عزل وتعريف واختبار كفاءة بعض الفطريات في تحليل الهيدروكربون من التربة الملوثة بالنفط

سعاد محمد خليفة أبو الغيث¹ وأحلام القمودي محمد زعيط²

^{2,1} كلية العلوم / جامعة الزاوية.

¹ Alsaadh69alzawia@gmail.com

الملخص

استهدفت هذه الدراسة عزل بعض أنواع الفطريات من التربة الملوثة بالهيدروكربون بمصفاة الزاوية لتكرير النفط، حيث تم عزل وتعريف بعض الفطريات مثل *Rhizopus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans* وأوضحت نتائج هذه الدراسة أن تواجد وتنوع فطر *Aspergillus* قد تفوق معنوياً مقارنة بتواجد وتنوع فطر *Rhizopus*. كما تم في هذه الدراسة اختبار قدرة وكفاءة الفطريات المعزولة على النمو واستغلال المركبات الهيدروكربونية المتمثلة في زيت الحمادة وزيت الشرارة بتركيز 1% و 3%، حيث أوضحت النتائج بأن جنس *Rhizopus* سجل أعلى معدل للنمو على الوسط الغذائي Malt Extract Agar، وسجل كلا من فطر *A. fumigatus* وفطر *A. flavus* معدل النمو القطري أعلى معنوياً من النمو القطري لفطر *A. niger* وفطر *A. nidulans*. هذه المعدلات العالية تدل على إمكانية استخدام الفطريات المعزولة في المعالجة البيولوجية للتربة الملوثة بالنفط.

الكلمات الرئيسية: *Aspergillus* - كفاءة التحلل - فطريات التربة - النمو القطري - الهيدروكربونات.

المقدمة

تتعرض العناصر البيئية إلى اختلال شديد في توازنها نتيجة للاستخدام المستمر للنفط ومشتقاته (بن صادق، 1999) ويمكن أن يتسرب النفط بشكل مباشر وغير مباشر إلى داخل البيئة مما يؤدي إلى تلوثها

الخطير (Thouand *et al.*, 1999) وغالبا ما تؤدي إلى حدوث اضطرابات هائلة للكائنات الحية وغير الحية (Muller *et al.*, 1992)، وتعدّ التربة ملوثة باحتوائها على مادة أو عدة مواد بتركيزات تشكل خطراً على صحة الإنسان والحيوان والنبات، وكما أشارت بعض الدراسات إلى أن النبات يتأثر سلباً عند تلوث التربة بالنفط الخام، حيث يتسبب التلوث بتأخر وانخفاض نسبة الإنبات بدرجة كبيرة وخاصة في وجود مستوى عالٍ من التلوث وحدث نقص تام في تغذية النبات (Schwendinge, 1968)، كما اتضح أيضاً إلى أن الاستصلاح السريع للتربة الملوثة بالنفط الخام يتم بعملية تنشيط للكائنات الحية الدقيقة التي تستعمل الهيدروكربونات الموجودة في النفط كمصدر للكربون والطاقة (أبوالغيث، 2010).

تعدّ الهيدروكربونات النفطية لاسيما الأروماتية منها Aromatic hydrocarbons من الملوثات البيئية الخطيرة من خلال انتقالها في السلسلة الغذائية (محمد وشعيب، 2017) فضلا عن سميتها للأحياء وفعلها المطفر Mutagenic، والمسرطن Carcinogenic وصفاتها الكيميائية والفيزيائية المعقدة التي تجعل منها صعبة التحليل (الطائي وآخرون، 2016)، وتتوفر حالياً عدة طرق لإزالة أو معالجة الملوثات النفطية بالطرق الكيميائية والفيزيائية والحيوية.

وتحظى المعالجة الإحيائية Bioremediation باهتمام كبير كونها طريقة صديقة للبيئة وعواملها تعرف بأنها إمكانية استخدام الكائنات الحية الدقيقة في هدم وإزالة السمية بطريقة فعالة ولاسيما بالمعالجة الفطرية Mycoremediation التي هي جزء من النظام البيئي وغير مكلفة اقتصادياً، فضلا عن كونها تزيل الملوثات دون أن تخلف بقايا منها وتفككها إلى نواتجها النهائية الطبيعية في البيئة (Hameed *et al.*, 2013) و (Alwan & Seker, 2010)، وقد زاد الاهتمام بالفطريات لاستخدامها في المعالجة الحيوية للنفط الخام والملوثات البيئية الأخرى حيث تمتلك نظاماً أنزيمياً معقداً يزيد من قابليتها على تكسير أو تحويل عدد كبير من الملوثات الخطرة على الإنسان والبيئة (الدوسري وآخرون، 2009)، وتعدّ الفطريات من أهم الأحياء المجهرية الموجودة في التربة والتي تعمل على تكسير العديد من الملوثات ومنها الهيدروكربونات النفطية (حميد، 2015)، وبما أن ليس هناك في ليبيا دراسات حول تنوع العزلات الفطرية التي قد تكون لها كفاءة في تحليل الملوثات كان الغرض من الدراسة عزل وتشخيص الفطريات من التربة الملوثة بالنفط واختبار كفاءة الفطريات المعزولة في تحليل الهيدروكربونات معملياً.

المواد وطرق العمل

تجميع عينات التربة بالمنطقة الملوثة

أجريت التجربة خريف 2019 في المركز الوطني للصحة الحيوانية بالزاوية لعزل وتعريف أنواع الفطريات النامية على تربة ملوثة بالهيدروكربون بمصفاة الزاوية لتكرير النفط. تم تجميع عينات التربة الملوثة بالهيدروكربونات من مصفاة الزاوية لتكرير النفط وبعمق من 5-15 سم، وكان وزن العينة حوالي 1 كجم حيث تم وضعها في أكياس بلاستيكية معقمة وكتب عليها رقم العينة. نقلت العينات إلى المختبر لإجراء الاختبارات الميكروبيولوجية للحصول على عزلات فطرية واختبار كفاءتها في إزالة الهيدروكربونات باستغلالها كمصدر للكربون والطاقة.

الطرق الميكروبيولوجية

تم تحضير الوسط الغذائي Malt Extract Agar (MEA) المصنع من قبل شركة (OXOID) بإذابة 50 جرام من المسحوق في 1 لتر من الماء المقطر المعقم وعقم في جهاز التعقيم Autoclave بدرجة حرارة 121°م لمدة 15 دقيقة. تم العزل بطريقتين حيث تم أخذ 1 جرام من التربة الجافة الملوثة بالهيدروكربون ووضعها في أنبوبة اختبار تحتوي على 9 مل من الماء المقطر المعقم وتم رجها لمدة 5 دقائق، ثم نقل كمية من الراشح بواسطة إبرة تلقيح معقمة وزرعت على الأطباق المجهزة بالوسط الغذائي بطريقة النشر، حُضنت الأطباق في درجة حرارة 25±2°م بواقع 3 مكررات لكل معاملة.

وفي الطريقة الأخرى للعزل تم نشر 1 جرام من عينة التربة الجافة في طبق بتري معقم بقطر 9 سم حاوي على الوسط الزرعي (MEA) السابق التحضير وبعدها حُضنت الأطباق بدرجة حرارة 25±2°م بواقع 3 مكررات للعينة، بعد عملية التحضين للأطباق في كلتا الطريقتين لمدة من 3-5 أيام فحصت النموات الفطرية المختلطة ومنها يتم نقل من كل مستعمرة بواسطة إبرة التلقيح المعقمة على الوسط الغذائي الصلب للحصول على مزارع نقية للتعرف عليها.

شخصت العزلات الفطرية اعتماداً على المظهر الخارجي للمستعمرة Morphological Feature مثل الشكل واللون وأيضاً اعتماداً على الصفات المجهرية Microscopic Feature مثل شكل وحجم ولون وتركيب الحوامل والأبواغ والتراكيب الأخرى باستخدام المفاتيح التصنيفية الواردة في المصادر التي تناولت تصنيف ودراسة الفطريات قيد الدراسة الحالية وهي (Domsch *et al.*, 1980) و (Gilman, 1957). استخدام شريط لاصق شفاف بطول 2 سم وذلك بلامسة ووضع الجهة اللاصقة للشريط على سطح المستعمرة الفطرية النامية على الطبق، ثم رفع الشريط على الشريحة الزجاجية الحاوية على قطرة من صبغة القطن الأزرق، ثم تفحص تحت المجهر لمعرفة ترتيب وحجم وشكل الكونيدات.

اختبار كفاءة الفطريات المعزولة على تحليل المركبات الهيدروكربونية

تم اختبار كفاءة الفطريات المعزولة من التربة الملوثة موضوع الدراسة بمدى قدرتها على النمو في أوساط ملوثة بالنفط الخام (زيت الحمادة وزيت الشرارة) وتركيز 1% و3%، ومقارنة أيهما أكثر كفاءة على النمو، حيث حُضر الوسط الغذائي (MEA) بإضافة تركيز 1% و3% لزيت الحمادة وزيت الشرارة عند درجة حرارة 45°م، مع إضافة مضاد بكتيري، ثم مزج الخليط باستخدام المغناطيس المعقم قبل صبه في الأطباق للحصول على تراكيز متجانسة ومتماثلة في كل طبق، ثم لُفحت الأطباق بالخيوط الفطرية المعزولة بواسطة الناقل الفليني المعقم ذي قطر 5 ملم أُخذ من مستعمرة فطرية نامية لمدة أسبوع، وحضنت الأطباق في درجة حرارة 25°م، وتم قياس أقطار المستعمرات النامية بعد 7 أيام من التحضين باستخدام measuring tap وقورنت بطبق الكنترول.

استعملت طريقة ANOVA لتحليل البيانات إحصائياً عند مستوى معنوية أقل من (0.05) باستخدام نظام (SPSS) Statistical Packages For Social Sciences.

النتائج والمناقشة

أوضحت نتائج الفحص والعزل من التربة الملوثة بالهيدروكربون في هذه الدراسة و كما هو موضح بالجدول (1).

جدول (1): يبين المعزولات الفطرية التي تم عزلها من التربة الملوثة بالنفط

المعزولات الفطرية من التربة الملوثة بالهيدروكربون
<i>Rhizopus sp</i>
<i>Aspergillus fumigates</i>
<i>Aspergillus niger</i>
<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>

تم عزل العديد من الفطريات مثل *Rhizopus sp.*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, وسجل فطر *Rhizopus sp* أعلى معدل للنمو القطني في جميع التركيزات وكان متوسط النمو 9 سم واتفقت هذه النتائج مع ما أشار إليه (Dawood et al., 2015) بأنه تم عزل العديد من الفطريات من التربة الملوثة بالنفط من بينها فطر *Rhizopus sp.* بينما كانت نسبة التنوع وتواجد فطر *Aspergillus* في هذه الدراسة عالية جدا مقارنة بفطر *Rhizopus*، وهذا ما أكدته الدراسة التي قام بها (Al-Nasrawi, 2012) في المكسيك بعزل 16 عزلة فطرية من بينها فطر *Aspergillus niger* لما له من القدرة على النمو في أوساط حاوية على المركبات الهيدروكربونية ويعزى هذا لما يتميز به هذا الفطر من قابلية النمو في بيئات مختلفة وقابليته الأنزيمية العالية التي تمكنه من السيادة على بقية الأجناس الأخرى، وتتفق هذه النتائج مع ما أكدته (حميد وآخرون، 2013) بأن *Aspergillus spp.* أكثر الفطريات سيادة مقارنة بالفطريات التي تم عزلها، وتأكيداً لما توصلت إليه الدراسة التي قام بها (فرج وآخرون، 2013) بأن *Aspergillus spp.* إحدى الفطريات التي تم عزلها من التربة الملوثة بالهيدروكربون، كما وتتفق كذلك لما أشار إليه (شفيق ومزعل، 2009) بأن هناك تباين في نسب وانتشار العزلات الفطرية حيث كانت السيادة للفطر *Aspergillus*.

جدول (2): تأثير تركيز زيت الحمادة على النمو القفري للفطريات حسب التركيز

نوع الفطر	تركيز الزيت	المتوسط	Sig
<i>A. fumigatus</i>	Control	6.25	0.000
	%1	6.02	
	%3	5.77	
<i>A. niger</i>	Control	4.00	0.048
	%1	0.373	
	%3	4.65	
<i>A. flavus</i>	Control	7.15	0.022
	%1	7.18	
	%3	6.88	
<i>A. nidulans</i>	Control	4.65	0.002
	%1	4.23	
	%3	4.27

شكل (1): يبين تأثير تركيز زيت الحمادة على النمو القفري للفطريات حسب التركيز.

جدول (3): تأثير تركيز زيت الشراة على النمو القشري للفطريات حسب التركيز

نوع الفطر	تركيز الزيت	المتوسط	Sig
<i>A. fumigatus</i>	Control	6.30	0.046
	%1	5.97	
	%3	5.97	
<i>A. niger</i>	Control	2.20	0.000
	%1	5.20	
	%3	4.65	
<i>A. flavus</i>	Control	7.00	0.045
	%1	6.87	
	%3	6.75	
<i>A. nidulans</i>	Control	4.75	0.001
	%1	5.32	
	%3	4.02

شكل (2): يبين تأثير تركيز زيت الشراة على النمو القشري للفطريات حسب التركيز.

استخدمت في هذه الدراسة المركبات الهيدروكربونية متمثلة في زيت الحمادة وزيت الشارة لمعرفة مدى الاختلاف في التأثير على النمو القطري للفطريات المعزولة، حيث سجلت النتائج بأن فطر *Rhizopus sp.* سجل أعلى معدل لنمو القطري وكان 9 سم في النوعين كليهما من الزيوت زيت الحمادة وزيت الشارة وفي كل التركيزات المختبرة، وكما هو موضح بالجدول (2،3) والشكل (1،2) أن معدل النمو القطري لفطر *A. fumigatus* أعلى معنوياً لمجموعة الكنترول (6.25،6.30) من المجموعة ذات التركيز 1% (5.97،6.02) و3% (5.77،5.97) لزيت الشارة وزيت الحمادة على التوالي، بينما كان معدل النمو القطري أعلى معنوياً عند تركيز 1% من تركيز 3% (5.77،6.02) لزيت الحمادة، ولا يوجد فرق معنوي بين التركيز 1% و3% لمعدل النمو القطري لهذا الفطر لزيت الشارة (5.97،5.97)، وسجلت النتائج بأن التركيز 3% أعلى معنوياً من مجموعة الكنترول والمجموعة التركيز 1% لفطر *A. niger* لزيت الحمادة (4.65،4.00،0.373) بينما سجل مجموعة التركيز 1% أعلى معنوياً لمعدل النمو القطري لهذا الفطر من مجموعة الكنترول ومجموعة التركيز 3% لزيت الشارة (5.20،2.20،4.65)، ومعدل النمو القطري لفطر *A. flavus* في مجموعة الكنترول كانت أعلى معنوياً من مجموعة التركيز 3% (7.15،6.88) ولكن لا توجد فروق معنوية للنمو القطري لهذا الفطر في التركيز 1% (7.15،7.18) بينما كان معدل النمو القطري في التركيز 1% أعلى معنوياً من تركيز 3% لزيت الحمادة (7.18،6.88)، بينما عند استخدام زيت الشارة وجد أن معدل النمو القطري لهذا الفطر لمجموعة الكنترول أعلى معنوياً من معدل النمو القطري عند تركيز 3% (7.00،6.75) ولكن الفروق ليست معنوية عند الكنترول والتركيز 1% (7.00،6.87) وكذلك لا توجد فروق معنوية بين معدل النمو القطري عند تركيز 1% و3% (6.87،6.75)، وأوضحت النتائج أن معدل النمو القطري لفطر *A. nidulans* لمجموعة الكنترول أعلى معنوياً من مجموعة التركيز 1% و3% (4.65،4.23،4.27) ولا توجد فروق معنوية بين التركيز 1% و3% لزيت الحمادة (4.27،4.23)، وسجل هذا الفطر عند استخدام زيت الشارة معدل النمو القطري لمجموعة الكنترول أعلى معنوياً من مجموعة التركيز 3% (4.75،4.02) وكما سجلت مجموعة التركيز 1% معدل النمو القطري أعلى معنوياً من مجموعة الكنترول والتركيز 3% (5.32،4.75،4.02)، وهذا ما أشار إليه (AL-Hawash, 2019) بأن *Aspergillus* له القدرة العالية على النمو وإزالة الهيدروكربون من التربة وذلك لقدرته على الاستحلاب والامتزاج في هذه الأوساط.

جدول (4): يبين تأثير تركيز الزيت على النمو القطري للفطريات حسب نوع الفطر

نوع الفطر	تركيز الزيت	المتوسط	Sig
<i>A. fumigatus</i>	Control	6.28	0.000
	%1	5.99	
	%3	5.87	
<i>A. niger</i>	Control	3.10	0.009
	%1	4.47	
	%3	4.65	
<i>A. flavus</i>	Control	7.08	0.019
	%1	7.03	
	%3	6.82	
<i>A. nidulans</i>	Control	4.70	0.023
	%1	4.78	
	%3	4.14

شكل (3): يبين تأثير تركيز الزيت على النمو القطري للفطريات حسب نوع الفطر.

أظهرت هذه الدراسة نتائج الاختبار لأكثر الفطريات التي تم عزلها نمواً وكفاءة في استغلال الهيدروكربون وتقليل من نسبة تلوثها للتربة فوجد أن فطر *Rhizopus sp.* سجل أعلى معدل للنمو القطري لهذا الفطر 9 سم أي الدرجة القصوى عند كل التركيزات مختبرة الكنترول وعند تركيز 1% و 3% ويليه فطر *A. flavus* كما هو موضح بالجدول (4) والشكل (3)، حيث أن معدل النمو القطري لهذا الفطر أعلى معنوياً عن باقي الفطريات الأخرى (6.82، 7.03، 7.08) على التوالي، ثم فطر *A. fumigatus* (5.87، 5.99، 6.28) وفي المرتبة التي تليه فطر *A. nidulans* حيث سجل أعلى معدل للنمو القطري من فطر *A. niger* في الكنترول وتركيز 1% (4.47، 4.78) بينما سجل الأخير أعلى معدل للنمو القطري من الفطر *A. nidulans* عند تركيز 3% (4.14، 4.65). وما أشارت إليه هذه النتائج يعدّ دليلاً على قدرة الفطريات على النمو في الأوساط الحاوية على الهيدروكربون بنسب متفاوتة وفي هذا تأكيد لما توصلت إليه دراسة سابقة أوضحت بأن نمو الفطريات وبقاءها حية حتى بعد 40 يوماً كان واضحاً لاستغلالها للزيت كمصدر للكربون وأن هذا التباين نتيجة لاختلاف الصفات الوراثية لتلك المعزولات (فرج وآخرون، 2013).

الخلاصة والتوصيات

سجلت هذه الدراسة عزل وتعريف لبعض الأنواع الفطرية (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *flavus*, *Rhizopus*) التي كانت قادرة على تحليل مخلفات الهيدروكربون الموجودة في التربة الملوثة بالنفط، وكشفت أن بعض الأنواع الفطرية مثل *Rhizopus*, *Aspergillus* لديها القدرة على النمو واستغلال المركبات الهيدروكربونية الملوثة للتربة. وتؤكد الدراسة على إمكانية أن تستخدم هذه الأنواع في المعالجة البيولوجية للتربة الملوثة بالنفط والحد من تلوث النفط في مختلف النظم البيئية، كما توصي الدراسة بأهمية إجراء مزيد من الدراسات لعزل وتحديد مجموعات أخرى من الكائنات الحية الدقيقة الموجودة في المناطق الملوثة بالمخلفات النفطية للتسريع في عملية المعالجة البيولوجية.

المراجع

1- المراجع العربية:

- أبو الغيث، سعاد محمد. (2010). عزل بكتيريا مؤكسدة للهيدروكربونات من البيئة المحلية وتعريفها- رسالة ماجستير - جامعة الزاوية.
- الدوسري، مصطفى عبدالوهاب؛ الامارة، فارس جاسم؛ عبدالله، سمير خلف. (2009). قابلية بعض الفطريات المعزولة من رسوبيات أهوار جنوب العراق على تكسير النفط الخام مختبرياً. المؤتمر العلمي الثالث لإعادة التأهيل الأهوار 13-23.
- الطائي، ميسون صالح؛ حمد، نداء شهاب؛ البكري، جولان جبار صاحب. (2016). دراسة إمكانية إزالة الهيدروكربونات النفطية وبعض الملوثات في مياه المخلفات النفطية لمصفاى النجف. مجلة جامعة بابل/لعلوم الصرفة التطبيقية 1(24):50-60.
- بن صادق، علي. (1999). التلوث البيئي. جامعة الملك سعود- الرياض- المملكة السعودية- الطبعة الثانية.
- حميد، مروان سالم. (2015). اختبار قابلية بعض الأنواع الفطرية على النمو في أوساط ملوثة بالنفط الخام -مجلة تكريت للعلوم الصرفة -جامعة تكريت- العراق. 20(5):47-55.
- شفيق، شذى علي؛ مزعل، شيماء نغيش. (2009). تأثير واستغلال النفط الخام من بعض الفطريات المعزولة من التربة. مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية- جامعة المستنصرية. 22(4).
- فرج، فوزية؛ مؤيد، سري؛ محمد، رسل. (2013). التحلل الحيوي للمركبات الهيدروكربونية بواسطة الفطريات. مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة- المؤتمر العلمي الأول للعلوم البيولوجية- جامعة بغداد.

- محمد، فايز عبدالحميد؛ شعيب، فرج محمد. (2017). عزل وتعريف بكتيريا بحرية محللة للنفط الخام وقياس قدرتها على النمو في تراكيز مختلفة من النفط الخام والمحلية وإمكانية تكوين مستحلب. المجلة الليبية العالمية- جامعة بنغازي - العدد السابع عشر.

2- المراجع الأجنبية:

- Al-Hawash AB; Zhang X; Ma F. (2019). Removal and biodegradation of different petroleum hydrocarbons using the filamentous fungus *Aspergillus* sp.J Microbiologypen. jan 8(1).
- Al-Nasrawi. H. (2012). Biodegradation of Crude Oil by Fungi Isolated from Gulf of Mexico. J Bioremediation & Biodegradation.3:4.
- Alwan, S. L. and Seker, A. R. (2010). Test the ability of Some Fungi Species in Biodegradation of Some Chemical Pesticides. Kofa University Journal for Life Science. (2) 2.
- Dawood, V.; Madani, M.; Tahmourespour, A. and Golshani, Z. (2015). Heterotropic and Crude Oil Utilizing Crude Oil Contaminated Regions. J BioremedBiodeg.
- Domsch, K. H.; W. Gams and Anderson,T.H. (1980). Compendium of Soil Fungi Academic Press.859 pp.
- Gilman, J. C. (1957). A manual of soil fungi. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, USA, (PP.450).
- Hameed, S. M.; Al-khesraji, O. T.; Bander, A.K. (2013). Study of Seasonal Variation in Fungi Isolated From Petroleum Contaminated Soils In Baiji, Salah adin Province. Tikrit Journal of Pure Science. 18 (5): 114-122.
- Mueller, J.G.; Resnick, S.M.; Shelton,M.E.; Pritchard, P.H.(1992). Effect of inoculation on the biodegradation of weathered Prudhoe Bay crude oil. J.Industrial Microbiology. 10: 95-102.
- Schwendinger, R. B. (1968). Reclamation of soil contaminated with oil. J. Industrial Petroleum. 54:182-197.

- Thouand, G.; Bauda, P.; Oudot, J.; Kirsch, G.; Sutton, C.; Vidalie, J.F. (1999). Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula. Canadian Journal of Microbiology. 45(2): 106-115.