The Effects of Certain Nutritional Additives on the Activity of *Sporosarcina ureae* in Biodegrading Oil in the Arabian Gulf Water

Sohair M. El-Tayeb and Kauther F. Abed
Botany Department, Girls College of Education, Scientific Section. Riydah, Saudi Arabia.

ABSTRACT. The effects of incrementally adding one or more of the nutritional materials on the biodegrading activity of the Sporosarcina ureae were investigated. The materials used and their rates were: Peptone (0.7%), Yeast (0.7%), Ureae (0.14%), Casein (0.7%), Fat-Free Milk Powder (0.7%), Fish Extract (0.7%), Acidic Potassium Phosphate (0.14%), Sea Algal Extract (1.0%) and Sea Algal Powder (1.0%). Among these, Peptone was the most efficient; it increased the bacterial biodegrading activity of the oil Polluted Gulf water to 92.0%.

It was also revealed that, in comparison with the control treatment, the addition of a mixture of algal powder, phosphate, fish Extract and fat-free milk powder to the Gulf water-containing oil, caused atremintdous increased in oil biodegradation. Oil biodegradation in presence of the bacteria reached 88.5%, and in the absence of the bacteria reached 80.4%.

المـــــراجع

Antai, S.P. and Mgbomo, E. (1989) Distribution of hydrocarbon-utilizing bacteriain oil spill areas. Microbios Letfers **40**: 137-143.

Atlas, R. M. (1981) Microbiol degradation of petroleum hydrocarbons. An environmental perspective. Microbiol. Rev. **45**: 180-209.

Atlas, R. M. and Bartha, R. (1972) Degradation and mineralization of petroleum in sea water : limitation by nitrogen and phosphorus.Biotechnol. Bioeng. **14**: 309-317.

Basson, P. W., Burchard, J. J. Hardy, J. T. and Price, A. R. (1977) Biotopes of the Western Arabian Gulf. Aramco Department of Loss Prevention and Environmental Affairs, Dhahran, Saudi Arabia, 272 p.

Cooney, J. J. (1984) The fate of petroleum pollutants in fresh water ecosystems. *In*: **R. M. Atlas (ed.),** *Petroleum microbiology* - Macmillan Publishing Co., New York, 399-434 pp.

Cooney, J. J., Silver, S. A. and Beck, E. A. (1985) Factors influencing hydrocarbon degradation in three fresh water lakes, Microb. Ecol. **11**: 127-137.

Emara, H. I. (1990) Oil pollution in the Southern Arabian Gulf of Oman. Mar. Pollut. Bull. **21**: 299-401.

Ijah, U. J. J. K and Ukpe, L. I. (1992) Biodegradation of crude oil by Bacillus strains 28A and 61B isolated from oil spilled soil. Waste Management **12**: 55-60.

Jamison, V. M., Raymond, R. L. and Hudson, J. O. (1975) Biodegradation of high-octane gasoline in ground water. Dev. Ind. Microbiol. **16**: 305-312.

Jobson, A., M. Mclaughlin, F. D. Cook and Westlake, W. S. (1974) Effect of amendments on the microbial utilization of oil applied to Soil. Appl. Microbiol. **27**: 166-171.

Odu, C. T. I. (1972) Microbiology of Soil contaminated with Petroleum hydro-carbons. 1- Extent of contamination and some soil and microbial properties after contamination. J. Inst. Petrol. **58**: 201-208.

Pearce, F. (1991) Gulf War could mean largest ever oil spill. New Scientist **19**: 18.

Reisfeld, A., E. Rosenbery and Gutnick, D. (1972) Microbial degradation of oil: factors affecting oil dispersion in sea water by mixed and pure cultures. Appl. Microbiol. **24**: 363-368.

Sen Gupta, R. and Kureishy , T. W. (1981) Present state of oil pollution in the northern Indian Ocean. Mar. Pollut. Bull. **12**: 295-301.

Sorkhoh, N. A. Ghannoum; A. S. Ibrahim, R. J. Strettor and Radwan, S. S. (1990) Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochroas* isolated from soil and marine environments in Kuwait Environ. Pollu. **65**: 1-17.

ZoBell, C. E. (1964) The occurrence effects and fate of oil polluting the sea. Adv. Water Pollut. Res. **3**: 85-118.

(Received 15/12/1998;
in revised form 26/03/2000)

الباحثين Jobson *et al* ., 1974; Jamison *et al.*, 1975; Cooney *et al* ., 1985) (Atlas and Bartha, 1972; إلى أن التركيز الضئيل المتاح في البيئات البحرية والمائية وفي الرواسب البحرية فيها ، من كل من النتروجين والفوسفور ، يقلل من معدل التحليل الإحيائي للنفط . مما قد يستدعي إضافتها إلى البيئة البحرية لتشجيع معدل التحليل الإحيائي للنفط .(Reisfeld *et al.*, 1972; Cooney, 1984) لذلك أجريت هذه الدراسات لتقويم تأثير إثراء مياه الخليج الملوثة بالنفط ، بواحدة أو أكثر من الإضافات الغذائية ، على معدل التحليل الإحيائي للنفط فيها . وقد دلت النتائج المتحصل عليها من هذه الدراسة ، على أن مياه الخليج فقيرة في محتواها من بعض المواد الغذائية التي تحتاجها السلالات البكتيرية المحللة للنفط ، فضلاً عن احتياج هذه البكتيريا إلى منشطات غذائية عضوية قد تتمثل في بعض الفيتامينات أو بعض الأحماض الأمينية الضرورية . فقد أدت كل من الإضافات الغذائية المختبرة إلى تنشيط معدل التحليل الإحيائي للنفط ، بنسب ملحوظة وكبيرة ، وإن تفاوتت فيما بينها تفاوتاً كبيراً في مقدار هذا التنشيط .

وتتفق هذه النتائج مع ما سبق أن حصل عليه باحثون آخرون (Ijah and Ukpe, 1992) ، بخصوص تشجيع معدل التحليل الإحيائي للنفط . إلا أن النتائج التي تحققت في الدراسة الحالية كانت أفضل كثيراً من تلك التي تحققت في الدراسة السابقة ، التي لم يزد معدل التحليل للنفط فيها ، مع وجود الإضافات الغذائية الثلاثة معاً وبالاستعانة بأفضل السلالتين البكتيريتين نشاطاً ، عن (50.4%) خلال عشرين يوماً .

كما كان لإضافة مجموعة المواد الغذائية إلى مياه الخليج العربي تأثيراً فعالاً في تشجيع معدل التحليل الإحيائي للنفط فيها بواسطة الفلورا الميكروبية الطبيعية الموجودة في المياه . حيث لم يزد معدل التحليل في وجود السلالة البكتيرية إلا قليلاً عن معدله في وجود الفلورا الطبيعية فقط . أما في غياب الإضافات الغذائية ، فكانت السلالة البكتيرية أكثر نشاطاً ، بشكل ملحوظ ، من الفلورا الميكروبية الطبيعية للمياه . حيث قامت بتحليل (23.7%) من النفط المضاف مقابل (4.26%) فقط للفلورا الطبيعية . وتدل هذه النتائج على إمكانية استخدام مجموعة الإضافات الغذائية فقط ، دون الحاجة إلى إثراء مياه الخليج بالسلالة البكتيرية لتنشيط معدل التحليل الإحيائي للنفط المنسكب . ويعني هذا ، أن الإضافات الغذائية قد أدت إلى تنشيط نمو الفلورا البكتيرية الطبيعية المحللة للنفط تنشيطاً كبيراً ، وزيادة أعدادها في مياه الخليج العربي بحوالي 214 ضعفاً .

تاريخ إستلام البحث: 1998/12/15
تاريخ إعداده النهائي للنشر: 2000/03/26

جدول رقم (4) تأثير إضافة مجموعة المواد الغذائية (الفوسفات + مسحوق اللبن منزوع الدسم + مستخلص السمك + مسحوق الطحلب) على معدل تحليل النفط في مياه الخليج العربي في وجود البكتيريا *Sporosarcina ureae* أو في غيابها والكثافة العددية للبكتيريا في نهاية كل تجربة

مدة التحضين باليوم	في وجود الإضافات الغذائية مع اللقاح	في وجود الإضافات الغذائية فقط	في وجود اللقاح فقط	بدون إضافات وبدون لقاح
4	5.8	4.7	2.5	0.45
7	11.4	19.3	6.8	0.0
11	19.9	16.1	9.4	0.72
15	35.2	31.8	13.3	0.65
19	68.6	62.6	18.9	1.81
23	88.5	80.4	23.7	4.26
عدد المستعمرات البكتيرية في نهاية التجربة	10^3 X 91 X 53 وم م / مل (١)	10^3 X 87.67 وم م / مل	10^3 X 7.24 وم م / مل	10^3 X 0.41 وم م / مل

2- تقدير تأثير إضافة مجموعة من المواد الغذائية إلى مياه الخليج العربي مع السلالة البكتيرية *Sporosarcina ureae* أو في غيابها على معدل تحليل النفط :

يتضح من فحص النتائج الواردة في (الجدول رقم 4) ، أن إضافة مجموعة المواد الغذائية المكونة من مسحوق الطحالب والفوسفات ومستخلص السمك ومسحوق اللبن منزوع الدسم إلى مياه الخليج العربي المضاف إليها النفط ، مع عدم تلقيحها بالسلالة البكتيرية ، كان له تأثير كبير في تشجيع معدل التحليل الإحيائي للنفط فيها . حيث أدت مع نهاية التجربة ، إلى تحليل (80.4%) من النفط المضاف . وتقترب هذه النسبة كثيراً من النسبة المئوية للنفط المتحلل في حالة وجود اللقاح البكتيري من السلالة *Sporosarcina ureae* مع مجموعة الإضافات الغذائية ، حيث بلغت نسبة التحلل للنفط (88.5%) . وبالمقارنة كانت النسبة المئوية للنفط المتحلل في المياه الملوثة المضاف إليها اللقاح البكتيري ، دون إضافة المواد الغذائية (23.7%) .

المناقشة

نظراً لكون الهدف الأساسي من الدراسة الحالية هو التوصل إلى تحديد أنسب الظروف الملائمة لتشجيع معدل التحليل الإحيائي للنفط في مياه الخليج العربي ، بواسطة العزلة البكتيرية المنتخبة والإضافات الغذائية . فقد تم إجراء التجارب باستخدام مياه الخليج المضاف إليها النفط دون تعقيم ، وذلك كي تكون النتائج المتحصل عليها قابلة للتطبيق العملي تحت الظروف الطبيعية السائدة في مياه الخليج العربي . وفي دراسات سابقة ، أشار بعضُ

جدول رقم (2) تأثير بعض الإضافات الغذائية البروتينية على نشاط البكتريا *Sporosarcina ureae* في تحليل النفط في مياه الخليج العربي

مدة التحضين باليوم	النسبة المئوية للنفط المفقود من مياه البحر			بدون لقاح وبدون إضافات
	الكازين	مسحوق اللبن منزوع الدسم	الخميرة	
3	4.1	2.7	10.2	0.45
7	10.2	6.1	22.5	0.0
11	14.6	10.8	30.2	0.72
15	32.7	22.8	46.1	0.65
19	46.4	38.6	68.7	1.81
23	62.3	56.9	92.0	4.26

جدول رقم (3) تأثير بعض الإضافات الغذائية المنفردة المأخوذة من كائنات بحرية على معدل تحليل النفط في مياه الخليج العربي بعد تلقيحها بالسلالة *Sporosarcina ureae*

مدة التحضين باليوم	النسبة المئوية للنفط المفقود من مياه البحر			بدون لقاح وبدون إضافات
	مستخلص السمك	مسحوق اللبن منزوع الدسم	مسحوق الطحلب	
3	2.3	0.9	1.1	0.45
7	6.0	2.5	1.5	0.0
11	10.1	6.3	4.0	0.72
15	22.5	12.5	8.2	0.65
19	32.4	22.4	14.6	1.81
23	48.6	38.6	26.9	4.26

معنوية وكبيرة بالمقارنة مع التزرعات التي لم تضاف إليها هذه المواد . وكان مسحوق اللبن منزوع الدسم هو أقلها تأثيراً إذ أنه أدى إلى زيادة النسبة المئوية للنفط المتحلل إلى (56.9%) . واحتل الكازين مركزاً وسطياً حيث أدت إضافته إلى زيادة النسبة المئوية للنفط المتحلل إلى (62.3%) وكان البيتون أكثر هذه الإضافات كفاءة إذ أدى إلى تحليل (92%) من النفط المضاف إلى مياه الخليج العربي في التجربة .

3-1 تأثير إضافة كل من مستخلص السمك ومستخلص الطحالب ومسحوقها على معدل تحليل النفط :

تظهر نتائج هذا التأثير في (الجدول رقم 3) المدونة فيه أن كلاً من هذه الإضافات الغذائية المأخوذة من نواتج بحرية قد أدت إلى زيادة معدل تحليل النفط في وجود السلالة البكتيرية . وكان مسحوق الطحالب أقلها تأثيراً ، حيث أدى إلى رفع النسبة المئوية للنفط المتحلل عند نهاية التجربة إلى (26.9%) . وكان لإضافة مستخلص الطحالب أثر أكبر في رفع كفاءة تحليل النفط ، حيث بلغت نسبة تحليله (38.6%) . وكان مستخلص السمك هو الأعلى كفاءة بين هذه المجموعة من الإضافات ، حيث تسبب في زيادة معدل النشاط البكتيري في تحليل النفط لتبلغ (48.6%) عند نهاية التجربة .

جدول رقم (1) تأثير بعض الإضافات الغذائية المنفردة على معدل تحليل النفط في مياه الخليج العربي بعد تلقيحها بالبكتيريا *Sporosarcina ureae*

مدة التحضين باليوم	النسبة المئوية للنفط المفقود من مياه البحر			بدون لقاح وبدون إضافات
	اليوريا	الفوسفات	الخميرة	
3	2.4	1.5	4.5	0.45
7	6.5	4.6	10.8	0.0
11	14.6	10.8	16.4	0.72
15	20.5	16.4	24.7	0.65
19	26.7	24.7	38.5	1.81
23	34.8	30.9	52.1	4.26

2-2 مستخلص الطحالب البحرية :

تم تحضيره بنفس الطريقة التي استخدمت لتحضير مستخلص السمك المذكورة أعلاه .
وذلك باستخدام نوعين من الطحالب ، تم الحصول عليهما من الخليج العربي ، وهما :
Dictiota dickotoma, Sargasum

3-2 مسحوق الطحالب البحرية :

تم تحضيره بغسل الطحالب البحرية ، لتخليصها من العوالق والأتربة ، ثم تركها لتجف هوائياً ، وطحنها بعد ذلك في مطحنة كهربائية صغيرة ، وحفظ المسحوق الجاف في إناء محكم الإغلاق لحين استخدامه .

4-2 مسحوق اللبن الخالي من الدسم :

تم تحضيره باستخلاص الدسم من 100 جم من مسحوق اللبن المجفف (نيدو) ، بواسطة رجه مع 200 ملليلتر من ايثير البترول لمدة ساعة ، ثم ترشيحه. وكررت هذه العملية لعدة مرات حتى يتم التخلص تماماً من الدسم الموجود في المسحوق ، ويصبح الراشح رائقاً شفافاً . وترك المسحوق ليجف بعد نثره على ورقة ترشيح ، في طبق تجفيف ، في خزانة الغازات ، إلى أن تم التخلص من آثار ايثير البترول كلياً . وحفظ في إناء محكم الغلق لحين استخدامه .

النتائج

1- نشاط السلالة *Sporosarcina ureae* في تحليل النفط في مياه الخليج العربي المحتوية على واحدة من الإضافات الغذائية :

1-1 تأثير إضافة كل من اليوريا ، الفوسفات ، والخميرة على معدل تحليل النفط :

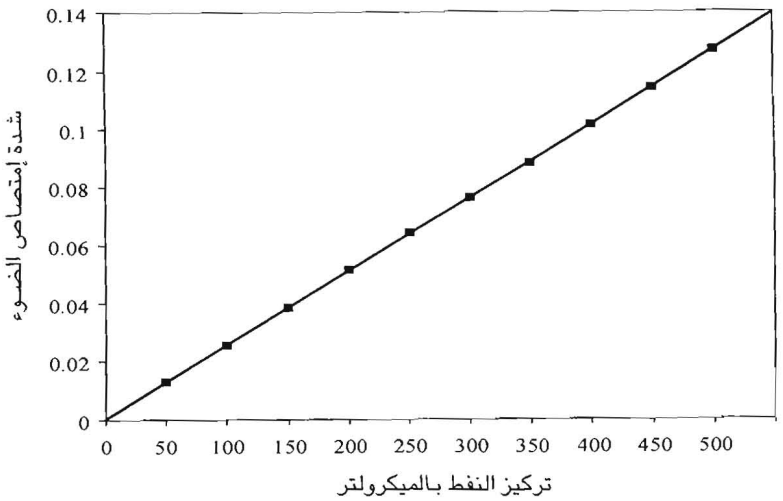
بينت النتائج أن كلا من الإضافات الغذائية الثلاثة (اليوريا ، الفوسفات ، الخميرة) ، قد أدت إلى زيادة معدل نشاط البكتيريا في تحليل النفط المضاف إلى مياه الخليج العربي ، وكان الفوسفات أقلها تأثيراً وقد أدى إلى تحليل (30.9%) من النفط المضاف . وجاءت اليوريا في مركز متوسط ، حيث أدت إلى زيادة النسبة المئوية لتحليل النفط إلى (34.8%) عند نهاية التجربة . أما تأثير إضافة الخميرة فكان متفوقاً جداً عليهما ، حيث أدت الخميرة إلى رفع النسبة المئوية للنفط المتحلل إلى (52.1%) (جدول رقم 1) .

2-1 تأثير إضافة كل من الببتون ، الكازين ، ومسحوق اللبن منزوع الدسم على معدل تحليل النفط :

تظهر نتائج إضافة الببتون والكازين ومسحوق اللبن منزوع الدسم المبين فيه (الجدول رقم 2) ، أن إضافة إي من هذه المواد الغذائية البروتينية قد أدت إلى زيادة معدل النشاط البكتيري في تحليل النفط المضاف إلى مياه الخليج العربي ، بشكل ملحوظ وبفروقات

منزوع الدسم (0.7%) ، مستخلص سمك (0.7%) ، مستخلص طحالب (1.0%) ومسحوق طحالب (1.0%).

وبعد ذلك ، تم تحضين المعاملات على حضان هزاز رحوي يدور بسرعة 180 دورة في الدقيقة عند درجة حرارة 28 – 30°م لمدة التجربة ، والتي تم تكرارها أربع مرات . تقدير النفط المتبقي في مياه الخليج غير المعقمة تم إستخلاصه بالرج في قمع فصل مع 50 ملليلتر من التولوين ، وتقدير تركيز النفط المستخلص في التولوين بواسطة المطياف الضوئي Spectronic 21, Milton Roy Company ، عند طول الموجة 420 نانومتر ، ثم قراءة التركيز من المنحنى القياسي للنفط . تم إعداد المنحني القياسي بإذابة أحجام معلومة من النفط ، تتراوح بين 50 و 500 ميكرولتر في 50 ملليلتر من التولوين ، وتقدير درجة امتصاص الضوء في كل حالة (Odu, 1972) ، ثم تم رسم المنحنى القياسي (شكل رقم 1) .



شكل رقم (١) المنحنى القياسي لتقدير النفط

تم إجراء تجربة لتقويم تأثير مجموعة الإضافات الغذائية إلى مياه الخليج العربي على معدل تحليل النفط فيه ، في وجود السلالة البكتيرية S. urea وكذلك في غيابها ، مقارنة مع تأثير تلقيح المياه بهذه السلالة البكتيرية بدون الإضافات الغذائية بنفس الطريقة أعلاها .

2- تحضير مستخلصات الإضافات الغذائية المستخدمة في بعض التجارب :

1-2 مستخلص السمك :

تم تحضيره بإضافة لتر من الماء المقطر إلى 500 جم من مهروس سمك الهامور ، وتركه في البراد الكهربائي (4°م) لمدة 12 ساعة ، ثم تم تعقيمه في المعقام البخاري عند درجة 121°م لمدة 15 دقيقة ، وترشيحه وحفظه في المجمد (الفريزر) لحين استخدامه .

المقدمة

أصبحت حوادث انسكاب الزيت الخام ونواتج تكريره في الأوساط المائية ظاهرة عامة لا يمكن تجاهلها . ونادراً ما تمر فترة زمنية قصيرة دونما حدوث نوع من التسرب النفطي إلى البيئة البحرية وينتج عن ذلك تلوث بيئي بالزيت الخام. (Atlas , 1981)

كما ظهر أن خطوط سير السفن التجارية وناقلات النفط في الخليج العربي ، هي الأكثر تلوثاً بالمركبات الهيدروكربونية البترولية من الخطوط المماثلة لها في الخليج الجنوبي للبنغال .(Sen Gupta and Kureishy, 1981) وكان أخطرها وأشدها قسوة ذلك التسريب المتعمد لملايين الأطنان من النفط أثناء حرب الخليج (1990) الذي سبب أسوأ كارثة بيئية في تاريخ المنطقة . (Pearce, 1991)

وللتعامل مع بقع الزيت وتنظيف البيئة البحرية من ملوثاتها النفطية ، استخدمت وسائل فيزيائية ، منها حرق الزيت ودفعه إلى القاع بتغير كثافته (Emara, 1990) ، وأخرى كيميائية ، مثل المشتتات أو الموزعات .(Pearce, 1991) وكان المتبع عادة للتعامل مع بقع الزيت المتسربة إلى مياه الخليج وغيره من البحار ، هو سرعة شفط أكبر كمية ممكنة من الزيت الخام الطافي فوق سطح المياه ، ثم التعامل مع الزيت المتبقي عن طريق تشتيته ، باستخدام الكيماويات المفرقة .(ZoBell, 1964)

ويفضل الكثيرون ، من العلماء ، ترك مثل هذه البيئات لتنظف نفسها طبيعياً تحت تأثير الأكسدة الحيوية بفضل أحيائها الدقيقة الطبيعية .(Basson *et al.*, 1977; Antai and Mgbomo, 1989; and Sorkhoh *et al.*, 1990) وفي دراسة أخرى ، أمكن عزل سلالتين من البكتيريا تابعتين للجنس Bacillus قادرتين على تكسير الزيت الخام الخفيف بكفاءة في وجود بعض الإضافات الغذائية ، مثل البيتون (0.7%) والخميرة (0.7%) واليوريا (0.14%) (Ijah and Ukpe, 1992) ، حيث أدت إلى خفض تركيز الزيت المسكوب بنسبة (50.4%) خلال عشرين يوماً .

الطرق والمواد :

١ – تقدير نشاط البكتريا في تحليل النفط الخام في وجود الإضافات الغذائية :

تم ذلك بإضافة نصف ملليلتر من النفط الخام إلى 50 ملليلتر من مياه الخليج العربي غير المعقمة ، في دوارق مخروطية سعتها 250 ملليلتر ، وأضافة نصف ملليلتر من اللقاح البكتيري المنشط والإضافات الغذائية ، التي ثبت تأثير إضافتها على معدل تحليل النفط في مياه الخليج العربي ، بالنسب التالية : اليوريا (0.14%) ، الفوسفات (14.0%) (KH_2PO_4) (0.14%) الخميرة (0.7%) ، البيتون (0.7%) ، الكازين (0.7%) ، مسحوق لبن مجفف

تأثير بعض الإضافات الغذائية على نشـــاط ســـلالة بكتيـــريا *Sporosarcina urea* في التحليل الإحيائي للزيت الخام في مياه الخليج العربي

سهير هانم محمد الطيب ، كوثر فؤاد عابد

قسم النبات ، كلية التربية للأقسام العلمية .

الرياض ، (المملكة العربية السعودية)

المستخلص: تم إجراء سلسلة من التجارب لتقدير نشاط السلالة البكتيرية *Sporosarcina ureae* في تحليل النفط في مياه الخليج العربي ، تحت تأثير واحدة أو أكثر من الإضافات الغذائية لتحفيز نموها . وكانت الإضافات الغذائية التي تم تقويم تأثير إضافتها على معدل تحليل النفط في مياه الخليج العربي والتركيزات المستخدمة هي: اليوريا (0.14%) ، الفوسفات البوتاسيوم الحامضية (0.14%) ، الخميرة (0.7%) ، البيتون (0.7%) ، الكازين (0.7%) ، مسحوق لبن مجفف منزوع الدسم (0.7%) ، مستخلص سمك (0.7%) ، مستخلص طحالب (1.0%) ومسحوق طحالب (1.0%) . وكان البيتون أكثر هذه الإضافات الغذائية كفاءةً في رفع معدل تحليل النفط ، إذ أدى إلى تحليل (92.0%) من النفط المضاف إلى مياه الخليج العربي في التجربة.

وبالمقارنة مع التجربة الضابطة ، كان لإضافة مجموعة المواد الغذائية مجتمعة إلى مياه الخليج العربي ، مع عدم تلقيحها بالبكتريا ، تأثيراً فعالاً في تشجيع معدل التحليل الإحيائي للنفط فيها بواسطة الفلورا الميكروبية الطبيعية الموجودة في المياه . حيث أدت إلى تحليل (80.4%) من النفط المضاف خلال فترة التجربة . وكانت هذه النسبة تقترب كثيراً من النسبة المئوية للنفط المتحلل في وجود اللقاح البكتيري بالسلالة *Sporosarcina ureae* مع مجموعة الإضافات الغذائية (88.5%) .