

عزل جراثيم العصيات اللبنية *Lactobacillus* من الزيتون المخلل ودراسة دورها في تفكيك ماء الجفت

د. محمد بشير عرنوس*

الملخص

تنتج صناعة زيت الزيتون كميات كبيرة من المخلفات السائلة المسماة بالجفت Olive Mill Wastewater (OMW)، والتي تعد من أخطر السوائل على البيئات المختلفة المائية واليابسة، لما تحمله من تراكيز كبيرة من المركبات العضوية والفينولية السامة. وللدخول من خطورتها أجريت الأبحاث لمعالجة هذه المركبات بطرائق مختلفة وأثبتت المعالجة الحيوية Biological Treatment فعاليتها في تفكيك هذه المركبات. تقوم الجراثيم وخاصة العصيات اللبنية بعملية التخمر، وتحلية طعم الزيتون المخلل بتحويل المركبات المختلفة ومنها الفينولات في ثمار الزيتون إلى حمض اللبن ومركبات عضوية أخرى. تم في هذا البحث تحضير الزيتون الأخضر المخلل، ودراسة التعداد الكلي للنمو الجرثومي خلال أربعة أشهر للزيتون المخلل، وتم عزل جراثيم العصيات اللبنية منه وحضنها بوسط خاص مع تراكيز مختلفة (1، 5، 10، 20 و 25%) من ماء الجفت لدراسة مقدرة الجراثيم في تفكيك المركبات الفينولية الكلية الموجودة في ماء الجفت. بينت النتائج احتواء كل من ماء الزيتون المخلل وماء الجفت على تراكيز عالية من المركبات الفينولية الكلية بمتوسط 4.83 ± 0.42 و 4.71 ± 0.29 mg/ml على الترتيب. بمقارنة تركيز المركبات الفينولية الكلية في بداية التجربة، وبعد شهر من حضن جراثيم العصيات اللبنية مع ماء الجفت وجد أن

* قسم علم الحياة النباتية . كلية العلوم . جامعة دمشق.

متوسط التركيز الذي بلغ القيمة 0.668 ± 0.18 mg/ml كان الأكبر في بداية التجربة، في حين انخفض بشكل كبير بعد شهر إذ سجل القيمة 0.426 ± 0.07 mg/ml، مما يدل على تفكك قسم من المركبات الفينولية الكلية بواسطة الجراثيم اللبنية المعزولة. سجلت الفعالية الأكبر للتفكك الحيوي بواسطة *Lactobacillus* عند تركيز 1% من ماء الجفت وهي بحدود 69% من الإجمالي، في حين سجلت الفعالية الأقل لتفكك المركبات الفينولية الكلية في التركيز 25% إذ لم تتجاوز 25% من إجمالي المركبات الفينولية الكلية. وجدت علاقة ارتباط خطية عكسية ذات دلالة إحصائية ($p < 0.05 = 0.036$) بين كل من النمو الجرثومي والتركيز الكلي للفينولات، مما يعني أنه كلما ارتفعت كثافة الجراثيم في أنابيب التجربة انخفضت تراكيز المركبات الفينولية الكلية فيها، مما يؤكد قدرة *Lactobacillus* المعزولة من ماء الزيتون المخلل على تفكك الفينولات الضارة الموجودة في ماء الجفت.

الكلمات المفتاحية: ماء الجفت - الزيتون المخلل - العصيات اللبنية - المركبات الفينولية الكلية - التفكك الحيوي

Isolation of *Lactobacillus* from Pickled Olives and studying its role in Biodegradation of Olive Mill Wastewater

Dr. Mohamad Bachir Arnous*

Abstract

The olive oil industry produces large quantities of liquid waste called Olive Mill Wastewater (OMW), which is considered one of the most dangerous liquids in different water and land environments due to its high concentrations of toxic organic and phenolic compounds. To reduce its risk, research was conducted to treat these compounds in different ways, and Biological Treatment proved its effectiveness in degrading these compounds. Bacteria, especially *Lactobacillus*, ferment and sweeten the pickled olives by converting various compounds, including phenols in olive fruits, into acetic acid and other organic compounds. In this research, green pickled olives were prepared and the total bacterial growth counting was studied during four months from pickled olives, as well as the *Lactobacillus* was isolated from it and incubated in a special growth medium with different concentrations (1, 5, 10, 20 and 25%) of OMW to study the removal ability of these bacteria on the total phenolic compounds present in OMW. The results showed that pickled olive water and OMW contain high concentrations of phenols with an average of 4.83 ± 0.42 and 0.29 ± 4.71 mg/ml, respectively. By comparing the concentration of total phenols at the beginning of the experiment and one month after incubation of *Lactobacillus* with OMW, it was found that the mean concentration was greater 0.668 ± 0.18 mg/ml at the beginning of the experiment, while it decreased significantly after one month 0.426 ± 0.07 mg/ml, which indicates that Phenols have been

* Department of Plant science - Faculty of Sciences-Damascus University.

partially removed by isolated *Lactobacillus*. The highest activity of *Lactobacillus* biodegradation was recorded at a concentration of 1% of OMW and it was 69% of the total, while the lowest efficacy was at the concentration of 25% of OMW and it did not exceed 25% of the total phenols. A statistically significant inverse linear correlation was found ($p < 0.05 = 0.036$) between both bacterial growth and the total phenolic compounds, which means that whenever the higher the of bacteria in the experimental tubes, the lower concentrations of total phenolic compounds in them, which confirms the ability of *Lactobacillus* bacteria isolated from pickled olive water to removing harmful phenols in OMW.

key words: Olive Mill Wastewater (OMW) - pickled olives – *Lactobacillus* - total phenolic compounds – biodegradation.

مقدمة Introduction:

تعد صناعة زيت الزيتون من الصناعات القديمة والمهمة من جهة التقاليد والثروة في بلدان حوض البحر المتوسط إذ تحتل إسبانيا المركز الأول في إنتاج الزيت، تليها إيطاليا فاليونان وتركيا وبعد ذلك سوريا وتونس (Roig *et al.*, 2006). وعلى الرغم من أهمية هذه الصناعة إلا أنها تلوث البيئة وبخاصة التربة والمياه بمخلفاتها السائلة والتي تدعى بالجفت Olive Mill Wastewater، إذ يتم إنتاج كميات كبيرة منها أثناء عملية عصر ثمار الزيتون حيث تنتج معاصر الضغط ماء الجفت بكمية (400 – 550) ل/طن من الزيتون، في حين تنتج معاصر الطرد المركزي كمية (850 – 1200) ل/طن من الزيتون (Benitez *et al.*, 1997). مع العلم أن عملية استخراج الزيت تعطي أيضاً المخلفات الصلبة والمسماة بالبيرين.

يتكون الجفت بشكل رئيس من الماء (83-96)% وأيضاً من (3,5-15)% مواد عضوية ومن (0,5-2) % أملاح معدنية. هذا ويتركب الجزء العضوي من السكريات (1-8)% ومن المركبات الأزوتية (0,5-2,5)% والأحماض العضوية (0,5-1,5)% والدهون (0,02-1)% وكذلك الفينولات (1-1,5)% (Greco *et al.*, 1999). هذا ويصل الحد الأقصى للطلب الحيوي للأكسجين (BOD)، وكذلك الطلب الكيميائي للأكسجين (COD) <170 و <110 g/l على الترتيب (Pokhrel and Viraraghavan, 2004). هذا وتمتاز المركبات الفينولية الكلية في ماء الجفت بأنها ذات وزن جزيئي منخفض (هيدروكسي تيروسول hydroxytyrosol، تيروسول tyrosol، كاتيكول catechol، حمض الكافيين caffeic acid) (Azbar *et al.*, 2004). إن احتواء ماء الجفت على المركبات الفينولية الكلية وعلى نسبة عالية من الزيت والطلب الكيميائي للأوكسجين (COD) المرتفع يجعله من مصادر التلوث الرئيسية عند صرف هذه المياه إلى شبكات الصرف أو التربة دون معالجتها. حيث يؤدي ذلك إلى تشكل قشور طينية ذات روائح كريهة على سطح التربة، مما يتسبب في القضاء على

الأحياء الدقيقة الأصيلة في التربة مؤدياً إلى انخفاض خصوبتها وصولاً إلى إحداث خلل في التوازن البيئي. كما أن وجود الأحماض العضوية والمركبات الفينولية يمكن لها أن تسمم النباتات والأشجار عند سقايتها بماء الجفت مباشرة. كما يعيق ارتفاع نسبة المركبات العضوية واللاعضوية والمركبات الفينولية الكلية فيها عملية التنقية الذاتية في مياه الأنهار والبحيرات إذا صرفت فيها، بالإضافة إلى أن التراكيز العالية من المركبات العضوية تعمل على خفض كمية الأوكسجين في الماء و من ثمّ التأثير في الحيوانات المائية على اختلافها. ويساعد التركيز العالي للفوسفور فيها على حدوث الازدهار الطحلي (Ait-hmane *et al.*, 2018).

دفعت المشكلات البيئية والمخاطر المحتملة التي يسببها ماء الجفت OMW نتيجة لمحتواه العالي من النفايات السائلة، العديد من البلدان إلى الحد من تصريفها إلى التربة والمياه والعمل على تطوير تقنيات جديدة في معالجتها كالمعالجات الكيميائية والبيولوجية المختلفة (كبيبو وعليا، 2011 : العبدو ومحمد، 2019) (Roig *et al.*, 2006; Niaounakis and Halvadakis, 2004; Chen *et al.*, 2009; Rodier, 2009; Jaouad *et al.*, 2015; An *et al.*, 2016; Ait-hmane *et al.*, 2018) ومن هذه الطرائق:

- رش رذاذ ماء الجفت إلى بعض أنواع الترب بكميات محددة.
- تجميع ماء الجفت في أحواض كبيرة المساحة وقليلة العمق، وتجفيفها بالأشعة الشمسية.
- الخلط مع مخلفات القمامة في أماكن الطمر الصحي للمخلفات البلدية.
- الهضم الهوائي aerobic digestion بإضافة الحمأة المنشطة والمعالجة في الموقع وصرف المياه الناتجة إلى المسيلات المائية.
- الهضم اللاهوائي anaerobic digestion.
- استخدام التقانات النانوية Nanotechnology.

نتيجة لاحتواء ماء الجفت على كميات كبيرة من المركبات الفينولية ذات الأثر السمي على الأحياء الدقيقة في الترب الزراعية، فقد هدف هذا البحث إلى دراسة إمكانية تخليص ماء الجفت من هذه المركبات الفينولية بطريقة التفكيك الحيوي Biodegradation باستخدام الجراثيم المعزولة من الزيتون المخل، وبخاصة جنس العصيات اللبنية *Lactobacillus* ذات الدور المهم في تحلية زيتون المائدة (المخل)، وذلك بتفكيك المركبات الفينولية الكلية الموجودة فيه. وبذلك يهدف البحث إلى:

- دراسة التعداد الكلي للجراثيم في الزيتون المخل.
- عزل الجراثيم من الزيتون المخل في مرحلة طور الثبات وتحديداتها.
- تحديد أهم خواص ماء الجفت وتركيز المركبات الفينولية الكلية Total phenols فيه.
- دراسة فعالية الجراثيم المعزولة في التفكيك الحيوي للمركبات الفينولية الكلية في ماء الجفت.

المواد والطرائق: Materials and methods

الزيتون المخل: حُضْر وفق الآتي:

- 1- جُمعت عينات الزيتون من الصنف الإسطنبولي الأخضر من منطقة عرطوز بريف دمشق بثمار سليمة متجانسة الحجم والشكل، غسلت الثمار جيداً للتخلص من بقايا الغبار والأتربة العالقة، وتم تكسير الجزء اللحمي منها بواسطة مطرقة نظيفة (تفقيش) وضعت في ثلاث أواني زجاجية متماثلة نظيفة.
- 2- حُضْر محلول ملح الطعام NaCl بنسبة (10% w/w) وأضيف للأواني الحاوية على الثمار، وأغلقت بإحكام ووضعت في درجة حرارة الغرفة في الظلام (Hurtado et al., 2011).

ماء الجفت: جمعت عينات ماء الجفت من معصرة عرطوز الآلية (نوع: طرد مركزي) وتم قياس مجموعة من العوامل الخاصة به مباشرة وحفظ في الظلام، وبدرجة حرارة البراد 4 م° لحين الاستخدام.

التعداد الكلي للجراثيم في الزيتون المخلل:

حضّر الوسط المغذي العام لنمو الجراثيم وهو الآغار المغذي Nutrient Agar، كما حضّرت مجموعة تخفيفات (10^{-4} - 10^{-9}) من ماء الزيتون لتنمية الجراثيم وزراعتها على أطباق بتري من أجل تعداد الجراثيم الكلي لرسم منحني النمو الجرثومي في سائل الزيتون المخلل، وأجري التعداد العام للجراثيم كل أسبوعين ولمدة أربعة أشهر. هذا وقد قيست درجة الحموضة لعبوات الزيتون قبل عزل الجراثيم مباشرة.

عزل جراثيم العصيات اللبنية *Lactobacillus*:

من المعلوم أن عملية التخليل تتم بما يسمى التعاقب البيئي Ecological succession لمجموعة من جماعات Populations الأحياء الدقيقة المختلفة (Hurtado *et al.*, 2008). في طور الثبات وبعد الحصول على المستعمرات الجرثومية على وسط الآغار المغذي من سائل الزيتون المخلل تمت عملية إعادة الزرع للجراثيم النامية على وسط MRS Agar (Man Rogosa Sharpe) الاصطفائي لجراثيم *Lactobacillus* (De Man *et al.*, 1960)، حيث حضنت الأطباق في ظروف لاهوائية مدة (48 - 72) ساعة عند درجة حرارة 37م°. كما أعيد زرعها ثلاث مرات على وسط MRS للحصول على عزلات نقية بوساطة عملية التخطيط، ولونت بطريقة غرام وأجري لها اختبار الكاتلاز (Maxton *et al.*, 2013).

حضن جراثيم العصيات اللبنية *Lactobacillus* المعزولة مع ماء الجفت:

حضّرت تراكيز مختلفة من ماء الجفت (1-5-10-20-25)%، لدراسة قدرة جراثيم العصيات اللبنية *Lactobacillus* المعزولة من ماء الزيتون المخلل من طور الثبات على تفكيك المركبات الفينولات الكلية الموجودة في ماء الجفت، وذلك بتتميتها في

أنابيب حاوية على وسط معدني مغذ سائل خاص خلال مدة شهر (الجدول 1). وأضيف ماء الجفت بما يحتويه من فينولات بعد تعقيمه كمصدر وحيد للكربون والطاقة (Tziotzios *et al.*, 2005). حضر معلق جرثومي من الجراثيم المعزولة وأضيف منه 1مل لكل تركيز من ماء الجفت، ومن ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م. يوضح الجدول (1) تركيب الوسط الخاص لتنمية جراثيم *Lactobacillus* على ماء الجفت في 1 ل.

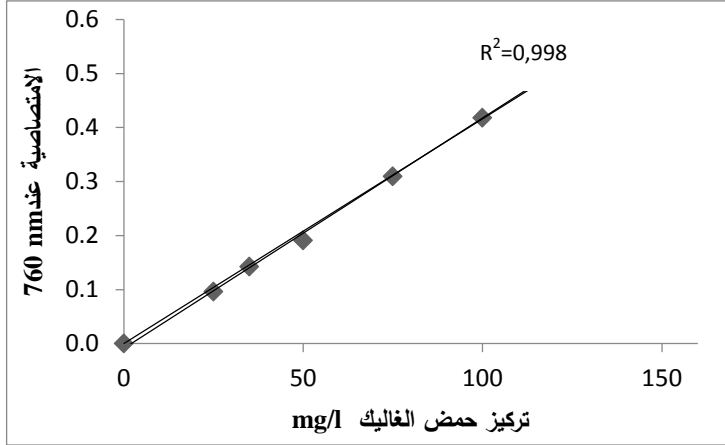
الجدول (1): تركيب الوسط الخاص لتنمية جراثيم *Lactobacillus* على ماء الجفت في 1 ل.

المادة	الكمية (غ/ل)
K ₂ HPO ₄	1
Na ₂ HPO ₄	0.64
NH ₄ Cl	1.4
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.2
KCl	0.2
خلاصة الخميرة	0.02

تقدير المركبات الفينولية الكلية في عينة ماء الجفت:

تستعمل طريقة فولين لتعيين المركبات الفينولية الكلية total phenols، وهي طريقة لونية تستعمل كاشف فولين-سيوكالتو folin-ciocalteu، حيث تُرجع الفينولات حمض فوسفو موليبدات التتغستين (الكاشف) في وسط قلوي فينتج عنه محلول أزرق اللون يقاس امتصاصه عند طول موجة 760 nm، حيث تحدث سلسلة من تفاعلات الإرجاع بانتقال إلكترون أو اثنين من الفينولات تؤدي إلى تشكيل معقدات زرقاء اللون (Singleton *et al.*, 1999).

أخذ 1 mL من ماء الزيتون، ثم أضيف 4.8 mL ماء منزوع الشوارد و 4 mL كربونات الصوديوم اللامائية (2% w/v) و 200 µL من كاشف فولين-سيوكالتو.



الشكل (1) السلسلة العيارية لحمض الغاليك

رُجّ المزيج جيداً وحُضِن في الظلام وبدرجة حرارة الغرفة مدة ساعة، ومن ثم قيست الامتصاصية عند طول الموجة 760 nm، وقورنت بشاهد يحتوي جميع المواد السابقة فيما عدا ماء الزيتون (Alhafez *et al.*, 2014). تم تحديد تركيز المركبات الفينولية الكلية في العينة بإسقاط قيمة الامتصاصية السابقة على السلسلة المعيارية الخطية لحمض الغاليك Gallic acid في الإيتانول 70% بعدة تراكيز (0-150) mg/L (الشكل 1).

تم حساب نسبة المركبات الفينولية الكلية لجميع تراكيز ماء الجفت في التجربة على مرحلتين، الأولى مباشرة بعد إضافة المعلق الجرثومي لتراكيز ماء الجفت المختلفة لتحديد نسبتها في بدء التجربة (الزمن صفر) والثانية في آخر التجربة (بعد شهر).

حساب الامتصاصية الجرثومية (النمو الجرثومي):

حُسِبَت الامتصاصية الجرثومية للجراثيم المعزولة من ماء الزيتون المخمل في كل التراكيز أثناء فترة الحضانة مع ماء الجفت على مرحلتين هما: في الأسبوع الأول، وكذلك في الأخير من التجربة عن طريق معلق مكفرلاند إذ حُضِرَت سلسلة من المعلق الجرثومي وذلك بأخذ 1 مل من المعلق الأم ومزجه مع 9 مل من المصل

الفيزيولوجي، وقيست نسبة العكارة للمعلق المحضر باستعمال جهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 600 nm وقورنت نتائج الامتصاص مع الجدول المرجعي (Cockerill *et al.*, 2012).

التحليل الإحصائي:

أُجريت كافة الاختبارات بثلاثة مكررات وسجلت النتائج كمتوسطات \pm الانحراف المعياري واختبرت معنوية الفروق بين المتوسطات باستعمال طريقة تحليل التباين One Way ANOVA اعتماداً على اختبار Tukey في إجراء المقارنات المتعددة مع مستوى دلالة $p < 0.05$ وذلك باستعمال البرنامج الإحصائي Minitab17.

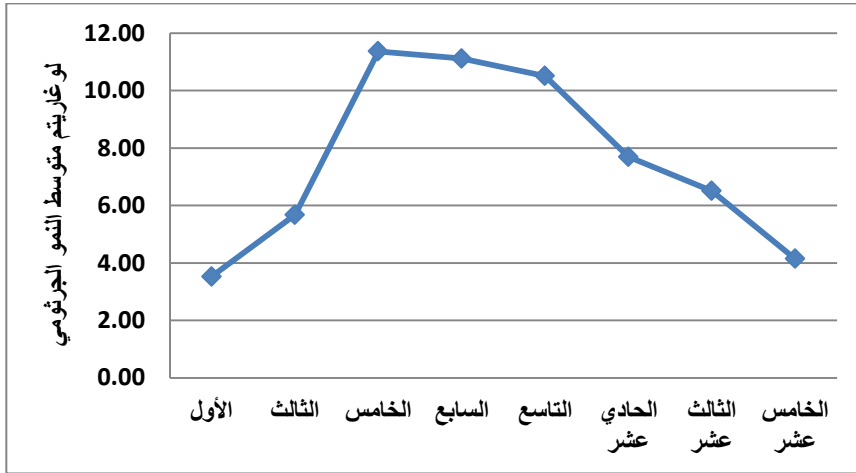
النتائج والمناقشة Results and discussion:

أولاً. دراسة منحنى النمو الجرثومي الإجمالي في الزيتون المخلل وتحديد الجراثيم المعزولة:

يبين الشكل (2) منحنى النمو الجرثومي الإجمالي في عبوات الزيتون المخلل خلال أربعة أشهر. يبدأ الأسبوع الأول بطور التأقلم Lag Phase ($10^3 \times 3,3 \pm 0,18$) خلية جرثومية/مل وما يلبث أن يزداد النمو الجرثومي بشكل متسارع (الطور اللوغاريتمي Logarithmic Phase) ليصل إلى التعداد الأعلى في الأسبوع الخامس Stationary ($10^{11} \times 2,29 \pm 0,25$) خلية جرثومية/مل ليبدأ بعدها طور الثبات Phase حتى نهاية الأسبوع التاسع (تم عزل الجراثيم لعمل تجربة التفكك الحيوي من هذا الطور)، ولينخفض التعداد الجرثومي تدريجياً حتى نهاية التجربة وهذا ما يمثل طور الانحدار Decline Phase. أثناء عملية العزل تم قياس درجة حموضة الوسط وتبين أنها $pH=5,1$.

نتيجة لزراع جراثيم ماء الزيتون المخلل في طور الثبات على وسط الأغار المغذي، ومن ثم على وسط MRS Agar الاصطناعي لجراثيم *Lactobacillus* تبين أن

الجراثيم التي تنمو في الزيتون المخلل المحلي في هذه المرحلة هي من جنس العصيات اللبنية *Lactobacillus*، حيث ظهرت المستعمرات بشكل محدب أملس تام الحواف بلون أبيض كريمي، وبالدراسة تحت المجهر الضوئي تم التأكد من أشكالها العصوية الرفيعة ذات اللون البنفسجي (موجبة لصبغة الغرام) وهي سلبية الكاتلاز وسلبية الأكسيداز (Bergey's manual, 1984).



الشكل (2) منحنى النمو الجراثيمي لتعداد جراثيم *Lactobacillus* في ماء الزيتون المخلل من الأسبوع الأول وحتى الأسبوع الخامس عشر

قام العديد من الباحثين بدراسة عملية تخليل الزيتون وأظهروا أنها معقدة بما فيه الكفاية من حيث تتابع المجتمعات الميكروبية فيها، والتي تختلف باختلاف الظروف البيئية للتخليل (نوع الزيتون، درجة الحرارة، الملوحة، الحموضة...) وقد أثبتوا أنها خليط معقد من الجراثيم موجبة وسالبة صبغة غرام وكذلك الخمائر، إذ إنها تؤدي جميعها دوراً مهماً في عملية التخليل (Hurtado et al., 2012). تنشط وتتكاثر الجراثيم سالبة صبغة غرام في الأيام الأولى من التخمير، إذ تعمل على خفض قيم الحموضة تدريجياً للوسط وتصل لعددتها الأعظمي ومع تقدم الزمن وبانخفاض

الحموضة والتي قد تصل إلى pH=4 بعد عدة أسابيع فإن جراثيم العصيات اللبنية LAB أو الخمائر yeasts هي التي تكون مسؤولة عن إكمال العملية وإعطاء الزيتون النكهة النهائية. لذلك تمت عملية العزل في طور الثبات لضمان أن الجراثيم المطلوبة هي العصيات اللبنية، وكونها نمت على وسط MRS وتأكدت بالاختبارات المختلفة المُجرّاة (Garrido-Fernández *et al.*, 1997; Sánchez-Gómez *et al.*, 2006; Hurtado *et al.*, 2008). وعلى الرغم من التنوع الكبير لأنواع جراثيم العصيات اللبنية فإن الأنواع المعزولة من الزيتون المخلل تتبع غالباً لكل من *L. plantarum* و *L. pentosus* (Hurtado *et al.*, 2012). كما أن التعداد الجرثومي الناتج يماثل ما ذكره Sánchez-Gómez وزملاؤه (2006) حيث إن بعد تكسير الثمار ويتأثير التركيز العالي من الملح في الوسط فإن العصارات الخلوية تخرج من الثمار وتشكل وسطاً ملائماً لنمو الجراثيم، كما ويعمل التركيز المرتفع من ملح كلوريد الصوديوم على تهيئة وسط نمو مناسب للعصيات اللبنية وقتل معظم الجراثيم التي تسبب تخرب الثمار، ومن ثم يسهم بشكل كبير في حفظها.

ثانياً. تحديد أهم خواص ماء الجفت وتركيز المركبات الفينولية الكلية Total phenols فيه:

يبين الجدول (2) كلاً من درجة pH ماء الجفت والتي تميل إلى الحموضة والتي سجلت pH=4,7، وكذلك الطلب الحيوي للأكسجين والطلب الكيميائي للأكسجين وتركيز المركبات الفينولية الكلية المنحلة في ماء الجفت.

تم حساب تركيز المركبات الفينولية الكلية Total phenols في كل من:

- 1- ماء الزيتون المخلل في بداية التجربة حيث حوى هذا الماء على تراكيز عالية من المركبات الفينولية الكلية بمتوسط قدره $(4,83 \pm 0,42)$ mg/ml.
- 2- ماء الجفت الخام وكان تركيز المركبات الفينولية الكلية فيه أقل بقليل من تركيزها في ماء الزيتون المخلل فبلغ متوسط المركبات الفينولية الكلية $(4,71 \pm 0,29)$ mg/ml.

الجدول (2): أهم الخصائص الكيميائية المسجلة لماء الجفت

4.7	pH
1/02 g (23.12±9,42)	BOD
1/g (28.67±12,84)	COD
mg/ml(4.71±0,29)	الفينولات الكلية

هذا وقد كانت قيم خصائص ماء الجفت قريبة من تلك المسجلة في عدد من الدراسات وبخاصة ما سجله Tziotzios وزملاؤه (2007) لقيم الخصائص الفيزيائية والكيميائية لماء الجفت من نوعين لمعاصر الزيتون في اليونان، وكذلك ما توصل إليه Arous وزملاؤه (2018) في تونس وغيرها، مما يثبت أن تركيب ماء الجفت الخارج من معاصر الزيتون متقارب جداً في منطقة حوض البحر المتوسط. في حين انخفض تركيز المركبات الفينولية الكلية في هذه الدراسة عن تلك المسجلة من قبل Tziotzios وزملاؤه (2007) والتي قدرت بـ (6.71) mg/ml، وربما يعود ذلك لتأثير التأخر في القطف والبدء بعملية عصر الزيتون في سورية عموماً والتي يمكن أن تصل لأكثر من شهر، وفي هذه الفترة يمكن أن تتفكك المركبات الفينولية الكلية ذاتياً مع مرور الزمن (Hurtado *et al.*, 2012).

ثالثاً: نتائج دراسة فعالية الجراثيم المعزولة في التفكيك الحيوي للمركبات الفينولية الكلية في ماء الجفت:

سُجّلت تراكيز المركبات الفينولية الكلية في بداية التجربة وبعد شهر من حضن جراثيم العصيات اللبنية مع النسب المختلفة من الجفت (1-5-10-20-25) %، كما هو موضح في الجدول (3) إذ بينت النتائج أن متوسط تركيز المركبات الفينولية الكلية هو الأكبر (0.668±0.18) mg/ml لكل تراكيز ماء الجفت في بداية التجربة (t=0) في حين انخفض هذا المتوسط بشكل واضح بعد شهر من التجربة (0.426±0.07) mg/ml، مما يدل على أنه قد تم تفكيك قسم من المركبات الفينولية الكلية بواسطة الجراثيم اللبنية، وهذا ما أكدته العديد من الدراسات بأن الجراثيم

والفطريات وبخاصة الخمائر قادرة على تفكيك المركبات الفينولية الكلية بماء الجفت (Garcia-Garcia *et al.*, 2000; Fadil *et al.*, 2003; Tziotzios *et al.*, 2007). تقوم جراثيم العصيات اللبنية بتحويل الكربون العضوي ضمن الفينولات إلى CO₂ وحمض اللين وحموض عضوية أخرى دون الحاجة للأكسجين في الوسط (Hurtado *et al.*, 2012). هذا ويزداد تركيز المركبات الفينولية الكلية مع ازدياد تركيز ماء الجفت في التجربة من 1% وحتى التركيز 25%.

الجدول (3): مقارنة متوسط تركيز المركبات الفينولية الكلية مقدراً بـ mg/ml وفقاً لتراكيز

الجفت المختلفة مع الشاهد في كل تجربة بعد شهر من بدء التجربة

النسبة المئوية % لتفكيك المركبات الفينولية الكلية	متوسط تركيز المركبات الفينولية الكلية مقدراً بـ mg/ml بعد شهر من التجربة	متوسط تركيز المركبات الفينولية الكلية مقدراً بـ mg/ml في بداية التجربة (t=0)	تركيز الجفت بالعينة
69.1	0.128±0.067	0.414±0.11	1%
62.25	0.231±0.085	0.612±0.27	5%
60.45	0.265±0.11	0.67±0.23	10%
49.47	0.382±0.10	0.756±0.19	20%
25.06	0.667±0.35	0.89±0.47	25%

سُجلت الفعالية الأكبر للتفكك الحيوي بوساطة *Lactobacillus* عند تركيز 1% من الجفت، حيث كان تركيز المركبات الفينولية الكلية هو الأقل وبلغت النسبة المئوية للتفكيك بحدود 69% من الإجمالي، واقتربت فعالية التفكيك من هذه القيمة في تركيزي ماء الجفت (5 و 10%) بنسبة (62 و 60%) من إجمالي المركبات الفينولية الكلية على الترتيب في حين سجلت الفعالية الأقل للتفكيك في التركيز 25% إذ لم تتجاوز 25% من إجمالي المركبات الفينولية الكلية. وهذا يتفق مع ما وُجد من قبل العبدو ومحمد (2019) حيث قاما بمعالجة تراكيز مختلفة من ماء الجفت مع أربع عزلات جرثومية مأخوذة من التربة وماء الجفت، وتبين أن التفكيك كان أعظمياً بالتركيز المنخفضة (50-400) ppm وبنسبة تفكيك للفينول 100%، في حين وجدا أن التراكيز العالية للفينولات (1000) ppm كانت ذات تأثير تثبيطي لنمو الجراثيم

ومن ثمَّ عدم القدرة على التفكيك. كما أثبت كيبو وعليا (2011) أن السلالات الجرثومية اللاهوائية المأخوذة أيضاً من التربة وماء الجفت كانت لها القدرة على تفكيك المركبات الفينولية المضافة لوسط النمو بنسبة تتراوح بين 60-93%. هذا وقد أثبت Ghabbour وزملاؤه (2011) أن التراكيز العالية من المركبات الفينولية الكلية في ماء الزيتون من شأنه أن يثبط نمو جراثيم العصيات اللبنية، مما يعني أن التراكيز المنخفضة للمركبات الفينولية الكلية كانت مصدراً كربونياً مناسباً لجراثيم *Lactobacillus* ومن ثمَّ قامت بالتفكيك بدرجة كبيرة، ومع ارتفاع هذه النسبة حتى 25% حدث انخفاض في تفكيك المركبات الفينولية الكلية حيث قامت هذه الأخيرة بتنشيط عمل الجراثيم.

رابعاً: الامتصاصية لجراثيم العصيات اللبنية *Lactobacillus*:

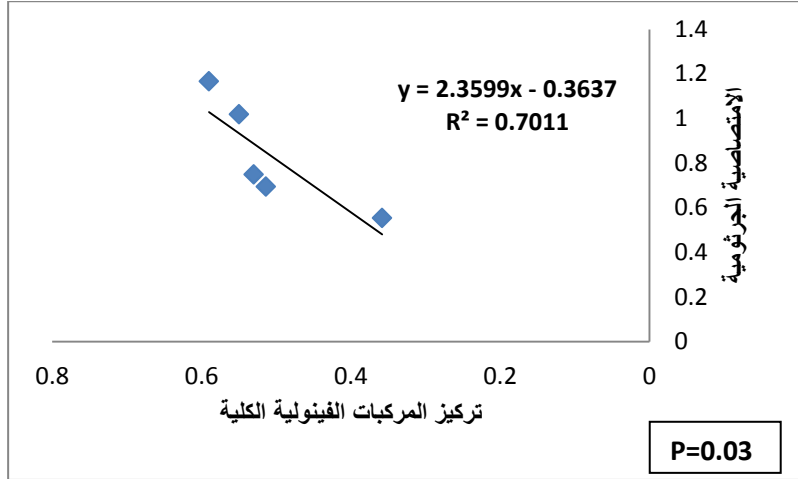
تم حساب الامتصاصية الجرثومية (التي تحدد مقدار نمو الجراثيم في العينة) في 1م في كل التراكيز أثناء فترة الحضانة على مرحلتين: في الأسبوع الأول ، والخامس عشر من التجربة، ويوضح الجدول (4) مقدار النمو الجرثومي في هاتين المرحلتين من التجربة. لوحظ تزايد تدريجي طردي للنمو الجرثومي في الأسبوع الأول مع تزايد تركيز الجفت مقارنة بالشاهد من 0.289 ± 0.01 إلى 0.365 ± 0.05 في التركيزات 1% و 25% على الترتيب. وهذا يدل على أن جراثيم العصيات اللبنية تستعمل ماء الجفت كمصدر كربون مناسب في بداية تكاثرها ونموها، ويأتي هذا التفكيك في مرحلة لاحقة من النمو الجرثومي لماء الزيتون وبخاصة في طور النبات بعد أن يحدث الاستقرار في تتابع المجتمع الميكروبي على جراثيم العصيات اللابنية (Hurtado *et al.*, 2008). بالمقارنة مع الشاهد لوحظ ازدياد كبير للنمو الجرثومي في الأسبوع الأخير والذي ترافق مع تناقص نسبة المركبات الفينولية الكلية لماء الجفت للتراكيز المختلفة الموجودة في أنابيب التجربة (الجدول 4) (Hurtado *et al.*, 2007; Tziotzios *et al.*, 2012).

الجدول (4): قيم الامتصاصية الجرثومية (مقدار النمو الجرثومي مقدراً بالوحدة المشكلة للمستعمرة في 1 مل = $10^9 \times \text{CFU/ml}$) في أنابيب التجربة الحاوية على تراكيز مختلفة من ماء الجفت في الأسبوعين الأول والخامس عشر من التجربة.

الأسبوع الخامس عشر		الأسبوع الأول		
الشاهد	الامتصاصية الجرثومية ($10^9 \text{CFU/ml} \times =$)	الشاهد	الامتصاصية الجرثومية ($10^9 \text{CFU/ml} \times =$)	تركيز ماء الجفت
0.060	0.5535±0,21	0.272	0.289±0,01	% 1
0.474	0.694±0, 35	0.096	0.328±0, 11	% 5
0.738	0.748±0,06	0.165	0.360±0,06	% 10
0.312	1.018±0,34	0.247	0.3635±0,05	% 20
0.437	1.023±0,14	0.276	0.4475±0,08	% 25

يبين الشكل (3) علاقة الارتباط الخطية العكسية ذات الدلالة الإحصائية ($p < 0.05 = 0.036$) بين كل من النمو الجرثومي والتركيز الكلي للمركبات الفينولية الكلية في أنابيب التجربة، حيث إنه كلما ارتفعت كثافة الجراثيم في أنابيب التجربة انخفضت تراكيز المركبات الفينولية الكلية فيها مما يؤكد قدرة جراثيم *Lactobacillus* المعزولة من ماء الزيتون المخلل على تفكيك المركبات الفينولية الكلية الصارة الموجودة في ماء الجفت الناجم عن معاصر الزيتون. إن هذا العمل تم ضمن أنابيب اختبار في الشروط البيئية الثابتة غير المتجددة مع عزلة واحدة من جراثيم العصيات اللبنية، في حين قام عدد من الباحثين بدراسات قريبة على جراثيم معزولة من التربة وماء الجفت وعمل مزارع مختلطة من أربع عزلات جرثومية (العبدو ومحمد، 2019) وكانت نسبة التفكيك كبيرة في التراكيز $> 1000 \text{ ppm}$ في حين كانت هذه المزارع غير قادرة على التفكيك في تراكيز أعلى من ذلك. وكذلك تم عزل جراثيم من حمأة ماء الجفت وضمن مفاعلات حيوية وبشروط متجددة، ووُجد أن نسبة التفكيك وصلت إلى 100% خلال 30 يوماً من بدء التجربة، وكذلك بتثبيت درجة حرارة المفاعل الحيوي 28 م° وصلت النسبة إلى (55 و 70)% خلال 5 و 3 أيام على الترتيب

(Tziotzios *et al.*, 2007; Ait-hmane *et al.*, 2018). إن هذه النتائج التي تم الحصول عليها يمكن تطويرها بتقانات حيوية وبخاصة أن الدراسة تمت على ماء الجفت الخام والحاوي على العديد من المركبات العضوية غير المركبات الفينولية مما يحتم صعوبة التفكيك (Goncalves *et al.*, 2009)، ومن ثمّ يمكن اعتمادها كطريقة مفضلة من الطرائق المستقبلية للتخلص من سمية ماء الجفت.



الشكل (3) العلاقة الخطية بين التركيز الكلي للمركبات الفينولية الكلية والنمو الجراثيمي في أنابيب التجربة في الأسبوع الخامس عشر

الاستنتاجات:

1. عزل جراثيم العصيات اللبنية *Lactobacillus* من الزيتون المخلل.
2. احتواء كل من ماء الزيتون المخلل وماء الجفت على تراكيز عالية من المركبات الفينولية الكلية بمتوسط 4.83 ± 0.42 و 4.71 ± 0.29 mg/ml على الترتيب.
3. تفكك قسم من المركبات الفينولية الكلية في ماء الجفت بواسطة الجراثيم اللبنية المعزولة.
4. سجلت الفعالية الأكبر للتفكك الحيوي بواسطة *Lactobacillus* عند تركيز 1% من ماء الجفت وهي بحدود 69% من الإجمالي.

5. سجلت الفعالية الأقل لتفكيك المركبات الفينولية الكلية عند التركيز 25% إذ لم تتجاوز 25% من إجمالي المركبات الفينولية الكلية.
6. وجود علاقة ارتباط خطية عكسية ذات دلالة إحصائية ($p < 0.05 = 0.036$) بين كل من النمو الجرثومي والتركيز الكلي للفينولات، مما يعني قدرة *Lactobacillus* المعزولة من ماء الزيتون المخال على تفكيك الفينولات الضارة الموجودة في ماء الجفت.

المراجع: References:

1. العبدو، قصي، محمد، سيراؤوس. 2019. التفكيك الحيوي للفينول باستعمال سلالات جرثومية محلية. مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية.
2. كبيبو، عيسى، عليا، تميم. 2011. دراسة أولية لمعالجة المخلفات السائلة لمعاصر الزيتون (ماء الجفت) باستخدام بعض الأحياء الدقيقة. مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية-العلوم البيولوجية. 33. 2.
3. Ait-hmane, A., Ouazzani, N., Latrach L., Hejjaj A., Assabbane A., Belkoudssi M. and Mandi J. 2018. Feasibility of Olive Mill Wastewater treatment by Multi-Soil-Layering Ecotechnology. Journal of Materials and Environmental Sciences. 9, 4: 1223-1233.
4. AlHafez M., Kheder F. and AlJoubbeh M., 2014. Polyphenols, flavonoids and (-)-epigallocatechin gallate in tea leaves and in their infusions under various conditions. Nutrition and Food Science. 44:455–463.
5. Arous F., Hamdi Ch., Kmiha S. and Jaouani A., 2018. Treatment of olive mill wastewater through employing sequencing batch reactor: performance and microbial diversity assessment. Biotechnology. 8(11): 481.
6. Azbar, N., Bayram A., Filibeli A., Muezzinoglu A., Sengul F. and Ozer, A., 2004. A review of wastes management options in olive oil production. Critical Reviews on Environmental Science and Technology 34, 209–247.
7. Benitez J., Beltran-Heredia J., Torregrosa J., Acero J.L. and Cercas V., 1997. Aerobic degradation of olive mill wastewaters. Applied Microbiology and Biotechnology 47, 185–188.
8. Bergey's manual of systematic bacteriology". APA (6th ed.) Bergey, D. H., Krieg, N. R., and Holt, J. G. (1984).
9. Chen X., Luo C., Sato K., Wakatsuki T., Masunaga T., 2009. Clarification of water movement properties in a multi-soil-layering system. Water & Environ. 23 - 255

10. Cockerill III, Franklin R. *et al.* (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI. p. 12.
11. Goncalves C.; Lopes M.; Ferreira J. P. and Belo I., 2009. Biological Treatment of Olive Mill Wastewater by Non-conventional Yeasts. *Bioresource Technology* . 100, 3759–3763.
12. De Man J.D., Rogosa M. and Sharpe M.E., 1960. A Medium for the Cultivation of Lactobacilli;. *Journal of Applied Bacteriology*. 23 ,130–135.
13. Fadil K., Chahlaoui A., Ouahbi, A., Zaid A. and Borja R., 2003. Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *International Biodeterioration & Biodegradation* 51, 37–41.
14. Garcia Garcia I., Pena Jimenez, P.R., Venceslada Bonilla J.L., Martin Martin A., Santos Martin M.A. and Gomez Ramos E., 2000. Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry* 35, 751–758.
15. Garrido-Fernández A., Fernández Díez M.J. and Adams M.R., 1997. *Table Olives, Production and Processing*. Chapman and Hall, London.
16. Greco Jr., G., Toscano G., Cioffi M., Gianfreda L. and Sannino F., 1999. Dephenolisation of olive mill waste-waters by olive husk. *Water Research* 33, 3046–3050.
17. Hurtado A., Reguant C., Bordons A. and Rozès N., 2011. Expression of *Lactobacillus pentosus* B96 bacteriocin genes under saline stress. *Food Microbiology* 28, 1339-1344.
18. Hurtado A., Reguant, C., Bordons A. and Rozès N., 2012. Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology* 31. 1-8
19. Hurtado A., Reguant C., Esteve-Zarzoso B., Bordons A. and Rozès N., 2008. Microbial population dynamics during the processing of Arbequina table olives. *Food Research International* 41, 738-744.
20. Jaouad Y., Villain M., Ouazzani N., Marrot L., Desalin B., 2015. Biodegradation of olive mill wastewater in a membrane

- bioreactor:acclimation of the biomass and constraints. Water. Treat. 57 8109–8118.
21. Maxton A., Benjamin J.C., Ram G.D., Bailey S.B. and Ramteke P.W., 2013. Antibacterial activity of isolated human intestinal microbiota *Lactobacillus* strains against methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus*. 7. 18: 1802-1808.
 22. Niaounakis M. and Halvadakis C.P., 2004. Olive-Mill Waste Management: Literature Review and Patent Survey. Typothito-George Dardanos Publications, Athens.
 23. Pokhrel D. and T. Viraraghavan., 2004. Treatment of pulp and paper mill wastewater—a review. Science of the total environment, 333(1): 37-58.
 24. Rodier J., 2009. L'analyse de l'eau. 9ème edition. DUNOD, Paris, France. p.1579.
 25. Roig A., Cayuela, M.L. and Sa´nchez-Monedero, M.A., 2006. An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. Waste Management 26, 960–969.
 26. Sánchez-Gómez, A.H., García P., Rejano L., 2006. Trends in table olives production, elaboration of table olives. Grasas y Aceites 57, 86-94.
 27. Singleton, V.L., Orthofer R. and Lamuela-Raventos R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in enzymology, (299C): p. 152-178.
 28. Tziotziou G., Michailakis S., Vayenas D.V., 2007. Aerobic biological treatment of olive mill wastewater by olive pulp bacteria, International Biodeterioration and Biodegradation ;60:209–214.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2020/05/31.
تاريخ قبوله للنشر 2020/09/02 .

