P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2015 ,(9), (3) :121-129
مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)
Open Access

اختبار كفاءة تحلل الهيدروكربونات بواسطة بكتريا معزولة من ترب ملوثة بالمشتقات النفطية

ظافر فخري عبد القادر هونر هيوا عارف عدنان علي حماد

جامعة الانبار – كلية التربية للعلوم الصرفة

معلومات البحث:
تاريخ التسليم: ٢٠١٣/٠٠/٠٠
تاريخ القبول: ٢٠١٤/٥/٦
تاريخ النشر: / / ٢٠٢٢

DOI: 10.37652/juaps.2015.127621

الكلمات المفتاحية:
النفط الخام،
Pseudomonas aeruginosa،
تشخيص البكتريا.

الخلاصة:
تضمنت هذه الدراسة التعرف على كفاءة البكتريا في تحلل الهيدروكربونات أذ عُزلت 38 عزلة بكتيرية محللة للهيدروكربونات من 5 نماذج ترب ملوثة جمعت من مصافي وخزانات في محافظة السليمانية، و استعمل عينات نفط كركوك الخام المتوسط من مصفى بيجي، شُخصت العزلتين المحليتين المنتخبة بالاعتماد على الفحوصات المظهرية والزرعية والكيموحيوية، اظهرت النتائج أن العزلة (B22) *Pseudomonas aeruginosa* و العزلة (D32) *Bacillus cereus* كانت الاكفأ بين العزلات في تحلل الهيدروكربونات.

دُرِست قابلية العزلتين المحللة لهيدروكربونات النفط الخام من خلال تنميتها على وسط الأملاح المعدنية بفترات حضن مختلفة (120, 96, 72, 48, 24) ساعة والحاوي على تراكيز مختلفة من النفط الخام (3, 2, 1, 0.5)% وتبين من خلال النتائج كانت افضل مدة حضن هي 120 ساعة حيث قدرت النسبة المئوية لاستهلاك النفط الخام بفعل بكتريا *P. aeruginosa* (42.1%)، اما بكتريا *B. cereus* فبلغت النسبة (32.8%)، اما بفعل اللقاح المزدوج المحضر من نوعي البكتريا فبلغ نسبة الاستهلاك(51.07 %)، و ان افضل تركيز كان (1%) حيث بلغت نسبة استهلاك النفط الخام بفعل العزلة *P. aeruginosa* عند هذا التركيز (35.8%)، اما العزلة *B. cereus* فكانت نسبة الاستهلاك (27.2%)، اما بفعل القاح المزدوج المحضر من نوعي البكتريا فوجد ان اللقاح المزدوج كان اكثر كفاءةً في استهلاك الهيدروكربونات من كل من العزلتين على حده، و كانت نسبة الاستهلاك (50.7%).

المقدمة :-

النفط الخام هو مزيج معقد من المركبات الهيدروكربونية العطرية و البارافينية والاليفاتية، مع الاوكسجين والنتروجين والمركبات المحتوية على الكبريت ومواد اخرى تحتوي على معادن عضوية وغير عضوية (١).

ذكر (2) أن النفط الخام يتكون من مجموعة من المركبات الهيدروكربونية المتميزة كيميائيا والتي تتطلب آليات محددة للتفعيل والاستهلاك.

حدد كثير من العلماء أنواع مختلفة من الكائنات الحية الدقيقة التي لها القابلية على استهلاك المركبات الهيدروكربونية الفعالة في البيئة الطبيعية، مثل البكتريا والفطريات والخمائر والطحالب(٣).

إن الترية الملوثة بالبترول تحتوي على مواد متنوعة خطرة مثل الهيدروكربونات العطرية و الهيدروكربونات العطرية المتعددة الحلقات، وهي ذات قدرة سامة ومطفرة ومسرطنة للإنسان والحيوانات والنباتات(4).

يعد الديزل احد المشتقات المهمة للنفط الخام والتي تساهم بشكل رئيسي في تلوث التربة،مع ازدياد الطلب على الديزل كوقود في السيارات والشاحنات والمولدات والمكائن الصناعية و لكونه ينقل عبر مسافات طويلة فأنه يلوث التربة خلال حوادث التسرب (5).

* Corresponding author at: University of Anbar - College of Education for Pure Sciences
E-mail address:

تنتشر البكتريا والفطريات المحللة للهيدروكربونات على نطاق واسع في المناطق البحرية والمياه العذبة والتربة إذ تم الكشف عن Cyanobacteria المحللة للمواد الهيدروكاربونية، ومجموعات بكتيرية معروفة لها القدرة على تحلل المواد الهيدروكاربونية تشمل *Pseudomonas*،*Marinobacter*،*Alcanivorax* ، *Sphinogomonas*،*Micrococcus*، *Gordonia* *Cellumonas* (6). ذكر (7) ان الكائنات الحية الدقيقة المنتشرة في التربة تستعمل الهيدروكربونات النفطية كمصادر للكربون والطاقة بعملية التحلل الحيوي للنفط الخام وتنتج مركبات فعالة سطحية

إنَّ عملية المعالجة الحيوية واحدة من افضل الطرق لاستعادة التربة الملوثة وذلك باستعمال الكائنات الحية الدقيقة التي تحلل الهيدروكربونات النفطية السامة، وإنها عملية بسيطة وفعالة من حيث التكلفة وتنطبق على مساحات واسعة مما يؤدي الى تحلل كامل للملوثات (8).

المواد وطرائق العمل

عينات النفط الخام

جُلبت عينات نفط كركوك الخام المتوسط من مصفى بيجي باستعمال قناني زجاجية معقمة ومعتمة ومعلمة وأُحكم غلقها وحفظت في مكان بارد لحين الاستعمال.

عينات التربة

جمعت عينات التربة من عمق (٢-١٠) سم من مواقع مختلفة في مصافي وخزانات اهلية في مدينة السليمانية والمذكورة على التوالي (خزانات قيوان، خزانات هاوين، مصفى سوران، مصفى هيوا،مصفى خاوين)ووضعت في اكياس بلاستيكية معقمة ومعلمة، ونقلت الى المختبر.

عزل البكتيريا المحللة للنفط الخام المستخدمة في هذه الدراسة

أ- وسط الاملاح المعدنية BHM

حُضر الوسط تبعاً لـ Malatova عام 2005 يتكون هذا الوسط من الأملاح الأتية :- KNO_3(1g) – KH_2PO_4 (1g) – $CaCl_2$ (0.02g) – $MgSO_4$ (0.2g) – $(NH_4)_2SO_4$ (1g) $FeCl_3$ (0.05g) المركز، تذاب هذه الأملاح الواحد تلو الأخر في لتر من الماء المقطر و عُدل الأس الهيدروجيني الى ٧ ثم عقم بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة ١٢١°م لمدة ١٥ دقيقة. استعمل هذا الوسط في تجربة قياس نسبة الفقدان الكمي للنفط الخام.

ب- وسط اختياري لبكتريا *Bacillus cereus* Selective Agar – base (MYP)

حُضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة بإذابة 43 g من وسط *Bacillus cereus* Selective Agar– base (MYP) في 900 ml من الماء المقطر وأُكمل الحجم الى 1000 ml، ثم عقم بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة ١٢١°م لمدة ١٥ دقيقة برد الوسط الى درجة حرارة 45 – 50 مئوية ثم اضيف 100 ml من مستحلب صفار البيض Egg yolk emulsion وأُضيف 2 ml من محلول Polymyxin B استعمل هذا الوسط لاختيار بكتريا *Bacillus cereus* واختبار قابليتها على انتاج انزيم اللسيثينيز lecithinase.(9)

جـ وسط الأكار المغذي:

حُضّر بإذابة (28g) من الاكار المغذي في لتر من الماء المقطر ، ثم عقم بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة ١٢١°م لمدة ١٥ دقيقة، وأُستعمل الوسط لغرض العزل الأولي ودراسة الخواص المزرعية والمظهرية للبكتريا المعزولة.

د – وسط السترمايد اكار

حُضر الوسط بإذابة (46.7 g) من اكار السترمايد في لتر من الماء المقطر، ثم عقم بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة ١٢١°م لمدة ١٥ دقيقة، و استعمل الوسط كونه وسط انتقائي لبكتريا *Pseudomonas*.

هـ – وسط اكار الدم الاساس

حُضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة،، ثم عقم بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة ١٢١°م لمدة ١٥ دقيقة وترك ليبرد بدرجة حرارة ٤٥ مئوية، ثم اضيف اليه دم الانسان بنسبة ٥% مزج جيدا، استعمل هذا الوسط للكشف عن قدرة العزلات البكتيرية على انتاج الانزيم الحال hemolysin.(10)

B. cereus

P. aeruginosa

شكل (١) يوضح نمو العزلات ونوع التحلل على وسط اكار الدم

قدرة العزلات البكتيرية على تفكيك وسط الهيدروكربون الصلب

اخذت عينة وزنها (1 g) من كل نوع تربة وعُمل لها تخافيف عشرية ثم نقل (1 ml) من كل من التخفيفين الرابع والخامس من انابيب الاختبار الى اطباق بتري، وبعد ذلك صُب وسط الأملاح المعدنية في الاطباق تركت للتصلب، ثم رش على الاطباق محلول ايثري النفط الخام (v/v 10%)، حضنت الإطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 °م لمدة 72 ساعة، تكررت العملية مرات عديدة استعمل هذا الوسط لغربلة العزلات الكفوءة والقادرة على تحليل المركبات الهيدروكاربونية عن غيرها.

الغربلة الثانوية واختيار العزلات الأكثر كفاءة

بعد اختيار العزلات القادرة على تحليل النفط الخام وأكفأها من الغربلة الأولية نُميت مرة أخرى على وسط الاملاح المعدنية، ولمعرفة أكفاء العزلات يتم ذلك من خلال تشكيل المنطقة الواضحة (الشفافة)، وذلك من خلال رش محلول أثيري النفط الخام (10% v/v) بشكل موحد على سطح أطباق وسط أكار BHM الصلبة إذ ان ثنائي اثيل أيثر يتبخر فورا ويتبقى طبقة من النفط الخام على سطح الأكار، وزرعت العزلات البكتيرية النقية التي تم الحصول عليها مسبقا، وذلك بنشرها على دائرة قطرها (1 سم) في منتصف إطباق BHM الصلبة بواقع ثلاث مكررات لكل عزلة، ثم حضنت الإطباق بدرجة حرارة °C 37 ولمدة (24-144)ساعة وقد اختيرت العزلات البكتيرية التي أعطت قطرا أكبر . (11)

تشخيص العزلات المنتخبة في الدراسة

شُخصت عزلتان بكتيرية من مجموع العزلات المحللة للنفط الخام من موقعين بيئيين مختلفين وهي عزلة B22 من خزانات هاوين، وD32 من مصفى هيوا، وحُدد حجم المستعمرة ولونها ودراسة قوامها، بعد التأكد من إن تلك المستعمرات مشابهة لمستعمرات بكتريا *Bacillus cereus* و*Pseudomonas aeruginosa* وبعد تنميتها على اوساط انتقائية (MYP, Cetrimide) اختيرت عينة من المستعمرات المماثلة لصفات هذه البكتريا، وذلك بأخذ مسحة بواسطة لوب الزرع ونشره على شريحة زجاجية معقمة وتثبيته، ومن ثم تصبيغة بصبغة كرام ومعاينة شكل الخلية البكتيرية وموقع السبورات فيها، و عن طريق اختبار الاوكسديز والكتاليز والاندول والمثيل الاحمر واستهلاك السترات و اختبار اليوريز والحركة.(12)

دراسة الظروف البيئية المثلى لنمو العزلات البكتيرية المحللة للمركبات الهيدروكاربونية:

أ- تأثير مدة الحضن في نمو العزلات البكتيرية

وزع (100 ml) من وسط الأملاح المعدنية في دوارق سعة (250 ml) وعدل الرقم الهيدروجيني الى (7)، وعُقمت في المؤصدة

بدرجة حرارة 121 م° ولمدة 15 دقيقة، وبعدما بُردت الدوارق الى درجة 45 م أضيف لها النفط الخام المعقم بالترشيح كمصدر للكربون والطاقة بتركيز 1 %، ثم لقحت الدوارق بـ(0.1ml) من اللقاح البكتيري للعزلات المنتخبة (D32،B22) لتحديد أفضل مدة حضانة لكل عزلة، و حُضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة بسرعة 120 دورة/دقيقة ودرجة حرارة 37 م° لمدة 5 أيام، قدرت اعداد الخلايا ونسبة استهلاك الهيدروكربونات وبعد مدة حضن مختلفة (24، 48، 72، 96، 120) ساعة

ب- تأثير تراكيز مختلفة من النفط الخام في نمو العزلات البكتيرية:

وضع (100ml) من وسط الاملاح المعدنية في دوارق مخروطية سعة (250 ml)، وعدل الرقم الهيدروجيني إلى (7) وعُقمت الدوارق بالمؤصدة بدرجة 121 م ولمدة 15 دقيقة، وأضيفت إلى الدوارق تراكيز مختلفة من النفط الخام (0.5 ،1، 2، 3)% المعقمة بالترشيح، لتحديد أفضل تركيز للنفط الخام لنمو كل عزلة، و لقحت الدوارق بـ (0.1ml) من اللقاح لكل من العزلتين المنتخبتين (B22,D32)، وحضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة بسرعة 120 دورة/دقيقة وبدرجة حرارة 37 م° ولمدة 120 ساعة، و قدرت نسبة استهلاك الهيدروكاربونات

حساب النسبة المئوية لإستهلاك الهيدروكاربونات

استعملت الطريقة الوزنية في حساب نسبة إستهلاك الهيدروكاربونات بحسب (13) من خلال حساب كمية المتبقي من الهيدروكاربونات، وذلك عن طريق أخذ ورقة ترشيح معقمة نوع واتمان Whatman filter paper (No.1) وتجفيفها بالأوفن Oven لمدة 24 ساعة بدرجة 45م° ووزنها، ثم رُشّح الوسط بورقة الترشيح وبعدها جُفف بالأوفن Oven لمدة 24 ساعة بدرجة 45م°، ثم وُزّن لمعرفة الفرق بالوزن قبل وبعد الترشيح، إذ أن وزن الراسب يمثل المتبقي من الهيدروكاربونات مع ملاحظة أن العملية كاملةً تتم تحت ظروف معقمة حسب القانون التالي:

R= (A-B/A) x100%

R=نسبة المستهلك من الهيدروكاربونات

A=كمية الهيدروكاربونات المضافة

B=كمية المتبقي من الهيدروكاربونات

النتائج والمناقشة

قدرة العزلات البكتيرية على تفكيك وسط الهيدروكربون الصلب

بعد زرع العزلات على وسط BHM مع النفط الخام، لوحظ ان البكتريا تنمو بعد 24 ساعة الاولى من الحضن، بدأ النمو في الاطباق و حصلت تغيرات على طبقة النفط الموجودة على الوسط اذ اختزلت كميتها من الوسط، وأصبحت بشكل قطرات صغيرة بسبب تجمع الخلايا البكتيرية حولها كما في الشكل (٢). وظهر تبايناً في كمية النمو بين المستعمرات المختلفة على هذا الوسط، فقد اظهرت نتائج الدراسة بأن (25) عزلة بكتيرية (65.78)% كانت قادرة على استهلاك النفط الخام، و الكاز كل على حده مصدراً للكاربون والطاقة من مجموع (38) عزلة، في حين فشلت (13) عزلة بكتيرية (34.22)% في استهلاكه. وقد يعزى سبب عدم نمو البكتريا على هذا الوسط الى عدم امتلاكها القابلية على تفكيك هذه المركبات نتيجة لعدم وجود النظام الانزيمي المتخصص (14). تبعا لذلك انتخبت العزلات الكفوءة في الاستهلاك لإجراء التجارب اللاحقة.

B

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2015 ,(9), (3) :121-129

A

شكل (2) يوضح نمو العزلات على وسط BHM مع النفط الخام عند درجة حرارة 37 °C و(7)pH الصورة A تمثل نمو العزلة واستهلاك النفط الخام، اما الصورة B توضح فشل العزلة من النمو على وسط BHM واستهلاك النفط.

الغربلة الثانوية واختيار العزلات الكفوءة

اعتمدت نتائج كفاءة استهلاك النفط الخام من خلال قياس قطر المناطق الشفافة على وسط اكار BHM الصلب، اظهرت ان العزلة *Pseudomonas aeruginosa* اعطت قطر (٣.١cm) اعلى من العزلة *Bacillus cereus* (2.6 cm). شكل (3) يوضح ذلك.

B. cereus

P. aeruginosa

شكل (3) يوضح تشكيل المنطقة الشفافة على وسط BHM الصلب مع محلول ايثيري النفط الخام (10% v/v) عند الحضن بدرجة حرارة 37 °C ولمدة 120 ساعة

تشخيص العزلات البكتيرية ذات الكفاءة العالية

شُخصت العزلتين الكفوءة والمرشحة للدراسة وهي (D32 و B22) والمعزولة من بيئتين مختلفتين على اساس صفاتها المظهرية، وبعض الصفات الفسلجية، والفحوصات البيوكيميائية و ذلك بالاعتماد على جداول التشخيص المعتمدة. كما مبين في جدول (1) و(2).

جدول (1) المواصفات الزرعية و المجهرية للعزلات البكتيرية المنتخبة B22 و D32

العزلة	طبيعة المستعمرات على الوسط المغذي الصلب						شكل الخلية	تجمع الخلية	صبغة كرام
	الشكل	اللون	القوام	الحافة	الشفافية	الارتفاع			
B22	دائري	اخضر	جاف	منتظمة	معتمة	مسطحة	عصوي	مفرد	سالبة
D32	دائري	ابيض	جاف	متموجة	معتمة	مسطحة	عصوي	مفرد	موجبة

جدول (2) الفحوصات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية المنتخبة B22 و D32

ت	انواع البكتريا / الاختبارات	B22	D32
1	Catalase	+	+
2	Oxidase	+	+
3	الاندول	-	-
4	Methyl red	-	+
5	Voges - Proskauer	-	+
6	تحلل النشا	-	+
7	Motility	+	+
8	Urease	+	-
9	Simmon Citrate	+	+
10	النمو على وسط الماكونكي	+	-
11	اختبار الكلكلر KIA	ح/ CO2/ +	ح/+
12	انتاج انزيم اللسيثين	-	+
13	Hymolysis	α	β
14	انتاج H2S	+	-
15	النمو على وسط السترمايد	+	-
16	النمو على وسط MYP	-	+
17	فحص السبورات تحت المجهر	-	+

(+) النتيجة الموجبة للفحص، (-) النتيجة السالبة للفحص، β تحلل كامل للدم، α تحلل جزئي للدم، ق/ح قاعدي/حامضي.

تأثير مدة الحضن

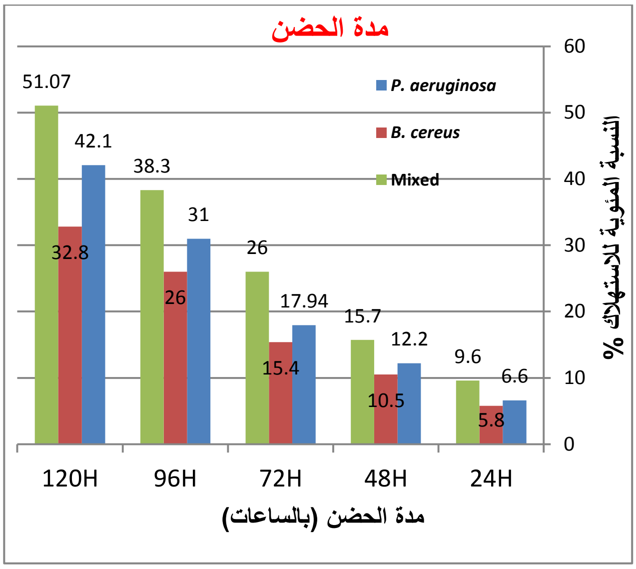
درس تأثير مدة الحضن المختلفة في نمو العزلات بعد تنميتها على وسط الاملاح المعدنية السائل الحاوي على النفط الخام بتركيز 1%، وبرقم هيدروجيني 7، وعند درجة حرارة 37م°، وبسرعة رج 120 دورة/دقيقة، وقورنت النتائج بنسبة الاستهلاك والزيادة في اعداد الخلايا كدلالة على تفكيك النفط الخام والشكل (٤) يبين نسبة استهلاك النفط الخام لبكتريا *P. aeruginosa*، فقد بلغت خلال الـ (24) ساعة الاولى من الحضن (6.6%)، واستمر التحلل الحيوي للنفط الخام حتى وصل بعد 120 ساعة (42.1%)، اما بكتريا *B. cereus* فقد كانت نسبة استهلاك النفط الخام فيها خلال (24) ساعة الاولى (5.8%)، واستمر تفكيكها للنفط الخام حتى وصلت النسبة بعد 120 ساعة (32.8%).

بعد دراسة كفاءة العزلتين البكتيريتين قيد الدراسة بصورة منفردة على استهلاك المركبات الهيدروكاربونية، تم تحضير لقاح بكتيري مزدوج من النوعين (*P. aeruginosa*، *B. cereus*)، وقد اوضحت النتائج استهلاك النفط الخام بكفاءة اعلى من استهلاك كل من نوعي البكتريا بصورة منفردة، فبلغت خلال الـ(24) ساعة الاولى (9.6%)، واستمر الاستهلاك بالازدياد حتى بلغ بعد 120 ساعة (51.07%).

تؤكد كثير من الدراسات على فعالية التآزر البكتيري في تفكيك المركبات النفطية (15)، وتكمن الفائدة من استعمال اللقاح البكتيري المزدوج بالقدرة على تحليل مختلف المركبات الهيدروكربونية بدون تراكم للمركبات الوسطية السامة (١٦).

ذكر (17) أن بكتريا *P. aeruginosa* استعملت ضمن خليط بكتيري Consortium وأثبتت أن لها القدرة على تحليل زيت المحركات، وقد عزل هذا الخليط من التربة والمياه الجوفية الملوثة بالمشتقات النفطية.

أشار (18) إلى ان *P. aeruginosa* قد اعطت اعلى نسبة تحلل للنفط الخام بعد مدة حضانة (4-8) ايام عند درجة حرارة 30 م°،هذا ليست لأنها معزولة من البيئة الملوثة بالنفط الخام فقط، ولكن ايضا لامتلاكها الانزيمات المحللة للهيدروكربونات والأكثر كفاءة ونشاطا من البكتيريا الاخرى.



شكل(4): تأثير مدة الحضن المختلفة في نسبة استهلاك النفط الخام لبكتريا *P.aeruginosa*، *B. cereus*، Mixed bacterial inoculum في وسط الاملاح المعدنية الحاوي على 1% نفط خام وفي رقم هيدروجيني(7) وبدرجة حرارة 37 م° وبسرعة مزج 120 دورة/دقيقة ولمدة بين 24-120 ساعة.

دراسة تأثير تركيز النفط الخام في نمو العزلات البكتريا

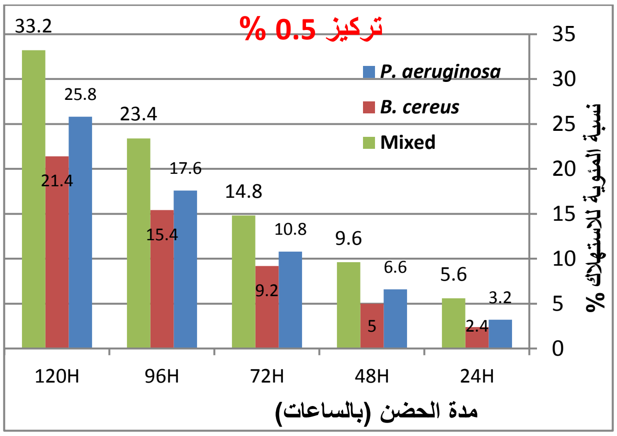
حضنت الاوساط الزرعية الملقحة بالعزلات المنتخبة والمشخصة مسبقا *P. aeruginosa* و *B. cerues* و Mixed bacterial inoculum عند درجة الحرارة 37م° والرقم الهيدروجيني (7) وبإضافة تراكيز مختلفة من النفط الخام (3، 2، 1، 0.5)% كما

موضح في الاشكال (٥)،(٦)،(٧)،(٨). اظهرت النتائج اختلاف العزلات في قدرتها على تفكيك النفط الخام المستعمل بمختلف التراكيز. فقد كانت نسبة استهلاك للعزلة *P. aeruginosa* عند التركيز 0.5 % خلال 24 ساعة الاولى (%3.2) واستمر الاستهلاك بالتزايد حتى بلغ بعد 120 ساعة (%25.8) اما العزلة *Bacillus cereus* فبلغت نسبة الاستهلاك (2.4 %) بعد 24 ساعة حضن اما بعد 120 ساعة فقد بلغت نسبة الاستهلاك (%21.4)، اما عند التركيز 1% فكانت نسبة استهلاك النفط الخام بعد 24 ساعة بفعل *P. aeruginosa* (%4.9) وبعد مدة حضن 120 ساعة ازداد الاستهلاك حتى بلغ (%35.8) اما بكتريا *B. cereus* بلغت نسبة الاستهلاك (%3.4) عند 24 ساعة الاولى وبعد مدة تحضين 120 ساعة بلغت نسبة الاستهلاك (%27.2)، اما نسبة الاستهلاك عند التركيزين (2، 3) فبلغت نسبة استهلاك النفط الخام بفعل بكتريا *P. aeruginosa* (%2.2) و(%1.2) على التوالي بعد 24 ساعة حضن وتدرجت نسبة الاستهلاك بالازدياد حتى بلغت بعد 120 ساعة (%17.8) و(%11.5) على التوالي، اما بكتريا *B. cereus* فبلغت نسبة استهلاكها للنفط الخام خلال 24 ساعة الاولى (%1.5) و (%1) على التوالي ايضا و بعد مدة حضانة 120 ساعة بلغت نسبة الاستهلاك (%13.7) و (%8.7) على التوالي.

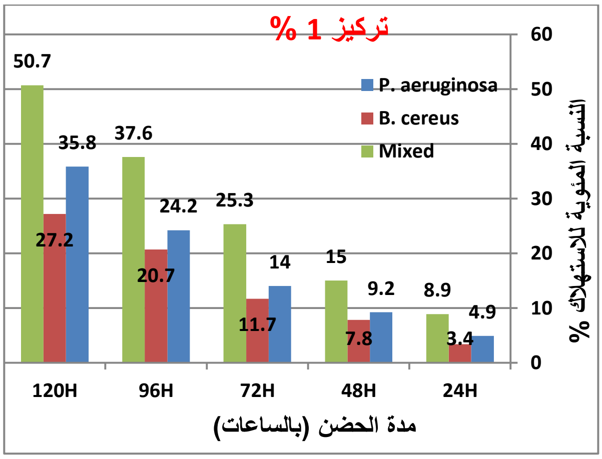
اما بالنسبة لتركيز النفط الخام ومن خلال التجارب نلاحظ ان التركيز (%١) هو الامثل إذ تحقق افضل استهلاك للنفط الخام، ومن خلال ذلك ندرك ايضا انه اذا كان تركيز النفط اقل من (%١) فأنه يؤثر سلباً في نسبة الاستهلاك والنمو الغير كافي للعزلات بسبب نقص مصدر الكاربون اما اذا كان اعلى من (%١) سوف يكون له تأثير سام على الكائنات الحية الدقيقة مما يسبب تأثيراً كبيراً في نسبة الاستهلاك ومعدل النمو (١٩).

وبعد دراسة العزلات بشكل منفرد ومعرفة نسب تحليلها للنفط الخام فقد أجريت تجارب معاملات تآزر بين العزلتين المنتخبتين بنفس الظروف وأظهرت النتائج نسب استهلاك اعلى مما لو كانت بشكل منفرد إذ اعطت نسبة استهلاك اعلى عند التركيز (%1) نفط خام وكانت (%50.7) اما عند التركيز (%0.5) فكانت (%33.2) وعند التركيز (%2) فبلغت نسبة الاستهلاك (%28.7) وعند التركيز (%3) بلغت نسبة الاستهلاك (%20.2) عند مدة حضن 120 ساعة. واتفقت هذه الدراسة بنتائجها مع الكثير من الدراسات التي اجراها الباحثين ومنهم (٢٠) والذين اكدوا بنتائجهم بان التآزر بين الانواع البكتيرية كان الاكفأ في تحليل مركبات النفط الخام.

اما (7) فقد بين أن الاحياء المجهرية كانت من افضل العوامل المحللة للهيدروكاربونات المشبعة الداخلة في تركيب النفط الخام المتدفق. في معظم الحالات .*Bacillus* sp سادت وخاصة في التربة الملوثة بالنفط الخام، قد يكون هذا بسبب قدرة هذه البكتريا على إنتاج السبورات، والتي قد تحميها من الآثار السمية للهيدروكربونات.(12) .



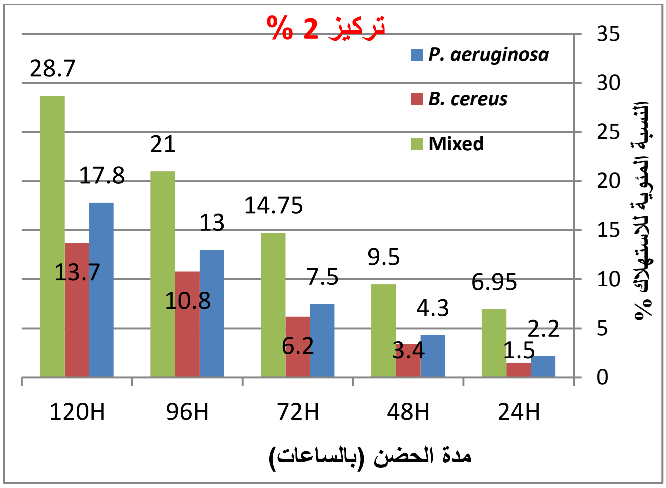
شكل (٥) يوضح تأثير تركيز النفط الخام على التحلل الحيوي للنفط الخام بفعل بكتريا P. aeruginosa، B. cereus، Mixed bacterial inoculum المعزولة في وسط BHM المضاف له (%0.5) نفط خام، وعند درجة حرارة (37م°)، و(7) pH ولمدة (24- 120) ساعة، وسرعة مزج 120 دورة/دقيقة



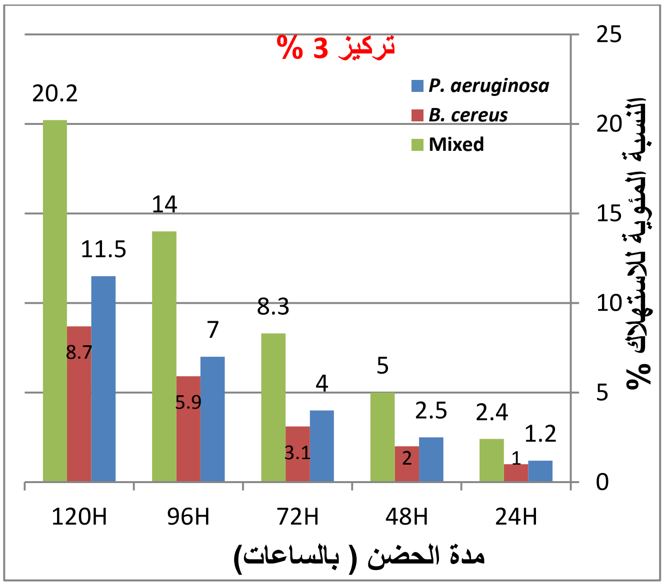
شكل (٦) يوضح تأثير تركيز النفط الخام على التحلل الحيوي للنفط الخام بفعل بكتريا P. aeruginosa، B. cereus، Mixed bacterial inoculum المعزولة في وسط BHM المضاف له (%1) نفط خام، وعند درجة حرارة (37م°)، و(7) pH ولمدة (24–120) ساعة، وسرعة مزج 120 دورة/دقيقة

from polluted site in Saudi Arabia. Pak. J. Biol. Sci. 6(17): 1482-1486.

3. Atlas, M.R. (2005). Hand book of media for Environmental Microbiology.2nd ed. Published by CRC press. Taylor and francis Group 6000 Broken sound parkway NW. Boca Raton, FL 33487-2742.
4. Bachmann, R.T., Johnson, A.C., Edyvean, R.G.J., (2014). Biotechnology in the petroleum industry: an overview. Int. Biodeterior. Biodegrad. 86, 225-237
5. Brito, E. M., Guyoneaud, R., Goni Urriza, M. Ranchou peyruse, and Duran, R. 2006. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay. Brazil Research in microbiology 14: 219- 230.
6. Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996). Practical Medical Microbiology. 14th ed. The Churchill Livingstone. Inc. New York, USA.
7. Diaz, M. P. ; Boyd, K. G.; Grigson, S. J. W. and Burgess, J. G. (2002). Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD. M-immobilized onto polypropylene fibers. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 79, No. 2, PP: 145 – 153.
8. Al-Jaff،B.M.A.(1998)Microbiological and genetical study on local isolates of Bacillus cereus. PhD thesis، university of Baghdad، Iraq.
9. Kumar A, Bisht BS, Joshi V, Dhewa T (2011) Review on
10. Bioremediation of polluted environment: A management tool.
11. Int J Env Sci 1(6)
12. Latha, R. and Kalaivani, R., (2012).Bacterial degradation of crude oil by gravimetric analysis. Advances in Applied Science Research, 3: 2789-2795.
13. MacFaddin, J.E. (2000). Individual Biochemical Tests in Biochemical for Identifications of Medical Bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. USA.
14. Malatova, K.(2005). Isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacteria from environmental habitats in western New York State. Master thesis of science in chemistry, : 21-26.
15. Mariano,A.P.;Angelis,D.F.;Pirollo,M.P.S.;Contiero,J.and Bonotto,D. M.(2009).Investigation about the efficiency of the bioaugmentation technique when applied to diesel oil contaminated soil. Braz. Arch. Biol. Technol.,.52(5): 1297-1312.
16. Mc Genity,T.; Folwell,B.D.; McKew,B.A. and Sanni, G.O.(2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for.AgaticBiosystems, 8(10) :1-19.
17. Mesdaghinia, A., Rezaie, S., Shariat, M., Nazmara, S. and Ali Mohammadi, M. (2007). Isolation and Detection of MTBE Degrading Bacteria. Pakistan Journal of biological science, 8(7), 974-977.



شكل (7) يوضح تأثير تركيز النفط الخام على التحلل الحيوي للنفط الخام بفعل بكتريا P. aeruginosa ،B. cereus ،Mixed bacterial inoculum المعزولة في وسط BHM المضاف له (2%) نفط خام، وعند درجة حرارة (37م°)، و(7) pH ولمدة (24- 120) ساعة، وسرعة مزج 120 دورة/دقيقة



شكل (8) يوضح تأثير تركيز النفط الخام على التحلل الحيوي للنفط الخام بفعل بكتريا P.aeruginosa ،B. cereus ،Mixed bacterial inoculumالمعزولة في وسط BHM المضاف له (3%) نفط خام، وبدرجة حرارة (37م°)، و(7) pH ولمدة (24-120) ساعة، وسرعة مزج 120 دورة/دقيقة

المصادر

1. Acuna-Arguelles, M.E.; Olguin-Lora, P. and Razo-Flores, E. (2003). Toxicity and kinetic parameters of the aerobic biodegradation of the phenol and alkylphenols by a mixed culture. Biotechnol. Lett. 25: 559-564.
2. Arafa, M.A. (2003). Biodegradation of some aromatic hydrocarbons (BTEXs) by a bacterial consortium isolated

18. Milic J.S.,V.P. Beskoski, M.V. Ilic, S.A.M. Ali, G.D. Gojgovic and M.M. Vrvic,(2009). Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products : Compsition of the microbial consortium. J. Serbian Chem Soc.,74:455-460
19. Nwaogu L.A, Onyeze G.O.C. Nwabueze R.N (2008). Degradation of diesel oil in a polluted soil using Bacillus subtilis.African J. Biotechnol. 7(12):1939-1943.
20. Okoh, A. I. (2003). Biodegradation of bonny light crude oil in soil microcosm by some bacterial strains isolated from crude oil flow stations saver pits in Nigeria. African. Journal of Biotechnology. Vol. 2(5), PP: 104 – 108
21. Pepi, M.; Minacci, A.; Cello, F. D.; Baldi, D., and Fani, R. (2003). Long-term analysis of diesel fuel consumption in a co-culture of Acinetobactervenetianus, Pseudomonas putida and Alcaligenesfaecalis. Kluwer Academic publishers. Antonie Van Leeuwenhoek. 83: PP: 3 – 9. Netherlands.
22. Udofia U.S. and Ekpo M.A. (2008). Rate of biodegradation of crude oil by microorganisms isolated from oil sludge environment. African Journal of Biotechnology، 7 (24): 4495-4499
23. Zhou Changyi, Lin Qingyuan, Su Guocheng, et al 2009. Isolation, characterization and study on properties of a strain for degrdation of offshore petroleum hydrocarbons [J]. Journal of Jimei University (Natural Science Section),، 14(1): 24-28.