doi.org/10.52866/esj.2020.01.15.08

Journal of Education and Scientific Studies Chemistry Science
JESCS Vol. 15, No. 1, January 2020, ISSN 2413 - 4759

إزالة الملوثات النفطية في التربة باستعمال عزلة بكتيرية نوع pseudomonas

بكر فوزي عبدالله الكبيسي* طارق عبد الجليل منديل * فؤاد حسين كامل **
*جامعة الأنبار - كلية العلوم - قسم الكيمياء
** جامعة أربيل - المعهد التقني الطبي

خلاصة :

بالنظر لخطورة الملوثات النفطية وخصوصا المركبات متعددة الحلقات والتي تكون ذات سمية عالية جدا وذات مقاومة شديدة التفكك لذلك المعقد بسبب استقراريتها العالية، أجريت هذه الدراسة لإزالة الملوثات البترولية بطريقة التفكك الحيوي باستعمال البكتريا اذ تم عزل بكتريا من نوع Pseudomonas والتي تعتبر من اكفأ الاجناس المحللة لنفط الخام الموجود في التربة وأجريت عمليات التفكك بأوقات زمنية مختلفة 5,10,15 يوما، تم متابعة نتائج التفكك الحيوي باستخدام تقنيات GC,FTIR, إذ تم تفكك المركبات الاليفاتية والاروماتية ذات السلاسل الطويلة الى مركبات ذات سلاسل قصيرة حيث أعطت عمليات التفكك نتائج جيدة وتكون هذه العملية رخيصة الثمن وقليلة التعقيد والتي بواسطتها يتم التخلص من الملوثات.

Releasing Petroleum Pollutants in Soil by Used Bacteria isolate type Pseudomonas

Baker Fawzi - Al.kubaisi* Tariq Abdul Jalil Mandeel* Fouad Hussein Kamel **
* Chemistry of Department. College of Science. University of Al - Anbar
** Erbil polytechnic University, Erbil medical institute, Iraq
Email: Bakeralkubaisi@yahoo.com

Abstract

In view of the seriousness of pollutants and oil especially polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs), which are very toxic and have high resistance to the degradation. This study was conducted for removal of, the so complex and stability petroleum contaminants using bacteria of type pseudomonas which analysis petroleum in soil. Where they were taking samples for every five days. To follow-up the results of biodegradation some techniques were employed (GC, FTIR) before and after the degradation were it was the degradation of the aliphatic and aromatic compounds with long chains convert to short chains compounds. The degradation processes gave good results, These processes was cheaper and less complexity.

Keywords: Biodegradation, crude oil, Pseudomonas, Bacteria, GC analysis.

المقدمة

يعد النفط الخام مزيج معقد يحتوي على عدد كبير من المواد الكيميائية المختلفة ويتألف من اجزاء رئيسية هي (الهيدروكربونات المشبعة، الهيدروكربونات العطرية، الراتنجات والمواد الاسفلتية)[1] . ويعرف النفط الخام كذلك بأنه سائل قابل للاشتعال يكون ذات لون بني او اسود في بعض الاحيان، وهو عبارة عن خليط من الهيدروكربونات المعقدة كما يحتوي على كميات صغيرة من الشوائب غير الهيدروكربونية والمعادن الاخرى التي تكون مختلفة الاوزان الجزيئية وغيرها من المركبات العضوية السائلة التي وجدت في التكوينات الجيولوجية تحت سطح الارض[2]. يعرف التلوث بأنه حدوث اخلال في التوازن البيئي والذي يودي الى خلل في انظمة الهواء، الماء والتربة والتي تؤثر بشكل مباشر او غير مباشر على الكائنات الحية[3] . يعتبر التلوث البيئي اخطر كارثة يواجهها الانسان، اذ تنتقل الملوثات في كل مكان فهي لا تعرف حدودا اقليمية وتساهم التيارات المائية والرياح والسحب وغيرها في نقل الملوثات من بلد الى اخر، إذ تمثل المواد الهيدروكربونية الإليفاتية والأروماتية وبشكل خاص متعدد الحلقات التي هي احدى الملوثات الموجودة في الماء واليابسة[4] . يعتمد التدهور البيئي الناتج عن الهيدروكاربونات النفطية على نوعية هذه الملوثات التي تطلق إلى البيئة. وهذه الملوثات التي تطلق إلى البيئة هي عباره عن نفط خام، أو منتجات المصافي النفطية؛ إذ يحتوي النفط الخام على عدد كبير من المواد الكيميائية المتنوعة التي تتضمّن (الغازات الذائبة، السوائل، المواد القيرية الصلبة) بينما تتكوّن نواتج النفط في المصافي عادة من مزيج من المركبات الهيدروكاربونية المعروفة، تُعد الهيدروكاربونات النفطية من أهم الملوّثات للبيئة لكونها سامة لمعظم الكائنات الحيّة الموجودة في البيئة لاسيما الهيدروكربونات الأروماتية بسبب طبيعتها الذائبة في الدهون، إنّ لهذه المركبات دوراً كبيراً في التكبير الحياتي عن طريق انتقالها في السلسلة الغذائية وتمتلك خصائص مطفّرة ومشوشة ومسرطنة[5]. تُعرّف المعالجة الحياتية أو الإزالة الحياتية بأنّها استخدام الأحياء المجهرية في إزالة المواد الكيميائية السامة بعمليات الأكسدة والاختزال، وتتضمّن العملية فك السُّمّيّة وجعل هذه المواد أقل سُمّيّة وتحويلها إلى نواتج غير سامة وهي الماء، ثاني اوكسيد الكاربون، غاز الميثان وإنتاج كتلة حيوية[6]. إذ استخدمت المعالجة الحياتية في إزالة المخلفات النفطية أو المصادر الملوثة بهذه المخلّفات منذ زمن بعيد، وتتضمّن العملية استغلال قابلية الأحياء المستوطنة أو إضافة أحياء مجهرية إلى موقع التلوّث لأكسدة المواد العضوية كلياً إلى نواتج نهائية، بالمقارنة مع الطرائق التقليدية في المعالجة التي لا تكون كفوءة في إزالة هذه الملوّثات أو اختزالها من مواقع التلوث[7]. إنّ مميزات التفكّك الحيوي جعلت من هذه المعالجة في العقود الأخيرة ترتبط ارتباطاً كبيراً مع تلوث البيئة بالهيدروكربونات النفطية بالدرجة الأولى والهيدروكربونات المصنعة بالدرجة الثانية[8]. تناولت دراسات قليلة دور الأحياء المجهرية في تفكيك المركبات النفطية المعقدةٍ ودراسة العلاقة بين الأحياء المجهرية والهيدروكربونات بالمقارنة مع كثير من الدراسات التي تناولت دور الأحياء المجهرية في تفكيك المركبات الهيدروكربونية النقية، ودراسة أنزيماتها، ودراسة الجانب الوراثي لهذه الأحياء وتطويرها. على الرغم من الدراسات الكثيرة على التفكّك الحيوي لا تزال العلاقة بين الأحياء المجهرية

والهيدروكربونات والبيئة غير معروفة بشكل كامل نظراً لاختلاف الظروف البيئية بين منطقة واخرى من جهة والتغيّر الواسع بين نوعية النفط من جهة أخرى[9].

المواد وطرائق العمل

المواد المستخدمة في البحث: نفط خام، كلوريد الصوديوم، كبريتات المغنيسيوم، كلوريد الامونيوم، كلوريد الكالسيوم، ثنائي بوتاسيوم هيدروجين فوسفات، كلوريد البوتاسيوم، كلوريد الحديدأ مستخلص الخميرة، بيبتون، اكر- اكر.

الاجهزة المستخدمة في البحث: كروماتوغرافيا الغاز، س الاشعة تحت الحمراء.

طرائق العمل

تحضير الأوساط الزراعية

الوسط الزراعي السائل

تم أخذ (2.5) غم من كلوريد الصوديوم (NaCl) ويوضع في دورق مخروطي ذات حجم (500) مل، تضاف (0.125) غم من كبريتات المغنيسيوم ($MgSO_4$)، يضاف (0.125) غم من كلوريد الأمونيوم (NH_4Cl)، يضاف (0.05) غم من كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$). بعدها يضاف (0.025) غم من ثنائي بوتاسيوم هيدروجين فوسفات (K_2HPO_4)، يضاف(0.125)غم من بوتاسيوم ثنائي هيدروجين فوسفات (KH_2PO_4)، يضاف (0.025) غم من كلوريد البوتاسيوم (KCl) ويضاف (0.0075) غم من كلوريد الحديديك المائي($FeCl_3.6H_2O$) يذاب المحلول بالماء المقطر ويكمل الحجم لـ (250) مل ماء مقطر، يقاس (PH) للمحلول والذي يكون متعادلاً، ويوضع في ثلاجة بدرجة حراره (4) درجه مئوية. يتم أخذ (1) مل من المحلول المحضر في الخطوة الأولى ونضعه في دورق مخروطي بحجم (250) مل. يضاف (1) مل من النفط الخام ثم يكمل بالماء المقطر إلى حجم (100) مل. ويوضع في الثلاجة بدرجة حرارة (4) مئوية.

الوسط الزراعي الصلب

تم أخذ (2.5) غم من مستخلص الخميرة (Yeast extract) ويوضع في دورق مخروطي بحجم (1000) مل، يضاف (5) غم من (Peptone)، يضاف (5) غم من كلوريد الصوديوم (NaCl)، ويضاف (8) غم من (Agar-Agar) ويذاب بماء مقطر بوضع المحلول على مسخن كهربائي بعدها يكمل المحلول إلى (500) مل ماء مقطر، يقاس (PH) للمحلول، ويوضع المحلول في أطباق ويحفظ في الثلاجة في درجة حرارة (4) درجة مئوية.

عزل البكتريا

تم أخذ (1) غم من التربة الملوثة بالنفط الخام وتوضع في بيكر بحجم (300) مل ويضاف لها (100) مل ماء مقطر. ويحرّك المزيج لمدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة، وتؤخذ (5) قناني من (Wight tube). تم وضع في كل واحدة (9) مل من الماء المقطّر في كل قنينة. ويؤخذ (1) مل من المحلول المحضر ويوضع في الأنبوبة الأولى وترج الأنبوبة جيداً، ويؤخذ منها (1) مل وتضاف إلى الأنبوبة الثانية، وترج الأنبوبة الثانية جيداً، ويؤخذ منها (1) مل وتضاف إلى الأنبوبة الثالثة، وترج الأنبوبة الرابعة جيداً، ويؤخذ منها(1) مل وتضاف إلى الأنبوبة الخامسة، وترج الأنبوبة الخامسة جيداً، ويؤخذ منها (1) مل ويهمل، أي يكون التخفيف بمقدار سبع مرات، ويؤخذ من الأنبوبة الخامسة (100) مايكروليتر بواسطة (Micro pipet)

وتوضع على الوسط الصلب وتمزج بواسطة (Loop) وتوضع في حاضنة لمدة ثلاثة أيام.

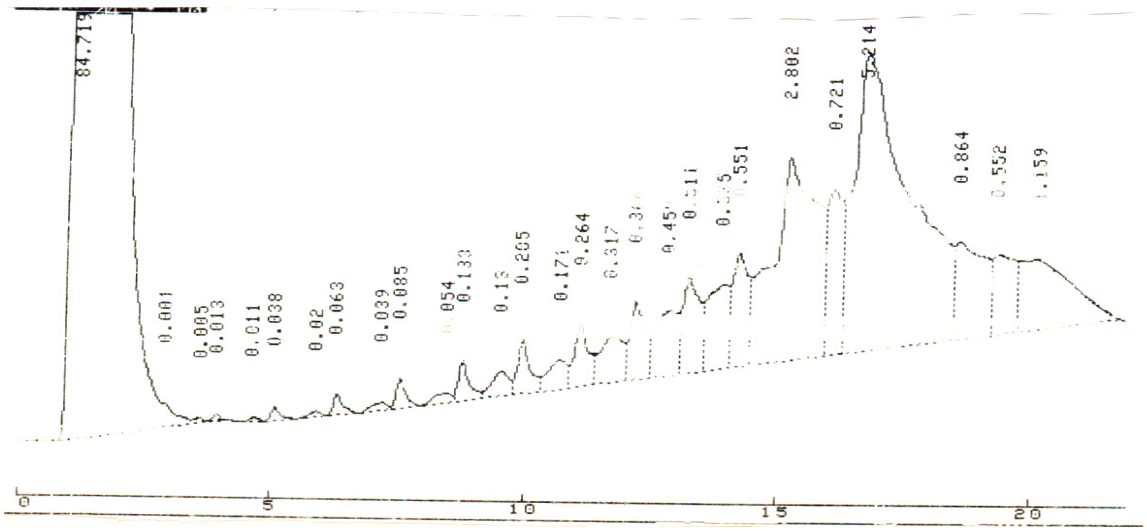
زرع البكتريا

يتم عزل بكتريا نوع (Pseudomonas) وتترك لمدة أسبوع لغرض تنميتها بعدها يتم أخذ (0.018) غم، من البكتريا وتوضع في بيكر يحتوي على (100) مل نفط خام مع التحريك المستمر كل مرة، وتؤخذ نماذج كل خمسة أيام لإجراء قياسات (FTIR ,GC) وملاحظة التفكك الذي يحصل بواسطة البكتريا[10].

النتائج والمناقشة

تحليل نتائج التفكك بواسطة كروماتوغرافيا الغاز

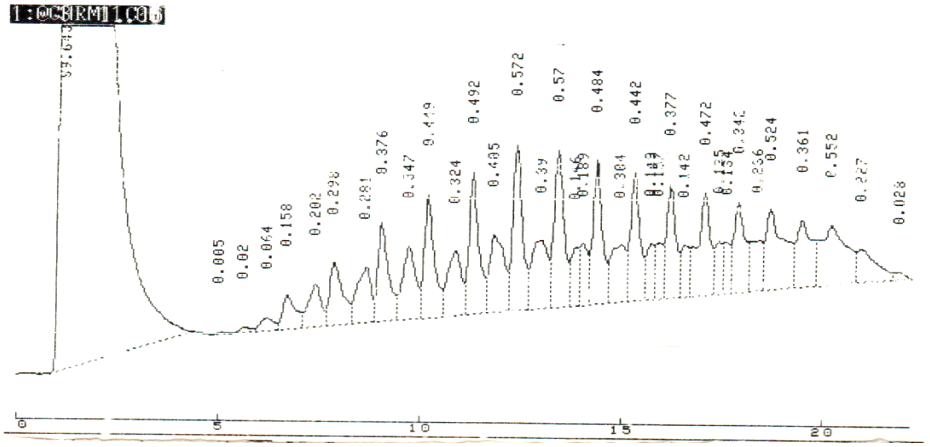
تمت متابعة تفكك المركبات الاليفاتية والاروماتية الموجودة في النفط الخام والتي اجريت عليها عمليات تفكك حيوي بواسطة عزلات بكتيرية نوع pseudomonas التي تكون قادرة على تحلل المركبات السامة الموجودة في النفط الخام وتمت متابعة النسبة المئوية للمركبات قبل وبعد التفكك بأخذ اربعة ازمان احتجاز ومتابعة التفكك الحاصل للمركبات وفق هذه الازمان.



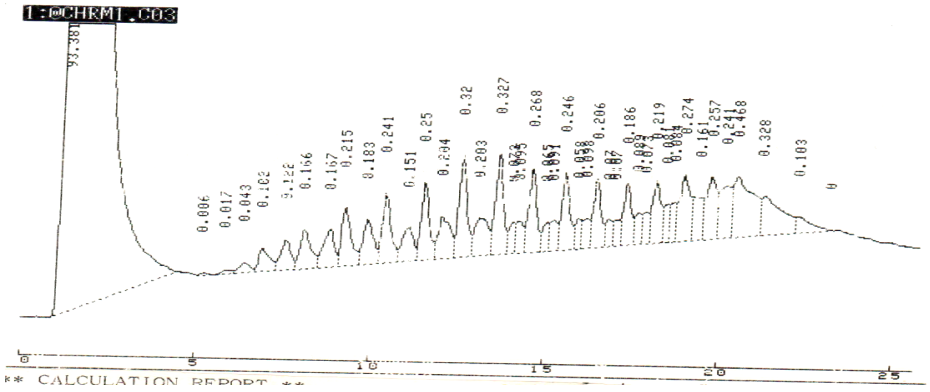
شكل (1-1) كروماتوغرافيا الغاز للمركبات الموجودة في النفط الخام قبل التفكك

جدول (1-1) أزمان الاحتجاز والنسب المئوية
للمركبات الموجودة في النفط الخام قبل وبعد التفكك الحيوي باستعمال البكتريا

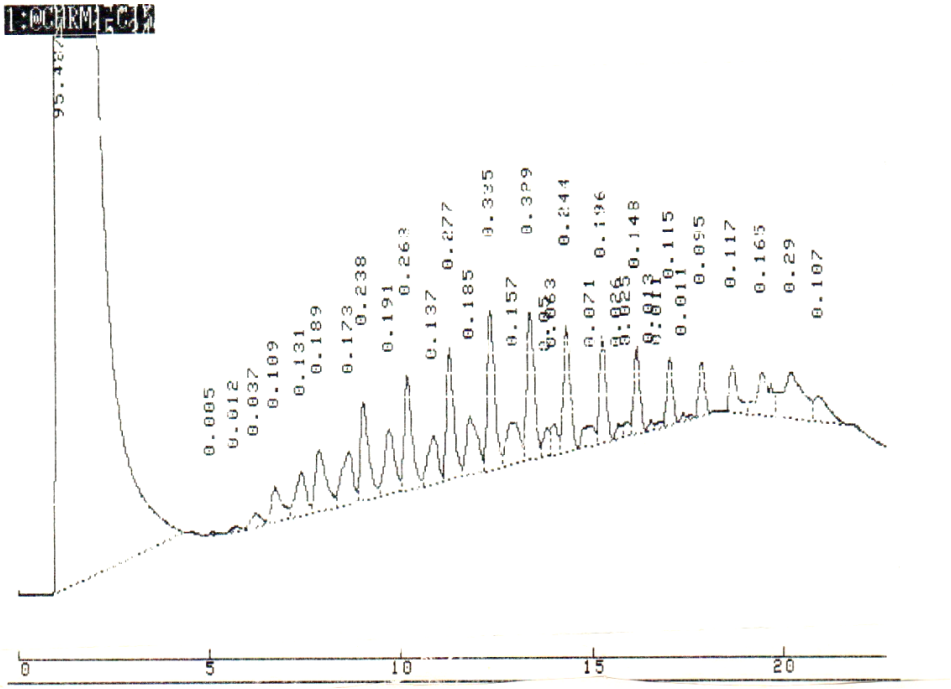
ت.	المركبات	زمن الاحتجاز	النسبة المئوية قبل التفكك	النسبة المئوية بعد التفكك بفترات زمنية مختلفة		
				أيام5	أيام 10	يوم 15
1	A	1.156	84.7187	89.6481	93.3808	95.4874
2	B	15.186	2.8017	0.4417	0.0911	0.0259
3	C	16.718	5.214	0.1422	0.0699	0.0107
4	D	20.158	1.1589	0.5524	0.2465	0.1074



شكل (1-2)
كروموتوغرافيا الغاز للمركبات الموجودة في النفط الخام بعد التفكك الحيوي بعد مرور (5) أيام باستعمال البكتريا



شكل (1-3)
كروموتوغرافيا الغاز للمركبات الموجودة في النفط الخام بعد التفكك الحيوي بعد مرور (10) أيام باستعمال البكتريا

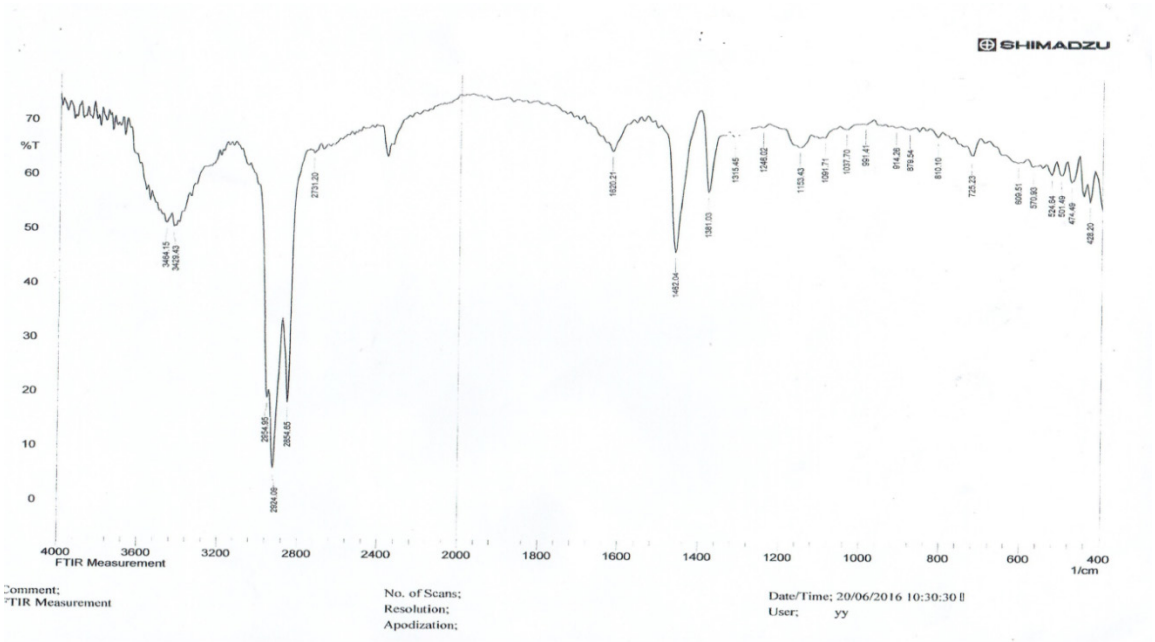


شكل (1-4)
كروموتوغرافيا الغاز للمركبات الموجودة في النفط الخام بعد التفكك الحيوي بعد مرور(15) يوماً باستعمال البكتريا .

عند استعمال عزلة من البكتريا نوع (Pseudomonas) في تفكك المركبات الموجودة في النفط الخام حيث بعد مرور خمسة ايام ازدادت النسبة المئوية للمركب (A) فأصبحت (89) اما المركب (B) فقلت النسبة المئوية الى (0.44) وهذا يدل على تفكك المركبات الثقيلة وتحولها الى مركبات خفيفة سريعة التطاير. وبعد مرور عشرة ايام من التفكك ارتفعت النسبة المئوية للمركب (A) بمقدار (4) كذلك قلت النسبة المئوية للمركب (B) إذ وصلت الى (0.09) وبعد مرور خمسة عشر يوما يزداد تفكك المركبات الموجودة في النفط الخام والذي يوضح في جدول (1-1) فضلا عن الاشكال (1-1)، (1-2)، (1-3)، (1-4) [11].

تحليل نتائج التفكك بواسطة الاشعة تحت الحمراء

شُخصت أطياف (FTIR) لغرض التعرف إلى المجاميع الفعالة الموجودة في مكونات النفط الخام قبل وبعد عمليات التفكك الحيوي والتي اجريت بمدد زمنية مختلفة، إذ أُعيدت القياسات عدة مرات للحصول على أفضل نسب مئوية لعمليات التفكك للمركبات الهيدروكربونية السامة لنفط الخام في درجة حرارة (303 k).



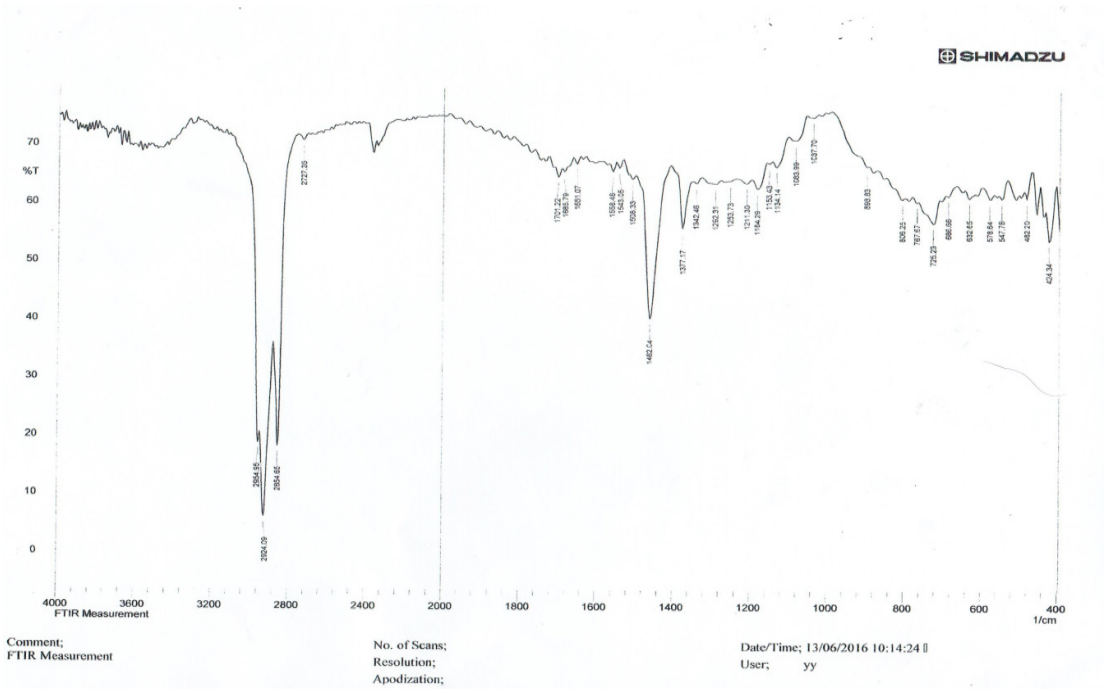
شكل (1-5) طيف (FTIR) للمركبات الموجودة في النفط الخام قبل التفكك

جدول (2-1)

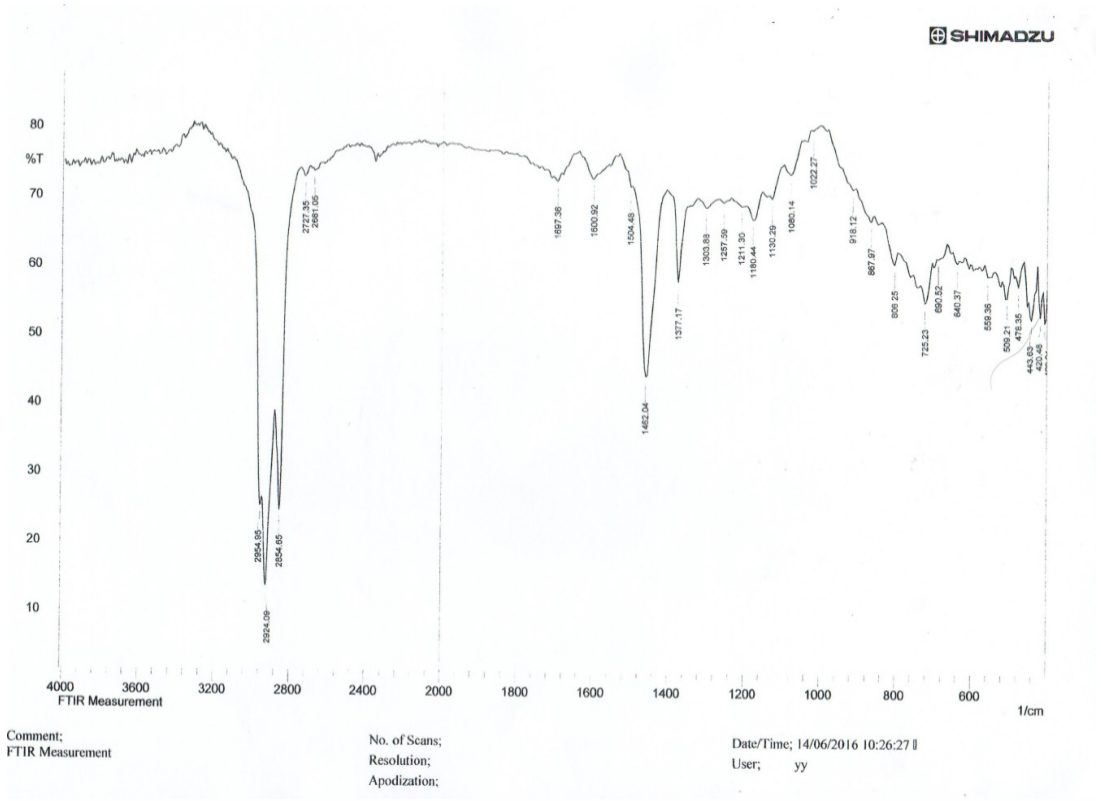
قيم مواقع حزم الامتصاص لطيف الاشعة تحت الحمراء لنفط الخام قبل وبعد التفكك الحيوي (بكتريا)

No.	Group	Before Bio-degradation	After Biodegradation		
			5 days	10days	15days
1	$C\text{-}H_{st}$	2854-2924	2854-2924	2854-2924	2854-2924
2	$C\equiv N_{st}$	2731	2727	2681-2727	2665-2727
3	C=O	------	1701	1697	------
4	$C=C_{ro}$	1620	1651	1600	1620
5	$C\text{-}H_{be}$	1462	1462	1462	1462
6	$C\text{-}O_{st}$	1153	1153	1130	1153
7	$=C\text{-}H_{oop}$	1037	1037	1022	1053
		810	806	806	810
		725	725	725	725
8	NH_2	-----	-----	------	3417

St=stretching, ro=rock , be=bending, oop=out of plane

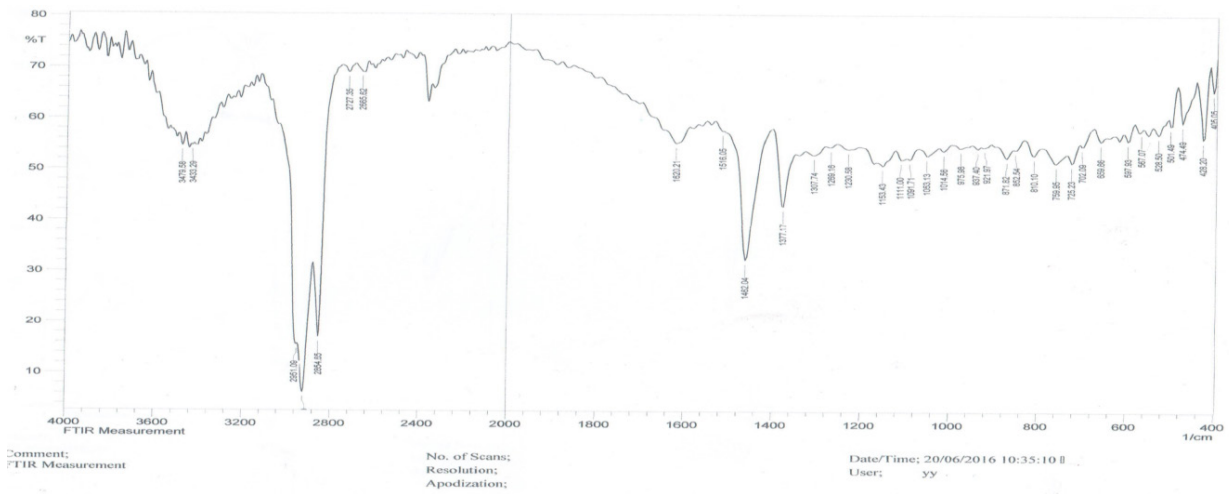


شكل (1-6) طيف (FTIR) للمركبات الموجودة في النفط الخام بعد التفكك الحيوي (5) أيام بوجود البكتريا



شكل (1-7)

طيف (FTIR) للمركبات الموجودة في النفط الخام بعد التفكك الحيوي (10) أيام بوجود البكتريا



شكل (1-8)

طيف (FTIR) للمركبات الموجودة في النفط الخام بعد التفكك الحيوي (15) يوم بوجود البكتريا

في عملية التفكك الحيوي عند استعمال عزلة من البكتريا (Pseudomonas) فقد تمت قياسات هذه العملية بأزمان مختلفة (15,10,5) يوم وتبين الحزم الواقعة في الجدول (1-2) فضلا عن الاشكال (1-5)، (1-6) الى (1-8) إذ إن الحزم الواقعة بالقرب من(2854-2924 cm^{-1}) تدل على وجود امتصاص عائد إلى الآصرة (C-H) لمجموعة المثيل (Stretching) للمركبات المحتوية على الجزء المشبع تظهر متشابهة قبل وبعد التفكك، وهناك حزمة موجودة في (cm^{-1} 2731) تعود إلى مط الآصرة (C≡N) والتي تتغير شدة الحزمة بعد مرور(5) أيام من التفكك اذ تظهر(cm^{-1} 2727)، ولكن بعد مرور(15,10) أيام تبقى ثابتة. وقد تم ظهور حزمة عند (cm^{-1} 1620) تدل على امتصاص(Rocking) للاهتزازات (C=C) في مستوى الحلقة الأروماتية، والتي تقل شدة الحزمة بعد مرور (5) أيام فتكون (cm^{-1} 1558) ولكن تزداد شدة الحزمة بعد مرور (10) فتظهر(cm^{-1} 1600) وبعد مرور (15) يوما تزداد الشدة ايضا (cm^{-1} 1620). وأما الحزمة (cm^{-1} 1462) فممكن أن تعود إلى الآصرة(C-H) الانحنائية التي تبقى شدتها ثابتة ولكن تزداد حدة الحزمة بعد التفكك. نلاحظ ان الفرق في قيم الحزم قبل وبعد المعالجة تكون قليلة[12].

الاستنتاجات

بينت هذه الدراسة في عملية التفكك الحيوي أن عزلة Pseudomonas التي تُعَد من أكفأ اجناس البكتريا المحللة لنفط الخام قادرة على تفكك المركبات العالية الاروماتية والاليفاتية طويلة السلسلة الى مركبات ذات سلاسل قصيرة وبالتالي تقلل التلوث الموجود في التربة.

التوصيات:

استعمال الخمائر والفطريات المحللة للنفط الخام وذلك لان عملية الحصول عليها سهلة ومتوفرة.

المصادر

1. Hasan Uzzaman, M., Ueno, A.; Ito, H.; Ito, Y., Yamamoto, Y.;Yumoto, I And Okuyama,H., Degradation Of Long-Chain N-Alkanes (C36 And C40) By Pseudomonas Aeruginosa Strain Watg. Int. Biodeterior. Biodegrad. 59, 40 - 43. (2007).
2. Davis, J.B. Petroleum Microbiology. Elsvier Publishing Company,London. (1967).
3. Fransiscus, F. And Berkers, A., "Influence Of Chemical Composition On The Performance Of Bitumen", M.Sc. Thesis, Department Of Civil Engineering Tswane University Of Technology, Pag.11, April (2005).
4. Dunn, K., Chilingarian, G. V. And Yen, T. F. " Bitumens: Liquid Chromatography " University Of Southern California, Los Angeles, CA, USA, Pag. 2180 - 2182. (2000).
5. Kanaly, B.A. And Harayama, S. Biodegradation Of High - Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons By Bacteria. Journal Of Bact. 182 (8): 2059 - 2067. (2000).

6. Rockne, K.J. And Reddy, K.R. "Bioremediation Of Contaminated Sites. Indian Institute Of Technology" Madras. PP: 1 - 22. (2003).
7. Field, S.D. "Advanced Biological Treatment And Separation Of Hazardous Constituents From Petrochemical Sludge". J Of Hazardous Mat. 28: 101 - 113 (1991).
8. Jain, R. K.; Kapur, M.; Labana, S.; Lal, B.; Sarma, P. M.; Bhattacharya, D. And Thakur, I.S. "Microbial Diversity: Application Of Microorganisms For The Biodegradation Of Xenobiotics". Current Science 89(1): 101 - 112. (2005).
9. Desai, J.D. And Banat, I.M. "Microbial Production Of Biosurfactants And Their Commercial Potential". Microbial. Mol. Biol. Rev. 61: 47 - 67. (1997).
10. Yan, S.; Wang, Q.; Qu, L. And Li, C." Characterization Of Oil -Degrading Bacteria From Oil-Contaminated Soil And Activity Of Their Enzymes" Biotechnology & Biotechnological Equipment , Vol. 27,P: 3932 - 3938, (2013).
11. Al-Saeedi, S.S., Mandeel, T.A.J., And Al-Ani, B.M. "Bio Degradation Of Gasoil By Fungal Isolates From Petroleum Contaminated Soils" Journal Of Environment And Erth Science, Vol.4, No.8,(2014).
12. Robert M. , Francis X., And David J., "Spectrometric Identification Of Organic Compounds" 7th Ed., John Wiley And Sons, Inc., New York, Pp. 95- 101., (2005).