

Studying the efficiency of locally isolated *Klebsiella pneumoniae* and *Bacillus cereus* In Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon

Dr. Tamim Alia*
Dr. Omiema Nasser**
Ola ALshakh***

(Received 30 / 9 / 2023. Accepted 1 / 2 / 2024)

□ ABSTRACT □

The use of indigenous microorganisms in the bioremediation of hydrocarbon petroleum to cleanup environment has become a valuable technique. In this study two strains of bacteria *Klebsiella pneumoniae* and *Bacillus cereus* have been tested to remove engine oil. The results showed that both *K. pneumoniae* and *B.cereus* have ability to remove petroleum hydrocarbons in Bushnell Hass Broth medium containing 126mg/l engine oil as sole carbon source, but *K. pneumoniae* was more efficient in the bioremediation of engine oil than *B.cereus*.The results obtained showed the *K. pneumoniae* strain degradation efficacy was 83.17% on 20 day compared to *B.cereus* 65.291%. furthermore the rate growth of *K. pneumoniae* strain was faster than that of the *B.cerues* strain. Spectrum results by Spectrophotometric analysis and colorimetric using DCPIP (2,6 dichlorophanelin- dophenol) revealed that The isolate *K. pneumoniae* showed 79.79 % of biodegradation on 7day compared to *B.cereus* 61.23%.

Keywords : Petroleum Hydrocarbon, Bacteria, Biodegradation, Bacteria growth rate.

Copyright



:Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* Professor, Department of environmental Chemistry, Higher Institute for Environmental Research, Tishreen University , Lattkia, Syria

**Professor, Department Department of environmental prevention, Higher Institute for Environmental Research, Tishreen University , Lattkia, Syria

***Postgraduate student (phd), Department of environmental prevention, Higher Institute for Environmental Research, Tishreen University , Lattkia, Syria.

دراسة كفاءة جرثومتي *Bacillus cereus* و *Klebsiella pneumoniae* المعزولة محلياً في المعالجة الحيوية للهيدروكربونات النفطية

د تميم علياً*

د. أميمة ناصر**

علا الشاخ***

(تاريخ الإيداع 30 / 9 / 2023. قبل للنشر في 1 / 2 / 2024)

□ ملخص □

يعد استخدام الكائنات الحية الدقيقة المحلية في التفكيك الحيوي للمركبات النفطية من التقانات الحيوية المتاحة للحفاظ على البيئة وتخفيف عبء التلوث البيئي بمعالجة هذه الملوثات بطريقة حيوية، في هذه الدراسة تم اختبار فعالية العزلتين الجرثوميتين *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* في تفكيك زيت المحرك، أظهرت نتائج الدراسة مقدرة كلاً من العزلتين السابقتين على تفكك المركبات الهيدروكربونات النفطية في وسط Bushnell Hass Broth الحاوي على زيت محرك بتركيز 126mg/l كمصدر وحيد للكربون. حيث بلغت نسبة التخفيض لـ *K. pneumoniae* 83% في 20 يوم مقابل 65.29% للعزلة الجرثومية *B. cereus*، بالإضافة إلى أن معدل نمو *K. pneumoniae* كان أسرع من العزلة *B. cereus*. وأظهرت نتائج تقدير نسب الإرجاع بطريقة التحليل الطيفي واللوني باستخدام مركب DCPIP (2,6 dichlorophanelin dophenol) أن نسبة إرجاع العزلة الجرثومية *K. pneumoniae* وصلت لـ 79.79% في 7 أيام بالمقارنة مع 61.23% للعزلة الجرثومية *B. cereus*.

الكلمات المفتاحية: الهيدروكربونات النفطية، الجراثيم، التحلل الحيوي، معدل النمو الجرثومي.

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين - سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص



CC BY-NC-SA 04

*أستاذ- قسم الكيمياء البيئية-المعهد العالي لبحوث البيئة-جامعة تشرين - اللاذقية- سورية.

** أستاذ- قسم الوقاية البيئية- المعهد العالي لبحوث البيئة -جامعة تشرين - اللاذقية- سورية.

***طالبة (دكتوراه)- قسم الوقاية البيئية-المعهد العالي لبحوث البيئة -جامعة تشرين - اللاذقية- سورية.

مقدمة

تعد المركبات النفطية واحدة من أهم مصادر الطاقة، إضافة إلى كونها مادة خام أساسية لأنواع مختلفة من الصناعات الحديثة، الأمر الذي يتطلب زيادة عمليات الإنتاج والنقل والتخزين لسد كافة الاحتياجات المطلوبة. يرافق هذه العمليات تسرب المركبات النفطية إلى النظم البيئية، مما يؤثر على مكوناتها الحيوية وغير الحيوية، ويؤدي إلى اختلال توازنها (Head et al., 2006)، وتعد هذه المركبات من أكثر الملوثات إثارة للقلق بسبب سميتها العالية فهي خليط متنوع من المركبات الهيدروكربونية (كالعطرية والأليفاتية.....) التي تؤثر على كافة أشكال الحياة في التربة والمياه والهواء وتؤدي إلى تدهورها مما يترتب عليه أضرار بيئية واقتصادية وغذائية

(Varjani et al., 2017; Zengo et al., 2007). استحوذت مشكلة التلوث النفطي على اهتمام الباحثين ودفعتهم للقيام بدراسات وأبحاث عديدة للوصول إلى استراتيجيات مستدامة لإعادة تأهيل المناطق الملوثة، بهدف التخلص من المركبات الهيدروكربونية، وخفض مؤشرات التلوث بالاعتماد على طرائق معالجة مختلفة، كالطرائق الفيزيائية والكيميائية والحيوية. لم تعطي معظم المعالجات المستخدمة النتائج المرجوة، فبعض المعالجات كانت فعالة في إزالة التلوث ولكنها مكلفة. بينت الأبحاث التطبيقية أن الطرائق الحيوية في معالجة الملوثات النفطية هي الأفضل لأنها منخفضة التكلفة الاقتصادية، وتطبيقها لا يحتاج إلى الكثير من التجهيزات وهي صديقة للبيئة تحقق الاستدامة (Al-Dhabi et al., 2020; Esmail et al., 2020; Trindade et al., 2005). تعتمد الطرائق الحيوية على عزل وانتخاب كائنات حية دقيقة قادرة على تحطيم المركبات الهيدروكربونية وتحويلها من مواد ملوثة للبيئة إلى مواد غير ضارة أو قليلة الضرر (Nzila et al., 2018).

يعتمد تطبيق المعالجة الحيوية على الفهم العميق للعوامل التي تؤثر على متطلبات الأحياء الدقيقة خلال فترة المعالجة، بالإضافة إلى أهمية تحديد نوع الكائن الحي المناسب، وتعد الجراثيم من أفضل الكائنات الحية في تفكيك الهيدروكربونات النفطية بالمقارنة مع الأنواع أخرى من الكائنات الحية كالفطريات والطحالب (Mukherjee et al., 2008; Al-Hawash et al., 2018)، حيث تتميز الأوساط الملوثة بالمركبات الهيدروكربونية بغناها بالكربون والذي يعد أحد أهم مصادر الطاقة بالنسبة لعدد من الأنواع الجرثومية (Zhang et al., 2010)، ومن هنا يتم الانطلاق بضرورة اختيار الكائن الحي الدقيق الذي سيتم استخدامه بالمعالجة الحيوية، لتحديد مدى تكيفه مع الوسط المراد معالجته لتكون المعالجة فعالة، لدراسة الكائنات الحية الدقيقة بشكل ناجح، من الضروري تطوير المفاتيح المبسطة المستخدمة في التعرف عليها، وتنفيذ طرائق عزل بسيطة وفعالة ومنخفضة التكلفة (Yuliwati et al., 2016; AL Hashemi et al., 2015).

وتأتي هذه الدراسة كمساهمة في مجال التعامل مع هذه الملوثات البيئية بهدف تخفيف عبء التلوث البيئي الناتج عنها، وذلك من خلال عملية الاستقصاء والبحث عن كائنات حية دقيقة قادرة على تحمل عبء التلوث البيئي للمخلفات النفطية، واستخدامها في معالجة الملوثات البيئية بشكل فعال ويكلف اقتصادياً منخفضة.

أهمية البحث وأهدافه:

تكمن أهمية هذه الدراسة في كونها حلقة مهمة في مجال المعالجة الحيوية للمياه النفطية بأقل تكاليف ممكنة، وذلك باستخدام كائنات حية دقيقة محلية معزولة من مياه ملوثة بالمخلفات النفطية قادرة على خفض مؤشرات التلوث المرتفعة بالمركبات الهيدروكربونية.

يهدف البحث إلى ما يلي

- دراسة بعض الصفات الشكلية والخصائص الحيوية الكيميائية لـ *B.cereus* و *K. pneumoniae*
- دراسة فعالية العزلتين الجرثوميتين المعزولتين محلياً *B.cereus* و *K. pneumoniae* في تفكيك المركبات الهيدروكربونية لزيت محرك 10/40 كممثل عن مركبات النفطية.
- تقدير معدل النمو الجرثومي واختبار العزلة الجرثومية الاسرع في التفكيك الحيوي لزيت المحرك.

طرائق البحث ومواده:

- مرحلة العزل والتوصيف الجرثومي

استخدمت في هذه الدراسة العزلتان الجرثوميتان *B. cerues* و *K. pneumoniae* والتي تم الحصول عليهما من عينات مياه ملوثة بالمركبات النفطية جمعت من حوض المعالجة البيولوجية للشركة العامة لمصفاة بانياس، وذلك بعد القيام بعمليات العزل والتفريق على الأوساط الزرعوية والأوساط الزرعوية المعدلة المبينة في الجدول [1]، حيث تم توصيف العزلتين الجرثوميتين من خلال دراسة الصفات العامة على الأوساط الزرعوية (شكل المستعمرة، لونها وملمسها)، والصفات الشكلية (شكل الخلايا، أبعادها، صبغة غرام، الحركة)، والصفات الحيوية الكيميائية (الأوكسيداز، الكاتالاز، اليوريا، اختبار الأندول، تخمر السكر، اختبار السترات....) المحددة للأجناس والأنواع وفق الطرائق المعتمدة مرجعياً (Cappuccino.,1999; Holt.,1994)

الجدول (1): الأوساط المستخدمة في عزل الجراثيم وتحديدها وانتقائها

طريقة التحضير	الأوساط المستخدمة
حُضِر بإذابة 13g (13) في 1L (1) ماء مقطر وعقم بالاتوغلاف بدرجة حرارة 121C° لمدة 20 دقيقة.	وسط المرق المغذي (NB) (Nutrient Broth)
حُضِر بإذابة 28g (28) في 1L (1) ماء مقطر وعقم بالاتوغلاف بدرجة حرارة 121C° لمدة 20 دقيقة.	الوسط المغذي الصلب (NA) (Nutrient Agar)
حُضِر بإذابة 1.0g K ₂ HPO ₄ ، 1.0g KH ₂ PO ₄ ، 1.0g NH ₄ NO ₃ ، 0.2g (0.2) MgSO ₄ ، 0.02g CaCl ₂ ، 0.05g FeCl ₃ في 1L (1) ماء مقطر، وعدلت الـ pH إلى (7-7.2) بإضافة (NaOH, HCl)، وعقم بالاتوغلاف بدرجة حرارة 121C° لمدة 20 دقيقة وأضيف له زيت محرك 10/40 بتركيز 126mg/L كمصدر للكربون	وسط (Bushnell Hass Broth) (BH-CO)

2- مرحلة المعالجة الحيوية للملوثات النفطية

1-2 تحضير اللقاح الجرثومي

حضرت بادئة جرثومية نقية لكل من العزلتين الجرثوميتين *B. cerues* و *K. pneumoniae*، حيث نقلت الجراثيم النامية على الوسط المغذي الصلب (NA) بمقدار عقدة ابرة زرع إلى أنابيب تحتوي الوسط المغذي السائل (NB)، ثم وضعت في الحاضنة عند درجة حرارة (35C°) ولمدة (48) ساعة، بعد ذلك نقلت الأنابيب الحاوية على العزلات الجرثومية بالمتقلة (4000)rpm لمدة (10) دقائق، وتم التخلص من السائل الطافي وغسلت بمحلول ملحي (NaCl) تركيز (0.9%) ثلاث مرات لتخلص من كامل المواد العضوية (Tahseen et al.,2016; Rahman et al.,2002).

2-2 اختبار فعالية العزلات الجرثومية في تفكيك المركبات الهيدروكربونية في زيت المحرك

تمت المعالجة الحيوية بإضافة البادئة الجرثومية النقية المحضرة بالطريقة السابقة إلى أنابيب زجاجية تحتوي (20)ml من وسط (BH-CO) وبمعدل ثلاث مكررات (Bushnell et al.,1941) ، حيث خلط الوسط باستخدام المحرك المغناطيسي مدة ثلاث ساعات للحصول على أفضل حالة استحلاب، ثم حضنت في حمام مائي هزاز بدرجة الحرارة (35°C) وبمعدل (150) هزة في الدقيقة لمدة (20) يوم، أخذت القياسات في الأيام (2-4-6-8-10-12-15-20) على التوالي لحساب فعالية المعالجة الحيوية للعزلتين الجرثوميتين *B. cerues* و *K. pneumoniae* من خلال قياس التركيز الكلي للمركبات الهيدروكربونية خلال زمن المعالجة، وذلك بالاعتماد على إجراء مسح طيفي باستخدام جهاز السبيكتروفوتومتر ضمن المجال (700 - 190)nm، وقيس النمو بشكل متزامن خلال فترة المعالجة بطريقة قياس الطيف الضوئي لحساب الكتلة الحية للجراثيم OD₆₀₀ باستخدام جهاز السبيكتروفوتومتر UV عند طول موجة (600)nm (Rina et al.,2021; Myers et al.,2013).

2-3 اختبار فعالية العزلتين الجرثوميتين في تفكيك المركبات الهيدروكربونية باستخدام الـ DCPIP

تعتمد الطريقة على التغير اللوني لـ DCPIP بسبب عمليات الأكسدة والارجاع التي تؤدي إلى تحرر الإلكترونات نتيجة أكسدة المركبات الهيدروكربونية بفعل تفاعلات الهدم التي يقوم بها الكائن الحي فيقوم مركب الـ DCPIP باستقباله، مما يؤدي لإرجاعه وتغير اللون من الأزرق الغامق إلى الأزرق الباهت أو عديم اللون.

طريقة العمل

تم إضافة (100)µl من البادئة الجرثومية النقية لكل من *B.cerues* و *K. pneumoniae* و (400)µl من الـ DCPIP بتركيز (0.5)g/l إلى أنابيب زجاجية حاوية على وسط من (BH-CO) وبمعدل ثلاث مكررات، ثم حضنت في حمام مائي هزاز بدرجة الحرارة (28°C) و (150) هزة في الدقيقة لمدة (7) يوم وتم القياس بشكل يومي، حيث ثقلت العينات للتخلص من المعلق الجرثومي، ثم قيست الامتصاصية بواسطة جهاز السبيكتروفوتومتر عند طول موجة (600)nm وقُدرت كفاءة العزلة الجرثومية الأسرع في عملية المعالجة من خلال حساب معدل ارجاع الـ DCPIP بتطبيق العلاقة :

(Wenhui et al.,2022; Habib et al.,2017; Obi et al.,2016).

$$D = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100$$

D: نسبة ارجاع مركب الـ DCPIP ، A₀: امتصاصية الشاهد، A_i: امتصاصية العينة

النتائج والمناقشة:

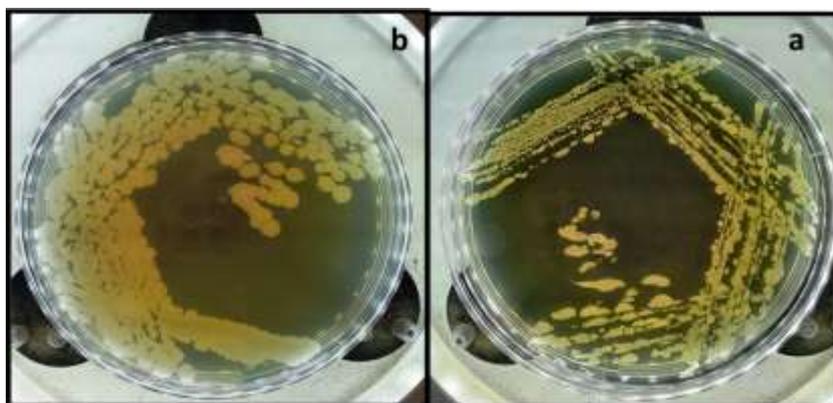
بعد دراسة كل من الصفات المزرعية والشكلية للجراثيم المعزولة من المياه الملوثة بالمركبات النفطية، تم تصنيف عزلتين جرثوميتين عزلة عائدة للجنس *Bacillus cereus* وعزلة عائدة للجنس *Klebsiella pneumoniae* كالآتي (Whitman et al.,1984)

الصفات الشكلية والبيوكيميائية *Bacillus cereus*

بدأت المستعمرات الجرثومية المستتبّة على وسط النترتيت أغار لـ *B. cereus* بلون أبيض إلى كريمي، ملساء، متوسطة الرطوبة، عصيات موجبة الغرام تكون بشكل ثنائي أو سلاسل، تعطي النتائج الايجابية تجاه الاختبارات (السترات، اليورياز، الغلوكوز.....) الجدول (2)

الصفات الشكلية والبيوكيميائية *Klebsiella pneumoniae*

بدأت المستعمرات الجرثومية المستتبنة على وسط النترتيت أغار لـ *K. pneumoniae* مخاطية بلون أبيض إلى كريمي، ملساء، عسورات سالبة الغرام تكون بشكل ثنائي أو سلاسل، تعطي النتائج الايجابية تجاه الاختبارات الأتية (السترات، اليورياز، الغلوكوز.....) الجدول (2)



الشكل (1) المستعمرات الجرثومية النامية على علة الوسط الزرع NA حيث (a) *K. pneumoniae* و (b) *B. cereus*

الجدول (2) الاختبارات الكيميائية الحيوية للعزلتين *K. pneumoniae* و *B. cerues*

نتائج الاختبارات		الاختبار
<i>K.pneumoniae</i>	<i>B. cerues</i>	
عسورات	عصيات	الشكل المجهري
-(ve)	+(ve)	صبغة غرام
-(ve)	-(ve)	المالتاز
+(ve)	+(ve)	السترات
-(ve)	-(ve)	الأوكسيداز
+(ve)	+(ve)	اليورياز
-(ve)	-(ve)	الحركية
-(ve)	-(ve)	اللاكتوز
-(ve)	-(ve)	اندول
-(ve)	-(ve)	أحمر الميتيل
+(ve)	+(ve)	الغلوكوز
-(ve)	+(ve)	الأرجنين

(ve) - الاختبار سلبي

(ve) + الاختبار ايجابي

التفكك الحيوي لزيت المحرك

أبدت العزلتان الجرثوميتان *B.cerues* و *K. pneumoniae* كفاءة مختلفة في تفكك المركبات الهيدروكربونية في زيت المحرك كمثل عن مركب نفطي، كما هو موضح في الجدول (3) والشكل (3)، حيث أظهرت العزلة الجرثومية *K. pneumoniae* كفاءة معالجة تزيد 18% عن العزلة الجرثومية *B. cerues*، وازدادت فعالية العزلتان الجرثوميتان في تخفيض نسبة الزيت مع زيادة فترة الحضان، هذا وقد وصلت فعالية التفكك الحيوي للعزلة الجرثومية

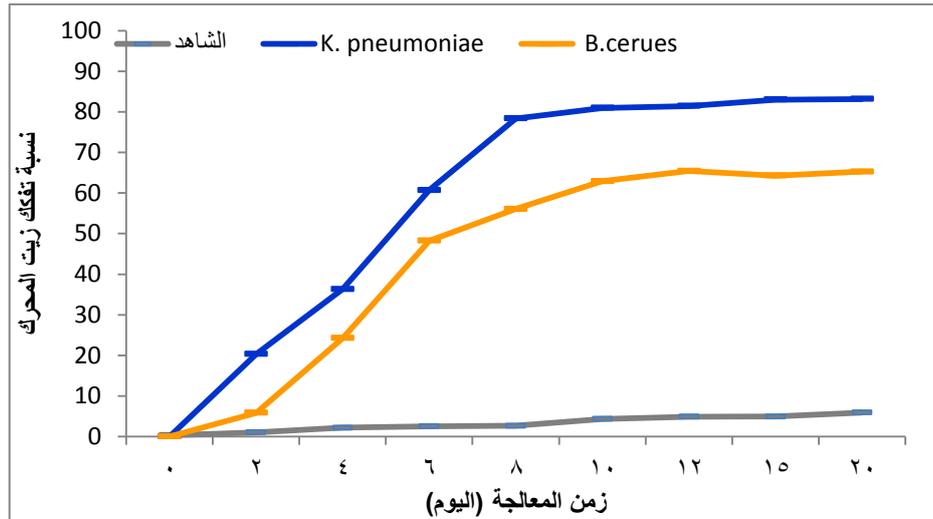
K. pneumoniae في اليوم العاشر من المعالجة لـ 80% واستمرت بزيادة بسيطة إلى انتهاء فترة المعالجة الحيوية في اليوم 20، حيث بلغت نسبة التفكك 83.17%، بينما كانت الفعالية الأكبر للعزلة الجرثومية *B. cerues* في اليوم 12 وصلت لـ 65.42% مع شبه ثبات لهذه النسبة حتى نهاية المعالجة، يلاحظ مما سبق تقدم عملية المعالجة مع الزمن، حيث زادت كفاءة المعالجة الحيوية بازدياد فترة الحضان. أظهرت النتائج تفوق كفاءة العزلة الجرثومية *K. pneumoniae* على العزلة *B. cerues* في تخفيض المركبات الهيدروكربونية، ويعزى ذلك لسلك وأداء الكائن الحي، حيث تتأثر كفاءة التفكك الحيوي للمركبات الهيدروكربونية بمسار الاستقلاب الحيوي الخاص لكل كائن، فقد بينت الدراسات أن العزلة الجرثومية *K. pneumoniae* المستخدمة في هذه الدراسة تفرز مواد استقلابية من طبيعة ليبيدية سكرية تزيد من معدل استقلاب الزيت، مما أدى إلى الالتصاق بين سطح الخلايا الجرثومية والمركبات الهيدروكربونية، كما أدت هذه المواد إلى تخفيض التوتر السطحي للخلايا الجرثومية، وزيادة الذوبانية للزيت الأمر الذي جعلها فعالة في المعالجة باعتبارها صلة وصل بين شروط البيئة وانسجام الكائن الحي الدقيق بصورة أسرع من *B. cerues* (Kumar et al.,2006; Zhao et al.,2007).

الجدول (2) متوسطات نسب إزالة زيت المحرك وتركيزه بعد المعالجة الحيوية بالبائنة الجرثومية لكل من العزلتين *B. cerues* و *K. pneumoniae*

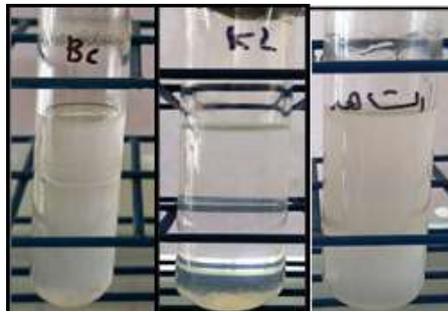
كفاءة المعالجة الحيوية لتحلل زيت المحرك						زمن المعالجة (اليوم)
<i>K. pneumoniae</i>		<i>B. cerues</i>		الشاهد		
نسبة التخفيض %	تركيز الزيت mg/L	نسبة التخفيض %	تركيز الزيت mg/L	نسبة التخفيض %	تركيز الزيت mg/L	
20.315	100.402	5.835	118.647	1.05	124.67	2
36.323	80.232	24.256	95.317	2.19	123.24	4
58.401	52.664	48.252	65.202	2.53	122.81	6
78.376	27.155	56.093	55.322	2.64	122.67	8
80.994	23.946	61.941	47.953	4.32	120.51	10
81.443	23.226	65.429	43.559	4.9	119.82	12
82.016	21.398	64.312	44.965	4.93	119.78	15
83.170	21.205	65.291	43.732	5.9	118.56	20

بالمقارنة بين نتائج هذه الدراسة ودراسات أخرى استخدمت المصدر الكربوني ذاته (زيت المحرك) كانت النتائج متفاوتة ففي دراسة (Veerapagu et al.,2019) وصلت نسبة تخفيض المركبات الهيدروكربونية لزيت المحرك لـ 69% - 58% عند استخدام العزلتين الجرثوميتين *pseudomonas sp.* و *Bacillus subtilis* على التوالي خلال فترة معالجة استمرت 30 يوم ونسبة زيت محرك 1% (v/v)، وتعد كفاءة جيدة على عكس دراسة (Borah et al.,2014)، حيث كانت فعالية المعالجة منخفضة، فقد بلغت 16% بعد فترة معالجة امتدت 28 يوم وبتكريز زيت محرك بلغ 2%، عند استخدام العزلة الجرثومية *B. cerues* وهي أقل من النتيجة التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة رغم استخدام النوع ذاته من الجراثيم، وذلك بسبب اختلاف تركيز الزيت كما توضح الدراسة تأثر المعالجة بنوع المركب الهيدروكربوني وتركيبه الكيميائي ووزنه الجزيئي، وهذا يظهر بشكل واضح في فقد تفوقت العزلة الجرثومية *B. cerues* في المعالجة الحيوية لأنواع أخرى من المركبات الهيدروكربونية بنسب تفكيك جيدة لمركب الديزل بلغت 71% ولمركب الكيروسين 83%.

بينما كانت كفاءة العزلة الجرثومية *K. pneumoniae* متقاربة إلى حد ما مع نتائج دراسة (Ozyurek et al.,2018)، حيث وصل معدل التحلل الحيوي لزيت المحرك في اليوم السابع عند درجة حرارة 30C لـ 68.71%.



الشكل (2): النسبة المئوية لتفكك زيت المحرك بفعل العزلتين الجرثوميتين *B.cerues* و *K. pneumoniae*

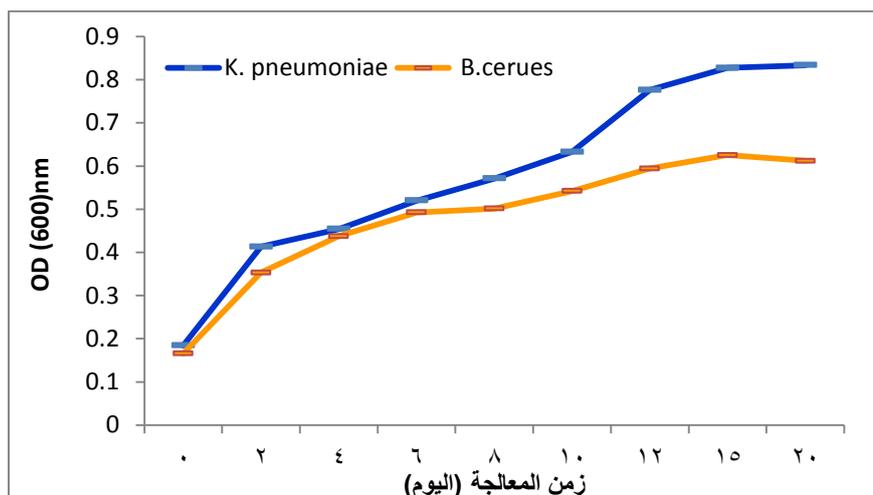


الشكل (3): وسط (BH-CO) بعد المعالجة الحيوية للعزلتين الجرثوميتين *B.cerues* و *K. pneumoniae*

تقدير معدل نمو العزلتين الجرثوميتين *B.cerues* و *K. pneumoniae*

تبين عند تقدير معدل النمو للعزلتين الجرثوميتين بالاعتماد على زيت المحرك كمصدر وحيد للكربون بطريقة الكثافة الضوئية OD_{600} أن العزلة الجرثومية *K. pneumoniae* كانت قادرة على النمو بمعدل أسرع من العزلة الجرثومية *B.cerues* ، كما هو موضح في الشكل (4)، ويعود السبب إلى قوة الأنزيمات والمواد المفرزة داخل الجراثيم لـ *K. pneumoniae* بالمقارنة مع *B.cerues* في تفكيك المركبات الهيدروكربوني والاستفادة من الكربون كمصدر للطاقة والنشاطات الحيوية المختلفة، مما أدى إلى نمو الـ *K. pneumoniae* بمعدل جيد على وسط الزيت (Zhaoyang et al.,2018).

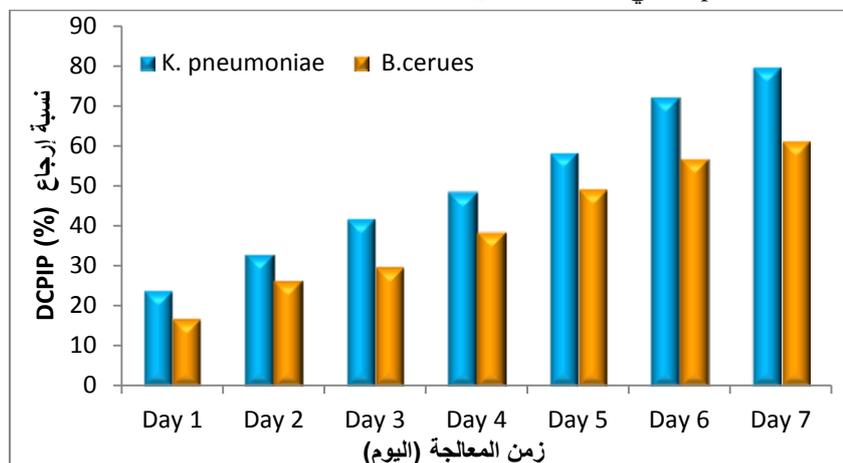
يتضح مما سبق وجود ارتباط ايجابي بين معدل النمو وسرعة التفكك، لذا فإن معدل النمو من العوامل المستخدمة في انتخاب الكائن الأفضل للمعالجة الحيوية.



الشكل (4): منحنى نمو العزلتين الجرثوميتين *B. cereus* و *K. pneumoniae* على وسط يحتوي زيت محرك خلال المعالجة الحيوية

تقدير فعالية التفكك الحيوي بطريقة الـ DCPIP

تفيد هذه الطريقة في تحديد العزلات الجرثومية الأسرع في تفكيك المركبات الهيدروكربونية بالاعتماد على التغير اللوني، يبين الشكل (5) أن كلا العزلتين الجرثوميتين *B. cereus* و *K. pneumoniae* لديها ميل مميز في تفكيك المركبات الهيدروكربونية، حيث أثبتت نتائج حساب نسب الإرجاع لمركب الـ DCPIP بعد 7 أيام من الحضن أن كلا العزلتين السابقتين مرشحة للقيام بعملية المعالجة الحيوية، وأن العزلة الجرثومية *K. pneumoniae* كانت أسرع من *B. cereus* بتفكيك زيت المحرك باعتباره المصدر الوحيد للكربون، حيث بلغت نسبة الإرجاع 79.798% بالإضافة إلى التغير الواضح للون بالمقارنة مع الشاهد كما هو واضح في الشكل (6)، مما يؤكد النتيجة التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة بتفوق الـ *K. pneumoniae* في المعالجة الحيوية.



الشكل (5): نسبة إرجاع DCPIP للعزلتين الجرثوميتين *B. cereus* و *K. pneumoniae* على وسط يحتوي زيت محرك

بالمقارنة مع دراسات مختلفة اعتمدت طريقة قياس الـ DCPIP لتقدير كفاءة الأحياء في تفكيك المركبات الهيدروكربونية، فقد تبين قدرة مجموعة من العزلات الجرثومية على إرجاع الـ DCPIP، وكانت نتائج نسبة الإرجاع للعزلة *K. pneumoniae* في هذه الدراسة أفضل من دراسة (Obi et al., 2016)، رغم توافق الشروط المطبقة في الدراستين من حيث مدة المعالجة ودرجة الحرارة وتركيز الـ DCPIP والاختلاف بنوع العزلة الجرثومية فكانت العزلة

المستخدمة في دراستهم *Pseudomonas sp.* حققت نسبة التخفيض 73%، كما بينت دراسة (Wenhui *et al.*,2022) أن نسبة إرجاع الـ DCPIP لخليط من الجراثيم مكون من 29 عزلة وصل لـ 60% خلال 5 أيام، وهي نسبة منخفضة بالمقارنة مع عدد العزلات الجرثومية الذي من المفترض أن يسهم في زيادة نسبة المواد الحيوية المفروزة والتي تساعد في تعزيز النشاط الحيوي، ويعزى السبب إلى أن تركيز الـ DCPIP المطبق في التجربة كان 1g/L. أظهرت نتائج التحليل الكيفي لدراسة (Ionescu *et.al*) وزملائه زوال اللون الأزرق لمركب الـ DCPIP بعد 20 يوم بشكل كامل بفعل العزلة الجرثومية *Pseudomonas fluoresce* (Ionescu *et al.*,2015). لوحظ مما سبق أن تقدير نسب الإرجاع لمركب الـ DCPIP نتيجة استقبله للإلكترونات المتحررة بفعل أكسدة المركبات الهيدروكربونية يعكس فعالية أنزيمات الأكسدة والارجاع التي ساهمت في ضبط مسارات تفاعلات الاستقلاب داخل الخلايا، وبالتالي النشاط الحيوي للأحياء والذي يعد عامل مساعد في الانتقاء الصحيح والدقيق للكائن الحي المستخدم في المعالجة. في هذه الدراسة كانت نسب الارجاع منسجمة مع نسب التخفيض للمركبات الهيدروكربونية ومعدل النمو، مما يؤكد فعالية العزلة الجرثومية *K. penomoniae* في المعالجة الحيوية.



الشكل (6): التغير اللوني لمركب الـ DCPIP للعزلتين الجرثوميتين *B. cereus*(IW2) و *K. pneumoniae* (SL4) على وسط يحتوي زيت محرك

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

- 1) أعطت المعالجة الحيوية للملوثات النفطية باستخدام كائنات حية دقيقة معزولة محلياً كفاءة تخفيض للمركبات الهيدروكربونية كان أفضلها للعزلة الجرثومية *K. pneumoniae* حيث بلغت (83.17%).
- 2) أعطى تقدير معدل النمو للعزلتين الجرثوميتين فكرة تقريبية عن مدى فعالية كل عزلة على استهلاك المركبات الهيدروكربونية لزيت المحرك كركيزة للنمو باعتباره مصدر وحيد للطاقة.
- 3) ساعد اختبار الـ DCPIP على انتقاء العزلة الجرثومية الأسرع في تفكيك المركبات النفطية، حيث بلغت نسبة ارجاع هذا المركب 79.80% للعزلة الجرثومية *K. pneumoniae*.

التوصيات:

- 1) متابعة العمل على توصيف عزلات جرثومية محلية من مياه وتراب ملوثة بمشتقات نفطية مختلفة تضاف إلى البنك الوراثي المرجعي ليستفاد منه في تطبيقات حقلية.
- 2) اجراء مزيد من الدراسات حول إمكانية تحسين كفاءة المعالجة الحيوية وفقاً لظروف المعالجة ونمذجة النتائج، بما يحقق الاستثمار الأمثل للكائنات الحية المحلية في تخفيض العبء البيئي.

References:

- AL-DHABI, N.A., ESMAIL, G.A., ARASU, M.V. Effective degradation of tetracycline by manganese peroxidase producing *Bacillus velezensis* strain Al-Dhabi 140 from Saudi Arabia using fibrous-bed reactor. *Chemosphere*, 2020, 128-726.
- AL-DHABI, N.A., ESMAIL, G.A., ARASU, M.V. Sustainable conversion of palm juice wastewater into extracellular polysaccharides for absorption of heavy metals from Saudi Arabian wastewater. *J. Clean. Prod.*, 2020, 124-252.
- AL-HAWASH, A.B., Li, S., ALHUJAILY, A., ZHANG, X., DRAGH, M.A., ABBOOD, H.A. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *Egypt. J. Aquat. Res.*, 2018, vol. 44, 71–76.
- AL HASHEMI, W., MARAQA, M.A., RAO, M.V., HOSSAIN, M. M. Characterization and removal of phenolic compounds from condensate-oil refinery wastewater. *Des. Water Treat.*, vol.54, 2015, 660-671.
- BORAH, D., YADAV, R.N.S. biodegradation of petroleum oil by novel *Bacillus cereus* strain drdu1 from an automobile engine. *Int. J. Environ. Res.*, vol.4, 2014, 1287-1294.
- BORAH, D., YADAV, R.N.S. biodegradation of complex hydrocarbon by a novel *Bacillus cereus* strain. *Journal of environmental science and technology*, vol.7, 2014, 176-184.
- BUSHNELL, L.D., HAAS, H.F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*, vol. 41, 1941, 653-673.
- CAPPUCCINO, J.C. *Microbiology: laboratory manual*. Fox, fifth edition, Addison Wesley Longman, USA, 1999.
- DAS, P., MUKHERJEE, S., SEN, R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chemosphere*, vol 72, 2008, 1229–1234.
- HEAD, M., JONES, D.M., ROLING, W.F. Marine microorganisms makes a meal of oil. *Nat Rev Microbiol*, vol 4, 2006, 173–182.
- HOLT, J.G. *The shorter bergeys manual of determinative bacteriology*. Eight edition, Williams and Wilkins, Baltimore, 1994.
- Habib, H., LUTFI, W., JOHARI, W., ABD SHUKOR, M.Y., YASID, A.Y. Screening of Hydrocarbon-degrading Bacterial Isolates Using the Redox Application of 2,6-DCPIP. *Bioremediation science and technology research, Malaysia*, VOL.5, 2017, 13-16.
- IONESCU, R., LUMINI, M.R., ESCU, A.M., CHICIUDEAN, L., CSUTAK, O., PELINESCU, V., VASSU, STOICA, Y. Flow Cytometry Based Method for Evaluation of Biodegradative Potential of *Pseudomonas fluorescens*. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, VOL.6, 2015, 567 – 578.
- KUMAR, M., LEON, V., MATERANO, A.S., ILZINS, O.A. Enhancement of oil degradation by co-culture of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing bacteria. *Pol. J. Microbiol.*, 2006, 55- 139.
- LU, J.R., ZHAO, X.B., YASEEN, M. Biomimetic amphiphiles: Biosurfactants. *Curr. Opin. Colloid In*, VOL12, 2007, 60–67.
- MYERS, J. A., CURTIS, B. S., CURTIS, W. R. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophys.*, 2013, 4-6.
- NZILA, A. Current status of the degradation of aliphatic and aromatic petroleum hydrocarbons by thermophilic microbes and future perspectives. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2018, 15, 2782.
- OBI, L. U., ATAGANA, H. I., ADELEKE, R. A. Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria. *SpringerPlus*, 2016.

- OZYUREK, S. B., BILKAY, S. Biodegradation of petroleum by klebsiella pneumonia isolated from drilling fluid. *Int. J. Environ. Sci. Technol., Turkey*, 2018, vol. 15, 2107-2016.
- RAHMAN, K.S.M., THAHIRA-RAHMAN, J. P., BANAT I.M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology*, vol. 85, 2002, 257-261.
- RINA, M. S., WIBOWO, M., AMBARSARI, H. Biodegradation of Diesel Oil Hydrocarbons Using *Bacillus subtilis* InaCC B289 and *Pseudomonas aeruginosa* InaCC B290 in Single and Mixed Cultures. *Science International Conference*, 2021.
- TAHSEEN, R., AFZAL, M., IQBAL, S., SHABIR, G., KHAN, Q.M., KHALID, Z.M. Rhamnolipids and nutrients boost remediation of crude oil-contaminated soil by enhancing bacterial colonization and metabolic activities. *Int Biodeterior Biodegradation*, vol 8, 2016, 115:192.
- TRINDADE, P., SOBRAL, L., RIZZO, A., LEITE, S., SORIANO, A. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: A comparison study. *Chemosphere*, vol. 58, 2005 515-522.
- VEERAPAGU, M., JEYA KR, K. R., JEYANTHI, K.A., GEETHANJ, A. S. Screening of hydrocarbon degrading bacteria isolated from oil contaminated soil. *The Pharma Innovation Journal*, vol. 6, 2019, 69-72.
- VARJANI, S. J., UPASANI, V. N. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2017. 02-6.
- WENHUI, X.U., YANLU, Q., JINXIAO, W.E., QING, J., JIANLIANG, XUE. Bacterial Communities and Culturable Petroleum Hydrocarbon Degrading Bacteria in Marine Sediments in the Northeastern South China Sea. *Front. Environ. Sci, China*, VOL10, 2022.
- WHITMAN, W.B., PARTE, A.C., *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, vol. 3, 1984.
- YULIWATI, E., ISMAIL, A.F., MATSUURA, T., KASSIM, M.A., ABDULLAH, M.S. Effect of modified pvdf hollow fiber submerged ultrafiltration membrane for refinery wastewater treatment. *Des.*, vol. 283, 2016, 214-220.
- ZENGA, Y., YANG, C., ZHANG, J. Feasibility Investigation Of Oily Wastewater Treatment By Combination Of Zinc And PAM In Coagulation/Flocculation. *J. Hazard. Mater*, vol. 147, 2007, 991-996.
- ZHANG, Z.Z., GAI, L.X., HOU, Z.W., YANG, C.Y., WANG, Z.G., SUN, B.P., TANG, H.Z., Xu, P. Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. *Bioresour. Technol*, vol. 101, 2010, 8452-8456.
- ZHAOYANG, Y., HAIYANG, X., SHUJUAN, Z., HYUNOOK, K., WENFEI, Y., LI, Z., MIAO, H. Comparison of Petroleum Hydrocarbons Degradation by *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Sci.*, vol 8, 2018.