خفض تركيز المركبات الفينولية في المخلفات السائلة لمعاصر الزيتون باستزراع الجراثيم البحرية *Bacillus cereus* و *Staphylococcus xylosus*

ميس زوان* [1] و أحمد قره علي[2]

(1). قسم البيولوجيا البحرية– اختصاص الزراعة البحرية وإدارة الموارد الحية– المعهد العالي للبحوث البحرية– جامعة تشرين– اللاذقية – سوريا

(2). قسم الكيمياء البحرية– المعهد العالي للبحوث البحرية– جامعة تشرين – اللاذقية – سوريا

(*للمراسلة الباحثة: ميس زوان، البريد الإلكتروني: maiszwan22@gmail.com)

تاريخ الاستلام: 29/ 3/ 2024 تاريخ القبول: 25/ 5/ 2024

الملخص

ينتج عن عملية استخراج زيت الزيتون مخلفات سائلة سامة تعرف بسوريا بـ مياه الجفت أو (OMW: Olive Mill Wastewater) والتي تسبب مشكلة بيئية خطيرة عند التخلص منها مباشرة دون معالجة بسبب محتواها العالي من المواد العضوية والفينولية. تهدف الدراسة الحالية إلى تخفيض تركيز المركبات الفينولية في مياه الجفت، وذلك باستزراع السلالتين البكتيريتين *Bacillus cereus* و *Staphylococcus xylosus* المعزولتين من الرسوبيات البحرية والمياه المسامية (المياه الموجودة بين حبيبات الرسوبيات البحرية) على التوالي –من المنطقة الشاطئية لمدينة اللاذقية– في أوساط تحوي مياه جفت بتخفيفات مختلفة (25، 50، 100)% عند الدرجة 30°C لمدة 30يوم. بعد انقضاء مدة الحضن، تم تقطير الأوساط عند الدرجة 157°C وحللت المستخلصات باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) عند طول موجة الامتصاص الأعظمي 275 نانومتر. لوحظ عند استخدام بكتريا *B. cereus*، حدوث انخفاض في تراكيز كل من 2,6 dimethyl phenol، salicylic acid، وP-cresol عند كل تخفيفات OMW، كما لوحظ ازدياد تركيز كل ferulic acid وQuersteen، واختفاء كل من chlorogenic acid، coumaric acid و Vanillin مع وجودها في مستخلصات الشاهد عند كل تخفيفاتOMW. عند استخدام بكتريا *S. xylosus* كان هناك انخفاض واضح لجميع المركبات الفينولية التي تمت دراستها، مع غياب لـ chlorogenic acid وCoumaric acid في خلاصات عينات التخمر بالمقارنة مع وجودهما في خلاصات الشاهد. إن المعالجة الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة منخفضة التكلفة ولها فعالية جيدة في القضاء على مشكلة التلوث البيئي الناجم عن المركبات الفينولية في مياه الجفت مع وجود فعالية واضحة لبكتيريا *S. xylosus* مقارنة ببكتيريا *B. cereus*.

الكلمات المفتاحية: المخلفات السائلة لمعاصر الزيتون, جراثيم بحرية، *Bacillus cereus*، *Staphylococcus xylosus*، المركبات الفينولية، الكروموتوغرافيا السائلة عالية الأداء.

المقدمة:

تعد أشجار الزيتون مصدراً طبيعياً لكثير من المنتجات في سوريا وخياراً زراعياً استراتيجياً في جزء كبير من أراضيها الجافة وشبه الجافة، خاصة أن سوريا بلد زراعي، ويبقى إنتاج زيت الزيتون السمة المميزة لنسيجها الاقتصادي والاجتماعي (IOC, 2012). وبحسب بيانات المجلس الدولي للزيتون، أنتجت سوريا 134 ألف طن من زيت الزيتون خلال موسم 2023/2022 (IOC, 2022). تعد المياه السوداء الناتجة عن معاصر الزيتون أو ما تعرف في سورية بـ مياه الجفت (OMW) (ناصر, 2008؛ صالح, 2008) من أكثر النفايات السائلة التي تنتجها صناعات الزيتون تلوثاً للبيئة (Niaounakis and Halvadakis, 2006)، ويعتبر التحكم في التخلص من هذه المياه له أهمية بالغة لما تسببه من خطورة كبيرة على البيئة، خاصةً في منطقة البحر الأبيض المتوسط التي تمثل أكبر منتج للزيت الزيتون (Isidori *et al.*, 2005). إن التخلص المباشر من مياه الجفت له آثار سلبية على البيئة (تربة، هواء وماء) (Dali *et al.*, 2023) والذي يتجلى في زيادة حموضة التربة وتغيير بعض خصائص المياه السطحية والجوفية وإطلاق روائح كريهة (El Hajoji *et al.*, 2008).

إن التراكيز المرتفعة من المركبات العضوية السامة في مياه الجفت (خاصة المركبات الفينولية 0.1 – 18 غ/ل) السمة الرئيسية والمحددة لخصائص هذه المخلفات السائلة (Davies *et al.*, 2004)، حيث أنها المسؤولة عن اللون الأسود لمياه الجفت و لها دور فعال في التأثيرات السامة للنباتات والفعالية المضادة للبكتيريا لـ OMW (Perez *et al.*, 1986; Paredes *et al.*, 1986; Rodriguez *et al.*, 1988; Perez *et al.*, 1992).

يوجد 53% من محتوى المركبات الفينولية لثمار الزيتون في OMW، و45% في كعكة الزيتون بينما 2% فقط من الفينولات في زيت الزيتون (Rodis *et al.*, 2002)، وتتراوح قيمة pH من 3–6 (Azzam *et al.*, 2015)، بالإضافة إلى احتوائها على تراكيز عالية من السكريات المخفضة وتراكيز مرتفعة من المواد العضوية والتي تعكسها القيم العالية لـ COD التي قد تتجاوز 220غ/ل (Mantzavinos and Kalogerakis 2005; Azzam and Hazaimeh, 2020). نظرًا لخصائصها، تعد مياه الجفت ذات سمية كبيرة للكائنات الحية ويجب معالجتها قبل تصريفها (Boutafda *et al.*, 2020).

تمت دراسة العديد من طرائق المعالجة وتطبيقها على نطاق واسع لتقليل الخواص السامة للمياه (التركيز الفينولي و COD)، بما في ذلك المعالجة الفيزيائية والكيميائية و منها : (النقع والإستخلاص سائل – سائل) (Gueboudji *et al.*, 2022, Abu Shahkouhmahalia and Mohamadzadehb,) (Shmeis *et al.*, 2024، الترشيح بالطرد المركزي والترشيح الفائق 2023)، الامتزاز (Abu-Dalo *et al.*, 2023) التبخر، التخثر، الأكسدة، الطرائق الحرارية وغيرها (Azzam and Hazaimeh, 2020).

تم اتباع طريقة المعالجة الحيوية لـ OMW وذلك لتقليل المركبات العضوية والفينولية واللون الداكن والسمية والتخلص بشكل أساسي من بعض المركبات الفينولية السامة من OMW، وذلك عن طريق استخدام الكائنات الحية الدقيقة المختلفة مثل البكتيريا على سبيل المثال *Bacillus pumilus*، *Bacillus subtilis*، *Paseudomenas putida* و *Ralstonia sp* (Ramos-Cormenzana *et al.*, 1996; Di Gioia *et al.*, 2001; McNamara *et al.*, 2008; Afify *et al.*, 2009; Anastasiou *et al.*, 2011; Boutafda *et al.*, 2020). تمكن Ramos-Cormenzana وآخرون (1996) من تقليل المحتوى الفينولي في مياه الجفت إلى 50% باستخدام بكتيريا *B. pumilis*. وقام El-Khateeb وآخرون (2014) أيضًا بعزل سلالتين من البكتيريا *Bacillus sp* و *Rhodococcus sp.* القادرة على تحطيم الفينولات الموجودة في مياه الجفت. تهدف هذه الدراسة إلى تقليل المواد العضوية السامة (المركبات الفينولية) بعد المعالجة الحيوية لمياه الجفت وذلك باستزراع البكتيريا البحرية

Bacillus cereus و *Staphylococcus xylosus* المعزولتين من الرواسب البحرية ومياه مسام الرواسب البحرية على التوالي، وذلك بعد التأكد من فعالية هاتين السلالتين في إنتاج الكحولات (الميتانول, الإيتانول, الإيزوبروبانول, البوتانول و الهكسانول) من مياه الجفت (OMW) وفقاً لـ (Zwan, 2016).

مواد البحث وطرائقه:

1- المواد الكيميائية والأجهزة المستخدمة:

تم استخدام المحاليل القياسية للمركبات الفينولية عالية النقاوة: chlorogenic acid ، coumaric acid، وVanillin، 2,6 dimethyl phenol ، P-cresol ، ferulic acid، salicylic acid، و Quersteen جميعها من شركة (Sigma-Aldrich, USA, 99%). غيلسرين، أسيتونتريل من (Merck ,Germany, 99%) . بيبتون، مستخلص اللحم، كلوريد الصوديوم جميعها من شركة (SIFIN, Germany).

تم تحليل الخلاصات على جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء High Performance Liquid chromatography (HPLC) (إنتاج شركة Shimadzu اليابانية) –في المعهد العالي لبحوث البيئة– المزود بمضخة ثنائية الطور (LC-20AT)، حاقن آلي (SIL-M20A)، كاشف UV-VIS مع نظام Diod Array Detector (SPD-M20A) ووحدة معالجة (CBM-20A)، عمود التحليل C18(250,4mm) انتاج شركة Teknokroma.

2- جمع العينات:

تم إحضار OMW باستخدام عبوات زجاجية عاتمة معقمة لتجنب الأكسدة الضوئية من معصرة زيتون حديثة طرد مركزي ثلاثي الأطوار من ريف اللاذقية – سوريا خلال موسم 2022-2023. تم تخزين العينة عند درجة حرارة 4^oC لاستخدامها لاحقاً في التجارب. استخدمت البكتيريا موجبة الغرام *Bacillus cereus*، *Staphylococcus xylosus* والمعزولة سابقاً في مخابر المعهد العالي للبحوث البحرية من المنطقة الشاطئية لمدينة اللاذقية عند مصب ساقية موسى في البحر بعمق 30cm.

3- إزالة المركبات الفينولية من مياه الجفت:

تم تعقيم مياه الجفت بالأتوكلاف عند درجة حرارة 121^oC لمدة 15 دقيقة. ثم حُضر المرق المغذي اللازم لتنشيط البكتريا ولتخفيف مياه الجفت في أوساط التخمر كما يلي: 5 غ ببتون، 5 غ مستخلص اللحم، 5 غ كلوريد الصوديوم، 1000مل ماء مقطر، pH=7.2 ثم التعقيم بالأوتوكلاف.

حُضرت أوساط تخمر تحوي تخفيفات مختلفة من مياه الجفت المعقمة بشكل مشابه للطريقة التي أجريت أثناء إجراء تجارب إنتاج الكحولات بالمعالجة الحيوية لـ OMW باستخدام البكتيريا ذاتها وفقًا لـ (Zwan, 2016).

الطريقة: تم أخذ 9 أوعية زجاجية (سعة 100 مل) مقسمة إلى ثلاث مجموعات، كل مجموعة تتكون من 3 عبوات، تحوي العبوة الأولى على 90 مل (OMW معقمة%: مرق مغذي75%) والثانية 90 مل (OMW معقمة 50%: مرق مغذي 50%) والثالثة 90 مل (OMW معقمة 100%) وبشكل مماثل بالنسبة لعبوات المجموعة الثانية والثالثة، تم تعديل قيم الـ pH في جميع عبوات المجموعات الثلاث عند القيمة 7.2. تم اعتماد نسب تخفيفات مياه الجفت هذه (25، 50، 100)% وفقاً لـ (Massadeh and Modallal, 2007; Bacha *et al.*, 2023). ثم أضيف 10مل من مزرعة *B. cereus* إلى عبوات المجموعة الأولى في مرحلة نموها الأسي في المرق المغذي وبنسبة 10% إلى وسط التخمر.

بطريقة مماثلة تم إضافة مزرعة *S. xylosus* بنسبة 10% الى عبوات المجموعة الثانية. بينما تركت عبوات المجموعة الثالثة كشاهد عند كل تخفيف من مياه الجفت دون إضافة أي بكتيريا. تم إغلاق عبوات المجموعات الثلاث بإحكام بعد ملئها بالكامل، وحضنت عند درجة حرارة 37°C لمدة 30 يوماً من أجل إتمام عملية التخمر.

4- الاستخلاص والتقطير:

أخذ حجم (50 مل) من كل عينة تخمر في التجربة السابقة بعد انتهاء فترة الحضن (30 يوم) ليتم تقطيرها عند درجة حرارة 157°C، ثم تخزين المستخلصات في عبوات بلاستيكية معقمة ومحكمه الاغلاق عند الدرجة 4°C لتحليلها لاحقاً كما هو مبين في الشكل (1)، وفق دراسة (Zwan, 2016) .

5- التحليل باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC):

تم اعتماد الشروط التحليلية الآتية:

- الطور المتحرك: أسيتونتريل: ماء ثنائي التقطير منزوع الشوارد (v/v) (60:40)
- طول الموجة: 275 nm
- سرعة التدفق: 1m/min
- نوع العمود: ODS أبعاده (25 x0.46) cm
- درجة حرارة الفرن: 30°C
- نظام التحليل: مزيج الطور المتحرك ثابت خلال زمن التحليل (Isocratic)

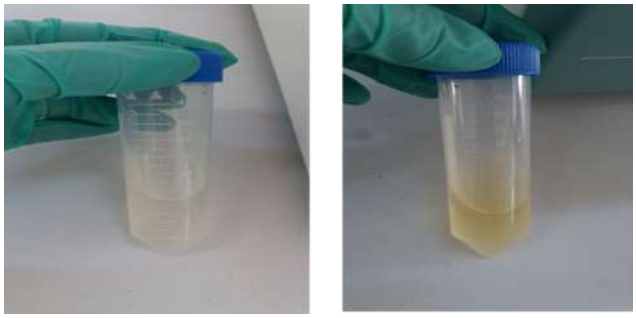
تم تحديد هوية المركبات الفينولية المدروسة بمقارنة أزمنة احتفاظها في مستخلصات العينات –بعد اجراء الدراسة المطلوبة– مع أزمنة احتفاظ أزمنة هذه المركبات في محاليلها العيارية.

النتائج والمناقشة:

أظهرت نتائج الدراسة وجود انخفاض متباين في تركيز المركبات الفينولية في المستخلصات الناتجة عن تخمير مياه الجفت عند جميع التخفيفات باستخدام كل من بكتريا *B. cereus* و *S. xylosus* المعزولة من الرسوبيات البحرية والمياه المسامية على التوالي، وذلك بالمقارنة مع تركيزها في مستخلصات عينات الشاهد لمياه الجفت.

1- استخدام *B. cereus* لمعالجة OMW بتخفيفات مختلفة في أوساط التخمر:

لوحظ انخفاض في تركيز كل من 2,6 dimethyl phenol، salicylic acid، وP-cresol، مع زيادة طفيفة عند كل تخفيفات OMW لـ ferulic acid وعند التخفيف 25% و 50% لـ Quersteen مقارنة بتراكيزها في مستخلص عينة الشاهد (الجدول1 والشكل2).



الشكل (1): بعض الخلاصات الناتجة عن تقطير أوساط تخمر تحوي تخفيفات مختلفة من مياه الجفت بعد انقضاء مدة التخمر عند الدرجة 37°C لمدة 30 يوم

الجدول (1): تركيز المركبات الفينولية (النسب المئوية) لمستخلصات مياه الجفت 25، 50، 100% (V/V) بعد التخمر باستخدام *B. cereus* عند الدرجة 37°C لمدة 30 يوم

وسط التخمر	الجراثيم	Chlorogenic acid %	Ferulic acid %	2,6 dimethyl phenol %	Salicylic acid %	P-cresol %	Quersteen %	Coumaric acid%	Vanellin%	المجموع الكلي للمركبات الفينولية
مياه جفت معقمة : مرق مغذي (v/v)25%	***B. cereus***	-	3.01	1.46	0.5	0.237	0.233	-	–	**5.44**
	Control	4.08	2	1.92	2.57	2.21	0.137	0.305	0.989	**14.211**
مياه جفت معقمة : مرق مغذي (v/v) 50%	***B. cereus***	-	7.52	2.97	1.2	0.39	0.873	-	–	**12.953**
	Control	7.67	3.006	5.69	3.31	3.63	0.4	0.45	2.235	**26.391**
مياه جفت معقمة 100%	***B. cereus***	-	10.76	6.99	2.017	0.96	1.973	-	–	**27.7**
	Control	10.8	5. 81	9.78	7.143	5.8	2.42	0.7	5.04	**47.493**

أظهرت النتائج اختفاء كل من chlorogenic acid، coumaric acid و vanillin في خلاصات العينات بعد التخمر عند كل نسب مياه الجفت، في حين أنها كانت موجودة في مستخلصات عينات الشاهد. يشير ذلك إلى كفاءة عالية لبكتريا *B. cereus* في تخفيض تراكيز الفينولات في خلاصات العينات المدروسة. انخفضت تراكيز كل من 2,6 dimethyl phenol (1.46، 2.97، 6.99)% ، salicylic acid (0.5، 1.2، 2.017)% و P-cresol (0.237، 0.39، 0.96)% بشكل كبير عند نسب (25، 50، 100)% OMW على التوالي، وهذا يدل على فعالية بكتيريا *B. cereus* في التحويل الحيوي وإنتاج مركبات أخرى كالكحولات (ميتانول، ايتانول، بوتانول، ايزوبروبانول، هكسانول) (Zwan, 2016)، وبالتالي تقليل أو اختفاء بعض المركبات الفينولية من OMW. يمكن أن يُفسر ذلك بأن هذه البكتريا تستخدم جزءاً من الكربوهيدرات الموجودة في تركيب مياه الجفت لإنتاج مواد كالكحولات، كما تنتج مجموعة متنوعة من الأنزيمات القادرة على إرجاع بعض الفينولات وهذا الأمر مشابه لدراسة (Massadeh and Modallal, 2007)، حيث تم استخدام فطر Pleurotus sajor-caju لتفكيك المركبات الفينولية في مياه الجفت من جهة وإنتاج الإيتانول من جهة أخرى. كما قامت دراسة أخرى بعزل سلالة *B.*

amyloliquefaciens OM81 من مياه الجفت واستخدامها لإنتاج البلاستيك الحيوي وتخفيض الفينولات (Bacha *et al.*, 2023).

أكدت دراسات عديدة أن الأنواع التابعة للجنس *Bacillus* ومن بينها النوع *B. cereus* ذات الأصل البحري قادرة على استخدام مجال واسع من المركبات العضوية, وكانت تتميز بتسامحها للملوحة، وكذلك للقلوية، الأمر الذي يعكس مرونتها الإستقلابية العالية في إنتاج عدد من المركبات الفعالة فيزيولوجياً (Ivanova *et al.*, 2010) كالأنزيمات ذات الأهمية الصناعية والتطبيقية لتحويل مخلفات الأحياء البحرية إلى منتجات ذات قيمة عالية (Wang *et al.*, 2009; Poopathi *et al.*, 2014; Mani *et al.*, 2015). من ناحية أخرى، زادت تراكيز Ferulic acid في خلاصات العينات بعد المعالجة الحيوية (3.01، 7.52، 10.76)% بالمقارنة مع تراكيزه في خلاصات الشاهد (2 ،3.006، 5. 81)% عند نسب (25، 50، 100)% OMW على التوالي، وكذلك الأمر بالنسبة لتراكيز Quersteen التي ارتفعت (0.233، 0.873)% عند التخفيفين (25 و 50) % OMW فقط. يمكن أن يعزى ذلك إلى أن بكتيريا *B. cereus* لها القدرة على زيادة نسبة المركبات الفينولية (Ferulic acid و Quersteen) الموجودة في المستخلصات الشاهد، أو إنتاج مركبات فينولية جديدة، وقد يعود ذلك إلى أن هذه الأحياء الدقيقة قد فككت حلقات البنزن في المركبات الفينولية وحولتها إلى مركبات فينولية أخرى (Massadeh and Modallal, 2007) مما قد يترتب عليه ارتفاع في تراكيز بعض المركبات الفينولية أو إنتاج مركبات فينولية جديدة، وهذا ما أكده الباحث (Ramos-Cormenzana *et al.*, 1996) والذي استخدم بكتيريا *B. pumilus* 123 في المعالجة الحيوية لـ OMW، حيث تم إنتاج مركب فينولي جديد (حمض الثوم (garlic acid)) كان غائباً في مستخلصات الشاهد.

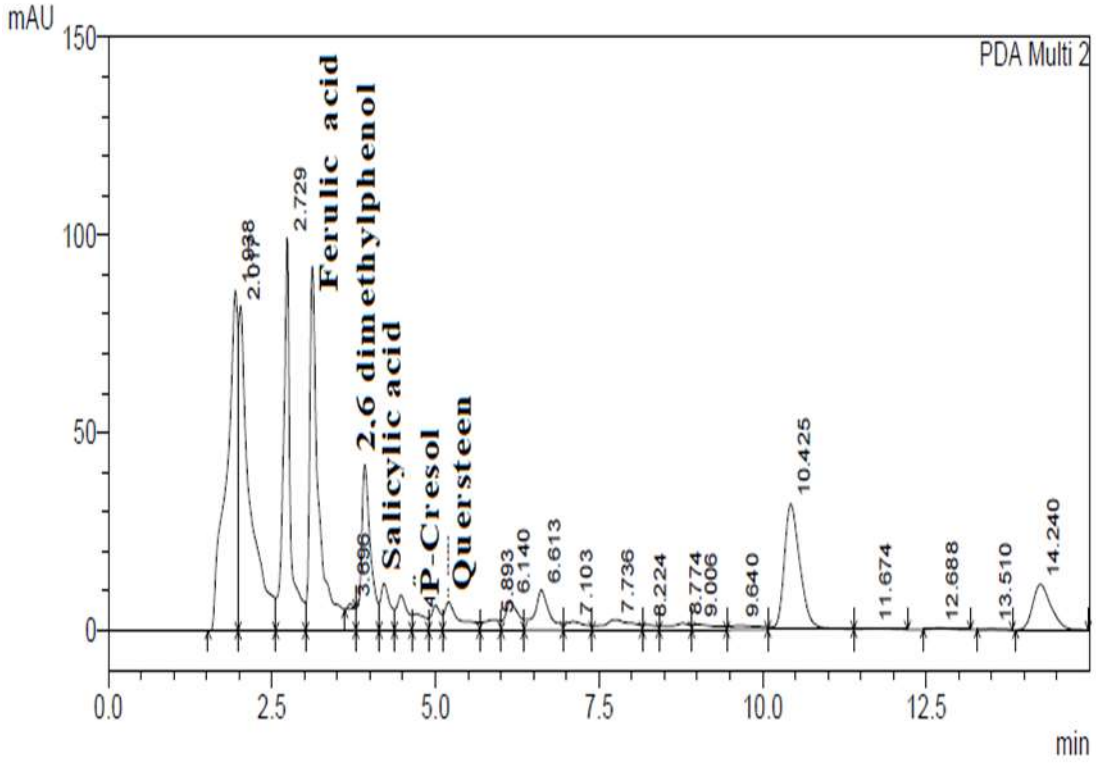
على العكس، انخفض تركيز Quersteen (1.973%) عند التخفيف 100 % بالمقارنة مع تركيزه في الشاهد (2.42%) والذي يمكن أن يعود سببه إلى أن تركيز الكربوهيدرات التي تدخل في تركيب مياه الجفت يكون أعلى ما يمكن في وسط التخمر، وبما أن دراسة (Zwan, 2016) أكدت أن بكتريا *B. cereus* المعزولة من الرسوبيات البحرية لها القدرة والكفاءة العالية على إنتاج الكحولات وخاصة في النسب المرتفعة لمياه الجفت 100 %، بالتالي فإن هذه البكتريا استخدمت القسم الأكبر من الكربوهيدرات إضافةً إلى إنتاجها أنزيمات قادرة على تفكيك الفينولات، وخاصة أن مركب Quersteen يحوي وظيفة كحولية وعند تفككه قد يعطي مركبات كحولية.

2- استخدام *S. xylosus* لمعالجة OMW بتخفيفات مختلفة في أوساط التخمر:

انخفضت التراكيز عند التخفيف 25% لمياه الجفت، لكل من Ferulic acid (0.477، 1.19، 2.049)%، 2,6 dimethyl phenol (0.105، 0.251، 0.446)%، وsalicylic acid (0.897 ، 0.189، 0.420)%، وP-Cresol (0.8 ، 0.162، 0.257)% إلى النصف تقريباً ، مقارنة مع تراكيزها في مستخلصات الشاهد كما هو مبين في (الجدول2).

لوحظ انخفاض واضح لجميع المركبات الفينولية المدروسة في التخفيفين 50% و100% لمياه الجفت (جدول 2، شكل3)، حيث انخفض تركيز Ferulic acid من (3.006% في خلاصة الشاهد) إلى (1.19% في العينة) عند 50% OMW، ومن (5. 81% في خلاصة الشاهد) إلى (2.049% في العينة) عند 100% OMW. كذلك انخفض 2,6 dimethyl phenol من (5.69% في خلاصة الشاهد) إلى (0.251% في العينة) عند 50% OMW، ومن (9.78% في خلاصة الشاهد) إلى (0.446% في العينة) عند 100% OMW. إضافة الى أن تركيز salicylic acid انخفض من (3.31% في خلاصة الشاهد) إلى (0.189% في العينة) عند 50% OMW، ومن (7.143% في خلاصة الشاهد) إلى (0.420% في العينة) عند

OMW %100. كذلك الأمر بالنسبة لبقية الفينولات P-cresol، Quersteen و vanillin باستثناء مركبي chlorogenic acid و coumaric acid، فقد كانا غائبان تماماً في خلاصات مياه الجفت عند التخفيفات (25، 50، 100%) ، بينما كانا موجودان في الخلاصات الشاهد كما هو موضح في (الجدول2).



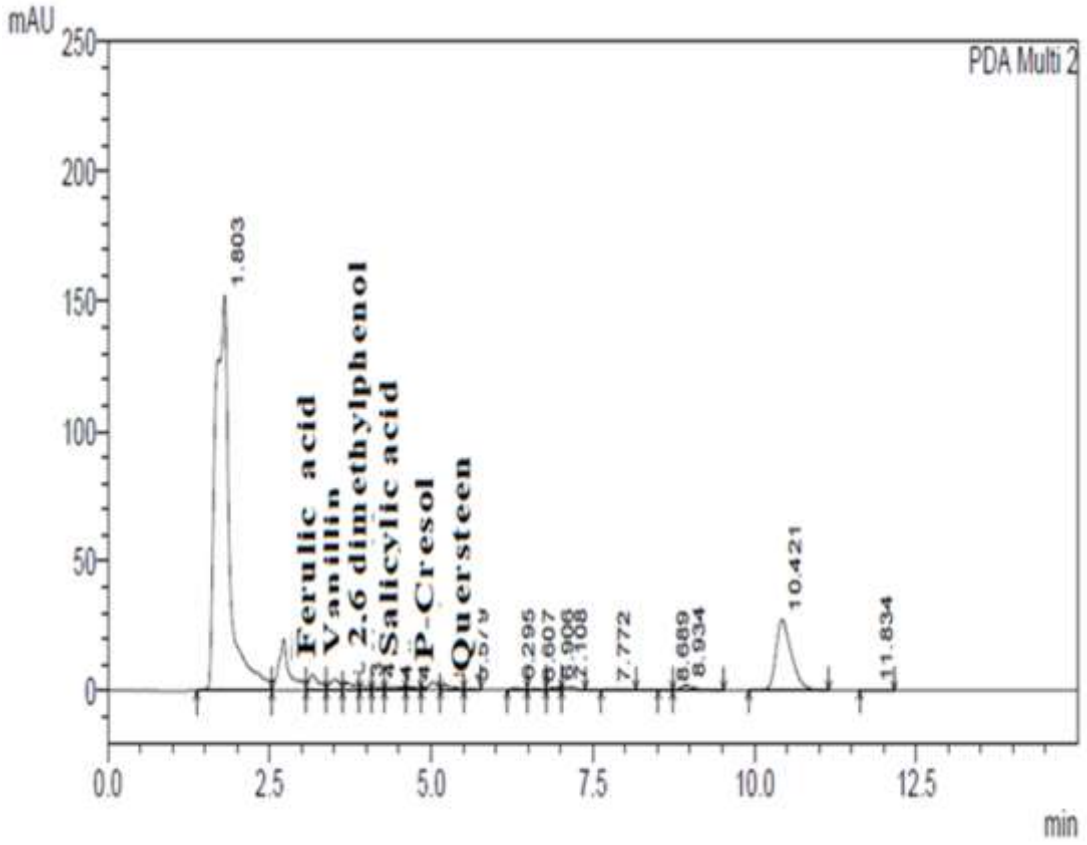
الشكل (2): كروماتوغرام للمستخلص الناتج عن تخمر OMW 100% بواسطة البكتريا *B. cereus* المعزولة من الرسوبيات البحرية عند الدرجة 37 °C لمدة 30 يوم

بشكل عام، تشير هذه النتائج إلى أن بكتريا *S. xylosus* تحول الفينولات إلى مركبات جديدة في أوساط تحوي نسب مرتفعة من مياه الجفت، فقد يعود السبب الى أن جدران خلايا الـ *Staphylococcus* ، مثل بقية الجراثيم موجبة الغرام، تؤمن الحماية لهذه الخلايا ضد أي عامل ميكانيكي مخرب، وتحتوي عدة بروتينات سطحية لها دور مهم في البقاء على قيد الحياة (Navarre and Schneewind, 1999; Vela *et al.*, 2012). يشير هذا إلى قدرة السلالة (2) *S. xylosus* المعزولة من المياه المسامية للرسوبيات البحرية على النمو ومقاومة المواد المثبطة الموجودة في مياه الجفت واستخدامها للمركبات الفينولية لإنتاج مركبات هامة مثل الكحولات الهامة صناعياً كالميتانول، الايتانول، البوتانول، الإيزوبروبانول، الهكسانول (Zwan, 2016)، وهذا مشابه لما أشارت إليه دراسة (Kanmani *et al.*, 2016) والتي قامت بعزل سلالة *S. xylosus* MHB32 من تربة بمحيط معامل الزيت، حيث كانت هذه البكتريا قادرة على إنتاج مجموعة من الأنزيمات بما في ذلك protease، L-asparginase، lipase، xylanase و cellulose إضافة إلى أنواع أخرى من الأنزيمات الأمر الذي يفسر كفاءة هذه البكتريا. بشكل عام، تساهم عمليات تخمر مياه الجفت ونمو البكتريا في تغيير الخصائص الفيزيائية والكيميائية لمياه الجفت وهذا بدوره يؤثر على المركبات المتواجدة فيها (Massadeh and Modallal, 2007).

الجدول (2): تراكيز المركبات الفينولية (النسب المئوية) لمستخلصات مياه الجفت 25، 50، 100% (V/V) بعد التخمر باستخدام *S. xylosus* عند الدرجة 37ºC لمدة 30 يوم

وسط التخمر	الجراثيم	chlorogenic acid %	Ferulic acid%	2,6 dimethyl phenol %	salicylic acid%	P-cresol %	Quersteen %	coumaric acid%	Vanillin %	المجموع الكلي للمركبات الفينولية
مياه جفت معقمة : مرق مغذي (v/v)25%	***S. xylosus***	-	0.477	0.105	0.897	0.8	0.116	-	0.297	**2.692**
	Control	4.08	2	1.92	2.57	2.21	0.137	0.305	0.989	**14.211**
مياه جفت معقمة : مرق مغذي)v/v(50%	***S. xylosus***	-	1.19	0.251	0.189	0.162	0.297	-	0.694	**2.783**
	Control	7.67	3.006	5.69	3.31	3.63	0.4	0.450	2.235	**26.391**
مياه جفت معقمة 100%	***S. xylosus***	-	2.049	0.446	0.420	0.257	0.571	-	1.346	**5.089**
	Control	10.8	5. 81	9.78	7.143	6.8	0.62	0.7	5.04	**47.493**

بالنتيجة، لوحظ وجود فعالية أكبر لبكتريا *S. xylosus* في خفض المجموع الكلي للمركبات الفينولية (2.692، 2.783، 5.089)، بالمقارنة مع قيم المجموع الكلي للمركبات الفينولية الناتج عن فعالية البكتريا *B. cereus* (5.44، 12.953، 27.7) وذلك عند نسب مياه الجفت (25، 50، 100)% على التوالي. على الرغم من أن بكتريا *B. cereus* ذات إنتاجية عالية لإنتاج الكحولات (Zwan, 2016)، إلا أنه من المحتمل أن بكتريا *S. xylosus* قد فككت الفينولات وأنتجت مركبات أخرى بالإضافة للكحولات. تعد عملية التفكك الحيوي هذه من الطرائق الواعدة التي تعمل على تخفيض تركيز الفينولات في مياه الجفت باستخدام بكتريا *S. xylosus* و *B. cereus* (تطبيقات بيئية) وانتاج الكحولات مثل الايتانول، الميتانول، البوتانول، الايزوبروبانول والهكسانول (تطبيقات إقتصادية، صناعية، وقود حيوي.....) وهذا يتوافق مع كل من دراسة (Massadeh and Modallal, 2007; Zwan, 2016).



الشكل (3): كروماتوغرام للمستخلص الناتج عن تخمر OMW 100% بواسطة البكتيريا *S. xylosus* المعزولة من المياه المسامية للرسوبيات البحرية عند الدرجة 37 °C لمدة 30 يوم

الاستنتاجات:

1- أظهرت النتائج أن انخفاض تراكيز المركبات الفينولية في المستخلصات الناتجة عن تخمر مياه الجفت (25، 50، 100)% باستخدام بكتريا *S. xylosus* المعزولة من المياه المسامية كان أكبر بالمقارنة مع استخدام بكتريا *B.cereus* المعزولة من الرسوبيات البحرية.

2- لوحظ فعالية واضحة لكلتا السلالتين في معالجة مياه الجفت، وتخفيض محتواها الفينولي مما يؤكد دورها الكبير في تقليل الأثر البيئي السلبي من جهة، وفعاليتهما في إنتاج مركبات قيمة طبياً وصيدلانياً وصناعياً... (الكحولات) من جهة أخرى.

3- ازدادت فعالية المعالجة الحيوية لمياه الجفت مع زيادة نسبتها في وسط التخمر، وهذا يؤكد على إنتاج الكحولات أثناء عملية التخمر وانخفاض نسبة المركبات الفينولية في المستخلصات مقارنة بمستخلصات الشاهد.

4- تعد عملية التفكك الحيوي من الطرائق الواعدة التي تعمل على تخفيض تركيز الفينولات في مياه الجفت باستخدام بكتريا *S. xylosus* و *B. cereus* (تطبيقات بيئية) وإنتاج الكحولات مثل الإيتانول، الميتانول، البوتانول، الايزوبروبانول والهكسانول (تطبيقات اقتصادية، صناعية، وقود حيوي.....)

4- التوصيات:

1- عزل المزيد من البكتريا من البيئة البحرية ذات الكفاءة العالية واستخدامها في العمليات التطبيقية للمعالجة الحيوية للمخلفات المختلفة.

2- الاستمرار بمثل هذه الأبحاث التي تهدف إلى التخفيف من العبء البيئي الذي تسببه المخلفات على البيئة من جهة ، وإنتاج مركبات ذات تطبيقات متنوعة من جهة أخرى.

3- ضرورة دعم المراكز البحثية المختصة من أجل الوصول إلى أفضل الطرائق المناسبة للتخلص من المخلفات بكافة أنواعها.

المراجع:

صالح ، فؤاد ومحمد الشحنة ومصعب خليل (2008). تأثير تغيير pH المياه الناتجة عن معاصر الزيتون في المعالجة الأنودية لهذه المياه. مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية، سلسلة العلوم الأساسية. 30(1): 151-163.

ناصر، أميمة (2008). مساهمة في دراسة المعالجة البيوكيميائية للمياه الناتجة عن معاصر الزيتون لإنتاج الغاز الحيوي. رسالة دكتوراه. المعهد العالي لبحوث البيئة, جامعة تشرين: سورية. 133 صفحة.

Abu Shmeis, R. M.; I. N. Tarawneh and A. T. Issa (2024). Profiling and evaluation of phenolic compounds in olive mill wastewater in Jordan. Water Quality Research Journal. 00 (0): 1-17 doi: 10.2166/wqrj.2024.024

Abu-Dalo, M. A.; N. A. F. Al-Rawashdeh; M. Almurabi; J. Abdelnabi and A. Al Bawab (2023). Phenolic Compounds Removal from Olive Mill Wastewater Using the Composite of Activated Carbon and Copper-Based Metal-Organic Framework. Materials. 16 (1159): 1-16 https://doi.org/10.3390/ ma16031159

Afify, A.S.; M.A. Mahmoud; H.A. Emara and K. I. Abdelkreem (2009). Phenolic Compounds and COD Removal from Olive Mill Wastewater by Chemical and Biological Procedures . Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 3 (2): 1087-1095, ISSN 1991-8178

Anastasiou, C. C.; P. Christou ; A. Michael; D. Nicolaides and T. P. Lambrou (2011). Approaches to olive mill wastewater and disposal in Cyprus. Environmental Research Journal. 5 (2): 49-58.

Azzam, M. O.; S. I. Al-Gharabli and M. S. Al-Harahsheh (2015). Olive mills wastewater treatment using local natural Jordanian clay. Desalination and Water Treatment. 53: 627-636.

Azzam, M.O.J. and S.A. Hazaimeh (2020). Olive mill wastewater treatment and valorization by extraction/concentration of hydroxytyrosol and other natural phenols. Process Safety and Environmental Protection. 1-69 doi: https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.10.030

Bacha, S.; F. Arous; E. Chouikh; A. Jaouani; M. Gtari; K. Charradi; H. Attia and D. Ghorbel (2023). Exploring *Bacillus amyloliquefaciens* strain OM81 for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastic using olive mill wastewater. King Abdulaziz City for Science and Technology, 3 Biotech. 13(415): 1-9.

Boutafdaa, A.; Y. Zegzoutia; L. El Felsa; Y. Alkaaa; S. Jamild; Y. Ouhdoucha; F. Bekkaouie, L. Kouisnif and M. Hafidia (2020). Optimization of the process conditions for biodegradation of phenolic compounds in olive mill wastewater using *Bacillus subtilis* in bioreactor cultures. Desalination and Water Treatment. 194: 101–109

Dali, I.; A. T. Abdelwahab; A. Aydi; N. Fares ; A. Eladeb; M. Hamzaoui; M. Abderrabba; M. A. Abdelfattah and A. Guetat (2023).Valorization of lyophilized olive mill waste water: Chemical and Biochemical Approaches. Chemical and Biochemical Approaches. Sustainability. 15: 1-16. 3360. https://doi.org/10.3390/ su15043360

Davies, L. C.; A. M. Vilhena; J. M. Novais and S. Martins-Dias (2004). Olive mill wastewater characteristics: modelling and statistical analysis. Grasas y aceites. 55: 233-241.

Di gioia, D.; L. Bertin; F. Fava and L. Marchetti (2001). Biodegradation of hydroxylated and methoxylated benzoic, phenylacetic and phenylpropeoinic acids present in olive mill wastewater by two bacterial strains. Research in Microbiology. 152 (1): 83-93.

El Hajoji, H.; G. Ait Baddi; A. Yaacoubi; H. Hamdi; P. Winterton; J.C. Revel and M. Hafidi (2008). Optimisation of biodegradation conditions for the treatment of olive mill wastewater. Bioresource Technology. 99: 5505–5510.

El-khateeb, M.A.; B.A. Tantry; A.H. Mohammed and S. Rahiman (2014). Phenotypic characterization of phenol degrading microorganisms isolated from olive mill waste. African Journal of Microbiology Research. 8 (21): 2131-2136.

Gueboudji, Z.; K. Kadi; M. Mahmoudi; H. Hannachi; K. Nagaz; D. Addad; L. Yahya; B. Lachehib and K. Hessini (2022). Maceration and Liquid-liquid extractions of phenolic compounds and antioxidants from Algerian olive oil mill wastewater. 1-16. PREPRINT (Version 1) available at Research Square [https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1423045/v1].

IOC: International Olive Council (2012). General description of olive growing in Syria. Policies-Syria, 1-10.

IOC: International Olive Council (2022). https: // www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2022/12/IOC-Olive-Oil-Dashboard-2.html#production-1

Isidori, M.; M. Lavorgna; A. Nardelli and A. Parrella (2005). Model Study on the Effect of 15 Phenolic Olive Mill Wastewater Constituents on Seed Germination and Vibrio fischeri Metabolism. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 53: 8414-8417.

Ivanova, E. P.; M. V. Vysotskii; V. I. Svetashev; O. I. Nedashkovskaya; N. M. Gorshkova; V.V. Mikhailov; N. Yumoto; Y. Shigeri; T. Taguchi and S. Yoshikawa (2010). Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. International Microbiology. 2(4): 267-271.

Kanmani, P.; J. Aravind and K. Kumaresan (2016). Hydrolytic Enzyme Profiling of *Bacillus Subtilis* COM6B and Its Application in the Bioremediation of Groundnut Oil Mill Effluent. Integrated Waste Management in India: Status and Future Prospects for Environmental Sustainability. 179-189.

Mani, C.; K. Thirugnanasambantham; S. Sundarapandian; and S. Poopathi (2015). Identification and characterization of a novel marine *Bacillus cereus* VCRC-B540 for mosquito control. Biological Control. 60(1): 71-79.

Mantzavinos D. and N. Kalogerakis (2005). Treatment of olive mill effluents: Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes—an overview. Environment international. 31: 289-295.

Massadeh, M. and N. Modallal (2007). Ethanol Production from Olive Mill Wastewater (OMW) pretreated with *Pleurotus sajor-caju*. American Chemical Society. 22(1): 150-154

Mcnamara, C. J.; C. C. AnastasioU; V. O' Flaherty and R. Mitchell (2008). Bioremediation of olive mill wastewater. International Biodeterioration and Biodegradation. 61(2) :127-134.

Navarre, W.W. and O. Schneewind (1999). Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 63:174–229.

Niaounakis, M. and C.P. Halvadakis (2006). Olive processing waste management: literature review and patent survey. Elsevier.

Paredes, M.J.; M. Monteoliva-Sanchez; E. Moreno; J. Perez; A. Ramos-Cormenzana and J. Martinez (1986). Effect of wastewaters from olive oil extraction plants on the bacterial population of soil Chemosphere. 15(5): 659 664

Perez, J.; T. De la rubia; J. Moreno and J. Mart~nez (1992). Phenolic content and antibacterial activity of olive oil waste waters. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal. 11(4): 489-495.

Perez, J.D.; E. Esteban; M. Gomez and F. Gallardo Lara (1986). Effects of wastewater from olive oil processing on seed germination and early plant growth of different vegetable species. Journal of Environmental Science & Health Part B. 21(4): 349-357.

Poopathi, S.; C. Mani; K. Thirugnanasambantham; V.L. Praba; N.A. Ahangar and K. Balagangadharan (2014). Identification and characterization of a novel marine *Bacillus cereus* for mosquito control. Parasitology Research. 113 (1): 323-332.

Ramos-Cormenzana, A.; B. Juárez-jiménez and M. Garcia-pareja, (1996). Antimicrobial activity of olive mill waters (Alpechin) and bio transformed olive oil mill wastewater. International Bio deterioration and Biodegradation. 38(3-4): 283-290.

Rodis, P.S., V.T. Karathanos and A. Mantzavinou (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. Journal of Agricultura and Food Chemistry. 50: 596–601.

Rodriguez, M.M.; J. Perez; A. Ramos-Cormenzana and J. Martinez (1988). Effect of extracts obtained from olive oil mill wastewaters on Bacillus megaterium ATCC 33085. Journal of Applied Bacteriology. 64(3): 219-226.

Shahkouhmahalia, E. and J. Mohamadzadehb (2023). Optimization of phenolic compounds extraction from olive mill wastewater using response surface methodology. Water Science & Technology. 88 (9): 2400-2408. doi: 10.2166/wst.2023.346

Vela, J.; K. Hildebrandt; A. Metcalfe; H. Rempel; S. Bittman; E. Topp and M. Diarra (2012). Characterization of *Staphylococcus xylosus* isolated from broiler chicken barn bioaerosol. Poultry Science. 91(12): 3003-3012.

Wang, S.L.; C.H. Chao; T. W. Liang and C.C. Chen (2009). Purification and Characterization of Protease and Chitinase from *Bacillus cereus* TKU006 and Conversion of Marine Wastes by These Enzymes. Marine Biotechnology. 11(3): 334-344.

Zwan, M. (2016). Cultivation some of the marine microbial strains for alcohols production from Olive Mill Wastewater. Master's thesis. Department of Marine Biology, High Institute of Marine Research, Tishreen University, Lattakia, Syria. Pp 95.

Reducing the concentration of phenolic compounds in Olive Mill Wastewater by cultivation of marine bacteria *Bacillus cereus* and *Staphylococcus xylosus*

Mais Zwan* (1) and Ahmad Kara-Ali(2)

(1). Department of Marine Biology -High Institute of Marine Research- Tishreen University – Lattakia- Syria.
(2). Department of Marine Chemistry- High Institute of Marine Research - Tishreen University – Latakia- Syria.
(*Corresponding author: Mais Zwan E-Mail : maiszwan22@gmail.com).

Received: 29/3/2024 Accepted: 25/5/2024

Abstract

The process of extracting olive oil produces toxic liquid wastes known as (OMW: Olive Mill Wastewater), which causes a serious environmental problem when disposed directly without treatment due to its high content of organic and phenolic substances. The present study aims to reduce the concentrations of phenolic compounds in OMW by cultivation the bacterial strains *Bacillus cereus* and *Staphylococcus xylosus* isolated from sediment and marine porous waters respectively - from the coastal area of Latakia city - in media containing OMW with different dilutions (25, 50, 100)% at 30 ºC for 30 days. After the incubation period had elapsed, the media were distilled at 157 ºC and the extracts were analyzed using a high-performance liquid chromatography (HPLC) at a maximum absorption wavelength of 275 nm. When *B. cereus* was used, a decrease in the concentrations of 2,6-dimethyl phenol, salicylic acid, and P-cresol was observed at all dilutions of OMW. It was also observed that the concentration of ferulic acid and Questeen increased, and the disappearance of chlorogenic acid, coumaric acid, and vanillin with their presence in control extracts at all OMW dilutions. When using *S. xylosus* bacteria, there was a clear decrease in all the phenolic compounds studied, with the absence of chlorogenic acid and coumaric acid in the extracts of fermentation samples compared to their presence in control extracts. The bioremediation used in this study is low cost and has good efficacy in reducing the problem of environmental pollution caused by phenolic compounds in OMW with a clear efficacy of *S. xylosus* compared to *B. cereus*.

Keywords: Olive Mill Wastewater, Marine bacteria, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus xylosus*, phenolic compounds, High performance liquid chromatography.