Production of alcohols from Olive Mill Wastewater by cultivation of some marine bacterial strains

Mais Sobhi Zwan*

(Received 12 / 12 / 2022. Accepted 25 / 1 /2023)

□ ABSTRACT □

This research focuses on the use of marine bacteria in treatment of a serious environmental problem caused by liquid waste from olive mills called (Olive Mill Wastewater : OMW)
Marine bacterial strains (*Staphylococcus xylosus*(1), *Staphylococcus xylosus*(2), *Bacillus cereus*) were isolated from marine water and sediment to produce alcohols (methanol, ethanol, isopropanol, butanol and hexanol) from OMW.
The results showed that the marine bacterial strain *Staphylococcus xylosus* (1) gave the highest alcohol productivity (methanol: 1427.22µg/l, ethanol: 720.45 µg/l, butanol: 187.65 µg/l, isopropanol: 11.28µg/l, hexanol: 137.31 µg/l) in a fermentation medium containing 25% OMW.
In general, the results showed higher concentrations of alcohols in the fermentation medium using the strain *Bacillus cereus* compared to the strain *Staphylococcus xylosus* (2), while the concentrations of both hexanol and butanol were similar for the two bacteria with a slight increase in production for *Staphylococcus xylosus* (2) compared to Bacillus cereus When both were used in treatment of OMW at percent 50% in the fermentation medium.
The bioremediation used in this study using *Staphylococcus xylosus* (1), Staphylococcus xylosus (2), and Bacillus cereus is low cost and has good effectiveness in eliminating the problem of environmental pollution caused by OMW on the one hand and the production of alcohols of applied importance in various in fields (Industrial, medical, pharmaceutical) on the other hand.

Keywords: Marine cultivation, Olive Mill Wastewater (OMW), Alcohols, Marine bacteria, High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

* **Master, Higher Institute of Marine Research ,Tishreen University,lattakia,Syria**

انتاج الكحولات من مياه الجفت باستزراع بعض السلالات الجرثومية البحرية

ميس صبحي زوان *

(تاريخ الإيداع 12 / 12 / 2022. قبل للنشر في 25 / 1 / 2023)

□ ملخّص □

يركز هذا البحث على استخدام الجراثيم البحرية في معالجة مشكلة بيئية خطيرة تسببها المخلفات السائلة الناتجة عن معاصر الزيتون والتي تدعى بمياه الجفت (Olive Mill Wastewater :OMW) .

تم عزل السلالات الجرثومية البحرية ((*Staphylococcus xylosus*(1)، (*Staphylococcus xylosus*(2)، *Bacillus cereus*) من المياه والرسوبيات البحرية لإنتاج الكحولات (ميتانول، ايتانول، ايزوبروبانول، بوتانول وهكسانول) من مياه الجفت.

لوحظ من النتائج أن السلالة الجرثومية البحرية (1) *Staphylococcus xylosus* أعطت أعلى إنتاجية للكحولات (الميتانول:1427.22µg/l ، الإيتانول:720.45 µg/l ، والبوتانول: 187.65 µg/l والإيزوبروبانول: 11.28µg/l، والهكسانول :137.31 µg/l) في وسط تخمر يحوي مياه الجفت بنسبة 25%.

بشكل عام، أظهرت النتائج ارتفاع تراكيز الكحولات في وسط التخمر باستخدام السلالة *Bacillus cereus* مقارنة مع السلالة (2) *Staphylococcus xylosus* ، في حين كانت تراكيز كل من الهكسانول والبوتانول متقاربة بالنسبة للجرثومتين مع زيادة بسيطة في الانتاج لـ (2) *Staphylococcus xylosus* بالمقارنة *Bacillus cereus* عند استخدامهما في معالجة مياه الجفت بنسبة 50% في وسط التخمر.

تعد المعالجة الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة باستخدام عزلات جرثومية بحرية (1) *Staphylococcus xylosus* ، (2) *Staphylococcus xylosus* ، *Bacillus cereus* منخفضة التكلفة وذات فعالية جيدة في التخلص من مشكلة التلوث البيئي الناجمة عن مياه الجفت من جهة وانتاج الكحولات ذات الأهمية التطبيقية في نواحي مختلفة (صناعية، طبية، صيدلانية) من جهة أخرى.

الكلمات المفتاحية: الاستزراع البحري، مياه الجفت OMW، الكحولات، الجراثيم البحرية، الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء

* **ماجستير – المعهد العالي للبحوث البحرية– جامعة تشرين، اللاذقية– سورية** maiszwan@tishreen.edu.sy

مقدمة:

يبلغ إنتاج مياه الجفت في بلدان زراعة الزيتون في حوض البحر الأبيض المتوسط أكثر من 30 مليون متر مكعب في كل عام (FAO, 2004; Hanifi and El Hadrami , 2009; Mekki *et al.*, 2013)، وتعد هذه المخلفات من أهم مصادر التلوث البيئي في بلاد البحر الأبيض المتوسط (Bejerano and Madrid,1992; Roig *et al.*, 2006, García-Negueroles *et al.*, 2021)، ومن هنا تأتي ضرورة اعتبار إدارة النفايات وإعادة استخدام المنتجات الثانوية قضية بيئية رئيسة تتعلق بقطاع إنتاج زيت الزيتون (Kotronarou and Méndez, 2003) تدعى المخلفات الصلبة بـ كعكة زيت الزيتون (**OOC** : **O**live **O**il **C**ake) (Fernández-Bolaños *etal.*, 2006) وبالعرجوم أو ثفل الزيتون (Pomace) (Shaheen *etal.*, 2011)، أما المخلفات السائلة يطلق عليها تسميات متعددة ومختلفة منها المخلفات السائلة لمعاصر الزيتون: (**OMW**: **O**live **M**ill **W**astewater) (Hanifi and El Hadrami, 2009; Sahraoui *et al* ., 2015) و مياه الجفت أو المياه السوداء في سورية (ناصر، 2008؛ صالح، 2008)..

تؤدي عملية التخلص من مياه الجفت مباشرة دون معالجة إلى تلوث التربة والمياه الجوفية والبحيرات والأنهار، وبالتالي تهدد الحياة المائية (Anastasiou *et al.*, 2011; La Cara *et al.*, 2012). ففي سورية، تعد هذه المخلفات السائلة من أهم المشكلات البيئية نتيجة التخلص منها مباشرةً دون معالجة. الأمر الذي يستدعي إجراءات صارمة تمنع رمي هذه المخلفات السائلة لمعاصر الزيتون قبل معالجتها حتى لا تسبب مشكلة بيئية خطيرة (Solomakou and Goula, 2021).

تلعب المعالجة الحيوية لمياه الجفت دوراً بارزاً في إنتاج مصادر متنوعة من الطاقة البديلة: كالكحولات مثل: الإيتانول (Bambalov *et al.*, 1989; Li *et al*., 2007; Massadeh and Modallal, 2007; Sarris *et al.*, 2013, 2014) ، البوتانول (Bambalov *et al.*, 1989) والأسيتون– البوتانول–الإيتانول (Massadeh and Fandi, 2014). بالإضافة إلى إنتاج الغاز الحيوي مثل: الهيدروجين (Eroğlu *et al.*, 2004; 2006) والميتان (Borja *et al.*, 2006; Antizar-Ladislao and Turrion-Gomez, 2008 ؛ ناصر وآخرون، 2008; Zakoura *etal.*, 2022).

تعد الأحياء الدقيقة البحرية مصدر كامن ومحتمل لإنتاج المركبات الكيميائية الحيوية (مثل الكحولات) ، وذلك نتيجة انتشارها الواسع وتنوعها وما تتمتع به من خصائص فريدة وإمكانية استثمارها في عدد كبير من تطبيقات التقانة الحيوية (Corinaldesi *et al*., 2017; Poulose *et al.*, 2020).

من هنا تأتي أهمية هذه الدراسة في إمكانية استثمار بعض السلالات الجرثومية البحرية في مجال من المجالات التطبيقية للتقانة الحيوية من خلال استخدامها في عمليات تخمر مياه الجفت لتحويلها من مادة ملوثة إلى مواد أولية (الكحولات: ميتانول، إيتانول، إيزوبروبانول، بوتانول، هكسانول) يمكن الاستفادة منها في نواحي عديدة (صناعية، طبية، صيدلانية و وقود حيوي) من جهة، والتخلص من هذه المخلفات الضخمة المسببة أضراراً بيئية خطيرة من جهة أخرى.

أهمية البحث وأهدافه

أهمية البحث:

تتجه معظم الدراسات والأبحاث العالمية الحديثة إلى استخدام التقانات الحيوية في معالجة المخلفات المختلفة ومنها المخلفات السائلة الناتجة عن معاصر الزيتون أو ما يسمى بمياه الجفت، وذلك بعزل كائنات حية دقيقة قادرة على تحطيم هذه المخلفات، وبالتالي تحويلها من مواد ملوثة للبيئة وإمكانية الاستفادة منها في إنتاج الكحولات ذات الاستخدامات الطبية، الصيدلانية، الصناعية وفي مجال الطاقة

أهداف البحث:

1. عزل بعض السلالات الجرثومية من المياه والرسوبيات البحرية الشاطئية لمدينة اللاذقية واستزراعها على نسب مختلفة من مياه الجفت.
2. تحديد تراكيز بعض الكحولات الناتجة عن عمليات التخمر.
3. تحديد فعالية الجراثيم المعزولة في انتاج الكحولات.

طرائق البحث ومواده:

1- عينات الدراسة:

تم جمع عينات مياه الجفت اللازمة لإجراء هذا البحث، باستخدام عبوات زجاجية معقمة من احدى المعاصر القريبة الموجودة في محافظة اللاذقية خلال موسم عام 2012/2013 ، ثم حفظت العينات بدرجة حرارة $4\ ^oC$ ليتم استخدامها في التجارب لاحقاً.

جمعت عينات المياه البحرية بوساطة عبوات زجاجية عاتمة معقمة بسعة 2L، والرسوبيات البحرية في عبوات معقمة سعة $5cm^3$، من المنطقة الشاطئية لمدينة اللاذقية عند مصب ساقية موسى في البحر وعلى عمق 30cm ، ثم نقلت هذه العينات مباشرة إلى المخبر من أجل اجراء التجارب التحضيرية لعزل سلالات جرثومية بحرية قادرة على تفكيك مياه الجفت.

2-الأجهزة والأدوات المستخدمة

- غرفة عزل جرثومي JSCB-1200SB (Korea)
- حاضنة Dryall Leedal (USA l)
- جهاز تعقيم كهربائي الأوتوكلاف Astell AMB240BT (UK)
- جهاز كروماتوغرافيا سائلة HPLC JASCO (Japan)
- ميزان إلكتروني حساس(Nahita (China
- جهاز التخلص من الغازات بالأمواج فوق صوتية Electrothermal (UK)
- جهاز قياس الـ pH Crisou (Spain)
- مجهر ضوئي(Motic (USA
- مجموعة مساطر الـ API20E BioMerieux (France)
- جهاز تقطير الكحولات

- فرن تجفيف(Blue M (USA
- المصابيح الكحولية
- الأرلنمايرات والحوجلات و البياشر
- أطباق بتري

3-المواد الكيميائية المستخدمة:

استُخدمت المواد الكيميائية عالية النقاوة الآتية في الدراسة الكيميائية التحليلية والبيولوجية:

إيتانول، ميتانول ، بوتانول، ايزوبروبانول، هكسانول، أسيتون، غليسيرول، حمض كلور الماء المخفف، أسيتونتريل من شركة (Merck ,Germany). بيبتون، مستخلص اللحم، كلوريد الصوديوم من شركة (SIFIN, Germany)

4-عزل جراثيم من مياه البحر:

أخذت بوساطة ماصة ميكروبيبت كميات (200 µl) من عينات المياه البحرية ووضعت داخل طبق بتري (الحاوي على مزيج من وسط الآغار المغذي مع مياه جفت معقمة بنسبة (25%)) ثم نشرت على كامل سطح الوسط داخل الطبق، وحضنت هذه الأطباق بدرجة حرارة 37^oC لمدة 5 أيام. نمت مستعمرات جرثومية على وسط الاستنبات. بعد ذلك تم اختيار مستعمرة، والتي تم تحديد هويتها لاحقاً على أنها جراثيم (1) *Staphylococcus xylosus* ، حيث تم عزلها وتنقيتها ثم حفظت في أنابيب إبندروف تحوي غليسرول بتركيز نهائي 25%، عند بدرجة حرارة -20^oC .

5-عزل جراثيم من الرسوبيات البحرية :

تم أخذ كمية 1ml من المياه المسامية الموجودة في عينة الرسوبيات الأولى بعد مزجها بشكل جيد بوساطة ماصة وتم تمديدها بـ 9ml مياه بحرية معقمة كما تم تحضير وزن 1g من رسوبيات العينة الثانية. ثم تم تحضير أنبوبا اختبار سعة كل منها 50ml، كلا الأنبوبين يحتويان على: مياه جفت معقمة بتركيز50% مياه جفت والـ pH = 7.2 ، ثم أضيف إلى الأنبوب الأول 1ml من المياه المسامية الممددة (التي تم تحضيرها سابقاً). في حين أن أضيف إلى الأنبوب الثاني 1g من الرسوبيات. ثم أُغلق الأنبوبان، وتم الحضن عند درجة حرارة 37^oC لمدة 48 ساعة. وتم استزراع عينات من الأوساط السابقة كل على حده بوساطة اللاقحة الجرثومية بالتخطيط على وسط آغار مغذي ضمن أطباق بتري ثم حضنت هذه الأطباق عند الدرجة 37^oC لمدة 5 أيام، حيث كان نمو المستعمرات في الأطباق جيداً وواضحاً، بعد ذلك اختيرت مستعمرة جرثومية واحدة وعزلها من الطبق وهي سلالات جرثومية معزولة من المياه المسامية الرسوبية والتي نمت على وسط يحوي مياه جفت بتركيز50%)، والتي تم تحديد هويتها لاحقاً على أنها جراثيم (2) *Staphylococcus xylosus*، وكذلك اختيرت مستعمرة جرثومية واحدة وعزلها من الطبق الثاني وهي سلالات جرثومية معزولة من رسوبيات بحرية والتي نمت أيضاً على وسط يحوي مياه جفت بتركيز: 50%، والتي تم تحديد هويتها لاحقاً على أنها جراثيم *Bacillus cereus*.

حيث تم عزلها وتنقيتها كلٌ على حده ثم حفظت هذه السلالات الجرثومية بالغليسرول 25% وبدرجة حرارة -20^oC لحين استخدامها في التجارب المخبرية .

6- تحديد هوية الجراثيم:

تم تحديد هوية بعض العزلات الجرثومية البحرية (مياه ورسوبيات) التي تم استخدامها في تجارب معالجة مياه الجفت لإنتاج الكحولات وأعطت نتائج قيمة خلال التجارب التي أنجزت خلال البحث. فقد تم تحديد هوية ثلاث سلالات

جرثومية من خلال الفحص المباشر والتلوين بصبغة غرام ودراسة خصائصها على الأوساط الزرعية مثل وسط شابمان لجراثيم *Staphylococcus*، وسط أزرق الإيزوميتيلين (EMB) ، وسط المغذي Blood agar، وبإجراء اختبارات كيميائية حيوية تفريقية باستخدام جملة تنميط API20E (BioMerieux) (Hendriksen, 2003) بأخذ عينة من مستعمرة منفصلة من عزلة جرثومية ومجانستها بـ 5 ml مصل فيزيولوجي لتضاف إلى حجرات مسطرة الـ API20E وحضن المسطرة لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37°C ثم إجراء القراءة المرجعية وفق الدلالة اللونية ثم تحليل التفاعلات بالاعتماد على الفهرس المرجعي لجملة التنميط (George and Davis, 1979). بالنسبة للعزلات الجرثومية موجبة صبغة الغرام أجري اختبار الكواغيولاز والكاتالاز بإضافة قطرة من الماء الأكسجيني وتخمر المانيتول وأجري اختبار الأوكسيداز لكل من السلالات الجرثومية المعزولة بإضافة قطرة من كاشف أوكسيداز – (1% tetramethyl-p phenylenediamine dihydrochloride) على ورقة الترشيح مشربة بمعلق جرثومي.

دراسة تأثير التراكيز المختلفة لمياه الجفت في إنتاجية الجراثيم البحرية:

1-تجارب السلالات المعزولة من المياه البحرية :

لإجراء التجارب فقد تم تحضير حجم معين من المرق المغذي المخفف التركيز، ثم وضع 500ml من عينة مياه الجفت الخام غير الممددة في أرلنماير سعة 1L وتم تعقيم كلاً منهما بالأوتوكلاف، وداخل غرفة العزل تم القيام بالتجارب الآتية: أخذت 6 عبوات زجاجية عاتمة سعتها 110ml من أجل استخدامها في التخمر اللاهوائي، حيث وزعت هذه العبوات إلى مجموعتين كل مجموعة مؤلفة من ثلاث عبوات على النحو التالي:

تحتوي العبوة الأولى مزيج (مياه جفت معقمة + وسط المرق المغذي المخفف) بنسبة 5% لمياه جفت في وسط التخمر، وكذلك الأمر بالنسبة للعبوتين الثانية والثالثة حيث تحتوي كل منهما على المزيج ذاته باستثناء نسبة مياه جفت 15% للثانية، 25% للثالثة .

وبعد ذلك ضبطت قيم الـpH، في جميع عبوات المجموعتين عند قيمة تساوي 7.2، ثم أضيفت إلى عبوات المجموعة الأولى كمية من مزرعة السلالة الجرثومية البحرية (1) *Staphylococcus xylosus* في مرحلة نموها الأسي النامية في المرق المغذي وبنسبة 10%. في حين أن عبوات المجموعة الثانية تُركت كشاهد عند كل نسبة من النسب المستخدمة في الأعلى من مياه الجفت في وسط التخمر، بدون إضافة الجراثيم. ثم أغلقت عبوات المجموعتين جميعها بعد ما ملأت تماماً، وتم الحضن عند الدرجة $37^{o}C$ لمدة 30 يوم، وفي نهاية الحضن أجريت التحاليل الكيميائية.

2- تجارب السلالات المعزولة من الرسوبيات البحرية :

تم تحضير حجم معين من وسط المرق المغذي المخفف التركيز، ثم وضع 500ml من عينة مياه الجفت الخام غير الممددة في أرلنماير سعة 1L وتم تعقيم كلاً منهما بالأوتوكلاف، وداخل غرفة العزل تم القيام بالتجارب الآتية: أخذت 4 عبوات عاتمة ومعقمة سعة 110ml وزعت إلى مجموعتين بحيث تحتوي كل منها على (مياه جفت معقمة + وسط المرق المغذي المخفف) بنسبة 50% مياه جفت في وسط التخمر.

ضبطت الـ pH، في جميع العبوات عند قيمة تساوي 7.2. أضيف الى أحدى عبوات المجموعة الأولى السلالة الجرثومية (2) *Staphylococcus xylosus* في مرحلة نموها الأسي النامية في المرق المغذي وبنسبة 10%، والعبوة الثانية تركت كشاهد، وكذلك الأمر في المجموعة الثانية حيث أضيف الى أحدى العبوتين السلالة الجرثومية

Bacillus cereus والعبوة الأخرى تركت كشاهد. ثم أغلقت العبوات جميعها بعدما مزجت بشكل جيد و مُلأت تماماً، وتم الحضن عند الدرجة 37^oC لمدة 30 يوم، وفي نهاية الحضن تم القيام بالتحاليل الكيميائية.

تجارب القسم الكيميائي المخبرية :

1-مرحلة الاستخلاص والتقطير:

✓ أخذ حجم (50ml) من كل عينة من عينات التخمر في التجارب السابقة، بعد انتهاء فترة الحضن(30 يوماً)، لتقطيرها عند درجة حرارة $157\ ^oC$ مئوية، وذلك لأن درجة غليان كل من الميتانول $64.5\ ^oC$، الإيتانول $78\ ^oC$، الإيزوبروبانول$82.4\ ^oC$، البوتانول$116\text{-}118\ ^oC$ والهكسانول$157\ ^oC$. لذلك تم اعتماد أعلى درجة غليان لتشمل تقطير كل أنواع الكحولات المدروسة.

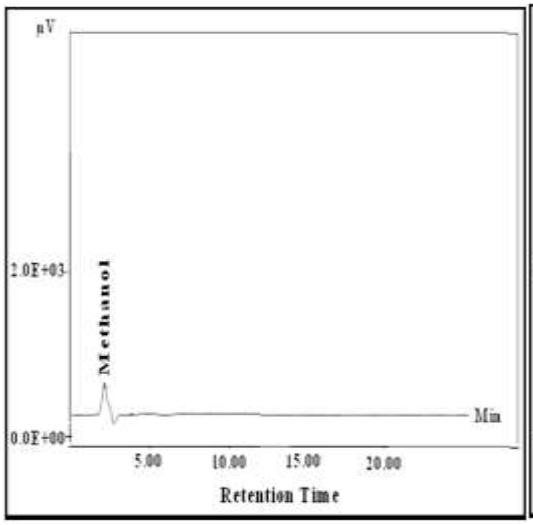
✓ حُفظت العينات الكحولية المستخلصة في عبوات بلاستيكية معقمة ومحكمة الإغلاق عند الدرجة 4^oC ليتم تحليلها.

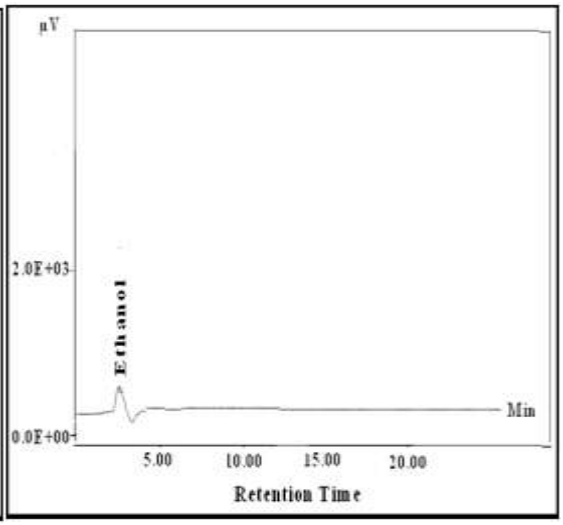
2-مرحلة التحليل بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) :

تم تحليل الخلاصات الكحولية الناتجة للعينات المتخمرة باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء نوع Jasco، المكشاف المستخدم: Jasco UV-290، المضخة رباعية القناة نوع Jasco UV-980.

تم اعتماد الشروط التحليلية الآتية :

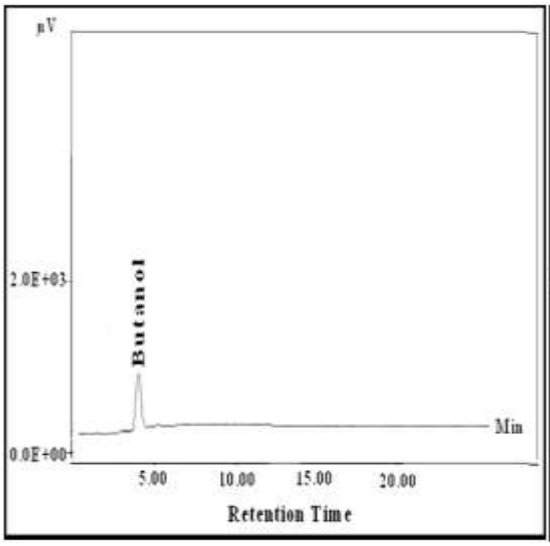
- الطور المتحرك : أسيتونتريل : ماء ثنائي التقطير منزوع الشوارد (v/v) (60:40)
- طول الموجة: 240nm
- التدفق : 1m/min
- العمود : (25 x0.46) cm
- الطور الثابت : ODS
- درجة حرارة الفرن: 35^oC
- نظام التحليل : مزيج الطور المتحرك ثابت خلال زمن التحليل (Isocratic)
- تم اعتماد 240nm وتثبيته لكل التجارب كطول موجي وسطي موحد لكل الكحولات كما في هو مبين في الأشكال (1 – 5).

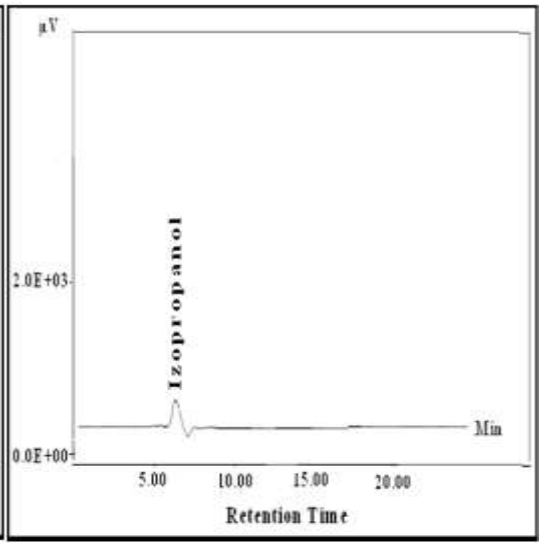




الشكل(1): كروماتوغرام الميتانول عند طول موجة 240 nm

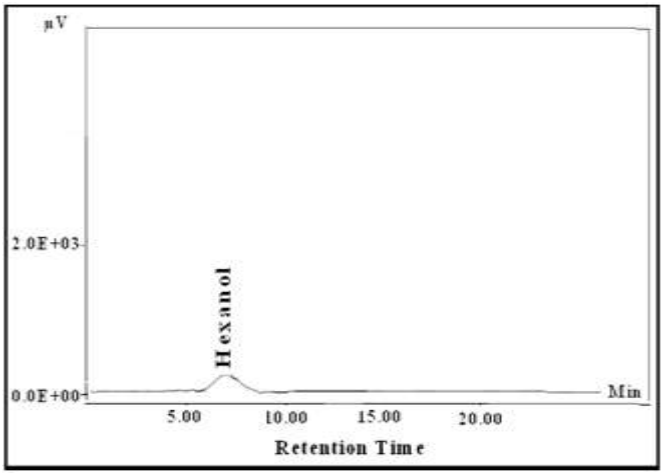
الشكل(2): كروماتوغرام الإيتانول عند طول موجة 240 nm





الشكل(3):كروماتوغرام البوتانول عند طول الموجة 240 nm

الشكل(4): كروماتوغرام الإيزوبروبانول عند طول الموجة 240 nm



الشكل(5): كروماتوغرام الهكسانول عند طول الموجة 240 nm

- حقنت الستاندرات وهي محاليل عيارية لكل من الميتانول، الإيتانول، الإيزوبروبانول، البوتانول و الهكسانول عالية النقاوة، وبعدها حقنت الخلاصات الكحولية للعينات .
- تم التحليل الكيفي بمقارنة أزمنة احتفاظ الميتانول، الإيتانول، الإيزوبروبانول، البوتانول و الهكسانول بالعينة مع أزمنة احتفاظ هذه الكحولات في محاليلها العيارية، ومن ثم حساب تراكيز كل من الكحولات الخمسة في الخلاصات الكحولية للعينات المتخمرة الحاوية على مياه جفت بتراكيز مختلفة باستخدام الجراثيم الممرضة و الجراثيم البحرية، وذلك باستخدام العلاقة التالية:

$$C\ [\mu g/l] = Rf \times Area \times V_{ext} / V_{inj} \times V$$

C [µg/l] : تركيز الكحول في الخلاصة الكحولية

(Rf: Response Factor) : عامل الإستجابة

Area: مساحة قمة الكحول في العينة.

$\mathbf{V_{extraction}}$: حجم الخلاصة الكحولية النهائية.

$\mathbf{V_{injection}}$: حجم العينة المحقونة في جهاز HPLC (20µl)

V: حجم عينة مياه الجفت التي تم تخميرها (بـ1L).

النتائج والمناقشة:

1- تحديد هوية الجراثيم البحرية المعزولة:

تم تحديد هوية الجراثيم المجهولة والتي عزلت من المياه البحرية والرسوبيات البحرية، المياه المسامية والقادرة على إنتاج كحولات مختلفة من خلال معالجة مياه الجفت المعقمة، بعد إجراء الفحوصات المخبرية في المعهد العالي للبحوث البحرية وإجراء الاختبارات الكيميائية الحيوية اللازمة (API20E) في مركز التقانة الحيوية في جامعة دمشق كان التالي:

- بالنسبة للسلالة الجرثومية المعزولة من المياه البحرية:

أظهرت نتائج الفحوصات المخبرية بأن خلايا هذه السلالة قادرة على النمو على وسط آغار المغذي الدم، وعلى وسط يحتوي على ملح كلوريد الصوديوم بتركيز 10% وكانت المستعمرات متوسطة الحجم ملساء ذات لون رمادي. أما تحت المجهر بدت كمكورات عنقودية الشكل، وتتميز بأنها موجبة صبغة غرام.

- بالنسبة للسلالة الجرثومية المعزولة من المياه الرسوبية:

بينت الفحوصات المخبرية أن خلايا هذه السلالة قادرة على النمو على وسط آغار المغذي الدم ، وتنمو على وسط يحتوي على ملح كلوريد الصوديوم بتركيز 10% وكانت المستعمرات متوسطة الحجم، ملساء و ذات لون رمادي. وبدت الخلايا تحت المجهر كروية بيضوية الشكل بشكل أزواج أحياناً لا تشكل سلاسل صغيرة وعناقيد، وكانت موجبة صبغة غرام.

و بناءً على نتائج الاختبارات الكيمياحيوية وبالاعتماد على دليل بيرجي (De Vos *et al.*, 2009) فقد تم تحديد هوية السلالتين المعزولة من مياه البحرية و المعزولة من المياه المسامية للرسوبيات البحرية على أنهما: *Staphylococcus xylosus*، لذلك تم إعطاء اسم (1) *Staphylococcus xylosus* للسلالة المعزولة من مياه البحرية

واسم (2) *Staphylococcus xylosus* للسلالة المعزولة من المياه المسامية ، وتشير هذه النتائج إلى تواجد جراثيم الـ *Staphylococcus* بشكل عام في المياه والرسوبيات البحرية، وهذا ما أكدته دراسات أخرى بمقدرة هذه الجراثيم على الانتشار بشكل كبير في المياه الشاطئية، الرسوبيات والرمال البحرية (Buck, 1976; Gunn and Colwell, 1983). في الحقيقة تتواجد الجراثيم الكروية موجبة صبغة غرام، وموجبة الكاتلاز بشكل طبيعي في البيئة البحرية متمثلةً بالجنس الأكثر تواجداً *Staphylococcus* (Gunn and Colwell, 1983) .

- بالنسبة للسلالة الجرثومية المعزولة من الرسوبيات البحرية:

أظهرت نتائج الفحوصات المخبرية بأن خلايا هذه السلالة قادرة على النمو على وسط الآغار المغذي، و المستعمرات غير منتظمة مع حواف متعرجة و امتدادات شعاعية الشكل. بدت خلايا هذه السلالة تحت المجهر عصوية الشكل، وتحتوي على أبواغ طرفية. ولوحظ بأن خلايا هذه السلالة موجبة صبغة غرام.

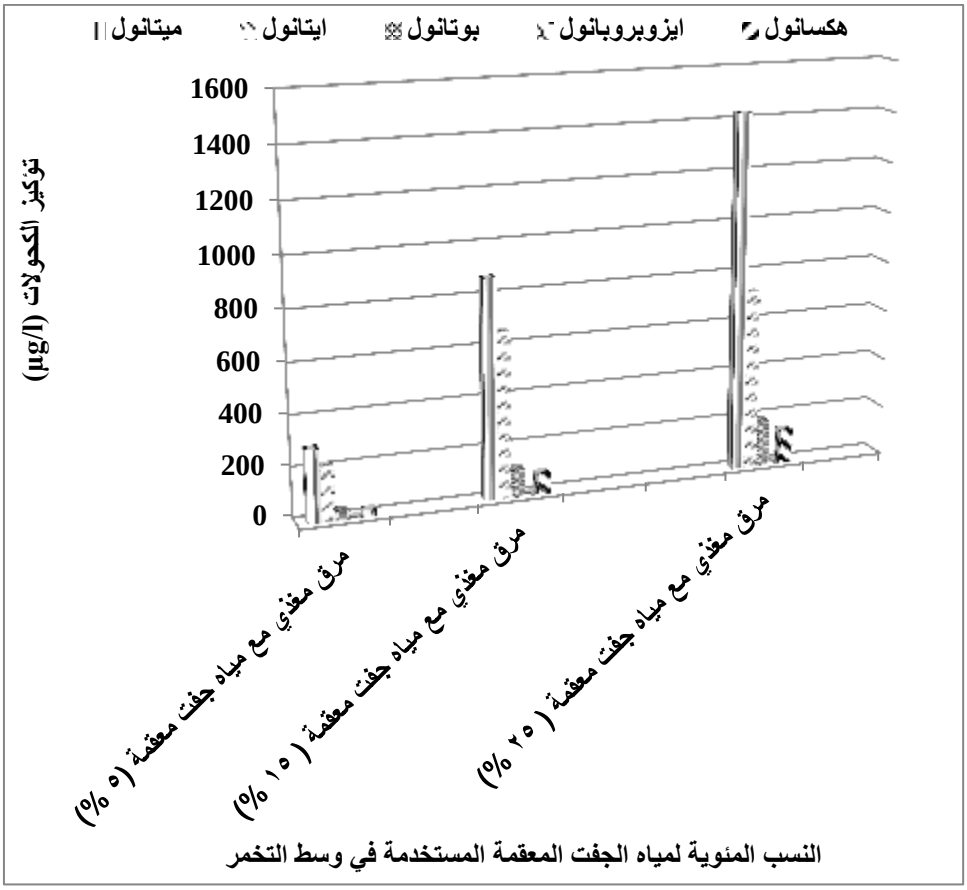
ونتيجة لنتائج الاختبارات الكيمياء الحيوية واعتماداً على دليل بيرجي فقد تم تحديد هوية السلالة المعزولة من الرسوبيات البحرية على أنها *Bacillus cereus*. إن تواجد هذه الجراثيم في البيئة البحرية يتوافق مع دراسات أخرى، والتي تمكنت من عزل سلالات أنواع تابعة للجنس *Bacillus* مثل الـ *B. cereus* بالإضافة الى أنواع أخرى من البيئة البحرية (Ivanova *et al.*, 2010) وأن هذه السلالة من الأنواع السائدة في بيئة المحيط الهادي (Ivanova *et al.*, 1992).

2- تأثير التراكيز المختلفة لمياه الجفت في إنتاجية السلالات الجرثومية البحرية للكحولات:

2-1-السلالات المعزولة من المياه البحرية :

بينت النتائج أن السلالة الجرثومية البحرية (1) *Staphylococcus xylosus* أعطت أعلى إنتاجية للكحولات (الميتانول:1427.22µg/l ، الإيتانول:720.45 µg/l ، والبوتانول: 187.65 µg/l والإيزوبروبانول: 11.28µg/l، والهكسانول :137.31 µg/l) عند معالجتها لمياه الجفت بنسبة 25% في وسط التخمر (الشكل6).

لوحظ ارتفاع تراكيز الكحولات مع ازدياد نسبة مياه الجفت المعقمة في وسط التخمر من 5% إلى 25% مع فعالية واضحة في إنتاج كل من الميتانول والإيتانول مقارنة مع الكحولات الباقية (الإيزوبروبانول، البوتانول والهكسانول).

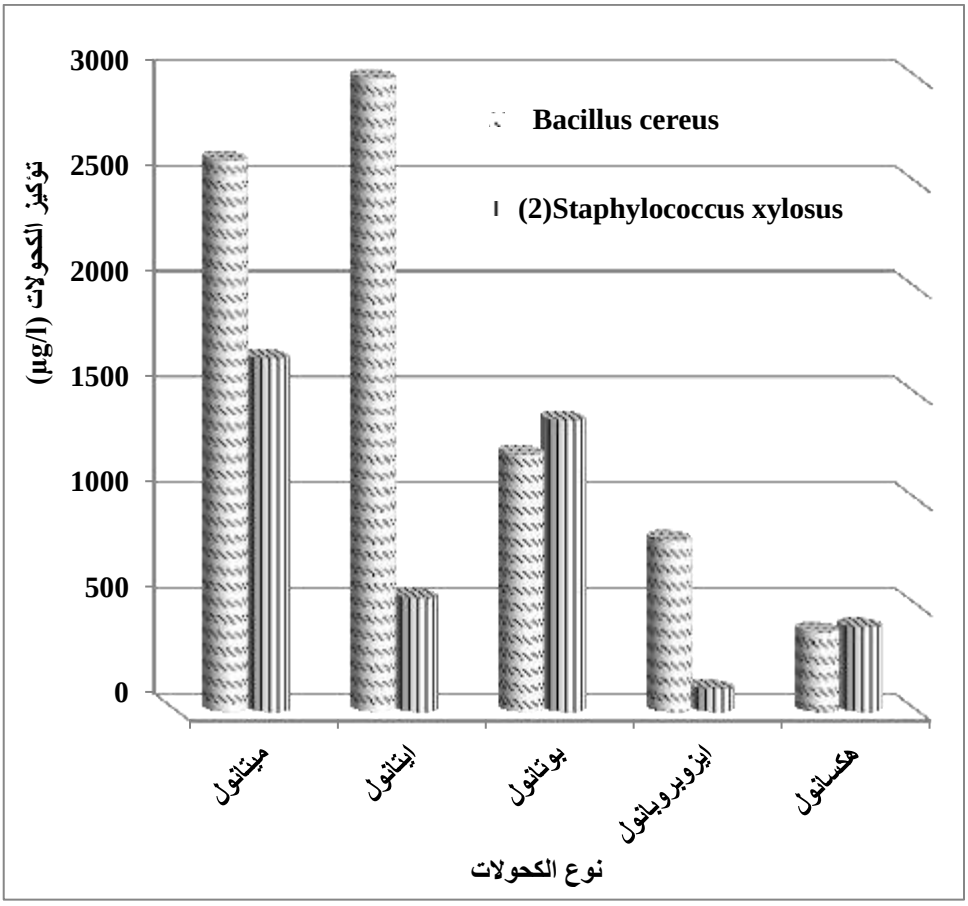


الشكل (6): تراكيز الكحولات الناتجة بوساطة Staphylococcus xylosus (1) المعزولة من المياه البحرية المستخدمة في عمليات تخمر نسب مختلفة من مياه جفت معقمة

2-2-السلالات المعزولة من الرسوبيات البحرية :

لوحظ أن الجراثيم المعزولة من الرسوبيات البحرية *Bacillus cereus* ومن المياه المسامية *Staphylococcus xylosus* (2) أعطت تراكيز مختلفة من الكحولات في عمليات تخمر لمياه جفت معقمة (50%)، حيث لوحظ فعالية واضحة في إنتاجية للكحولات. تراوحت تراكيز الميتانول (2612.11 µg/l) و (1673.2 µg/l) على التوالي، وبين قيم (2998.82 µg/l) و (540.03 µg/l) بالنسبة للإيتانول، وأيضاً قيم البوتانول بين (1219.63 µg/l) و (1380.41 µg/l)، وأما بالنسبة للإيزوبروبانول فقد تراوحت القيم بين (815.07µg/l) و (107.92µg/l) ، وأخيراً للهكسانول فقد تراوحت القيم بين (380.3 µg/l) و (400.91 µg/l) (الشكل 7).

بشكل عام، أظهرت النتائج ارتفاع تراكيز الكحولات في وسط التخمر باستخدام السلالة *Bacillus cereus* مقارنة مع السلالة *Staphylococcus xylosus* (2) ، في حين كانت تراكيز كل من الهكسانول والبوتانول متقاربة بالنسبة للجرثومتين مع تفوق بسيط للجرثومة *Staphylococcus xylosus* (2) على *Bacillus cereus* كما هو مبين في الشكل (8).



الشكل (8): تراكيز الكحولات الناتجة الجراثيم المعزولة من الرسوبيات البحرية *Bacillus cereus* ومن المياه المسامية (2) *Staphylococcus xylosus* المستخدمة في عمليات تخمر نسب 50% من مياه جفت معقمة

أبدت جراثيم الـ *Bacillus cereus* المعزولة من الرسوبيات البحرية إنتاجية وكفاءة عالية في إنتاج جميع الكحولات في وسط تخمر مياه الجفت 50%. يمكن أن يعزى ذلك إلى ما أكدته دراسات عديدة عن إمكانية هذا الجنس من البكتيريا العصوية البحرية في إنتاج مستقلبات مختلفة عن تلك الناتجة بوساطة الجراثيم العصوية من مصدر بري (Jensen and Fenical, 1994). كما استطاعت عدة دراسات أن تكشف وترصد أنواع التابعة للجنس *Bacillus* ومن بينها النوع *B. cereus* في البيئات البحرية وكانت هذه الأنواع الجرثومية ذات الأصل البحري قادرة على استخدام مجال واسع من المركبات العضوية، وكانت تتميز بتسامحها للملوحة، وكذلك للقلوية، الأمر الذي يعكس مرونتها الاستقلابية العالية في إنتاج عدد من المركبات الفعالة فيزيولوجياً (Ivanova *et al.*,2010). كذلك تم استخدام سلالة *Bacillus cereus* في إنتاج مضادات حيوية وأنزيمات ذات أهمية صناعية وتطبيقية لتحويل مخلفات الأحياء البحرية إلى منتجات ذات قيمة عالية (حمود ، 2022 ؛ Mani *et al.*, 2015 ; Poopathi *et al.*, 2014)

أما بالنسبة لـ (2)*Staphylococcus xylosus* المعزولة من المياه المسامية للرسوبيات البحرية فقد أبدت هذه السلالة الجرثومية فعالية جيدة في إنتاج الكحولات في وسط تخمر مياه الجفت 50% و بقائها حية في وسط التخمر هذا وذلك قد يعود الى أن جدران خلايا المكورات العنقودية، مثل بقية الجراثيم موجبة الغرام، تؤمن الحماية لهذه الخلايا ضد أي عامل ميكانيكي مخرب، وتحتوي عدة بروتينات سطحية لها دور مهم في البقاء على قيد الحياة (Navarre and Schneewind, 1999; Vela *et al.*, 2012) . وهذا يمكن أن يفسر قدرة هذه السلالة *Staphylococcus*

xylosus(2) المعزولة من المياه المسامية للرسوبيات البحرية على النمو ومقاومة المواد المثبطة الموجودة في مياه الجفت المرتفعة التركيز، وإنتاج تراكيز عالية من الكحولات.

أما جراثيم الـ *Staphylococcus xylosus*(1) المعزولة من المياه البحرية فقد كانت ذات إنتاجية جيدة للكحولات في وسط تخمر يحوي مياه الجفت 25% .

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات :

- تم عزل السلالات الجرثومية (*Staphylococcus xylosus* (1) ، *Staphylococcus xylosus* (2) ، *Bacillus cereus*) من المياه والرسوبيات البحرية
- لوحظ ازدياد فعالية *Staphylococcus xylosus* (1) المعزولة من المياه البحرية في انتاج الكحولات مع ارتفاع نسبة مياه الجفت في وسط التخمر وفق الترتيب التالي: 5 < 15 < 50
- أظهرت النتائج ارتفاع تراكيز الكحولات في وسط التخمر باستخدام السلالة *Bacillus cereus* مقارنة مع السلالة *Staphylococcus xylosus* (2) ، في حين كانت تراكيز كل من الهكسانول والبوتانول متقاربة بالنسبة للجرثومتين مع تفوق بسيط للجرثومة *Staphylococcus xylosus* (2) على *Bacillus cereus*

وهذا ما يعطي أهمية خاصة للسلالات البحرية الرسوبية في المجال التطبيقي.

- اختلفت نسبة الكحولات الناتجة مع اختلاف نسب مياه الجفت المستخدمة في وسط التخمر.
- بشكل عام، سجلت القيم الأعلى للكحولات الناتجة وفق الترتيب التالي:

الايتانول> الميتانول> البوتانول> الايزوبروبانول> الهكسانول.

- لوحظ فعالية جيدة للتقانة الحيوية في معالجة مياه الجفت والتخفيف من الأثر البيئي السلبي لها وانتاج الكحولات ذات الاستخدامات المختلفة

التوصيات :

- ✓ استخدام الجراثيم البحرية (*Bacillus cereus*، *Staphylococcus xylosus*(1) و *Staphylococcus xylosus*(2)) في معالجة المخلفات السائلة الناتجة عن معاصر الزيتون.
- ✓ دعم الجهات الحكومية بشكل عام والعاملة في القطاع البيئي بشكل خاص لهذا البحث لما له من أهمية في معالجة مشكلة بيئية وانتاج مواد ذات قيمة عالية.
- ✓ الاستمرار في مجال تطبيقات المعالجة الحيوية باستخدام الجراثيم المعزولة من البيئة البحرية كأحد الموارد الحية المتجددة لإنتاج مركبات ذات أهمية اقتصادية، صناعية، وطبية.

References:

حمود، رامي. *دراسة المضادات المنتجة من أنواع جنس الـ Bacillus البحرية والعوامل المؤثرة على انتاجها*. رسالة دكتوراه. المعهد العالي للبحوث البحرية، جامعة تشرين: سورية، 2022، 124-1

صالح ، فؤاد ؛ الشحنة، محمد؛ خليل، مصعب. *تأثير تغيير pH المياه الناتجة عن معاصر الزيتون في المعالجة الأنودية لهذه المياه*. مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية، سلسلة العلوم الأساسية، المجلد 30، العدد 1، 2008، 151-163.

ناصر، أميمة ؛ كبيبو، عيسى؛ شاهين، هيثم ؛ نصور، عبد الله . *معالجة المخلفات الناتجة عن معاصر الزيتون باستخدام الجراثيم*. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، المجلد24، العدد2، 2008،269-287.

ناصر، أميمة. *مساهمة في دراسة المعالجة البيوكيميائية للمياه الناتجة عن معاصر الزيتون لإنتاج الغاز الحيوي*. رسالة دكتوراه. المعهد العالي لبحوث البيئة، جامعة تشرين: سورية، 2008.

HAMMOUD, RAMI. A study of the antigens produced from marine *Bacillus* species and the factors affecting their production. Ph.D. Higher Institute for Marine Research, Tishreen University: Syria, 2022, 1-124

SALEH, FOUAD; Shipment, Muhammad; Khalil, Musab. The effect of changing the pH of water generated from olive presses on the anodic treatment of this water. Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies, Basic Sciences Series, Volume 30, Issue 1, 2008, 151-163.

NASSER, OMAIMA; KBIBO, ISSA; SHAHEEN, HAITHAM; NASSOUR, ABDULLAH. Treatment of waste resulting from olive presses using bacteria. Damascus University Journal of Agricultural Sciences, Volume 24, Number 2, 2008, 269-287.

NASSER, OMAIMA. Contribution to the study of biochemical treatment of water resulting from olive presses for the production of biogas. Ph.D. Higher Institute for Environmental Research, Tishreen University: Syria, 2008.

ANASTASIOU, C. C.; CHRISTOU, P. ; MICHAEL, A.; NICOLAIDES, D. And LAMBROU, T. P. *Approaches to olive mill wastewater and disposal in Cyprus*. Environmental Research Journal, Vol. 5 , N°. 2, 2011, 49-58.

ANTIZAR-LADISLAO, B. And TURRION-GOMEZ, J. L. *Second generation biofuels and local bio-energy systems*. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, Vol. 2, N°. 5, 2008, 455-469.

BAMBALOV, G.; TANCHEN, S. And ISRALLIS, C. *Alcohol fermentation in olive extraction effluent*. Biological Wastes, Vol. 27, 1989, 71-75.

BEJERANO, M. And MADRID, L. *Solubilization of heavy metals from a river sediment by a residue from olive oil industry*. Environmental Technology, Vol.13, N°. 10, 1992, 979-985

BORJA, R.; RINCÓN, B. And RAPOSO, F. *Anaerobic biodegradation of two-phase olive mill solid wastes and liquid effluents: kinetic studies and process performance*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Vol. 81, N°. 9, 2006, 1450-1462.

BUCK, J. D. *Pollution microbiology of Biscayne Bay beaches*. Quarterly Journal of the Florida Academy of Sciences, Vol. 39, 1976, 111-120.

CORINALDESI, C.; BARONE, G.; MACELLINI, F.; ANNO, A.D. & DANOVARANO, R. *Marine microbial-derived molecules and their potential use in cosmeceutical and cosmetic products*. Marine Drugs, Vol. 15, 2017, 118.

DE VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N. R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F. A.; SCHLEIFER, K.-H. And WHITMAN, W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes*. 2nd ed. Vol. 3, Springer-Verlag, New York, Krieg, 2009.

EROĞLU, E; GÜNDÜZ, U.; YÜCEL, M.; TÜRKER, L. And EROĞLU, İ. *Photobiological hydrogen production by using olive mill wastewater as a sole substrate source*. International Journal of Hydrogen Energy, Vol. 29, N°. 2, 2004,163-171

EROĞLU, E.; EROĞLU, İ.; GÜNDÜZ, U.; TÜRKER, L. And YÜCEL, M. *Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two-stage processes*. International Journal of Hydrogen Energy, Vol. 31, N°. 11, 2006, 1527-1535.

FAO, 2004; Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004.

FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J.; RODRÍGUEZ, G.; RODRÍGUEZ, R.; GULLÉN, R. And JIMÉNEZ, A. *Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste*. Grasas y Aceites. Enero-marzo, Vol. 57, N°.1, 2006, 95-106.

GARCÍA-NEGUEROLES, P.; GARCÍA-BALLESTEROS, S.; SANTOS-JUANES, L.; SABATER, C.; CASTILLO, M. A.; LÓPEZ-PÉREZ, M. F.; ... & ARQUES, A. *Humic like substances extracted from oil mill wastes in photo-Fenton processes: Characterization, performance and toxicity assesment*. Journal of Environmental Chemical Engineering, Vol. 9, N° 6, 2021, 106862.

GEORGE, S. and DAVIS, G. *Rapid identification of entrobacteriaceae by using non-commercial micro-tests in conjunction with API 20E profile data*. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 10, N°. 4, 1979, 399-403.

GUNN, A.B. and COLWELL, R. R. *Numerical Taxonomy of Staphylococci Isolated from the Marine Environment. International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 33, N°. 4, 1983, 751-759.

HANIFI, S. and EL HADRAMI, I. *Olive mill wastewater: Diversity of the fatel product in olive oil industry and its valorization as agronomical amendment of poor soils: a review*. Journal of Agronomy, Vol. 8, N° 1, 2009, 1-13.

IVANOVA, E. P.; MIKHAILOV, V. M. And ANDREEV, L. A. *Marine bacilli and some approaches to their identification (in Russian*). Mikro bioliologicgeskii Zhurnal, Vol. 54, 1992, 27–33.

IVANOVA, E. P.; VYSOTSKII, M. V.; SVETASHEV, V. I.; NEDASHKOVSKAYA, O. I.; GORSHKOVA, N. M.; MIKHAILOV, V. V.; YUMOTO, N.; SHIGERI, Y.; TAGUCHI, T. And YOSHIKAWA, S. *Characterization of Bacillus strains of marine origin*. International Microbiology, Vol. 2, N° 4, 2010, 267-271.

JENSEN, P. R. And FENICAL, W. *Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives*. Annual Review Microbiology, Vol. 48, 1994, 559-584.

KOTRONAROU, N. And MÉNDEZ, M. *IMPEL olive oil project*. European Union Network for the Implementation and Enforcement of Environmental Law. Rome, Number report 3, 2003, 4- 33.

LA CARA, F.; IONATA, E.; DEL MONACO, G. MARCOLONGO, L.; GONÇALVES, M. And MARQUES, I. *Olive mill wastewater anaerobically digested: phenolic compounds with antiradical activity*. Chemical engineering transactions, Vol. 27, 2012, 325-330.

LI, A.; ANTIZAR-LADISLAO, B. And KHRAISHEH, M. A. M. *Bioconversion of municipal solid waste to glucose for bio-ethanol production*. Bioprocess Biosystem Energy, Vol. 30, N° 5 , 2007, 189-196.

MANI, C.; THIRUGNANASAMBANTHAM, K.; SUNDARAPANDIAN, S. And POOPATHI, S. *Identification and characterization of a novel marine Bacillus cereus VCRC-B540 for mosquito control*. Biological Control, Vol. 60, N° 1, 2015, 71-79.

MASSADEH, M. And MODALLAL, N. *Ethanol Production from Olive Mill Wastewater (OMW) pretreated with Pleurotus sajor-caju*. American Chemical Society, Vol. 22, N° 1, 2007, 150-154

MASSADEH, M. I. And FANDI, K. *Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Production by Anaerobic Microflora Growing on Olive Mill Wastewater. Journal of Biobased Materials and Bioenergy*. American Scientific Publishers, Vol. 8, N° 1, 2014, 94-99

MEKKI, A.; DHOUIB, A. And SAYADI, S. *Review: Effects of olive mill wastewater application on soil properties and plants growth*. International Journal Of Recycling of Organic Waste in Agriculture, Vol. 2, N° 15, 2013, 1-7.

NAVARRE, W.W. And SCHNEEWIND, O. *Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol . 63, 1999,174–229.

POOPATHI, S.; MANI, C.; THIRUGNANASAMBANTHAM, K.; PRABA, V. L.; AHANGAR, N. A. And BALAGANGADHARAN, K. *Identification and characterization of a novel marine Bacillus cereus for mosquito control*. Parasitology Research, Vol. 113, N°. 1, 2014, 323-32.

POULOSE, N.; SAJAYAN, A.; RAVINDRAN, A.; SREECHITHRA, T.V.; VARDHAN, V.; SELVIN, J. & KIRAN, G.S. *Photoprotectective effect of nanomelanin-seaweed concentrate in formulated cosmetic cream: With improved antioxidant and wound healing properties*. Journal of Photochemistry & Photobiology, B:Biology, Vol. 205, 2020, 111816.

ROIG, A.; CAYUELA, M. L. And SANCHEZ-MONEDERO, M. A. *An overview on olive mill wastes and their valorisation methods*. Waste Management, Vol. 26, N°. 9, 2006, 960-969.

SAHRAOUI, H.; KANZARI, S.; HACHICHA, M. And MELLOULI, H. J. *Olive mill wastewater spreading effects on hydraulic soil properties* .The Experiment , International Journal of Science and Technology, Vol. 30, N°. 4, 2015, 2002-2011.

SARRIS, D.; GIANNAKIS, M.; PHILIPPOUSSIS, A.; KOMAITIS, M.; KOUTINAS, A. And PAPANIKOLAOU, S. *Conversions of olive mill wastewater-based media by through sterile and non-sterile bioprocesses*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, Vol. 88, N°. 6, 2013, 958–969.

SARRIS, D.; MATSAKASA, L.; AGGELIS, G.; KOUTINAS, A. A. And PAPANIKOLAOU, S. *Aerated vs non-aerated conversions of molasses and olive mill wastewaters blends into bioethanol by Saccharomyces cerevisiae under non-aseptic conditions.* Industrial Crops and Products, Vol. 56, 2014, 83–93.

SHAHEEN, A. S. ; EL-TAWEEL, A.A. And AL-KHATEEB,A. *Effect of using olive vegetation (OVW) on growth, flowering and yield of Manzanillo olive trees*. Journal of American Science, Vol. 7, N°. 9, 2011, 501-510.

SOLOMAKOU, N., AND GOULA, A. M. *Treatment of olive mill wastewater by adsorption of phenolic compounds*. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, Vol. 20, N°3, 2021, 839-863.

VELA, J.; HILDEBRANDT, K.; METCALFE, A.; REMPEL, H.; BITTMAN, S.; TOPP, E. And DIARRA, M. *Characterization of Staphylococcus xylosus isolated from broiler chicken barn bioaerosol*. Poultry Science, Vol. 91, N°12, 2012, 3003-3012.

ZAKOURA, M.; KOPSAHELIS, A.; TSIGKOU, K.;NTOUGIAS, S.; ALI, S. S., & KORNAROS, M. *Performance evaluation of three mesophilic upflow anaerobic sludge blanket bioreactors treating olive mill wastewater: Flocculent and granular inocula tests, organic loading rate effect and anaerobic consortia structure*. Fuel, Vol. 313, 2022, 122951.