عزل وتوصيف جزيئى لسلالات بكتيرية متميزة لها القدرة على تكسير مخلفات المصانع البترولية فى المملكة العربية السعودية

الهنوف محمد طريخم الخماش

إشراف

أ. د. ناريمان عبد المنجي حسن علي

د. نورة حسن مستور الزهراني

المستخلص

تهدف الرسالة الى عزل السلالات البكتيرية التي تعيش على مخلفات المصانع البتروكيميائية المنتجة للبلاستيك كمصدر رئيس ومنفرد للكربون والتي اكتسبت القدرة على تحليل منتجات البلاستيك من البولي ايثيلين والبولي بروبيلين والبولي ايثيلين جليكول بكفاءة عالية بالاضافة الى تعريف وتوصيف السلالات البكتيرية المعزولة باستخدام تحليل التتابعات النيكلوتيدية لجين 16S rRNA. ولتحقيق هذه الأهداف المطلوبة فقد تم تجميع ٩ عينات من الماء والتربة لمخلفات المصانع في ثلاث مناطق مختلفة في المملكة العربية السعودية وهم الشركة السعودية للصناعات الأساسية (سابيك) المنتجة للبولي ايثيلين ، البولي اثيلين جليكول في المنطقة الصناعية بالجبيل وشركة الصحراء للبتروكيماويات (صحراء) بالجبيل والمنتجة لمنتجات الايثيلين والبولي اثيلين والشركة الوطنية للصناعات البتروكيميائية (ناتبيت) المتخصصة في انتاج البولي بروبيلين ومنتجاته من المدينة الصناعية بينبع هذا بالإضافة لعينة تربة من مردم نفايات جدة وقد اجريت دراسات التحلل الميكروبي لأنواع البلاستيك بتنمية العينات المتحصل عليها على بيئة الكفاف المضاف إليها تركيزات مختلفة من البولي ايثيلين والبولي ايثيلين جليكول والبولي بروبيلين في تجارب منفصلة كل على حده كمصدر وحيد للكربون في البيئة الفيزيائية .امكن الحصول على ٧٠ عزلة بيكتيرية من الأربعة مواقع المختلفة والتي امكنها ان تعيش على تركيزات المواد الثلاثة. واختبرت العزلات البكتيرية مرة اخرى على المواد الثلاثة باضافة تركيزات اخرى وفي تجارب منفصلة .وتم قياس الوزن لفترات مختلفة وقد أظهرت تجارب الكفاءة التحليلة للمواد ان العزلات التي نمت على البولي ايثيلين بعد شهر وأربعة أشهر كانت أكثر من العزلات التي نمت على البولي بروبيلين حيث تم الحصول على ١٨ عزلة للبولي ايثيلين مقابل ٧ عزلات للبولي بروبيلين. وقد أظهرت تجارب تحليل البولي ايثيلين ان العزلات المحللة لمسحوق البولي ايثيلين كانت أكثر عددا من العزلات المحللة للبللورات وأيضا للبولي ايثيلين منخفض الوزن الجزيئي حيث أظهرت التجارب ان ١٨ عزلة قد أعطت نسب مئوية مختلفة لكفاءة تحليل بودرة البولي ايثيلين في حين أمكن الحصول على ٤ عزلات أمكنها تحليل البولي ايثيلين منخفض الوزن الجزيئي وعزلة واحدة فقط لبللورات البولي ايثيلين. وقد أعطت العزلة ٢٧ (ستينوتروفوموناس اسيدامينفيلا) أعلى كفاءة تحليلية لمسحوق البولي ايثيلين بنسبة ٤٨،٣% في حين أظهرت العزلة ٣٧ (باسيلس سيركيلانس) أقل نسبة تحليل حيث بلغت ١،٢% وذلك بعد ٤ شهور من التحضين. أظهرت العزلتين السابقتين بالإضافة الى العزلتين ٤٤،٣٣ وهي على الترتيب (ستينوتروفوموناس اسيدامينفيلا ، بانيباسلس اجاريديفورانس) كفاءة تحلل مزدوجة لمسحوق البولي ايثيلين والمنخفض الوزن الجزيئي أيضا. كما أظهرت العزلة ٤١ (باينباسيلس كوكى) كفاءة تحلل مزدوجة لمسحوق وبللورات البولي ايثيلين . أظهرت نتائج مقارنة المناطق الصناعية للبتروكيماويات ارتفاع ملحوظ في العزلات البكتيرية المحللة للبولي ايثيلين والبولي بروبيلين من عينات المياه المتحصل عليها من ناتبيت،في حين احتلت عينات التربة المتحصل عليها من شركة الصحراء ثاني منطقة في كفاءة العزلات البكتيرية المحللة للبولي ايثيلين والبولي بروبيلين. من ناحية أخرى أظهرت عينات المياه من منطقة شركة صحراء وسابيك أعلى كفاءة للعزلات في تحليل البولي ايثيلين مقارنة بعينات الماء من منطقة شركة ناتبيت . أمكن توصيف العزلات البكتيرية المتحصل عليها بناء على الشكل الظاهري للمستعمرات والحركة وتكوين الجراثيم وايضا قابليتها للصبغ بالجرام.كما أمكن معرفة التتابعات النيوكليوتيدية لجين 16S rRNA في عدد ٢٨ عزلة من اجمالي ٧٠ عزلة محللة لانواع البلاستيك الثلاثة . وأظهر تحليل البلمرة المتسلسل القطع الممثلة للجين باحجامها المختلفة للعزلات.

أظهرت مقارنة التتابعات النيوكليوتيدية للعزلات البكتيرية بمثيلتها الموجودة في بنك الجينات الدولي نسبت تشابه تراوحت بين ٧٨% في العزلة ١٦ (كارنوباكتيريم مالتاروماتيكيم) الى ٩٩% في خمسة عزلات اخرى. كما أظهر تحليل التتابعات النيكليوتيدية للجين وجود ١٦ صنف بكتيري أمكن تعريفها وتقع داخل ٨ عائلات بكتيرية هذا بالإضافة الى وجود ١٧ عزلة جديدة أعطت نسبة تشابه أقل من ٩٨%. اجرى التوصيف الجزيئى للعزلات التى تم تعريفها على حده من الاصناف البكتيرية الاربعة (بريفيباسلس بريفيس ، ستينوتروفوموناس اسيدامينفيلا ، اوكروباكتريم انترميديم ، باسيلس ساتلس) واظهرت النتائج وجود اختلافات فى التتابعات النيكلوتيدية لبعض العزلات وفى مناطق متعددة من جين 16S rRNA مقارنة بالعزلات الاخرى وبالسلالات الموجوده فى بنك الجينات الدولى حيث اختلفت القواعد النيتروجينية البيورين وتحولت الى بيرميدين وبالعكس. وتعذى الاختلافات النيكلوتيدية لهذه العزلات الى تغير صفات السلالات البكتيرية نتيجة اكتساب صفات جديدة من البيئة المحيطة بها وتنصح الدراسة باستخدام السلالات المعزولة والتي بينت التجارب قدرتها العالية على تحليل منتجات البلاستيك باستخدامها على نطاق واسع في المملكة العربية السعودية بغرض التخلص من المواد البلاستيكية الملوثة للبيئة خاصة في المناطق المحيطة بالمدن الصناعية للبتروكيماويات كذلك تحث الرسالة على دراسة ميكانيكيات تنظيم الجينات والأنزيمات المحللة للبلاستيك في العزلات المتميزة.

Molecular characterization of bacterial isolates degrading petroleum industry wastes in Saudi Arabia

Al-Hanouf Mohammed Trikhem Al-Khammash

Superwised By

Prof. Dr. Nariman Abdel-Mongy Hassan Aly

Dr. Nworh Hasan Alzhrani

ABSTRACT

The present study aims to isolate and identify the indigenous bacterial strains that adapted to the petrochemical industrial waste as sole carbon source and acquired high potential degrading efficiencies of polyethylene (PE), polyethylene glycol (PEG) and polypropylene (PP) as well as identify and characterize the nucleotide sequences of the isolated strains using 16S rRNA. To do that, nine samples were collected from soil and water of three different locations in Saudi Arabia; Saudi Basic Industries Corporation (SABIC) in Jubail, Saudi Ethylene & Polyethylene Company (Sahara Petrochemicals Co) in Jubail and National Petrochemical Industrial Co. (NATPET) at Yanbu Industrial City, as well as sample from soil garbage in Jeddah. Biodegradation studies were conducted by growing the nine samples in the minimal medium containing PE, PEG and PP individually as a sole source of carbon. A total of 70 bacterial isolates were obtained from the four locations under PE, PEG and PP treatments. The number of isolates with degrading efficiency of PE was more than PP; 18 vs. 7 isolates. Among the three experiments using polyethylene as sole sources of carbon, polyethylene powder showed high depredated bacterial strains than polyethylene crystal and low molecular weight of polyethylene. Whereas, 18 isolates displayed various degrading efficiency percentages under powder vs. 4 isolates under LDPE and one under PE crystal. The 18 isolates degrading PE powder displayed various activities ranged from 48.3% in isolate 27 to 1.2% in isolate 37 after 4 months of incubation. The two previous isolates and another two isolates 33 and 44 showed dual degrading efficiency to polyethylene powder and low density. One isolated strain no. 41 displayed dual degrading activities with powder and crystals. In regard to the five locations of sample sources with the relation of degrading efficiency of bacterial isolates, high number of PE and PP degrading efficiency strains obtained from NATPET water. Sahara soil showed the second high area for bacterial strains with degrading their efficiency to PE and PP. Sahara water and Sabic water were high locations for PE degrading efficiency than NATPET water. The bacterial strains were classified based on the morphological features; cell shape, motility, formation of spores and Gram stain. Out of the 70 degrading isolates, 28 were DNA sequencing for 16S rRNA gene and their fragments were detected by PCR amplification. Comparing the sequences of the isolates with the related species in NCBI GenBank revealed that similarity percentages were ranged from 78% in isolate 16 that identified as

Carnobacterium maltaromaticum to 99% in other 5 isolates. Eight families comprised 16 different identified bacterial strains were uniquely identified and BLAST alignment of 16S rRNA revealed 17 new identified strains with similarity percentages less than 98%, which capable of degrading PE, PP and PEG. Isolated strains belonging to each of the 4 species; *Ochrobactrum intermedium*, *Stenotrophomonas Acidaminiphila*, *B. subtilis* and *Brevibacillus brevis* were characterized based on multi-alignment of 16S rRNA sequences. Isolates of each species revealed positional differences with base-pair substitutions either transversions interchanges of purine⇆pyrimidine nucleotides and/or transitions. The study recommends using the promising identified strains for large scale plastic biodegradation in Saudi Arabia to eliminate the plastic pollutions, especially from the areas around the petrochemical industrial cities and molecular searching for the gene regulatory mechanisms of bacterial degrading enzymes.