مجلة القادسيه للعلوم الصرفه المجلد 16 العدد 3 سنة 2011

عزل وتشخيص الفطريات من الترب الملوثة بالموادالهيدروكاربونية

لبنى عبد المطلب

مركز بحوث البيئة / جامعة بابل

الخلاصه :-

تم عزل الفطريات من ترب ملوثة وترب غير ملوثة بالمخلفات النفطية لمناطق مختلفة لمدينة الحلة .حيث أظهرت الدراسة مجموعة كبيرة من الفطريات كان لها القدرة على النمو في كلا التربتين. وكانت الفطريات الناقصة Deutromycotinaهي السائدة .إما الجنس Aspergillusفتميز بنسبة ظهور عالية والذي شمل ثلاثة أنواع هي *Asp.flavus ,Asp. niger ,Asp. Terrus*.إما باقي الأنواع فقد ظهر نوع واحد لكل منها بالإضافة إلى الخمائر والخيوط العقيمة السوداء والبيضاء .

وان أعلى نسبة للظهور كانت لفطر*Asp . terrus ,Asp. niger ,Penicilium sp.,Cephalosporium sp.* ولكلا التربتين وكذلك لاحظنا إن لتأثير درجة الحرارة الأثر الواضح في نمو هذه الفطريات حيث نلاحظ إن الخمائرقد سجلت أعلى نسبة للظهور بدرجة حرارة25 درجة مئوية ، اما باقي الفطريات فسجلت بدرجة حرارة 35,30 درجة مئوية .

المقدمة :-

أن التلوث البيئي اخطر كارثة يواجهها الإنسان ،إذ تنتقل الملوثات من أقصى الشمال إلى أقصى الجنوب ، فهي لا تعرف حدودا إقليمية . وتساهم الرياح والسحب والتيارات المائية وغيرها في نقل الملوثات من بلد إلى أخر .وتمثل المواد الهيدروكاربونية (Polycyclic aromatic hydrocarbons . PAHs) احد هذه الملوثات الموجودة في الماء واليابسة .(17).

والهيدروكاربونات هي مركبات عضوية تركيبها الأساسي هو الكربون والهيدروجين والأوكسجين وهي موجودة في الطبيعة على نوعين ،الهيدروكاربونات الاليفاتية والهيدروكاربونات الاروماتية .(5) .وتكون هذه المواد مقاومة للتحلل ، لذلك فهي تتجمع بكميات ضخمة في البيئة ، وتمتلك أكثر من 70 مركب يصنف على انه مواد هيدروكاربونية تمتلك من(2 _7) حلقات.

وتتواجد هذه المواد في البيئة من حرق الوقود وانبعاثات عوادم السيارات وعمليات استخراج النفط ،بالإضافة إلى المولدات و المخلفات الصناعية ومن المصادر الأخرى عمليات معالجة التربة بمخلفات المجاري كمخصبات . والتي ظهر أنها تحتوي على تراكيز واضحة ومميزة من مركبات (PAHs) حيث وجد إن المخلفات تحتوي على تراكيز من هذه المركبات تتراوح مابين(1-10) ملغم / كغم (20) . وان وجود هذه المواد في مياه الصرف الصحي الناتجة من الاستعمالات المنزلية والصناعية، قد سبب مشكلة في معالجة هذه المياه) .(9كذلك توجد مصادر طبيعية للمواد الهيدروكاربونية مثل تربين وايزوبرين والاثلين، و الناتج من التفسخ البكتيري المعروف بغاز المستنقعات (10). بالإضافة إلى انسياب المواد الهيدروكاربونية إلى المياه والترب والتي يعتبر احد الملوثات الخطيرة للبيئة ، وذلك من خلال تقليل التنوع الميكروبي الذي اثر على ظاهرة الاختيارية لهذه الإحياء (16)

وقد أدى الاستخدام الواسع للمولدات التجارية والأهلية إلى التلوث العالي بالموادالملوثة . فبالإضافة إلى الغازات المنبعثة من عوادم المولدات وبالأخص زيادة نسبة غاز , CO_2, CO والرصاص الذي تجاوزت أقطار دقائقه إل(4) مايكرو متر، مما تسبب في زيادة حالات الصداع والضعف العام والغيبوبة والتشنجات وحالات الإجهاض ، انخفاض نسبة الكالسيوم مما يسبب تاكل عظام الجسم ، التخلف العقلي لدى الأطفال وغيرها من الإمراض ،و تعتبر هذه المركبات مواد مسرطنه للإنسان .(4)

دورا لأحياء المجهرية في تحلل المواد الهيدروكاربونية :-

توجد أنواع عديدة من الإحياء المجهرية كالبكتريا والفطريات والتي لها القابلية على التحليل البايلوجي للمواد الهيدروكاربونية . حيث إن لكل كائن دور معين في عملية التحليل.إذ تنشـط البكتريا في البيئات المائية. إما الفطريات فدورها يتجلى في بيئات اليابسـة على الاغلب. وقد اطلق على سـلسـلة عمليات التحلل والتكسـير لهذه المواد وتحويلها إلى مواد ابسـط بالتحلل البايلوجي(Biodegradation) ،التمعدن (Mineralization)،التحول البـايلوجي(Biotransformation) ،المعـالجـة الحيـاتيـة والتراكم الحيـاتي (Bioremediation and Bioaccumulation).إن تعريف التحلل البايلوجي هو المعالجة البايلوجية من خلال تكسير المواد الكيمياوية وبشكل عام هي سلسلة من التفاعلات البايوكيمياوية التي تحدث للمواد الهيدروكاربونية .وعند إكمال عملية التكسير تدعى العملية التمعدن حيث إن الناتج هو ماء وغاز CO_2وغيرها من المواد الغير عضوية . ويشير التحول الحياتي إلى مسار التفاعلات الكيميائية التي تحث الجزيئة لتتحول إلى مواد مختلفة . (8)

اما المعالجة الحياتية هي تحويل المواد الأكثر سمية إلى مواد اقل سمية. وأخيرا التراكم الحياتي الذي تعمل فيه الإحياء على تركيز وتراكم المواد في أجسامها ، وبالتالي فهي إحدى خطوات المعالجة الحياتية (19) . وقد أشارت بحوث كثيرة حول القدرة العالية للأحياء المجهرية في تحليل المواد للهيدروكاربونات (12).

حيث أشار Pickard وجماعته (17) إلى قدرة فطريات white rot fungiعلى هضم polychlorinated biphenyls، وامتلاك الفطر *Coriolopsis gallica* القابلية على أكسدة 10 مركبات هايدروكاربونية باستخدام أنزيم Laccase، في حين أظهرت دراسة أخرى قدرة *Phanerochaete chrysosporium* لتحليل المواد الهيدروكاربونية وذلك لامتلاكه أنزيم لكنينlignin (9).أما Mancera-Lopez وجماعته (16) فقد شخص ثلاثة فطريات لها القابلية لازالة الهايدروكاربونات وهي *A.sydowii , P.funiculosum , Rhizopus sp* .
إن عمليات التحلل البايلوجي تستخدم لمعالجة التلوث الهيدروكاربوني في الترب . حيث إن المواد ذات الأوزان الجزيئية الصغيرة والتركيب البسـيط من السـهل اسـتغلالها كمصـدر للطاقة بواسـطة بعض الإحياء المجهرية . في حين نلاحظ إن المواد ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة والأكثر تعقيدا تكون أكثر مقاومة للكسر والتحليل بواسطة الإحياء المجهرية . لذلك نلاحظ إن إزالة المواد المسرطنة ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة تكون غير تامة بسبب إن هذه المواد لا تذوب بشكل كامل في الماء .(13).

ونظرا لمشـاكل التلوث التي تعاني منها المدن العراقية ابتداء من تلوث الهواء وانتهاء بالتلوث البصـري ولغرض تسـليط الضـوء على احد مصادر التلوث ،فقد استهدفت الدراسة الاثار السلبية للمولدات الكهربائية من خلال طرحها للمخلفات النفطية إلى الترب القريبة منها وقدرة بعض الأحياء المجهرية المتمثلة بالفطريات من النمو في مثل هذه الترب وذلك من خلال دراسـة الخطوات التالية ،عزل وتشـخيص الإحياء المجهرية والمتمثلة بالفطريات والموجودة في الترب الملوثة بالمخلفات النفطية ومقارنتها بالترب غير الملوثة لغرض الاسـتفادة منها في المعالجة .وكذلك دراسة تأثير درجات الحرارة على نمو هذه الفطريات .

طريقة العمل :-

جمع العينات:-

تم جمع العينات من ست مواقع لترب ملوثة بالكاز ودهن المحركات و قريبة من المولدات و اخرى غير ملوثة بمسافة 9 امتار عن المناطق الملوثة لعدة مناطق من مدينة الحلة وتمثلت بمنطقة البكرلي والكرامة وشـارع اربعين بالاضـافة الى كلية علوم البنات ، جامعة بابل، وقد كانت العينات عشوائية وبواقع عينتين لكل موقع .

التجارب المختبرية :-

طريقة العزل والتنقية والحفظ للمزارع الفطرية

استعملت طريقة التخفيف في عزل الفطريات من عينات الدراسة حسب طريقة(6) اذ اضيف 1غم من التربة إلى100 مل ماء معقم، ثم رج الخليط مدة دقيقة واحدة و ترك ليستقر مدة عشر دقائق ،عملت سلسلة تخافيف للعالق ،وبعد اجراءتجارب اولية تم اختيار التخفيف الثالث .

نقل 1 سم3 من العالق إلى كل طبق بتري وصب فوقه الوسط الزرعي ، حرك الطبق لزيادة انتشار العالق بعدها ترك الطبق لحين تصلب الوسط .ثم يحضن بالحاضنة بحسب درجة الحرارة المراد دراستها ولمدة من 5-10 أيام. تحفظ العينات عن طريق عمل slant في الثلاجة وتجدد بين فترة وأخرى لإجراء التجارب المختبرية عليها

ملاحظة :تم اختيار مجموعة من درجات الحرارة لغرض الدراسة وهي 25 ،30 ،35،40 م° .

تشخيص الفطريات:-

اجري الفحص الأولي للمستعمرات الفطرية النامية على الأوساط الزرعية باستعمال مجهر تشريح ،وحضرت شرائح زجاجية لهذه المستعمرات لغرض دراسة صفاتها الدقيقة تحت المجهر الضوئي المركب . وقد اعتمدت المصادر الآتية في تشخيص وتصنيف الفطريات المعزولة (11 ; 18)

خواص التربة الكيميائية والفيزيائية

قيست الاس الهيدروجيني الايصالية الكهربائية للمواقع الستة باستخدام جهاز MI 180 Bench meter بعمل مستخلص للتربة 1غم تربة :1 مل ماء مقطر

النتائج والمناقشة:-

تم خلال البحث عزل 11 نوع من الفطريات والخمائر،تعود إلى 7 أجناس زيادة على الخيوط العقيمة السوداء والبيضاء .جدول (1)

وأوضحت النتائج سيادة الفطريات الناقصة Deutromycotina ولكافة المناطق التي جلبت منها العينات شكل (1) .وقد وجد إن هنالك نوع واحد لكل جنس ماعدا جنس *Aspergillus* الذي كان أكثر الأجناس ظهورا وتمثل بثلاثة أنواع هي *Asp.terrus ,Asp.flavus,Asp.niger*.

وقد سجلت اعلى نسبة ظهور للأنواع الفطرية التالية *Cephalosporium sp. ,Pen.sp. ,Asp. niger ,Asp. terrus* بالإضافة إلى الخمائر حيث بلغت 100% .أما اقل ظهور قد سجل لفطر Asp.flavus والتي كانت 3%في الموقع 2 يليه *Asp.niger* في الموقع 3، وكلاهما كانت في معاملة الترب الملوثة .أما باقي الفطريات فقد تراوحت نسبة الظهور مابين (13.5-96.7)%.

أظهرت النتائج أن أفضل درجة كانت 35, 30م حيث نلاحظ أن هناك مجموعة كبيرة من الفطريات قد ظهرت مثل *Pen.sp.Asp.flavus, Asp. terrus ,Candida sp ,Acremonium sp, Stachybotry sp, Trichoderma sp,Alternaria alternate, Cephalosporium sp,Asp.niger*. هذا ربما يعود إلى إن الفعاليات الحيوية لنمو هذه الفطريات تصل إلى قمة نشاطها عند درجة الحرارة المثلى للنمو ليسهل استغلال المصادر الغذائية في الوسط (Maheshwari , etal .2000). كذلك لوحظ نمو المستعمرات الفطرية في الترب الملوثة كان ضعيفا،وهذا قد يعود إلى التراكيز العالية للمواد الهيدروكاربونية والتي ثبطت من نمو الفطريات ، أو وجود عوامل ساعدت في عدم تكسير هذه المواد الهيدروكاربونية ،وهي الصفات الفيزيائية والكيميائية لهذه المواد ،حيث أنها حددت تكسير وتحلل هذه المواد أو تكوينها لمواد سامة ربما كان لها تاثير تثبيطي في نمو الفطريات (7) .

اما الانتشار الواسع لفطر *Asp.terrus* يعود لامتلاك هذا الفطر قابلية عالية على تحليل بعض المركبات الاروماتية مثل الاسنفثين ،حيث تصل إلى 95% .(1) .أما ظهور الخمائر فامتلاكها قدرة على تحليل المواد الهيدروكاربونية وهذا ما أثبته MacGillirary and Shiaris

(14) .اما جدول (2) يوضـح الاس الهيدروجينية للتربة ، والتي تراوحت بين 7.3-7.5 .وهذه قريبه من دراسـة Mancera-Lopgez وجماعته (16) . إن هذا النوع من الترب يعرف بالمتعادل ، وهذه الترب مثالية لنمو الأحياء المجهرية و المحاصـــيل الزراعية ، وذلك لملائمتها لنمو الاحياء المجهرية . إن زيادة تركيز ايون الهيدروجين له التأثير الكبيرعلى مكونات التربة وبالأخص معادن الطين وتحلل المادة العضوية،بالإضافة إلى النشاط الحيوي لها (2).

أما بالنســـبة للايصـــالية الكهربائية للتربة فيوضـــحها الجدول(3).حيث نلاحظ إن هنالك اختلاف بقيم الايصـــالية بين التربة الملوثة بالهيدروكاربونات و الترب غير الملوثة .وقد تراوحت قيمها للترب الغير ملوثة بين(14.4 _16.2) مليموز /ســـنتمتر اما الترب الملوثة فنلاحظ ان نسبة الايصـالية الكهربائية كانت (12.3_13.2)مليموز/سم وهذا ربما قد يعود الى عدم اذابة الاملاح وان تقدير الأملاح الكلية الذائبة في مسـتخلص التربة من التقديرات الرئيسـية الهامة للحكم على ملوحة التربة .كما إن تأثير الأملاح لا يتوقف على كميتها في التربة فقط بل على نوعية تلك الأملاح . إ ن التوصـيل الكهربائي للمحلول المائي يزداد بزيادة ايونات الأملاح الذائبة فيه ، أي بزيادة تركيزها في الترب الغير ملوثة بالهيدروكاربونات .(5).اما تاثير الايصالية الكهربائية على التنوع الفطري فنلاحظ ان هناك علاقة عكسية بين المحتوى الملحي والمحتوى الفطري ،اذ يتاثر ظهور الفطريات بايصـالية الكهربائية(6). وهذا واضـح في الجداول (2,4) . من خلال ما تقدم تبين لنا النتائج امكانية الاستفادة من بعض الفطريات كمعالجة بيئية والتي تكون غير ضـارة على النظام البيئي مثل فطر *Trichoderma sp.* في التقليل من اثر المواد الهيدروكاربونية في الترب

درجة الحرارة	موقع 1		موقع 2		موقع 3		موقع 4		موقع 5		موقع 6	
	A**	B ***	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
25	Asp .niger *19% ,Asp. Flavus 80%		Candida sp 100%	Candida sp 100%	Candida sp 100%	Candida sp -100%	—	—	Cephalosporium sp 100%	Cephalosporium sp 100%	—	—
30	,Asp .terrus 50% White mycelia 30% ,Alternaria alternate 20%.	———	Pen.sp 100% ,	,Asp .terrus 55%, Asp.flavus % 44	Candida sp 100%	———	,Asp. Flavus 50% ,Asp. Terrus 33% Pen.sp 16%	———	Acremonium sp 20% Stachybotry sp 40% Trichoderma sp 40%	———	–	—
35	Asp. Terrus 100%	Asp. Terrus 100%	Asp. Terrus 100%	Asp. Terrus 100%	Asp .niger 20% Penicelium sp80%	Asp .nige r 100%	Asp .terrus 50% ,Asp. Flavus 50%	Asp. Terrus 40% Pen. Sp 20% Asp .niger 40%	———	Cephalosporium 50% Asp. Niger 50%	Asp. Terrus 100%	Asp. Terrus 100%
40	Asp. Terrus 100%	Asp. Terrus 100%	Asp. Terrus10 0%	Asp. Terrus 96% Asp .flavus 3%	Asp. Terrus 100%	Asp. Terrus 92% Asp .flavus 3.8% Asp .niger %3,8	Asp. Terrus 68% Asp .flavus %13,5 White mycelia 18%	Asp. Terrus 100%	Asp. Terrus 100%	Asp. Terrus 60% Asp. Niger 40	Asp. Terrus 100%	Asp.Terrus 100%

حرارة	موقع 1		موقع 2		موقع 3		موقع 4		موقع 5		موقع 6	

		Cephalosporiu	Cephalosp			Cand –100%	Candida sp	Candida sp 100%	Cand 100%		Asp .niger *19% ,Asp. Flavus 80%	
		–	Acremoniu Stachybo Trichoder		,Asp. F ,Asp. T 33% F	—	Candi	,Asp . Asp.	F	–	,Asp . White m ,Alte alt	
Asp. T	Asp. T	Cephalosp Asp.	—	Asp. T Pe Asp	Asp . ,Asp. F	Asp .	Asp Penicelium s	Asp. T	Asp. T	Asp. T	Asp. T	
Asp.T	Asp. T	Asp. T Asp.	Asp. T	Asp. T	Asp. T Asp . White m	Asp. T Asp . Asp	Asp. T	Asp. T Asp .	Asp. Terrus	Asp. T	Asp. T	

جدول رقم (1) يمثل تأثير درجات الحرارة على نمو المستعمرات الفطرية و النسبة المئوية لظهور المستعمرات الفطرية

%* يمثل النسبة المئوية للمستعمرات الفطرية . A** يمثل ترب غير ملوثة بالهيدروكاربونات . B*** يمثل ترب ملوثة بالهيدروكاربونات

جدول (2) يمثل الأس الهيدروجيني لكلا النوعين من الترب ، ترب ملوثة وترب غير ملوثة .

العينة	ل الهيدروجيني.	
	غير ملوثة	ملوثة

1	7.4	7.3
2	7.4	7.4
3	7.4	7.4
4	7.4	7.4
5	7.5	7.5
6	7.4	7.3

جدول (3) يمثل حموضة التربه لكلا النوعين من الترب ، ترب ملوثة وترب غير ملوثة .

رقم العينة	التوصيلية الكهربائية cm/Mmohs	
	غير ملوثة	ملوثة
1	14.5	12.3
2	13.6	11.6
3	14.5	12.4
4	14.2	12.6
5	13.8	11.9
6	13.8	12.3

Asp. Flaves

Cephalosporium sp.

شكل (1) يوضح بعض الأنواع الفطرية المعزولة خلال البحث

المصادر :-

1_الدوسري ،مصطفى عبد الوهاب نجم .(1998) قابلية بعض الفطريات المعزولة من رسوبيات مصب شط العرب وشمال غرب الخليج العربي على تكسير المركبات الهيدروكاربونية الاروماتية المتعددة النوى . رسالة ماجستير ، جامعة البصرة .

2_ الشلش ، علي حسين .(1981) جغرافية التربة . جامعة البصرة .

3-حسن ،سليمان حبيب ، السفدجلاني ،عبد الرحمن محي الدين ، بطحة ، عدنان غازي ، 2006 ،اسس علم التربة والجيولوجيا ،كلية الزراعة ،جامعة دمشق .

4-خنسي ، بيوار .(2005) البترول وأهميته ومخاطره وتحدياته .. هولندا.

5- عواد ، كاظم مشحوت (1986) مبادئ كيمياء التربة . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة البصرة .

6-Abdel-Hafez,S.I..I.(1982) Survey of the mycoflora of desert soils in Saudi Arabia . Mycopathol.,80:3-8.

7-Aitken ,M.and Pfaender ,F. (2007) .Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons .project 5 ,University of North Carolina .

8-Alexander ,M.1981 .Biodegradation of chemicals of environmental concern .Science 211;132-138

9-Benner.B.A. ,etal .1990.Polycyclic aromatic hydrocarbons emissions from the combustion of crud oil on water.Environ .Sci .Technol .24 ;1418-1427.

10-Cerniglia,C.E. 1997 .Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbon :past ,present and future application in bioremediation. J Ind Microbial .Biotechnol 19:324-333.

11-Ellis,M.B. (1993)Dematiaceous Hyphomycetes . International Mycological Institute ,U.K.

12- Leahy .J.G. and Colwell, R.R. 1990 Microbiol .Rev.54. 305-315

13-Lundstedt ,S. 2003 .Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes. Sweden : depart .of chemistry ,environ chemistry .Umea Unversity 1-55.

14-MacGllivary,A.R. and Shiaris, M.P. 1993 .Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbon by yeast isolated from coastal sediments Appli .Envi. ,Microb. 59: 1613-1618.

15-Maheshwari ,R. ,Bharadwaj , G. and Bhat ,M.2000 .Thermophilic fungi , their physiology and enzymes .Microbiology and Molecular Biology Review 63: 461-488 .

16-Mancera-lopes ,M.E. etal.2007 .Fungi and bacteria isolated from two highly polluted soils for hydrocarbon degradation .Acta .Chim. Slov . 54 ,201-209.

17-Pickard ,M.A.,Roman ,R., Tinoco ,R. and Duhalt ,R.V.1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriolopsis gallica* UAMH8260 Laccase.AEM 65, no 9 ,3805-3809.

18-Pitt J.I.and ,Hocking C.J.(1997)Fungi and Food Spoliage .2nd ed .Blackie Academic and Professional ,London . pp:108 ,126 ,291 ,378.

19-Riser-Roberts,E1992. Bioremediation of petroleum contamination sites .CRCPress.inc .Boca Raton ,Fla.

20-Wild, S. R. and Jones ,K.C. 1993 .biological and abiotic loss of polyneuclear aromatic hydrocarbon (PAHs) from soils fresh lyamended with sewage sludge .Environ. Toxico .Chem. 12 : 5-12 .

Isolation and Identifecation of fungi from soils polluted by hydrocarbons

Lubna . A. Al.Mutalib

Environment research center /Babylon Unv.

Abstract:

Some fungi have been isolated from polluted and non polluted by oil wastes soils, from different areas in Hilla city . This study shows the existence of great collection of fungi that have the ability to grow in both type of soil.Deutromycotina was the dominant group . In particular Asp. genus which reavealed higher percent of occurenase . there are 3sp. Asp. Terrus, Asp .flavus ,Asp. Niger .

While the other groups were exhipited less occurenase in addition to yeast and sterilized black and white mycelia . this experiment shown that the higher percentage of existence belong to *Cephalosporium sp.,Penicelium sp. ,Asp. niger ,Asp . terrus* for both soils . the optimum affect of temp. ranged between 30-35 C , In contrast the yeast is recorded the higher percentage at temp. 25 C.