التردي البكتيري الهوائي لمستحلب الزيت ٧٢٠١ والسيطرة عليه باستعمال بعض المضادات

اطروحة مقدمة الى
مجلس كلية العلوم – جامعة بابل
وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة (Ph. D.) علوم
في علوم الحياة / الاحياء المجهرية

من قبل
وسام عبد الزهراء هندي الطاهر

جمادى الاولى ١٤٢٤ هـ **تموز ٢٠٠٣ م**

Aerobic bacterial deterioration of oil emulsion ٧٢٠١ and it's control by some biocides

A Thesis Submitted to the Council of the College of Science at the University of Babylon in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Ph.D. In Biology / Microbiology

By

Wesam Abd-al-Zhrah Hindi Al-taher

July

٢٠٠٣

Summary

The work described in this thesis was undertaken at the university of Babylon between July ٢٠٠١ and Jone ٢٠٠٢ under the supervision of Dr.N.K. Al-Haidary & Dr.A.K. Hindi. Except where indicated by reference, it is the original work of the auther and has not been submitted for any other scientific degree.

The aims of the present work were to study aerobic bacterial deterioration of oil emulsion to determine the physical & chemical changes in it's original characteristics & to test the effect of some chemicals as a biocides for control.

Thirty-four isolates of aerobic bacteria belong to fourteen different genera were isolated from the used oil emulsions & all isoalates were diagnosed according to their morphological & biochemical properties.

The capability of the isolates to utilize the emulsion as a sole source of carbon & energy were tested & only twenty isolates belong to eight genera classified as strains of B.cepacia , P.putida , A.media , A.baumanni , C.koseri , K.oxytoca , S.marcescens , R.eutropha were viable, while the others which belong to the genera Staphylococcus, Corynebacterium, Escherichia, Moraxella, Micrococcus & Methylobacterium lost their viability & die with time.

The present study showed the ability of the selected isolates to utilize the base oil ٤٠ & the chemical additive .

The changes in the physical characteristics including the color index, conductivity value, changes in pH , droplet size & demulsifying number, were determined.

The G.L.C. apparatus was used to determine the chemical changes in the emulsion formulation due to bacterial utilization of most of it's constituents.

The significance of emulsion infection with the isolates in causing chemical corrosion was also examined & it was found that changes in the emulsion formulation cause corrosion of mild steel surfaces as shown by S.E.M. photographs & increased rust.

The possible use of four different chemical compounds (chlorhexidine gluconate, Na-tetraborate, E.G.M.E. & Tween-٨٠) as a biocide was tested at different concentrations & the results showed that the first three of these chemicals were more effective in controlling the emulsion infection & the biocidal activity of these compounds increased with increasing concentration.

توصية الاستاذ المشرف

نشهد ان اعداد هذه الاطروحة قد جرى باشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بابل ، وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة علوم في علوم الحياة / الاحياء المجهرية .

التوقيع
اسم المشرف: د.عبدالله كاظم هندي
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
العنوان: قسم علوم الحياة/كلية العلوم/جامعة بابل

التوقيع
اسم المشرف: د.نظام كاظم الحيدري
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
العنوان: قسم علوم الحياة/كلية العلوم/جامعة بغداد

التوقيع
اسم المشرف: د.فكرت مجيد حسن
المرتبة العلمية:استاذ مساعد
العنوان: جامعة بابل/كلية العلوم
(بدلاً من المشرفين)

توصية رئيس القسم

اشارة الى التوصية في اعلاه التي قدمها الاستاذان المشرفان أُحيل هذه الاطروحة الى لجنة التقويم والمناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:
الاسم: د. فكرت مجيد حسن
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
العنوان: قسم علوم الحيـاة /
كلية العلوم/ جامعة بابل

قرار لجنة المناقشة

نشهد باننا اعضاء لجنة التقويم والمناقشة اطلعنا على هذه الاطروحة وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها وذلك بتأريخ ٢٤ / ٧ / ٢٠٠٣ ووجدنا انها جديرة بالقبول بدرجة ( ) لنيل درجة دكتوراه فلسفة علوم في علوم الحياة/ الاحياء المجهرية.

التوقيع
رئيس اللجنة:د.فاروق خالد حسن
المرتبة العلمية:استاذ
العنوان:الجامعة المستنصرية/ كلية الطب
التاريخ

التوقيع
عضو اللجنة:د.ابراهيم محمد سعيد
المرتبة العلمية:استاذ
العنوان:جامعة بابل/كلية العلوم
التاريخ

التوقيع
عضو اللجنة:د.محمد عبود محسن
المرتبة العلمية:استاذ مساعد
العنوان:جامعة بابل/ كلية الطب
التاريخ

التوقيع
عضو اللجنة:د.شذى سلمان العزاوي
المرتبة العلمية:استاذ مساعد
العنوان:جامعة بغداد/ كلية العلوم

التاريخ

التوقيع
عضو اللجنة:د.قاسم نجم عبيد
المرتبة العلمية:استاذ مساعد
العنوان:جامعة بابل/كلية طب الاسنان

التاريخ

التوقيع
عضو اللجنة:د.فكرت مجيد حسن
المرتبة العلمية:استاذ مساعد
العنوان:جامعة بابل/كلية العلوم
(بدلاً من المشرف)

التاريخ

مصادقة عميد كلية العلوم

اصادق على ما جاء في قرار اللجنة اعلاه

التوقيع
الاسم: د.عودة مزعل ياسر
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
العنوان:جامعة بابل/كلية العلوم

توصية الاستاذ المشرف

نشهد ان اعداد هذه الاطروحة قد جرى باشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بابل ، وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة علوم في علوم الحياة / الاحياء المجهرية .

التوقيع
اسم المشرف: د.فكرت مجيد حسن
المرتبة العلمية:استاذ مساعد
العنوان: جامعة بابل/كلية العلوم
(بدلاً من المشرفين)

توصية رئيس القسم

اشارة الى التوصية في اعلاه التي قدمها الاستاذ المشرف أُحيل هذه الاطروحة الى لجنة التقويم والمناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:
الاسم: د. فكرت مجيد حسن
المرتبة العلمية: استاذ مساعد

العنوان: قسم علوم الحيــاة /
كلية العلوم/ جامعة بابل

توصية الاستاذ المشرف

نشهد ان اعداد هذه الاطروحة قد جرى باشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بابل ، وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة علوم في علوم الحياة / الاحياء المجهرية

.

التوقيع
اسم المشرف: د.عبدالله كاظم هندي
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
العنوان: قسم علوم الحياة/كلية العلوم/جامعة بابل

التوقيع
اسم المشرف: د.نظام كاظم الحيدري
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
العنوان: قسم علوم الحياة/كلية العلوم/جامعة بغداد

التوقيع
اسم المشرف: د.فكرت مجيد حسن
المرتبة العلمية:استاذ مساعد
العنوان: جامعة بابل/كلية العلوم
(بدلاً من المشرفين)

توصية رئيس القسم

اشارة الى التوصية في اعلاه التي قدمها الاستاذ المشرف أُحيل هذه الاطروحة الى لجنة التقويم والمناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:
الاسم: د. فكرت مجيد حسن
المرتبة العلمية: استاذ مساعد
العنوان: قسم علوم الحيــاة /
كلية العلوم/ جامعة بابل

المحتويات

ت		رقم الصفحة
	الفصل الاول : المقدمة واستعراض المراجع	١
اولاً	المقدمة	١
ثانياً	استعراض المراجع	٤
١-٢-١	تمثيل المركبات الهيدروكاربونية	٤
١-٢-٢	آلية اخذ الهيدروكاربونات بفعل الاحياء المجهرية	٨
١-٢-٣	اكسدة المركبات الهيدروكاربونية	١١
١-٢-٤	الاحياء المجهرية الملوثة لمستحلبات الزيت	١٢
١-٢-٥	بيئة مستحلبات الزيت	١٨
١-٢-٦	التآكل الميكروبي المصاحب للمنتجات النفطية	٢٣
١-٢-٧	الخسائر الاقتصادية للتردي الحيوي لمستحلبات الزيت	٢٥
١-٢-٨	طرق قياس التردي الحيوي للمركبات الهيدروكاربونية	٢٦
١-٢-٩	السيطرة على نمو الاحياء المجهرية في مستحلبات الزيت	٢٨
	الفصل الثاني: المواد وطرائق العمل	٣٢
اولاً	المواد المستعملة	٣٢
٢-١-١	الزيت الذائب ومكوناته	٣٢
٢-١-٢	المواد الكيمياوية	٣٢
٢-١-٣	الاوساط الزرعية	٣٤
٢-١-٤	الكواشف	٣٧
٢-١-٥	الاجهزة المستخدمة	٣٨
ثانياً	طرائق العمل	٣٩
٢-٢-١	جمع العينات	٣٩
٢-٢-٢	عزل البكتريا	٣٩
٢-٢-٣	تشخيص العزلات البكتيرية	٣٩
٢-٢-٤	اختبار قابلية البكتريا المعزولة على النمو في مستحلب الزيت	٤٢
٢-٢-٥	حساب اعداد الخلايا الحية	٤٢
٢-٢-٦	تحضير مستحلب الزيت وتعقيمه	٤٣
٢-٢-٧	تحضير اللقاح	٤٣
٢-٢-٨	التحضير لتجربة التردي الحيوي لمستحلب الزيت والتلقيح	٤٣
٢-٢-٩	فصل الزيت عن الماء المستحلب فيه	٤٥
٢-٢-١٠	الدراسة الكروموتوكرافيه لمستحلب الزيت	٤٥
٢-٢-١١	قياس اقطار القطيرات للمستحلب	٤٧
٢-٢-١٢	قياس التوصيلية الكهربائية للمستحلب	٤٧
٢-٢-١٣	قياس قيمة الاس الهيدروجيني	٤٧
٢-٢-١٤	قياس معامل اللون	٤٨
٢-٢-١٥	قياس فك الاستحلاب	٤٨
٢-٢-١٦	دراسة كفاءة التردي الحيوي للعزلات	٤٨
٢-٢-١٧	تآكل عينات الفولاذ	٤٩
٢-٢-١٨	فحص الصدأ	٥١
٢-٢-١٩	استخدام المركبات الكيمياوية في السيطرة	٥١
	الفصل الثالث	

	النتائج	٥٣
٣-١	العزل والتشخيص	٥٣
٣-٢	اختبار قدرة العزلات على النمو في مستحلب الزيت واستهلاكه	٥٣
٣-٣	دراسة نمو العزلات المختارة في مستحلب الزيت وتأثيراتها المختلفة عليه	٥٦
٣-٤	قيم الاس الهيدروجيني للمستحلب خلال فترة نمو الانواع البكتيرية فيه	٥٨
٣-٥	فيم التوصيلية الكهربائية للمستحلب خلال فترة نمو الانواع البكتيرية فيه	٥٨
٣-٦	قيم معامل اللون للمستحلب خلال فترة نمو الانواع البكتيرية فيه	٦٣
٣-٧	قياس اقطار قطيرات مستحلب الزيت بعد نمو الانواع البكتيرية فيه	٦٣
٣-٨	قيم فك الاستحلاب	٦٤
٣-٩	قدرة الانواع البكتيرية على النمو في زيت الاساس ٤٠	٦٧
٣-١٠	قدرة الانواع البكتيرية على النمو في المضاف الكيمياوي (المركَّز)	٦٩
٣-١١	زيادة شدة التآكل للمستحلب	٧١
٣-١٢	التحليل الكروموتوكرافي لمستحلب الزيت	٨٢
٣-١٣	قياس كفاءة الانواع البكتيرية في ترديها لمستحلب الزيت حيوياً	٨٩
٣-١٤	استخدام المركبات الكيمياوية في السيطرة	٩٠
	الفصل الرابع	
	المناقشة	٩٧
٤-١	اختيار مستحلب الزيت في الدراسة ونسبة التخفيف ودرجة الحرارة والتهوية	٩٧
٤-٢	العزل والتشخيص	٩٩
٤-٣	التغيرات الفيزياوية للمستحلب	١٠٤
٤-٤	قدرة العزلات على استهلاك مستحلب الزيت ومكوناته الاساسية والتغيرات الكيمياوية الحاصلة فيه	١١٢
٤-٥	استخدام المركبات الكيمياوية في السيطرة	١٢١
	الاستنتاجات والتوصيات	١٣٠
	المصادر	١٣١

الفصل الاول

المقدمة واستعراض المراجع

اولاً: المقدمة

تجمعت خلال العقود القليلة الماضية كثير من المعلومات المتعلقة بالتردي الحيوي لسوائل التشغيل الآلي Metal Working Fluids (MWFs)، ومع هذا فان تلف Spoilage هذه السوائل مازال مستمراً بكونه من المشاكل الصناعية الكبيرة التي تكلف سنوياً ملايين الدولارات، حيث تحتاج المكائن الحديثة ذات السرع العالية الى تجهيز مستمر منها وتستخدم سنوياً كميات هائلة على نطاق العالم من هذه السوائل في العديد من العمليات، فهي شائعة الاستعمال في عمليات الخراطة Turning والقطع Cutting والطحن Milling والسَّن Grinding والثقب Drilling وغيرها حيث تعمل هذه الزيوت على تسهيل وتسريع العمليات لاعطاء منتجات معدنية ذات نوعية عالية وتحافظ على المكائن المستخدمة من الاستهلاك السريع وتهيء درجة مقبولة من التزييت[١]، وتعمل على تبريد السطوح المحتكة الحارة بتكوين اغشية رقيقة بين سطح آلة القطع في المكائن وبين المعدن الذي تجرى عليه العملية، مما يؤدي الى تقليل الاضرار الناجمة عن توليد الحرارة اثناء العمل، اذ تختزن خلال العمل كميات قليلة من الطاقة (١-٣%) على شكل اجهاد متخلف في قطعه العمل او البرادة chips، وان اكثر من ٩٧% من هذه الطاقة تظهر بشكل حرارة تؤدي الى اتلاف المكائن المستخدمة[٢]، او الى حدوث التشوه الحراري للمكائن ولقطعه الشغل واحياناً تسبب لحم قطع البرادة باجزاء من المكائن، او ثلم اجزاء مختلفة منها مما يؤدي الى توليد سطوح ثانوية للآلة، وتمنع تكوين الصدأ او زيادة حدوث التآكل[٣،٤]. استخدمت سوائل التشغيل الآلي في الماضي بشكل بدائي على هيأة زيوت بترولية المنشأ وكان يطلق عليها عادةً سوائل او زيوت القطع Cutting fluids or oils، اما اليوم فتستخدم انواعاً متعددة منها، وكل نوع يشير الى استخدامات محددة مثل زيوت القطع، زيوت السَّن، زيوت التبريد coolants ، زيوت الحركة lubricants ، وان الغرض الرئيسي من استخدام هذه السوائل ليس للتزييت فحسب وانما للتبريد ايضاً، وبجانب الخواص التزييتية والتبريدية لها فانها يجب ان تحمي قطعتي الشغل والآلة من الصدأ والتآكل ، وان تحافظ على مواصفاتها الهندسية عند الحرارة المتطرفة او الضغط العالي، وان تكون أمينة لكل من العمال والبيئة[٥].

قسمت الزيوت المستخدمة في العمليات الصناعية على مجموعتين رئيسيتين هما[٦]:

١-الزيوت الذائبة Soluble oils وهي بثلاثة اشكال:

أ- مستحلبات الزيت المعدنية Mineral oil emulsions : وهي مستحلبات ناتجة من اذابة الزيوت المعدنية في الماء، وهنا يمتزج الفعل التزييتي للزيت مع الفعل التبريدي للماء، ويستحلب الزيت المعدني بشكل مادة شبه غروية بعوامل استحلاب مثل سلفونات البترول Petroleum Sulphonate او صوابين الاحماض الشحمية Fatty acids soaps وغيرها.

ب- السوائل المصّنعة Synthetic fluids: وهي محاليل كيمياوية لمركبات عضوية وغير عضوية ولا تحتوي على زيت معدني، بل مضافات كيمياوية مصّنعة فقط ، وبدلاً من الزيت المعدني فان خواص التزييت تعتمد على مواد اخرى مثل amine soaps of fatty acids ، polyoxyethlene sorbitan monooleate ، alkanolamides of fatty acids ، phosphate esters .

ج-السوائل شبه المصّنعة Semisythetic fluids: وهي التي تحتوي على نسبة مئوية قليلة من الزيت المعدني مع المضافات الكيمياوية المصّنعة التي تعطي التركيبة الكاملة، والقطيرات شبه الغروية المتكونة هنا تكون اصغر كثيراً مما عليها في النوعين السابقين مما يجعل هذا النوع من السوائل اكثر شفافية.

٢- الزيوت غير الذائبة Straight oils وهذه تستعمل مباشرة من دون خلطها بالماء وتتكون من زيوت معدنية فقط، او تمزج احياناً مع زيوت نباتية، او حيوانية، او مضافات كيمياوية حسب متطلبات العمل.

تصّنع سوائل التشغيل الآلي عادةً بخلط الزيوت المصنّعة، او زيت الاساس المعدني Mineral base oil المستخرج من النفط الخام اثناء عملية التقطير الفراغي مع عدد من المواد الكيمياوية المحسَّنة مثل مضادات الصدأ، ومضادات التآكل، ومواد مثبته stabilizers، ومواد ضد التزنخ، ودارئات Buffers، وعوامل استحلاب emulsifiers، ومواد قاتلة للاحياء المجهرية Biocides ،ومركبات اخرى حسب نوع الاداء المطلوب[٢]، لذا فان التركيب الكيمياوي لهذه السوائل يمثل خليطاً معقداً من الهيدروكاربونات، والفوسفات، والامينات، والنترات، وغيرها التي تعد بعضها او جميعها مصادر غذاء وطاقة ايجابية لنمو مجموعة واسعة من الاحياء المجهرية بأجناسها وانواعها المختلفة التي لها القدرة على تحليل او استخدام هذه المركبات اذ تقوم على معدنه العناصر فيها كالكاربون الذي تتراوح نسبته بين ٨٠-٩٠% في المركبات الهيدروكاربونية، والنتروجين والكبريت، وتعد البكتريا السالبة لصبغة كرام هي الاكثر شيوعاً[٧].

تجهز الزيوت الذائبة الى المصانع والمعامل بشكل مزيج مركَّز ويستعمل بعد التخفيف مع الماء بنسب متفاوتة قد تصل الى ٦٠:١ (زيت : ماء)، وفي المصانع الكبيرة فان المستحلب يصل الى ماكنة الشغل بنظام من المضخات تدفع المستحلب من الخزان الرئيسي (عادة السعة تتراوح بين ١٠٠٠-٥٠٠٠ غالون) والعودة به ثانية بعد الاستعمال الى الخزان نفسه، وعليه فان التردي الحيوي لمستحلبات الزيت يكون ذا اثر اقتصادي سلبي واضح يكلف مبالغ اضافية باهضة بسبب تقصير عمر الزيوت المستخدمة، او بسبب التآكل، او انسداد المرشحات فضلاً عن المشاكل الصحية والبيئية الناشئة عنه، وقد اجريت بحوث مختلفة للكشف عن المحتوى الميكروبي للزيوت غير الذائبة، او قدرة الاحياء المجهرية على البقاء حية فيها، او تأثيراتها على الصحة العامة، ولقلة البحوث المتعلقة بالتردي الحيوي لمستحلبات الزيت وخصوصاً المنتجة محلياً على الرغم من زيادة وسعة استخدامها نتيجة التطور الصناعي المضطرد للبلد وما يمكن ان يشكل ذلك من فقدان مواصفاتها الهندسية الناتج عن التغيرات الكيمياوية والفيزياوية التي تطرأ عليها وما يترتب عليه من خسائر اقتصادية. تم اجراء هذه الدراسة التي تتضمن عزل البكتريا الهوائية المسببة لحالات التردي الحيوي لمستحلبات الزيت وتحديد التغيرات الفيزياوية والكيمياوية على المستحلب، وكذلك استعمال بعض المركبات الكيمياوية بوصفها محاولة للسيطرة عليها.

ثانياً : استعراض المراجع

١- ٢-١: تمثيل المركبات الهيدروكاربونية

بدء الاهتمام بالاحياء المجهرية المتعلقة بالصناعات النفطية ومشتقاتها بشكل متوازٍ مع زيادة انتاج النفط الخام والتقدم الصناعي العالمي، وكان من اوائل البحوث المتعلقة بتمثيل الهيدروكاربونات قد نشر من قبل (١٨٩٥) Miyoshi عندما لاحظ استهلاك الشمع البارافيني بفعل الفطر Botrytis cinera [٨]، ومنذ ذلك الوقت كان هناك العديد من البحوث حول استهلاك الاحياء المجهرية للهيدروكاربونات، لكن الدراسة الاولى الكبيرة حول اكسدة الهيدروكاربونات بفعل البكتريا كانت من قبل Kaserer & Sohngen (١٩٠٦) اذ نشرا نتائج التجارب حول استهلاك البكتريا للميثان،الكازولين،الكيروسين،والمركبات الهيدروكاربونية الاثقل،وسمّيا البكتريا المعزولة بعصيات الميثان Methane bacillus [٨]، وبتراكم المعلومات حول التردي الحيوي للمركبات الهيدروكاربونية وتمثيلها تطور مفهوم التردي الحيوي Biodeterioration على فترات زمنية متلاحقة تخللتها اكتشافات وتطوير اساليب جديدة لعزل وتشخيص انواع الاحياء المجهرية،التي لها القدرة على استهلاك المركبات الهيدروكاربونية بوصفها مصدراً

وحيداً للكاربون والطاقة ومن ثم ظهر حقلاً جديداً بالمعرفة يعنى بالاحياء المجهرية ذات الصلة بالنفط ومشتقاته عرف بـ Petroleum Microbiology طبقت المعلومات المتوفرة فيه في مجالات عديدة منها التخلص من المخلفات النفطية، النقل، التصفية، الاستكشاف، انتاج البروتين وحيد الخلية،انتاج الشحوم،الفيتامينات،ازالة التلوث البيئي بالمنتجات النفطية،انتاج المركبات البتروكيمياوية وغيرها[٩، ١٠]،وتوجهت البحوث ايضاً نحو معرفة آلية التردي الحيوي وايجاد مثبطات لها، ومحاولة السيطرة على تلف الكازولين،زيوت الوقود، وقود الطائرات، دهون التزييت وغيرها من مشتقات النفط[١١، ١٢].

اشار Bennett الى ان نتائج المهاجمة الميكروبية للمركبات الهيدروكاربونية للحصول على الكاربون والطاقة اللازمة لفعالياتها الحيوية قد تكون بأحدى ثلاث صور[١]:

١- تحويل الهيدروكاربونات الى مركبات مشابهه بوصفها نواتجاً وسطية او نهائية لكنها ابسط تركيباً مثل الميثان، الايثان، الكحولات، الالديهايدات، الحوامض، الكيتونات وغيرها.

٢- ادخالها في الهيكل الكاربوني للعديد من المركبات العضوية التي تكوّن الخلية نفسها.

٣- اكسدتها كلياً الى غاز ثاني اوكسيد الكاربون وماء.

تعتمد سرعة اكسدة الهيدروكاربونات على عوامل مختلفة منها توفر الاوكسجين، درجة الحرارة، نوع الكائن المجهري، ظروف الزرع وطور النمو، طول السلسلة وتفرعها وتشبع الهيدروكاربون من عدمه[١٣]، وبصورة عامة فان سرعة تمثيل الهيدروكاربونات تكون وفق الترتيب التالي الالكانات، ثم الاوليفينات، ثم البارافينات الحلقية، ثم المركبات الاروماتية، وكلما كانت السلسلة اطول كلما كان تمثيلها اسهل[٧، ١٤، ١٥] ، ومع ذلك فان القدرة على تمثيل أي مركب هيدروكاربوني يبدو بانه وظيفة انواع معينة من الاحياء المجهرية واحياناً سلالات محددة ضمن الانواع[١١].

درس Perry استهلاك الميثان والكيروسين ووجد ان التركيب الكيمياوي لهما قد تغيّر بعد المهاجمة البكتيرية[١٦] ، واجرى Zajic وجماعته عدة دراسات على اجناس مختلفة من الاحياء المجهرية شملت الـ Nocardia ، Streptomyces ، Mycobacterium ، Corynebacterium ، Brevibacterium ، Pseudomonas ، Flavobacterium وAchromobacter ووجد ان الطريقة الاكثر شيوعاً لتمثيل الالكانات هي عن طريق اكسدتها طرفياً وانتاج كحولات اولية، او حوامض شحمية تدخل لاحقاً بعمليات التمثيل الحياتي للخلية[١٧]. واشار Sandin الى دراسات سابقة حول الموضوع، وذكر ان Harper (١٩٣٩) لاحظ زيادة في خصوبة التربة بسبب تسرب الغاز الطبيعي، واعتقد ان زيادة محتوى النايتروجين في التربة ناتج بفعل تثبيته من قبل البكتريا القادرة على استهلاك الغاز

المتسرب بوصفه مصدراً للطاقة، وعزل احياء مجهرية مختلفة من التربة لها القدرة على مهاجمة البترول ومشتقاته، واستنتج ان الزيت الغني بالمركبات البارافينية يكون اكثر سهولة في التمثيل من الزيوت الحاوية على نسبة عالية من المركبات الاروماتية وان الزيوت النفثينية تشغل موقعاً وسطاً [٦].

ذكر Yoshida وجماعته ان غاز ثاني اوكسيد الكاربون والماء وكميات ضئيلة من الحوامض العضوية هي نواتج تمثيل الكازولين، الكيروسين، زيت البارافين وشمع البارافين بفعل بكتريا Mycobacterium والـ Pseudomonas [١٨]، واشارت بحوث اخرى الى قدرة الانواع المختلفة من الاحياء المجهرية على استهلاك مدى واسع من المركبات الهيدروكاربونية بما فيها المركبات الاروماتية التي يكون معظمها ساماً للاحياء المجهرية، وان المركبات النقية التي لاتستهلك ممكن ان تهاجم وتمثل من قبل البكتريا عندما تكون ضمن خليط من المركبات الهيدروكاربونية الاخرى سريعة التمثيل[١٦، ١٩، ٢٠]، وذكر Straube ان قدرة بكتريا Sphingomonas paucimobilis في ازالة تلوث التربة بالمركبات الهيدروكاربونية الاروماتية وخصوصاً ذات الاربع حلقات فاكثر قد ازدادت عندما خلطت التربة مع بكتريا P. aerognosa القادرة على افراز مواد استحلاب حياتية او اضافة نفط خفيف سريع التحلل للتربة[٢١]، واجريت في السنوات الاخيرة عدة بحوث تناولت نقل الجينات المسؤولة عن تحطيم مركبات هيدروكاربونية معينة بين الخلايا البكتيرية ودراسة قدرة الخلايا الجديدة على استهلاك مركبات هيدروكاربونية اخرى[٢٢، ٢٣] فقد درس Kanji وجماعته نقل الجين المسؤول عن تمثيل التلوين من بكتريا E. coli الى بكتريا P. putida و P. pseudoalcaligenes ، ودراسة قدرتهما على تمثيل كل من Biphenyle و Trichloroethylene ، واستنتج ان الخلايا الجديدة لها كفاءة اعلى في استهلاك هذه المركبات من الخلايا الاصلية [٢٤] ، وعمل مماثل قام به Akiko وجماعته عندما استبدل الجين المسؤول عن انزيمات Biphenyl dioxygenase في بكتريا Pseudomonas sp. بالجين المسؤول عن انزيمات Toluene dioxygenase من بكتريا P. putida ، ووجد ان الخلايا الناتجة لها قدرة اعلى على تمثيل العديد من المركبات الهيدروكاربونية مثل Trichloroethylene وdichloroethylene١,٢ ، وتستطيع ان تنمو على مدى واسع من المركبات الهيدروكاربونية الاروماتية [٢٥] .

١-٢-٢: آلية اخذ الهيدروكاربونات بفعل الاحياء المجهرية

تعتمد آلية اخذ المركبات الهيدروكاربونية من قبل الاحياء المجهرية وجعلها تصل الى مناطق محددة داخل الخلية لتمثيلها والحصول على الطاقة على عدة عوامل منها نوع الكائن المجهري المستهلك لذلك المركب، ونوع المركبات الهيدروكاربونية وطبيعتها الفيزياوية[١٠، ٢٦]، ووضعت فرضيات لشرح هذه الآلية منها:

أ-اخذ الهيدروكاربونات الذائبة Uptake of dissolved hydrocarbons

وتعتمد هذه الآلية على ان الهيدروكاربونات يمكن ان تؤخذ الى داخل الخلية وهي ذائبة في محلول مائي، فقد لاحظ Walker وجماعته ان الخميرة Candida lipolytica تستهلك بشكل اسرع الالكانات ذات الوزن الجزيئي الواطيء عندما تنمو في وسط يحتوي على مزيج من الالكانات ذات الاوزان الجزيئية المختلفة، وفسر هذه الحالة بالاعتماد على قابلية الذوبان النسبية لهذه المركبات، فذات الوزن الجزيئي الاوطيء تذوب اسرع ومن ثم فهي اسهل في عملية الاخذ من قبل الخلية[٢٧] ، الا ان هذه الآلية تعد ذات اهمية محدودة بسبب قابلية الهيدروكاربونات الضئيلة على الذوبان بالماء، وهي عادة تقتصر على الالكانات ذات السلاسل القصيرة[١٨، ٢٨]، ووجد Perry ان الخميرة Candida tropicalis يمكن ان تنمو في وسط يجهز بشكل مستمر ببخار من البارافين لغاية $C_{١٨}$ اذ يذوب البخار في الوسط من دون ان يكوّن طوراً من الهيدروكاربون السائل، ومع هذا فقد اشار الى ان ذوبان الهيدروكاربونات في المحاليل المائية هو بصورة عامة قليل جداً للحد الذي لا يمكن ان يساعد على نمو الاحياء المجهرية عندما يكون هو المصدر الوحيد للكاربون والطاقة[٢٩].

ب-آلية التلامس المباشر والاستحلاب direct contact & emulsification mechanism

تشير هذه الآلية الى ان اخذ الهيدروكاربونات من قبل الخلية يحدث بفعل الاتصال المباشر بينهما من خلال احتجازها ثم نقلها عبر الغشاء البلازمي[٣٠،٣١]، واشار Harowitz الى ان الخلايا تلصق نفسها الى قطرة الهيدروكاربون، وان سلسلة الكاربون فيها تصبح جزءاً من الدهون المفسفرة للغشاء البلازمي، ويعتمد ذلك على الفة المركبات الهيدروكاربونية للارتباط مع المواقع الكارهة للماء في جدار الخلية[١٩] ، ودعم Boultton & Ratledge هذا الرأي ووجدا ان النمو المكروبي يتأثر باختزال المساحة السطحية لمنطقة الاتصال وعدا ان المركبات الهيدروكاربونية الموجودة في جدار الخلية هي مصدراً غذائيا لها[٣٢] ، ولكون العديد من المركبات الهيدروكاربونية تتصف بانها قليلة الذوبان بالماء فان ترديها الحيوي سيكون صعباً بسبب قلة جاهزيتها الحيوية Bioavailability، الا ان هذه الجاهزية تزداد عندما تكون الخلايا لها القدرة على انتاج مواد مُستحلِبة اذ تعمل هذه المستحلبات على زيادة انتشار تلك المركبات بالماء وزيادة ذائبيتها[٢٨، ٣٣، ٣٤] ، وتغّير الالفة

بين الخلايا والهيدروكاربونات من خلال تحفيز وزيادة الصفات الكارهة للماء لسطوح الخلايا[٣٥] وهذا كان قد اشار اليه Walker وجماعته عندما لاحظ ان الخلايا تلتصق الى سطح قطيرات الدهن عند نموها في وسط يحتوي على دهن مستحلب[٢٧]، وصوّر Herman وجماعته جزئيات الهيدروكاربونات النفطية ملتصقة بسطوح الخلايا عند فحصها بالمجهر الالكتروني، ووجد ان الخلايا النامية على الالكانات في مزرعة مستقرة اعطت افضل نمو عندما كانت قطيرات الدهن بحجم اقل من المايكرون[٣٦] ، وهذا يشير الى ان افضل اخذ للهيدروكاربونات يحدث عندما يكون الطور الزيتي منتشراً بشكل قطيرات صغيرة جداً التي تهيء مساحة سطحية اكبر، لذا فان الاحياء المجهرية التي تحرر او تنتج مركبات ذات شد سطحي لها ميزة على تلك غير المنتجة لها اذ تعمل هذه المركبات على استحلاب الزيت، وجعله اكثر سهولة وجاهزية للاستهلاك من قبل الخلايا[٣٧، ٣٨].

لاحظ Boulton & Ratledge ان المستحلب قد تكوّن عندما نمت انواع من الـ Pseudomonas في وسط حاوي على الهيدروكاربونات، وان ظاهرة الاستحلاب تبدأ بتحول المركبات الهيدروكاربونية الى قطيرات صغيرة الحجم يمكن احتجازها من قبل الخلايا[٣٢] ، وقد تكون المواد المستحلبة جزءاً من جدار الخلية او قد تفرز من قبل الخلية في الوسط وان طبيعتها الكيمياوية قد تكون دهنية – سكرية glycolipid او دهنية مفسفرة phospholipid[٣٩].

ذكر Britton ان بكتريا الـ Pseudomonas sp. لها القدرة على تكوين حوامض عضوية عالية الوزن الجزيئي ذات شد سطحي خلال نموها على الزيوت الهيدروكاربونية، وبسبب الطبيعة المحبة للدهن للهيدروكاربون فان الدهون قد تلعب دوراً مهماً في عملية اخذ الهيدروكاربونات، واشار ايضا الى ان الخلايا التي نمّيت على الهيدروكاربونات يكون لها جدار خلوي ذا محتوى عالٍ من الدهون مقارنة بالخلايا نفسها فيما لو نمّيت على الكلوكوز[٤٠] ، الا ان جدار الخلية يبدو ان ليس له أي دور في عملية الاكسدة وان الهيدروكاربونات لا يطرأ عليها أي تغيير اثناء مرورها عبره وانه فقط موقع لتراكمها، وليس موقعاً للتكسير الانزيمي وان بداية التحطيم يحدث في الغشاء البلازمي[١٨، ٣٠، ٣٢].

١-٢-٣: اكسدة المركبات الهيدروكاربونية

ان عملية استهلاك المركبات الهيدروكاربونية بوصفها مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة يتم من خلال سلسلة من العمليات الهدمية التي تشترك بها مجموعة من الانزيمات لينتج في نهاية التفاعل طاقة وماء وثاني اوكسيد الكاربون وكذلك العديد من المركبات الايضية الوسطية الاخرى مثل الالكينات ، كحولات اولية وثانوية وكحولات متفرعة السلسلة ،

حوامض شحمية وامينية ونووية ، حوامض ثنائية الكاربوكسيل ، سكريات دهنية ، استرات ، اصباغ ، فيتامينات وغيرها[٢٩، ٣١، ٤١] ، وتعتمد عملية التحطيم والاكسدة على عدة عوامل منها تركيب الزيت نفسه ، ونوع عوامل الاستحلاب وطبيعة المواد المطهرة المضافة وتوفر المواد العضوية القابلة للاكسدة ونوع الاحياء المجهرية الملوثة ويمكن تلخيص عملية الاكسدة كما يأتي:

أ- الهيدروكاربونات الاليفاتية: تؤكسد بطرق مختلفة والطريق الرئيس هو الاكسدة من احدى النهايتين التي من خلالها يتكسر الهيدروكاربون الى كحولات اولية، الديهايدات، حوامض شحمية التي تؤكسد لاحقاً مكونة الـ acetyl co-A الذي يدخل في طرق التمثيل الرئيسية للخلية[٤٠، ٤٢]، وان عملية الاكسدة من الطرفين قد تحدث ولكن بشكل طفيف مؤدية الى انتاج حوامض ثنائية الكاربوكسيل التي تؤكسد لاحقاً بمسار الاكسدة نوع بيتا B-oxidation وعادة يمكن التحري عن وجود كيتونات المثيل والالكينات بوصفها نواتجاً عرضية خلال اكسدة الالكانات، وتؤكسد الالكينات غالباً عند النهاية المشبعة للجزيئة ، لكن اكسدة المركبات غير المشبعة قد تحدث ايضاً ، وتشترك في عملية الاكسدة الطرفية وتحت الطرفية للمركبات الاليفاتية المشبعة وغير المشبعة مجموعة انزيمات مؤكسدة Oxidizing enzymes وانزيمات الديهايدروجينيز Dehydrogenase enzymes بنظام انزيمي كلي يطلق عليه Monooxygenase system [٤٠].

ب- اكسدة المركبات الاروماتية: وهنا تكون العملية اكثر تعقيداً لكونها تحتاج الى طاقة لكسر الحلقة والانزيمات التي تشترك في العملية تختلف عن تلك التي تشترك في اكسدة المركبات الاليفاتية، وتتضمن عملية الاكسدة تكوين ثنائي الهيدروكسيل diol، وكسر الحلقة مكونة Hydroxy muconic acid semi-aldehyde او Cis-muconic acid وعندما تكون الحلقة الاروماتية بها مجموعة الكيل بوصفها سلسلة جانبية فانها تؤكسد اولاً، وعادة عندما تصل نواتج اكسدة البارافينات الحلقية بعد تكوّن ثنائي الهيدروكسيل وكسر الحلقة الى احد المركبات الثلاث التالية Catechol، Protocatechutae، Gentisate فانها يمكن ان تدخل احد ثلاث مسارات تعرف بميتا او بارا او اورثو ليتم اكمال عملية التحلل[٤٢، ٤٣، ٤٤].

١-٢-٤: الاحياء المجهرية الملوثة لمستحلبات الزيت

لما كانت هذه السوائل تتكون من خليط معقد من المركبات الهيدروكاربونية والمركبات الفوسفاتية، والامينية، والنتريت، والدهون الحيوانية، والنباتية، والاملاح العضوية وغير

العضوية، والكبريت وبوجود الماء، فان هكذا بيئة تصبح ملائمة جداً لنمو اعداد وانواع مختلفة من الاحياء المجهرية باختلاف نوع وبيئة المستحلب ومرحلة التردي الحيوي التي يمر بها[٤٥] ، ان وجود الرطوبة، العناصر المعدنية والاوكسجين من العوامل الاساسية لنشاط الاحياء المجهرية في المشتقات النفطية، وهذه العوامل قد تجهز عندما يكون المنتوج في الخزن، او النقل، او حتى في الاستعمال ومن المستحيل الحيلولة من دون وصولها اليه ، وحتى ان الماء نفسه هو احد نواتج عملية الاكسدة، لذا فان العملية بمجرد ان تبدأ تصبح وكانها تمّول ذاتياً[٤٦]، وتلعب البكتريا الهوائية الدور الرئيس في التردي الحيوي على الرغم من ان باقي الانواع قد تشترك باوقات مختلفة وباختلاف الظروف اذ ان العملية كلها متشابكة ويشترك فيها مجتمع معقد ومتداخل من الاحياء المجهرية ، فعند نقصان او اختفاء أي نوع يحل محله نوع اخر او كائن مجهري اخر من دون تغّير ظاهر ي واضح في العملية اذ تبقى المشكلة كما هي بالرغم من ان ديناميكية الاحياء المجهرية في المستحلب بتغير مستمر وان هناك علاقة مباشرة بين البكتريا الهوائية والبكتريا المختزلة للكبريت، وان التلوث الهوائي شرط مسبق لظهور اختزال الكبريتات[١٢، ٤٢] ، واشترط Wilkes وجماعته نمو البكتريا الهوائية لعدة اسابيع قبل ان يصبح الوسط له تقّبل ومهيء لنمو مختزلات الكبريت[٤٧] ، واشار اخرون الى ان الخمائر والاعفان نادراً ما تتواجد عندما تكون البكتريا هي السائدة ، وان هناك شبه اجماع في مجال المعرفة الحقلية او العملية للمستحلبات مفاده انه عند استعمال أي مبيد للحياة Biocide مع المستحلبات الملوثة بالبكتريا فان النمو البكتيري سرعان ما يستبدل بآخر فطري[٤٨، ٤٩]، وعموماً يمكن تقسيم الاحياء المجهرية الملوثة لمستحلبات الزيت على مجموعتين رئيسيتين هما:

أ-البكتريا

يعتقد ان جنس الـ Acinetobacter يمثل اول الاحياء نمواً في مستحلب الزيت وان وجودها ولو باعداد قليلة يعد ضرورياً جداً لدعم نمو بقية الانواع ومنها جنس Pseudomonas التي تنمو بسرعة ويسود وجودها في المستحلبات[٦] ، وقد مَثَلَتْ بكتريا Acinetobacter عند Salmeen وجماعته نسبة اكثر من ٢٥% من العدد الكلي من الانواع السائدة في مستحلبات الزيت[٥٠] ، وذكر Chaineau وجماعته ان بكتريا الـ Acinetobacter baumanni كانت واحدة من الانواع الاكثر فعّالية في تمثيلها للمركبات الهيدروكاربونية المختلفة مشاركة مع Arthrobacter sp. و Sphingomonas spiritivorum [٥١] ، واشار Sandin الى دراستين منفصلتين شملت كل منهما مئة عينة

من مستحلبات الزيت المستعمل كانت الانواع السائدة في الاولى هي P.olevorans و P. aerogenosa ومَثّل جنس الـ Pseudomonas ٦٠% من مجموع العزلات، بينما عزلت باقي الانواع التي شملت Pr. vulgaris، E. coli، K. pneumoniae ، Citrobacter sp.، Aerobacter aerogenosa و Staphylococcus aureus بنسبة ٤٠-٥٠% والخمائر والـ Achromobacter sp بنسبة ١٢-٣٤% من مجموع النماذج، واوضحت الدراسة الاخرى سيادة الانواع P.aerogenosa، Pr.mirabilis و K. pneumoniae[٦] واشار Bennett بان جنسي الـ Psendomonas والـ Desulfovibrio عزلا من ٨٥-١٠٠% من عينات مستحلبات الزيت الملوثة بينما وجدت الاجناس Escherichia و Klebsiella و Aerobacter و Proteus والفطريات بنسبة ١٤-٤٨% من العينات[١] ، ووجد Wort وجماعته ان البكتريا السائدة في الزيوت المستحلبة لست عينات من مستحلبات الزيت لاحد المعامل هي Pseudomonas فضلاً عن الى وجود Aerobacter aerogenosa و E. coli و B-hemolytic Streptococci[٥٢] ، وذكر Lioyd وجماعته ان مستحلبات الزيت تشكل البيئة المناسبة لنمو البكتريا المعوية وعزل انواعاً مختلفة شملت Str. faecalis ، Pr. vulgaris، Salmonella typhi، E. coli، Peudomonas sp. و Enterobacter aerogenosa[٥٣]، ووجد Foxall–Van-AKen وجماعته انه عند تلقيح مستحلب زيت جديد بمستحلب قديم وتركه لفترة، فان البكتريا السائدة هي الـ Pseudomonas و Klebsiella و Proteus و Citrobacter [٧]. عزل Salmeen وجماعته انواعاً مختلفة من البكتريا من مستحلبات الزيت، وكانت اقل كثافة سجلتها أي عزلة هي ١٠ ^٨ خلية/مليلتر وشملت الانواع Acinetobacter calcoaceticus , A. lwoffi , A. haemolyticus , P. putida , P. stutzeri , P. cepacia , P. putrifaciens , Pseudomonas sp.[٥٠] ، وعزل Okpokwasili &Okorie انواعاً مختلفة من الاحياء المجهرية من سوائل التزييت شملت اجناس الـ Bacillus، Corynebacterium، Actinomyces، Micrococcus، Serratia، Citrobacter، Edwardsiella، Pseudomonas، Nocardia و Acinetobacter [٥٤] ، واحتوت نماذج الحمأه المنشطة لمياه التصريف الحاوية على مستحلب الزيت لاحد مراكز معاملة المياه انواع من البكتريا للاجناس Pseudomonas، Acinetobacter ، Alcaligenus ، Corynebacterium ، Aeromonas ، Listeria ، Moraxella ، وضمت بعض من هذه الاجناس انواعاً من الممرضات الانتهازية[٥٥]. وجد Sandin اعداداً كبيرةً من الاحياء المجهرية في الزيوت المستحلبة المستعملة وكانت بكتريا

P.pseudoalcaligenes هـي السائـدة[٦] ، بينما كانت الانواع السائدة والمسببة للمشاكل فـي سوائل التشغيل الآلي في دراسة Passman هي Bacillus subtilis و Xanthomonas conpestris [٥٦]، وذكـرRajas وجماعـته ان الانـواع السائـدة فـي الزيـوت المستعمـلة فـي محـولات القدرة هـي Acinetobacter calcoaceticus ، Comamonas acidovoras ، Flavobacterium devorans ، Pseudomonas sp . ، Achromobacter sp. ، Bacillus thuringiensis [٥٧] B. lentus ، B. masceransˌ ، وعزل Lonon ١٩ عزلة بكتيرية مختلفة من مستحلبات الزيت الملوثَّة، وكانت الانواع السالبة لصبغة كرام هي السائدة وكان جنس الزوائف هو الغالب فيها[٤٩]، وتمكن اخرون من عزل ٢٠ عزلـة بكتـيرية تعـود الـى ثمانيـة اجنـاس مختلفـة شـملت Acinetobacter , Sphingomonas , Pseudomonas , Brevundimonas , Nocardia , Rhodococcus , Arthrobacter , Corynebacterium وكـان الجنس السـائد هو Corynebacterium [٥١] ، وفـي دراسـة اسـتمرت ٢٧٠ يـوم اسـتنتج Chaineau وجماعتـه ان ٧٥% مـن زيـت الوقود المستخدم في عمليات الحفر والقطع قد استهلكت بفعل الاحيـاء المجهريـة التـي شملت البكتريا والفطريات، وعزل ١٤ نوعاً مختلفاً من البكتريا تعود الى ثمانية اجناس والانواع هي P.fluorescens , P.vesicularis , P.paucimopilis , P.cepacia , P.aureofasciens , P.luteola , Xanthomonas maltophilia , A.baumanni , Flavobacterium indologenes , F.sbiritivorum , Agrobacterium radiobacter Micrococcus sp. , Rhodococcus sp. , Arthrobacter sp. [٤١] .

اشارت معظم البحوث الى ان البكتريا السائدة في مستحلبات الزيت هي الانـواع الهوائيـة ، الا ان نمو البكتريا اللاهوائية وخصوصاً النوع السائد منها Desulfovibrio desulfuricans يزدهر في ظروف الركود او التوقف عن العمل وقد يصل تعدادها الـى ٣×١٠ ٦ خليـة/مليلتر فـي المسـتحلب، وتتركـز علـى بـرادة الحديـد بتعداد قد يصـل الـى ١٠ ٣ خلية/سم٢ ، ولا تمنـع التهوية المتقطعة او المستمرة وجودها، وتتميز هذه البكتريـا بقدرتها علـى اختـزال الكبريتـات الى الكبريتيد مسببة اسوداد المستحلب وانتاج روائح كريهة يمكن تحسسـها صـباح اليـوم الـذي يلـي عطلـة نهايـة الاسـبوع[٤٦، ٥٨، ٥٩]. ودرس Wilkes وجماعتـه دور البكتريـا المختزلـة للكبريت في استهلاك عدد من المركبات الهيدروكاربونيـة فـي النفط الخـام، واستنتج ان عمل الاحياء يكون متمماً بعضه للبعض الاخر ، وانه حين استخدم العزلات بشكل مفرد ونقي وجد انها تصل الى مرحلة معينة من اكسدة المركبات الهيدروكاربونية وتتوقف وتموت بفعل تكوّن نـواتج اكسـدة نهائيـة غيـر قـادرة علـى اسـتمرار اكسـدتها dead end metabolites وان

المركبات المكونة من ١٣ ذرة كاربون قد تجمعت بالوسط[٤٧] ، وذكر Schmitt وجماعته ان العديد من المركبات الهيدروكاربونية مثل البنزين ، التلوين ، اثيل بنزين ، زايلين ومركبات اروماتية اخرى ذات اوزان جزيئية واطئة قد استهلكت بفعل البكتريا وان كمية كبيرة من الحوامض العضوية قد تولدت بوصفها نواتجاً ايضيةً لاكسدة المركبات الاروماتية وعزى الامر الى دور البكتريا المختزلة للكبريت والنترات[٦٠].

ب-الفطريات

ذكرت البحوث ان نمو الفطريات في مستحلبات الزيت يجب ان يسبق بالنمو البكتيري، وعموماً فان الفطريات لا يمكنها ان تتنافس مع البكتريا بسبب نمو الاخيرة بشكل اسرع ، فالمستحلب الحاوي على ٣-٤×١٠ ٤ خلية بكتيرية/مليلتر في بداية التشغيل يصبح محتواه بالملايين بعد ٨ ساعات عمل فقط[٤٥] ، وعليه فعندما تسود البكتريا في مستحلب ما فان الفطريات تختفي ، فضلاً عن ارتفاع قيمة الاس الهيدروجيني للمستحلب اذ يصل الى ٩.٨ وكذلك ان بعض مكونات الزيوت المعدنية الداخلة في تركيب المستحلبات تمنع تكوين السبورات الفطرية، ويؤثر وجود بعض المضافات الكيمياوية في المستحلب على نموها[٤٩، ٥١] إلا انه عند استخدام المبيدات ضد البكتريا تنشط الفطريات وتتكاثر[٦١] وتتمثل الفطريات السائدة في مستحلبات الزيت بالاجناس Candida، Fusarium ، Cephalosporium، Trichoderma، Trichosporom، Penicillium Mucor، Beauveria، Aspergillus، Gongronella، Cladosporium، Botrytis ، Saccharomces، Monosporium ، Acremonium و Cryptococcus[٤١،٥١، ٦٢] وسجل Krivobok وجماعته ثمانية انواع من الفطريات تسجل لاول مرة في قدرتها على تحطيم المركبات الهيدروكاربونية الاروماتية واستهلاكها عند دراسته لتسع وثلاثين عزلة من الفطريات المستهلكة للانثراسين والانواع الجديدة هي Cryphonectria parasitica ، Verticillium lecanii ، Oxysporus sp. ، Ceriporiopsis subvermispora ، Cladosporium herbarum ، Rhizopus arrhizus ، Fusarium moniliforme ، Drechslera spicifera ، var subglutinans[٦٣]. ان نمو الفطريات في المستحلبات ينتج عنه كميات كبيرة من المواد اللزجة والهايفات التي تسبب انسداد المرشحات وخطوط الانابيب والمبادلات الحرارية وابطاء سرعة الجريان وكثير من مشاكل التلف الاخرى[٤٨، ٥٦].

١-٢-٥: بيئة مستحلبات الزيت

أ-الماء:

في سنة ١٨٨٣ اوضح Taylor ان غمر منطقة التماس بين قطعة الشغل وماكنة القشط بالماء خلال عملية القطع تؤدي الى زيادة كفاءة وسرعة القطع بمعدل ٣٠-٤٠% ولم يكن في الحقيقة مدركاً للابعاد المستقبلية البيئية والاقتصادية لاكتشافه هذا إذ اعطى استخدام الماء في الصناعة ازدهاراً للاحياء المجهرية وللعاملين في حقلها ايضاً[٦] ، فالماء ولما يتمتع به من حرارة نوعية وتوصيل حراري عاليين وذو كلفة اقتصادية قليلة ومتاح للاستعمال، يعد احد اهم السوائل المستخدمة في اختزال الحرارة العالية في العمليات الصناعية ، إلا أن استخدامه لوحده غير مرغوب فيه لما يمكن ان يحدثه من صدأ او تآكل، لذا يضاف اليه عوامل الترطيب Wetting agents التي تعمل على خفض الشد السطحي له من خلال تقليل زوايا اتصال الماء بالاسطح ومن ثم انفصاله عنها[٦٤] ، ويعد الماء من اول المتطلبات لنمو الاحياء المجهرية في المستحلبات، اذ يشكل نسبة كبيرة من تركيبها مما يجعلها عرضة لغزو العديد من الانواع، وتتميز مستحلبات الزيت عن غيرها من الزيوت غير الذائبة بانها تهيء سطحاً بينياً كبيراً يساعد على النمو الميكروبي السريع وان وجود الماء ولو بنسب قليلة (١٠٠-٣٠٠ غم/طن زيت) كافٍ لنمو الاحياء المجهرية وحتى الرطوبة القليلة الناتجة بطريقة الارتشاح او التكاثف او الكميات القليلة من الماء الناتجة من اكسدة الهيدروكاربونات نفسها كافية لنموها[٤٦].

ب-نسبة التخفيف

تؤثر نسبة التخفيف بشكل كبير جداً على نمو الاحياء المجهرية في المستحلبات، فعندما تكون النسبة ١:٥ (زيت: ماء) فانها تكون مثبطة وعادة يكون هناك نسبة نمو ضعيفة جداً بسبب التأثيرات السمية لبعض مكونات الهيدروكاربون نفسه او بعض المضافات الكيمياوية، اما النسبة ١:١٠ فانها مثبطة جزئياً وان نمواً جيداً سيحدث بعد عدة ايام والنسب بين ١:٢٠ الى ١:٥٠ تعطي افضل نمو، اما في التخافيف الاعلى من ١:٥٠ فان مكونات المستحلب التي يمكنها ان تؤكسد بفعل الاحياء المجهرية ستتخفف للحد الذي تصبح فيه هي العامل المحدد للنمو[١]، ولما كان التركيز الاعتيادي للمستحلبات المستعملة هو بين ٢-٦% فان هذا يبدو ملائماً جداً مع متطلبات النمو للعديد من الاحياء المجهرية[٦].

ج-عسرة الماء

تلعب عسرة الماء المستعمل لتخفيف الزيوت الذائبة لعمل المستحلب دوراً كبيراً في سرعة عملية التردي الحيوي للمستحلب بالاضافة الى نوع الاحياء المجهرية النامية[٦٥]، وفي دراسة Bennett اوضح ان الماء اليسر الحاوي على ٧٢ جزء بالمليون من كاربونات الكالسيوم اعطى ١.٧ مرة اعداداً بكتيرية اكثر مقارنة باعدادها باستخدام الماء المقطر، وان

زيادة نسبة كاربونات الكالسيوم في الماء العسر الى مقدار ٦٩٢ جزء بالمليون اعطى ٣.٧ مرة اعداداً بكتيرية اعلى مقارنة بالمستحلب المخفف بالماء المقطر، إلا أنه لاحظ علاقة عكسية بين نمو الاعفان وعسرة الماء، فعند دراسته لخمسة مستحلبات زيت عولج الماء المستعمل فيها لتقليل عسرته باستخدام مادة Sodium hexa meta phosphate من ٧٠٠ جزء بالمليون من كاربونات الكالسيوم الى ٣٥٠ ثم الى الصفر، كان معدل الزيادة في نمو الاعفان بالمستحلب ٨.٨ مرة بتركيز ٣٥٠ جزء بالمليون و ٢٦ مرة للتركيز صفر مقارنة بالمحلول الاصلي الحاوي على ٧٠٠ جزء بالمليون، وتساعد زيادة محتوى الماء من الاملاح او آيونات الحديدوز، والمغنيسيوم، والفوسفات على سرعة التردي الحيوي للمستحلب إذ تساعد على تحفيز نمو البكتريا المختزلة للكبريت ومن ثم زيادة مشاكل التلف[١].

د-تركيب المستحلب

ان الاختلاف في تركيب المستحلبات وحقيقة كون التركيب الدقيق لها هو صفة خاصة وشبه سرّية لكل مجهَّز، يجعل من الصعب القول أي من المكونات تعد هي المصدر الاكثر جاهزية للاستهلاك[٧] ومستحلبات الزيت بصورة عامة هي زيوت معدنية ذائبة مخلوطة مع عوامل استحلاب مختلفة، وان اكثر المستحلبات شيوعاً في الاستخدام لها صيغة تركيبية من ثلاثة مكونات رئيسية هي زيت بترولي بنسبة ١-٥% و Petroleum sulphonate بنسبة ٠.١-٠.٥% واحماض شحمية بنسبة اقل من ٠.١% وهي بالدرجة الاساس حوامض الاوليك واللينولك Olic & Linoleic acid[٢،٣] ، وان هذه المصادر بهذه التراكيز توفر المصدر الكاربوني الكافي لدعم النمو، ويعتقد ان حوامض الاوليك واللينولك تمثل المصدر الكاربوني الاوفر حظاً لنمو البكتريا في المستحلبات، وان سلالات مختلفة من البكتريا قد نمت في مستحلبات زيت حاوية على هذين الحامضين وكذلك نمت على زيت بترولي حاوي على النفثالين بينما لم تظهر الـ Petroleum sulphonate أي دليل على كونها ممكن ان تكون مصدراً للكاربون[٧].

هـ -الاوكسجين

تتعرض بعض مناطق الانظمة الهندسية للمكائن التي تستخدم فيها مستحلبات الزيت الى التهوية المستمرة والبعض الاخر تكوّن مناطق ساكنة تنخفض فيها نسبة الاوكسجين المذاب مما يعطي فرصة لنمو البكتريا المختزلة للكبريت[٤٩،٦٦] ، وتسمح عملية ملء المستحلبات في المكائن وتدويرها بدخول كميات كبيرة من الاوكسجين اليها مما تهيء ظروفاً مناسبة لنمو البكتريا الهوائية والفطريات، ويتم تدوير المستحلبات في المكائن شائعة الاستعمال مرة واحدة كل ٣-٥ ساعات تقريباً، إلا أن التدوير السريع يؤدي الى زيادة دخول

الاوكسجين الذائب الى المستحلب، وتؤثر في العملية ايضاً درجة الحرارة ومحتوى المستحلب من المواد العضوية[٥٨].

و-الاس الهيدروجيني

تكون قيم الاس الهيدروجيني لمعظم مستحلبات الزيت ضمن المدى القاعدي وتتراوح بين ٨-٩.٨ وبذلك تكون البكتريا هي اول من يبدأ مهاجمة المستحلب ويحصل التردي الحيوي لمستحلبات الزيت بدرجة كبيرة عندما يكون الاس الهيدروجيني للمستحلبات بين ٧-٩ وعندما تنخفض قيمة الاس الهيدروجيني تزدهر الفطريات والخمائر، وان نمواً لعدة اسابيع للبكتريا يكون ضرورياً جداً قبل بدء ظهور التلوث بالفطريات ويصبح التردي الحيوي للمستحلب عملياً معدوماً عند قيم اعلى من ٩.٥ [٥٦، ٦٢، ٦٦].

ي- درجة الحرارة

تختلف درجة حرارة المستحلبات باختلاف نوع العمليات المعدنية المجراة ففي المكائن ذات الاستعمالات الشائعة تكون درجة حرارة المستحلب اعلى قليلاً من درجة حرارة الغرفة، بينما في انواع اخرى تصل الى اكثر من ٥٠°م، وهناك تفاوت ايضاً بدرجة حرارة المستحلب بين ساعات العمل وساعات التوقف سواء اكان بالليل ام ايام العطل مما يؤثر ذلك على نوع الاحياء المجهرية النامية[٩]، وذكر Okpokwasili & Okorie ان التردي الحيوي لزيوت محرك السيارات يحصل بفعل البكتريا المعتدلة للحرارة mesophilies عندما يكون المحرك بارداً في غير اوقات العمل، وتكون البكتريا المحبة للحرارة Thermophilic وخصوصاً من جنس الـ Bacillus هي المسؤولة عنه اثناء الاشتغال[٥٤]، وتؤثر درجة الحرارة على الطبيعة الفيزياوية والكيمياوية للمستحلب ومن ثم على سرعة تمثيله والمحتوى الميكروبي له[١٢، ٤٣]، ووجد ان لزوجة المستحلب تزداد بدرجات الحرارة الواطئة ويقل تطاير الالكانات ذات السلاسل القصيرة السامة وتزداد قابليتها على الذوبان في الماء مما يؤدي الى انخفاض نمو الاحياء المجهرية فيها وبزيادة درجات الحرارة يزداد تمثيل الهيدروكاربونات في المستحلبات، وان الدرجة الحرارية المثلى للتردي الحيوي للمستحلبات هي بين ٣٠-٤٠ °م[١٣، ٣٢].

١-٢-٦: التآكل الميكروبي المصاحب للمنتجات النفطية

يمثل التآكل الميكروبي مشكلة مهمة في العديد من مجالات الصناعة وخصوصاً الصناعات النفطية واستخداماتها بسبب ان الاحياء المجهرية التي لها القدرة على تمثيل

المركبات الهيدروكاربونية يمكنها ان تهاجم الوقود، زيت الوقود، دهون التزييت والمستحلبات بكل انواعها وتنتج مركبات مختلفة بوصفها نواتجاً عرضية للتمثيل تقود الى التآكل[٦٧] وتسبب الاحياء المجهرية التآكل بطرق مختلفة فقد تنتج مواد كيمياوية مثل CO_2، H_2S، H_2SO_4، S، NH_4، R-COOH تعمل هذه المواد بشكل مباشر او غير مباشر على احداث التآكل ، او بسبب نمو كتلة الاحياء على سطح المعدن واحداث مناطق اختلاف بالتهوية differential aeration، او تحطيم الطبقات الواقية المستخدمة للمحافظة على المعدن تحتها كما هي الحالة في خزانات حفظ الوقود او مهاجمتها للمركبات الكيمياوية المضافة مثل مضادات الصدأ ومضادات التآكل، وتعتمد سرعة التآكل على عدة عوامل منها نوع الكائن المجهري، سرعة نموه ، الظروف البيئية ، نوع المعدن وتركيب المركب الهيدروكاربوني ، ويمكن ان يحدث كلا النوعين من التآكل الهوائي واللاهوائي ضمن النظام نفسه[٤، ٦٨، ٦٩] وتعد البكتريا المختزلة للكبريت المسبب الرئيسي للتآكل اللاهوائي للحديد والفولاذ وان انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين بفعل هذه البكتريا قد يحمل تأثيراً تأكلياً لهما، وان نواتج التآكل هي في الغالب كبريتيد الحديدوز، وعادة يحدث التآكل اللاهوائي في خزانات حفظ المركبات الهيدروكاربونية المخزونة لفترة طويلة[٧٠]. اشار Gangloff & Kelly الى وجود ثقوب وحفر عميقة وكذلك تنقر سطحي غير منتظم في قاع خزانات حفظ زيت الغاز استعملت لفترات طويلة وعزلا البكتريا المختزلة للكبريت وذكرا بانها ممكن ان تصبح فعّالة جداً خلال عدة اشهر عندما تكون الظروف ملائمة[٧١] ، ويمكن ان يحدث التآكل اللاهوائي ايضاً في انظمة تدوير مستحلبات الزيت الهوائية خلال فترة عدم الشغل أو عندما تكون سرعة التدوير واطئة أو على السطوح المغطاة بالطبقة الحيوية الرقيقة Biofilm التي تحتاج فقط من ١٥-٢٠ مايكرومتر من السُمُك لكي تنشأ ظروفاً لاهوائية تسمح للبكتريا اللاهوائية والبكتريا المختزلة للكبريت بالنمو تحتها[٦٩، ٧٢]، ومع هذا فان معظم مشاكل التآكل الناشئة في خزانات حفظ الوقود او خزانات وقود الطائرات وخصوصاً النفاثة منها التي تستخدم خزانات وقود اضافية او انظمة دهون التزييت او المستحلبات الوّار ة هي بفعل البكتريا الهوائية[٤] ، وقد تسبب الاحياء المجهرية التآكل بانتاجها حوامض عضوية تؤثر على المعدن إذ تعمل هذه الحوامض على زيادة تجهيز المحلول أو المستحلب بايونات الهيدروجين ومن ثم تعمل على سحب الالكترونات مسببة التآكل[٧٣]، وتستعمل في المستحلبات مضافات كيمياوية ضد التآكل والصدأ مثل النتريت، والنترات، والامينات وهي مركبات يمكن ان تستهلكها الاحياء المجهرية بوصفها مصدراً غذائياً ومن ثم فان تحطم هذه المضادات يجعل المستحلب اكثر حدة في تأثيره على المعدن، ووجد Tiller ان تركيز مضادات التآكل والصدأ

ممكن ان ينخفض من ١٢M الى ٠.٢M خلال عدة ايام بوجود البكتريا[٤]. درس Dias & Bromel ظاهرة بدأ نشوء التآكل على سطح المعدن تحت كتلة الخلايا النامية التي تسبب عدم تجانس توزيع الاوكسجين، وكذلك انتاج حوامض عضوية تحتها، ووجدا ان هناك تركيزاً عالياً من البوتاسيوم بمركز نقطة الصدأ، واشارا الى ان هذا العنصر يتميز بزيادة تركيزه في المواد البايولوجية وانه يمكن ان يكون للترسبات الميكروبية دوراً في عملية التآكل، وان التآكل الهوائي يترافق عادة مع انخفاض في قيمة الاس الهيدروجيني في مستحلبات الزيت بينما يترافق التآكل اللاهوائي مع زيادته [٦٨].

١-٢-٧: الخسائر الاقتصادية للتردي الحيوي لمستحلبات الزيت

ان التردي الحيوي الذي تسببه الاحياء المجهرية لمستحلبات الزيت يتصف بمظاهر عديدة، وان التكلفة الكلية للمشكلة لا تتعلق بالخسائر المباشرة الناتجة من تلف المشتق النفطي فقط بل تتعداها الى نقاط اخرى تشمل :

١. خسائر في وقت الانتاج خلال عمليات تبديل الدهن او المستحلب، وكذلك انخفاض انتاجية العمليات الاخرى المرتبطة معها.
٢. الخسائر المباشرة بشكل اجور عمل للقيام بعملية التبديل فضلاً عن ثمن المستحلب الجديد نفسه.
٣. التكلفة الاضافية الناتجة من عمليات التخلص من الزيت او المستحلب التالف وقد يفوق ثمن التخلص ثمن الشراء، فقد ذكر Sandin انه في عام ١٩٩١ كان ثمن شراء المتر المكعب لسوائل التشغيل الآلي في السويد هو بين ٢٥٠٠-٤٠٠٠ كراون بينما كان ثمن التخلص منها بين ١٢٠٠-٤٥٠٠ كراون[٦].
٤. تردي نوعية المنتوج وخصوصاً الحالة النهائية للسطح وتآكله وظهور نقط الصدأ عليه.
٥. خسائر اقتصادية اضافية للتخلص من زيادة المواد اللزجة المتراكمة بعمليات الازالة أو بفعل تسببها في انسداد الانابيب ، المرشحات ، العدادات ، المضخات وغيرها.
٦. حدوث تآكل وتلف لادوات التشغيل كالمكائن ، المضخات ، الصمامات ، الانابيب الاحواض ، العُدد وغيرها.
٧. تسريب الصمامات والتصاق المكابس وتوقف عملها مما يتطلب عناية مستمرة ومتكررة وتقصير عمر الآلات عموماً.

٨. تصبح جرعة المضاد biocide المضافة اعتماداً على توصية المجهز غير كافية للسيطرة على التردي الحيوي، ولا تمنع جرعة التي تظهر تأثير تثبيطي عملية التآكل.
٩. تكوين روائح كريهة وغير مستساغة من قبل العمال مما يؤثر على ادائهم.
١٠. مشاكل صحية للعاملين (تنفسية ، جلدية) وحتى نفسية فقد يشعر العمال بسبب كل ما ورد اعلاه وتدني نوعية المنتوج النهائي بانهم اقل براعة في عملهم[٥٦، ٧٤].

١-٢-٨: طرق قياس التردي الحيوي للمركبات الهيدروكاربونية

تضم الهيدروكاربونات مجموعة كبيرة ومختلفة من المركبات العضوية ومن حيث التعريف فانها تشمل فقط المركبات المكوّنة من الكاربون والهيدروجين ، ومع ذلك فان المصطلح قد نمّا وتوسع ليشمل كل المركبات العضوية المختلفة الذرات المشتقة من النفط او منتجاته[٤٣] ، لذا فان هناك عدة طرق يمكن من خلالها التحري عن استهلاك المركبات الهيدروكاربونية بفعل الاحياء المجهرية، ولعل ابسطها واقلها كلفة واكثرها شيوعا هي معرفة الزيادة في العدد الكلي للخلايا الحية مع الزمن، أو زيادة بعض الفعاليات الحياتية للخلايا مثل سرعة النمو, التنفس, الحرارة المنبعثة، او حساب العدد الكلي الاكثر احتمالاً (M.P.N.) للخلايا المستهلكة للمركب الهيدروكاربوني من مجموع العدد الكلي للخلايا النامية، ومثل هذه الطرق تعطي دليلا غير مباشر لعملية التردي الحيوي وعادة تستعمل لقياس درجة أو شدة Potential التردي وتختلف الطرق المستعملة في القياس حسب نوع المركبات الهيدروكاربونية وبيئتها ونوع المعلومات المطلوبة[٧٥]، وهناك عدد من الطرق الكيمياوية غير المتخصصة يستدل بواسطتها على استهلاك المركبات الهيدروكاربونية من دون معرفة او تحديد الجزء المستهلك كما في قياس كمية الـ ATP المتكونة وعلاقتها بالكتلة الحيوية للخلايا، او حساب مقدار الاستهلاك للمادة الاساس كمّياً ، او قياس متطلبي الاوكسجين الحيوي والكيمياوي [٧٦, ٧٧] او حساب النواتج النهائية مثل قياس كمية غاز ثاني اوكسيد الكاربون إذ ان الطريق الرئيسي لتردي المركبات الهيدروكاربونية هو عن طريق اكسدتها , فالهيدروكاربونات (معطية للالكترونات) تؤكسد بوجود الاوكسجين او أي بديل اخر يعمل بوصفه مستلماً للالكترونات وهذه المستلمات ستختزل بالمقابل, وفي الحالات التي لاتتحدد فيها عملية التردي الحيوي بعوامل اخرى فأن المركبات الهيدروكاربونية ستتحول الى غاز ثاني اوكسيد الكاربون بوصفه ناتجاً نهائياً، وان قياس كمية الغاز الناتج يمثل مقياسا جيدا لفعالية الخلايا وتعطي دليلا على مدى دعم مثل هذه المركبات للنمو ومدى استجابة

الخلايا لتلك المركبات[١٢] اما الطرق الكيمياوية المتخصصة فيستدل من خلالها على نوع المركب المستهلك ومن هذه الطرق بعض تقنيات الكروموتوكرافي المختلفة ومطياف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية والاشعة تحت الحمراء والمطياف التألقي ومطياف الكتلة [٧٨, ٧٩] .

١-٢-٩: السيطرة على نمو الاحياء المجهرية في مستحلبات الزيت

يبدو انه من المستحيل ابقاء المشتقات النفطية في حقل العمل معقمة وانه من الصعب جداً لامور عملية وتطبيقية جعل كل الظروف غير ملائمة لنمو الاحياء المجهرية[٤٦]، وتستخدم طرق مختلفة لمنع عملية التردي الحيوي لمستحلبات الزيت كالطرق الميكانيكية مثل الترشيح، او الطرد المركزي العالي، والطرق الفيزياوية مثل استعمال الاشعة فوق البنفسجية , اشعة كاما, استخدام الامواج فوق الصوتية , البسترة الحرارية بدرجة ٦٣-٧٠ م لمدة ٢٠-٦٠ ثانية، او البسترة باستعمال الامواج الدقيقة microwave بدرجة ٦٠-٧٠ م لمدة ٤٥ ثانية[٨٠,٨١]، وقد جُرّبت هذه الطرق مختبريا ووجدت بانها تقلل اعداد الخلايا الا انها لم تكن كفوءة للدرجة المطلوبة عندما طبقت بنطاق واسع في المعامل ومن ثم فأن استخداماتها ما زالت محدودة إذ ان فعالية أي منها تكون محددة بجزء معين من دورة تشغيل وتدوير المستحلب ومن ثم تفشل في قتل كل الخلايا وخصوصاً تلك التي تكون ملتصقة بالجدران او الحوض او مناطق الربط او بداخل الانابيب[٨٢] لذلك وعلى الرغم من كل التحذيرات الصحية المتكررة وكثير من الضوابط والقيود حول استعمال المركبات الكيمياوية, فأنه يبدو ان لا مناص من استخدامها بوصفها مبيدات في المستحلبات لاجل السيطرة على ترديها حيويا[٨٣] فما ان يستوطن النمو الميكروبي في سوائل التشغيل الالي لاي نظام، فأنه يصبح من الصعوبة التخلص منه كليا بسبب قدرة الاحياء المختلفة على تحطيم العديد من المركبات المستخدمة تجاريا للسيطرة مثل مركبات الفورمالديهايد والفينول فضلاً عن التراكيز العالية من هذه المركبات تكون مؤثرة على العمال، وان الجرعة المطلوبة للسيطرة على الاحياء وتلك الجرع المؤثرة مفصولتان عن بعضهما بمدى ضيق جداً وان التراكيز الثابتة من الصعب ابقاؤها في المستحلب بوجود الخلايا وحتى بغيابها بسبب الاختفاء الذاتي للمبيدات[٨٤], لقد نشر العديد من الدراسات حول استعمال المركبات الكيمياوية للسيطرة وأُختُبِرَ العديد منها وذكر بعضهم ان اكثر المركبات فعالية هي مركبات الزئبق العضوية إلا أنه بصورة عامة هناك ميل دائما للابتعاد عن مركبات الزئبق في العمل بسبب سميتها[٨]، وتستخدم هذه الايام مواد كيمياوية محددة والانواع الاكثر شيوعا هي الفورمالديهايد والمركبات المحررة له، وتكون هذه المركبات ثابته في الوسط القاعدي وتتحلل محررة الفورمالديهايد بانخفاض الاس الهيدروجيني، وتمتاز هذه المركبات بكونها رخيصة الثمن وتلائم معظم انواع الزيوت

المستحلبة إلا أنها مهيجة للجلد والحنجرة والعيون، وان الاشارات حول قدرتها المسرطنة قد قلل من استعمالها حتى وان كانت التراكيز المستخدمة منها بعد تخفيف المستحلب هي دون الحدود الخطرة[٨٥] وتُظهِر المركبات المحررة للفورمالديهايد فعالية كبيرة ضد البكتريا لكنها اقل كفاءة تجاه الفطريات وحتى بالتراكيز العالية منها[٦٠] وَوِجِدَ ان تأثيرها يكون افضل عند استعمالها بشكل مشترك مع مركب Na-٢-pyridinethiol-oxide او المركبان ٤-chloro-٣-phenol و ٢-phenyl phenol (pp) ويستخدم هذان المركبان وهما من مشتقات الفينول بكثرة، بينما نادراً ما يستخدم الفينول نفسه، وتهيء هذه المركبات السيطرة على الاحياء بطرق مختلفة منها تأثيرها على مكونات جدار الخلية وتثبيط عمل انظمة انزيمية متعددة ، وهناك العديد من المركبات الكيمياوية التي اجريت عليها دراسات في امكانية استخدامها بوصفها مبيدات شملت انواعاً من الكحولات والالديهايدات ومشتقات المعادن الثقيلة والهالوجينات والعوامل المؤثرة على الشد السطحي وغاز الاوزون وغيرها[٦، ٨٣]، وقادت النواحي الصحية الى تحديد انتاج مبيدات جديدة مما ادى الى انتاج انواع جديدة قليلة جداً خلال السنوات الماضية، وان التطور في هذا المجال يبدو انه مسيطر عليه باغراض تجارية اكثر ما هي علمية مما قاد الى انتاج مركبات غير محددة كيمياوياً بشكل تام وهناك توضيحات قليلة فيما يخص آلية عملها[٨٦] وتوجهت الابحاث الى مجالين هما تطوير المركبات المستعملة بوصفها مضادات للتآكل للعمل في الوقت نفسه بوصفها عوامل سيطرة على النمو، مما يقلل استعمال المواد الكيمياوية ذات التأثير الصحي الخطر[٨٧] ، فقد وجد Tabakova وجماعته ان تركيز ١٠٠ملغم/لتر من مادة Tetra methyl di thio oxamide (TMDTOA) المستعملة بوصفها مادة مانعة للتآكل سببت قتل ٩٩.٩٩% من الخلايا الحية في خزانات الوقود، واستمرت فعاليتها لمدة بين ١-٣ شهر[٨٨] ، واشار Tiller الى ان استخدام ١% من Ethylenglycolmonoethylether (E.G.M.E.) سبب منع التآكل الميكروبي لسبائك الالمنيوم في الانظمة التي يشترك فيها الزيت: الماء[٤]، واستخدم Meshako وجماعته مجموعة من المركبات الكيمياوية منها di E.G.M.E. ووجد انها خفظت استهلاك متطلب الاوكسجين الحيوي من قبل الخلايا بمقدار ٢٧% عند استخدامها بتراكيز واطئة بلغت ٣.٥ ملغم/لتر[٨٩]، والمجال الثاني هو استعمال المركبات الموجودة والمستعملة حالياً ومحاولة ايجاد تعاضد Synergism بينهما ، ان استعمال مركبات معروفة الخواص والمواصفات بمفردها او مشتركة مع غيرها سيقلل المخاطر السمية والبيئية وحتى المهنية فالمبيدات بالتراكيز العالية مؤثرة على صحة العمال وبالتراكيز الواطئة غير فعّالة ضد الاحياء المجهرية ومن ثم فهناك صعوبة في التحديد الدقيق بين مقاومة المبيد ونقطة

نهاية التحمل للخلية، وكذلك تحديد المقاومة الحقيقية النادرة الحدوث وبين المقاومة الكاذبة التي غالباً ماتحدث بفعل سوء استعمال المبيدات في حقل العمل[٨٣، ٨٤] وذكر Cloete وجماعته انه عند استعمال المبيدات في أي نظام تشغيل يجب مراقبة مجموعة نقاط منها معرفة نوع الاحياء الواجب قتلها واختيار المبيد او المبيدات المناسبة بتراكيزها الصحيحة، ومعرفة الوقت العلمي الدقيق لاعادة اضافة المبيد، وتحليل مجمل البيانات المستحصلة دورياً لمتابعة تأثير المبيد ومراقبة التصاق الخلايا بالسطوح، ومنع تكوّن الطبقة الحيوية الرقيقة عليها[٨٦].

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل

اولاً: المواد المستعملة

٢-١-١: الزيت الذائب ومكوناته

تم الحصول على الزيت الذائب المصنّع محلياً ومكوناته الاساسية والمعلومات المتعلقة به من شركة مصافي الوسط/قسم البحوث والسيطرة النوعية :

أ- الزيت الذائب الكامل Whole soluble oil.

ب- زيت الاساس ٤٠ المعدني ٤٠-Base mineral oil.

ج- المضاف الكيمياوي (المركَّز) The concentrate.

استخدم الزيت الذائب أو مكوناته المذكورة اعلاه بوصفها مصادراً وحيدةً للكاربون والطاقة للعزلات البكتيرية في البحث.

٢-١-٢: المواد الكيمياوية والاوساط الزرعية المستخدمة جهزت من الشركات الاتية

أ- شركة BDH/ England

كبريتات المغنيسيوم $MgSO_4$، ارابينوز Arabinose ، لاكتوز Lactose ، مستخلص اللحم Beef extract ، وسط Simmon citrate ، صبغة المثيل الاحمر Methyl red بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 ، مالونات الصوديوم Sodium malonate ، مركب Chlorhexedin gluconate ، تراب الزنك Zinc dust، نفثالين Naphthalene ، ايثانول Ethanol.

ب- شركة Abbott Laboratories/ USA

كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ ، زايلوز Xylose، الفينول الاحمر Phenol red ، مستخلص الخميرة Yeast extract ، بروموثايمول الازرق Bromothymol blue ، فينانثرين Phenanthrene ، مركب Ethylen glycol monoethyl ether ، كلوريد الحديديك $FeCl_3$.

ج- شركة Fisher Laboratories/ USA

فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4، سكروز Sucrose، تربتون Tryptone ، كبريتات الصوديم اللامائية Na_2SO_4، انثراسين Anthracene، مادة ٨٠-Tween .

د- شركة Ciba-geigy/ Switzerland

فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين K_2HPO_4، رافينوز Raffinose ، دلسيتول Dulcitol ، لايسين Lysine ، هيدروكسيد البوتاسيوم KOH ، كلوريد الزئبقيك $HgCl_2$، هيدروكسيد الصويوم NaOH ، ثنائي اثيل الايثر diethylether.

هـ- شركة Difco/ U.S.A.

سوربيتول Sorbitol ، ارجينين L-Arginine ، وسط MR-VP ، جيلاتين gelatine وسط Kligler iron agar ، ثنائي المثيل الفانفثول أمين N.N.dimethyl-α-naphthyl amine.

و- شركة Merck/Germany

كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ ، اورنثين L-ornithine ، حامض الهيدروكلوريك HCl ، مادة P-dimethyl amino benzaldehyde، بنزين benzene، تلوين Toluene ، مادة Na-tetraborate.

ز- شركة Fluka/ Switzerland

كلوكوز Glucose ، المرق المغذي Nutrient agar ، مسحوق Tetramethyl-p-phenylene diamine dihydrochloride، بروموكريسول ارجواني Bromocresol purple.

ح- شركة Oxoid/ England

كلوريد الصوديوم NaCl، وسط urea agar ، وسط Blood agar ، وسط ماكونكي Mac Conkey agar، نترات البوتاسيوم KNO_3، يود I، سفرانين Safranin، بلازما ارنب مجفدة Lyophilized rabbit plasma.

ط- شركة Sigma/ U.S.A.

مانيتول Mannitol ، ببتون Peptone ، نشأ starch ، مسحوق اليوريا urea powder ، يوديد البوتاسيوم KI ، حامض السلفانيلك sulfanilic acid ، حامض الخليك الثلجي glacial acetic acid.

٢-١-٣: الاوساط الزرعية

٢. وسط الاكار المدمم Blood agar: حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة (Oxoid) واستخدم في العزل الاولي للبكتريا.

٣. وسط ماكونكي الصلب: حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة (Oxoid) واستخدم لتفريق النمو للعزلات السالبة عن الموجبة لصبغة كرام.

٤. وسط الاملاح المعدنية السائل Mineral medium: المستخدم من قبل Bushnell & Hass لتنمية البكتريا واختبار قدرتها على استهلاك مستحلب الزيت بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة او احد مكوناته المتمثلة بزيت الاساس ٤٠، او المضاف الكيمياوي (المركَّز) ، وحضر الوسط باذابة $MgSO_4$ ٠.٢ غم، $CaCl_2$ ٠.٠٢ غم ، KH_2PO_4 اغم ، K_2HPO_4 اغم، $(NH_4)_2SO_4$ اغم، قطرتين من محلول $FeCl_3$ المركز في لتر ماء مقطر، وعّدل الاس الهيدروجيني الى ٧.٢ ثم عقم بالمؤصدة بدرجة ١٢١م لمدة ١٥ دقيقة [٩٠].

٥. وسط اكسدة السكريات: المكون من peptone ١٠غم ، Beef extract اغم ، NaCl ٥غم ، phenol red ٠.٠١٨غم ، ماء مقطر (١) لتر ، ثم اضيفَ له احد السكريات المستخدمة (كلوكوز ، سكروز ، لاكتوز ، ارابينوز ، زايلوز ، رافينوز ، سوربيتول دلسيتول ، مانيتول) بتركيز نهائي مقداره ١ % وعّدل الاس الهيدروجيني الى ٧.٢ ووزع بانابيب اختبار بمقدار ٥ مليلتر ثم عقم بالمؤصدة بدرجة ١٢١م لمدة ١٠ دقائق [٩١].

٦. وسط استهلاك الحوامض الامينية: حضر باذابة Tryptone ٥غم، Yeast extract ٥غم KH_2PO_4 ٢غم ، glucose ٠.٢٥غم ، Bromocresol purple ٠.١غم، في لتر من الماء المقطر ثم اضيف له اغم من احد الحوامض الامينية (ارجينين ، لايسين، اورنثين) وعّدل الاس الهيدروجيني الى ٧.٢ ووزع بانابيب اختبار بمقدار ٥ مليلتر وعقم بالمؤصدة بدرجة ١٢١م لمدة ١٥ دقيقة [٩١].

٧. وسط اليوريا: حضر الوسط الاساس حسب تعليمات الشركة المجهزة "Oxoid" وبعد تعقيمه بالمؤصدة اضيف له محلول اليوريا ٤٠% (وزن /حجم) المعقم بالترشيح وبمقدار ٥٠ مليلتر لكل ٩٥٠ مليلتر من الوسط ووزع بانابيب اختبار بمقدار ٥ مليلتر[٩١].

٨. وسط النترات : حضر باذابة Beef extract ٣غم، peptone ٥غم ، KNO_3 اغم في لتر من الماء المقطر وعّدل الاس الهيدروجيني الى ٧.٢ ووزع بانابيب اختبار بمقدار ٥ مليلتر وعقم بالمؤصدة بدرجة ١٢١م لمدة ١٥ دقيقة[٩١].

٩. وسط اكار النشأ : حضر باضافة النشأ بنسبة ٢% الى وسط المرق المغذي الصلب Nutrient agar وعقم بالمؤصدة بدرجة ١٢١م لمدة ١٥ دقيقة[٩١].

١٠. وسط استهلاك الستررات: استخدم وسط Simmon citrate وحضر حسب تعليمات الشركة المجهزة (BDH).

١١. وسط تمّيع الجيلاتين: حضر باذابة Beef extract ٣غم ، Pepton ٥غم ، gelatin ١٢٠غم في لتر من الماء المقطر ، ذوّب بالتسخين ووزع بانابيب اختبار بمقدار ٥ مليلتر ثم عقم بالمؤصدة بدرجة ١٢١م لمدة ١٥ دقيقة[٩١].

١٢. وسط MR-VP: حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة (Difco) ووزع بانابيب اختبار بمقدار ٥ مليلتر ثم عقم بالمؤصدة بدرجة ١٢١م لمدة ١٥ دقيقة.

١٣. وسط Kligler iron agar: حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة (Difco) ووزع بانابيب اختبار وعقم بالمؤصدة بدرجة ١٢١م لمدة ١٥ دقيقة وحفظ بشكل مائل لحين تصلّبه.

١٤. وسط البيتون: حضر باذابة Pepton ١٠غم ، NaCl ٥غم، في لتر من الماء المقطر، ووزع بانابيب اختبار بمقدار ٥ مليلتر وعقم بالمؤصدة بدرجة ١٢١م لمدة ١٥ دقيقة[٩١].

١٥. وسط استهلاك الـ Malonate: حضر باذابة Yeast extract ١غم، $(NH_4)_2SO_4$ ٢غم، K_2HPO_4 ٠.٦غم ، KH_2PO_4 ٠.٤غم، NaCl ٢غم ، كلوكوز ٠.٢٥غم، Na-malonate ٣غم ، Bromothymol blue ٠.٢٥ غم في لتر ماء مقطر وعّدل الاس الهيدروجيني الى ٦.٧ ووزع بانابيب اختبار بمقدار ٥ مليلتر ثم عقم بالمؤصدة بدرجة ١٢١م لمدة ١٥ دقيقة [٩١].

٢-١-٤: الكواشف

١. كاشف المثيل الاحمر Methyl red حضر باذابة ٠.١غم من صبغة المثيل الاحمر في ٣٠٠ مليلتر كحول اثيلي ٩٥% ثم اكمل الحجم الى ٥٠٠ مليلتر بالماء المقطر[٩٢].

٢. كاشف باريت Barritt's reagent: ويتكون من محلولين هما:

محلول A: α- naphthol ٥% في أيثانول مطلق.

محلول B: KOH ٤٠% في الماء المقطر[٩٢]

٣. كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent: المتكون من ١% مسحوق Tetramethyl-P-phenylenediaminedihhydrochloride في الماء المقطر وحفظ في زجاجة معتمة[٩١].

٤. كاشف الكاتاليز Catalase reagent: المتكون من ٣% بيروكسيد الهيدروجين.

٥. كاشف اختزال النترات: ويتكون من:

١- محلول A: ٠.٦غم من N.N.dimethyl-α naphthyl amine تذاب ١٠٠ مليلتر من حامض الخليك الثلجي (٥ عياري) .

٢- محلول B: ٠.٨غم من حامض السلفانيلك تذاب في ١٠٠ مليلتر من ٣٠% حامض الخليك الثلجي.

٣- تراب الزنك[٩٢]

٦. كاشف نسلر Nessler's reagent: حضر باضافة محلول يوديد البوتاسيوم (٥غم KI في ٥ مليلتر ماء مقطر) تدريجياً ومع التحريك المستمر الى محلول مشبع من كلوريد الزئبقيك لحين تكون راسب احمر، بعدها رشح المحلول واضيف للراشح ٤٠ مليلتر من هيدروكسيد الصوديوم (٩N NaOH) ومزج جيداً ثم اكمل الحجم الى ١٠٠ مليلتر ماء مقطر[٩٢].

٧. كاشف تحلل النشأ: اذيب ١٠غم من يوديد البوتاسيوم (KI) في ٢٥ مليلتر ماء مقطر ثم اضيف ٥غم من اليود ببطء مع التحريك المستمر حتى الذوبان الكامل ثم اكمل الحجم بالماء المقطر الى ١٠٠ مليلتر [٩١].

٨. كاشف كوفاكس Kovac's reagent: اذيب ١٠غم من مادة P-dimethylamino benzaldehyde في ١٥٠مليتر من الكحول الاثيلي، ثم اضيف ٥٠ مليلتر من حامض الهيدروكلوريك المركز[٩٢].

٢-١-٥: الاجهزة المستخدمة

فرن كهربائي، ميزان كهربائي حساس، جهاز قياس الاس الهيدروجيني جهاز قياس التوصيلية الكهربائية، جهاز قياس اقطار القطيرات، مجهز الكتروني ماسح، مجهز ضوئي، جهاز طرد مركزي فائق السرعة، مؤصدة، حاضنة، مضخة هواء، جهاز كروموتوكرافيا الغاز، ماكنة صقل المعادن، مرشح، جهاز قياس معامل اللون.

ثانياً: طرائق العمل

٢-٢-١: جمع العينات

جمعت عينات من مستحلبات الزيت المستعملة من مكائن مختلفة ومن ورش صناعية مختلفة اثناء عمل الآلات (المستحلب في حالة دوران) من المنشآت الصناعية في الاسكندرية في قناني

زجاجية معقمة سعة ١٠٠ مليلتر، ونقلت للمختبر بصندوق مّبرد واستخدمت لعزل البكتريا المستهلكة للهيدروكاربونات.

٢-٢-٢: عزل البكتريا

اخذ ١ مليلتر من العينات التي جمعت في ٢-٢-١ وخفّف بوسط الاملاح المعدنية السائل لغاية التخفيف السادس نشر بعدها ٠.١ مليلتر من كل تخفيف على اطباق من وسط الاكار المدمم وحضنت بدرجة ٣٧م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة ، تم انتقاء المستعمرات المختلفة مظهرياً وخططت على اطباق من الوسط نفسه، اعيدت العملية ثلاث مرات للتأكد من نقاوة المزرعة ثم زرعت العزلات على وسط الاكار المغذي المائل وحفظت في الثلاجة لحين اجراء الاختبارات اللاحقة عليها.

٢-٢-٣: تشخيص العزلات البكتيرية

درست الصفات المظهرية للمستعمرات والخلايا البكتيرية وقابلية اصطباغها بصبغة كرام واجريت بعض الفحوصات الوظيفية المذكورة في طرق التشخيص القياسية والجداول التصنيفية[٩١، ٩٢، ٩٣] وشملت الاختبارات الكيمو-حيوية ما يأتي:

أ- اكسدة السكريات: لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي المذكور في ٢-١-٣-٤ بالبكتريا وحضنت بدرجة ٣٧م لمدة ٢٤ ساعة، تغّير لون الوسط من الاحمر الى الاصفر يدل على النتيجة الموجبة.

ب- استهلاك الحوامض الامينية: لقحت الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي المذكور في ٢-١-٣-٥ بالبكتريا وحضنت بدرجة ٣٧م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة ، تغير لون الوسط من الاصفر الى الارجواني، وكذلك تكوّن راسب برتقالي عند اضافة قطرات من كاشف نسلر للوسط يدل على النتيجة الموجبة.

ج- انتاج انزيم اليورييز Urease: لقحت انابيب من مائل وسط اليوريا بالبكتريا وحضنت بدرجة ٣٧م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة، ظهور اللون الوردي في الوسط يدل على النتيجة الموجبة.

د- اختزال النترات: لقحت الانابيب الحاوية على وسط النترات بالبكتريا وحضنت بدرجة ٣٧م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة، ظهور اللون الاحمر بعد اضافة بضع قطرات من كاشف الفانفثول ومثلها من حامض السلفانيلك يدل على النتيجة الموجبة، النتائج السالبة تؤكد باضافة قليل من تراب الزنك وترج بشدة، ظهور اللون الاحمر يؤكد النتيجة السالبة إذ يعمل الزنك على اختزال النترات الى نتريت، وهذا الاخير يتفاعل مع الكواشف معطياً اللون الاحمر.

هـ- تحلل النشأ : زرعت اطباق من وسط اكار النشأ بالبكتريا وحضنت بدرجة ٣٧م لمدة ٢٤ ساعة، ثم اضيف الكاشف (محلول اليود) تكّون هالة شفافة حول المستعمرات النامية يدل على النتيجة الموجبة.

و- استهلاك الستريات: لقحت انابيب وسط Simmon citrate بالبكتريا وحضنت بدرجة ٣٧م لمدة ٢٤ ساعة ، تغّير لون الوسط من الاخضر الى الازرق يدل على النتيجة الموجبة.

ز- تميّع الجيلاتين: لقحت الانابيب الحاوية على وسط الجيلاتين بطريقة الطعن وحضنت بدرجة ٣٧م لمدة ٢٤-٧٢ ساعة بعدها تركت الأنابيب بالثلاجة لمدة نصف ساعة ، عدم تصلّب الوسط ثانية ، يدل على النتيجة الموجبة (انتاج انزيم gelatinase).

ح- اختبار المثيل الاحمر والفوكس بروسكاور MR.VP tests: لقحت الانابيب الحاوية على وسط MR.VP بالبكتريا (انبوبتين لكل عزلة)، وحضنت بدرجة ٣٧م لمدة ٢٤ - ٤٨ ساعة، اضيف بعدها ٥ قطرات من كاشف المثيل الاحمر لاحدى الانبوبتين، واضيف للثانية كاشف باريت (٠.٦ مليلتر محلول A+ ٠.٢ مليلتر محلول B) تكّون اللون الاحمر في الانبوبة الاولى، وتكّون اللون الوردي في الثانية يدل على النتائج الموجبة لكل من الاختبارين كل على حدة.

ط- انتاج كبريتيد الهيدروجين: لقحت الانابيب الحاوية على وسط Kligler iron agar بالبكتريا بطريقة الطعن وحضنت بدرجة ٣٧م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة ، تكّون راسب اسود في قاعدة الوسط الزرعي Butt يدل على النتيجة الموجبة (انتاج H_2S).

ك- انتاج الاندول: لقحت الانابيب الحاوية على وسط الببتون بالبكتريا وحضنت بدرجة ٣٧م لمدة ٢٤ ساعة ، تكون طبقة حمراء لماعة على السطح بعد اضافة كاشف كوفاكس ٠.٥ مليلتر يدل على النتيجة الموجبة.

ل- استهلاك الـ Malonate: لقحت الانابيب الحاوية على الوسط المذكور في (٢-١-٣-١٤) وحضنت بدرجة ٣٧م لمدة ٢٤ ساعة تحول لون الوسط من الاخضر الى الازرق الفاتح أو الغامق يدل على النتيجة الموجبة.

م- انتاج انزيم التجلط Coagulase: اضيف ٠.٥ مليلتر من معلق الخلايا بعمر ١٨ ساعة الى ٠.٥ مليلتر من بلازما دم الارنب المجفدة بعد خلطها بالماء المقطر المعقم، مزجت بهدوء وحضنت بدرجة حرارة ٣٧ م لمدة اربع ساعات فحصت بعدها للتحري عن تجلط البلازما النتائج السالبة تركت لمدة ٢٤ ساعة في الحاضنة وفحصت ثانية.

ن- انتاج انزيم الاوكسيديز Oxidase: نقل جزء من النمو البكتيري بعود خشبي الى ورقة ترشيح مشبعة بالكاشف، تلون النمو البكتيري على ورقة الترشيح باللون الازرق يدل على النتيجة الموجبة .

ي- انتاج انزيم الكاتاليز Catalase: اضيف قطرات من محلول بيروكسيد الهيدروجين ٣% الى مستعمرات البكتريا النامية على وسط الاكار المغذي الصلب، تكّون الفقاعات نتيجة تحرر غاز الاوكسجين يدل على النتيجة الموجبة.

٢-٢-٤: اختبار قابلية البكتريا المعزولة على النمو في مستحلب الزيت

نمّيت العزلات البكتيرية في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة وذلك لتأكيد قابليتها على استهلاكه وفصل المهاجمات الاولية عن المهاجمات الثانوية، استخدم الوسط بواقع ١٠٠ مليلتر في دوارق زجاجية سعة ٥٠٠ مليلتر ولقح كل دورق بعزلة من البكتريا بعمر ١٤-١٨ ساعة بمقدار ٠.١ مليلتر ذو كثافة ضوئية مقدارها ٠.١ على طول موجة ٦٠٠ نانومتر، حضنت الدوارق بدرجة ٣٧م لمدة كلية لغاية ١٢ يوم، وحسبت اعداد الخلايا على فترات زمنية هي: ١،٢،٤،٦،٨،١٠،١٢ يوم.

٢-٢-٥: حساب اعداد الخلايا الحية

تم اخذ العينات وحساب اعداد الخلايا الحية في المواعيد المذكورة في كل تجربة بطريقة التخفيف وعدّالاطباق المتكررة[٩٤].

٢-٢-٦: تحضير مستحلب الزيت وتعقيمه

حضر مستحلب الزيت بتركيز ٤% باذابة ٤ مليلتر من الزيت الذائب في ٩٦ مليلتر من وسط الاملاح المعدنية السائل وعقم بالمؤصدة بدرجة ١٢١م لمدة ١٥ دقيقة ، عقمت مكونات الزيت وهي زيت الاساس ٤٠ والمضاف الكيمياوي (المركَّز) بالتراكيز المذكورة في كل تجربة بالطريقة نفسها.

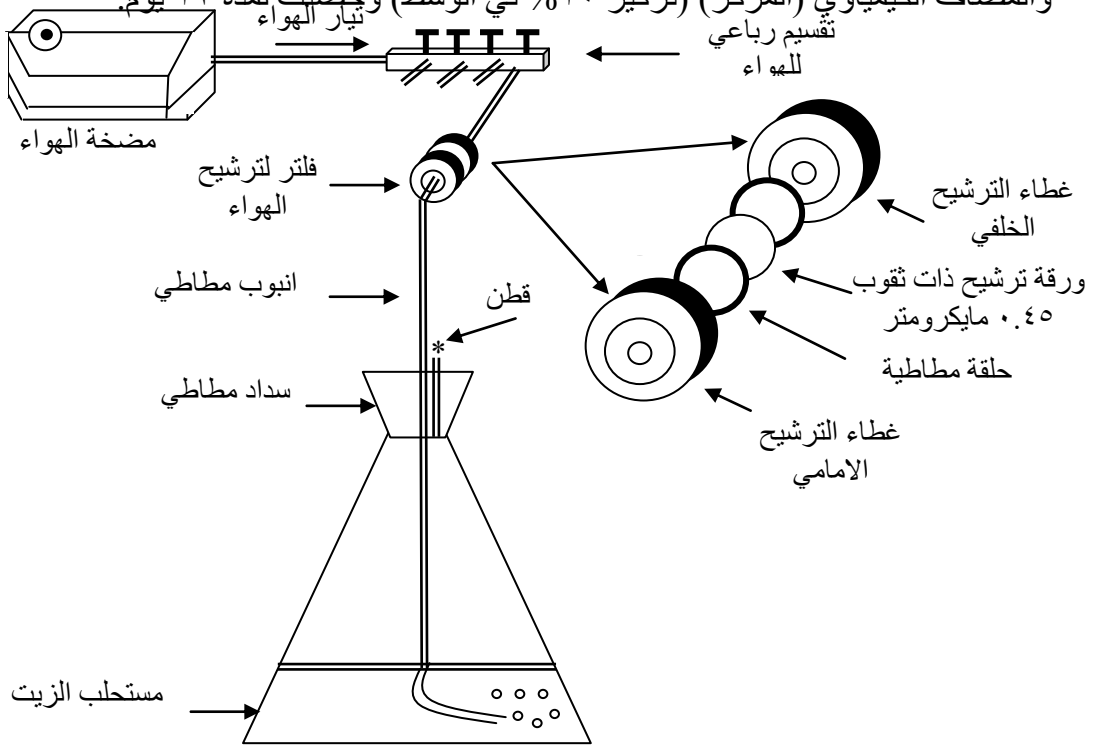
٢-٢-٧: تحضير اللقاح

اعتمدت الطريقة التي اشارت اليها Budzinski في تحضير اللقاح وتتلخص بما يأتي: يلقح ٢٠ مليلتر من وسط المرق المغذي السائل بالعزلة البكتيرية ويحضن بدرجة ٣٧م لمدة ١٤-١٨ ساعة ، بعدها تطرد مركزياً بسرعة ٦٠٠٠ دورة بالدقيقة لمدة ١٠ دقائق ، يؤخذ الراسب ويعاد تعليقة بوسط الاملاح المعدنية السائل، ثم يؤخذ منه ٠.٢ مليلتر ذو كثافة ضوئية مقدارها ٠.١ على طول موجه ٦٠٠ نانومتر لتلقيح الدوارق الحاوية على ١٥٠

مليلتر من المستحلب، اجريت الخطوات نفسها عند تلقيح زيت الاساس ٤٠ والمضاف الكيمياوي (المركَّز) [٤٢].

٢-٢-٨: التحضير لتجربة التردي الحيوي لمستحلب الزيت والتلقيح

استخدم تصميم خاص في التجربة لضمان التهوية والتحريك المستمر معاً وعلى غرار ما ذكره Rogers[٩٥] وجماعته، ويتكون التصميم كما في الشكل (١) من دورق زجاجي مخروطي بسعة ٥٠٠ مليلتر مغلق بسداد مطاطي له فتحتان احدهما مسدودة بالقطن لخروج الهواء والاخرى يمر خلالها انبوب بلاستيكي بقطر ٤ مليمتر الى داخل الدورق بحيث تنغمر نهايته في المستحلب المحضّر بتركز ٤% في وسط الاملاح المعدنية السائل ويحوي كل دورق على ١٥٠ مليلتر لقحت بـ ٠.٢ مليلتر كما ذكر في ٢-٢-٧، ربط الطرف الثاني (الخارجي) للانبوب الى مرشح قرصي وضع بداخله ورقة ترشيح ذات ثقوب سعة ٠.٤٥ مايكروميتر نوع Millipore type HA لترشيح الهواء المار خلاله، ثم ربطت باقي الدوارق ذات التصاميم المشابهة الى تقاسيم هواء وربطت جميعها الى مضخة هواء من نوع ٧٩٩ Elit ذات قدرة على ضخ ١٢٠٠ مليلتر من الهواء في الدقيقة، وتم التحكم بالتهوية للحصول على تهوية تعطي نسبة تدوير متماثلة في كل الدوارق وهو الاسلوب نفسه الذي اتبعه Gannon[٩٦] وجماعته ، عملت نماذج للسيطرة وتم تأشير مستوى الوسط الزرعي لتعويض الماء المتبخر بالماء المقطر المعقم قبل اخذ العينات للفحوصات الاخرى ، حضنت الدوارق بدرجة حرارة ٣٧م لمدة ٦ اسابيع ، استخدمت الظروف نفسها عند استخدام زيت الاساس ٤٠ (تركيز ١٥% في الوسط) والمضاف الكيمياوي (المركَّز) (تركيز ١٠% في الوسط) وحضنت لمدة ١٢ يوم.



٥

شكل (١): التصميم المستخدم في التجربة (٢-٢-٨)

٢-٢-٩ فصل الزيت عن الماء المستحلب فيه

استخدمت الطريقة التي اشار اليها Nadalig وجماعته وتتلخص بما يأتي:

ينقل محتويات كل دورق حاوي على المستحلب بعد اجراء التجارب عليه الى قمع فصل سعة ٥٠٠ مليلتر، ثم يغسل الدورق الفارغ بـ ١٠٠ مليلتر من الايثر di ethyl ether لازالة كل الاجزاء العالقة بالجدران واضافتها الى محتويات القمع ، يرجع القمع جيداً لمدة ٥ دقائق ويترك لينفصل الايثر مع الزيت عن الطبقة المائية التي كانت متداخلة معه، يتم التخلص من الطبقة المائية السفلى وتمرّر طبقة الايثر مع ما تحتويه من الزيت على ورقة ترشيح بقمع تحتوي على كبريتات الصوديوم اللامائية للتخلص من الماء المتبقي، ثم غسل الزيت العالق على ورقة الترشيح بـ ٥٠ مليلتر اخرى من الايثر، ويجمع الراشح في قناني زجاجية نظيفة ويوضع في فرن بدرجة حرارة ٤٠-٤٥م للتخلص من الماء المتبقي ولتطاير الايثر. اجريت الخطوات نفسها لنماذج السيطرة[٩٧].

٢-٢-١٠: الدراسة الكروموتوكرافية لمستحلب الزيت

أ-وصف الجهاز

اجريت الدراسة في مركز بحوث الطاقة والبيئة / بغداد واستخدم جهاز Pye unicam series ٣٠٤ chromatography ، مزود بكاشف التآين اللهبي detector flame ionization (F.I.D.) واستخدم غاز النتروجين المزوّد محلياً غازاً ناقلاً محفوظاً في اسطوانة حديدية مجهزة بمنظم ومزود بمؤشر له القدرة على تزويد الجهاز بضغط ثابت بمقدار ٥ بار ، يمر الغاز بعد خروجه من منظم الاسطوانة بمجفف، ثم بمنظم اخر مربوطاً بالجهاز وبهذا يمكننا الحصول على سرعة جريان ثابتة ، يمر الغاز الناقل بعدها بعمود التحليل ولمعرفة السرعة الحجمية للغاز الناقل المار بسلك العمود فقد الحق مقياس دوّار ذو وحدة قياسية مقدارها سنتمتراً مكعباً بالدقيقة الواحدة. اما مولد غاز الهيدروجين فكان من نوع Pye unicam HG hydrogen generator ١٠ والمسجَّل كان من نوع dual pen recorder ٨٢٥٢ PM المجهز من شركة philps وذو سعة مقدارها ملي فولت واحد.

ب-استعمال المركبات القياسية Standards

استخدمت بعض المركبات الكيمياوية العالية النقاوة Analar بواصفها مواداً قياسيةً لكروموتوكرافيا الغاز وشملت (البنزين، التلوين، الزايلين، النفثالين، الانثراسين، الفينانثرين) وتم تحليل كل مادة على انفراد إذ اظهرت نتائج التحليل ظهور قمة واحدة فقط وعندما خلطت وحلّلت مجتمعة اظهرت مطابقتها للنتائج الاولى من حيث موقع كل ذروة وزمن احتجازها ، استخدمت

نتائج هذا الفحص في تحقيق دقة عمل الجهاز ومعرفة المركبات المقابلة في مستحلب الزيت ايضاً.

ج-ظروف التحليل الكروموتوكرافي

استعمل عمود ES-٣٠ من النوع العام General وكانت السرعة الحجمية للغاز الناقل ٣٠سم^{٣} في الدقيقة اما درجة حرارة العمود Column temperature فقد استخدم برنامج حراري يبدأ بدرجة حرارة ابتدائية ١٥٠ م لمدة دقيقتين، ثم ترتفع بمقدار ١٠°م كل دقيقتين الى الدرجة الحرارية النهائية ٢٧٥ م ويبقى لمدة دقيقتين ، وثبتت درجة حرارة المجس detector temperature. ودرجة حرارة الحقن Injection portion عند ٢٩٠ م أي اعلى من درجة حرارة البرنامج الحراري للعمود وذلك لضمان التبخير السريع للمواد بعد حقنها ومنع تكاثفها وثبتت حساسية الجهاز gas control & readout ionization amplifier على ٤×١٠^{٢} إذ اعطت ذروات peaks جيدة من حيث الضيق والارتفاع، وتم تسجيلها على شريط ورقي سرعته ٣٠ مليمتر/دقيقة ، ثم حقن حجم ٠.١ مليلتر من المستحلب المستخلص كما ذكر في ٢-٢-٩ بالجهاز بعد ان نمّيت فيها العزلات لمدة ٦ اسابيع وحقننموذج السيطرة ايضاً .

٢-٢-١١: قياس اقطار القطيرات للمستحلب

اجريت الدراسة في المركز الوطني للصحة والسلامة المهنية/بغداد وقيست اقطار القطيرات بوساطة جهاز four stage cascade impactor لنماذج المستحلبات التي نمت فيها العزلات البكتيرية لمدة ٦ اسابيع ، اجري العمل على نموذج السيطرة ايضاً.

٢-٢-١٢: قياس التوصيلية الكهربائية للمستحلب

استخدم جهاز conductivity meter ٨٠٠ digital alpha المجهز من شركة court cloud/England لقياس الزيادة الحاصلة في التوصيلية الكهربائية للمستحلبات الملقحة بالبكتريا واخذت القراءات بعد ١، ٢، ٣، ٤، ٥، ٦ اسبوع، اخذت القراءات لنماذج السيطرة ايضاً.

٢-٢-١٣: قياس قيمة الاس الهيدروجيني

استخدم جهاز digital pH meter ٣٥٠٠ Beckman model لقياس الانخفاض الحاصل في الاس الهيدروجيني لمستحلبات الزيت الملقحة بالبكتريا، وقيست كل ٢٤ ساعة لمدة ٦ اسابيع.

٢-٢-١٤: قياس معامل اللون Color index

اجري العمل في مختبرات شركة مصافي الوسط /بغداد واستخدم جهاز Fisher ASTM Colorimeter Model D-١٥٠٠/USA لقراءة معامل اللون لمستحلبات الزيت التي نمت فيها العزلات البكتيرية بعمر ١-٦ اسبوع ، قيست نماذج السيطرة ايضاً.

٢-٢-١٥: قياس قيم فك الاستحلاب

اعتمدت الطريقة في المواصفة القياسية الامريكية لفحص المواد المرقمة ASTM/D١٤٠L لحساب قيم فك الاستحلاب للعزلات التي اظهرت قدرة على مهاجمة مستحلب الزيت واستغلاله بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة، وتتلخص بوضع ١٠٠ مليلتر من المستحلب بتركيز ١٠% في وسط الاملاح المعدنية السائل بانبوبة زجاجية مدرجة تلقح بعدها بمقدار ٠.١ مليلتر من مزرعة بكتيرية سائلة بعمر ١٤-١٨ ساعة ذات كثافة ضوئية مقدارها ٠.١ على طول موجة ٦٠٠ نانومتر ويترك بشكل ساكن وعمودي بدرجة حرارة الغرفة لمدة ٧ ايام يسجل بعدها مقدار طبقات الزيت او مكوناته المنفصلة عنه والمتجمعة عند السطح، اجريت نماذج للسيطرة ايضاً[٩٨].

٢-٢-١٦: دراسة كفاءة التردي الحيوي للعزلات Biodeterioration activity

درست كفاءة العزلات البكتيرية في ترديها لمستحلب الزيت حيوياً التي اظهرت قابلية على النمو فيه واستهلاكه بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة حسب الطريقة التي اشار اليها Chaineau وجماعته إذ أُستخلص الزيت المستحلب كما ذكر في ٢-٢-٩ ووزن بعد تبخير المذيب بفرن بدرجة حرارة ٤٥م لمدة ٢٤ ساعة، وحسبت النسبة المئوية للتردي الحيوي للمستحلب لكل عزلة وفق المعادلة الاتية[٥١]:

$$\%B = 100\,(Mc - M)\,/\,Mc$$

إذ تمثل

%B النسبة المئوية للتردي الحيوي

Mc: كتلة المستحلب المستخلص من نموذج السيطرة

M: كتلة المستحلب المستخلص من نموذج المزرعة

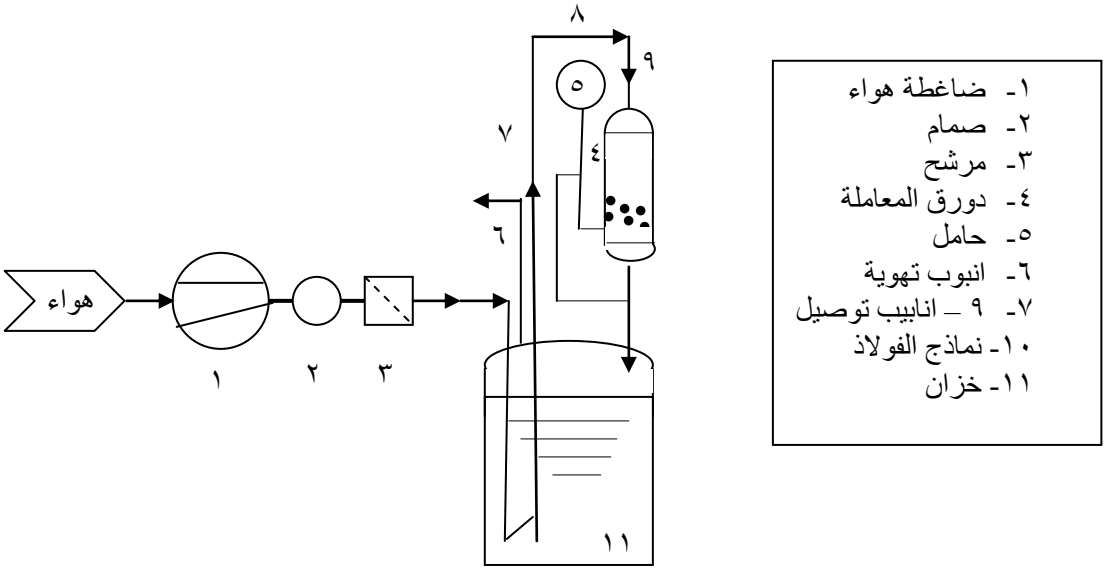
٢-٢-١٧: تآكل عينات الفولاذ

أ-تحضير العينات

قطعت نماذج الفولاذ بشكل قطع اسطوانية صغيرة بقطر ١ سم بعد ازالة الطبقات الخارجية المؤكسدة منها، وتم صقل polishing احد الوجوه بالسحق grinding باستخدام emery paper no: ٥٠,١٨٠,١٩٠,٢٠٠,٢٢٠,٣٢٠,٥٠٠,٦٠٠,٧٠٠، ثم استخدام AP-microcloth wheel (٠.٣μm) مع aluminium polishing agent إذ اصبح السطح بعدها صقيلاً تماماً.

ب-ظروف التجربة

صمّمت ماكنة تتطابق مع التصميم العالمي المتبع في معهد النفط البريطاني British institute of petroleum (B.I.P.)[٩٩] وتتفق مع ميكانيكية عمل الآلات المختلفة في الورش الصناعية التي تستخدم مستحلبات الزيت وموضح بالشكل (٢) وتم تشغيلها ٨ ساعات يومياً، وهي فترة العمل لوجبة واحدة في المصانع وتعتمد فكرة العمل على تدوير المستحلب بالماكنة ومروره على قطع معدنية من الفولاذ تمثل اجزاء الماكنة أو قطعة الشغل لمعرفة مقدار ما يمكن ان يحدثه المستحلب الملوث من تآكل، وضعت القطع المعدنية بحيث يكون السطح الصقيل فيها للاعلى ومرّر عليها المستحلب لمدة ٢٤ ساعة (أي ثلاث وجبات عمل)، استعملت مستحلبات الزيت التي نمت فيها العزلات لمدة ١-٦ اسبوع واستخدمت نماذج للسيطرة ايضاً.



شكل (٢) : التصميم المستخدم في التجربة (٢-٢- ١٧ -ب)

ج-ازالة نواتج التآكل من العينات

اعتمدت الطريقة التي اشار اليها Champion الخاصة بازالة نواتج التآكل من سطوح سبائك الحديد والفولاذ وتتلخص بغمر العينة في محلول ٢٠% هيدروكسيد الصوديوم شديد الغليان ثم يضاف تراب الزنك بمقدار ٣٠غم/لتر فيعمل الهيدروجين المتحرر نتيجة ذوبان الزنك بالقاعدة على اختزال نواتج التآكل الى آيونات الحديدوز وجعلها اقل التصاقاً بالسطح فيمكن ازالتها بعد ذلك باستخدام فرشاة ناعمة[١٠٠].

د-تصوير عينات الفولاذ بالمجهر الالكتروني الماسح

اجري العمل في المعهد المتخصص للصناعات الهندسية/بغداد واستخدم المجهر الالكتروني الماسح نوع Steroscan electron microscope model S٤-١٠ المجهز من شركة Cambridge instruments/ England لتصوير العينات وتوضيح حالات التآكل الحاصلة، وكان قد تم طلاء العينات بطبقة رقيقة من الذهب بطريقة التبخير بالفراغ Vacuum evaporation باستخدام جهاز Stutter coater ٥-١٥٠ المجهز من شركة Edwards high vacuum قبل عملية التصوير لمنع تراكم الالكترونات على السطح.

٢-٢-١٨: فحص الصدأ

اعتمدت الطريقة التي اشار اليها Jewell وجماعته لاجراء هذا الفحص وتتلخص بوضع قطعة مربعة الشكل من ورقة ترشيح نوع Whatman-٥ بابعاد ٣.٥ سم في طبق زجاجي، ثم نشر ٢غم من برادة الحديد عليها بشكل متجانس ليغطي كل المساحة ثم غمرت بـ ٢ مليلتر من مستحلب الزيت الذي سبق وان نمت فيه البكتريا، ثم يغطى ويترك لمدة ساعتين تفحص الاوراق بعدها للتحري عن أي تلوّن ، استخدمت مستحلبات مزارع بعمر ٤,٣,٢,١ اسابيع واجريت الخطوات نفسها على نماذج السيطرة[١٠١].

٢-٢-١٩: استخدام المركبات الكيمياوية في السيطرة Biocides

أ-تحضير مجتمع الخلايا البكتيرية والتجربة

استخدمت الطريقة التي اشار اليها Gaylarde وجماعته في تحضير اللقاح وتتلخص بما يأتي: لقحت ثمانية دوارق سعة ١٥٠ مليلتر حاوية على ٥٠ مليلتر مستحلب الزيت بـ١.٠ مليلتر من مزرعة سائلة بعمر ١٤-١٨ ساعة للعزلات التي اظهرت قدرة على استهلاك مستحلب الزيت، حضنت الدوارق لمدة ١٨ ساعة ، لقح دورق اخر واحد سعة ٥٠٠ مليلتر حاوي على ١٠٠ مليلتر مستحلب لكل تخفيف من المركبات المستعملة بـ ٠.٤ مليلتر ذو كثافة ضوئية مقدارها ٠.١ على طول موجة ٦٠٠ نانومتر من المزارع البكتيرية الثمان اعلاه (٠.٠٥ مليلتر من كل دورق). حضنت الدوارق بدرجة ٣٧م لمدة ٦ ايام، وحسبت

اعداد الخلايا الحية كل ٢٤ ساعة بطريقة التخفيف وعدّالاطباق المتكررة ، اجريت التجربة بثلاثة مكررات واخذ معدل القراءات، تم فحص نماذج السيطرة ايضاً[٤٨].

ب-المركبات الكيمياوية المستخدمة

استخدمت اربعة انواع من المركبات الكيمياوية المختلفة لدراسة تأثيرها في السيطرة على البكتيريا النامية في مستحلبات الزيت وبتراكيز مختلفة وكما يأتي:-

١. Chlorhexedine gluconate بتراكيز ٠.٥ ,١ ,١.٥ ,٢ ,٢.٥٪ .
٢. Sodium tetraborate بتراكيز ١ ,٢ ,٣ ,٤ ,٥٪.
٣. ٨٠- Tween بتراكيز ٦ ,٨ ,١٠ ,١٢ ,١٤٪.
٤. Ethylenglycolmonoethylether(E.G.M.E.) بتراكيز ٤.٥٪ ,٢.٥ ,٣ ,٣.٥ ,٤.

الفصل الثالث

النتائج

٣-١: العزل والتشخيص

تم عزل (٣٤) عزلة بكتيرية من عينات مستحلب الزيت المستعمل ونقّيت العزلات وشخّصت عن طريق اجراء الاختبارات الوظيفية والمظهرية لها بالاعتماد على جداول وطرق تشخيص قياسية[٩١، ٩٢، ٩٣] ، يوضح جدول (١) الانواع البكتيرية ونتائج الاختبارات التي اجريت عليها، اظهرت النتائج ان العزلات تعود الى (١٤) جنساً مختلفاً منها ١١ (٧٨.٥%) سالبة لصبغة كرام و ٣ (٢١.٤%) موجبة، وكان مجموع العزلات السالبة ٢٦ عزلة (٧٦.٤%) بينما مثلت العزلات الموجبة (٢٣.٥%) وبواقع (٨) عزلات ، يوضح جدول (٢) توزيع ونسب العزلات حسب اجناسها.

٣-٢: اختبار قدرة العزلات على النمو في مستحلب الزيت واستهلاكه

اوضحت النتائج ان ٢٠ عزلة (٥٨.٨%) جميعها سالبة لصبغة كرام تعود الى ثمانية اجناس هي Serratia ، Burkholderia ، Citrobacter ، Pseudomonas ، Acinetobacter ، Klebsiella ، Ralstonia ، Aeromonas لها القدرة على البقاء بشكل حي والنمو في مستحلب الزيت واستهلاكه بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة، واظهرت جميع العزلات معدلات نمو متقاربة في اليوم الاول، لكن الاعداد بدأت بالزيادة في اليوم الثاني، واظهرت العزلة P.putida نمواً وصلت اعداده في اليوم الثاني عشر الى ٩.٦×١٠ ٦ خلية/مليلتر تلتها بكتريا S.marcescens بحدود ٩.٥×١٠ ٦ خلية/مليلتر بينما سجلت R.eutropha اقل الاعداد وكانت بحدود ٦.١×١٠ ٦ خلية/مليلتر

جدول (٢): توزيع العزلات البكتيرية المعزولة من عينات مستحلب الزيت المستعمل حسب تفاعلها مع صبغة كرام، اجناسها، اعدادها ونسبها المئوية

اسم الجنس	العدد	النسبة المئوية%
١-Gram negative genera	١١	٧٨.٥٧
Pseudomonas	٤	١١.٧٦
Burkholderia	٣	٨.٨٢
Acinetobacter	٣	٨.٨٢
Escherichia	٣	٨.٨٢
Serratia	٢	٥.٨٨

Citrobacter	٢	٥.٨٨
Aeromonas	٢	٥.٨٨
Klebsiella	٢	٥.٨٨
Ralstonia	٢	٥.٨٨
Moraxella	٢	٥.٨٨
Methylobacterium	١	٢.٩٤
Total Gr^{-ve}isolates	٢٦	٧٦.٤٧
٢- gram Positive genera	٣	٢١.٤٢
Staphylococcus	٤	١١.٧٦
Micrococcus	٢	٥.٨٨
Corynebacterium	٢	٥.٨٨
Total Gr^{+ve}isolates	٨	٢٣.٥٢
All isolates	٣٤	٩٩.٩

بنهاية اليوم الثاني عشر وتراوحت اعداد باقي العزلات بين الحدين الاعلى والادنى وكانت ٩.٤× ١٠ ٦، ٩.٢×١٠ ٦، ٨.٢×١٠ ٦، ٧×١٠ ٦ ، ٦.٨× ١٠ ٦ خلية/مليلتر لكل من B.cepacia، K.oxytoca ، A.media ، A.baumanni ، C.koseri على التوالي يوضح الشكل (A،٣) منحنيات النمو لمعدل قراءات اعداد الخلايا الحية لعزلات كل جنس، واما العزلات ١٤ (٤١.١%) الباقية التي تعود الى الاجناس Staphylococcus ، Micrococcus ، Moraxella ، Methylobacterium ، Escherichia ، Corynebacterium فقد فشلت في استهلاك المستحلب ولم تستطع النمو وتناقصت اعدادها مع الايام، واختفت جميعها خلال ستة ايام من الحضانة، وكانت بكتريا S.aureus اول الانواع التي اختفت في اليوم الثاني تلتها بكتريا M.luteus في اليوم الثالث، واظهرت عزلات جنس الـ Moroxella والـ Escherichia زيادة طفيفة في الاعداد لليومين الاول والثاني بلغت حوالي ٨.١×١٠ ٥ و ٧.٨×١٠ ٥خلية /مليلتر على التوالي، الا ان الاعداد بدأت بالتناقص حتى اختفتا في اليومين الخامس والسادس على التوالي ايضاً، واختفت عزلات الجنسين Corynebacterium ، Methylobacterium في اليوم الرابع من الحضانة ويوضح الشكل (B،٣) منحنيات النمو لمعدل قراءات عزلات كل جنس.

٣-٣: دراسة نمو العزلات المختارة في مستحلب الزيت وتأثيراتها المختلفة عليه

اختيرت العزلة التي اعطت اكبر عدد من الخلايا الحية من كل جنس من الاجناس الثمانية التي اظهرت القدرة على استهلاك مستحلب الزيت بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة التي ذكرت في (٣-٢) لدراسة التغيرات الفيزياوية والكيمياوية التي تطرأ على المستحلب بعد نموها فيه لمدة ٦ اسابيع، واظهرت العزلات البكتيرية منحنيات نمو متشابهة نسبياً، الا ان الزيادة في الاعداد كانت تقع ضمن اسابيع مختلفة باختلاف الانواع (الاشكال ٤-١١).

شكل (٣) قدرة العزلات على استمرار النمو من عدمه في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة .
A : العزلات النامية
B : العزلات غير النامية

٣-٤: قيم الاس الهيدروجيني للمستحلب خلال فترة نمو الانواع البكتيرية فيه

اظهرت نتائج قياس قيم الاس الهيدروجيني لمستحلب الزيت انخفاضاً بسيطاً في الاسبوعين الاول والثاني لمعظم العزلات ،الا ان الهبوط ظهر بشكل اوضح منذ نهاية الاسبوع الثاني وحتى الاسبوع السادس، وسجلت بكتريا B.cepacia اعلى انخفاض ووصل الى ٥.٤ تلتها الانواع P.putida ، A.media ، C.koseri إذ وصل الاس الهيدروجيني لكل منها الى ٥.٦ ثم S.marcescens ، K.oxytoca ، R.eutropha بقيم ٥.٨ لكل منها وسجلت بكتريا A.baumanni اقل انخفاضاً ووصل الى ٦ (الاشكال ٤-١١).

٣-٥: قيم التوصيلية الكهربائية للمستحلب خلال فترة نمو الانواع البكتيرية فيه

اظهرت نتائج قياس قيم التوصيلية الكهربائية لمستحلب الزيت قراءات متقاربة لجميع العزلات تراوحت بين اعلى قيمة سجلتها الانواع K.oxytoca ، B.cepacia ، A.baumanni وهي ١٥.٢٥ ، ١٥.٢٠ ، ١٥.٢٠ مايكروسمنز/سم، على التوالي وبين اقل قيمة كانت لبكتريا R.eutropha بلغت ١٤.٤٠ مايكروسمنز/سم اما باقي القيم فكانت ١٥.٠١ ، ١٤.٨٠ ، ١٤.٦٠ ، ١٤.٥٠ مايكروسيمنز/سم للانواع P.putida ، A.media ، S.marcescens ، C.koseri على التوالي (الاشكال ٤-١١) وكانت قراءة نموذج السيطرة ٤ مايكروسمنز/سم.

شكل (٤) : نمو بكتريا P. putida في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت والتغيرات الحاصلة في الآس الهيدروجيني , معامل اللون , التوصيلية الكهربائية .

شكل (٥) : نمو بكتريا S. marcescens في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت والتغيرات الحاصلة في الآس الهيدروجيني , معامل اللون , التوصيلية الكهربائية .

شكل (٦) : نمو بكتريا C. koseri في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت والتغيرات الحاصلة في الآس الهيدروجيني , معامل اللون , التوصيلية الكهربائية .

شكل (٧) : نمو بكتريا B. cepacia في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت والتغيرات الحاصلة في الآس الهيدروجيني , معامل اللون , التوصيلية الكهربائية .

شكل (٨) : نمو بكتريا A. media في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت والتغيرات الحاصلة في الآس الهيدروجيني , معامل اللون , التوصيلية الكهربائية .

شكل (٩) : نمو بكتريا A. baumanni في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت والتغيرات الحاصلة في الآس الهيدروجيني , معامل اللون , التوصيلية الكهربائية .

شكل (١٠) : نمو بكتريا K. oxytoca في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت والتغيرات الحاصلة في الآس الهيدروجيني , معامل اللون , التوصيلية الكهربائية .

شكل (١١) : نمو بكتريا R. eutropha في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت والتغيرات الحاصلة في الآس الهيدروجيني , معامل اللون , التوصيلية الكهربائية .

٣-٦: قيم معامل اللون للمستحلب خلال فترة نمو الانواع البكتيرية فيه

اظهرت القيم هبوطاً كبيراً في قراءات معامل اللون لجميع العزلات، وكان الهبوط تدريجياً لمعظمها في الاسابيع الثلاثة الاولى، الا انه بدى بشكل كبير وواضح منذ الاسبوع الرابع وحتى نهاية الاسبوع السادس، وكان اعلى انخفاض في معامل اللون قد وصل الى ١.٣ سجلته الانواع B.cepacia ، P.putida ، A.media تلاها النوعان S.marcescens ، C.koseri إذ وصلت القراءة فيهما الى ١.٦ ثم النوعان A.baumanni و R.eutropha بقيمة ١.٨ واخيراً كان النوع K.oxytoca بقراءة ٢.٥ اما نموذج السيطرة فكانت قراءته ٨ (الاشكال ٤-١١).

٣-٧: قياس اقطار قطيرات مستحلب الزيت بعد نمو الانواع البكتيرية فيه

اظهرت نتائج قياس اقطار قطيرات مستحلب الزيت بعد نمو الانواع البكتيرية المختلفة فيه لمدة ٦ اسابيع قراءات مختلفة (شكل ١٢)، وتراوح معدل القراءات بين ١٨٠ مايكرومتر للعزلة A.baumanni ٧٢٠ مايكرومتر للعزلة C.koseri ، اما باقي الاقطار فكانت متقاربة للعزلتين A.media ٤٨٠ مايكرومتر و K.oxytoca ٤٧٠ مايكرومتر، ومتقاربة نسبياً للعزلتين P.putida ٥٦٠ مايكرومتر و R.eutropha ٥١٠ مايكرومتر، وكان معدل قطر القطيرات ٢٦٠ و ٣٥٠ مايكرومتر لكل من S.marcescens و B.cepacia على التوالي، وكانت اقطار قطيرات نموذج السيطرة ٤ مايكرومتر، يوضح الشكل ١٣ الاختلافات المتكونة في حجم وشكل القطيرات ايضاً .

شكل (١٢) : معدل القطر لقطيرات مستحلب الزيت ٤% بعد نمو العزلات البكتيرية فيه لمدة (٦) اسابيع

٣-٨: قيم فك الاستحلاب

اظهرت النتائج حصول زيادة كبيرة في رقم فك الاستحلاب demulsifying number لمستحلب الزيت بعد نمو الانواع البكتيرية وتراوحت القيم بين ٢٧ ملم للنوع A.media وهي اعلى قراءة تلتها R.eutropha ٢٦ ملم وبين ٦ ملم للنوع A.baumanni وهي اقل قراءة، وتقاربت القراءات لكل من K.oxytoca و C.koseri و S.marcescens و B.cepacia وكانت ٢٢، ٢١، ٢٠، ١٨ ملم على التوالي اما بكتريا P.putida فقد كان رقم فك الاستحلاب لها ١٢ ملم وكانت قراءة نموذج السيطرة ١ ملم (شكل ١٤و١٥).

شكل (١٣) صور توضح الاختلافات في حجم وشكل قطيرات مستحلب الزيت بعد نمو العزلات البكتيرية فيه لمدة ٦ اسابيع (X١٠٠)

١-نموذج السيطرة ٢-S.marcescens ٣-B.cepacia ٤-C.koseri ٥-P.putida ٦-A.media ٧-A.baumanni ٨-K.oxytoca ٩-R.eutropha

شكل (١٤): قيم فك الاستحلاب لمستحلب الزيت ١٠% في وسط الاملاح المعدنية السائل بعد نمو العزلات البكتيرية فيه لمدة (٧) ايام .

شكل (١٥) صورة فك الاستحلاب لمستحلب الزيت ١٠% وانفصال طبقاته نتيجة نمو العزلات البكتيرية فيه لمدة ٧ ايام

A- نموذج السيطرة B- P.putida C- S.marcescens D- C.koseri E- K.oxytoca F- R.eutropha G- A.baumanni H- A.media I- B.cepacia

٣-٩: قدرة الانواع البكتيرية على النمو في زيت الاساس ٤٠

اظهرت النتائج قدرة جميع الانواع البكتيرية على النمو في زيت الاساس ٤٠ واستهلاكه بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة (شكل ١٦)، واظهرت منحنيات نمو مختلفة (شكل ١٧) ترافقت بزيادة الاعداد منذ اليوم الاول للنوعين C.koseri و K.oxytoca إذ بلغت اعدادهما بنهاية اليوم الاول ٥.٨×١٠ ^٥ و ٦.٤×١٠ ^٥خلية /مليلتر على التوالي، ثم بدأت الاعداد بالهبوط التدريجي ثم الاستقرار النسبي مع الايام ، واظهر النوعان S.marcescens ، P.putida زيادة مستمرة بالاعداد للايام الاربعة الاولى بلغت ٤.٥×١٠ ^٥، ٧.٨×١٠ ^٥ خلية/مليلتر على التوالي، واستقرت الاعداد بشكل نسبي للنوع الاخير بينما اظهر النوع الاول

شكل (١٦) صورة توضح قدرة العزلات البكتيرية على النمو في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ١٥% زيت الاساس ٤٠ بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة

A- نموذج السيطرة C.koseri -D K.oxytoca-G
B -S.marcescens R.eutropha -E B.cepacia -H
C-A.baumanni A.media -F P.putida -I

شكل (١٧): نمو العزلات البكتيرية في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ١٥% زيت الاساس – ٤٠ بوصفة مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة.

تذبذباً بالاعداد باستمرار ايام الحضانة، اما بكتريا A.media و B.cepacia فقد اظهرتا انخفاضاً اولياً في الاعداد لليومين الثاني والثالث على التوالي، ثم بدأت اعدادهما بالتصاعد المستمر، ووصلت الاعداد بنهاية اليوم الثاني عشر الى حدود ٨.٢×١٠ ^٥ و ٨×١٠ ^٥ خلية/مليلتر على التوالي ، وسجلت كل من S.marcescens و A.baumanni اعلى الاعداد، وكانت بحدود ١٠×١٠ ^٥ و ١٠.١×١٠ ^٥ خلية/مليلتر بنهاية التجربة، بينما اظهرت بكتريا R.eutropha اقل زيادة في الاعداد بنهاية اليوم الثاني عشر وبلغت حوالي ٢.٦×١٠ ^٥ خلية/مليلتر.

٣-١٠: قدرة الانواع البكتيرية على النمو في المضاف الكيمياوي (المركَز)

اظهرت النتائج قدرة جميع الانواع البكتيرية على النمو واستهلاك المضاف الكيمياوي (المركَّز) بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة (شكل ١٨ و١٩) إلا ان جميع الانواع اظهرت فترة ركود Lag لليوم الاول ثم بدأت اعدادها بالتصاعد بشكل كبير للايام اللاحقة، ووصلت اعلى الاعداد في اليوم الثالث للانواع P.putida (١٠.٢×١٠ ^٤) ، K.oxytoca (١٠.١×١٠ ^٤)، A.media (١٠.١×١٠ ^٤)، R.eutropha (١٠.٢×١٠ ^٤) و B.cepacia (١٠.٢×١٠ ^٤) خلية/مليلتر، بينما وصلت الانواع S.marcescens ، C.koseri ، A.baumanni الى اعلى الاعداد في اليوم الرابع وبلغت ١٠.١×١٠ ^٤،

١٠×١٠ ٤، ٨.٢×١٠ ٤ خلية/مليلتر على التوالي، ثم بدأت الاعداد بالايام التالية ولمعظم الانواع بالتذبذب بين الزيادة والنقصان معطية منحنيات نمو مختلفة.

شكل (١٨): نمو العزلات البكتيرية في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على١٠% من المضاف الكيمياوي (المركّو) بوصفة مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة

شكل (١٩) صورة توضح قدرة العزلات البكتيرية على النمو في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ١٠ % من المضاف الكيمياوي (المركّو) بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة

١- نموذج السيطرة	٤- C.koseri	٧- A.media
٢- S.marcescens	٥- A.baumanni	٨- R.eutropha
٣- P.putida	٦- K.oxytoca	٩- B.cepacia

٣-١١: زيادة شدة التآكل Corrosiveness للمستحلب

لدراسة التأثير التآكلي لمستحلب الزيت بفعل التغيرات الكيمياوية التي طرأت عليه بعد نمو الانواع البكتيرية فيه فقد استخدمت طريقتان هما:

أ- فحص الصدأ Rust test

اظهرت نتائج هذا الفحص تغّيراً كبيراً في صفات المستحلب بزيادة قدرته على تكوين الصدأ، ويوضح (الشكل ٢٠) ان تكوين الصدأ قد ازداد بشكل كبير ومتصاعد مع زيادة الوقت الذي نمت فيه البكتريا في المستحلب، ووصلت اشد الحالات في الاسبوع الرابع وعلى الرغم من وجود اختلافات بسيطة بين الانواع البكتيرية المفحوصة في شدة تأثيرها في تكوين الصدأ، الا انه يمكن ملاحظة ان جميع العزلات قد اظهرت قدرة كبيرة في ذلك مقارنة بنموذج السيطرة.

شكل (٢٠) صورة لحالات تكون الصدأ وشدته بفعل مستحلبات الزيت التي نمت فيها العزلات البكتيرية لفترة ١-٤ اسابيع

ب- تآكل الفولاذ Steel corrosion

استخدمت قطع من الفولاذ لمراقبة التأثير التآكلي للمستحلب بعد نمو الانواع البكتيرية فيه وحسب مقدار الخسارة بالوزن Weight loss (جدول ٣)، وصوّرت سطوح النماذج بالمجهر الالكتروني الماسح S.E.M. لتوضيح حالات التآكل واثر المهاجمة عليها تحت تأثير مستحلبات الزيت الملوثة ، ويوضح الجدول المذكور ان مقدار الخسارة بالوزن يتصاعد مع زيادة فترة تعرض المستحلب للنمو البكتيري فيه، وان اكبر خسارة بالوزن سببته مستحلبات الاسبوع السادس للنمو، وسببت مستحلبات الاسبوع السادس لبكتريا B.cepacia اكبر خسارة بالوزن بين الانواع البكتيرية وبلغت ٠.٨٨٣٦ ملغم/يوم تلتها بكتريا P.putida بمقدار ٠.٨٠٣٢ ملغم/يوم، وكانت اقل خسارة بالوزن للاسبوع نفسه سببتها بكتريا

A.baumanni ومقدارها ٠.٠٤٥٥ ملغم/يوم وتراوحت القيم للانواع الاخرى ضمن المدى المحصور بين اعلى واوطىء قيمة وبلغت ٠.٧٣٤٠ ، ٠.٥٣٥٧ ، ٠.٢٧٣٤ ، ٠.١٩٧٠ ، ٠.٠٥٦٦ ملغم/يوم للانواع A.media ، C.koseri ، S.marcescens ، K.oxytoca، R.eutropha على التوالي ، وتوضح الصور المأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح (الاشكال ٢١-٢٨) حالات مختلفة من التآكل وتظهر بوضوح حالات التنقر pitting على السطح وزيادة شدة تآكل سطح الفولاذ بزيادة فترة حضانة البكتريا في المستحلب.

شكل (٢١) صورة مكبرة ٥٠٠ مرة مأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح لحالات التآكل لسطح نماذج الفولاذ بعد تعرضها لمدة ٢٤ ساعة لمستحلبات الزيت التي نمت فيها بكتريا B.cepacia لمدة ١-٦ اسابيع
١-نموذج السيطرة
٢-٧-النماذج المعرضة لمستحلبات المزارع لمدة ١-٦ اسابيع على التوالي

شكل (٢٢) صورة مكبرة ٥٠٠ مرة مأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح لحالات التآكل لسطح نماذج الفولاذ بعد تعرضها لمدة ٢٤ ساعة لمستحلبات الزيت التي نمت فيها بكتريا P.putida لمدة ١-٦ اسابيع
١-نموذج السيطرة
٢-٧-النماذج المعرضة لمستحلبات المزارع لمدة ١-٦ اسابيع على التوالي

شكل (٢٣) صورة مكبرة ٥٠٠ مرة مأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح لحالات التآكل لسطح نماذج الفولاذ بعد تعرضها لمدة ٢٤ ساعة لمستحلبات الزيت التي نمت فيها بكتريا A.media لمدة ١-٦ اسابيع
١-نموذج السيطرة
٢-٧-النماذج المعرضة لمستحلبات المزارع لمدة ١-٦ اسابيع على التوالي

شكل (٢٤) صورة مكبرة ٥٠٠ مرة مأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح لحالات التآكل لسطح نماذج الفولاذ بعد تعرضها لمدة ٢٤ ساعة لمستحلبات الزيت التي نمت فيها بكتريا C.koseri لمدة ١-٦ اسابيع
١-نموذج السيطرة
٢-٧-النماذج المعرضة لمستحلبات المزارع لمدة ١-٦ اسابيع على التوالي

شكل (٢٥) صورة مكبرة ٥٠٠ مرة مأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح لحالات التآكل لسطح نماذج الفولاذ بعد تعرضها لمدة ٢٤ ساعة لمستحلبات الزيت التي نمت فيها بكتريا S.marcessens لمدة ١-٦ اسابيع
١-نموذج السيطرة
٢-٧-النماذج المعرضة لمستحلبات المزارع لمدة ١-٦ اسابيع على التوالي

شكل (٢٦) صورة مكبرة ٥٠٠ مرة مأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح لحالات التآكل لسطح نماذج الفولاذ بعد تعرضها لمدة ٢٤ ساعة لمستحلبات الزيت التي نمت فيها بكتريا K.oxytoca لمدة ١-٦ اسابيع
١-نموذج السيطرة
٢-٧-النماذج المعرضة لمستحلبات المزارع لمدة ١-٦ اسابيع على التوالي

شكل (٢٧) صورة مكبرة ٥٠٠ مرة مأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح لحالات التآكل لسطح نماذج الفولاذ بعد تعرضها لمدة ٢٤ ساعة لمستحلبات الزيت التي نمت فيها بكتريا R.eutropha لمدة ١-٦ اسابيع
١-نموذج السيطرة

٢-٧-النماذج المعرضة لمستحلبات المزارع لمدة ١-٦ اسابيع على التوالي
شكل (٢٨) صورة مكبرة ٥٠٠ مرة مأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح لحالات التآكل لسطح نماذج الفولاذ بعد تعرضها لمدة ٢٤ ساعة لمستحلبات الزيت التي نمت فيها بكتريا A.baumanni لمدة ١-٦ اسابيع
١-نموذج السيطرة
٢-٧-النماذج المعرضة لمستحلبات المزارع لمدة ١-٦ اسابيع على التوالي
جدول (٣): مقدار النقصان بالوزن (ملغم/يوم) لعينات الفولاذ بعد تعرضها لمستحلبات الزيت التي نمت فيها البكتريا لمدة ١-٦ اسابيع

العزلة البكتيرية		الاسبوع ١	٢	٣	٤	٥	٦
B.cepacia	مقدار النقصان بالوزن	٠.١٦٣٩	٠.٢٩٧٨	٠.٤٤٦٧	٠.٦٧٨٣	٠.٧٨١٧	٠.٨٨٣٦
P.putida		٠.١٦٥٥	٠.٢٢٥٧	٠.٣٩١٣	٠.٦٠٢٦	٠.٧٥٨٦	٠.٨٠٣٢
A.media		٠.١٣٣٢	٠.٢٤٧٥	٠.٣٠٠٧	٠.٥٠٧٦	٠.٦٦٦٠	٠.٧٣٤٠
C.koseri		٠.٠٩٩١	٠.٢٦٦٢	٠.٢٦٧٨	٠.٣٢٢٤	٠.٤٠٣٣	٠.٥٣٥٧
S.marcescens		٠.٠٥٤٦	٠.٠٦٧٣	٠.١٠١٩	٠.١٨٢٢	٠.٢٣٧٧	٠.٢٧٣٤
K.oxytoca		٠.٠٠٩٨	٠.٠٧٩٦	٠.١١٤٩	٠.١٤٢٩	٠.١٨٨٢	٠.١٩٧٠
R.eutropha		٠.٠٠٤٣	٠.٠٠٩٩	٠.٠٢٧٨	٠.٠٤٢١	٠.٠٤٩٨	٠.٠٥٦٦
A.baumanni		٠.٠٠٣٢	٠.٠٠٧٦	٠.٠٢٣٣	٠.٠٢٦٠	٠.٠٣٩٢	٠.٠٤٥٥
control		٠.٠٠٠١	٠.٠٠٠١	٠.٠٠٠١	٠.٠٠٠١	٠.٠٠٠١	٠.٠٠٠١

٣-١٢: التحليل الكروموتوكرافي لمستحلب الزيت

اظهرت نتائج التحليل الكروموتوكرافي لمستحلب الزيت بعد نمو الانواع البكتيرية فيه لمدة ٦ اسابيع تغّيراً كبيراً في النسب المئوية لمكوناته مقارنة بنموذج السيطرة وفق النتائج المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز الـ G.L.C. الذي استحصل مساحات الذروة لكل مركب من مكونات المستحلب عاكساً تركيزه في النموذج قبل وبعد المهاجمة، توضح (الشكل ٢٩) كروموتوكرامات مستحلب الزيت لنموذج السيطرة وللنماذج التي نمت فيها الانواع البكتيرية المختلفة ، وتوضح الجداول (٤-١٢) زمن الاحتجاز Retention time لكل مركب من مكونات المستحلب حسب عدد ذرات الكاربون فيه ومساحة الذروة ونسبتها لباقي المركبات ونسبته المئوية مقارنة بتركيزه الاصلي في نموذج السيطرة والزيادة او النقصان الحاصلة في تركيز كل مكوّن من المستحلب مع نسبتها المئوية.

جدول (٤): النسب المئوية لمكونات مستحلب الزيت قبل المعاملة (نموذج السيطرة) بدلالة مساحة الذروة ووقت ظهورها لكل مركب حسب عدد ذرات الكاربون فيه

عدد ذرات الكاربون	زمن الاحتجاز R.T. دقيقة	مساحة الذروة P.A سم^2	النسبة المئوية %

٦	٠.٤	٤.٦	٦.٨٨
٧	٠.٧	٠.٦٤	٠.٩٥
٨	٠.٩	٠.٣٠	٠.٤٤
٩	٢.١	١.١٨	١.٧٦
١٠	٢.٤	٦.٩	١٠.٣٣
١١	٣.٤	٦.٩	١٠.٣٣
١٢	٥.٤	٠.٣٧	٠.٥٥
١٣	٦.٥	١.٠٢	١.٥٢
١٤	٧.٦	١.٧١	٢.٥٦
١٥	٨.٥	٦.٤٨	٩.٧٠
١٦	٩.٧	٥.١٦	٧.٧٢
١٧	١٠.٣	١.٤٧	٢.٢
١٨	١٠.٧	٣٠.٠٣	٤٤.٩٧

جدول (٥): القراءات المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز G.L.C. لمستحلب الزيت بعد ان نمت فيه بكتريا S.marcescens لمدة ٦ اسابيع

عدد ذرات الكاربون	زمن الاحتجاز (دقيقة)	مساحة الذروة (سم^2)	النسبة المئوية (%)	النسبة المئوية للذروة مقارنة بالسيطرة (%)	الزيادة	النقصان	النسبة المئوية (%)
٦	٠.٤	٠.٠٢	٠.٠٧	٠.٠٢	-	٤.٥٨	٩٩.٥٦
٧	٠.٧	٠.٠٩	٠.٣٣	٠.١٣	-	٠.٥٥	٨٥.٩٣
٨	٠.٩	١.٢١	٤.٤٨	١.٨١	٠.٩١	-	٣٠٣.٣٣
٩	٢.١	٠.٠٣	٠.١١	٠.٠٤	-	١.١٥	٩٧.٤٥
١٠	٢.٤	٢.٨١	١٠.٤١	٤.٢٠	-	٤.٠٩	٥٩.٢٧
١١	٣.٤	٣.٤١	١٢.٦٣	٥.١٠	-	٣.٤٩	٥٠.٥٧
١٢	٥.٤	-	-	-	-	٠.٣٧	١٠٠
١٣	٦.٥	٠.٠٢	٠.٠٧	٠.٠٤	-	٠.٩٩	٩٧.٣٥
١٤	٧.٦	٠.٠٣	٠.١١	٠.٠٤	-	١.٦٧	٩٨.١٢
١٥	٨.٥	٠.٠٣	٠.١١	٠.٠٤	-	٦.٤٥	٩٩.٥٣
١٦	٩.٧	٠.٠٤	٠.١٤	٠.٠٥	-	٥.١٣	٩٩.٤١
١٧	١٠.٣	٠.٠٥	٠.١٨	٠.٠٧	-	١.٤٢	٩٧.٩٥
١٨	١٠.٧	١٩.٢٤	٧١.٣١	٢٨.٨١	-	١٠.٧٩	٣٥.٩٣

جدول (٦): القراءات المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز G.L.C. لمستحلب الزيت بعد ان نمت فيه بكتريا A.media لمدة ٦ اسابيع

عدد ذرات الكاربون	زمن الاحتجاز (دقيقة)	مساحة الذروة (سم^2)	النسبة المئوية (%)	النسبة المئوية للذروة مقارنة بالسيطرة (%)	الزيادة	النقصان	النسبة المئوية (%)
٦	٠.٤	٠.٤	١.٤٥	٠.٥٩	-	٤.٢٠	٩١.٣٠
٧	٠.٧	-	-	-	-	٠.٦٤	١٠٠
٨	٠.٩	١.٠١	٣.٦٨	١.٤٨	٠.٧١	-	٢٣٦.٦٦
٩	٢.١	٠.٠١	٠.٠٣	٠.٠١	-	١.١٧	٩٩.١٥
١٠	٢.٤	٠.٠٣	٠.١٠	٠.٠٤	-	٦.٨٧	٩٩.٥٦
١١	٣.٤	٠.٠٣	٠.١٠	٠.٠٤	-	٦.٨٧	٩٩.٥٦
١٢	٥.٤	٠.٠٥	٠.١٨	٠.٠٧	-	٠.٣٢	٨٦.٤٨
١٣	٦.٥	٠.٧٧	٢.٨٠	١.١٤	-	٠.٢٥	٢٤.٥٠
١٤	٧.٦	٠.٥٦	٢.٠٤	٠.٨٣	-	١.١٥	٦٧.٢٥
١٥	٨.٥	١.٨٦	٦.٧٧	٢.٧٩	-	٤.٦٢	٧١.٢٩
١٦	٩.٧	٠.٦٦	٢.٤٠	٠.٩٨	-	٤.٥	٨٧.٢٠
١٧	١٠.٣	١.٢٩	٤.٧٠	١.٩٣	-	٠.١٨	١٢.٢٤
١٨	١٠.٧	٢٠.٨٠	٧٥.٨	٣١.١٤	-	٩.٢٣	٣٠.٧٣

جدول (٧): القراءات المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز G.L.C. لمستحلب الزيت بعد ان نمت فيه بكتريا C.koseri لمدة ٦ اسابيع

عدد ذرات الكاربون	زمن الاحتجاز (دقيقة)	مساحة الذروة (سم^2)	النسبة المئوية (%)	النسبة المئوية للذروة مقارنة بالسيطرة (%)	الزيادة	النقصان	النسبة المئوية (%)
٦	٠.٤	٠.٧٥	١.٩٦	١.١٢	-	٣.٨٥	٨٣.٦٩
٧	٠.٧	٠.٥٠	١.٣١	٠.٧٤	-	٠.١٤	٢١.٨٧
٨	٠.٩	-	-	-	-	٠.٣٠	١٠٠
٩	٢.١	٠.٠٤	٠.١٠	٠.٠٥	-	١.١٤	٩٦.٦١
١٠	٢.٤	٠.٠٤	٠.١٠	٠.٠٥	-	٦.٨٦	٩٩.٤٢
١١	٣.٤	٠.٠٧	٠.١٨	٠.١٠	-	٦.٨٣	٩٨.٩٨
١٢	٥.٤	٠.٠٣	٠.٠٧	٠.٠٤	-	٠.٣٤	٩١.٨٩
١٣	٦.٥	٠.٢٩	٠.٧٦	٠.٤٣	-	٠.٧٣	٧١.٥٦
١٤	٧.٦	٠.٦٠	١.٨٧	٠.٨٩	-	١.١١	٦٤.٩١
١٥	٨.٥	٤.٨٠	١٢.٥٨	٧.١٨	-	١.٦٨	٢٥.٩٢
١٦	٩.٧	٤.١٠	١٠.٧٥	٦.١٣	-	١.٠٦	٢٠.٥٤
١٧	١٠.٣	٠.٨١	٢.١٢	١.٢١	-	٠.٦٦	٤٤.٨٩
١٨	١٠.٧	٢٦.١٠	٦٨.٤٥	٣٩.٠٨	-	٣.٩٣	١٣.٠٨

جدول (٨): القراءات المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز G.L.C. لمستحلب الزيت بعد ان نمت فيه بكتريا K.oxytoca لمدة ٦ اسابيع

عدد ذرات الكاربون	زمن الاحتجاز (دقيقة)	مساحة الذروة (سم^2)	النسبة المئوية (%)	النسبة المئوية للذروة مقارنة بالسيطرة (%)	الزيادة	النقصان	النسبة المئوية (%)
٦	٠.٤	٠.٧٠	١.٨٥	١.٠٤	-	٣.٩	٨٤.٧٨
٧	٠.٧	٠.٥١	١.٣٥	٠.٧٥	-	٠.١٣	٢٠.٣١
٨	٠.٩	-	-	-	-	٠.٣٠	١٠٠
٩	٢.١	٠.٠٢	٠.٠٥	٠.٠٢	-	١.١٦	٩٨.٣٠
١٠	٢.٤	٠.١٢	٠.٣١	٠.١٧	-	٦.٧٨	٩٨.٢٦
١١	٣.٤	٠.٩٢	٢.٤٤	١.٣٧	-	٥.٩٨	٨٦.٦٦
١٢	٥.٤	٠.٣٠	٠.٧٩	٠.٤٤	-	٠.٠٧	١٨.٩١
١٣	٦.٥	٠.٩٩	٢.٦٢	١.٤٧	-	٠.٠٣	٢.٩٤
١٤	٧.٦	١.٢٠	٣.١٨	١.٧٩	-	٠.٥١	٢٩.٨٢
١٥	٨.٥	٥.٠٠	١٣.٢٨	٧.٤٨	-	١.٤٨	٢٢.٨٣
١٦	٩.٧	٣.٦٦	٩.٧٢	٥.٤٧	-	١.٥	٢٩.٠٦
١٧	١٠.٣	٠.٩٠	٢.٣٩	١.٣٤	-	٠.٥٧	٣٨.٧٧
١٨	١٠.٧	٢٣.٢٥	٦١.٧٥	٣٤.٨١	-	٦.٧٨	٢٢.٥٧

جدول (٩): القراءات المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز G.L.C. لمستحلب الزيت بعد ان نمت فيه بكتريا R.eutropha لمدة ٦ اسابيع

عدد ذرات الكاربون	زمن الاحتجاز (دقيقة)	مساحة الذروة (سم^2)	النسبة المئوية (%)	النسبة المئوية للذروة مقارنة بالسيطرة (%)	الزيادة	النقصان	النسبة المئوية (%)
٦	٠.٤	٠.٢٠	٠.٥٠	٠.٢٩	-	٤.٤٠	٩٥.٦٥
٧	٠.٧	٠.٣٢	٠.٨١	٠.٤٧	-	٠.٣٢	٥٠
٨	٠.٩	-	-	-	-	٠.٣٠	١٠٠
٩	٢.١	٠.٠٣	٠.٠٧	٠.٠٤	-	١.١٥	٩٧.٤٥
١٠	٢.٤	٠.٠٣	٠.٠٧	٠.٠٤	-	٦.٨٧	٩٩.٥٦
١١	٣.٤	٠.٣١	٠.٧٩	٠.٤٦	-	٦.٥٩	٩٥.٥٠
١٢	٥.٤	٠.٤٠	١.٠١	٠.٥٩	٠.٠٣	-	٨.١
١٣	٦.٥	٠.٩٩	٢.٥٢	١.٤٧	-	٠.٠٣	٢.٩٤
١٤	٧.٦	١.٣٠	٣.٣١	١.٩٤	-	٠.٤١	٢٣.٩٧
١٥	٨.٥	٤.٩٨	١٢.٦٩	٧.٤٥	-	١.٥	٢٣.١٤
١٦	٩.٧	٤.٤٢	١١.٢٦	٦.٦١	-	٠.٧٤	١٢.٢٤
١٧	١٠.٣	١.٢٩	٣.٢٨	١.٩٣	-	١.١٨	٨٠.٢٧
١٨	١٠.٧	٢٤.٩٥	٦٣.٦١	٣٧.٣٦	-	٥.٠٨	١٦.٩١

جدول (١٠): القراءات المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز G.L.C. لمستحلب الزيت بعد ان نمت فيه بكتريا B.cepacia لمدة ٦ اسابيع

عدد ذرات الكاربون	زمن الاحتجاز (دقيقة)	مساحة الذروة (سم^2)	النسبة المئوية (%)	النسبة المئوية للذروة مقارنة بالسيطرة (%)	الزيادة	النقصان	النسبة المئوية (%)
٦	٠.٤	٠.٢٢	٢.٨٠	٠.٣٢	-	٤.٣٨	٩٥.٢١
٧	٠.٧	-	-	-	-	٠.٦٤	١٠٠
٨	٠.٩	٠.٠١	٠.١٢	٠.٠١	-	٠.٢٩	٩٦.٦٠
٩	٢.١	-	-	-	-	١.١٨	١٠٠
١٠	٢.٤	٠.٠٣	٠.٣٨	٠.٠٤	-	٦.٨٧	٩٩.٥٦
١١	٣.٤	٠.٠٤	٠.٥٠	٠.٠٥	-	٦.٨٦	٩٨.٤٢
١٢	٥.٤	-	-	-	-	٠.٣٧	١٠٠
١٣	٦.٥	٠.٠٢	٠.٣١	٠.٠٣	-	٠.٩٩	٩٧.٥٤
١٤	٧.٦	٠.٠٢	٠.٢٥	٠.٠٢	-	١.٦٩	٩٨.٨٣
١٥	٨.٥	٠.٠٤	٠.٥٠	٠.٠٢	-	٦.٤٤	٩٩.٧٣
١٦	٩.٧	٠.٠٤	٠.٥٠	٠.٠٥	-	٥.١٢	٩٩.٢٢
١٧	١٠.٣	٠.٠٢	٠.٢٥	٠.٠٢	-	١.٤٥	٩٨.٦٣
١٨	١٠.٧	٧.٤١	٩٤.٣٣	١١.٠٩	-	٢٢.٦٢	٧٥.٣٢

جدول (١١): القراءات المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز G.L.C. لمستحلب الزيت بعد ان نمت فيه بكتريا A.baumanni لمدة ٦ اسابيع

عدد ذرات الكاربون	زمن الاحتجاز (دقيقة)	مساحة الذروة (سم^2)	النسبة المئوية (%)	النسبة المئوية للذروة مقارنة بالسيطرة (%)	الزيادة	النقصان	النسبة المئوية (%)
٦	٠.٤	٠.٩٢	٣.٠٦	١.٣٧	-	٣.٦٨	٨٠
٧	٠.٧	٠.٦١	٢.٠٣	٠.٩٠	-	٠.٠٣	٤.٦٨
٨	٠.٩	-	-	-	-	٠.٣٠	١٠٠
٩	٢.١	٠.٠٤	٠.١٣	٠.٠٥	-	١.١٤	٩٦.٦١
١٠	٢.٤	٠.٠٤	٠.١٣	٠.٠٥	-	٦.٨٦	٩٩.٤٢
١١	٣.٤	٠.٠٧	٠.٢٣	٠.١٠	-	٦.٨٣	٩٨.٩٨
١٢	٥.٤	٠.٥٣	١.٧٦	٠.٧٨	٠.١٦	-	٤٣.٢٤
١٣	٦.٥	٠.٩٩	٣.٣٠	١.٤٧	-	٠.٠٣	٢.٩٤
١٤	٧.٦	١.٥١	٥.٠٣	٢.٢٦	-	٠.٢٠	١١.٦٩
١٥	٨.٥	٢.٦	٨.٦٧	٣.٨٩	-	٣.٨٨	٥٩.٨٧
١٦	٩.٧	٢.١٢	٧.٠٧	٣.١٧	-	٣.٠٤	٥٨.٩١
١٧	١٠.٣	٠.٧٨	٢.٦٠	١.١٦	-	٠.٦٩	٤٦.٩٣
١٨	١٠.٧	١٩.٧٦	٦٥.٩٣	٢٩.٥٩	-	١٠.٢٧	٣٤.١٩

جدول (١٢): القراءات المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز G.L.C. لمستحلب الزيت بعد ان نمت فيه بكتريا P.putida لمدة ٦ اسابيع

عدد ذرات الكاربون	زمن الاحتجاز (دقيقة)	مساحة الذروة (سم^2)	النسبة المئوية (%)	النسبة المئوية للذروة مقارنة بالسيطرة (%)	الزيادة	النقصان	النسبة المئوية (%)
٦	٠.٤	-	-	-	-	٤.٦	١٠٠
٧	٠.٧	-	-	-	-	٠.٦٤	١٠٠
٨	٠.٩	-	-	-	-	٠.٣	١٠٠
٩	٢.١	-	-	-	-	١.١٨	١٠٠
١٠	٢.٤	٠.٠٣	٠.١٣	٠.٠٤	-	٦.٨٧	٩٩.٥٦
١١	٣.٤	٠.٠٥	٠.٢٣	٠.٠٧	-	٦.٨٥	٩٩.٢٧
١٢	٥.٤	٠.٢٠	٠.٩٢	٠.٢٩	-	٠.١٧	٤٥.٩٤
١٣	٦.٥	٠.٣٣	١.٥٢	٠.٤٩	-	٠.٦٩	٦٧.٦٤
١٤	٧.٦	٠.٥٥	٢.٥٣	٠.٨٢	-	١.١٦	٦٧.٨٣
١٥	٨.٥	١.٣٨	٦.٣٦	٢.٠٦	-	٥.١	٧٨.٧٠
١٦	٩.٧	٠.٠٥	٠.٢٣	٠.٠٧	-	٥.١١	٩٩.٠٣
١٧	١٠.٣	٠.٣٦	١.٦٦	٠.٥٣	-	١.١١	٧٥.٥٠
١٨	١٠.٧	١٨.٧٢	٨٦.٣٨	٢٨.٠٣	-	١١.٣١	٣٧.٦٦

وقد اختلفت العزلات البكتيرية في تفضيلها وكفائتها في استهلاك المكونات الهيدروكاربونية للمستحلب باختلاف عدد ذرات الكاربون فيها فقد استهلكت بكتريا P.putida المركبات التي بها ٦، ٧، ٨، ٩ ذرات كاربون بنسبة ١٠٠% بينما استهلكت الانواع A.baumanni ، R.eutropha ، K.oxytoca ، C.koseri المركبات التي بها ٨ ذرات كاربون بنسبة ١٠٠% واظهرت بكتريا B.cepacia قدرة على استهلاك المركبات التي بها ٧ ، ٩ ، ١٢ ذرة كاربون بنسبة ١٠٠% واستهلكت بكتريا A.media المركبات التي بها ٧ ذرات كاربون بنسبة ١٠٠% وبكتريا S.marcescens استهلكت المركبات التي بها ١٢ ذرة كاربون بنسبة ١٠٠% واظهرت الانواع K.oxytoca ، R.eutropha ، A.baumanni اقل قدرة في استهلاك المركبات المكونة من ١٣ ذرة كاربون وسببت نقصاً في تركيزها بلغ ٠.٠٣ بنسبة ٢.٩٤% لكل منها، واظهرت بعض العزلات عدم مقدرتها على استهلاك مركبات محددة في المستحلب، كما في حالة المركبات الحاوية على ٨ ذرات كاربون مع النوعين S.marcescens و A.media ،وزادت تراكيزها وبلغت ٠.٩١ و ٠.٧١ بنسبة مئوية كلية للزيادة مقدارها ٣٠٣.٣٣% و ٢٣٦.٦٦% على التوالي، والشيء نفسه ظهر بالنسبة للمركبات الحاوية على ١٢ ذرة كاربون في حالة النوعين R.eutropha و A.bamanni إذ حصلت زيادة في تراكيزها وبلغت ٠.٠٣ و ٠.١٦ بنسبة مئوية كلية للزيادة مقدارها ٨.١% و ٤٣.٢٤% على التوالي، ويلاحظ ان قدرة جميع العزلات على استهلاك المركبات ذات ذرات الكاربون ١٨ فاكثر كانت قليلة مقارنة بباقي المركبات ذات الذرات الاقل فيما عدا بكتريا الـ B.cepacia التي استطاعت ان تستهلك ٧٥.٣٢% من هذه الفئة.

٣-١٣: قياس كفاءة الانواع البكتيرية في ترديها لمستحلب الزيت حيوياً

درست نسبة الفقدان الكمي لمستحلب الزيت بفعل نمو العزلات البكتيرية فيه واستهلاكه بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة وذلك لتحديد كفاءة العزلات في ترديها له حيوياً، واظهرت النتائج ان بكتريا B.cepacia كانت اكثر الانواع فعالية وكفاءة، وبلغت نسبة الاستهلاك ٨٨.٢٤% تلتها بكتريا P.putida بنسبة ٦٧.٥٤% ، بينما كانت نسبة الاستهلاك للانواع S.marcescens ، A.media ، C.koseri ، A.baumanni هي ٥٩.٥٨%، ٥٨.٩%، ٥٧.١١%، ٥٥.١١% على التوالي ثم النوعين K.oxytoca بنسبة ٤٣.٦% و R.eutropha إذ سجلت اقل قيمة وبلغت ٤١.٢٥% (شكل٣٠).

شكل(٣٠): كفاءة العزلات البكتيرية في ترديها لمستحلب الزيت حيويا بعد نموها فيه لمدة (٦) اسابيع

٣-١٤: استخدام المركبات الكيمياوية في السيطرة

توضح الاشكال (٣١-٣٨) نتائج تأثير التراكيز المختلفة للمركبات الكيمياوية الاربعة المستخدمة في السيطرة على نمو البكتريا في مستحلب الزيت مقارنة بنماذج السيطرة، ومُثلت النتائج بحساب اعداد الخلايا الحية لكل حالة، واظهرت المستحلبات الحاوية على تراكيز مختلفة من المركبات تأثيرات مختلفة على اعداد الخلايا بالنسبة للمركب الواحد او باختلاف المركبات الكيمياوية المستخدمة. يوضح الشكلان (٣١ و ٣٢) تأثير اضافة مادة الكلورهكسيدين على نمو البكتريا في مستحلب الزيت، ويظهر من الشكل (٣١) ان التركيز ٠.٥% منها سبب انخفاضاً اولياً في اعداد الخلايا، ووصلت الاعداد بحدود ٤.٩×١٠ ٦ خلية/مليلتر في اليوم الثالث ثم بدأت الاعداد بالزيادة حتى وصلت بحدود ٦.٦ ×١٠ ٦ خلية/مليلتر بنهاية اليوم السادس، واظهر التركيز ١% هبوطاً تدريجياً بالاعداد لغاية اليوم السادس الذي وصلت الخلايا بنهايته الى حدود ١.٣ ×١٠ ٦ خلية/مليلتر، اما التراكيز ١.٥%، ٢% ، ٢.٥% فقد اظهرت هبوطاً حاداً في اعداد الخلايا الحية منذ اليوم الاول، ووصلت الاعداد الى الصفر في اليوم الثاني للتركيز ١.٥%، وفي اليوم الاول للتركيزين ٢% و ٢.٥% ، ويلاحظ ان تأثير الكلورهكسيدين قد ازداد بزيادة تركيزه.

يوضح الشكلان (٣٣ و ٣٤) تأثير اضافة مادة الـ Na-tetraborate في السيطرة على نمو البكتريا في مستحلب الزيت، ويلاحظ ان تركيز ١% منه كان غير مؤثراً وانه كان دون الحد القاتل إذ بقيت اعداد الخلايا بنهاية اليوم السادس بحدود ٦.١ ×١٠ ٦ خلية/مليلتر، واظهر التركيز ٢% زيادة تدريجية في قتل الخلايا بمرور الوقت إذ وصلت اعدادها بنهاية اليوم السادس الى حوالي ٣.٨ ×١٠ ٦خلية/مليلتر، واظهرت التراكيز ٣%، ٤%، ٥% سرعة قتل عالية ووصلت اعداد الخلايا الى الصفر في اليوم الثاني للتركيز ٣% وفي اليوم الاول للتركيزين ٤% و ٥%.

الشكلان (٣٥ و ٣٦) يوضحان تأثير اضافة مادة الـ Tween-٨٠ على نمو البكتريا في مستحلب الزيت، ويلاحظ ان جميع التراكيز المستخدمة ٦%، ٨%، ١٠%، ١٢%، ١٤% كانت غير فعّالة في قتل الخلايا، وعلى الرغم من ان التركيزين ١٢% و١٤% سببا في اليومين الاول والثاني هبوطاً بالاعداد وصل الى ٤.٩ ×١٠ ٦ و٤.٣ ×١٠ ٦خلية/مليلتر على التوالي، إلا ان الاعداد بدأت بالزيادة في الايام التالية، ووصلت اعداد الخلايا بنهاية اليوم السادس بالتراكيز ٦% ، ٨% ، ١٠% الى درجات مقاربة لاعدادها في نموذج السيطرة إذ

بلغت ٩.٤ ×١٠ ٦ ، ٩.٢ ×١٠ ٦ ، ٩.١ ×١٠ ٦خلية/مليلتر (قراءة السيطرة٩.٧ ×١٠ ٦) على التوالي، وقد اظهرت هذه التراكيز زيادة في اعداد الخلايا للايام الخمسة الاولى من الحضانة عما عليه في نموذج السيطرة، ويلاحظ من الشكل (٣٦) ان التركيز ١٤% من المركب قد غّو من الصفات القياسية للمستحلب.

يوضح الشكلان (٣٧ و ٣٨) تأثير اضافة مادة E.G.M.E. على نمو البكتريا في مستحلب الزيت ولم يظهر التركيزان ٢.٥% و ٣% تأثيراً كبيراً في قتل الخلايا إذ سببا انخفاضاً اولياً في الاعداد لليومين الاول والثاني بلغت فيه اعداد الخلايا ٤.٧ ×١٠ ٦ و ٣ ×١٠ ٦خلية/مليلتر على التوالي، إلا ان الاعداد بدأت بالزيادة بالايام التالية، وسببت التراكيز ٣.٥%، ٤%، ٤.٥% زيادة كبيرة في قتل الخلايا، ووصلت الاعداد الىالصفر في اليوم الثالث للتركيز ٣.٥%، وفي اليوم الثاني للتركيز ٤%، وفي اليوم الاول للتركيز ٤.٥% إلا ان هذه النسبة اظهرت تداخلاً مع الصفات القياسية للمستحلب كما يظهر في الشكل (٣٨).

شكل (٣١) : تأثير اضافة التراكيز المختلفة من المركب Chlorhexidine gluconate على اعداد الخلايا البكتيرية في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت .

شكل (٣٢) صورة توضح تأثير اضافة التراكيز المختلفة من المركب Chlorhexidine gluconate على النمو البكتيري في مستحلب الزيت
١-نموذج السيطرة
٢-٦-التراكيز ٠.٥ ، ١ ، ١.٥ ، ٢ ، ٢.٥ % على التوالي

شكل (٣٣) : تأثير اضافة التراكيز المختلفة من المركب Na-tetraborate على اعداد الخلايا البكتيرية في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت

شكل (٣٤) صورة توضح تأثير اضافة التراكيز المختلفة من المركب Na-tetraborate على النمو البكتيري في مستحلب الزيت
١-نموذج السيطرة
٢-٦-التراكيز ١ ، ٢ ، ٣ ، ٤ ، ٥% على التوالي

شكل (٣٥) : تأثير اضافة التراكيز المختلفة من المركب Tween-٨٠ على اعداد الخلاياالبكتيرية في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت .

شكل (٣٦) صورة توضح تأثير اضافة التراكيز المختلفة من المركب Tween-٨٠ على النمو البكتيري في مستحلب الزيت
١-نموذج السيطرة
٢-٦-التراكيز ٦ ، ٨ ، ١٠ ، ١٢ ، ١٤% على التوالي

شكل (٣٧) : تأثير اضافة التراكيز المختلفة من المركب E. G. M. E. على اعداد الخلايا البكتيرية في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت .

شكل (٣٦) صورة توضح تأثير اضافة التراكيز المختلفة من المركب E. G. M. E. على النمو البكتيري في مستحلب الزيت
١-نموذج السيطرة
٢-٦-التراكيز ٢.٥ ، ٣ ، ٣.٥ ، ٤ ، ٤.٥ % على التوالي

الفصل الرابع

المناقشة

٤-١ اختيار مستحلب الزيت في الدراسة ونسبة التخفيف ودرجة الحرارة والتهوية

اختير هذا النوع من سوائل التشغيل الآلي (مستحلب الزيت) في البحث لكونها من السوائل شائعة الاستعمال في العمليات الصناعية، إذ يشكل استخدامها حوالي ٨٠% من مجمل أنواع الزيوت المستخدمة في العمليات المكننية لكونها تجمع بين الخواص التبريدية والتزيتية وتوفر السرعة العالية والضغط المنخفض وتزيل البرادة الحديدية، وكذلك اختزال الهباء الزيتي والأبخرة[٢]، ولكون هذه الزيوت تمثل بيئة مناسبة لنمو مجموعة واسعة من الأحياء المجهرية بسبب محتواها العالي من الماء، والخليط المعقد من المركبات الهيدروكاربونية والفوسفات والامينات والنترات، مما يؤدي الى ترديها حيويا مسببة العديد من الاضرار الاقتصادية المباشرة وغير المباشرة كالخسارة في وقت العمل والانتاج فضلا عن المشاكل الصحية الناجمة عن تلف المستحلب وتعرض العمال له, واشار عدد من الباحثين الى قدرة المركبات الهيدروكاربونية الاروماتيه التطفيرية والمسرطنة التي تمثل احد المكونات العامة للمستحلبات [١٠٢، ١٠٣]

استخدمت المستحلبات بأذابة الزيت الذائب بنسبة ٤% وهي النسبة المستخدمة نفسها في المنشآت الصناعية التي جمعت منها العينات، واستخدمت هذه النسبة لمحاكاة الظروف المعملية وتتفق مع ما اشارت اليه البحوث من ان نسبة الزيت بين ٢-٦% تكون مناسبة جدا لنمو الاحياء المجهرية في المستحلبات[٦، ٤٥، ٤٦] ، ان زيادة تركيز الزيت في أي مستحلب ملوث بالبكتريا يقلّل من زمن الجيل، ويزيد العدد الكلي للخلايا الحية وان نسبة الزيت: الماء لها تأثيرات معنوية في النمو، وان اكثر نسب التخفيف استعمالا بالصناعة هي بين ١:٢٠ الى ١:٤٠ وهي بذلك تهيئ افضل الظروف للنمو الجرثومي[١، ٣٢، ١٠٤], واختيرت درجة الحرارة ٣٧م في كل تجارب البحث، لانها مثلت معدل القراءات التي سجلت في المعامل التي جمعت منها العينات إذ كانت درجة حرارة المستحلب في الخزان الرئيسى ٣٥ م وحرارة المستحلب المتجمع مباشرة من مكائن العمل ٣٩م فضلاً عن ان درجة حرارة جو الورش الصناعية كان ضمن هذه الحدود ايضا, وتم توفير التهوية المستمرة بأستخدام مضخة هواء من الطراز المصمم للعمل في احواض اسماك الزينة وهي طريقة التهوية نفسها التي استخدمها Rogers وجماعته عند دراسته للتاثيرات المختلفة على فعالية المواد القاتلة للأحياء المجهرية في مستحلبات قطع المعادن[٩٥]، وتم التحكم بالتهوية للحصول على تهوية تعطي نسبة تدوير متماثلة في كل الدوارق وفي كل التجارب وهو الاسلوب نفسه الذي اتبعه Gannon وجماعته

لغرض التخلص من تأثير تغاير التهوية الذى يسبب تغيرا في سرعة النمو[٩٦]. ان استخدام التهوية كان ضروريا للحصول على نمو جيد ومتجانس ولتدوير المستحلب وهذا يماثل بعض الشيء حركة المستحلب في العمل عند ضخه عبر فتحة ضيقة كي يُرش على قطعة الشغل، وهو يوافق ما ذكره Rhykerd وجماعته من ان التهوية تعطي نموا اكبراً واستهلاكا اسرعاً للمركبات الهيدروكاربونية المختلفة من قبل الاحياء المجهرية وذكر ان اعداد الخلايا البكتيرية السائدة عند وجود التهوية الجيدة تراوحت بين٩٠-١٠٠ مليون خلية/مليلتر، وان نسبة استهلاك المركبات الهيدروكاربونية متعددة الحلقات بلغت ٨٢% بعد ١٢ اسبوعاً في المزارع المهواة مقارنة بـ ٣٣% في المزارع غير المهواة[١٠٥].

٤-٢ : العزل والتشخيص

أستخدم وسط الاملاح المعدنية المستخدم من قبل Bushnell & Hass في العزل، ويعطي هذا الوسط نتائج اكثر استقرارا وخالية من التناقض لكونه يحتوي على الاملاح المعدنية الضرورية بشكل متوازن ويلبي احتياجات البكتريا القادرة على استهلاك الهيدروكاربونات، ويحدد مصدر الكاربون والطاقة بالمادة الاساس المراد دراستها ومن ثم فأنه يكون ملائما جدا لمعرفة هل ان العزلات قادرة على استهلاكه ام لا[١٠٦] واشارت مصادر عديدة الى اوساط زرعية اخرى الا انها تتكون من مكونات اكثر وان كثرة الاملاح والمركبات في الوسط تؤثر سلبا على طبيعة المستحلب [٩، ٤٣، ٤٦، ٧٦] ولغرض اعطاء التخمين البيئي الدقيق والصحيح للبكتريا الملوثة لمستحلب الزيت فقد تم جمع النماذج من المستحلبات المستخدمة في العمليات الصناعية والمستحلب في حالة دوران لأن البكتريا النامية في المستحلبات تعمل على فصل طبقة من الزيت عن المستحلب، وهي بذلك اما ان تستقر في الوحل الزيتيOil sludge ، او تهاجر الى طبقة الزيت المعزولة عند السطح اثناء توقف العمل[١، ٥٥، ٦٦].

تم الحصول على ٣٤ عزلة من البكتريا الهوائية من مختلف عينات مستحلب الزيت وكانت ٢٠ عزلة منها مستهلكة لمستحلب الزيت بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة، وشخصت جميع العزلات حسب جداول التشخيص المعتمدة واجري اكبر عدد من الفحوصات الممكن اجراؤها لتوكيد صحة التشخيص (جدول -١-) , كانت معظم العزلات(٢٦) عزلة بكتيرية سالبة لصبغة كرام وفقط (٨) عزلات بكتيرية موجبة، وهذا يتفق مع النتائج التى توصل اليها الكثير من الباحثين من ان البكتريا السالبة لصبغة كرام هي

السائدة في المنتجات النفطية[١٩، ٤٦، ٥٠، ٥٢، ٦١]، وان سبب سيادة الانواع السالبة لصبغة كرام يعود الى جملة امور منها النظام الانزيمي الكفء الذي تمتلكه هذه الانواع، والى وجود الغشاء الخارجي Outer membrane الذي يعمل على حمايتها من المؤثرات الخارجية من خلال تقليل نفاذيتها لانواع مختلفة من الجزيئات اذ يعمل بوصفه حاجزاً ضد بعض المركبات الموجودة في المستحلب والمؤثرة على الخلايا، وجعل غلافها غير منفذ للمركبات الكارهة للماء وكذلك المركبات المحبة للماء عالية الوزن الجزيئي فضلا عن امتلاكها للدهون في غلافها الخارجي التي تمكنها من الحصول على اكبر كمية من المركبات الهيدروكاربونية من البيئة النامية فيها ومن ثم اكسدتها واستغلالها بوصفها مصدراً للكاربون والطاقة[٣٥، ١٠٧، ١٠٨]. يتضح من جدول -٢- تنوع الاجناس البكتيرية المعزولة في البحث التي تمثل البكتريا السائدة في المستحلبات الملوثة، واظهر قسم منها قابلية عالية على استهلاك مستحلب الزيت مما يشير الى تطّبع هذه الانواع على البيئة الهيدروكاربونية التي عزل منها ، وهذا يوافق ما ذكره عدد من الباحثين حول قدرة البكتريا على استغلال المركبات الهيدروكاربونية اذا طُبعّت عليها[١٠٩]، فقد اشار Heath وجماعته الى ان بكتريا الـ P.fluorescens القادرة على النمو على المركبات التي بها ٤٥ ذرة كاربون تستطيع ان تستهلك المركبات ذات الوزن الجزيئي الاعلى ولغاية ٦٠ ذرة كاربون اذا تطّبعت عليها [١٤]، وذكر الحقيقة نفسها Churchill وجماعته عندما اشاروا الى ان فترة الكمون Lag phase لبكتريا Mycobacterium sp تصبح يوما واحدا بدلا من ثلاثة عند استهلاكها للمركبات الاروماتية ذات الثلاث والاربع حلقات اذا نمّيت اولاً على الفينانثرين والفلورانثين قبل نموها على البايرين[١١٠]، وذكر Sepic وجماعته ان استهلاك المركبات الاروماتية متعددة الحلقات في التربة الملوثة يكون اسرعاً وذلك لوجود احياء مجهرية مطّبعة [١١١] .ان الاجناس والانواع البكتيرية المعزولة في هذه الدراسة تتوافق مع ما ذكر في البحوث حول مقدرتها على استهلاك المركبات الهيدروكاربونية، وتختلف البحوث فيما بينها بسيادة جنس او نوع معين وحسب نوع المشتق النفطي, فقد اشار Ziara وجماعته السيادة جنس Pseudomonas وانهم عزلوا ٦٢ عزلة مستهلكة للنفط جميعها تعود لهذا الجنس[١١٢]، واشار اخرون الى سيادة انواع محددة ضمن هذا الجنس شملت P. putida , P.fluorescens , P.maltophilia عند دراستهم لمركبات هيدروكاربونية مختلفة يكون المشتق النفطي فيها هو المصدر الوحيد للكاربون والطاقة[١٠٤، ١١١، ١١٣]، وعلّلت Budziniski سعة انتشار هذا الجنس الى لكون معظم افراده يمتلك اكثر من طريق لتمثيل المركبات الهيدروكاربونية وحتى الاروماتية متعددة الحلقات منها[٤٢]. ان جدول -٢- يوضح

احتواء بيئة مستحلب الزيت الملوث على مدى واسع من الانواع البكتيرية التي تستطيع استهلاك المركبات الهيدروكاربونية المختلفة فيه، فضلاً عن التنوع الوراثي لها الذي يُعدْ نقطة مهمة لانه قد يسبب ظهور سلالات جديدة ذات قابليات عالية على استهلاك المركبات الهيدروكاربونية المختلفة في بيئات مختلفة[١١٤].

كان جنس Pseudomonas هو السائد في دراستنا وكان النوع P.putida هو النوع الوحيد المعزول، واشار عدد من الباحثين الى ان هذا الجنس عادة ما يكون هو السائد في المستحلبات الملوثة[٤٥، ٥٢]، وكان النوع P. pseudoalcaligenes هو السائد في دراسة Sandin وذكر بأن هذا النوع لم يسجل عادة بكونه احد الانواع الرئيسة في سوائل التشغيل الآلي وانه يعود الى المجموعة نفسها التي تضم كل من P.alcaligenes و P.stutzeri واللذان عادة ما يعزلان من المستحلبات[٦]، وفي دراسته للتغيرات الكيمياوية في مستحلبات الزيت الملوثه بالبكتريا وجد Lonon وجماعته ان ١٩ نوعا بكتيريا مختلفا كان لها القدرة على النمو واستهلاك المستحلب بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة وان اكثر من نصفها (١٢نوعاً) كانت سالبة لصبغة كرام وان جنس الزوائف كان الاكثر شيوعا [٤٩] ، وعزى Nikaido اسباب سيادة البكتريا السالبة الى تطبعّها على العيش في بيئات مائية مخففه فضلاً عن احتفاظها بانزيمات التردي الحيوي بغشائها الخارجي على عكس البكتريا الموجبة التي تحرر كميات كبيرة من انزيماتها الى خارج الخلية [١٠٧]، وذُكرت باقي الاجناس التي عزلت في البحث في دراسات وبحوث متنوعة اختلفت فيما بينها في تحديد النوع او الجنس الاكثر كفاءة, فقد كان افراد جنس الـ Arthrobacter اكثر الانواع كفاءة في استهلاك المركبات الهيدروكاربونية في الترب الزراعية في دراسة عزل فيها سبعة اجناس بكتيرية مختلفة ستة منها سالبة وواحد فقط موجباً هو جنس الـ Corynebacterium ولم تُسجل الانواع العائدة لجنس الزوائف ضمن الانواع الكفؤة وجاءت بكتريا A.baumanni في المرتبة الثالثة من حيث الكفاءة [٩]، وقد عزلت ثلاث عزلات من هذا النوع في بحثنا واشارت بعض البحوث الى ان هذا النوع كان سائدا ضمن الانواع التي عزلوها في مرحلة معينة من مراحل بحثهم وخصوصا عند استبدال المستحلب القديم باخر جديد وانها اول من يستوطن مستحلب الزيت بالاعتماد على قدرتها على النمو واستغلال مكوناته الشائعة مثل الحوامض الشحمية وزيت البترول[٧، ٤٩، ٥٠]، وبالرغم من العزل الاولي لـ١٤ عزلة تعود لستة اجناس مختلفة ثلاثة منها سالبة شملت كل من Methylobacterium , Moraxella , Escherichia وثلاثة موجبة شملت الاجناس Corynebacterium , Micrococcus , Staphylococcus فأن أي من عزلاتها لم

تُظهر القدرة على استهلاك مستحلب الزيت بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة بمفردها إذ بقيت الخلايا حية لفترات مختلفة تناقصت الاعداد فيها بمرور الوقت حتى اختفت ، ويمكن ان يعزى السبب في عدم قدرة هذه الانواع على النمو في المستحلب الى فقدانها للانزيمات الخاصة باكسدة المركبات الهيدروكاربونية او استهلاكها للمركبات السهلة والاكثر جاهزية فقط مما يشير الى انها مهاجمات ثانوية تستطيع ان تنمو فقط بوجود المهاجمات الاولية، او بعد انجاز عملية الاكسدة الاولية للمركبات الهيدروكاربونية مما يمكنها من استهلاك نواتج تمثيل النوع الاول او ان نمو المهاجمات الاولية يؤدي الى استهلاك المركبات المثبطة الموجودة في المستحلب مما يحسن الضروف لنموها[١٦، ٤٣، ٤٥]، وهذا يوافق ما ذكر في عدد من البحوث من ان هناك العديد من الانواع البكتيرية التي تعود لاجناس مختلفة شملت Staphylococcus , Pseudomonas, Corynebacterium, Serracia Bacillus لها القدرة على النمو في المنتجات النفطية بشكل مزارع مختلطة وتكون مسببه او مساهمة في عملية التردي الحيوي لتلك المنتجات بالرغم من عدم قدرتها على استغلال المشتق النفطي بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة فيما لو نمّيت لوحدها[٤٨، ١١٥]، وعزى Anton وجماعته ذلك الى فقدان هذه الانواع للانزيمات الضرورية الخاصة باكسدة المركبات الهيدروكاربونية او الى فقدانها لبعض المكونات التركيبية في الجدار التي تعد ضرورية لعملية التلامس والالتصاق مع قطيرات المستحلب[١٥]. ان حقيقة ان يكون هناك مجتمع بكتيري متعايش معا في بيئة هيدروكاربونية معينة تؤدي الى حدوث تغيرات كيمياوية وفيزياوية في اصل المركب قد ذكرت في بحوث مختلفة وان عدم نمو بعض الانواع بمفردها لا يلغي اهميتها في عملية التردي الحيوي، فقد عزل Mc Nally وجماعته ١٩ عزلة بكتيرية من الوقود استطاعت جميعها ان تنمو وتستهلك الوقود بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة عندما نمّيت بشكل مزارع مختلطة لكنها ماتت جميعا عندما نمّيت بشكل مزارع مفردة [٢٠]، وقسم Gaylard وجماعته البكتريا المعزولة من خزانات الوقود الى ثلاث مجاميع سماها بالمستهلكات المشكوك فيها doutful utilizers وتلك القادرة على المعيشة في الوقود fuel survivors ، والملوثات العارضة chance contaminants عندما وجد ان ثلاث عزلات فقط من اصل ٣٣ عزلة بكتيرية كانت مستهلكة للوقود المخزون بشكل حقيقي، وان المجموعتين الاولى والثالثة يمكنها ان تعيشا في مزرعة مشتركة لكنهما غير قادرتين على العيش بشكل مزارع نقية في اوساط حاوية علىالهيدروكاربون بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة فهذه الاحياء تستهلك نواتج التمثيل المتكونة بفعل البكتريا المستهلكة له fuel utilizers [٤٨].

٤-٣ : التغيرات الفيزياوية للمستحلب

على الرغم من ان مهاجمة الاحياء المجهرية للمركبات الهيدروكاربونية قد عرفت منذ فترة ليست بالقصيرة الا ان اهمية وتاثير ذلك على المنتجات النفطية نُظر اليه حديثا، فالاحياء المجهرية قد تؤثر في العديد من الصفات مثل اللون , الثبوتية , الرائحة , نسبة الاوكتان , الترشح تحمل الماء , الصدأ ، التآكل وغيرها[١٠٦] ، وقد سبب نمو العزلات البكتيرية في مستحلب الزيت عدد من التغيرات في الصفات الفيزياوية له التي تسبب تغيرا في مواصفاته وادائه القياسي , فمن المعروف أنه عند تلوث مستحلبات الزيت بالبكتريا فأن الجزء المائي يصبح حامضياً وعندما نمت العزلات في المستحلب فان انخفاضا حدث في قيمة الاس الهيدروجيني (الاشكال ٤-١١) خلال فترة النمو البالغة ٦ اسابيع، وكان الانخفاض لمعظم العزلات بشكل تدريجي وغير حاد بالرغم من انه بدى بشكل اوضح بعد الاسبوع الثاني لبعض العزلات، وهذا يوافق ما ذكره Stokes وجماعته من عدم وجود هبوط معنوي حاد في قيمة الاس الهيدروجيني للمستحلبات الملوثة مما يشير الى عدم انتاج حوامض قوية بل حوامض عضوية ضعيفة، وذكر ان حموضة الزيت تستخدم بوصفها دالة على حالته[١١٦]، ان الانخفاض غير المفاجيء للاس الهيدروجيني يعزى لعدة اسباب منها ان الامونيا التي تمثل احد النواتج الايضية لاكسدة المركبات الهيدروكاربونية تسبب زيادة في قاعدية المستحلب ومعادلة جزء من الحوامض المنتجة, الا ان استمرار فترة الحضانة يؤدي الى تحرر وتجمع الحوامض العضوية إذ ان مسار الاكسدة يؤدي الى تكوين الكحول وبفعل انزيمات الديهايدروجينيز dehydrogenase يتكون الالديهايد ثم تتكون الحوامض الدهنية التي تمر بطريق اكسدة بيتا مكونة مركبات مختلفة ومنها حوامض ايضا مثل حامض الخليك فضلاً عن تحرر غاز ثاني اوكسيد الكاربون من معدنه المستحلب الذي يؤدي ذوبانه الى تكوين حامض الكاربونيك[١٨], ان الانخفاض الحاصل في الاس الهيدروجيني لمستحلب الزيت في هذه الدراسة كان متوافقا مع ما اشارت اليه بعض المصادر التي عدت ان الانخفاض فيه لا يكون كبيرا وقدرّته بين (١- ٢,٥ درجة) عن درجة التعادل بسبب كون الحوامض المنتجة هي من النوع الضعيف وسريعة التفكك، واشارت الى ان الاختلافات في قيم الاس الهيدروجيني يعود الى اختلاف تركيز وتركيب الحوامض العضوية المنتجة من قبل الاحياء بوصفها نواتجاً ايضية اذ ان اختلاف المركبات الهيدروكاربونية المستهلكة من قبل الاحياء يحدد طول سلسلة الحامض الشحمي الذي تنتجه فضلاً عن انتاج مواد ايضية مختلفة مثل المواد المتبلمرة الخفيفة , الالكينات , الكيتونات , السكريات الدهنية , الكحولات

الاولية والثانوية , كحولات متفرعة السلسلة , فيتامينات , حوامض دهنية ونووية وثنائية الكاربوكسيل وهذه جميعا قد تتداخل مع بعضها في التاثير مسببة انخفاضا غير كبير في الناتج النهائي للاس الهيدروجيني[٢٦، ١١٧]، كان الهبوط في قيم الاس الهيدروجيني الذي سببته الانواع C.koseri , A.media , P.putida , B.cepacia اكبر من الهبوط الذي سببته الانواع k.oxytoca , S.marcescens , R.eutropha, ، وهذا اكبر من النوع A .baumanni وذلك يعكس الاختلافات بين الانواع البكتيرية وقدرتها الفسلجية والوراثية واختلاف نوع مكونات المستحلب المستهلكة ، ومن ثم اختلاف الحوامض العضوية المنتجة فالاحياء المجهرية المختلفة يمكن ان تستهلك مغذيات مختلفة وتطرح منتجات ايضية مختلفة[١١٨].

ان زيادة حامضية المستحلب ادت الى زيادة التوصيلية الكهربائية له أي ان قدرة المستحلب على حمل التيار الكهربائي قد ازدادت، وتعتمد هذه على تركيز وتكافؤ الايونات الذائبة الموجودة في المستحلب، وان النواتج الايضية المتجمعة سببت زيادة في التوصيلية الكهربائية للمستحلب لجميع العزلات وقد تلعب الحوامض العضوية المنتجة دورا في العملية بالرغم من انها بصورة عامة مواد رديئة التوصيل للتيار الكهربائي لكونها قليلة التآين في الماء[١١٩]، ان التغيرات الحاصلة في توصيلية المستحلب لها تأثيرات كبيرة على مقدرة المستحلبات التآكلية إذ تتناسب شدة التآكل طرديا مع التوصيلية الكهربائية للمحلول ، ومن ثم تؤثر على ادائها مسببة زيادة لاحتمالات الفشل في الاداء القياسي[٤, ٧١, ١٢٠]. ان نمو العزلات في المستحلب ادى الى انخفاض في قراءات معامل اللون وترافق الانخفاض الحاصل مع قدرة العزلات على تمثيل المستحلب وهذا يعني ان تغيرا في صيغة بعض المركبات الخاصة بالمضاف الكيمياوي وخصوصا تلك المكونات المسؤولة عن ثبوتية اللون قد حدث او ان تغيرات في مكونات المستحلب الاساسية قد حدثت وان ناتج التداخلات الكيمياوية الحاصلة ادت الى تغير في صفات المستحلب الفيزياوية (زيادة الشفافية) وهذا يتفق مع ما ذكره آخرون من ان نمو الاحياء المجهرية في مستحلبات الزيت يسبب اكسدة المركبات الهيدروكاربونية فيها، ومن ثم يسبب انخفاضا في قراءات معامل اللون لها الذي يعكس نسبة الكاربون المتبقي في المشتق النفطي ويؤثر هذا على ثبوتية المستحلب وبقائه بشكل مستحلب وهذه نقطة مهمة في العمليات الصناعية التي تُستخدم فيها المستحلبات، فقياس ثبوتية المستحلب ليست سهلة وتبدأ عملية كسر وتهديم خواص المستحلب مباشرة منذ لحظة التخفيف، ووضعت عدة طرق للتحري عنها مثل قياس حجم القطيرات , قياس الصفات الفيزياوية للمستحلب , فحوصات التعجيل, طرق تشتيت الضوء , قياس العكورة، او استخدام

المجاهر الضوئية والالكترونية وان اكثر الطرق شيوعا هي استخدام المجاهر وقياس حجم القطيرات[١٢٢,١٢١,٦٤].

ان نمو البكتريا في مستحلبات الزيت يعمل على ازالة مجموعة الامين من الامينات، وهدرجة الزيوت المكبرته، وتحليل مانعات التآكل، وازالة اللون، وخفض قيمة الاس الهيدروجيني، وان جميع هذه الفعاليات تؤدي الى انفصال طبقة الزيت عن الماء المستحلب فيه، وبمجرد ان يحدث النمو وينخفض الاس الهيدروجيني فأن ذلك دليل على بدء تحطم الهيدروكاربون وترديه وخلال الفتره اللاحقة ستحدث تغيرات بفعل افراز الخلايا لمواد تؤثر على الشد السطحي وتخفظه مسببة تشوها في اشكال وحجوم القطيرات (شكل ١٢و٣٢) وان احد مظاهر تلوث المستحلبات هي فقدانها القدرة على البقاء جيداً بشكل مستحلب[١٢٣]. ان العديد من الانواع البكتيرية تفرز مواد تؤثر على الشد السطحي عندما تنمو على المركبات الهيدروكاربونية، ومن النتائج المستحصلة فأنه يمكن القول ان جميع العزلات سببت تغيرات في الشد السطحي لقطيرات الزيت في المستحلب إذ ادت الى فصل الزيت الذائب عن الماء المستحلب فيه (شكل ١٤و١٥)، وهذا يتفق مع ما اشارت اليه البحوث من ان نمو البكتريا في الاوساط الحاوية على مركبات هيدروكاربونية تسبب تغيرات في تراكيز المركبات ذات الشد السطحي، وان البكتريا القادرة على انتاج مواد ايضية ذات شد سطحي تعمل على تقليل الشد بين الزيت والماء، مما يؤدي الى زيادة الطبقة السطحية بينهما وزيادة المهاجمة ومن ثم فصل اكبر للزيت عن الماء وزيادة في رقم فك الاستحلاب[١٢٤,٣٣,١٧]، ويمكن ان يعزى فك الاستحلاب الى استهلاك المواد المسؤولة عن الاستحلاب التي عادة ما تكون حوامض دهنية، او استرات من قبل الخلايا النامية , ان عوامل استحلاب قد تفرز من قبل الخلايا وتمدص على الطبقة البينية بين قطيرة الزيت والماء، واثبتت العزلات قدرتها على افراز هذه المواد عند نموها على المكونات الاساسية للمستحلب والمتمثلة بزيت الاساس ٤٠ والمضاف الكيمياوي (المركَّز) وسببت تفكك كتلة المكونات الاساسية في الوسط الزرعي (شكل١٦ و١٩)، وهذا يتفق مع ما اشارت اليه البحوث من ان عوامل الاستحلاب المنتجة من قبل البكتريا قادرة على استحلاب الهيدروكاربونات النفطية مع الماء , فقد وُجد ان بقاء الزيت بشكل طافي فوق الطور المائي الملوث يسبب اختزال الشد السطحي بين الزيت والماء معطيا حالة انتشار ثابتة للماء في الزيت[٣٨] ، وان مشتقات مختلفة شملت زيت الغاز وزيت الديزل والكيروسين والكازولين وانواع من النفط الخام قد استحلبت بفعل عوامل استحلاب مفرزة من قبل الخلايا وان عملية الاستحلاب كانت اشد في حالة كون

الهيدروكاربونات خليطة من مركبات اليفاتية واروماتية مما لو كانت كل منها لوحدها [٣٤،٢٨].

ان عملية استحلاب الزيت بالماء لها اهمية معروفة لنمو الاحياء المجهرية القادرة على استهلاك المركبات الهيدروكاربونية بوصفها مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة، ويعتمد ذلك على قدرة الانواع البكتيرية على تكوين مواد الاستحلاب التي تمتاز بقيمة موازنة واطئة بين الصفات المحبة للماء والمحبة للدهن Low hydrophilic-lipophilic balance value بمعنى انها اكثر ذوباناً في الطور الزيتي ومن ثم فانها فعالة في تكوين مستحلبات الزيت ومسؤولة عن استقرار تلك المستحلبات[٣٧، ٣٨]، وتتميز العوامل المؤثرة على الشد السطحي المنتجة من قبل البكتريا بكونها دهون عادةً وينشأ تأثيرها من احتواء جزيئتها المفردة على نصف قطبي ونصف غير قطبي، ويتكون الجزء غير القطبي في الغالب من هيدروكاربون وهو القطب الكاره للماء (يميل للطور الزيتي) وتمثل السلسلة الهيدروكاربونية للحوامض الشحمية ابرز امثلتها اما المجموعة القطبية المحبة للماء فتكون متنوعة ومن امثلتها مجاميع الاستر والكحول الفعّالة للدهون المتعادلة neutral lipids ، وكذلك الجزء الحاوي على فوسفات من الدهون الفوسفاتية، والسكر الخاص بالدهون السكرية، او قد تكون ببتيدات[١٢٥]، وبسبب امتلاك هذه العوامل لقطب كاره للماء واخر محب له فانها تتركز عادة عند السطح البيني بين الطورين المائي والزيتي وان زيادة مساحة السطح البيني تعني زيادة عوامل الاستحلاب المتركزة عنده ، وسَبَبَ نمو العزلات في المستحلب زيادة في رقم فك الاستحلاب وهذا ناتج من ان الحوامض الشحمية غير المشبعة والهيدروكاربونات في المستحلب تهدرج الى مركبات مشبعة كلياً وتكسر المركبات الحلقية وتتحول المركبات ذات السلسلة الطويلة الى حوامض شحمية والاخيرة تتحطم بازالة ذرتي كاربون منها بشكل متسلسل ويزداد ميل الحوامض الشحمية للمهاجمة البكتيرية كلما قل طول سلسلة الكاربون، والاجزاء المكونة من ذرتي كاربون تتحول الى حوامض عضوية، وينخفض الاس الهيدروجيني وتتحول الصوابين الى حوامض شحمية غير آيونية او حوامض بترولية Petroleum acids وهذه المواد غير ذائبة بالماء وتطفو على السطح بشكل طبقات من الزيت الحر وقد يصبح لون المستحلب بنياً، وان اختلاف القراءات يعتمد على نوع العوامل المنتجة وتركيبها وشدة فاعليتها وعلى نوع المركب الذي استهلكته البكتريا[١٢٤، ١٢٥]، ويلاحظ ان توزيع العزلات حسب الزيادة في رقم فك الاستحلاب لم تكن مترافقة مع باقي التغيرات في المستحلب مثل الانخفاض في الاس الهيدروجيني، او زيادة العدد الحي للخلايا، وهذا يعكس الاختلافات في القدرة على التمثيل الحياتي لمكونات المستحلب بين العزلات، وهذا يتوافق مع ما اشارت اليه البحوث من ان قيم

الاس الهيدروجيني لا ترتبط بشكل مباشر وتام مع رقم فك الاستحلاب وانه لابد من وجود اختلافات في فعالية عوامل الاستحلاب واستقرارها تجاه كل نوع من الانواع البكتيرية المختلفة [٢٨، ٤٥، ٤٦]، ان سبب انفصال طبقات من الزيت الذائب عن الماء المستحلب فيه يعود الى المسارات التغذوية للعزلات، والى الانظمة الانزيمية الرئيسية والبديلة التي تمتلكها الخلايا التي تمكنها من استهلاك مواد الاستحلاب الموجودة في المستحلب الاصلي والمسؤولة عن تكوين قطيرات الزيت وتداخلها مع جزيئات الماء مما يؤدي الى عدم ثبات المستحلب وزيادة حجم القطيرات وانفصالها عن الماء اذ تلعب مواد الاستحلاب دوراً اساسياً في تحديد حجم وثبات القطيرات في المستحلب وان التردي الحيوي للمستحلب يؤدي الى تكوين اعداداً اقل من القطيرات وذات حجم اكبر ويمكن ان تندمج مع بعضها مكونة طبقة من الزيت عند السطح ، ان الاختلافات في رقم فك الاستحلاب بين العزلات يمكن ان يعزى الى نقطتين رئيسيتن هما ان العزلات التي لا تظهر درجة عالية في تغيير رقم فك الاستحلاب كما في حالة العزلة A.baumanni قد تكون بسبب عدم قدرة هذه البكتريا على استهلاك بعض المركبات المهمة الداخلة في تركيب عوامل الاستحلاب نفسها وتلجأ مثل هذه الانواع عادة الى استغلال عدد من المركبات الداخلة في تركيب زيت الاساس للمستحلب بدلاً عنها، ولا تعمل على استغلال مواد الاستحلاب بشكل كفوء التي تشكل احد الاسباب الرئيسية في تلف المستحلب[٣٠، ١٠٦]، وهذا لا يعني ان نمو مثل هذه الانواع في المستحلبات لا يسبب ترديها اذ ان ذلك لا يرتبط فقط بازالة عوامل الاستحلاب وانما بنقاط كثيرة اخرى مثل التغيير في اللزوجة، وحدوث التآكل،او الصدأ، وانخفاض الاس الهيدروجيني، وزيادة التوصيلية الكهربائية، وتغّير اللون والرائحة[٤٥، ١٢٦]، اما النقطة الثانية فهي ان الانواع الكفوءة جداً ممكن ان تستهلك فيها الخلايا معظم مكونات مواد الاستحلاب خلال الفترة الاولى من الحضانة وان استمرار الحضانة اللاحقة ستستهلك فيها الخلايا طبقة الزيت المتجمعة عند السطح ، ومن ثم ينقص سمكها فتعطي انطباعاً خاطئاً بعدم كفاءة هذه العزلات باستهلاك مواد الاستحلاب وفي الحقيقة انها استهلكت معظم ان لم يكن كل مواد الاستحلاب ومن ثم الزيت نفسه بكفاءة عالية[٣٠، ٤٩]، وهذا يتوافق مع ما ظهر عندنا بهذه الدراسة بالنسبة للعزلتين P.putida و B.cepacia حيث كانت قراءات فك الاستحلاب لهما واطئة مقارنة بباقي العزلات بينما كانتا اكثر الانواع كفاءة في تردي المستحلب واستهلاكه.

تؤثر على ثبوتية المستحلب عوامل كثيرة منها تركيز المركبات الهيدروكاربونية المختلفة المكونة له، كمية مواد الاستحلاب المضافة ونوعها، نوع الماء المستخدم للتخفيف وعسرته، حجم القطيرات المتكونة ، تلوث المستحلب والاس الهيدروجيني الذي يؤثر بدوره على سرعة

النمو[٣٨، ٥٦، ٦٤]، الا ان منحنيات النمو في هذه الدراسة اظهرت عدم تأثرها كثيراً بالانخفاض غير الحاد في قيمة الاس الهيدروجيني للمستحلب اثناء نموها فيه، ومن ثم فان فعالية البكتريا بمثل هذه الظروف تعد هي المسؤولة الحقيقية عن التردي الحيوي للمستحلب وما رافقه من عمليات اكسدة وتحطيم لمكوناته وتغّير في صفاته الفيزياوية والكيمياوية القياسية.

٤-٤: قدرة العزلات علىاستهلاك مستحلب الزيت ومكوناته الاساسية والتغيرات الكيمياوية الحاصلة فيه

تميزت العزلات بقابلية جيدة على النمو في مستحلب الزيت الذي ساعدها في الحصول على المصدر الكاربوني لانقسام خلاياها وبلوغ تعداد عالٍ، وهذا يتفق مع ما ذكرته البحوث من ان البكتريا النامية في مستحلب الزيت قادرة على استهلاك المكونات الرئيسية له كي تصل الى كثافة عالية من النمو، لان هذه المكونات توفر الكمية المطلوبة من الكاربون والطاقة لها ولتوضيح الطاقة المتاحة من المركبات الهيدروكاربونية نشير الى ان الطاقة المنتجة من تمثيل بعض المركبات سداسية الكاربون مثل الكلوكوز تعطي ٦٧٤ سعرة مقارنة بالهكسان الذي يعطي ١٠٠٢ سعرة[٧]، توضح الاشكال (٤-١١) نمو العزلات في مستحلب الزيت من خلال حساب العدد الكلي للخلايا الحية، ويُعَدْ استخدام حساب العدد الحي للخلايا مقياساً لنموها في المشتقات النفطية طريقة مناسبة لمعرفة امكانية تردي تلك المشتقات حيوياً او بيان جودتها[١٢٦، ١٢٧]، ولوحظ ان العزلات تباينت في قدرتها على استهلاك المستحلب وان اعداد الخلايا تبدأ بالزيادة بشكل واضح بعد الاسبوع الثاني لمعظم العزلات وتستمر بالزيادة النسبية في الاسبوعين الاخيرين ولم يحدث أي انخفاض باعداد الخلايا لاي من العزلات طيلة فترة الحضانة البالغة ٦ اسابيع، ومعروف ان من الاسباب المؤدية الى خفض الاعداد هي نفاذ المركبات الهيدروكاربونية السريعة الاستهلاك، وبقاء المركبات المعقدة مثل المركبات الاروماتية المتعددة الحلقات والمركبات الاسفلتية ونفاذ المغذيات الاخرى مثل مصادر النايتروجين والفسفور او انخفاض الاس الهيدروجيني بفعل تراكم المواد الايضية الناتجة من عمليات الاكسدة وحتى نقص الاوكسجين وقلة التهوية وان عدم حدوث مثل هذا الانخفاض يشير الى الفعالية الجيدة للنظام الانزيمي للعزلات الى ان المواد الايضية السامة لم تتجمع للحد الذي يؤثر على الخلايا ويدخلها في طور الموت وان المواد المغذية لم تنفذ من الوسط والى ان العزلات تمتلك القدرة على استهلاك المركبات البسيطة والمركبات الاصعب تركيباً ايضاً، واظهرت العزلات قدرات نمو مختلفة في زيت الاساس ٤٠ (شكل ١٧)، وهو زيت مستخلص من النفط الخام اثناء عملية التقطير الفراغي له ويتكون من مركبات هيدروكاربونية مختلفة يجري عليها العديد من المعاملات مثل ازالة او تقليل المعادن والمركبات الاخرى مثل الكبريت والنايتروجين والمركبات البارافينية المشبعة المستقيمة

والمتفرعة وتترك المركبات الحلقية المشبعة او غير المشبعة الخماسية او السداسية المفردة الحلقة والمتعددة بوصفها مكوناً رئيسياً لهذا الزيت، وحدث انخفاظاً بسيطاً للاعداد بالنسبة للنوعين A.media و B.cepacia في الايام الاولى من الحضانة وقد يعود السبب الى ان العزلتين تحتاجان الى مدة للتأقلم وتحفيز انظمة انزيمية او احتواء زيت الاساس على بعض المواد التي تمتلك تأثيراً قاتلاً للاحياء المجهرية لكنه لم يسبب قتل الخلايا بسبب تركيزه الواطيء، إذ تعمل مثل هذه المواد عادة دور العامل المثبط للنمو عند التراكيز الواطئة ويكون التثبيط نتيجة لتحول مسار التخليق في الخلية الى اصلاح الاجزاء المتضررة مما يؤدي الى توقف النمو او تباطؤه ويمكن ان تكون هذه المواد قد ثبطت النمو لفترة ثم فقدت تأثيرها التثبيطي مع الوقت اما بسبب تداخلها المباشر مع الخلايا او تفاعلاتها الكيمياوية مع النواتج الايضية لها[١٢٨]، ان زيت الاساس ٤٠ غير ذائب بالماء لوحده وان الخلايا تحتاج الى بعض الوقت لاستهلاكه ببطء وذلك لان جاهزيتة اقل مما في صورته بعد خلطه مع المضاف الكيمياوي بنسبة ١٦:٨٤(حجم:حجم) على التوالي لتكوين مستحلب الزيت الكامل، وفضلاً عن ذوبانه فان خلط المكونات يؤدي الى تفاعلها مع بعض معطيه مركبات كيمياوية مختلفة وغير معروفة التركيب الى حد بعيد، وتوفر الطبيعة الكيمياوية المتباينة التركيب للمستحلب النهائي العديد من العوامل الفيزياوية والكيمياوية مثل تكوين معقدات للمادة الحافظة واختزال حساسية الاحياء المجهرية لها، او امدصاص بعض المركبات على جدران الماكنة وغيرها مما يجعل المنتج النهائي ملائماً للاستهلاك من قبل الخلايا[١٢٩]، واظهرت جميع العزلات فترة كمون Lag في بداية الحضانة عند نموها في المضاف الكيمياوي (المركَّز) ثم فترة من النمو السريع اعقبتها فترات من النمو المتذبذب بين الزيادة والنقصان انخفظت بنهاية التجربة الاعداد لمعظم العزلات وقد يكون ذلك بسبب نفاذ المركبات السهلة الاستهلاك والاكثر جاهزية او تراكم المواد الايضية. ان ظهور فترة ركود اولية في بداية الحضانة قد يعود للاسباب نفسها التي ذكرت مع زيت الاساس ٤٠، وهي احتياج الخلايا لفترة من التطّبع او التأثيرات السمية لواحد او اكثر من المركبات التي يحتويها المضاف الكيمياوي وان النمو السريع للعزلات يشير الى ان قسم من المكونات سهلة الاستهلاك وذات جاهزية عالية للخلايا وان احتواء المضاف الكيمياوي على الكثير من المكونات مثل مواد الاستحلاب ومانعات الصدأ والتآكل والرغوة والاكسدة وتغّير اللون والروائح والتي يمكن للبكتريا ان تستهلكها جميعاً بوصفها مصادراً للكاربون والطاقة ممكن ان تهيئ دعامة للنمو البكتيري، الا ان الشيء المهم هو احتواء المضاف الكيمياوي على المضادات Biocides وان نمو جميع العزلات فيه يدل على ان العزلات تمتلك نظاماً انزيمياً فعّالاً تستطيع بوساطته مقاومة تأثير

هذه المركبات والبقاء حية مدة اطول فيه[١٣٠]، واشارت بعض البحوث من ان بعض انواع البكتريا العائدة الى جنس Pseudomonas تمتلك اكثر من شكل من انزيمات الديهايدروجينيز القادرة على تحطيم الفورمالديهايد المستخدم بوصفه مبيداً حيوياً بشكل واسع في زيوت قطع المعادن المستحلبة[١٣١، ١٣٢]. ان استخدام مستحلب الزيت في الورش الصناعية يتم عادة بعد خلطه بماء الحنفية للتخفيف وان احتواء الماء على آيونات الكالسيوم والمغنيسيوم يعمل على تقليل كفاءة المبيد الحيوي، ومن ثم زيادة نمو الاحياء المجهرية فيه ، فضلاً عن ان الجهات المصنّعة للمضافات الكيمياوية عادةً ما تلجأ الى انتاجها بصيغة قابلة للتفكك الحياتي حماية للبيئة وهذا ما يجعلها ملائمة للاستهلاك من قبل الخلايا[٥، ٦] ،ان قلة تركيز المبيدات الحيوية الى الحد الذي لا يكفي لقتل الاحياء المجهرية او تثبيطها قد يدعم نموها، ولوحظ ان العديد من المركبات عند التراكيز الواطئة منها تشكل مصادر غذائية ملائمة لنمو الخلايا التي يمكنها استغلال آيونات الامونيوم بوصفها مصدراً للنايتروجين، وبعض مركبات الكبريتيت بوصفها مصدراً للكبريت[٤٦]، الا ان الامر الجدير بالاهتمام هو ان جميع العزلات قد نمت في المضاف الكيمياوي واستهلكته بوصفها مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة بالرغم من النسبة العالية منه والبالغة (١٠%) التي استخدمت بالتجارب وهي اعلى بكثير من تركيزه في المستحلب عند الاستعمالات الاعتيادية، ان هذا الشيء يعد ذو اهمية كبيرة ويشير الى عدة احتمالات منها ان العزلات البكتيرية لم تتأثر بتركيز المبيدات الحيوية التي يفترض وجودها فيه وهي بالتركيز العالي الذي استخدمت فيه بالتجربة، فكيف سيكون تأثيرها بعد خلط مكونات الزيت الذائب وتخفيفه لتحضير المستحلب ، ان المضاف الكيمياوي (المركَّز) ذو تكلفة اقتصادية كبيرة، فهو يجهّز من قبل شركات اجنبية تحتكر الكثير حول مكوناته وتركيبه (اتصال شخصي مع مدير المختبرات والبحوث في شركة مصافي الوسط) ومن ثم فان عدم فاعليته يمثل هدراً اقتصادياً كبيراً .

اظهرت العزلات قابليات مختلفة في استهلاك اكبر كمية من المستحلب، وهو يتوافق مع ما اشارت اليه البحوث من ان الانواع البكتيرية المختلفة لها معدلات نمو واكسدة مختلفة عندما تكون المشتقات الهيدروكاربونية هي المصدر الوحيد للكاربون والطاقة في الوسط[٧٨، ٧٩] ، وبسبب استهلاك العزلات لبعض مكونات المستحلب فان انخفاضاً في وزنه قد حصل وكانت العزلة B.cepacia اكثر الانواع استهلاكاً للمستحلب اذ استهلكت ٨٨.٢٤% منه وهذا يعكس كفائتها ومقدرتها العالية على تمثيل العديد من مكوناته تلتها بكتريا P.putida بنسبة ٦٧.٥٤%، وتقاربت نسبة الاستهلاك للانواع الاخرى بكميات متفاوتة ونسب اقل تراوحت بين ٥٩.٥٨% الى ٤١.٢٥% ويعزى التباين في الاستهلاك بين الانواع المختلفة

الى اختلاف القابلية الفسلجية والوراثية فيما بينها إذ لا توجد اختلافات بين افراد الجنس الواحد فحسب، وانما توجد اختلافات بين سلالات النوع الواحد ايضاً فيما يخص القدرة على استهلاك المركبات الهيدروكاربونية المختلفة فقد تكون بعض العزلات حاملة لعناصر وراثية مختلفة مثل البلازميدات او العناصر الوراثية الانتقالية Transposons الحاملة لجينات التحلل الحيوي التي تسهم في تنوع آليات الاستهلاك ، ان صفة استهلاك المركبات الهيدروكاربونية من قبل البكتريا هي صفة خاصة ومقترنة بالسلالة ومميّزة لها وليس بالضرورة ان تكون صفة للنوع العائدة له تلك السلالة او الانواع التصنيفية ذات العلاقة [١٣٣، ١٣٤]، وتُعد طريقة حساب كمية المشتق النفطي المستهلكة بفعل نمو الاحياء المجهرية من المؤشرات الجيدة لتحديد كفاءة تلك الاحياء الا انها لا تحدد نوع المركبات الهيدروكاربونية المستهلكة او نسبتها الا بعد اجراء التحليل الكيمياوي للجزء المتبقي، ويمكن اجراء ذلك باستخدام طرق مختلفة ومنها التحليل بجهاز الكروموتوكرافي الغازي، ولتحديد نوع ونسبة المركبات الهيدروكاربونية المستهلكة بفعل العزلات البكتيرية فقد اجري التحليل بجهاز G.L.C. للزيت المستخلص بعد نمو العزلات في المستحلب لمدة ٦ اسابيع ، اظهرت العزلات قدرات مختلفة في استهلاك مكونات مستحلب الزيت مما يعكس الاختلافات الوراثية والفسلجية لها، واظهرت جميع العزلات قدرة على استهلاك جميع المكونات عدا حالتين لم يتمكن فيها النوعان A.media و S.marcescens من استغلال المركبات المكونة من ٨ ذرات كاربون، والحالة الثانية للنوعين A.baumanni و R.eutropha إذ لم تتمكنا من استهلاك المركبات التي بها ١٢ ذرة كاربون وحدثت زيادة في تركيزها وهذا ناتج اما من تحول جزء من المركبات ذات الوزن الجزيئي الاعلى اليها بفعل عملية الاكسدة والتحطيم او بفعل عمليات البلمرة للمركبات الاقل عدداً من ذرات الكاربون [١٥، ٣١]، ان قدرة العزلات على النمو في مستحلب الزيت المكوّن اساساً من مركبات هيدروكاربونية اروماتية احادية الحلقة وثنائية ومتعددة يدل على المدى الواسع الذي يمكنها ان تستهلكه من مركبات، وبصورة عامة فان جميع العزلات اظهرت قدرة اقل في استهلاك المركبات الاروماتية المكونة من ١٨ ذرة كاربون، وهذا يتفق مع ما اشارت اليه البحوث من قلة استهلاك المركبات الاروماتية مع زيادة التعقيد في تركيبها إذ ان هناك علاقة بين سرعة التردي الحيوي للمركب وعدد حلقات البنزين ويعزى السبب للاختلافات بالجاهزية الحيوية، ثبات المركب الاروماتي ومقاومة حلقاته للكسر او الاكسدة ، سمية المركب والذوبان[١٣٥]، فالمركبات ذات الوزن الجزيئي الواطيء مثل النفثالين لها قابلية ذوبان عالية وميل قليل للدهون مقارنة بالمركبات عالية الوزن الجزيئي ويمكنها ان تكون مصدر للكاربون والطاقة، اما المركبات ذات الحلقات

المتعددة فان جاهزيتها الحيوية تكون اقل ويمكنها ان تكون مصدر للكاربون والطاقة بفعل عملية الاكسدة التي يشترك فيها اكثر من نوع بكتيري[١١١]، ومن المعروف ان اعداد وانواع البكتريا المستهلكة للهيدروكاربونات تقل مع زيادة تعقيد هذه المركبات، ويعد جنس الزوائف من اشهر اجناس البكتريا المستهلكة لهذا النوع من المركبات الا ان انواع مختلفة تعود لاجناس اخرى قد ذكرت ايضاً[٤٨، ٤٩]، لقد اظهر التحليل الكيمياوي بجهاز G.L.C. صورة واضحة لحالة المستحلب قبل وبعد المهاجمة البكتيرية الشكل (٢٩) واظهر الاختلافات باختلاف النوع والمقدرة الفسلجية على تمثيل المستحلب، ومن ثم فان كل عزلة كان لها تفاعلات خاصة بها تجاه مركبات هيدروكاربونية محددة في المستحلب ففي الوقت الذي استهلكت فيه بعض العزلات مركبات بنسبة ١٠٠% فشلت انواعاً اخرى في استهلاك أي جزء منها، واظهرت العزلات قدرات متباينة فيما بينها باستهلاك المكونات المختلفة جداول (٤-١٢)، وهذا يوافق ما ذكر في البحوث التي اشارت الى التباين الوراثي والفسلجي والقدرات المختلفة في الاستهلاك[١٠، ٤٣، ١٣٦]، ان التغيرات الحاصلة في التركيب الكيمياوي للمستحلب ستقود حتماً الى تغيرات في صفاته القياسية الاساسية وتزيد من مخاطر التآكل إذ يؤدي تردي المستحلب حيوياً الى ظهور نظام مكون من طبقتين احدهما فيه نسبة ماء عالية والاخر انفصلت فيه طبقة الزيت بشكل اكبر وان الطور المائي عادةً ما يكون حاوياً على الحوامض العضوية المتكونة خلال عملية التردي الحيوي للمستحلب وان حموضة هذا الجزء ستزداد، كما ان الزيت نفسه يصبح اكثر حامضية وحجم وشكل القطيرات سيتغير وستقتنص قطيرات الزيت جزءً من القطيرات المائية وستنقل عوامل التآكل الى سطح المعدن او الآلة وستزداد الحالة سوءً بازدياد فترة الاصابة والتعرض، ان هكذا بيئة متكونة بفعل التردي الحيوي للمستحلب ستقود الى التآكل الكيمياوي لامحالة،وان وجود الخلايا نفسها تقود الى تكوين ما يعرف بالخلايا المُ حِثة للتيار الكهربائي galvanic cells فعندما تغطي كتلة الخلايا جزء من سطح المعدن ستؤدي الى عدم تجانس انتشار الاوكسجين على السطح مسببة بدء التآكل[١٣٧، ١٣٨، ١٣٩]، ان الزيوت الذائبة ليست ذات طبيعة تأكلية عادةً لكن التآكل والصدأ قد يحدث بشكل مباشر بفعل المركبات الكيمياوية الايضية الناتجة بعد اكسدة الهيدروكاربونات، إذ تعمل الحوامض العضوية على زيادة تجهيز المستحلب بأيونات الهيدروجين وسحب مزيد من الالكترونات مسببة التآكل[١٤٠]، ان الربط بين التغيرات الكيمياوية التي حدثت للمستحلب خلال فترة الاصابة البكتيرية والتآ كل قد دُعّم تجريبياً، إذ اوضحت النتائج المستحصلة من فحص الصدأ (شكل ٢٠) ونتائج تأكل قطع الفولاذ (الاشكال ٢١-٢٨) زيادة قدرة المستحلب التآكلية وشدته وان تكوّن الصدأ قد ازداد بشكل مترافق مع

زيادة فترة نمو العزلات في المستحلب وصور سطوح نماذج الفولاذ بالمجهر الالكتروني الماسح تتوافق مع نتائج التجربة السابقة ايضاً، إذ ان النقر والتآكل الحبيبي قد ظهر على السطح بفعل التعرض للمستحلب وان شدة التآكل قد ازدادت بزيادة فترة تعرض المستحلب للبكتريا، وبسبب الطبيعة المعقدة التي تضم المكونات المختلفة للمستحلب فانه من الصعوبة معرفة أي جزء مسؤول عنها بالضبط ومع هذا فان الزيادة الحاصلة في حامضية المستحلب قد تلعب دوراً في عملية التآكل[٧٣]، ان زيادة حدوث الصدأ والتآكل يعكس عدم قدرة مانعات الصدأ والتآكل الموجودة في المضاف الكيمياوي (المركَّز) على معادلة التأثير التآكلي للمستحلب بعد نمو البكتريا فيه او أن تكون هذه المانعات قد تعرضت هي نفسها للمهاجمة البكتيرية والاستهلاك وان تمثيل المضافات الكيمياوية في المستحلب سيقلل من تركيزها للحد الذي يؤثر فيه ذلك على ادائها القياسي، ويجعل المستحلب بالتالي اكثر شدة في تأكله للمعادن وهذا يوافق ما ذكره بعضهم من ان تركيز موانع الصدأ قد انخفض من ١٢ مولار الى ٠.٢ مولار خلال عدة ايام في المستحلبات الملوثة وان استهلاك النترات والفوسفات الموجودة في المضافات الكيمياوية سببت تأكل ستة انواع من السبائك وادت الى ظهور النقر على سطحها[٤]، ان قطع الفولاذ المعرضة لمستحلب الزيت قد ظهر عليها اللون البني المسوّد بسبب تراكم نواتج التأكل او تأثير الحوامض العضوية الموجودة، الا ان تأثير نواتج التأكل هذه في الحد من عملية تأكل الفولاذ لم يظهر فنواتج التأكل المتجمعة على السطح تعد حاجزاً امام وصول الاوكسجين الى سطح المعدن وهناك علاقة مباشرة بين الاس الهيدروجيني للوسط وتحديد دور الاوكسجين في عملية التأكل بوصفه محفزاً او مثبطاً لها فسرعة التأكل في المدى (pH:٤-١٠) تعتمد فقط على سرعة انتشار الاوكسجين الى سطح المعدن[١٤١]، وتوضح الاشكال (٢١-٢٨) حالة بسيطة جداً من التأكل وان النتائج الموضحة تشير الى ان التأكل ازداد بزيادة تركيز الحوامض المنتجة (انخفاض الاس الهيدروجيني) ولم يحدث توقف بمقدار الخسارة في الوزن الناتجة عن عملية التأكل لاي من العزلات بمرور الوقت (جدول ٣)، وهذا يوافق ما ذكرته البحوث من ان سرعة التأكل تزداد بزيادة تركيز الحوامض وان توقف عملية التأكل بسبب حدوث حالة تمنّع المعدن Passivity لا تحدث باقل من تركيز ٧٠% من حامض مثل حامض الكبريتيك[١٠٠] ولما كانت المستحلبات التي استخدمت بالبحث بعيدة جداً عن هكذا تركيز فنستنتج انه يمكن عدها محاليل حامضية مخففة وقد تكون مخففة جداً في بعض الحالات، لذا فانه ليس لتركيز الحامض هنا تأثيراً مثبطاً على عملية التأكل وتصبح العملية كلها عملية تأكل معادن في محاليل حامضية تزداد فيها سرعة التأكل بزيادة تركيز الحامض وان سرعة التأكل تحددها بدرجة رئيسية سرعة انتشار الاوكسجين على

سطح المعدن وهذا يوافق ما ذكرته البحوث من ان الحوامض العضوية المنتجة بفعل الاحياء المجهرية تعد عوامل مسببة للتأكل بالرغم من كونها اضعف من العديد من الحوامض المعدنية[١٤٢، ١٤٣].

٤-٥: استخدام المركبات الكيمياوية في السيطرة

المبيدات هي مواد مضادة للاحياء وتوجد في بيئات مختلفة محيطة بالانسان لمنع او تثبيط او قتل النمو، ويمكن تقسيمها على مجموعتين رئيسيتين هما تلك التي توجد اساساً بالطبيعة وتنتج من قبل خلايا خضرية وتسمى بمضادات الحياة والمجموعة الثانية وهي غير المنتجة بالطبيعة وتصنّع كيمياوياً ولها تسميات مختلفة مثل المطهرات، المعقمات، المبيدات، المواد الحافظة وغيرها وهذه المجموعة تصنّف بالاعتماد على طبيعتها الكيمياوية او طريقة العمل او الفعالية وغيرها وبالرغم من ان استعمال المبيدات هو للتخلص من الاحياء الا انه وحتى عند الاستعمال الجائر لها قد لا تسبب كل التوقعات المطلوبة منها[٨٦، ١٤٤]، وذكر عدد من الباحثين ما يرونه مطلوباً في أي مركب للعمل بوصفه مبيداً فبعظهم يرى ان يكون رخيص الثمن وفعال في التراكيز الواطئة ولا يؤثر في البيئة بينما سجل (١٩٧٦) Sharply ما يصل الى اثنا عشر مطلباً[٨٣، ١٤٥]، الا ان Hill ذكر انه لا يمكن تلبية كل النقاط التي اشار اليها Sharply واكد على ان الامور المهمة الواجب توفرها في أي مركب للعمل بوصفه مبيداً ان يكون فعّالاً ضد الاحياء المجهرية الموجودة في النظام وان يكون متحملاً للحرارة وله ثبوتية ولا يتداخل مع الصفات القياسية للمستحلب[١٤٦]، وتستخدم في الانظمة الصناعية العديد من المبيدات المؤكسدة وغير المؤكسدة الا ان الكثير منها يفشل في السيطرة على نمو الاحياء بسبب الاختيار غير الصحيح والتطبيق غير الدقيق لهذه المركبات وان معرفة نوع الاحياء الواجب التخلص منها وديناميكية نظام العمل والتشغيل ودراسة قدرة الاحياء على انتاج سلالات مقاومة واستخدام التراكيز الصحيحة من المبيدات تعد من النقاط المهمة في نجاح العمل[١٤٧]، ان الهدف من استعمال المبيدات مع سوائل التشغيل الآلي هو لجعل اعداد الخلايا بمستويات واطئة منذ البداية (تأثير تثبيطي)، او لتقليل اعدادها عندما تصل الى مستويات عالية (تأثير قاتل)، وبالرغم من عدم وجود ضوابط قياسية محددة تحكم الحدود المسموحة من الاعداد في مثل هذه السوائل، الا ان هناك شبه اجماع في البحوث والدراسات من ان اعداد البكتريا الهوائية بمستويات اعلى من $١٠^{٥} - ١٠^{٧}$ خلية/مليلتر يجب تجنبها [١٢٧، ١٤٨]. اعتمد في البحث حساب اعداد الخلايا الحية مع الزمن بوجود المركبات المستخدمة للسيطرة وبعدمها لبيان كفائتها ومعرفة تأثير التراكيز المختلفة للمركب الواحد وهذا يوافق ما ذكرته بعض البحوث التي اعتمدت المبدأ نفسه [٨٤، ١٣٠، ١٤٩] ان مراقبة فعالية الخلايا هي نقطة مهمة

في تحديد كفاءة المبيد الا ان عدم وجود طريقة ملائمة جداً لتحديد فعالية كل الانواع المحتمل وجودها في بيئة المشتق النفطي من بكتريا هوائية، ولاهوائية، وفطريات، وخمائر، وطفيليات وغيرها غالباً ما يقود الى سوء في تعليل النتائج والفشل في استخدام المبيد، لذا يلجأ الى نوعين من الطرق في الغالب عند دراسة كفاءة المركبات المستعملة في السيطرة منها مباشرة تعتمد على عدد او كتلة الخلايا النامية وهذه الطرق تعطي عادةً معلومات اكثر حول العملية، ومنها غير مباشرة تعتمد على دراسة تأثير وجود هذه الاحياء مثل مراقبة التآكل او حساب مقدار الخسارة في المبادلات الحرارية او التغيرات في الصفات الكيمياوية او الفيزياوية للمركب[١٥٠، ١٥١] وبسبب تعقّد واختلاف انواع الاحياء المجهرية المتوقعة في أي نظام عمل ، فان اعتماد اكثر من طريقة للدراسة تعد امراً ضرورياً، وقد اشارت البحوث الى امكانية استعمال طرق مختلفة منها استخدام المجاهر الضوئية او الالكترونية او اجراء الفحوصات الكيموحيوية مثل قياس فعالية الانزيمات او سرعة التنفس او كمية ATP او بعض مكونات الجدار وعلى الرغم من ان جدار الخلية يمثل موقعاً جيداً لعمل عدد من مضادات الحياة ، إلا أنه لا يمثل موقعاً مناسباً للعديد من المبيدات المستخدمة بالصناعة فهو بالنسبة لها شبكة مفتوحة من وحدات الببتيدوكلايكان Peptidoglycan، إلا أن الغشاء البلازمي يمثل الموقع الامثل لعملها لكونه موقع العديد من الفعاليات الحيوية المرتبطة بعملية التردي الحيوي للمركبات الهيدروكاربونية[١٥٢]. استخدمت اربعة انواع من المركبات الكيمياوية المختلفة في محاولة للسيطرة على نمو العزلات في مستحلب الزيت واظهر ثلاثة منها قدرات جيدة في السيطرة، اما المركب الرابع وهو Tween-٨٠ فليس له أي تأثير سلبي على اعداد الخلايا بل بالعكس ساعد وجوده على الوصول الى درجات نمو عالية، ان تأثير المبيد على الخلايا يعتمد على سرعة نفاذه الى داخل الخلية فعندما تكون الخلايا بسرعة نمو واطئة فان معظم الانزيمات المسؤولة عن نقل المواد الغذائية عبر الغشاء البلازمي ستقل كفائتها، ومن ثم يقل تأثير المبيد وان نمو الخلايا بدرجات الحرارة التي تعطي اكبر نمو تزيد من فعالية المبيد وان زيادة درجة الحرارة بمقدار ١٠ ْم قد تؤثر سلباً على عمل المبيد من خلال تأثر عمل الانزيمات[١٥٠]، ان المبيدات المختلفة تعطي تأثيرات مختلفة على الانواع البكتيرية ويعتمد ذلك على الحالة الفسلجية للخلية، طور النمو، شدة الارتباط بين الخلايا وقطيرات الزيت فالمبيدات تهاجم المكونات الفعالة من الخلية وتجعلها تحت جهد غير طبيعي وفي التراكيز الواطئة تعمل مثبطات عادةً وقاتلة عند التراكيز العالية، وان موقع الهدف للمبيد هو اساساً مكونات من الغشاء البلازمي او السايتوبلازم ولاجل الوصول الى الهدف فالمبيد يجب ان يجتاز الغلاف الخارجي وما زال يحتفظ بالتركيز الفعال الاقل[١٥٣، ١٥٤]، وتوضح الاشكال

(٣١، ٣٣، ٣٥، ٣٧) ان التراكيز ٠.٥% و ١% من المركبين Na-tetraborate و Chlohexidine gluconate على التوالي والتركيزين ٣% و ٢.٥% من المركب E.G.M.E. لم تكن مؤثرة في السيطرة على نمو العزلات إذ ان اعداد الخلايا الحية انخفضت تدريجياً مما يشير الى ان تأثير هذه المركبات بهذه التراكيز كان تدريجياً ايضاً او ضعيفاً وبعدها حدثت زيادة في اعداد الخلايا مما يشير الى ان الخلايا المتبقية قد قاومت تأثيرهما وهذه المقاومة قد تحدث بسبب عمل الانزيمات المتنحية recessive الموجودة في الخلية التي تصبح لها اهمية عند الظروف غير الملائمة او العكسية adverse situations[١٣٣، ١٥٥] ان التردي الحيوي الذي حصل للمستحلب بفعل نمو العزلات فيه لم يكن بسبب التواجد الفيزياوي للخلايا في المستحلب فحسب، ولكن ايضاً بفعل الفعاليات الحيوية الناتجة عنها التي مكنتها من استهلاك مكوناته لذا فان تركيز المبيدات المطلوبة هو لقتل الخلايا اكثر مما هو لوقف نموها وتقليل اعدادها إذ انه في الحالة الاخيرة فان حدوث التغيرات في المستحلب ستحدث بمرور الوقت وعليه يعد من الخطورة استعمال مثل هذه التراكيز تحت القاتلة sub-lethal لانها تساعد في ظهور سلالات مقاومة قد تكون ذات كفاءة عالية في مهاجمة المستحلب فضلاً عن وجود قطيرات الزيت التي تعمل على سحب المبيد اليها وتقلل تركيزه في الجزء المائي حتى يصل للدرجة التي لا يؤثر فيها على الخلايا، بل قد يحفز الخلايا التي قاومت تركيزه الاصلي، وان نقص اعداد الخلايا لا يترافق دائماً مع النقص في الفعالية[١٣٠، ١٤٦]، سَبَبَ مركب الكلورهكسيدين هبوطاً حاداً في اعداد الخلايا الحية عند التركيزين ٢% و ٢.٥% ولم ترصد أي خلية حية بعد يوم واحد من الحضانة معه عند هذين التركيزين، ويمتاز هذا المركب بوجوده بعده اشكال منها gluconate, dihydrochloride, diacetate وبان له تأثير قوي في العمل بوصفه مبيداً للحياة وله مدى واسع في الفعالية ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ويؤثر في عمله على الاغشية بفعل تعادل السطوح ذات الشحنة السالبة للخلية بسرعة معه، وان التراكيز غير القاتلة منه تعمل على احداث تغيرات في الغشاء الخارجي للخلية وتسمح بخروج الايونات الموجبة ثنائية الشحنة وخصوصاً ايونات الكالسيوم Ca^{+2} ويعمل المركب على الاحلال محل الايونات الموجبة في الغشاء الخارجي مما يسبب تلفه وتعرض الخلية للتأثير المباشر للمبيد المتبقي بالوسط، ويعتقد ان الايونات الموجبة للمركب ترتبط بشكل مباشر مع الدهون المفسفرة الحامضية مثل phosphatidyl glycerol مؤدية الى عدم استقرار الغشاء ونضوح مكونات السايتوبلازم ذات الوزن الجزيئي الواطيء وتثبيط بعض الانزيمات المرتبطة بالغشاء مثل ATPase [١٥٦، ١٥٧] ، لقد استخدمت في البحث الطريقة نفسها التي اشار اليها Gaylarde

وجماعته[٤٨] في تحضير اللقاح وان خليط البكتريا الموجود في الوسط سيتأثر بدرجات مختلفة لعمل المبيد بسبب الاختلافات البايولوجية Biological variance بين الانواع، وذكرت البحوت ان هناك اختلافات في تحمل البكتريا لتأثير المركب كلورهكسيدين وسجلت اختلافات بين بكتريا الـ E.coli و Pseudomonas sp[٨٤] وان تأثير المبيدات لا يتغير بتغير الانواع البكتيرية فقط وانما ضمن النوع الواحد ايضاً، فقد اشير الى اختلافات في التركيز المثبط الاقل .M.I.C للكلورهكسيدين من ١٠-٨٠٠ جزء بالمليون عند فحص حساسية ١٠٤ عزلة من بكتريا P.mirabilis وان ١٤٨ عزلة من بكتريا E.coli لها .M.I.C للمركب نفسه يتراوح بين ٠.٣٩ - ١٢.٥ جزء بالمليون والبكتريا الموجبة التي هي اكثر حساسية له تختلف بمقدار ٣-٥ مرات فيما بينها[١٥٦] ولذا فان تراكيز المركبات الكيمياوية المستخدمة في البحث بوصفها عوامل سيطرة اظهرت قدرة عالية في السيطرة على النمو وتمثل الحد الادنى لقتل كل الانواع المعزولة مما يشير الى كفائتها، إلا ان قراءات الـ .M.I.C او الـ (.M.B.C) Minimal bactericidal concentration لاتمثل بشكل دقيق التركيز المطلوب استعماله في حقل العمل لمنع نمو الانواع البكتيرية المختلفة الموجودة في سوائل التشغيل الآلي، وانه لتحديد قوة وفعالية أي مركب يراد استخدامه فانه يفحص ضد عدد من العزلات المختلفة، ويؤخذ معدل القراءات او يستخدم $MIC_{٩٠}$. وهو اقل تركيز يؤدي الى تثبيط ٩٠% من الخلايا وهذا هو الذي ينصح باستخدامه عادة [٦].

كان تأثير مادة Na-tetraborate باتجاه تأثير المركب السابق نفسه مع بعض الاختلاف، فقد كان تأثير التركيز ٢% منه اقل شدة في قتل البكتريا وكان عدد الخلايا بنهاية اليوم السادس اعلى مما سجل مع مركب الكلورهكسيدين عند التركيز ١% إلا أن كفاءة المركب في قتل الخلايا ازدادت بشكل كبير جداً عند التراكيز ٣% ، ٤%، ٥% ولم ترصد خلايا حية بعد يومين للتركيز الاول وبعد يوم واحد للتركيزين الاخيرين، وكانت الاعداد عند التركيز ٣% بنهاية اليوم الاول قليلة جدا مما يعكس القدرة العالية لهذا المركب في السيطرة بزيادة تركيزه، وهناك معلومات قليلة جدا ومتفرقة حول مركبات البورون واستخدامها بوصفها مبيدات في سوائل التشغيل الالي، فقد وجد ان استخدامها يمنع تكوّن الروائح الكريهة فيها كما انها غير ضاره للعمال[١٥٨]، وعلى الرغم من ان بعض البحوث اشارت عند استخدام مركب Biobor-JF وهو استرات عضوية للبورون في الانظمة التي يشترك فيها الزيت مع الماء الى انها ثبطت نمو الفطريات بتركيز ٢٧٠ جزء بالمليون ولم تؤثر في البكتريا إلا أن مادة Na-tetraborate في البحث اعطت نتائج ايجابية جدا في قتل كل الانواع البكتيرية

المعزولة، وخصوصا عند التراكيز العالية منها ولم تشر البحوث الى استخدام مادة Na-tetraborate لوحدها في السيطرة وانما درست مشتقات البورون العضوية او الاسترات او خلطها مع مركبات كيمياوية اخرى مثل alkanolamines التي تستعمل كعوامل استقرار وثبوتية لسوائل التشغيل الالي عند الاس الهيدروجيني العالي (pH=١٠)، وقُوِسَ تاثير هذه المركبات معا مع امينات البورون amine borates التي قد تكون املاح او استرات لحامض البوريك، وتم الاعتقاد بان مركبات الـ alkanolamines المتحررة بفعل تحلل الاسترات هي التي تعطي الفعل القاتل للمركب[١٥٩، ١٦٠].

لم يظهر استخدام مادة Tween-٨٠ أي درجة من السيطرة على نمو البكتريا في المستحلب وفيما عدا الهبوط الذي حصل في الاعداد لليومين الاول والثاني عند التراكيز العالية ١٢% و ١٤% فان اعداد الخلايا استمرت بالزيادة وبوجوده وفاقت في بعض التراكيز منه اعدادها في نموذج السيطرة مما يشير الى ان وجوده في الوسط ساعد على زيادة استهلاك المستحلب وهذا يوافق ما ذكرته بعض البحوث من ان المركبات ذات التأثير على الشد السطحي ومنها Tween-٨٠ تسّرع من استهلاك المركبات الهيدروكاربونية وانها تسبب زيادة في التصاق الخلايا الى السطوح مما يسبب زيادة في قدرة الخلايا على تكوين الطبقة الحيوية وزيادة الاعداد [١٥٤، ١٦١]، ان سبب زيادة اعداد الخلايا عند استعمال الـ Tween-٨٠ قد يعزى الى زيادة ذوبان المركبات المكونة للمستحلب وجعلها اكثر استحلاباً وجاهزية للخلايا، فقد ذكرت البحوث ان استهلاك بعض المركبات الاروماتية متعددة الحلقات ولغاية سبع حلقات بنزين قد ازداد بمقدار ٢٥٠ ضعف وان النسبة الكلية للتردي ازدادت بنسبة ٣٠-٦٧ % وان فترة التطّبع Lag قد تقلصت بوجود سلسلة من مركبات التوين Tween series بتركيز ١٠غم/لتر[١٢٤]، كما وجد ان Tween-٨٠ ادى الى زيادة ذوبان المركبات الهيدروكاربونية متعددة الحلقات والتي شملت الفينانثرين، الفلورين، البايرين، الكريسين في الجزء المائي من الوسط وان تركيزها فيه قد ازداد بمقدار ٢.٢-٣.٥ مرة[١٢٤]، وبالرغم من معرفتنا بان المواد المؤثرة على الشد السطحي ومنها Tween-٨٠ تزيد من ذوبان المركبات الهيدروكاربونية بالماء مما يساعد في زيادة استهلاكها، إلا أن بحوث عديدة اشارت الى انها ممكن ان تسبب تثبيط او منع عملية التردي الحيوي بسبب سميتها للاحياء، وهذا ما دفعنا لدراسة تأثيرها بوصفها أحد عوامل السيطرة، فقد وُجد في دراسة لنوعين من مواد الشد السطحي احدهما Tween-٨٠ ان تأثيره على استهلاك الفلورانثين بفعل سلالتين من بكتريا Mycobacterium وسلالتين من بكتريا Sphingomonas كان ضعيفاً في التثبيط مع النوع الاول الا انه كان واضح التاثير على النوع الثاني وخفض الاستهلاك بمقدار

النصف[١٦٢]، بينما لم يجد اخرون أي تأثير للمواد المؤثرة على الشد السطحي غير الايونية في زيادة او نقصان استهلاك المركبات الهيدروكاربونية متعددة الحلقات بفعل البكتريا المؤكسدة للفينول بسبب قدرة البكتريا على استهلاك مركبات الشد السطحي نفسها بوصفها مصدراً للكاربون[١٦٣]، وهذا قد يكون مشابهاً بعض الشيء لما حدث في تجربتنا إذ لم يؤثر وجود الـ Tween-٨٠ على الخلايا وزادت اعدادها بكثرة ويمكن ان يعزى ذلك الا انه هو نفسه قد استهلكته البكتريا ايضاً، وبينت نتائج الدراسة ان فعالية المركب E.G.M.E. قد ازدادت بزيادة تركيزه فعند التراكيز ٢.٥% و ٣% كان تأثيره قليلاً وعند التراكيز ٣.٥% و ٤% و ٤.٥% كان تأثيره قوياً في الخلايا ولم ترصد الخلايا الحية بعد ٣، ٢، ١ يوم من الحضانة على التوالي، ان سبب عدم استمرار تأثير المركب عند التركيزين ٢.٥% و ٣% قد يكون بسبب كونها اقل من الجرع القاتلة او حتى استهلاكه من قبل الخلايا وذكرت البحوث انه عند التركيز القليل ١% منه فان الاحياء المجهرية تعمل على استهلاكه بوصفه مصدراً للكاربون وان التركيز ١٥٠٠ جزء بالمليون المستخدمة في خزانات وقود الطائرات بوصفها مادة مانعة للتجمد تعد واطئة جداً اذا نظر اليها بوصفها مبيداً ويمكن ان تسبب في ظهور سلالات مقاومة وان اقل تركيز مسموح به هو ٢٠٠٠ جزء بالمليون وينفع استخدام E.G.M.E. للاستعمالات المستمرة ولاينفع بوصفه علاج صدمه او للمعاملات المتوسطة المدى[٨٣، ١٤٦] ان مادة E.G.M.E. تذوب بالزيت بشكل ضئيل لكنها تذوب بالماء بسهولة لذلك فانه في انظمة الزيت:الماء فانها ستتجمع في الطور المائي وهذه نقطة مهمة عند استعمال المبيدات مع المستحلبات إذ يلعب معامل المشاركة Partition coefficient بين الزيت والماء دوراً في تحديد تركيز المبيد في كل منهما فالتركيز ٠.٠٥% من E.G.M.E. في الطور الزيتي ضروري كأقل تركيز مطلوب لكي يعطي تركيز ١٥% منه في الطور المائي[١٦٤]، وفي المستحلبات إذ المحلول مكون من طورين فان الخلايا ستنمو في الطور المائي ويجب ان تقتل هناك والمبيد الذي يذوب بالزيت اذا استعمل مع مستحلب الزيت فانه سيذهب الى قطيرات الزيت وسيكون له تأثير قليل على الخلايا في الطور المائي، ويعتمد تركيز المبيد في أي طور على عوامل كثيرة منها نسبة الماء: الزيت، معامل انتشار المبيد بينهما، درجة الحرارة، نوع الزيت، الاس الهيدروجيني ووجود المواد العضوية التي تمتص قسماً من المبيد وتقلّل من تركيزه وعليه فالانظمة الملوثة جداً تحتاج الى تراكيز اعلى من المبيد وبمجرد ان يستوطن النمو البكتيري اوالفطري في انظمة مستحلبات الزيت فانه من الصعب تعقيم النظام والتخلص منها نهائياً حتى لو استخدمت المركبات القاتلة لهما بالتراكيز المحسوبة وان احد اسباب ذلك الفشل هو قدرة الاحياء على تحطيم العديد من المبيدات

المستخدمة تجارياً وان معظمها غير كفوءة في السيطرة على نمو الاحياء في المستحلبات [١٣٠، ١٣٢، ١٤٦] وفي الحقيقة هناك العديد من المركبات الممكن استخدامها بوصفها مبيدات الا ان المساويء من استخدام أي منها يجب ان توزن مع الفوائد المستحصلة [١٤٧].

جدول (٢): توزيع العزلات البكتيرية المعزولة من عينات مستحلب الزيت المستعمل حسب تفاعلها مع صبغة كرام، اجناسها، اعدادها ونسبها المئوية

اسم الجنس	العدد	النسبة المئوية%
١-Gram negative genera	١١	٧٨.٥٧
Pseudomonas	٤	١١.٧٦
Burkholderia	٣	٨.٨٢
Acinetobacter	٣	٨.٨٢
Escherichia	٣	٨.٨٢
Serratia	٢	٥.٨٨
Citrobacter	٢	٥.٨٨
Aeromonas	٢	٥.٨٨
Klebsiella	٢	٥.٨٨
Ralstonia	٢	٥.٨٨
Moraxella	٢	٥.٨٨
Methylobacterium	١	٢.٩٤
Total Gr^{-ve}isolates	٢٦	٧٦.٤٧
٢- gram Positive genera	٣	٢١.٤٢
Staphylococcus	٤	١١.٧٦
Micrococcus	٢	٥.٨٨
Corynebacterium	٢	٥.٨٨
Total Gr^{+ve}isolates	٨	٢٣.٥٢
All isolates	٣٤	٩٩.٩

جدول (٣): مقدار النقصان بالوزن (ملغم/يوم) لعينات الفولاذ بعد تعرضها لمستحلبات الزيت التي نمت فيها البكتريا لمدة ١-٦ اسابيع

العزلة البكتيرية		الاسبوع

	مقدار الخسارة بالوزن ملغم/يوم	١	٢	٣	٤	٥	٦
B.cepacia		٠.١٦٣٩	٠.٢٩٧٨	٠.٤٤٦٧	٠.٦٧٨٣	٠.٧٨١٧	٠.٨٨٣٦
P.putida		٠.١٦٥٥	٠.٢٢٥٧	٠.٣٩١٣	٠.٦٠٢٦	٠.٧٥٨٦	٠.٨٠٣٢
A.media		٠.١٣٣٢	٠.٢٤٧٥	٠.٣٠٠٧	٠.٥٠٧٦	٠.٦٦٦٠	٠.٧٣٤٠
C.koseri		٠.٠٩٩١	٠.٢٦٦٢	٠.٢٦٧٨	٠.٣٢٢٤	٠.٤٠٣٣	٠.٥٣٥٧
S.marcescens		٠.٠٥٤٦	٠.٠٦٧٣	٠.١٠١٩	٠.١٨٢٢	٠.٢٣٧٧	٠.٢٧٣٤
K.oxytoca		٠.٠٠٩٨	٠.٠٧٩٦	٠.١١٤٩	٠.١٤٢٩	٠.١٨٨٢	٠.١٩٧٠
R.eutropha		٠.٠٠٤٣	٠.٠٠٩٩	٠.٠٢٧٨	٠.٠٤٢١	٠.٠٤٩٨	٠.٠٥٦٦
A.baumanni		٠.٠٠٣٢	٠.٠٠٧٦	٠.٠٢٣٣	٠.٠٢٦٠	٠.٠٣٩٢	٠.٠٤٥٥
control		٠.٠٠٠١	٠.٠٠٠١	٠.٠٠٠١	٠.٠٠٠١	٠.٠٠٠١	٠.٠٠٠١

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
١	التصميم المستخدم في التجربة (٢-٢-٨)	٤٤
٢	التصميم المستخدم في التجربة (٢-٢-١٧-ب)	٥٠
٣	قدرة العزلات على استمرار النمو من عدمه في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة	٥٧
٤	نمو بكتريا P.putida في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت والتغيرات الحاصلة في الاس الهيدروجيني، معامل اللون ، التوصيلية الكهربائية	٥٩
٥	نمو بكتريا S.marcescens في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت والتغيرات الحاصلة في الاس الهيدروجيني، معامل اللون ، التوصيلية الكهربائية	٥٩
٦	نمو بكتريا C.koseri في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت والتغيرات الحاصلة في الاس الهيدروجيني، معامل اللون ، التوصيلية الكهربائية	٦٠
٧	نمو بكتريا B.cepacia في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت والتغيرات الحاصلة في الاس الهيدروجيني، معامل اللون ، التوصيلية الكهربائية	٦٠
٨	نمو بكتريا A.media في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت والتغيرات الحاصلة في الاس الهيدروجيني، معامل اللون ، التوصيلية الكهربائية	٦١
٩	نمو بكتريا A.baumanni في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت والتغيرات الحاصلة في الاس الهيدروجيني، معامل اللون ، التوصيلية الكهربائية	٦١
١٠	نمو بكتريا K.oxytoca في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت والتغيرات الحاصلة في الاس الهيدروجيني، معامل اللون ، التوصيلية الكهربائية	٦٢
١١	نمو بكتريا R.eutropha في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت والتغيرات الحاصلة في الاس الهيدروجيني، معامل اللون ، التوصيلية الكهربائية	٦٢
١٢	معدل القطر لقطيرات مستحلب الزيت ٤% بعد نمو العزلات البكتيرية فيه لمدة (٦) اسابيع	٦٤
١٣	صور توضح الاختلافات في حجم وشكل قطيرات مستحلب الزيت بعد نمو العزلات البكتيرية فيه لمدة ٦ اسابيع (X١٠٠)	٦٥
١٤	قيم فك الاستحلاب لمستحلب الزيت ١٠% في وسط الاملاح المعدنية السائل بعد نمو العزلات البكتيرية فيه لمدة ٧ ايام	٦٦
١٥	صورة فك الاستحلاب لمستحلب الزيت ١٠% وانفصال طبقاته نتيجة نمو العزلات البكتيرية فيه لمدة ٧ ايام	٦٦
١٦	صورة توضح قدرة العزلات البكتيرية على النمو في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ١٥% زيت الاساس ٤٠ بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة	٦٧

١٧	نمو العزلات البكتيرية في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ١٥% زيت الاساس ٤٠ بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة	٦٨
١٨	نمو العزلات البكتيرية في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ١٠% من المضاف الكيمياوي (المركَّز) بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة	٧٠
١٩	صورة توضح قدرة العزلات البكتيرية على النمو في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ١٠% من المضاف الكيمياوي (المركَّز) بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة	٧١
٢٠	صور لحالات تكون الصدأ وشدته بفعل مستحلبات الزيت التي نمت فيها العزلات البكتيرية لفترة ١-٤ اسابيع	٧٢
٢١	صورة مكبرة ٥٠٠ مرة مأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح لحالات التآكل لسطح نماذج الفولاذ بعد تعرضها لمدة ٢٤ ساعة لمستحلبات الزيت التي نمت فيها بكتريا B.cepacia لمدة ١-٦ اسابيع	٧٤
٢٢	صورة مكبرة ٥٠٠ مرة مأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح لحالات التآكل لسطح نماذج الفولاذ بعد تعرضها لمدة ٢٤ ساعة لمستحلبات الزيت التي نمت فيها بكتريا P.putida لمدة ١-٦ اسابيع	٧٥
٢٣	صورة مكبرة ٥٠٠ مرة مأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح لحالات التآكل لسطح نماذج الفولاذ بعد تعرضها لمدة ٢٤ ساعة لمستحلبات الزيت التي نمت فيها بكتريا A.media لمدة ١-٦ اسابيع	٧٦
٢٤	صورة مكبرة ٥٠٠ مرة مأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح لحالات التآكل لسطح نماذج الفولاذ بعد تعرضها لمدة ٢٤ ساعة لمستحلبات الزيت التي نمت فيها بكتريا C.koseri لمدة ١-٦ اسابيع	٧٧
٢٥	صورة مكبرة ٥٠٠ مرة مأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح لحالات التآكل لسطح نماذج الفولاذ بعد تعرضها لمدة ٢٤ ساعة لمستحلبات الزيت التي نمت فيها بكتريا S.marcescens لمدة ١-٦ اسابيع	٧٨
٢٦	صورة مكبرة ٥٠٠ مرة مأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح لحالات التآكل لسطح نماذج الفولاذ بعد تعرضها لمدة ٢٤ ساعة لمستحلبات الزيت التي نمت فيها بكتريا K.oxytoca لمدة ١-٦ اسابيع	٧٩
٢٧	صورة مكبرة ٥٠٠ مرة مأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح لحالات التآكل لسطح نماذج الفولاذ بعد تعرضها لمدة ٢٤ ساعة لمستحلبات الزيت التي نمت فيها بكتريا R.eutropha لمدة ١-٦ اسابيع	٨٠
٢٨	صورة مكبرة ٥٠٠ مرة مأخوذة بالمجهر الالكتروني الماسح لحالات التآكل لسطح نماذج الفولاذ بعد تعرضها لمدة ٢٤ ساعة لمستحلبات الزيت التي نمت فيها بكتريا A.baumanni لمدة ١-٦ اسابيع	٨١
٢٩	ذروات تحليل مستحلب الزيت بجهاز كروموتوكرافيا الغاز G.L.C. قبل المعاملة (انموذج السيطرة) وللنماذج التي نمت فيها العزلات البكتيرية لمدة ٦ اسابيع	٨٣
٣٠	كفاءة العزلات البكتيرية في ترديها لمستحلب الزيت حيوياً بعد نموها فيه لمدة ٦ اسابيع	٩٠
٣١	تأثير اضافة التراكيز المختلفة من المركب Chlorhexidine gluconate على اعداد الخلايا البكتيرية في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت	٩٣

٣٢	صورة توضح تأثير اضافة التراكيز المختلفة من المركب Chlorhexidine gluconate على النمو البكتيري في مستحلب الزيت	٩٣
٣٣	تأثير اضافة التراكيز المختلفة من المركب Na-tetraborate على اعداد الخلايا البكتيرية في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت	٩٤
٣٤	صورة توضح تأثير اضافة التراكيز المختلفة من المركب Na-tetraborate على النمو البكتيري في مستحلب الزيت	٩٤
٣٥	تأثير اضافة التراكيز المختلفة من المركب Tween-٨٠ على اعداد الخلايا البكتيرية في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت	٩٥
٣٦	صورة توضح تأثير اضافة التراكيز المختلفة من المركب Tween-٨٠على النمو البكتيري في مستحلب الزيت	٩٥
٣٧	تأثير اضافة التراكيز المختلفة من المركب E.G.M.E.على اعداد الخلايا البكتيرية في وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على ٤% مستحلب الزيت	٩٦
٣٨	صورة توضح تأثير اضافة التراكيز المختلفة من المركب E.G.M.E. على النمو البكتيري في مستحلب الزيت	٩٦

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
١	الانواع البكتيرية المعزولة ونتائج الاختبارات الوظيفية التي اجريت عليها	٥٤
٢	توزيع العزلات البكتيرية المعزولة من مستحلب الزيت المستعمل حسب تفاعلها مع صبغة كرام، اجناسها، اعدادها ونسبها المئوية	٥٥
٣	مقدار النقصان بالوزن (ملغم/يوم) لعينات الفولاذ بعد تعرضها لمستحلبات الزيت التي نمت فيها البكتريا لمدة ١-٦ اسابيع	٨٢
٤	النسب المئوية لمكونات مستحلب الزيت قبل المعاملة (انموذج السيطرة) بدلالة مساحة الذروة ووقت ظهورها لكل مركب حسب عدد ذرات الكاربون فيه	٨٤
٥	القراءات المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز G.L.C لمستحلب الزيت بعد ان نمت فيه بكتريا S.marcescens لمدة ٦ اسابيع	٨٤
٦	القراءات المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز G.L.C لمستحلب الزيت بعد ان نمت فيه بكتريا A.media لمدة ٦ اسابيع	٨٥
٧	القراءات المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز G.L.C لمستحلب الزيت بعد ان نمت فيه بكتريا C.koseri لمدة ٦ اسابيع	٨٥
٨	القراءات المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز G.L.C لمستحلب الزيت بعد ان نمت فيه بكتريا K.oxytoca لمدة ٦ اسابيع	٨٦
٩	القراءات المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز G.L.C لمستحلب الزيت بعد ان نمت فيه بكتريا R.eutropha لمدة ٦ اسابيع	٨٦
١٠	القراءات المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز G.L.C لمستحلب الزيت بعد ان نمت فيه بكتريا B.cepacia لمدة ٦ اسابيع	٨٧
١١	القراءات المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز G.L.C لمستحلب الزيت بعد ان نمت فيه بكتريا A.baumanni لمدة ٦ اسابيع	٨٧
١٢	القراءات المستحصلة من المعالج الميكروي الملحق بجهاز G.L.C لمستحلب الزيت بعد ان نمت فيه بكتريا P.putida لمدة ٦ اسابيع	٨٨