضمن البحر أو بواسطة ناقلات ضخمة. تؤدي هذه النشاطات وغيرها مثل عمليات تنظيف هذه الناقلات و رمي الترسبات من خزاناتها في البحر مباشرة بالإضافة إلى التسرب الحاصل أثناء التحميل والتفريغ وحركة النقل والملاحة البحرية إلى حدوث تلوث نفطي في البيئة البحرية (Noriyuki *et al.*, 2002; Nievas *et al.*, 2008). والأكثر خطورة من ذلك الحوادث العرضية الحاصلة للناقلات، إذ أدت حادثة Exxon Valdez عام 1989 في ألاسكا، إلى إفراغ ما يقارب 40 مليون ليتر من النفط الخام والتي لوثت حوالي 2000 كم من شواطئ ألاسكا الصخرية (Harayama *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1997). تعتبر عملية التنقيب عن النفط في المناطق الشاطئية بحثاً عن مصادر جديدة للنفط من المسببات الهامة للتلوث النفطي في أيامنا الحاضرة، والمصدر الرئيسي للتلوث المستمر للمياه البحرية بالنفط هو الجريان السطحي لهذه الملوثات على اليابسة والناتج عن المعامل ونشاطات النقل البري وغيرها ووصولها لاحقاً إلى البيئة البحرية. كما يطلق الاحتراق غير الكامل للنفط أو أحد مشتقاته كميات كبيرة من الفحوم الهيدروجينية في الغلاف الجوي ومن ثم إلى البيئة البحرية عن طريق الأمطار. مما سبق نرى صعوبة تقدير كمية النفط المنتقلة إلى البيئة البحرية والتي تتراوح بين 1.7 و 8.8 مليون طن سنوياً (Clark *et al.*, 1997).

يمكن للنفط المتسرب إلى البيئة المائية عموماً أن يضر بالأحياء التي تعيش ضمن أو على سطح الماء وكذلك الأحياء المنتشرة ضمن العمود المائي، فيدخل بشكل أو بآخر ضمن أحد فروع الشبكة الغذائية بما فيها مصادر تغذية البشر. تختلف التأثيرات البيولوجية للتلوث النفطي بشكل كبير وتتحكم بها عدة عوامل منها الجغرافيا البحرية والمناخ ونوعية النفط المتسرب وكميته ومدة بقائه في البيئة (Giere, 2003; Holley, 2001).

تعد المجمعات الجرثومية في المناطق الشاطئية هي المسؤولة عن حلقة التفكك الحيوي ذات الأهمية الكبيرة في الحفاظ على سلامة النظام البيئي البحري (Castenholz *et al.*, 1994; Cohen, 2002) إذ إن هذه الحلقة هي العملية الأساسية في التنقية الذاتية لمياه البحر من الملوثات النفطية، ذات الأضرار البيئية المختلفة والتأثيرات السلبية في البيئة البحرية بشكل عام.

يشكل استقلاب الألكانات بواسطة الأحياء الدقيقة تحدياً كبيراً وذلك بسبب انحلاليتها المنخفضة في الماء من جهة وميلها للتراكم في الغشاء الخلوي من جهة أخرى والطاقة العالية نسبياً اللازمة لتنشيط الجزيء (Rojo, 2009). وعلى الرغم من ذلك هناك العديد من الأحياء الدقيقة قادرة على استخدام الألكانات كمصدر وحيد للكربون والطاقة ذلك أنها تمتلك الأنزيمات الأساسية اللازمة لاستقلاب الألكانات، وقدرتها على إنتاج المواد الحيوية الفعالة سطحياً Biosurfactant (Harayama *et al.*, 1995).

أهمية البحث وأهدافه:

يعدّ البحر الأبيض المتوسط والحوض الشرقي منه على وجه التخصيص فقيراً نسبياً بالدراسات التي تهتم بالتفكك الحيوي لهذه المركبات وتحولاتها عبر الزمن ضمن البيئة، والدراسات التي أجريت على الشاطئ السوري لم تتطرق بشكل مباشر إلى دراسة التفكك الجرثومي للألكانات على وجه الخصوص. حيث تختلف نتائج التفكك الحيوي ومعدلاته اعتماداً على الجغرافيا البحرية، بسبب اختلاف تركيب التجمعات الجرثومية من منطقة لأخرى مع أخذ التركيب

الفيزيائي والكيميائي والمنشأ للنفط بعين الحسبان (Harayama *et al.*, 1995) ومن هنا تأتي أهمية هذا البحث. ويهدف البحث إلى:

- الحصول على عزلات جرثومية بحرية نقية عائدة للمتقلبة الشائعة قادرة على تفكيك الألكانات النفطية .
- دراسة قدرة هذه العزلات الجرثومية على تفكيك الألكانات النفطية مخبرياً بتركيز متعددة.

طرائق البحث ومواده:

عزل جراثيم *Proteus vulgaris*:

تمّ عزل الجراثيم من مياه مرفأ مدينة اللاذقية انطلاقاً من احتمال احتواء هذه المياه على تركيز عالٍ نسبياً من الألكانات النفطية بحكم حركة النقل البحري عالية النشاط، حيث جمعت عينات بحجم 100 مل من هذه المياه ورشحت عبر وحدة ترشيح معقمة باستخدام فلاتر جرثومية قطر 47 ملم وحجم ثقب 0.45 ميلي بور، وُضع الفلتر كاملاً في أرلينة سعة 250 مل تحوي 50 مل من الوسط الصناعي المغذي A ($(0.2) \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)، بنزوات الصوديوم $\text{C}_6\text{H}_5\text{COONa}$ (2.5)، KH_2PO_4 (4.4)، $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (18.1)، NH_4Cl (1.0). الوزن بالـ g/L تم الحل باستخدام الماء المقطر، وكان مصدر الكربون فيها مزيجاً من المازوت والغازولين بنسبة 1:1، ثم حُضنت في حاضنة رطبة مزودة بهزاز آلي لمدة ثلاثة أيام عند درجة حرارة 37 م° ومعدل اهتزاز 150 هزة/دقيقة⁻¹ (Setti *et al.*, 1992). نُقل بعدها 10-20-50 ميكرو لتر من المعلق الجرثومي على أطباق تحوي وسط زرعي صلب (الوسط A مضافاً إليه الآغار لتصليب قوامه، ثم حضنت في الحاضنة الجافة عند الدرجة 35 م° لمدة 24 و 48 ساعة. وتُقيت العزلات الجرثومية النامية بتكرار زرعها على أطباق بتري تحتوي على وسط الآغار المغذي عدة مرات لضمان الحصول على عزلات نقية، ثم حفظت على وسط الآغار المغذي باستخدام طريقة أنابيب الآغار المائلة .

أمكن تصنيف العزلات الجرثومية بعد إجراء الاختبارات الحيوية الكيميائية اللازمة (أوكسيداز وكاتالاز والإندول وأحمر الميتيل والسترات وفوجس بروسكاور والحركة واليوريا وتخمر السكر وإطلاق H_2S وتحلل الجيلاتين والنشاء وإرجاع النترات ونزع الكربوكسيل من الحموض الأمينية) ثم بالاعتماد على دليل بيرجي (Garrity *et al.*, 2004; Garrity *et al.*, 2005). أنجز هذا البحث في مختبري البحث العلمي لقسم علم الحياة النباتية في كلية العلوم ومخبر البيولوجيا البحرية في المعهد العالي للبحوث البحرية بجامعة تشرين خلال عام 2011.

دراسة التفكك الحيوي:

دُرِس التفكك الحيوي للألكانات النفطية بتجديد زرع الجراثيم النقية العائدة للمتقلبة الشائعة على وسط الآغار المغذي حُضّر منها معلق جرثومي يوافق 4 Turbidity Macfarland Standerd أي ما يعادل 12×10^8 ml/CFU، وتم ذلك باستخدام محلول موقٍ مكون من ماء مقطر وملح كلوريد الصوديوم NaCl بنسبة 9‰، بعد ذلك جُهزت أرلينات سعة 250 مل تحتوي 50 مل من الوسط الصناعي المستخدم سابقاً في عزل الجراثيم البحرية العائدة للمتقلبة الشائعة، وأضيف مزيج المازوت والغازولين كمصدر وحيد للكربون والطاقة باستخدام التراكيز التالية لهذا المزيج : (10، 25، 75) مل/مل، ثم حُقن 2 مل من المعلق الجرثومي في الأرلينة وحُضنت في الحاضنة الرطبة المزودة بهزاز آلي أفقي بمعدل 150 هزة/دقيقة وعند درجة حرارة 37 م° لمدة 14 يوم (Li *et al.*, 2008).

الدراسة الكيميائية التحليلية:

الاستخلاص:

استخلصت الملوثات العضوية باستخدام طريقة التحليل المعتمدة من قبل (UNEP/MAP, 1996) حيث أجري الاستخلاص على العينات قبل الشروع بالحضن وبعد إتمام مدة الحضن باستخدام 20 مل من مزيج ن-هكسان + ثنائي كلور ميثان بنسبة (50:50) واستُخلصت بطريقة سائل سائل. بعد انتهاء عملية الاستخلاص جففت الخلاصة بواسطة كبريتات الصوديوم اللامائية، ثم وضعت في أنابيب اختبار 10 مل وبخرت تحت تيار لطيف من الآزوت النقي حتى الحجم 1 مل. وتصبح الخلاصة بذلك جاهزة للتحليل اللاحق باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا الغازية GC. (Bernard *et al.*, 1995).

التقانة المستخدمة في التحليل:

تم التحليل الكيفي والكمي للخلاصات النهائية للعينات المدروسة باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا الغازية Gas chromatography باستخدام جهاز GC من نوع (Shimadzu) موديل 2010 المزود بمكشاف تشتت اللهب FID. ويعمل بنظام درجة حرارة ثابتة، ونظام برمجة درجة الحرارة. تم استخدام عمود شعري من الزيوت السيليكونية من نوع (DB-5) الطور الساكن 5% فينيل ميثيل السيليكون، أبعاده 0.3 مم × 30 م وتبلغ سماكة الطور السائل 0.25 مايكرومتر. استخدم غاز الآزوت عالي النقاوة (99.999%) غازاً حاملاً وبمعدل سرعة تدفق قدرها 2 مل/دقيقة، وأجريت عملية الفصل وفق برنامج درجة الحرارة الآتي:

$$80 \text{ م} \xleftarrow{4 \text{ م}^{\circ}/\text{د}} 280 \text{ م} (15 \text{ دقيقة})$$

حقنت العينات بتقانة split/split less و بلغت درجة حرارة الحاقن 250 م° وحجم الحقن مقداره 1 مايكرو لتر من مستخلص كل عينة باستخدام حاقن آلي ميكروي.

نذ التحليل الكيفي Qualification بالطريقة العيارية وذلك بمقارنة أزمنة احتفاظ مركبات العينة مع أزمنة احتفاظ مركبات عيارية محددة الهوية والتركيز لمزيج من المركبات الألكانية مصدرها الوكالة الدولية للطاقة الذرية مخبر البيئة البحرية موناكو.

نذ التحديد الكمي Quantification بتحديد التراكيز الحقيقية للمركبات وفقاً ل (UNEP/MAP, 1996) ويحسب التركيز من العلاقة:

$$C_{1(\text{ng}/\mu\text{l})} = \frac{A \cdot V_{\text{ext}(\text{ml})} \cdot 1000}{A_{\text{st}} \cdot V_{\text{inj}(\mu\text{l})} \cdot V_{(\text{L})}}$$

بحيث:

C_1 : تركيز المركب العياري ($\text{ng}/\mu\text{l}$)
 A_{st} : مساحة قمة المركب العياري
 V_{inj} : حجم العينة المحقونة (μl)
 A : مساحة قمة المركب في العينة
 V_{ext} : حجم الخلاصة (ml).
 V : حجم العينة المائية المستخلصة (L)

النتائج والمناقشة:**نتائج دراسة الاختبارات الحيوية الكيميائية لجراثيم المتقلبة الشائعة *Proteus vulgaris*:**

تظهر جراثيم المتقلبة الشائعة مجهرياً على شكل عصيات مستقيمة أبعادها 0.5 مايكرومتر عرضاً وما بين 0.5 - 1.5 مايكرومتر طولاً، من الممكن أن تبدي أشكالاً غير نظامية عندما يتجاوز طولها 1.5 مايكرومتر وهي هوائية لاهوائية اختيارية وسالبة لصبغة غرام، تكون مفردة غالباً ونادراً ما تكون على شكل ثنائيات أو سلاسل وغير مشكلة للمحفظة وغير مفرزة للصبغ ويتراوح مجال درجة حرارة النمو بين 10 - 43م°.

الجدول (1) نتائج بعض الاختبارات الحيوية الكيميائية لجراثيم المتقلبة الشائعة *Proteus vulgaris*

الاختبار	<i>Proteus vulgaris</i>
Sucrose fermentation تخمير السكروز	+
Dextrose fermentation تخمير الديكستروز	+
Lactose fermentation تخمير اللاكتوز	-
Glucose fermentation تخمير الغلوكوز	+
Indole production إنتاج الإندول	+
Reduced nitrates to nitrites إرجاع النترات	+
Liquefies gelatin إسالة الجيلاتين	+
Starch hydrolysis إماهة النشاء	-
H ₂ S production	+
Urease اليورياز	+
Fermentation of mannitol تخمير المانيتول	-
Production of catalase الكاتالاز	+
Production of oxidase الأوكسيداز	-
Arginine	-
Lysin	-
Methyl red	+

تتحرك جراثيم المتقلبات الشائعة *Proteus vulgaris* عن طريق سيات محيطية ويمكن ملاحظة الحركة عند درجة الحرارة 20 م° وتقل هذه الحركة غالباً في الدرجة 37 م°.

تستطيع *P. vulgaris* أن تنمو في وسط حاوٍ على البنسلين مع وجود تغيرات مورفولوجية ملحوظة تختلف باختلاف درجة حرارة الحضانة (Fleming, 1982).

تكون مستعمراتها على وسط الآغار المغذي متوسطة إلى كبيرة الحجم وذات لون كريمي لامع بينما يبدو الانتشار المتموج الناتج عن حركة الجرثوم واضحاً على معظم أوساط الآغار حديثة التحضير.

تظهر جراثيم المتقلبة الشائعة *P. vulgaris* بشكل طبيعي في أمعاء الحيوانات ذوات الدم الحار وتظهر بشكل عام في المياه البحرية والعذبة والتربة واللحم النيئ، وتعد من أكثر الأنواع التي تسبب فساد الأغذية، حيث تؤدي إلى تغيرات نسيجية في اللحوم البيضاء والحمراء، وتسبب العديد من الإلتهابات في كل من المجاري البولية والتنفسية والجروح (Myszka & Czaczyk., 2011).

نتائج تفكك الألكانات النفطية بواسطة جراثيم المتقلبات الشائعة *P. vulgaris*:
يوضح الجدول (2) نتائج التفكك الحيوي في التركيز الأول (10 ملغ/مل):

الجدول (2) تفكك السلاسل الألكانية بواسطة جراثيم *Proteus vulgaris* في عينة الملوثات النفطية ذات التركيز 10 ملغ/مل

عدد ذرات الكربون	التركيز الأصلي المضاف ppm	التركيز بعد التفكك ppm	النسبة المئوية لتفكك السلاسل الألكانية
C10	2.91032	0.16688	94.27
C11	33.28224	7.32056	78.01
C12	60.4892	1.96664	96.75
C13	22.61328	7.1708	68.29
C14	14.23496	4.73928	66.71
C15	29.03936	7.45992	74.31
C16	23.22024	4.97224	78.59
C17	24.65712	-	-
Pristan	32.15872	-	-
C18	38.9364	16.04792	58.78
Phytan	39.39304	16.54264	58.01
C19	21.2136	10.365	51.14
C20	5.39424	2.9842	44.68
C21	12.41232	-	-
C22	21.17728	-	-
C23	12.44792	8.5031	31.69
C24	10.62224	-	-
C25	9.34256	-	-
C26	10.29112	-	-
C27	6.42104	-	-
C28	6.85472	-	-
Total	437.1119	88.23918	79.81

نلاحظ من خلال النتائج أن نسبة تفكك السلاسل الألكانية بواسطة جراثيم المتقلبات الشائعة *P. vulgaris* كانت مرتفعة بصورة واضحة للمركبات الخفيفة (الجدول 1) حيث بلغت أكثر من 90% في بعض المركبات، في حين أن نسبة التفكك للمركبات الثقيلة تراوحت بين 51.14% و 31.69% ويعزى السبب إلى أن المركبات الأثقل ذات مقاومة للتفكك واستقرار أكثر من المركبات الخفيفة ذات السلاسل القصيرة (Watkinson, 1978). يفكك هذا الجرثوم السلاسل الكربونية المستقيمة والمتفرعة الحاوية على نفس عدد ذرات الكربون بنفس الكفاءة تقريباً في التراكيز المنخفضة للملوثات حيث نلاحظ التقارب الكبير بين نسبة التفكك المركب C₁₈ و الـ Phytan.

كانت نسبة التفكك لمجمل السلاسل الألكانية 79.81%، وهذا يتفق مع دراسة أخرى حيث بلغت نسبة التفكك فيها 71.5% في التركيز 15 ملغ/مل (Ceyhan, 2012).

أما نتائج تفكك التركيز الثاني للألكانات المضافة فهي موضحة في الجدول (3):

الجدول (3) تفكك السلاسل الألكانية بوساطة جراثيم *Proteus vulgaris* في عينة الملوثات النفطية ذات التركيز 25 ملغ/مل

عدد ذرات الكربون	التركيز الأصلي المضاف Ppm	التركيز بعد التفكك ppm	النسبة المئوية لتفكك السلاسل الألكانية
C10	3.6556	0.69088	81.1
C11	50.2867	8.9752	82.15
C12	90.3347	-	-
C13	33.2527	3.77936	88.63
C14	21.3776	5.7876	72.93
C15	49.8724	10.70192	78.54
C16	34.6292	6.21816	82.04
C17	36.9574	-	-
Pristan	47.2163	20.10048	57.43
C18	71.497	-	-
Phytan	61.5653	21.34952	65.32
C19	35.5657	16.50784	53.29
C20	8.268	3.8547	53.38
C21	30.268	15.55968	48.59
C22	34.8129	29.172	16.2
C23	19.2815	-	-
C24	21.8037	-	-
C25	13.9907	-	-
C26	16.2338	-	-
C27	9.853	-	-
C28	12.941	-	-
Total	703.6632	142.6973	79.72

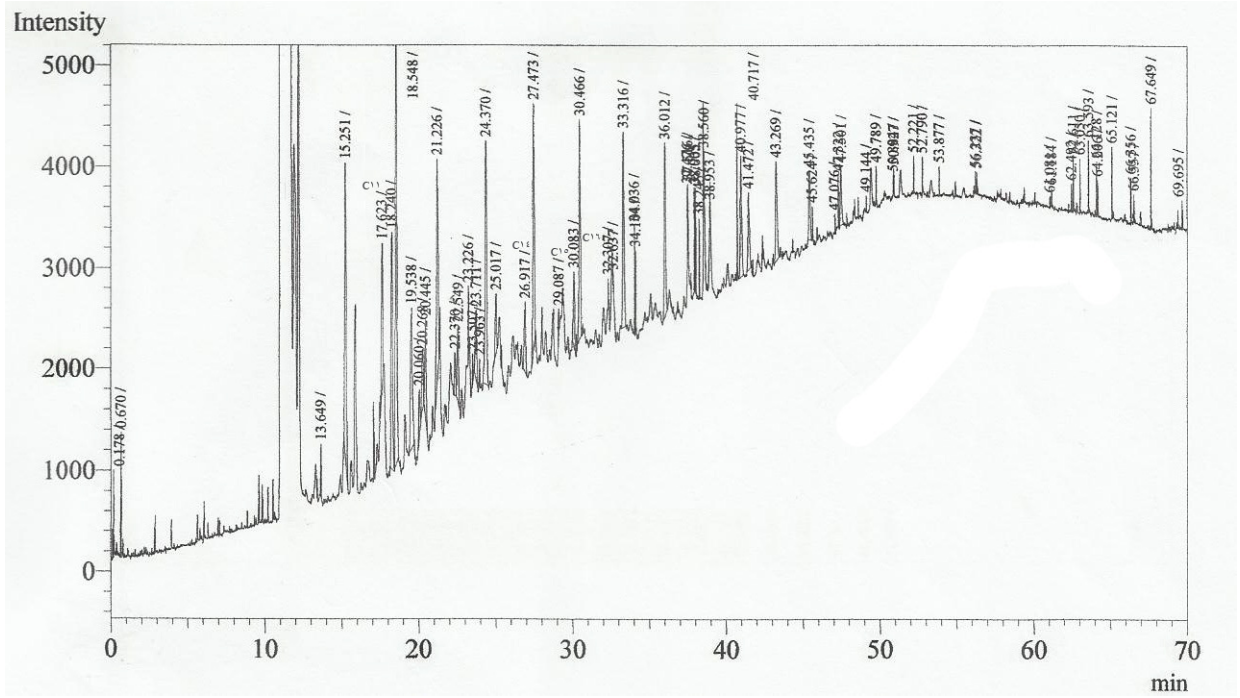
تراوحت نسب التفكك الحيوي في هذا التركيز بين 88.63% بالنسبة للمركبات ذات الـ C₁₃ وبين 16.2% بالنسبة للمركبات ذات الـ C₂₂ وبلغت النسبة الإجمالية لتفكك السلاسل 79.72%. من المعروف نظرياً أن مقاومة السلاسل الألكانية لتفكك الحيوي تزداد بازدياد طول هذه السلاسل (Watkinson, 1978) ونجد من خلال النتائج أن نسب التفكك تتناقص تدريجياً بشكل عام مع ازدياد طول السلسلة الكربونية جدول(3). كان هناك صعوبة في عملية الكشف عن بعض المركبات الألكانية الثقيلة بسبب حصول نزيف لحشوة العمود أثناء عملية الكشف عن المركبات ضمن درجات الحرارة العالية مما أدى إلى تداخل المركبات الثقيلة المدروسة مثل C₂₄...C₂₇ مع مركبات حشوة العمود النازفة مما أسفر عن انحراف واضح لخط الأساس شكل(1). علماً أنّ ظهور هذه المركبات الثقيلة حصل ضمن مجال الانحراف (Litell, 1970).

و كانت نتائج التفكك في التركيز الثالث للألكانات المضافة موضحة بالجدول(4):

الجدول (4) تفكك السلاسل الألكانية بوساطة جراثيم *Proteus vulgaris* في عينة الملوثات النفطية ذات التركيز 75 ملغ/مل

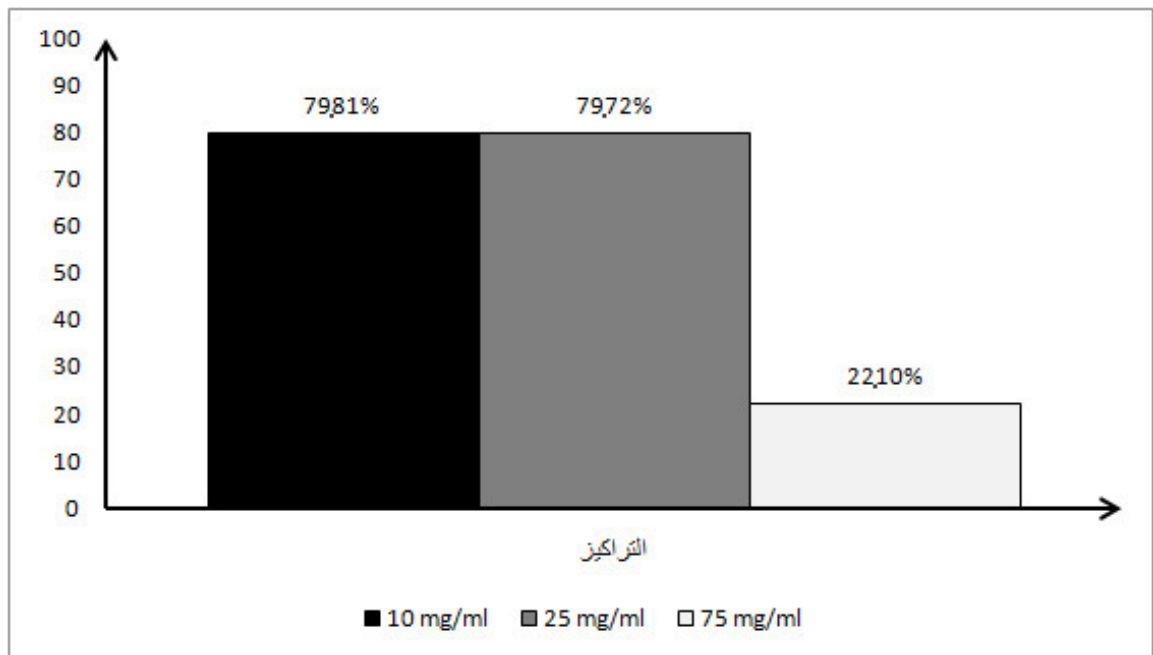
عدد ذرات الكربون	التركيز الأصلي المضاف Ppm	التركيز بعد التفكك ppm	النسبة المئوية لتفكك السلاسل الألكانية
C10	14.0504	-	-
C11	139.1624	129.8702	6.68
C12	302.2318	280.2991	7.26
C13	109.1064	90.27248	17.26
C14	115.7672	90.06536	22.2
C15	150.6376	132.8744	11.8
C16	79.8976	70.17104	12.17
C17	72.094	59.8746	16.95
Pristan	144.4936	139.2633	3.62
C18	181.038	155.423	14.15
Phytan	181.1404	176.3518	2.64
C19	105.6984	89.19904	15.61
C20	18.3378	16.0114	12.69
C21	147.6384	100.5314	31.9
C22	110.0164	93.36784	15.13
C23	57.9504	48.59104	16.15
C24	57.384	-	-
C25	42.4226	-	-
C26	46.5756	-	-
C27	30.42104	-	-
C28	40.34616	-	-
Total	2146.41	1627.166	22.095

نلاحظ من خلال النتائج في الجدول (3) أن نسبة التفكك الحيوي منخفضة مقارنةً مع التراكيز الأقل، يمكن أن يعزى ذلك إلى حساسية *P. vulgaris* تجاه التراكيز العالية من الملوثات النفطية نتيجة الدور السمي الذي تلعبه هذه المواد في التراكيز العالية على جراثيم المتقلبة الشائعة (Kayode-Isola *et al.*, 2008). وعلى عكس ما وجدناه في التركيز المنخفض نجد هنا أن نسبة تفكك C₁₇ أكبر من نسبة تفكك Pristan مع أنه يحوي 17 ذرة كربون أيضاً، يعود ذلك إلى أن الـ Pristan من الألكانات المتفرعة عالية الاستقرار والمقاومة نسبياً للتفكك الحيوي، ويمكن ملاحظة النتيجة نفسها بالنسبة لـ C₁₈ و الـ Phytan (Watkinson., 1978).



شكل (1) انحراف خط الأساس في كروماتوغرام التركيز 10 ملغ/مل ضمن درجات الحرارة المرتفعة

يوضح الشكل (2) النسب المئوية لتفكك الألكانات في الملوثات النفطية في التراكيز الثلاثة المستخدمة بواسطة جراثيم *P. vulgaris*. ويلاحظ أنها قادرة على تفكيك السلاسل الألكانية بكفاءة جيدة في التراكيز المنخفضة نسبياً للملوثات وأن نسبة التفكك الحيوي تنقص بشكل عام بازدياد تركيز الألكانات النفطية في وسط الحضانة.



شكل (2) نسب التفكك الحيوي في التراكيز الثلاثة للملوثات النفطية

الاستنتاجات والتوصيات:

إن وجود جراثيم *P. vulgaris* في البيئة البحرية يساهم في عملية التنقية الذاتية للمياه البحرية من الملوثات النفطية ضمن التراكيز المنخفضة والمتوسطة، كما أن قدرتها الكبيرة نسبياً على تفكيك السلاسل الألكانية الطويلة الموجودة ضمن تراكيز مرتفعة نسبياً يؤهلها لتكون فاعلة في عملية المعالجة الحيوية Bioremediation للبيئة البحرية الملوثة. ويوصي هذا البحث بالنقط الآتية:

- التأكيد على أهمية التقانات الحيوية في معالجة التلوث النفطي بشكل عام.
- العمل على عزل أنواع جرثومية أخرى قادرة على عملية التفكيك ودراسة جدوى استخدامها في عملية المعالجة الحيوية ضمن البيئة.
- محاولة تطوير القدرة التفكيكية لهذه الأنواع باستخدام التقانات الوراثية.

المراجع:

1. BERNARD, D. JEREMIE, J.J. PASCALINE, H. First Assessment of Hydrocarbon Pollution In a Mangrove Estuary. Marine Pollution Bulletin, vol. 30, No 2, 146-150, 1995.
2. CASTENHOLZ, R. W., Microbial mat research: the recent past and new perspectives, In: Stal L. J., Caumette P. (Eds), Microbial mat, structure, development and environmental signification. NATO ASI series, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 3-18, 1994.
3. CEYHAN, N. Biodegradation of pyrene by a newly isolated *Proteus vulgaris*. Scientific Research and Essays Vol. 7(1), 66-77, 9 January, 2012.
4. CLARK, R. B. FRID, Ch. ATTRILL, M. Marine pollution, fourth edition. Clarendon, Oxford university. 38-60, 1997.
5. COHEN, Y. Bioremediation of oil by marine microbial mats. Int. Microbial. 5, 198-93, 2002.
6. FLEMING, A. VOUREKA, A. KRAMER, I. R. H. HUGHES, W. H. The Morphology and Motility of *Proteus vulgaris* and Other Organisms Cultured in the Presence of Penicillin. The Wright-Fleming Institute Of Microbiology, London, 1982.
7. GARRITY, G. M.; BEH, J. A. and LILBURN, T. G. Taxonomic Outline Of Prokaryotes, Bergey's manual of systemic bacteriology. 2th edition, springer New York 2004.
8. GARRITY, G. M.; BRENNER, D. J.; KRIEGER, R., STIEY, J. T. Bergey's manual of systemic bacteriology. Springer USA, 2th edition, Vol. 2, pp. 1-1153, 2005.
9. GIÈRE, O.: The Impact Of Oil On Coastal Life. Proceedings Of The 7th International Effects Of Oil On Wildlife Conference, Hamburg, 2003.
10. HARAYAMA, Sh. VENKATESWARAN, K. TOKI, H. KOMUKAI, Sh. GOTO, K. TANAKA, H. ISHIHARA, M. Degradation Of Crude Oil By Marine Bacteria. J Mar Biotechnol, 3:239-243, 1995.
11. HOLLEY, T. South East Regional Marine Plan, Chapter 4- Impacts Of Petroleum, National Ocean Office, 5, 2001.
12. KAYODE-ISOLA, T.M. ENIOLA, K.I.T. OLAYEMI, A.B. IGUNNUGBEMI, O.O. Response of Resident Bacteria of a Crude Oil-Polluted River to Diesel Oil. American-Eurasian Journal of Agronomy 1 (1): 06-09, 2008.

13. Li, Y.Q.; Liu, H. F.; Tian, Z.L.; Zhu, H.; Wu, Y.H. and Tang, H.Q. Diesel pollution biodegradation: Synergetic effect of Mycobacterium and filamentous fungi. Biomedical and environmental sciences, China, Vol. 21,181-187 , 2008.
14. LITELL, A. B. Gas chromatography Eds. Academic press 255-256, 1970
15. MYSZKA, K. CZACZYK, K. Effect Of Starvation Stress On Morphological Change And Prpduction Of Adhesiv Exopolysaccharide (EPS) By *Proteus vulgaris*. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 10(3), 303-312, 2011.
16. NIEVAS, M.L. COMMENDATORE M, G. ESTEVES, J.L. BUCALA, V. Biodegradation Pattern Of Hydrocarbons From A Fuel Oil-type Complex Residue By An Emulsifier-producing Microbial Consortium. Journal of Hazardous Materials 154, 96-140, 2008.
17. NORIYUKI, I. MICHIO S. MAKOTO, U. CHIAKI, I. HIROSHI, A. MUTSUYASU, N. SHIGEAKI, H.: Extracellular Poly Saccharides Of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 Stimulate, The Degradation Of Aromatic Components In Crude Oil By Indigenous Marine Bacteria Applied and Environmental Microbiology, Vol. 68, No. 5, 2337-2343, 2002.
18. OLAJIDE, P. O. OGBEIFUN, L. B. Hydrocarbon Biodegrading Potentials of a *Proteus vulgaris* Strain Isolated from Fish Samples. American Journal of Applied Sciences Volume 7, Issue 7, 922-928, 2010.
19. ROJO F.: Degradation Of Alkanes By Bacteria, Environmental Microbiology, 11(10) 2477-2490,2009.
20. Setti L., Lanzarini G., Pifferi P.G., Spagna G.: Further Research Into The Aerobic Degradation Of n-Alkanes In A Heavy Oil By A Pure Culture Of A *Pseudomonas* SP.. Chemosphere, Vol.26, No.6, 1151 – 1157, 1992.
21. UNEP/MPA, “for the analysis of selected chlorinated hydrocarbons in The marine Environment”, reference method for marine pollution studies 71, 1996 .
22. WATKINSON, R. J. Development In Biodegradation Oh Hydrocarbons 1. Applied Science Publishers LTD, ISBN: 0853347514, 3-15,1978.