مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية المجلد22 (4) 2009

تأثير واستغلال النفط الخام من بعض الفطريات المعزولة من التربة

شذى علي شفيق ، شيماء نغيمش مزعل
قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية

الخلاصة

استهدفت الدراسة الحالية تأثير النفط الخام في بعض أنواع الفطريات *Penicillium sp Aspergillus* , *Aspergillus fumigatus flavus* , *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* التي تم عزلها من التربة لتلقي الضوء على دور هذه الكائنات في التوازن البيئي في التربة ، أظهرت النتائج تباينا واضحا في أعداد ونسب انتشار العزلات الفطرية، اذ حيث كانت السيادة للفطر *Aspergillus fumigatus* بنسبة تردد (32.47) % . وفيما يخص تأثير النفط الخام ، فلم توثر التراكيز الواطئة (0.1,0.05)% منه في النمو الخضري (معدل قطر المستعمرة) للفطريات المعزولة على الوسط الصلب إما بقية التراكيز (1,0.5)% فقد أظهرت تأثيرا سميا تدريجيا في النمو خلال مدة التجربة ، واظهر الفطر *Aspergillus fumigatus* حساسية عالية تجاه التراكيز الأربعة من النفط الخام مقارنة بالفطريات الأخرى . أظهرت النتائج تباين قدرة الفطريات المعزولة من التربة على استغلال النفط الخام على الوسط الملحي الصلب مصدرا" وحيدا" للكربون والطاقة باختلاف التركيز ومدة التعريض ونوع الفطر .

المقدمة

ان انسكاب المركبات النفطية على الأراضي تسبب مخاطر كبيرة على البيئة وتظهر جانب سلبي على جمالية المناظر لذلك اهتم علماء البيئة بتحسين واستصلاح الأراضي الزراعية والنهوض بجمالية المواقع وإزالة التلوث منها ، فتم استعمال الأحياء المجهرية بصورة عامة ومن ضمنها الفطريات في تحليل النفط الخام مقارنة بالبكتريا بسبب قدرة الخيوط الفطرية على النمو بشكل طبقة غزيرة على سطح النفط فضلا" عن إلى إمكانية نموها تحت ظروف بيئية قاسية [1] .

يعد النفط الخام خليطا" معقدا" من الهيدروكاربونات المرتبطة مع مواد عضوية وبكميات صغيرة إذ يحتوي على ألاف المركبات الكيميائية المختلفة الأخرى وتشكل الهيدروكاربونات الاليفاتية Aliphatic المتضمنة الالكانات Alkanes ,الالكينات Alkenesوالالكاينات Alkynes ، الهيدروكاربونات الحلقية Cyclic والهيدروكاربونات الاروماتية Aromatic فضلا" عن وجود مركبات غير هيدروكاربونيه حاوية على عناصر الكبريت والنتروجين والأوكسجين وكميات ضئيلة من المعادن [2]. للنفط الخام تأثيرات ايجابية وسلبية في العديد من الفطريات وتعتمد سمية النفط الخام على محتواه من المركبات الهيدروكاربونية ، فقد وجد عدد من الباحثين تأثيرات محفزة في نمو واستغلال النفط الخام من قبل الفطريات *Papulaspora sp* ,*Drechslera sp, Fusarium lateritium* المعزولة من صحراء الكويت ولاسيما بوجود عاملي الحرارة والملوحة [3] ، بالمقابل وجد[4] تباينا في تحلل ثلاثة أنواع من النفط الخام المختلفة التركيب الكيميائي بين سلالات من الفطر *Pseudallescheria boydii* المعزولة من تربة ملوثة بالنفط الخام ومن مخلفات المجاري . واظهر [5] سيادة الأجناس *Aspergillus* , *Pencillium* كأحياء" مستغلة للنفط الخام ومشتقاته ، كما اختبرت القدرة التحليلية للفطريات المعزولة من تربة غنية بالنفط الخام ومعظمها تعود إلى الفطريات الكيسية والبازيدية والناقصة

[6] وأوضحت العديد من الدراسات قابلية الفطريات المحبة للحرارة Thermophilic على النمو في أوساط حاوية على مركبات نفطية كمصدرا" وحيد للكربون مقارنة مع نموها في أوساط تحتوي على الكلوكوز مصدرا"للكربون والطاقة [8,7].

طرائق العمل

1- عزل وتشخيص الفطريات من التربة .

جمعت (10) عينات بصورة عشوائية من تربة زراعية في مدينة بغداد وبإتباع طريقة التخافيف[9] ، عزلت الفطريات في أطباق حاوية على الوسط الغذائي أكار البطاطا الدكستروزالمعقم potato dextrose agar (PDA) وحضنت جميع الأطباق بدرجة(25± 2) م وبالاعتماد على المفاتيح التصنيفية [11,10] تم تشخيص العزلات الفطرية ثم حساب النسبة المئوية لتردد كل فطر %Frequency [12] .

2- دراسة تأثير النفط الخام في النمو القطري (معدل قطر المستعمرة) للفطريات المعزولة.

استعملت تراكيز عديدة من النفط الخام كمايأتي (0.05 , 0.1 , 0.5, 1) % حجم /حجم من الوسط الغذائي المعقم (PDA) بالاعتماد على طريقة[13] ، صب الوسط الغذائي الحاوي على تراكيز مختلفة من النفط الخام في أطباق بتري زجاجية معقمة بقطر (9) سم وبعد تصلب الوسط الغذائي أخذت قطعة دائرية الشكل يبلغ قطرها (0.7) سم من حافة مزرعة أصلية stock culture بعمر (5) أيام باستخدام ثاقب فلين معقم ونقلت إلى وسط الطبق ثم احكم إغلاقه بالشريط اللاصق وحضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة (28) م ، تم حسب قطر المستعمرة من حافة الطبق . عملت ثلاث مكررات لكل معاملة فضلا" عن معاملة السيطرة .

3- اختبار قدرة الفطريات على استغلال النفط الخام

اختبرت العزلات الفطرية لمعرفة مدى قدرتها على استغلال النفط الخام مصدرا" وحيدا" للكربون والطاقة خلال تنميتها في وسط الأملاح المعدني الصلب المحضر والحاوي على تراكيز مختلفة من النفط الخام [14] ، وقد استخدم هذا الوسط بعد حذف مصدر الكربون منه (الكلوكوز) وإضافة تراكيز من النفط الخام ، اتبعت لتلك الطريقة السابقة الذكر في حساب قطر المستعمرات على وسط PDA . لكل نوع من الفطريات ، عملت ثلاث مكررات لكل معاملة فضلا" عن معاملة السيطرة .استعملت طريقة ANOVA لتحليل الإحصائي وعند مستوى احتمالية اقل من (0.05) باستخدام نظام SPSS . Statistical Packages For Social Sciences

النتائج والمناقشة

أوضحت نتائج فحص العينات من التربة توافر الفطريات *Rhizopus sp* , *Aspergillus fumigatus* , *Aspergillus flavus* , *Aspergillus niger* , *Aspergillus terreus* و *Penicillium sp* فيها وبنسب مختلفة اذ كانت أعلى نسبة تردد لفطر *A. Fumigatus* إذ بلغت النسبة المئوية 32.47% كما موضح في الجدول (1) ، تتفق نتائج العزل هذه مع نتائج العديد من الباحثين اذ كانت أكثر الفطريات انتشارا التابعة لجنس *Aspergillus* ويعزى ذلك إلى ما تتميز به أنواع هذا الجنس من قابلية نمو في مديات بيئية مختلفة وقابلية أنزيمية عالية تمكنها من السيادة على بقية الأجناس [15] . كما يبين الجدول (2) نتائج معاملة الفطريات المعزولة من التربة وعلى الوسط الغذائي الصلب PDA عدم وجود اختلافات معنوية بين التراكيز (0.05 , 0.1 , 0.5, 1) % ومعاملة السيطرة وفي اليوم الثاني لكل من

الفطريات *A. niger* , *A. flavus* , *A. terrues* , *Penicillium sp* بحيث كان معدل قطر المستعمرة مساو تقريبا لمعاملة السيطرة0.0% ماعدا تركيز 1% للفطر *Penicillium sp* اذ اظهر اختلافا" معنويا" عند مستوى ($P<0.05$) بينما اظهر الفطر *A.fumigatus* اختلافات معنوية بين التراكيز الأربعة ومعاملة السيطرة ، وفي اليوم الرابع لم تظهر اختلافات معنوية بالنسبة للفطر *A. terrues* عند التراكيز الأربعة ، بينما أظهرت التراكيز العالية (0.1, 0.5 , 1) % اختلافات معنوية عند مستوى ($P<0.05$)، للفطر *Penicillium* sp و *A. flavus* ، وتباينت معدلات قطر المستعمرة عند الفطرين *A.fumigatus* و *A. niger* . وفي اليوم السادس أظهرت الاختلافات المعنوية بزيادة التركيز للفطر *Penicillium sp* عند التراكيز العالية، بينما كان الاختلاف معنويا" عند التركيز 0.5 % للفطر *A. terrues* وللفطر *A. flavus* عند التركيزين, 0.5) (0.1 % فقط وفيما يخص الفطر *A.fumigatus* كانت الاختلافات معنوية عند التركيزين (1, 0.1) % ولم تظهر أي اختلافات معوية للفطر *A. niger* ، قد يعزى زيادة سمية النفط الخام، بزيادة التراكيز في بعض الفطريات المعزولة إلى الطبيعة الكيميائية للنفط الخام إذ يمثل خليط معقد من المركبات الهيدروكاربونية مع نسب مختلفة من الكبريت اللاعضوي والماء والأملاح، اذ ان تواجد كل هذه المواد معا يكون له تأثير سلبي في النمو [2] ، ولا يقتصر التأثير السمي والمثبط للنفط الخام على نوع ونسب المركبات الهيدروكاربونية الداخلة في تركيبه فقد يعود كذلك إلى وجود مركبات غير هيدروكاربونية ولا سيما الكبريت المتوافر في تركيب هذه المركبات الثلاثة، اذ يعد مثبطا" لنمو الفطريات ولا يخلو أي مبيد فطري من وجوده [16] . و يظهر الجدول (3) قدرة جميع الفطريات المعزولة على استغلال النفط الخام كمصدرا" وحيدا" للكربون والطاقة على الوسط الملحي الصلب وتباينت هذه القدرة باختلاف التركيز ومدة التعريض ونوع الفطر ، فقد اظهر الفطر *Penicillium* sp في اليوم الثاني اختلاف معنوي عند التركيزين (1,0.5)% عند مستوى احتمالية ($P<0.05$) مقارنة بمعاملة السيطرة بينما اظهر الفطر *A. terreus* اختلافا" معنويا" في استغلال النفط الخام عند التركيز 0.5% فقط ،إما بقية الفطريات *A.flavus* ، *A.fumigatus* و *A. niger* فقد أظهرت اختلافا معنويا بين التراكيز الأربعة لكل من الفطريات المعزولة ومعاملة السيطرة 0.0 % التي تمثل الفطريات النامية على الوسط الملحي الصلب مضافا" إليه الكلوكوز مصدرا" للكربون، وفي اليوم السادس لم يظهر التركيز 0.05 % اختلافا" معنويا" عند مستوى ($P<0.05$) لكل من الفطرين *Penicillium sp* و *A. terreus* في حين كانت الاختلافات معنوية عند التراكيز الأربع في بقية الفطريات المعزولة ما عدا التركيز 0.1 % للفطر *A.fumigatus* إذ لم يظهر أي اختلاف معنوي عند مستوى($P<0.05$) ، كما أظهرت التراكيز العالية (1,0.5)% تأثيرا واضحا على عملية تكوين الابواغ ولاسيما للفطريات الآتية *Penicillium* sp ، *A.flavus* و *A.fumigatus* إذ تأخرت عملية تكوين الابواغ sporogenesisإلى اليوم العاشر من التجربة مقارنة بمعاملة السيطرة . تتفق هذه النتائج مع بحوث عديدة [17,4,5] خلال دراستهم حول القدرة التحليلية للنفط الخام أو مشتقاته من الفطريات مصدرا" للكربون والطاقة وكان لجنس *Aspergillus* و *Penicillium* من الأجناس المهمة في استغلال النفط الخام .

المصادر

1-Boonchan , S. ; Britz , M . L. and Staniey , G. A. (2000). Degradation and mineralization of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal – bacterial co cultures , Appli. Environ. Microbiol . 66(3):1007-1019

2-Okolo , J. C. ; Amadi , E. N.and Odu , C. T . I. (2005) . Effects of soil treatments containing poultry manure on crude oil degradation in a sandy loam soil . Applied ecology and environmental research 3(1) : 47-53.

3-Badrudeen , A. M. ; Al- Saleh , E. and Mulder ,J. L .(2005) . Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under condition of simultaneous temperature and salt stress. International bio- deterioration and biodegradation , 56 (4) : 197-205.

4- April, T.M. ; Abbott, S.P. ; Foght, J.M. and Currah, R. S. (1998) . Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microascaceae) . Can . j . Microbiol. 44 (3) : 270-278.

5- Solarzanolemos , J. L. ; Rizzo, A.C. ; Millioli , V. S. : Soriono , A. U. (2000). Petroleum degradation by filamentous fungi. Applied Environ. Microbiol. 44 (3) : 270-278.

6- Boldu , F. X. P. ; Kuhn , A. ; Luykx, D.M. ; Van, J. W. (2001). Isolation and characterization of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source . Mycological research . 105 : 477-484.

7- Adekunle , A.A. , Oluyode , T. F. 2005. biodegradation of crude petroleum and petroleum products by fungi isolated from two oil seeds (melon and soy bean) . J. Environ. Biol.26(1); 37-42 .

8-Ijah , U. J. And Ndana , M. 2004.Stimulated biodegradation of crude oil in soil amended with periwinkle shells . The environmentalist . 23 (3) : 249-254.

9 –Burnette, J. H . 1976. Fundementals of mycology . second edition , Edward Arnold , England . 673pp.

10- Samson , R. A. ; Hockstra, E. S. and Vanoorschot, C. A . N. 1984. Introduction of food borne fungi . second edition ,Institute of the Royal Netherlands Academy of arts and sciences.523 pp.

11-Robert,A.S.;Ellen, S.H.;and Connie, A.N. (1984). Introduction of food borne – fungi contamination . second edition , Drukker .J. Van Gestol and Zn.B.v.laren NH: 1-205.

12-Pitt, J. I. ; Hocking , A. D. and Glenn, D. R. 1983 . An improved medium for detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* . J. Appl. Bacteriol. , 54 : 109-114.

13-Al-Rekabi , S. A. W. ;Ali , b. Z. ;Shafik, Sh. A. 2002.Effect and utilization of crude oil , gasoline and kerosene on the vegetative growth of *Achlya conspicua* and *Saprolegnia diclina*. the second conference and exhibition on biotechnology and genetic engineering 4 : 23-27.

14-Prenafeta-boldu, F.X. ; Kuhn, A. ; Luykx,D .M.A., Groenestlin, J.W. and debont , J.A.M.2001.Isolation and characterization of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source .Mycological research.105(9): 477-484.

15-Karaoglu , S. A. ; Ulker , S. (2006). Isolation , identification and seasonal distribution of soilborne fungi in tea growing areas of lyidere- ikizdere vicinity (Rize – Turkey) . j. of basic microbiol. 46(3): 208-218.

16- Panda , H. (2000). the complete technology book on pesticides , insecticides , fungicides and herbicides industrial research . New Delhi, India. 706pp.

17-Elshafie , A. ; Alkindi , A. ; Al-Busaidi , S. And Albahry ,S. N. (2007). Biodegradation of crude oil and N-alkanes by fungi isolated from Oman . Mar. pollut .bull. 54 (11): 1692-1606.

جدول (1) النسبة المئوية لتردد(% frequency) العزلات الفطرية من عينات التربة

الأجناس والأنواع	النسبة المئوية للتردد %
Penicillium sp	23.13
Aspergillus flavus	8.24
Aspergillus niger	11.85
Aspergillus terreus	24.22
Aspergillus fumigatus	32.47

جدول(2): تأثير النفط الخام في النمو الخضري (معدل قطر المستعمرة) للفطريات المعزولة

العزلات الفطرية	التراكيز	الأيام		
		2	4	6
Penicillium sp	0.0	0.45±1.60	0.25±3.05	0.10±3.80
	0.05	1.00±1.40	0.10±2.35	0.00±2.60
	0.1	0.20±1.55	*0.15±1.75	*0.20±1.90
	0.5	0.00±1.30	*0.17±1.45	*0.11±1.85
	1.0	*0.11±0.35	*0.11±1.40	*0.00±1.50
A. terreus	0.0	0.25±2.25	0.37±2.70	0.20±4.30
	0.05	0.32±2.45	0.20±3.20	0.15±4.95
	0.1	0.70±2.15	0.23±3.15	0.25±3.55
	0.5	0.15±2.15	0.00±3.50	*0.00±5.45
	1.0	0.15±2.30	0.32±3.60	0.20±4.75
A.flavus	0.0	0.10±2.55	0.26±4.30	0.22±5.20
	0.05	0.25±2.75	*0.20±3.10	0.25±4.25
	0.1	0.20±2.10	*0.11±2.90	*0.15±3.05
	0.5	0.10±3.00	*0.00±3.00	*0.00±3.30
	1.0	0.20±4.10	0.15±4.10	0.15±5.10
A.fumigatus	0.0	1.00±1.50	0.28±1.50	0.17±1.70
	0.05	*0.15±1.00	0.40±1.40	0.25±2.10
	0.1	*0.00±0.90	0.11±0.90	*0.22±1.20
	0.5	*0.00±0.90	*0.00±1.00	0.15±1.40
	1.00	*0.16±0.80	0.00±0.90	*0.00±0.90
A. niger	0.0	0.25±3.25	0.25±5.55	0.00±8
	0.05	0.55±3.55	*0.10±3.80	0.00±8
	0.1	0.00±2.95	0.22±5.69	0.00±8
	0.5	0.23±3.10	*0.15±3.10	0.00±8
	1.00	0.00±3.00	0.00±4.90	0.00±8

كل قراءة تمثل الوسط الحسابي ± الانحراف المعياري

• معنوي عند مستوى احتمالية ($P<0.05$)

جدول(3): اختبار قدرة الفطريات على استغلال النفط الخام كمصدروحيد للكربون والطاقة(النمو القطري)

العزلات الفطرية	التراكيز	الأيام		
		2	4	6
Penicillium sp	0.0	0.15 ± 1.35	0.17±2.70	0.30±3.50
	0.05	0.17±1.20	*0.10±2.10	*0.15±3.10
	0.1	0.15±1.10	*0.15±2.10	*0.23±2.80
	0.5	*0.11±1. 00	*0.20±1.80	*0.11±2.15
	1.00	*0.0±1.00	*0.0±1.80	*0.00±2.25
A. terreus	0.0	1.00±1.80	0.11±4.5	0.0±8.00
	0.05	0.77±1.90	*0.0±3.95	0.15±7.10
	0.1	0.70±1.50	*0.10±4.05	*0.11±6.50
	0.5	*0.11±1.20	*0.20±3.10	*0.26±5.25
	1.00	0.15±1.50	*0.35±3.75	*0.35±6.65
A.flavus	0.0	0.10±3.10	0.00±8.00	0.00±8.00
	0.05	*0.15±1.90	*0.15±4.10	*0.32±6.30
	0.1	*0.00±1.95	*0.11±2.80	*0.15±6.20
	0.5	*0.15±1.75	*0.00±3.60	*0.15±5.80
	1.00	*0.20±1.70	*0.50±4.20	0.00±6.10
A.fumigatus	0.0	0.20±1.20	0.20±2.1	0.11±2.60
	0.05	*0.00±0.90	*0.15±1.2	*0.00±1.25
	0.1	*0.20±0.80	0.40±1.6	0.28±2.25
	0.5	*0.11±0.80	*0.00±0.8	*0.00±0.90
	1.00	*0.00±0.80	*0.00±0.8	*0.10±1.45
A. niger	0.0	0.28± 2.75	0.15±6.10	0.11±8.00
	0.05	*0.00±1.70	*0.25±3.10	*0.00±5.00
	0.1	*0.11±1.65	*0.00±2.90	*0.00±4.55
	0.5	*0.10±1.95	*0.10±2.40	*0.15±3.55
	1.00	*0.15±1.80	*0.10±3.00	*0.11±4.20

كل قراءة تمثل الوسط الحسابي ± الانحراف المعياري

* معنوي عند مستوى احتمالية ($P<0.05$)

Effect and UtilIzation of Crude oil on Some of Fungi Isolated From Soil

Sh. A. Shafiq , S. N. Mizil
Department of Biology, College of sciences, University of AL-Mustansiriya

Abstract

The present study was conducted to reveal the effect of crude oil on some fungal species isolation from soil in order to evaluate the role of these fungi in environmental balance of soil . The results showed a variation in numbers and percentage of the fungal isolates *Aspergillus fumigatus* dominated over all isolates with a frequency of (32.47) . In respect of the effect of different concentrations of the crude oil, low concentrations (0.05, 0.1) % showed no effect on radial growth (mean colony diameter) of the isolated fungi grown on solid media , whereas other concentrations (5.10)% showed gradual toxic effect on these fungi . The fungus *Aspergillus fumigatus* reveal higher sensitivity against all concentrations of the crude oil compared to others species , The results showed also variation of these fungi in utilization of the crude oil on solid mineral media used as a sole carbon and energy source with the different concentrations of the crude oil , exposing time and kind of species.