Production of Biological De-Emulsification by Bacterial Isolates Isolated from Local Soils

Dr. Saad H. Khudhair
Water and Environment Directorate \ Ministry of Science and Technology/Baghdad
Email: Saad22004@yahoo.com
Amil A. Halob
Water and Environment Directorate \ Ministry of Science and Technology/Baghdad
Eman H. Gata
Water and Environment Directorate \ Ministry of Science and Technology/Baghdad
Dr. Salah H. Kalaf
Water and Environment Directorate \ Ministry of Science and Technology/Baghdad

Received on: 17/11/2013 & Accepted on:17 /3/2014

Abstract:

The purpose of this research was to isolate local bacterial have the effectiveness of de-emulsification in liquid emulsion. Twenty local isolates of actinomycetes were isolated from soil contaminated with oil waste using mineral liquid medium at initial pH of 7 in the presence of oil waste (1%) as a source of carbon and incubated at 40 $^{\circ}$C for 5 days .

The primary screening of isolates was tested to de-emulsifying ability.Results indicate that the isolates ST_3 , ST_8 and ST_{15} were selected for theirhigh ability to de-emulsification.

Secondary screening of selected isolates was estimated to deemulsification using the spore suspension . Results indicate that the ST_8 isolate showed the highest de-emulsification activity, subsequently was identified and designated as Nocardia sp..
Studied the effects of both the spores number and period of exposure on the effectiveness of de-emulsification. The results showed that the 0.5 ml of spore suspension (10^7 spore/ml) gave the best effective way to de-emulsifying, while 30 min. the best period appropriate to de-emulsifying.

Keywords: de-emulsification, actinomycetes, Nocardia sp..

انتاج مضاد الاستحلاب الحيوي بواسطة عزلات بكتيرية معزولة من الترب المحلية

الخلاصة:

يهدف البحث الى الحصول على عزلات بكتيرية محلية تمتلك فعالية على ازالة الاستحلاب من السوائل المستحلبة ، استخدمت نماذج تربة من مناطق ملوثة بالمخلفات النفطية للعزل، حيث تم الحصول على 20 عزلة محلية من البكتريا الخيطية باستخدام وسط الاملاح المعدنية السائل ذو الرقم الهيدروجيني 7 والحاوي على مخلفات نفطية(1%) كمصدر كربوني والمحضن بدرجة حرارة 40 م$^{\circ}$ لمدة 5 ايام ، بعدها اجريت غربلة اولية لاختبار قدرت العزلات على ازالة الاستحلاب، اظهرت النتائج ان العزلات ST_3 و ST_8 وST_{15} ابدت القابلية الاعلى على ازالة الاستحلاب، اجريت بعدها غربلة ثانوية للعزلات المنتقاة باستخدام عالق الابواغ، بينت النتائج

https://doi.org/10.30684/etj.32.6B.20
2412-0758/University of Technology-Iraq, Baghdad, Iraq
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

ان العزلة ST_8 ابدت القابلية الاعلى على ازالة الاستحلاب للمستحلب المحضر مختبريا، شخصت العزلة المحلية بكونها تعود للجنس Nocardia sp. .

درس تاثير كل من عدد الابواغ وفترة التعريض على فعالية ازالة الاستحلاب، بينت النتائج ان استخدام 0.5 مللتر من عالق الابواغ الحاوي على 10^7 بوغ/مللتر اعطى افضل فعالية لازالة الاستحلاب، فيما كانت الفترة الزمنية المناسبة لازالة الاستحلاب 30 دقيقة.

المقدمة:

بسبب الانتشار الواسع للملوثات العضوية وخصوصاً في البيئة المائية فقد اتجهت كثير من الدراسات إلى إنتاج مضادات الاستحلاب الحيوي لغرض المساعدة في فصل الكثير من الملوثات العضوية عن البيئة المائية المتواجدة فيها وبالتالي المساهمة في استخدام طرق الفصل الميكانيكية للتخلص منها، اذ اصبحت السوائل المستحلبة والتي تنتج خلال عمليات صناعة النفط المختلفة من اهم مشاكل صناعة النفط التي تؤدي الى تلوث البيئة [1].

وقد استخدمت تقنيات عديدة (فيزيائية وكيميائية) لإزالة الاستحلاب من الأوساط المائية ومنها التحكم بالرقم الهيدروجيني, الترسيب بالطرد المركزي , الترشيح, المعاملة الحرارية إلا أن لكل طريقة فوائدها وعيوبها وتشترك جميعاً بأنها تحتاج إلى كلف مالية عالية بالإضافة إلى مضارها البيئية [2] ، إلا إن الأنظار اتجهت في السنوات القليلة الماضية الى مضادات الأستحلاب البايولوجية وذلك من خلال استخدام الأحياء المهجرية او مكوناتها أو أنزيماتها نظراً الى كفاءتها وأنخفاض تكاليفها ولعدم اضرارها بالبيئة[3]، وقد أجريت العديد من الدراسات لعزل أحياء مجهرية لها قابلية على إزالة الاستحلاب ومنها الأنواع التابعة للأجناس Nocardia , Corynebacterium , Rhodcoccus , Bacillus , Lactobacillus , ، كما ركزت العديد من الدراسات الحالية على الأنواع التابعة للبكتريا الخيطية لكونها أظهرت القابلية الأعلى على إزالة الاستحلاب للكثير من المستحلبات وخصوصاً النفطية [4].

المواد وطرائق العمل:

عزل الاحياء المجهرية

استخدمت نماذج تربة ملوثة بالمشتقات النفطية جمعت من مرائب سيارات ومحطات وقود من منطقتي جسر ديالى والجادرية لعزل الاحياء المجهرية القادرة على ازالة الاستحلاب من الاوساط السائلة، حيث لقح وسط الاملاح المعدنية السائل ذو الرقم الهيدروجيني 7 والحاوي على مخلفات نفطية(1%) كمصدر كربوني وحيد والمعقم بالموصدة بنماذج التربة، حضنت الدوارق بالحاضن الهزاز بسرعة 200 دورة/دقيقة وبدرجة حرارة 40 م° ولمدة 5 ايام، استخدم 0.5 مللتر من المزرعة السائلة لتلقيح وسط الاملاح المعدنية الصلب المعقم للحصول على عزلات بكتيرية نقية [5].

تحضير المحاليل

أ- حضر المستحلب القياسي من خلط كل من الكيروسين ومحلول Triton X-100 بتركيز 0.2% بنسبة 1:2 على التوالي، حيث مزج الخليط باستعمال جهاز المازج عالي السرعة لمدة 1 دقيقة [2].

ب_ حضر مستحلب الديزل باستخدام الديزل بدلاً من الكيروسين وبنفس الطريقة المتبعة بالفقرة (أ) اعلاه [6] .

قياس فعالية ازالة الاستحلاب

اضيف حجم 0.2 مللتر من النمو البكتيري او من عالق الابواغ الى 3 مللتر من محلول المستحلب في انبوبة اختبار، بعدها يمزج المحلول لمدة دقيقة واحدة بجهاز المازج، ثم يقاس حجم المستحلب المتبقي في انبوبة الاختبار خلال فترات معينة، اذ ينفصل عن الجزء الغير مستحلب والمكون من الهيدروكاربون والماء.

تعرف فعالية ازالة الاستحلاب (De-emulsifying activity) بانها العمر النصف للمستحلب ($t_{1/2}$) وهي الفترة الزمنية اللازمة لانخفاض حجم المستحلب في انبوبة الاختبار الى النصف بدرجة حرارة الغرفة [7].

الغربلة الاولية للعزلات

استخدمت طريقة [2] للتحري عن قدرة العزلات البكتيرية على ازالة الاستحلاب، حيث لقحت العزلات على وسط الاختبار الصلب المكون من المكونات ادناه:

componants	Concentration g\l

10	Soluble starch
1	K_2HPO_4
1	$MgSo_4$
1	NaCl
1	$(NH4)SO_4$
2	$CaCo_3$
0.001	$FeSo_4$ $7H_2o$
0.001	$MnCl_2$ $7H_2o$
0.001	$ZnSo_4$

ذوبة المكونات في لتر ماء مقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 7 وعقم الوسط بالموصدة ، لقحت الاطباق بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 40 م° لمدة 5 ايام، بعدها نقل جزء من المستعمرات النقية الى المستحلب القياسي ومزج لمدة دقيقة واحدة بجهاز المازج ثم قدرة فعالية ازالة الاستحلاب بدرجة حرارة الغرفة (الفترة الزمنية بالدقائق اللازمة لخفض حجم المستحلب الى النصف) وحسب قدرة العزلات البكتيرية المستخدمة [2].

حساب عدد الابواغ في عالق الابواغ

استخدمت شريحة العد المجهري (Haemocytometer) لحساب عدد الابواغ في عالق الابواغ المستخدم للتلقيح وبالتخافيف الملائمة للحصول على التركيز المطلوب لتلقيح الأوساط المعدة لإنتاج مضاد الاستحلاب، حيث استخدمت المربعات الخاصة بحساب كريات الدم الحمراء لحساب عدد السبورات وحسب المعادلة التالية:

عدد السبورات(مللتر)=عدد السبورات الكلي المتواجد في خمسة مربعات×800 × مقلوب التخفيف

الغربلة الثانوية للعزلات

استخدم 0.2 مللتر من عالق الابواغ الحاوي على 10^7 بوغ/مللتر لاختبار فعالية العزلات الانشط على ازالة الاستحلاب، حيث لقحت العزلات البكتيرية الانشط على وسط الاختبار الصلب وحضنت بدرجة حرارة 40 م° لمدة 5 ايام ، عمل قشط للابواغ البكتيرية باستخدام 10 مللتر ماء مقطر معقم، عمل طرد مركزي بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقيقة، اخذ الراسب الحاوي على الابواغ واعيد تعليقة في 10 مللتر ماء مقطر معقم، استخدم عالق الابواغ لاختبار فعالية العزلات الانشط على ازالة الاستحلاب(الفترة الزمنية بالدقائق اللازمة لخفض حجم المستحلب الى النصف) وذلك باضافة 0.2 مللتر منه الى 3 مللتر من محلول المستحلب القياسي وحضنه بدرجة حرارة الغرفة [2].

تشخيص العزلة الانشط

شخصت العزلة المحلية الانشط وذات القابلية الأعلى على ازالة الاستحلاب في مختبرات قسم التقنيات الاحيائية في مركز معالجة الملوثات وعلى أساس الصفات المظهرية باستخدام المجهر الضوئي وبعض الصفات الفسلجية، واعتماداً على المفاتيح الخاصة بالتشخيص [8].

الظروف المثلى لازالة الاستحلاب

درس تاثير كل من عدد الابواغ ووقت التعريض على فعالية ازالة الاستحلاب للعزلة الانشط، حيث استخدمت حجوم مختلفة(0.1 ,0.2 ,0.3 ,0.4 ,0.5 ,0.6 ,0.7 ,0.9,0.8 مللتر) من عالق الابواغ الحاوي على 10^7 بوغ/مللتر لاضافتها الى 3 مللتر من محلول المستحلب القياسي، ثم حضنها بدرجة حرارة الغرفة لمدة 40 دقيقة، بعدها قدرت فعالية ازالة الاستحلاب للعزلة الانشط باستخدام لقاح الابواغ الامثل وخلال فترات حضن مختلفة (5 ,10 ,15 ,20 ,25 ,30 ,35 ,40 ,45 ,50 ,55 ,60 دقيقة) بدرجة حرارة الغرفة [2].

النتائج والمناقشة:

عزل الاحياء المجهرية

عزلت 20 عزلة بكترية من نماذج التربة الملوثة بالمخلفات النفطية والتي تم اخذها من مناطق بغداد (جسر ديالى والجادرية) والتي شملت مرائب للسيارات الملوثة بالهيدروكاربونات ومحطات للوقود، شخصت جميع العزلات المعزولة بكونها بكتريا خيطية وذلك بالاعتماد على الفحص العيني للمستعمرات النامية، إذ تتميز مستعمرات البكتريا الخيطية بكونها صلبة يصعب أزالتها من الوسط الصلب وبلونها الطباشيري بالإضافة إلى رائحة التربة المتعفنة الصادرة عن المستعمرات النامية.

الغربلة الاولية للعزلات

تمت غربلة 20 عزلة من البكتريا الخيطية المعزولة من نماذج التربة، حيث نميت العزلات على وسط الاختبار الصلب ثم نقل جزء من المستعمرات البكتيرية الى المستحلب القياسي، تظهر النتائج في الجدول(1) وجود تباين بين العزلات على ازالة الاستحلاب، فقسم منها ابدى فعالية على ازالة الاستحلاب فيما لم تظهر عزلات اخرى اي فعالية، كما وابدت 11 عزلة فقط فعالية على ازالة الاستحلاب، ومن بينها اعطت العزلات ST_3 و T_8 و ST_{15} الفعالية الاعلى على ازالة الاستحلاب وبالاعتماد على الفترة الزمنية اللازمة لازالة الاستحلاب.

جدول رقم (1): الغربلة الاولية لقابلية العزلات البكتيرية المعزولة من نماذج الترب الملوثة على ازالة الاستحلاب.

ت	العزلات البكتيرية	فعالية ازالة الاستحلاب ($t_{1/2}$) دقيقة
1	ST_1 و ST_{12}	100
2	ST_2	185
3	ST_3	62
4	ST_8	55
5	ST_{11} و ST_{13} و ST_{14}	140
6	ST_{15}	70
7	ST_{16} و ST_{19}	165
8	ST_4 و ST_5 و ST_6	اكبر من 200
9	ST_7 و ST_9 و ST_{10}	اكبر من 200
10	ST_{17} و ST_{18} و ST_{20}	اكبر من 200

الغربلة الثانوية للعزلات الانشط

استخدم 0.2 مللتر من عالق ابواغ العزلات الثلاثة الانشط لاختبار فعاليتها على ازالة الاستحلاب، يبين جدول(2) ان العزلة ST_8 ابدت اعلى فعالية على ازالة الاستحلاب (55 دقيقة)، لذا فقد تم انتخابها للتجارب اللاحقة، شخصت العزلة المنتخبة بكونها تعود للجنس .Nocardia sp

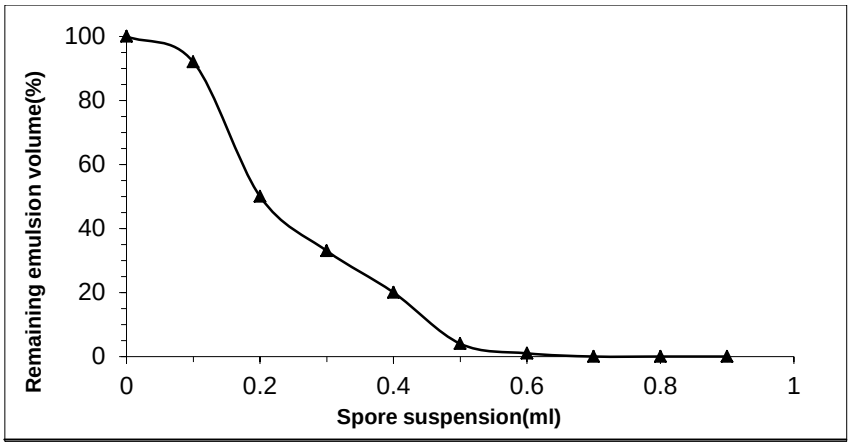
جدولرقم (2): الغربلة الثانوية للعزلات البكتيرية الانشط على ازالة الاستحلاب .

ت	العزلات البكتيرية	فعالية ازالة الاستحلاب ($t_{1/2}$) دقيقة
1	ST_3	57
2	ST_8	55
3	ST_{15}	65

استطاع [2] من عزل 50 عزلة من البكتريا الخيطية، وعند اختباره لكفاءة العزلات على ازالة الاستحلاب، ظهر ان 23 عزلة فقط ابدت قابلية على ازالة الاستحلاب، وان العزلة *Streptomyces* sp. AA8321 اظهرت اقصى فعالية لازالة الاستحلاب، كما قيام [6] باختبار كفاءة عزلتان على ازالة الاستحلاب ، بينت النتائج ان العزلة *Nocardia amarae* اعطت افضل فعالية لازالة الاستحلاب ، وفي دراسة اخرى قام [9] باختبار كفاءة 9 عزلات بكتيرية على ازالة الاستحلاب بشكل منفرد او بشكل مزرعة خليطة، حيث اشارت النتائج ان المزرعة البكتيرية الخليطة اعطت الفعالية الاعلى على ازالة الاستحلاب مقارنة مع استخدام كل عزلة وبشكل منفصل.

تاثير عدد الابواغ

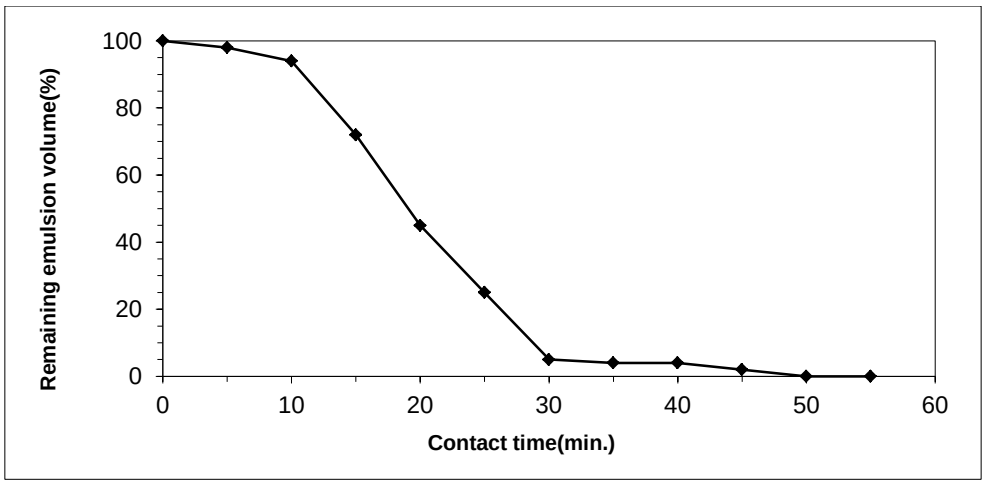
استخدمت حجوم مختلفة من عالق الابواغ للعزلة المنتخبة ST_8، اذ يظهر شكل(1) وجود علاقة طردية بين عدد الابواغ وفعالية العزلة على ازالة الاستحلاب، حيث يلاحظ من الشكل بان العزلة ST_8 تمكنت من ازالة 96% من مستحلب الديزل عند استخدام 0.5 مللتر من عالق الابواغ مقارنة بازالة 50% من المستحلب عند استخدام 0.2 مللتر من نفس عالق الابواغ، وعلية فقد اعتمد الحجم لاكمال باقي التجارب.



شكل رقم (1):تاثير عدد الابواغ في فعالية ازالة الاستحلاب للعزلة المحلية .Nocardia sp ، اضيفت حجوم مختلفة من عالق الابواغ(الحاوي على 10^7 بوغ/مللتر) ولكل معاملة الى 3 مللتر من مستحلب الديزل ، مزج المحلول وترك لمدة 40 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة، ثم قيس حجم المستحلب المتبقي.

تاثير فترة التعرض

عرض خليط عالق الابواغ ومستحلب الديزل الى فترات حضن مختلفة وبدرجة حرارة الغرفة، حيث يظهر الشكل(2) ان النسبة المئوية لحجم المستحلب المتبقي انخفضت بزيادة فترة التعرض لتصل الى 5% عند بقاء خليط التفاعل لمدة 30 دقيقة، بعدها قل مقدار الانخفاض في حجم المستحلب، وعلية فان فترة 30 دقيقة تعتبر الامثل عند اجراء اختبار فعالية ازالة الاستحلاب.



شكل رقم (2): تاثير فترة التعرض على فعالية ازالة الاستحلاب للعزلة المحلية .Nocardia sp وباستخدم 0.5 مللتر من عالق الابواغ الحاوي على 10^7 بوغ/مللتر ولكل المعاملات.

تمكن [10] من استخدم خليط مزرعة بكترية لازالة الاستحلاب، حيث اظهرت المزرعة الخليطة قدرة على ازالة 44% من المستحلب بعد ساعة واحدة و 96% بعد 24 ساعة من الحضن، وفي دراسة اخرى استخدم [3] خلايا بكتريا .Micrococcus sp لازال الاستحلاب، حيث لاحظ وجود علاقة طردية بين تركيز الخلايا المستخدمة وفعالية ازالة الاستحلاب وهذا يتطابق مع النتائج الحالية بخصوص عدد الابواغ، وبما ان الحجم المستخدم من عالق الابواغ يعد كبير جدا وخاصة عند اعتماده في التجارب الحقلية فانه سيكون من الافضل استخدام الحجم 0.2 مللتر مع اطالة فترة الحضن وهو الانسب اقتصاديا، فيما بين [2] ان استخدام 10^8 بوغ/مللتر ادى الى ازالة 95% من المستحلب بعد 30 دقيقة وهو ما تم التوصل اليه ايضا في هذه الدراسة.

References:

[1]. Kosaric,N., Duvnjak, Z. and Cairns,W. L.(De-Emulsification of complex petroleum emulsions by use of microbial biomass) Environm. Progress, 6, 1, 33-38, (2006).

[2]. Park,S. H., Lee, J., Ko, S., Lee, D., and Lee, H. K.(Demulsification of water-in-oil emulsions y aerial spores of a Streptomyces sp.) Biotech. Letters, 22, 1389-1395, ,(2000).

[3]. Das,M.(Characterization of de-emulsification capabilities of a *Micrococcus* species) Bioresource Technology, 79, 1, 15-22, (2001).

[4]. Leppehen, K., Daussmann, T., Curvers, S. and Bertau, M.(Microbial De-emulsification: Ahighly efficient procedure for extractive workup of whole-cell-biotransformations) Organic Process Research and Development, 10, 1119-1125, (2006).

[5]. Cairnc, W., Cooper, D., Zajic,H., Wood, J. and Kosaric, N.(Characterization of *Nocardia amarae* as a potent biological coalescing agent of water-oil emulsions) Appl. And Environment Micrpbiology, 43, 2, 362-366, (1982).

[6]. Stewart, A.L., Gray, N.C.C., Cairns,W. and Kosaric, N. (Bacteria-induced De-emulsification of water-in-oil petroleum emulsions) Biotech. Letters, 5, 2, 725-730, (1983).

[7]. Wilkinson, M.A. and Cooper, D.G.(Testing of Microbial Demulsifers with Heavy Crude Emulsions. Biotechnology Letters, 7, 6, 406-408, (1985).

[8]. Holt, J., G., Krieg, N., R., Sneath, P., H. Staley, J., T. and Williams, S., T. (B ergeys manual of systematic bacteriology), Williams and Wilkins, (1994).

[9]. Nadarajah,N., Singh,A. and Ward,O.P.(De-emulsification of petroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture) Process Biochemistry, 37, 10, 1135-1141, (2002).

[10]. Nadarajah,N., Singh,A. and Ward,O.P. (Evaluation of a mixed bacterial culture for de-emulsification of water-in-petroleum oil emulsions) World J. of Microbio. and Biotech., 18, 435–440, (2002).