Annals of Agric. Sci., Moshtohor **ISSN 1110-0419**
Vol. 52(3) (2014), 433–450 **http://annagricmoshj.com**

عزل وتعريف البكتريا السائدة فى الترب الملوثة بالنفط ومشتقاته وقابليتها لاستهلاك الهيدروكربونات .

أيمان الصادق منصور الحمادى
قسم التربة والمياه، كلية الزراعة، جامعة طرابلس، ليبيا
Corresponding author: emanbensaeed@gmail.com

اجريت هذه الدراسة بهدف التعرف على التركيبة الميكروبية السائدة فى الترب الملوثة بالنفط وقياس قابليتها لاستهلاك الهيدروكربونات ، إذ تم اخذ عينات من تربة ملوثة من مناطق مختلفة ملوثة بمواد هيدروكربونية متمثلة فى التربة المحيطة بأنابيب نقل البترول ، محطات البنزين والديزل و أماكن تغيير زيوت السيارات والتشحيم وعينة نفط خام من نوع خفيف .تم الحصول على 18 عزلة على مستوى الجنس أو النوع ودرست الصفات المظهرية والمجهرية لهذه العزلات باستخدام بعض الأوساط المزرعية وبعض الأختبارات الكيموحيوية ،كذلك تم أختبار قدرة البكتيريا المتوطنة طبيعيا في البيئات الملوثة نفطيا على استهلاك المواد الهيدروكربونية المختلفة وحساب الأعداد الحية للبكتيريا المعزولة خلال نموها على الأوساط المزرعية السائلة الحاوية على تركيز 1% من النفط الخام ومشتقاته. وأظهرت النتائج ان لمعظم العزلات البكتيرية المكونة للأبواغ وغير المكونة للأبواغ القدرة على النمو على هذه الأوساط بدلالة الأعداد الحية للعزلات التى ظهرت سواء بإضافة أو بدون أضافه المغذيات ،حيث ازدادت أعداد هذه العزلات سواء مع إضافة المغذيات أوعند الخلط بين العزلات ،وكانت *Pseudomonas putida* من أكثر العزلات سالبة جرام أعداداً و *Nocardia sp* عن العزلات الموجبة ومتغيرة جرام التى كانت متقاربة فى نتائجها وكانت sp *Actinomyces* أقل اعداداً . بالنسبة للعزلات المكونة للأبواغ كانت أكثر الأعداد على التوالى *Brevibacillus brevis* و*B.megaterium* و*B . subtilis* فى حين كانت انواع العزلات الأخرى متقاربة فى اعدادها. نستنتج من الدراسة إمكانية استخدام هذه العزلات في معالجة التلوث البيئي الناتج عن المخلفات الهيدروكربونيه لقابليتها العالية على استهلاك واستخدام المواد النفطية كمصدر للكربون والطاقة لها .

المقدمـــــة

أدى تطور التكنولوجيا في القرن العشرين إلى زيادة حادة في استهلاك النفط في العالم. إذ يتم استخراج النفط بكميات هائلة من باطن الأرض ،ثم ينقل النفط المستخرج بواسطة وسائط نقل بريّة أو بحرية أو بواسطة أنابيب طويلة إلى مناطق مختلفة حيث يتم استغلاله كمصدراً للطاقة ومادة خام أساسية في صناعات مختلفة للعديد من المركبات والمنتجات الكيميائية ،وأثناء المراحل المختلفة من التعامل مع النفط من استخراج ونقل ومعالجة واستعمال قد تحصل أخطاء تؤدي إلى تلويث البيئة.. وتقف الصناعة النفطية وراء العديد من المشاكل البيئية التي تتعرض لها التربة والناتجة عن انسكاب وتلوث اسطح التربة بالمواد النفطيـة. لقد أدى إهمال الإنسان وسعيه وراء التكنولوجيا الحديثة إلى الإخلال بالتوازن الطبيعي للبيئة المحيطة به، فساعد بذلك على تلوث الماء والهواء وأفسد التربة الزراعية ، (Lai ,2001 و Al- Sayigh,1978 و Al-Dobouni1977) وهذا ماجعل التفكير فى ايجاد حلول لتخلص من خطورة هذا التلوث وبطريقة صحية من الأمور الهامة لضمان صحة وسلامة البيئة وقد وجد أنّ أنجح طريقة لتحليل النفط هي بواسطة بكتيريا لها القدرة على استغلال مركبات الكربون الموجودة في النفط كمصدرٍ للطاقة اللازمة لها ، حيث يمكن استخدام البكتيريا في مكافحة التلوث النفطي للتربة مثل استعمالها في البقع النفطية البحرية ، وهناك الكثير من أنواع البكتيريا لديها القدرة الأنزيمية لاستخدام الهيدروكربونات النفطية كمواد غذائية وتحويلها إلى غاز ثاني أكسيد الكربون وماء ، إلى جانب المواد الخلوية ، مثل البروتينات والأحماض النووية ، وبذلك يتم تفكك هيدروكربونات النفط الخام وتحللها مما يعد فائدة عظيمة لتحولها إلى أصناف اخرى اقل سمية واقل خطراً على البيئة.(عبد الرازق 2012 و عزيز وآخرون 2012).

المخاطر الناجمة عن التلوث بالنفط الخام ومشتقاته

مع ازدياد عمليات إنتاج واستهلاك النفط زادت مخاطر التلوث البيئي الذي وصل إلى السطوح المائية والترب ، والتلوث النفطي من اشد انواع التلوث خطورة بسبب الكميات الهائلة التي تلقى من النفط الخام ومنتجاته الى المحيط الحيوي وما يحتويه من مركبات سامة وضارة (الخفاف وخضير، 2000)

وتمتد التأثيرات السامة لهيدروكربونات النفط الخام إلى النباتات وديدان الارض (Juteau *et al*.2003 و Wilson *et al*., 2002) . يحدث سنويا ما يقارب 14000 حالة تدفق للنفط الخام الى المحيط الحيوي وهذا يعكس حجم المخاطر البيئية الناجمة عن وصول كميات هائلة من النفط الخام الى المحيط الحيوي (Phillips, 2003 و Zhus *et al* ., 2004)

طرق إزالة الملوثات النفطية من البيئات المختلفة

استخدمت طرق او تقنيات عديدة للسيطرة على هذه الملوثات ومنها الكيميائية والفيزيائية والبايولوجية ومن أنجحها التقنيات البيولوجية التي يطلق عليها عملية التحليل الحيوي Biodegradation . تعد هذه الطريقة من الطرق البديلة والناجحة على نطاق واسع في ازالة الملوثات وأضرارها قليلة على البيئة ،وقد أظهرت بعض الدراسات(Koren *et al*., 2003 و Jaccobocci *et al*, 2001 و Alexander, 1999) أن عملية التحل الحيوي تتم بثلاث خطوات أساسية تشمل ، حدوث تغير صغير وبسيط في هذه المركبات العضوية ، تجزئة السلاسل الهيدروكربونية إلى أجزاء مع الاحتفاظ بالتركيب الكيميائي للمركب الأساسي قبل التجزئة وأخيرا معدنة الأجزاء العضوية وتغير تركيبها من جزيئات عضوية إلى جزيئات لاعضوية ومن وأن الاحياء المجهرية المحللة للمركبات الهيدروكربونية تشكل اقل من 1%من المجتمع الميكروبي للتربة وتزداد هذه الاعداد عند التلوث لتصل الى 10% وإنها تنتج بعض المواد المؤثرة في الشد السطحي والتي تعمل على تفكيك وتحليل البقع النفطية وأنها كيميائية غير ذاتية التغذية (متباينة) .وتم عزل العديد منها من المناطق الملوثة بالنفط الخام ومشتقاته وتم دراسة قابليتها لتحليل المركبات الهيدروكربونية وقد وجد أنها من أنواع البكتيريا الصديقة للبيئة حيث تعمل على تخليص البيئة من هذه الملوثات سواء على سطح الماء أو التربة، وتوفر خيار آمن لمعالجة التلوث .كما وصفها أخرون(Ojo,2006 و Atlas1981) بأنها تمتاز بقدرتها على تفكيك معظم مكونات النفط، ومستقرة وراثياً ، ولها القدرة على التكاثر بسرعة، وتمتلك إنزيمات التفكك والقدرة على منافسة الأحياء الأخرى الموجودة طبيعياً في موقع التلوث وأخيراً تمتاز بعدم إحداث تأثيرات جانبية سلبية وهى ايضا غير مرضية او منتجة لمواد ايضية سامة . أشارت بحوث عديدة إلى إمكانية عزل وتشخيص أنواع مختلفة من البكتيريا لها القابلية على تمثيل أنواع مختلفة من المركبات الهيدروكربونية (أكثرها تعود الى البكتيريا السالبة لصبغة كرام) ومن هذه *الاجناس Aeromonas media* , *Pseudomonas putida* *Serratia liquefaciens*، *Aeromonas media*, *Flavobacterium breve* ، *Sphingobacterium spiritivorum* , *Klebseilla oxytoca*, , *Acinetobacter baumanni* (جار الله,2008). واستطاع بعض الباحثين (Sanchez *et al*,2006) عزل كثير من البكتيريا الهوائية واللاهوائية اختيارية والبكتيريا اللاهوائية في مواقع االتلوث النفطى وفي الابار كذلك التربة الملوثة بالهيدروكاربونات .وفي دراسة اخرى وجد البعض (Rahman *et al*,2002)ان انواع ال *Bacillus* التي لها القدرة على تكوين الأبواغ ذات كفاءة عالية في التحلل فى البيئات الملوثة بالنفط اضافة الى عزل انواع مختلفة منها من مناطق عميقة من مياه البحار الملوثة وفي الترسبات والتربة.

العوامل المحددة للتحلل الحيوي للنفط الخام ومشتقاته

جاء فى بعض المصادر (Wright *et al*.,1993 و Boboye *et al*.,2010 ؛ Hazen *et al*., 2003) أن هناك عوامل تؤثر فى تحلل النفط فالعوامل البيئية تلعب دورا مهما في عملية التحلل الحيوي لهذه الملوثات ومنها وفرة الأوكسجين و الأس الهيدروجيني ودرجات الحرارة وتركيز وتركيب المواد الهيدروكربونية الملوثة والرطوبة النسبية والأملاح المعدنية. وقد لوحظ قدرة العزلات بكتيريا*Micrococcus roseus* على النمو على الديزل وذلك من خلال قياس الأعداد الحية والامتصاصية الضوئية لهذه العزلات وباستعمال طريقة التخفيف (Song and Bartha, 1990) تحت الظروف الهوائية نظرًا لاحتياج هذا النوع إلى الأوكسجين لعملية التحلل الحيوي والعزلات التي أظهرت نموًا متزايدًا من البداية وإلى نهاية التحضين يعكس مقدرة البكتيريا واستهلاكها للمركبات الهيدروكربونية بوصفها مصدرًا للطاقة والكربون.وهناك العوامل المتعلقة بالأحياء المجهرية ، تعتمد آلية التحلل الحيوي على وجود البكتريا ذات القابلية للنمو والتكاثر وتحليل الهيدروكربونات في المناطق الملوثة واعتمادا على وفرة المغذيات اللازمة لنموها بالإضافة إلى العوامل البيئة . وهناك عامل أخر هو احتواء البكتيريا على البلازميدات التي تحمل الجينات المسئولة عن عملية التحلل الحيوي . وقام بعض الباحثين (Singh and Mittal 2009) بدراسة تأثير إضافة المغذيات وعامل التهوية على التحلل الحيوي للهيدروكربونات الأروماتية المتعددة الحلقات بإستعمال خليط من البكتيريا. وتوصلوا الى أن زيادة التحلل الحيوى فى وجود عامل التهوية وإضافة المغذيات ووجود الخليط البكتيري . وفى دراسة أخرى (الشناوى 2010)عن فعالية الأحياء الدقيقة المستوطنة طبيعيا الترب الملوثة بالنفط فى تحليل مشتقات الزيت الخام فى وجود المغذيات النتروجينية والفوسفورية تبين قدرتها على هضم 80.8 % من النفط الخام خلال 21 يوم واختبرت كفاءة التحلل البيولوجي لهذه الملوثات عند الحقن الميكروبي بواسطة البكتيريا النشطة الجديدة Bact.No.4 وأيضا الحقن بمزرعة مختلطة من بكتيريا Bact.No.4 و فطر White rot وإستريتوميسيس وأيضا تم تقدير التحلل البيولوجي عند الحقن الميكروبي بالفلورا الميكروبية الكاملة حيث تمكنت من إزالة 99% من الزيت الخام . وفى دراسة أخرى (الشناوى ،

وآخرون 2010) لتربة تم تلويثها بتركيزات مختلفة من زيت البترول الخام تتراوح من 2.5 إلى 10 %، تم تقدير أعداد البكتيريا المحللة لزيت البترول فى كل جرام من هذه التربة ، وخاصةً فى وجود المغذيات المعدنية من مركبات النيتروجين والفسفور – ولُوحِظ أنه عند إضافة الزيت إلى التربة وفى وجود المغذيات المعدنية أظهرت البكتيريا المحللة لزيت البترول تأثيرا موجباً حيث زادت الأعداد أكثر منه فى عدم وجود المغذيات المعدنية وقد تم تسجيل $180x10^7$ وحدة مكونة للمستعمرات لكل جرام تربة فى حالة وجود المغذيات بالمقارنة عند عدم وجودها التى كانت $28x10^7$. وبين عويد (2008) فى تجربة عن الفعل الأنفرادى والمشترك وقابلية العزلات البكتيرية *Bacillus subtilis* و*Pseudomonas aeruginosa* و *Actinomyces sp* على تحليل نفط خام كركوك المتوسط وأوضحت النتائج ان نسبة تحلل النفط الخام لمزيج العزلات الثلاث كانت الافضل من الفعل الإنفرادى ، وفى حساب الاعداد الحية تبين أنها فى تزايد مستمر خلال فترة النمو البالغة 28 يوما على النفط المستخدم مما يؤكد القدرة العالية للعزلات البكتيرية المستخدمة لاستغلال مكونات النفط الخام في النمو.

أهداف البحث

عزل والتعرف على بعض الكائنات الحية الدقيقة المحللة للمركبات الهيدروكربونية الشائعة محليا فى الترب الملوثة بالمشتقات البترولية ، كذلك الكشف عن أعدادها فى هذه الترب ومقارنتها فى حالة توفير أفضل الظروف لنموها وتكاثرها، وتحديد مدى قدرة البكتيريا فى الترب الملوثة على استهلاك الهيدروكربونات .

المواد وطرق البحث

(1) تم جمع عينات من تربة ملوثة بالبترول ومشتقاته من المواقع التالية تربة محيطة بأنابيب نقل البترول ، محطات البنزين والديزل منطقة جنزور ، وأماكن تغيير زيوت السيارات والتشحيم وضمت المحطات التالية ، تاجوراء _ الهضبة الشرقية _ غوط الشعال وعينة نفط خام من خزانات حقل الفيل نوع نفط خفيف، واستخدم فى ذلك قنينات زجاجية غامقة معقمة سعة 100 ملليلتر. وجمعت على مستوى قريب من سطح التربة ،تحليل عينات التربة وكان نوع عينات التربة طمى رملى

(2)كذلك تم عد وعزل البكتيريا من عينات التربة الملوثة باستخدام طريقة عد الأطبـاق (Song and Bartha, 1990)

(أ) البيئات المستخدمة في زرع وعزل الأحياء الدقيقة القادرة على استغلال المركبات الهيدروكربونية كمصدر وحيد للكربون والطاقة هى :- Trypticase soy broth, blood agar، Trypticase soy agar(Olukunle , 2013) و(عويد 2008) .

(ب) طريقة التخفيف / استعمال محلول ملحى معقم8.5 جرام كلوريد صوديوم فى 1000ملليلتر تم عمل تخفيفات عشرية للتربة . ,تم نقل 1 مل من كل تخفيف مناسب على سطح طبق بتري يحوى 10 _ 15 مل من البيئة الغذائيةTrypticase soy agar. ثم تحضن الأطباق عند درجه حرارة 35م° لمدة 24 –48 ساعة ، تفحص الأطباق وتسجل النتائج المتحصل عليها حسب المستعمرات الناتجة .

طريقة عزل البكتيريا

تم أخذ 1جرام من التربة وأضيف الى 100مل من وسط Trypticase soya broth وحضن لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م° ثم نقلت بإبرة تلقيح وزرعت على وسط اجار الدم بطريقة التخطيط التتابعى وحضنت لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م° ، بعد التحضين تم تنقية البكتريا النامية على وسط اجار الدم بنقل كل مستعمرة بإبرة تلقيح معقمة وزرعها بطريقة التخطيط ايضا على نفس الوسط وتكرر عملية النقل والزرع 3 مرات الى التأكد من الحصول على مستعمرات نقية . ثم أجريت عليه اختبارات التعرف والتصنيف البكتيرى .

(ج) التعرف على العزلات البكتيرية ،أُجريت الاختبارات التشخيصية للعزلات قيد الدراسة حسب ما جاء في (Collee,*et.al.*,1996;Macfaddin,2000;Murray,*et al.*,2003; Cruickshank *et al*., 1975).

وتم الاعتماد على الصفات المظهرية والاختبارات الحيوية وعلى النحو الاتي ، الصفات المظهرية شُخصت العزلات تشخيصاً أولياً اعتماداً على الصفات المظهرية للمستعمرات على الأوساط الزرعية والمتضمنة حجم المستعمرات وحافتها وارتفاعها ولونها ، ثم صبغت الخلايا بصبغة جرام ، صبغ الأبواغ ، الصبغ المقاوم للأحماض ،الحركة ولوحظت الصفات المظهرية للخلايا تحت المجهر الضوئي المركّب والمتضمنة شكل الخلايا وحجمها وطريقة تجمعها ونتيجة تفاعل صبغة جرام. أما الأختبارات الكيموحيوية فقد كانت (الكتاليز _ أكسيديز _ أنتاج كبريتيد الهيدروجين _ أكسدة وتخمر السكريات [مواد الأساس التي تستخدم كمصدر للكربون والنيتروجين] _ السترات _ اختزال النترات _ النمو على :- أجار الدم _ أجار المغذى _ أجار

الماكونكى _ أجار الحديد الثلاثى السكر _ أجار الجيلاتين). تم بعد ذلك حفظ المستعمرات المعزولة على مرق الوسط الزرعى Trypticase salt broth فى درجة حرارة الثلاجة .

عد وعزل وتشخيص البكتريا المحللة للنفط الخام المستخدمة في هذه الدراسة كما جاء فى بعض المصادر (Philips and Traxler 1963 و(عويد 2008) تم من خلال استخدم مرق الوسط الزرعي Trypticase soy broth ، حيث وزع 50 ملليلتر من الوسط في دوارق مخروطية سعة 250 ملليليتر عقم وبرد الوسط وأضيف النفط الخام بنسبة 1 % (حجم/ حجم) ، وحضنت الدوارق على درجة حرارة 30مْ لمدة 21 يوما ، بعدها أجريت التخفيفات على إطباق من الوسط Trypticase soya agar وحضنت على درجة حرارة 30 مْ لمدة 24 ساعة واختير التخفيفات 10^{-6} ،10^{-7} لحساب العدد الكلى للبكتيريا فى عينة النفط الخام الخفيف. بعد عملية عد الأطباق تم اختيار طبقين من كل عينة يحوى اقل من 50 مستعمرة بكتيرية لعزل المستعمرات بشكل عشوائي على الوسط نفسه وتكرار الزراعة على بيئة أجار الدمblood Agar , بعدها عزلت المستعمرات المختلفة في الصفات المظهرية على إطباق في نفس الوسط وثبتت صفاتها من حيث الشكل ونوع استجابتها لصبغة جرام واختبار الحركة بعدها شخصت العزلات ثم حفظت العينات المعزولة على مرق الوسط الزرعي Trypticase soy broth في درجة حرارة الثلاجة لحين الاستخدام .

تنمية البكتريا المعزولة على النفط الخام والمشتقات النفطية

تم استخدام وسط Trypticase soya broth لتنمية العزلات البكتيرية بشكل منفرد ومشترك ، حيث تم توزيع 50 مل من الوسط فى دوارق مخروطية سعة 250 مل وبعدها عقم وبرد الوسط ثم أضف كل من / النفط الخام _ والمشتقات النفطية (البنزين ، الديزل ، زيت المحرك) بنسبة 1% (حجم / حجم) وأضيف 2 مل من العزلة البكتيرية منفردة وخليط العزلات الذى يحتوى كل ميلليتر منه على تركيز(1x10 ^{8}خلية / مل) إلى الوسط ثم حضنت الدوارق على درجة حرارة 30°م لمدة 28 يوم . وتم حساب مايلى :_

الأعداد الحية Viable count للعزلات

تم حساب الأعداد الحية لكل عزلة وخليط العزلات وذلك بإجراء سلسلة من التخفيفات لكل مزرعة فى محلول فسيولوجي معقم مستخدما الحلمة المطاطية فى عملية النقل وتحت شروط التعقيم ونقل 1مل من التخفيف 10^{-7} إلى إطباق بتري تحوى 15مل من وسط Trypticase soy agar وحضنت جميع الإطباق على درجة 30°م و'حسب العدد الكلي (الحي) viable count للمستعمرات البكتيرية النامية على كل من أطباق النفط الخام والمشتقات النفطية.

دراسة إضافة المغذيات التي تؤثر على الأعداد و النشاط التحللي لهذه العزلات ، تم ذلك بتقدير أعداد هذه البكتيريا منسوبا لكل جرام من التربة فى وجود المغذيات المعدنية من مركبات النيتروجين والفسفور ، من نفس البيئة السابقة وزع 50 ملليلتر في دوارق مخروطية سعة 250 ملليليتر ويكمل الوسط بإضافة 1% من نثرات الصوديوم والمغذى الفسفوري 0.8% من فوسفات بوتاسيوم أحادي الهيدروجين عقم وبرد الوسط وأضيف النفط الخام _ المشتقات النفطية (البنزين ، الديزل ، زيت المحرك) بنسبة 1 % (حجم/ حجم) ، وأضيف 2 مل من المعلق البكتيري لكل عزلة على حدة وخليط العزلات إلى الوسط وحضنت الدوارق على درجة حرارة 30مْ لمدة 21 يوما ثم بنفس الطريقة السابقة تم حساب العدد الكلى للبكتيريا .

الكشف عن وجود البكتريا المحللة ومدى قدرتها على استهلاك الهيدروكربونات

تم فصل الهيدروكربونات من عينات التربة الملوثة بالمشتقات النفطية وذلك بنسبة واحد من التربة مع 3 من المذيب العضوى ثنائى أثيل الأثير ثم الرج عدة مرات ثم ترك ليستقر على درجة حرارة الغرفة ، بعدها وضعت الطبقة السائلة فى قمع فصل لسماح لطبقة المائية بالنزول الى اسفل من خلال صمام . تم غسل الطبقة العضوية عدة مرات بكميات أخرى من الأثير تم ثم التجميع فى وعاء جاف ونظيف ووضعها عند درجة 45 م°.لكى تجف (Nadaling.*et.al*,2000) .بعد عملية الفصل تم اجراء إختبار قابلية البكتريا المعزولة على استهلاك الهيدروكربونات حيث أضيف 2 جرام من خليط الهيدروكربونات المجففة الى 100مل من وسط الأملاح المعدنية تم أخذ 0.1مل من التخفيف 10^{-7} من كل عينة ولقح بها الوسط وحضن فى درجة 30م° لمدة 7ايام بعد ذلك تم حساب نسبة استهلاك الهيدروكربونات (Arafa 2003 و عويد 2008) من خلال حساب كمية المتبقى من الهيدروكربونات (تحت ظروف التعقيم) وذلك عن طريق أخذ ورقة ترشيح معقمة وتجفيفها فى فرن التجفيف مدة 24 ساعة ووزنها ، تم رشح الوسط بورقة ترشيح وبعدها جفف بفرن التجفيف لمدة 24 ساعة بدرجة 45 م° ثم الوزن لمعرفة الفرق بالوزن قبل وبعد الترشيح اذ ان الراسب يمثل المتبقى من الهيدروكربونات حسب القانون التالى :- $R= (A-B/A) x100\%$ حيث أن :-

R = نسبة المستهلك من الهيدروكربونات

A = كمية الهيدروكربونات المضاف(2جرام)

B = كمية المتبقى من الهيدروكربونات

وتم اجراء التحليلات الأحصائى اللازمة .

النتـائج والمناقشـة

تم جمع 7 عينـات من الترب المحلية الملوثة بالمشتقات النفطية ، وعينة تمثل النفط الخام من النوع الخفيف، التربة كانت طمى رملى حسب نتائج التحليل الميكانيكي على النحو التالى :تاجوراء (طين 5 % ، سلت 10% ، رمل85 %)-جنزور(طين 7 % ، 5 سلت % ، رمل88 %)- غوط الشعال(طين 8 % ، سلت 6% ، رمل 86 %) تربة محيطة بأنابيب نقل البترول (طين 15 % ، سلت 5% ، رمل % 80)، الهضبة الشرقية (طين 8% ، سلت8 % ، رمل 84 %) .

عزلت منها 18عزلة بكتيرية مختلفة تمثل بكتيريا غير مكونة للأبـواغ اربعة منها موجبة جرام ، وثلاثة سالبة لصبغة جرام ، ونوعان متغيرة جرام . بكتيريا أخرى مكونة للأبـواغ خمسة منها موجبة لصبغة جرام ، وأربعة متغيرة لجرام . تم تنقية هذه العزلات على وسط أجار الدم لعدة مرات للحصول على عزلات مفردة نقية. وبعد ذلك تم تشخيصها بالإعتماد على الصفات المورفولوجية للمستعمرات والخلايا جدول (1) ،(2) ،(3) والصفات المجهرية وكذلك الخواص الحيوية جدول (4) ، (5)وقد أظهرت نتائج التشخيص أنها تعود الى الأنواع البكتيرية غير المكونة للأبواغ وتضم كل من ، *Acinetobacter sp* , *Nocardia sp* ، *Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida,* , *Micrococcus sp* *Actinomyces sp*، *Staphylococcus epidermidis*، *Arthrobacter sp*،*Corynebacterium sp* ومكـونة للأبـواغ وتضـم 9 انواع من بكتريا وهى *Bacillus spp : brevis* ، *(cereus , mycoides)*، *megaterium macerans* ، *badius* ، *lichenformis* ، *firmus* ، *subtilis* ، *polymyxa* واختبر قابلية هذه العزلات على النمو على الهيدروكربونات كمصدر وحيد للكاربون والطاقة بدلالة حساب الأعداد الحية للبكتيريا النامية على النفط الخام ومشتقاته/ مل (CFU/ml) من خلال دراسة وجود المغذيات المعدنية من مركبات النيتروجين والفوسفور كذلك حساب النسبة المئوية لتحلل الهيدروكربونات للتأكد من وجود البكتيريا المحللة للنفط فى عينات التربة الملوثة ومدى قدرتها على التحلل ، وأظهرت النتائج وجود هذه البكتيريا اذ تجاوزت نسبة التحلل للهيدروكربونات 50% ووصلت الى 65% كما يوضح جدول (6) ، وأن معظم العزلات البكترية غير المكونة للأبواغ والمكونة للأبواغ نمت بدلالة اعداد البكتريا الحية التى ظهرت مع إضافة المغذيات وبدونها من خلال تتبع الأعداد الحية للعزلات البكتيرية وجد ارتفاع فى هذه الأعداد خاصة مع وجود المغذيات مقارنة بنسب التحلل التى سجلت من تلك العزلات بدون إضافة المغذيات وقد يعزى ذلك إلى تأقلم البكتيريا للبيئة الملوثة بالنفط الخام، وكذلك إلى تيسر مركبات النفط الخاضعة للتحلل البكتيري التي تعد غذاءاً لهذه البكتيريا إذ أن العدد الميكروبي يعكس الارتباط بالتحلل الحيوي (عويد ،2008) و (Hazen*et, al* .,2003) وتتفق هذه النتائج مع ماورد فى بعض الدراسات(Atlas ,1981) من أن إضافة العناصر المغذية هى المحفزات الحيوية والمحددة لعمليات التحلل الحيوى نظراً لأهمية هذه العناصر في نمو الأنزيمات وبنائها التي تستخدمها الكائنات الحية في تكسير الهيدروكربونات. فالتلوث بالنفط ومشتقاته يضيف باستمرار الكربون إلى البيئة والذي تستهلكه الكائنات الدقيقة كمصدر للكربون ، ولكن نمو هذه الكائنات يتطلب عناصر مغذية أخرى فضلاً عن الكربون. ومن أهم هذه العناصر النيتروجين والفسفور واللذان تحتاجهما الأحياء الدقيقة بتركيزات عالية. وتبين كذلك أن جميع العزلات البكتيرية المكونة وكذلك غير المكونة للأبواغ تمكنت من النمو على النفط الخام ومشتقاته وإن تفاوتت أعدادها وكمية تحلله لهذه المواد ،فقد تبين ارتفاع اعداد البكتيريا غير مكونة للأبواغ عن المكونة للأبواغ مع أو بدون أضافة المغذيات كما فى جداول من 7 الى 10 وإشكال من 1 الى 4 . ويمكن أن يعزى ذلك إلى أن هذه الترب لم تعمل على خلق ظروف غير ملائمة تسود فيها بحكم قدرتها على التبوغ عن المجموعة الأخرى الى جانب النظام الجينى لها وهو الأرجح . وأن البكتيريا سالبة جرام *Pseudomonas putida* كانت من أكثر البكتريا أعدادا ونسبة تحلل ثم *Nocardia* sp عن تلك الموجبة والمتغيرة لجرام بينما كانت *Actinomyces* sp أقل أعدادا وتحليلا وقد يرجع ذلك الى زمن تحلل أو طبيعة المواد الكيميائية النامية عليها وهذا ماأشار اليه بعض الباحثين (الراوي وآخرون 1999 و عويد ، 2008). فى حين البكتريا الموجبة لصبغة جرام *Staphylococcus epidermidis* بعد عزلها من عينات التربة تم أختبار قدرتها على استهلاك هيدروكربونات النفط الخام ومشتقاته فلم تستطع النمو في وسط الأملاح المعدنية واستهلاك أى من المواد الهيدروكربونية ،أما بقية العزلات الأخرى فقد كانت متقاربة فى نتائجها ، كما تبين أن*B . brevis* الأكثر عددا بين العزلات المكونة للابواغ ثم *B. subtilis* ومن النتائج حول مدى قابلية العزلات على النمو على النفط الخام ومشتقاته فأغلب العزلات أظهرت نمو وتحلل أعلى على البنزين واقل على الديزل وهذا يؤكد ماورد فى بعض الدراسات (Stavanger and Edinburgh, 1999) ان النفط الاخف يكون اكثر استعدادا للتحلل الحيوي بفعل البكتيريا من النفط الاثقل منه ، وأيضا ما ورد فى دراسات أخرى (Atlas and Cerniglia1995) إن العديد من الأحياء الدقيقة قادرة على استهلاك الهيدروكربونات النفطية كمصدر للكربون والطاقة وهي واسعة الأنتشار في الطبيعة ، وإن استهلاك الهيدروكربونات النفطية يعتمد بشكل كبير على النظام الجيني وعلى الطبيعة الكيمياوية للمركبات والعوامل البيئية . بعد دراسة كل عزلة على حده تم دراسة قدرة مزيج العزلات البكتيرية على النمـو على النفط الخام ومشتقاته بدون ومع إضافة المغذيات وتبين ارتفاع اعداد وكمية تحلل المواد مقارنة بالعزلات الأنفرادية وكان لإضافة المغذيات تأثيرا ايجابيا أكبر على اعداد ونسب تحلل المواد النفطية وهذه النتائج تتفق مع نتائج دراسات أخرى (Okoh, 2003)(عويد 2008) من أن مزيج العزلات البكتيرية كان الاكفا في تحليل مركبات النفط الخام . من نتائج

التحليل الأحصائى جدول تحليل التباين الأحادى (ANOVA) (11 و 12) لاختبار معنوية المعاملات والتداخل بينهما ، تبين أن إضافة المغذيات كان له تأثيرا معنويا أو ايجابيا على العدد الكلى للعزلات المكونة للأبواغ وغير المكونة للأبواغ ، وبذلك يتضح أن إضافة المغذيات الى جانب توفير مصدر الكربون والطاقة يعجل من نمو وارتفاع العدد الكلى لكل العزلات البكتيرية . لم يكن هناك تأثيرا تداخليا بين إضافة المغذيات ونوعية المشتقات الملوثة على العدد الكلى لكل للعزلات البكتيرية. كما تبين وجود فروق معنوية بين المعاملات فى البكتيريا المكونة للأبواغ وكذلك بين انواع المشتقات النفطية فى وجود المغذيات وبدونها.

جدول (1) الخصائص المورفولوجية للمستعمرات البكتيرية المعزولة "غير المكونة للأبواغ "

الأجناس / الأنواع المحتملة	الشكل	الحافة	الأرتفاع	اللون	الحجم
sp *Micrococcus*	دائرية	كاملة	مرتفعة	صفراء	Mm2
sp *Acintobacter*	غيرمنتظم	غيرمنتظم	مرتفعة	كريمى	0.5×1 Mm
sp *Arthrobacter*	دائرية	كاملة	محدبة	ليمونية	1.9x3Mm
sp Nocardia	كومة قطنية وحبيبات طباشيرية	مجعدة	مرتفعة	أصفر ،ابيض رمادى	1.5x1Mm
sp *Corynebacterium*	غيرمنتظم	مسننة	محدبة	صفراء شفافة	0.5X1.6Mm
aeruginosa Pseudomonas	دائرية، غيرمنتظم	كاملة، مموجة	محدبة ، مرتفعة الوسط	أخضر مزرق	0.7x2Mm
putida Pseudomonas	دائرية، ونقطية	كاملة	مسطحة	أبيض	1x3.3Mm
Actinomyces sp	غيرمنتظم	كومة،دائرية	محدبة	ابيض رمادى	0.5x2Mm
Staphylococcus epidermidis	دائرية، ونقطيــة	كاملة	مرتفعة	ابيض	Mm0.9

جدول (2) الخصائص المورفولوجية للمستعمرات البكتيرية المعزولة "المكونة للأبواغ "

العزلات البكتيرية المحتملة	الشكل	الحافة	الأرتفاع	اللون	الحجم
brevis Brevibacillus	دائرية	كاملة	مرتفعة المركز	كريمى	0.9x3.5Mm
cereus Bacillus (Mycoides)	جذرية	خيطية	مسطحـة	بنية	0.8x1Mm
macerans Bacillus	دائرية	كاملة	كثيرة التحدب	بنية	0.7x3.6Mm
megaterium. Bacillus	غيرمنتظم	غيرمنتظم	مرتفعة	رمادى	3x1.3 Mm
badius Bacillus	جذرية	خيطية	مسطحـة	بنية	0.7x1Mm
lichenformis Bacillus	خيطية	خيطية	مسطحـة	شفافة باهتة	0.7x2.5Mm
firmus Bacillus	دائرية	كاملة	مرتفعة	ابيض	0.6x2.5Mm
subtilis Bacillus	دائرية	كاملة	مرتفعة	رمادى	0.6x2Mm
polymyxa Bacillus	غيرمنتظم	مموجة	مسطحـة	بنية	0.6x4.5Mm

جدول (3) الخصائص المورفولوجية للخلايا البكتيرية المعزولة المكونة / وغير المكونة للأبواغ

الأجناس / الأنواع المحتمـلة	صبغ جرام	صبغ الأبواغ	الصبغ المقاوم للأحماض
sp *Micrococcus*	+	-	-
sp *Acintobacter*	-	-	-
sp *Arthrobacter*	V	-	-
sp *Nocardia*	+	-	+
sp *Corynebacterium*	+	-	+
aeruginosa Pseudomonas	-	-	-
putida Pseudomonas	-	-	-
Actinomyces sp	-	-	V
Staphylococcus epidermidis	+	_	_
brevis Brevibacillus	V	O/ CTS	_
cereus Bacillus	+	O /T	_
(Var .Mycoides)			
macerans Bacillus	V	O /T	_
megaterium. Bacillus	+	O /C	_
badius Bacillus	V	O/ CT	_
Bacilluslichenformis	+	O /C	_
firmus Bacillus	+	O /C	_
subtilis . Bacillus	+	O /C	_
polymyxa Bacillus	V	O/ CTS	_

حيث تدل الرموز التالية ،(+)النتيجة الموجبة للفحص ، (-) النتيجة السالبة للفحص ، (V)متغيرة ،(موقع حافظة البوغ **:** C مركزى ، Tطرفى ،S شبه طرفى _ شكل حافظة البوغ : Oبيضـوى)

جدول (4) الأختبارات الكيموحيـوية للعزلات البكتيرية غي المكونة للأبواغ

العزلات البكـتيرية / الأختبارات الكيموحيوية	*Arthobacter sp*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Pseudomonas putida*	*Micrococcus sp*	*Acinetobacter sp*	*Nocardia sp*	*Corynebacterium sp*	*Staphylococcus epidermidis*	*Actinomyces sp*
الأوكسيديز	-	+	+	–	-	–	–	–	–
الكتاليز	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(أ) (الأكسدة والتخمر) / مصدر عضوى: _ الجلوكوز	–/+	+	+	–/+	–/+	+	+	+	+
اللاكتـوز	-	-	–	–	–/+	–	–	**V**	–
مالتـوز	–/+	–	**V**	–	-	+	+	+	+
مانيتـول	–/+	+	**V**	–	–/+	–	–	–	+
(ب) مصدر غير عضوى :- املاح الأمـونيوم $NH_4H_2PO_4$	+	–	–	–/+	-	–	–	–	–
إستهلاك السترات	+	+	+	–	-	–	–	–	–
تحلل النشـأ	–/+	–	–	–	-	–	–	–	+
تميع الجيلاتين	+	+	–	–/+	–/+	–	–	**V**	+
اختزال النترات	+	+	**V**	**V**	-	+	–	**V**	+

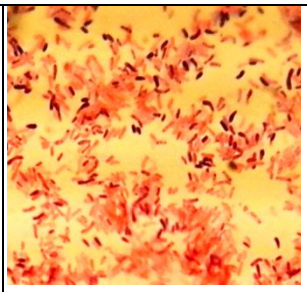
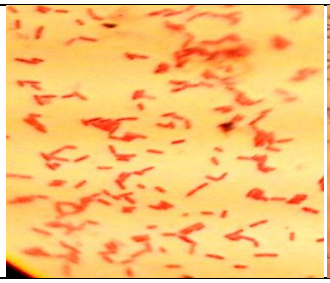
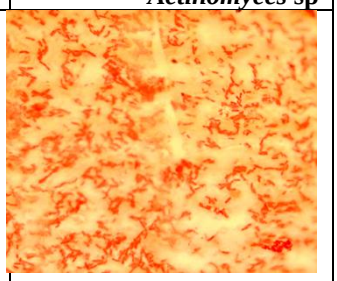
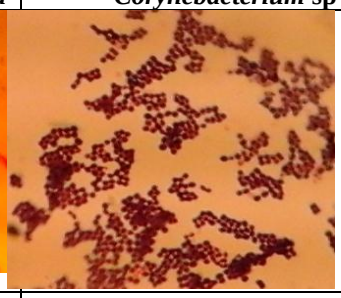
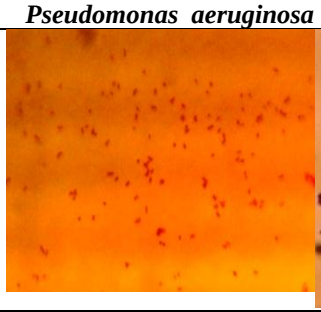
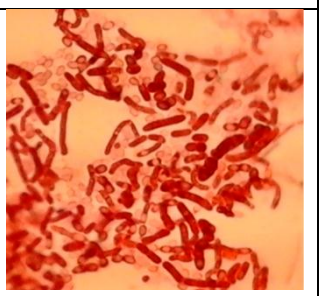
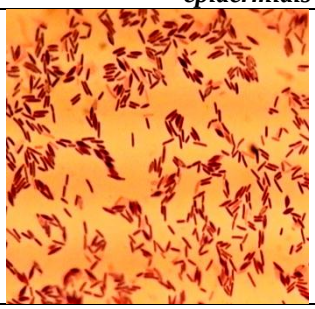
الحركة	+	+	+	_	-	-	_	_	_
النمـو على :- آجـار الحديد الثلاثى السـكر (TSI)	ق/ح	ق/ح	ق/ح	_	-	_	_	ق/ح	_
آجـار الماكونكى	_	+	+	_	+	_	_	_	_
آجار المغـذى	+	+	+	+	+	+	+	+	_
نوع تحلل الدم	γ	α	γ	γ	γ	γ	γ	γ	γ

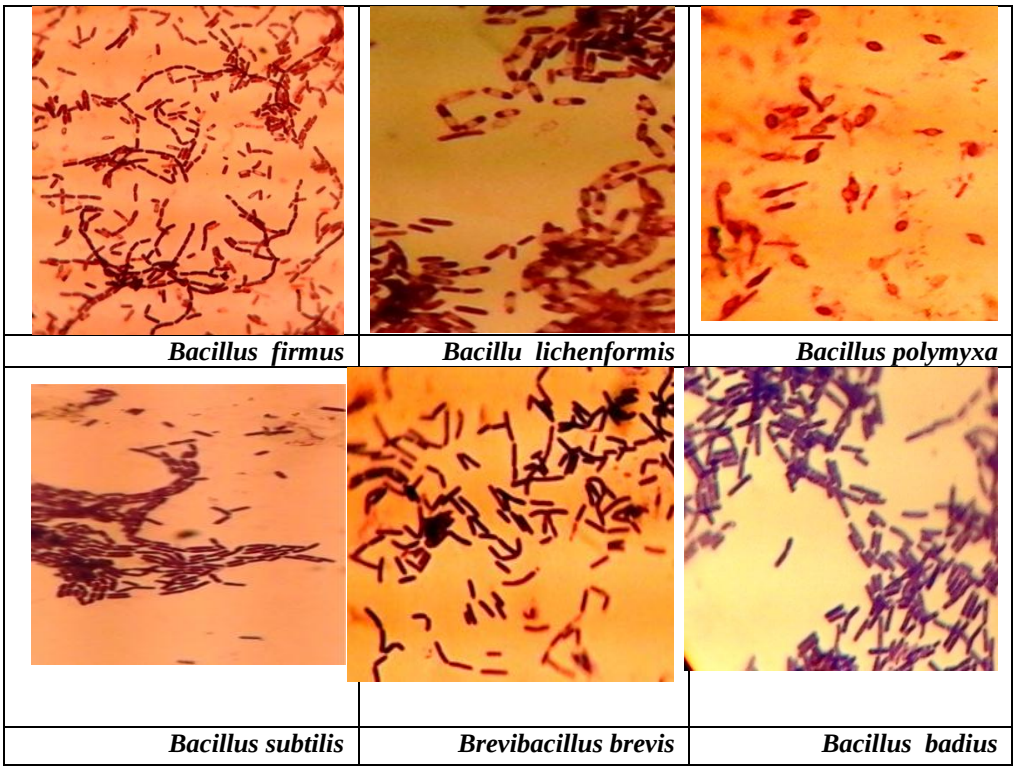
(+) النتيجة الموجبة للفحص ، - النتيجة السالبة للفحص ،(β)تحلل كامل للدم ، (α) تحلل جزئي للدم ، (γ) لا يوجد تحلل للدم، (ق/ح) قاعدي/حامضي ، (ح / ح) حامضــى / حامضــى ،(V) متغيرة ، (∓)ضعيف ، (±) تحلل غير كامل

جدول (5) الأختبارات الكيموحيـوية للعزلات البكتيرية المكونة للابواغ

العزلات البكـتيرية / الأختبارات الكيموحيوية	*Brevibacillus. brevis*	*B.cereus (mycoides)*	*B . macerans*	*B.megaterium*	*B. badius*	*B. lichenformis*	*B . firmus*	*B . subtilis*	*B . polymyxa*
الأوكسيديز	+	_	_	_	_	+	+	_	+
الكاتاليز	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(أ)(الأكسدة والتخمر) عضوى: _ الجلوكوز	_	_	+	+	_	+	∓	+	+
اللاكتوز	_	_	+	∓	_	+	_	_	_
مالتـوز	+	_	+	_	_	+	+	+	_
مانيتول	∓	_	+	+	_	+	+	+	_
(ب) غير عضوى :- املاح الأمـونيوم **$NH_4H_2PO_4$**	_	_	_	_	_	+	_	_	_
إستهلاك السترات	_	_	_	+	_	+	∓	+	_
تحلل النشـأ	_	+	+	+	∓	+	_	+	+
تميع الجلاتين	+	∓	+	+	∓	+	+	+	+
اختزال النترات	_	∓	+	+	_	_	±	+	+
الحركة	_	_	+	+	_	+	∓	+	+
النمـو على :- آجـار الحديد الثلاثى السـكر (TSI)	_	_	ق/ح	ق/ح	_	ق/ح	_	ق/ح	_
آجـار االماكونكى	_	_	_	_	_	_	_	+	∓
آجار المغـذى	+	+	+	+	+	+	+	+	+
نوع تحلل الدم	β	β	γ	α	γ	γ	γ	β	γ

(+) النتيجة الموجبة للفحص ، (-) النتيجة السالبة للفحص ، (β)تحلل كامل للدم ، (α) تحلل جزئي للدم ، (γ)لا يوجد تحلل للدم،(ق/ح) قاعدي/حامضي ، (ح / ح) حامضــى / حامضــى ، (V)متغيرة ، (∓)ضعيف ، (±)موجبة فى أغلب العينات .

صـور مجهـرية للعزلات البكتيرية المكونة وغير المكونة للألبــواغ المحللة للهيدروكربونات		
		
Nocardia . sp	***Arthrobacter* .sp**	***Micrococcus* .sp**
		
***Actinomyces* sp**	***Corynebacterium* sp**	***Pseudomonas aeruginosa***
		
Pseudomonas putida	***Staphylococcus epidermidis***	***Acintobacter* sp**
		
Bacillus megaterium	***Bacillus macerans***	***Bacillus cereus (mycoides)***

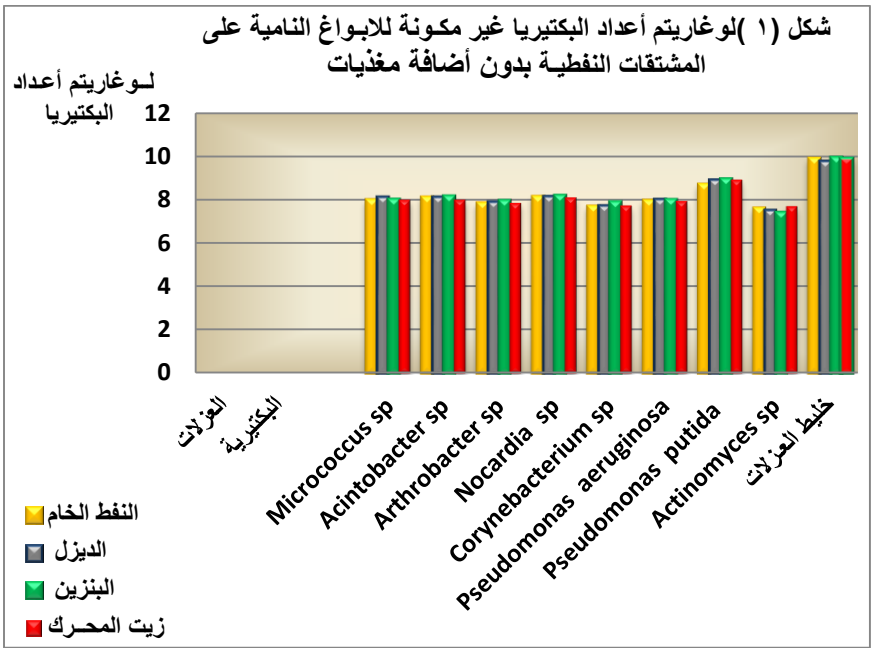


جدول(6): العدد الكلى للبكتيريا في الترب الملوثة وكمية الهيدروكربونات المتبقية والمستهلكة [كمية الهيدروكربونات المضافة(2gm)]

العينـات/ محطات	العدد الكـلىgm/cell	هيدروكربونات متبقيةgm	هيدروكربونات مستهلكةgm	النسبة المئوية لتحلل
تغييرزيوت تاجوراء	10^8 ×1.32	0.85	1.15	57.5
تغييرزيوت غوط الشعال	10^6 ×2.21	0.95	1.05	52.5
تغييرديزل الهضبة الشرقية	10^6 ×1.76	0.99	1.01	50.5
تربةمحيطة بأنابيب نقل البترول	10^6 ×1.95	0.72	1.28	64
بنزين وديزل جنزور	10^6 ×1.85	0.82	1.18	59
نفط خام	10^7 ×1.27	0.70	1.30	65

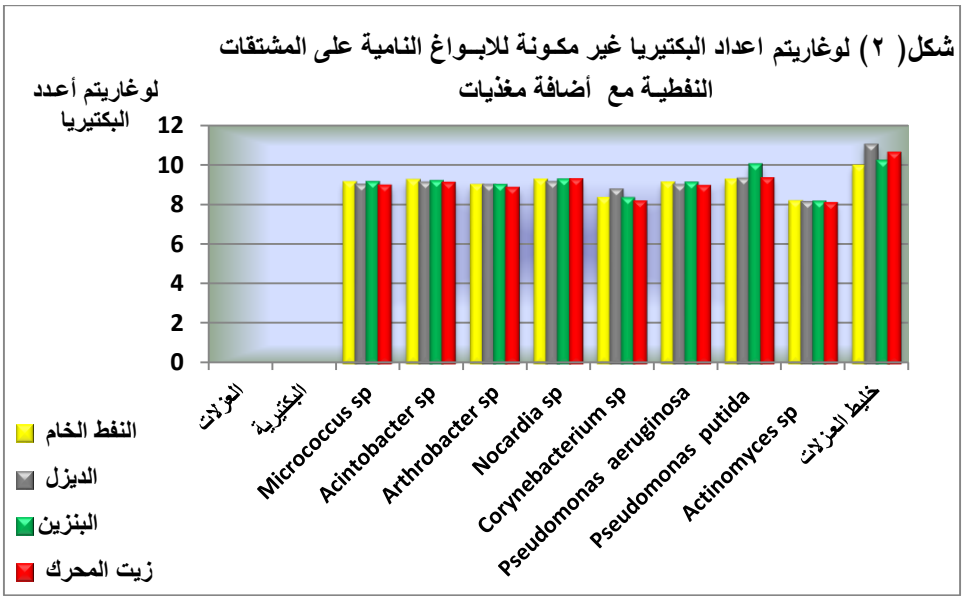
جدول (7) لوغاريتم أعداد البكتيريا غير المكونة للأبواغ النامية على المشتقات النفطية بدون إضافة المغذيات

المشتقات النفطيــة / العزلات البكتيرية	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحرك
sp *Micrococcus*	8	8.1	8	8
sp *Acintobacter*	8.12	8.11	8.15	8
sp *Arthrobacter*	7.85	7.89	7.94	7.86
sp *Nocardia*	8.15	8.13	8.18	8.11
sp *Corynebacterium*	7.7	7.7	7.89	7.73
aeruginosa Pseudomonas	7.97	8	7.98	7.94
putida Pseudomonas	8.72	8.89	8.94	8.92
Actinomyces sp	7.62	7.5	7.39	7.71
خليط العزلات	9.9	9.75	9.92	9.88



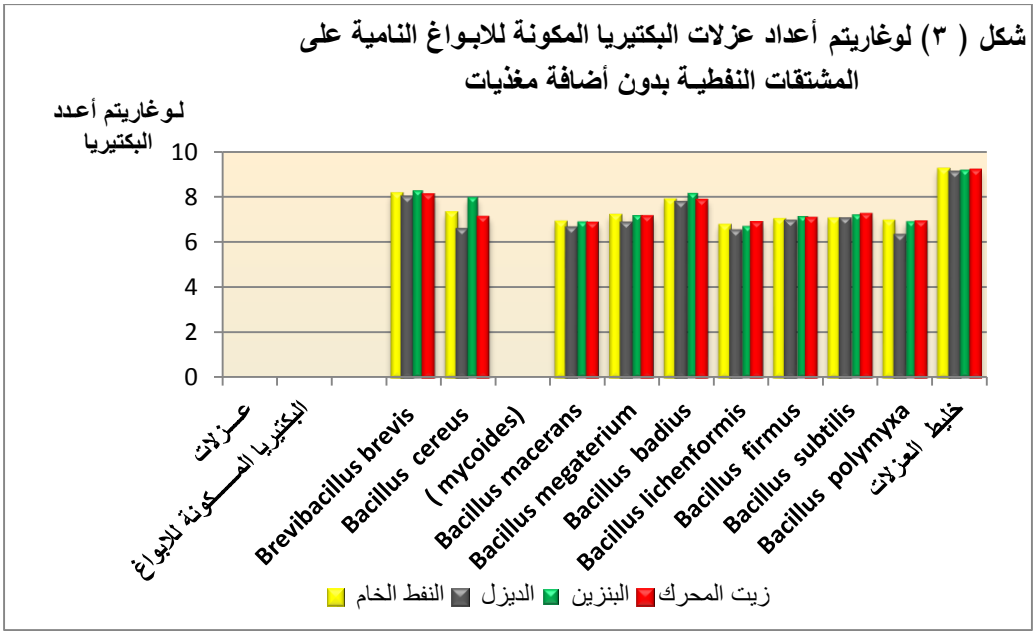
جدول (8) لوغاريتم أعداد البكتيريا غير المكونة للأبواغ النامية على المشتقات النفطية مع اضافة المغذيات

المشتقات النفطيـــة / العزلات البكترية	النفط الخام	الديزل	البنزين	زيت المحـرك
Micrococcus sp	9.08	8.95	9.09	8.9
Acintobacter sp	9.2	9.06	9.15	9.04
Arthrobacter sp	8.94	8.93	8.95	8.79
Nocardia sp	9.21	9.08	9.22	9.23
Corynebacterium sp	8.29	8.7	8.28	8.11
Pseudomonas aeruginosa	9.07	8.94	9.06	8.88
Pseudomonas putida	21.9	9.26	9.99	9.28
Actinomyces sp	8.13	8.08	8.1	8.02
خليط العـزلات	9.91	10.96	10.16	10.56



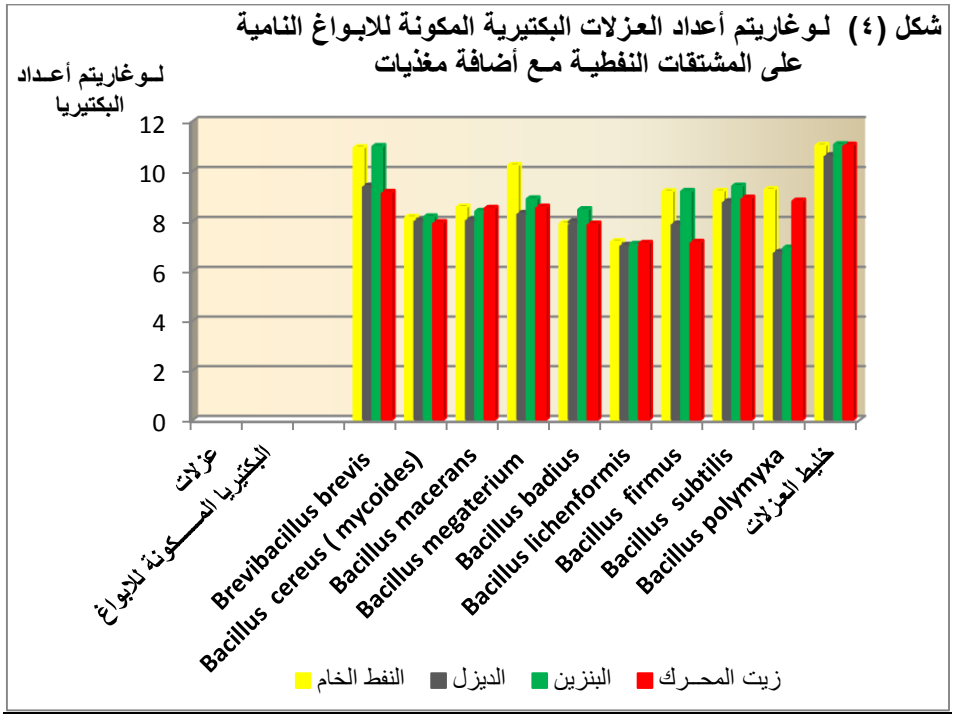
جدول (9) لوغاريتم أعداد العزلات البكتيرية المكونة للأبواغ النامية على المشتقات النفطية بدون إضافة المغذيات

المشتقات النفطيـــة / عـــزلات البكتيرية	النفط الخام	البنزين	الديزل	زيت المحـرك
brevis .Brevibacillus	8.14	8.27	7.96	8.08
cereus . Bacillus (Var .Mycoides)	7.3	7.98	6.54	7.08
macerans . Bacillus	6.89	6.9	6.62	6.82
megaterium. Bacillus	7.18	7.18	6.82	7.11
badius . Bacillus	7.86	16.8	7.73	7.83
lichenformis . Bacillus	6.74	6.7	6.49	6.85
firmus . Bacillus	6.99	7.14	6.91	7.04
subtilis . Bacillus	7.03	7.21	7.01	7.21
polymyxa . Bacillus	6.93	6.91	6.29	6.89
خليط العزلات	9.21	9.18	9.06	9.16



جدول (10) لوغاريتم أعداد العزلات البكتيرية المكونة للأبواغ النامية على المشتقات النفطية مع إضافة المغذيات

المشتقات النفطيـــة / عزلات البكتيرية	زيت المحـرك	البنزين	الديزل	النفط الخام
Brevibacillus brevis	9.15	10.99	9.4	10.94
Bacillus cereus (var. mycoides)	7.94	8.17	8.02	8.15
Bacillus macerans	8.51	8.39	8.05	8.56
Bacillus megaterium	8.56	8.89	8.31	10.23
Bacillus badius	7.88	8.46	7.98	7.9
Bacillus lichenformis	7.11	7.07	7.03	7.18
Bacillus firmus	7.15	9.19	7.89	9.18
Bacillus subtilis	8.92	9.4	8.78	9.19
Bacillus polymyxa	8.8	6.92	6.75	9.26
مـزيج العـزلات	11.04	11.06	10.62	11.03



التحليل الأحصائى

جدول (11) تحليل التباين(ANOVA) للعدد الكلى للبكتيريا غير مكونة للأبواغ

مصدرالتباين S.O.V	درجات الحرية d.f	مجموع الانحرافات المربعة (SSQ)	متوسط الانحرافات المربعة (M.S)	المحسوبةF	الجدوليةF ∞0.05
الكلية Total	71	166.29	–	–	
Treatment المعاملات	7	27.28	3.90	1.79 n.s	2.17
Aالمشتقات النفطية	3	0.42	0.14	0.07 n.s	2.76
Bإضافة المغذيات	1	9.41	9.41	4.33 **	4.00
ABالتداخل	3	17.43	5.81	2.68n.s	2.76
الخطأ error	64	139	2.17		

** الفروق معنوية ، n.s لاوجود لفروق معنوية.

جدول (12) تحليل التباين(ANOVA) للعدد الكلى للبكتيريا المكونة للأبواغ

(مصدر التباين) S.O.V	(درجات الحرية d.f)	(مجموع الانحرافات المربعة (SSQ)	(متوسط الانحرافات المربعة (M.S)	المحسوبةF	الجدوليةF ∞0.05
الكلية Total	79	115.69	–	–	
Treatment المعاملات	7	44.17	6.31	6.37 **	2.17
Aالمشتقات النفطية	3	4.28	1.42.	1.44n.s	2.76
Bإضافة المغذيات	1	38.71	38.71	39.1 * *	4.00
ABالتداخل	3	1.18	0.394	n.s0.39	2.76
الخطأ error	72	71.51	0.99		

** الفروق معنوية ، n.s لاوجود لفروق معنوية

المــراجــع

الخفاف، عبد علي ، ثعبان كاظم خضير. 2000 الطاقة وتلوث البيئة .الفصل الثاني، تلوث البيئة، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، الطبعة الأولى، عمان، الأردن، 61 صفحة.

الشناوى ، كوثر السيد فهمى .2010. المعالجة البيولوجية للملوثات النفطية فى بعض شواطىء المملكة العربية السعودية . كلية العلوم للبنات . جامعة الملك عبد العزيز .

الشناوى ، كوثر ؛ على ناصرحسن ؛ ايمان ذياب ؛ مجدى مداور و محمد المنيرى . 2010. قدرة المجتمعات الميكروبية فى التربة الطفلية المصرية على التحلل البيولوجي لزيت البترول . جامعة عين شمس _ معهد الدراسات والبحوث البيئية _ جامعة عين شمس _ كلية العلوم مركز بحوث الصحراء .

الراوي، أميرة محمود؛حسن خالد العكيدي ومحسن أيوب، . 1999 التحلل الحيوي لأنواع من النفط الخام بفعل البكتريا*Bacillus subtilis* مجلة التربية والعلم، العدد . 37

جارالله، إيمان محمد .2008.بكتيريا مكسرة للهيدروكربونات المعزولة من ترب ملوثة بالمشتقات النفطية . ماجستير . كلية العلوم .جامعة بابل .

عويد، ياسين محمد . 2008 الفعل الانفرادي والمشترك لبعض العزلات البكتيرية على التحلل الحيوي –2 لنفط خام كركوك المتوسط .مجلة علوم الرافدين . المجلد 19 : العدد 4، ص 101_115.

عزيز ، ايمان محمد ؛ أديبة يونس شريف . 2012 قابلية أنواع بكتريا*Micrococcus* المعزولة من التربة على تحليل مركب الديزل – الموصل . رسالة ماجستير . كلية العلوم ، قسم علوم الحياة ، جامعة الموصل.

عبد الرازق ، هالة عبد الحافظ . 2012 . أختبار قابلية العزلة المحلية *Nocardia asteroids* على انتاج المستحلبات الحياتية واستهلاك النفط الخام . مجلة مركز بحوث التقنيات الأحيائية ، المجلد السادس – العدد الثانى . العراق

Alexander, M. 1999. "Biodegradation and Bioremediation". 2nd edn. Academic Press, San Diego pp.88-90.

Al-Sayigh, H.Y. 1978. Studies on Q aiy arach crude oil fractionation of crude oil and thermal cracking of its heavy constituent. A thesis of Master of Science. Department of Chemistry, College of Science, University of Mousal-Iraq.

Al-Dobouni, I. A. K. 1977. Qaiyarah crude oil studies to assess potentials. A thesis of Master of Science. Department of Chemistry. College of Science-University of Mosul-Iraq.

Atlas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbial. Rev. 45: 180-209.

Atlas, R.M. and Cerniglia, C.E. 1995. Bioremediation of petroleum pollutions: diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. Biological Science, 45(5) :332-338.

Arafa, 2003. Biodegradation of some aromatic hydrocarbons (BTEXs) by a bacterial consortium isolated from polluted site in Saudi Arabia. Pak. J. Biol. Sci. 6(17): 1482-1486.

Boboye, B., O.F. Olukunle and F.C. Adetuyi, 2010. Degradative activity of bacteria isolated from hydrocarbon-polluted site in Ilaje, Ondo State, Nigeria. Afr. J. Microbiol. Res., 4: 2484-2491.

Collee , J.G, Miles, R.S ,Wan, B. 1996 Tests for the identification of bacteria. 14th ed. Edinburg:
churchill livingstone.

Cruickshank, R.Daguid, j,marmion and Swain,R. 1975. Medical microbiology, Churrchill livingstone. London .UK

Hazen, T.C., Tien, A.J., worsztynowicz, A., Altman, D.J., Ulfig, K. and Manko, T. 2003. Biopiles for remediation of petroleum–contaminated soils : Apolish case study.l awrence berkeley national laboratory .Institute for Ecology of Industrial Areas. pp.1-15. Poland

Jacobucci, D.F.C., Vasconcelos, C.K., Matsuura, A.B., Falconi, F.A. and Durrant, L.R. 2001. Degradation of diesel oil by biosurfactant –producing bacterial strains. The association for environmental health and sciences. food engineering faculty. companies state university. unicamp companies – Brazil advanced technology. pp.1-8.

Juteau, P., Bisaillon, J.G., Lepine, F., Ratheau, V., Beaudet, R. and Villemur, R., 2003. Improving the biotreatment of hydrocarbons –contaminated soils by addition of activated sludge taken from the waste water treatment facilities of an oil refinery. Bioremediation. 14: 31-40.

Koren, O.; Knezevic, V.; Eliora, Z.R.and Rosenberg, E., 2003. Petroleum pollution bioremediation using water-in soluble uric acid as nitrogen source. Apple. Environ. Microbiol., 6(10): 6337-6339.

Lai, B., Mishra, S., Bhattacharya, D. and Sarma, P.M., 2001. Biotechnological approach to manage oily sludge. Proc of the 4th Int. Petr. Conf & Exhib 195 – 196. R and D centre. Indian oil Corp.

MacFaddin, J. F. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. Williams and Wllkins co. USA .

Mittal, A., P. Singh, 2009. Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spill. Indian J. Exp. Biol., 47: 760-765.

Murray, P.R.,2003.Manual of clinical microbiology .8th ed. washington,DC,USA.

Nadaling TN, Raymond M, Gilewiez S and Budzinisk H. 2000.Development of a protocol to study aerobic bacterial degradation of PAHs . polycyclic Aro. Comp. 18: 177-192

Ojo, O.A., 2006. Petroleum-hydrocarbon utilization by native bacterial population from A waste water canal south west nigeria. african J of Biotech .5: 333-337.

Okoh, A.I., 2003. Biodegradation of bonny light crude oil in soil microcosm bysome bacterial strains isolated from crude oil flow stations saver pits in nigeria. african. J of Biotech.. 2: 104 – 108.

Olukunle ,O.F. , 2013. Characterization of indigenous microorganisms associated with crude Oil-polluted soils and water using traditional techniques. Microbiol J . 3: 1-11.

Phillips, C., 2003. Oil and environment. crude energy. Teaching guide. Oil and the environment. Technology Advanced, pp. 1-4.

Philips, U.A. and Traxler,R.W . 1963 Microbial degradation of asphalt apple . Microbiol. 11:235-238

Rahman K.S, Rahman T, Lakshmanaperumalsamy ,P.and Banat, I.M .2002 Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. J basic microbiol 42:284-291

Sanchez ,O, Ferrera I, Vigues N, Garcia de Oteyza T, Grimalt JO, Mas J, 2006. Presence of opportunistic oil-degrading microorganisms operating at the initial steps of oil extraction and handling. International Microbiology 9: 119-24

Song, H.G.and Bartha, R. 1990. Effect of jet fuel spills on the microbial community of soil. Appl. Environ. Microbiol, 56: 646- 651.

Stavanger and Edinburgh 1999 Project 2.3.Natural Degradation and estimated recovery time-scale.U kooa Drill Cuttings Initiative Research and Development Programe.Environmental and Resource Technology Rogaland Research . 1-105.

Wilson, J.J., Hatcher, J.F. and Goudey, J.S., 2002. Ecotoxicological endpoints for contaminated site remedation. hydroqual laboratories Ltd, Calgary. Ann 1st super sanita. 38(2): 143–147.

Wright, M.A., Taylor, F., RandleS, S.J., Brown, D.E., Higgins, I.J. 1993. Biodegradation of a synthetic lubricant by *Micrococcus roseus*. Applied Environ Microbiol, 59 (4): 1072-1076.

Zhu, X., Venosa, A.D., Suidan, M.T. and Lee, K., 2004. Guidelines for the bioremedation of oil–contaminated salt marshes. national risk management research laboratory. Office of Res and Development USA. Environ Protec. Agency, Cincinnati,. 68: 1-57.

Isolation and identification of bacteria prevailing in soils contaminated with oil and its derivatives and their ability to consume of hydrocarbons

Abstract

This study was conducted to identify the composition of the microbial prevailing in contaminated soils and determine the ability for consumption of hydrocarbons . Soil samples were taken from different areas contaminated with hydrocarbon materials represented in oil derivatives and a sample of light oil crude taken from soils under filter pipes,fuel stations of gasoline and diesel and places where cars change oils and lubricants (the following stations ,Tajura _ Alshrkia El Hadaba _ Got Alshall _ Janzur _fil field) . 18 bacterial isolates at the level of genus and/ or the species were obtained identified on basis of morphology and microscopic . The ability of bacteria to settle naturally in environments contaminated with oil and various hydrocarbons was assessed. The viable numbers of isolated bacteria during the growth on liquid culture media containing crude oil and its derivatives with aconcentration of 1% were counted . Most spore formers isolated bacteria as well as non-spore formers showed the ability to grow well on . These results were true with and without addition of nutrients . Among gram negative and positive bacteria , *Pseudomonas.putida* and *Nocrdia*. sp gave the highest counts, respectively . *Actinomyces* sp was the lowest count among the other spore formers bacteria while *Brevibacillus brevis* , *Bacillus megaterium* and *B. subtilis* were the most non-spore formers counts . These species could be put in a descending order according to their numbers . In conclusion , the bacterial isolates obtained in this study could be used in the treatment of environmental pollution caused by hydrocarbons waste since these isolates have high ability for consuming petroleum products as a carbon and energy sources .