جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية – كلية التربية
قسم علوم الحياة

توصيف بكتيري وجزيئي للانواع البكتيرية المحللة للمركبات الهيدروكاربونية في ترب محافظة القادسية

رسالة مقُدمة الى عمادة كلية التربية – جامعة القادسية
وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير
في علوم الحياة / أحياء مجهرية

من قبل

بيداء حسين جاسم

بكلوريوس علوم حياة / كلية التربية / جامعة القادسية 2016

أشراف

أ.م . علي عبد الرحيم الناشي

2018م 1440هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(وسَخَّرَ لَكُم مَّا فِي السَّمَاوَاتِ وَمَا فِي الأَرْضِ

جَمِيعًا مِّنْهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ)

صَدَقَ اللَّهُ العَلِيُّ العظِيمْ

سورة الجاثية الآية (13)

الإهداء

أُهدي ثمرة جهدي المتواضع الى :

قُوتي ونبراسي وركن سَعادتي ... والدي العزيز

بسمة الحياة وسرّ الوجود ... والدتي الغالية

من اشدُدَ بهم أزري ... أخوتي وأخواتي

كلّ من ساندني وتمنّى لي الخير .

بيداء ...

شُكر وتقدير

بسم الله الرحمن الرحيم ((لئن شَكرتُم لأزِيدنكُم)) فله الشكر كما ينبغي لجلال وجهه وعظيم سلطانه ،والحمد لله رب العالمين الذي هداني وأعانني وقدرني على إنجاز هذا البحث وصلّى الله على سيدنا محمد خاتم النبيينَ وعلى آلة الطيبين الطاهرين .

يطيب لي وانا أنهي كتابة رسالتي هذه ان أتقدم بجزيل شكري وعظيم امتناني الى أستاذي الفاضل علي عبدالرحيم الناشي لاقتراحه موضوع الرسالة ولما قدمه لي من نصح ومتابعة ودعم طوال مدة الدراسة فجزاه الله عني خير الجزاء.

كما اتقدم بجزيل الشكر والعرفان الى رئاسة جامعة القادسية ، وعمادة كلية التربية، ورئاسة قسم علوم الحياة متمثلة بشخصها الدكتور أحمد جاسم النائلي ،والى اعضاء الهيئة التدريسية واخص بالذكر منهم الدكتور حيدر عبد الواحد والدكتورة أزهار نوري.

ومن الواجب ان أثني بشكري وتقديري الى الدكتورة جنان ناظم / كلية الطب البيطري والى الزملاء رائد رزاق ، وسيف لطيف الذين لم يبخلوا علي في مد يد العون والمساعدة أثناء إجراء بحثي ، فوفقهم الله لما يحبّه ويرضاه .

ولايفوتني أن أشكر زملائي طلبة الدراسات العليا ولاسيما الأخوات زينب زيدان و زينب علاوي .

واختم كلامي بأرّق وأسمى كلماتِ الحبّ والعرفان الى أفراد أسرتي جميعاً على ما بذلوه من أجلي ومساندتهم لي طوال مدة كتابة الرسالة ... والله ولي التوفيق .

بيداء..

إقرار المشرف

أشهد أنَّ إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ (**توصيف بكتيري وجزيئي للانواع البكتيرية المحللة للمركبات الهيدروكاربونية في ترب محافظة القادسية**) قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة القادسية ، وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة / احياء مجهرية .

التوقيع :

المشرف : علي عبد الرحيم الناشي

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

التاريخ : 30 / 9 / 2018

قرار رئيس لجنة الدراسات العليا

بناء على التوصيات المقدمة من المشرف، أرشّح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الاسم : د. احمد جاسم حسن

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

التاريخ : 30 / 9 / 2018

جامعة القادسية
كلية التربية
قسم علوم الحياة
الدراسات العليا

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أنّ هذه الرسالة الموسومة بـ : (**توصيف بكتيري وجزيئي للانواع البكتيرية المحللة للمركبات الهيدروكاربونية في ترب محافظة القادسية**) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من اخطاء لغوية وتعبيرية ، وبذلك اصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلّق الامر بسلامة الأسلوب وصحّة التعبير .

التوقيع :

الاسم : خالد عبد فزّاع

اللقب العلمي : أستاذ

التاريخ : 25 / 10 / 2018

أقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن اعضاء لجنة المناقشة الموقعين في ادناه بأننا أطلعنا على الرسالة الموسومة بـ : (**توصيف بكتيري وجزيئي للانواع البكتيرية المحللة للمركبات الهيدروكاربونية في ترب محافظة القادسية**) المقدمة من قبل طالبة الماجستير (**بيداء حسين جاسم**) وناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها ، بتاريخ 2019/1/17 فوجدناها جديرة بالقبول لنيل شهادة الماجستير في علوم الحياة / أحياء مجهرية بتقدير (امتياز)

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.د دينا محمد رؤوف

العنوان :جامعة القاسية / كلية التربية

التاريخ : 6 / 2 / 2019

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.د احلام كاظم نعيم

العنوان :جامعة الكوفة/ كلية التربية للبنات

التاريخ : 31 / 1 / 2019

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.م. د امال غازي مهدي

العنوان : جامعة القادسية / كلية العلوم

التاريخ : 29 / 1 / 2019

عضو اللجنة والمشرف

التوقيع :

الاسم : أ.م علي عبد الرحيم الناشي

العنوان : جامعة القادسية / كلية التربية

التاريخ : 29 / 1 / 2019

مصادقة عمادة كلية التربية جامعة القادسية

التوقيع :

الاسم : خالد جواد العادلي

المنصب : عميد كلية التربية

اللقب العلمي : أستاذ دكتور

التاريخ : ٧ / ٣ / ٢٠١٩

الخلاصة Abstract

شملت الدراسة جمع 200 عينة من مصادر بيئية مختلفة شملت ترب كل من المولدات، محال تبديل الدهن ،معمل مطاط الديوانية وبعض مياه المبازل القريبة من مصادر التلوث في محافظة الديوانية للمدة من 1-11-2017 الى 1-4-2018 . هدفت الدراسة الى معرفة سيادة الانواع البكتيرية في الترب و المياه الملوثة بالمركبات الهايدروكاربونية ودراسة قابليتها على تحلل هذه المركبات واجراء دراسة جزيئية لهذه الانواع.

شُخصت 60 عزلة بكتيرية نامية في الترب والمياه الغنية بالمركبات الهايدروكاربونية. وتصدرت بكتريا *Escherichia coli* الانواع الاكثر شيوعاً بنسبة بلغت (38.33%) وسجلت اعلى نسبة لها في مياه البزل تليها بكتريا*Pseudomonas fluorescens* بنسبة(25%) سجلت أعلى نسبة عزل لها في تربة المولدة اما *Staphylococcus aureus* فقد جاءت بالمرتبة الثالثة اذ بلغت نسبة عزلاتها (16.66%) وتوالت بعدها جراثيم أخرى تميزت عزلاتها المحللة للهايدروكاربونات بنسب منخفضة وهي *Acinetobacter baumannii*، *Klebsiella pneumonia* *Bacillus cereus* و *Proteus mirabilis* وبلغت هذه النسب (8.33%،5%،5%،1.6%) على التوالي .

دُرست قابلية العزلات البكتيرية على تحلل الهايدروكاربونات النفطية ، وبينت النتائج تفوق عزلات *P.*fluorescens على غيرها من انواع البكتريا في قدرتها على تحلل الهايدروكاربونات اذ تميزت بكفاءة عالية في استحلاب النفط الخام واستعماله كمصدر للكاربون والطاقة ثم جاءت بعدها *E.*coli و *S.aureus* على التوالي .

وكمؤشر لفعالية نمو العزلات على المصادر الهايدروكاربونية تم قياس كل من التوصيلية الكهربائية والكثافة الضوئية ، فقد لوحظ زيادة تدريجية في قيم التوصيلية الكهربائية ولجميع العزلات البكتيرية اثناء مدة الحضن وكانت اعلى قيم التوصيلية الكهربائية ولجميع العزلات في الاسبوع الثالث من مدة الحضن وسجل ت بكتريا *P.fluorescens* المعزولة من تربة المولدات اعلى قيمة توصيلية كهربائية اذ بلغت 12.7 mc/cm في الاسبوع الثالث من الحضن ولكن انخفضت هذه القيمة في الاسبوع السادس لتصل الى 8.6 mc/cm جاءت بعدها بالمرتبة الثانية *E.coli* مسجلة قيمة توصيلية بلغت 11.7mc/cmومن ثم *S.aureus* بقيمة بلغت 10.6mc/cm اما بقية البكتريا المعزولة فقد سجلت قيماً توصيلية مختلفة وهي (8.8 ,9 9.3,9.3) mc/cmضمت بكتريا *Acinetobacter baumannii* ،

Bacillus cereus، *Klebsiella pneumonia* و*Proteus mirabilis* على التوالي. اما بالنسبة للكثافة الضوئية فقد اظهرت العزلات جميعها كثافات ضوئية مختلفة وكانت اعلى قيم الكثافة الضوئية ولجميع العزلات في الاسبوع الرابع مدة من الحضن سجلت بكتريا *P.fluorescens* المعزولة من تربة المولدات اعلى قيمة كثافة ضوئية بلغت 0.322 في الاسبوع الرابع من الحضن وأخذت هذه القيمة بالانخفاض لتصل الى 0.319 في الاسبوع السادس وجاءت بكتريا *E.coli* بالمرتبة الثانية 0.309 بعدها بالمرتبة الثالثة جاءت بكتريا *S.aureus* 0.301 بعدها توالت بقية البكتريا وهي *Bacillus cereus*، *Klebsiella pneumonia*، *Acinetobacter baumannii*، *proteus mirabilis* مسجلة قيم الكثافة الضوئية التي بلغت :0.212 ،0.209،0.208،0.206 على التوالي .

تم التحري جزيئياً عن جين (*C23O* gene) المشفر لأنتاج انزيم Catechol 2,3 dioxygenase المحلل للمركبات الهايدروكاربونية بأستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل وثبت تواجد الجين في 8 عزلات من *P.fluorescens* وبنسبة (53.33%) اما *E.coli* فقد تواجد الجين في 6 عزلات فيها بنسبة(26.08%) في حين تواجد الجين في عزلة واحدة فقط من عزلات بكتريا *S.aureus* وبنسبة(10%).

اظهرت نتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين (*C23O*) في عزلات كل من *P.fluorescens* *E.coli* , *S.aureus* بأستعمال تقنية التتابع Sequencing technique اعتماداً على ناتج 553bp للجين (C23O) نتيجة تفاعل PCR ان كلاً من بكتريا *P. fluorescens* و*E.coli* كانتا متماثلتين مع جين العزلة القياسية التي تحمل الرقم التسلسلي(KF010862.1) لل *P. fluorescens* و (CP019778.1) لل *E.coli* و بنسبة(100%) لكل منهما في حين كانت نسبة التطابق(99%) في *S.aureus* عند مقارنتها مع جين العزلة القياسية التي تحمل الرقم التسلسلي (CP023500.1) .

وبالتالي اثبتت هذه الدراسة ان هناك نواع بكتيرية لها القدرة على تحلل المركبات الهايدروكاربونية تمثلت ب *S.aureus*, *E.coli* ,*P.fluorescens* .

المحتويات

التسلسل	العنوان	رقم الصفحة
	الخلاصة	أ
	قائمة المحتويات	ت
	قائمة الجداول	خ
	قائمة الاشكال	د
	قائمة المختصرات	ذ
	قائمة الملاحق	ذ
	الفصل الاول	
.1	المقدمة Introduction	1
	الفصل الثاني	
.2	أستعراض المراجع Literatures Review	4
1.2	التلوث الكيمائي chemical pollution	4
2.2	مصير تسرب النفط في البيئات المائية The fate of the oil spill in aquatic environments	5
3.2	الاضرار البيئية والصحية التي تسببها الترسبات النفطية Health and environmental damage caused by oil deposits	6
4.2	تصنيف الهايدروكاربونات النفطية Classification of petroleum hydrocarbons	8
5.2	النفط الخام Crude Oil	9
6.2	المعالجة الحيوية Bioremediation	10
1.6.2	انواع المعالجة الحيوية Types of bioremediation	11
2.6.2	طرائق المعالجة الحيوية Bioremediation methods	12
7.2	الاحياء الدقيقة المستعملة للهايدروكاربونات Microorganisms used for hydrocarbons	13
8.2	اخذ المركبات الهايدروكاربونية Uptake hydrocarbon compounds	16
1.8.2	اخذ الهايدروكاربونات الذائبة uptaked dissolved hydrocarbon	16
2.8.2	آلية التلامس المباشر Direct Contact Mechanisms	16
3.8.2	آلية الاستحلاب Emulsification Mechanisms	16

9.2	اكسدة المركبات الهايدروكاربونية بفعل الاحياء المجهرية Oxidation of hydrocarbons by microorganisms	18
10.2	العوامل المؤثرة في التفكك الحيوي للهايدروكاربونات النفطية Factors Affecting on biodegrediation of petroleum hydrocarbons	19
11.2	انزيم Catechol 2,3 dioxygenase ودوره في عملية التحلل الحيوي للهايدروكاربونات النفطية	21
الفصل الثالث		
.3	المواد وطرائق العمل Meterial and Methodes	25
1.3	الاجهزة والمستلزمات Instruments and Equipments	25
1.1.3	الاجهزة Instruments	25
2.1.3	المستلزمات والادوات المختبرية Equipments and Tools	26
3.1.3	المواد الكيميائية والحيوية Chemical and Biological Substance	27
4.1.3	الاوساط الزرعية الجاهزة Culture Media	28
5.1.3	الصبغات والكواشف The Stain and Reagents	29
6.1.3	البادئ primer	29
7.1.3	العُدد المختبرية The Laboratary Kits	30
2.3	طرائق العمل Methods	31
1.2.3	التعقيم Sterilzation	31
2.2.3	تحضير الاوساط الزرعية Preparation of Culture Media	31
1.2.2.3	وسط الدم الاساس Blood Base Media	31
2.2.2.3	وسط الاملاح المعدنية السائل Mineral Salts Liquid Medium	31
3.2.2.3	وسط الاملاح المعدنية الصلب Mineral Salts Solid	32
4.2.2.3	وسط اليوريا الاساس Urea Base Media	32
5.2.2.3	وسط الحركة Motility Media	32
3.2.3	تحضير الكواشف Preparatiion of Reagents	32
1.3.2.3	كاشف الاوكسديز Oxidase Reagent	32
2.3.2.3	كاشف الكاتاليز Catalase reagent	33
3.3.2.3	كاشف المثيل الاحمر Methylred Reagents	33
4.3.2.3	كاشف فوكس بروسكور Voges-Proskauer Rergents	33
5.3.2.3	كاشف كوفاكس Kovacs Reagent	33

4.2.3	تحضير المحاليل Preparation of Solution	34
1.4.2.3	المحلول الملحي الفسلجي Solution Normal Saline	34
2.4.2.3	دارئ Tris base-Boric acid-EDTA (TBE)	34
3.4.2.3	محلول صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium bromid	34
4.4.2.3	محلول EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid)	34
5.2.3	جمع العينات Collection of Samples	34
6.2.3	زرع العينات Cultivation of Samples	35
7.2.3	العزل والتشخيص Isolation and Identification	35
1.7.2.3	التشخيص الزرعي Cultural Diagnosis	35
2.7.2.3	التشخيص المجهري Microscopical Diagnosis	36
3.7.2.3	الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Test	36
1.3.7.2.3	فحص الاوكسديز Oxidase Test	36
2.3.7.2.3	فحص الكاتاليز Catalase Test	36
3.3.7.2.3	اختبار المثيل الاحمر Methyl Red Test	36
4.3.7.2.3	اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization Test	37
5.3.7.2.3	اختبار فوكس بروسكور Voges –Proskauer	37
6.3.7.2.3	فحص قابلية البكتريا على الحركة Motility Test	37
7.3.7.2.3	فحص الاندول Indol Test	37
8.3.7.2.3	اختبار انزيم اليوريز Urease Test	38
9.3.7.2.3	اختبار تحلل الدم Hemolysis Test	38
4.7.2.4	تشخيص بنظام API20 API20 identification system	38
8.2.3	حفظ العزلات البكتيرية Maintenance of Bacteria Isolates	38
9.2.3	اختبار قابلية العزلات البكتيرية على تفكيك الهايدروكاربونات النفطية Test The Ability of Isolates to Degradation The Oil Hydrocarbons	39
3.3	تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction(PCR)	40
1.3.3	استخلاص الدنا الكلي Whole DNA Extraction	40
2.3.3	تقدير نقاوة وتركيزالدنا Estimation Purity and Concentration of DNA	41
3.3.3	تحضير مزيج سلسلة تفاعل البلمرة PCR Master Mixture	42
4.3.3	برمجة جهاز الدورات الحرارية Thermocycler PCR Program	43
5.3.3	الترحيل الكهربائي الهلامي Agarose Gel Electrophoresis	44

4.3	طريقة تحليل التسلسل التتابعي للجين المشفر لأنزيم catechol 2,3 dioxygenase catechol 2,3 dioxygenase sequencer method	45
5.3	التحليل الاحصائي Statistical Analysis	45
	الفصل الرابع	
.4	النتائج والمناقشة Results and Discussion	46
1.4	العزل والتشخيص Isolation and Diagnosis	46
2.4	قدرة العزلات البكتيرية على النمو على وسط الاملاح المعدنية الصلب والمضاف اليه النفط الخام كمصدر للكاربون والطاقة	55
3.4	النمو على وسط الاملاح المعدنية السائل	56
1.3.4	تقدير النمو بدلالة التوصيلية الكهربائية Estimation of growth in term of electrical conductivity	60
2.3.4	تقدير النمو بدلالة الكثافة الضوئية Estimation of growth in terms of optical density	62
4.4	التحري الجزيئي عن انتاج الجين المشفرلأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase Molecular Screening of Production *C23O* gene	66
1.4.4	تقنية تحليل التسلسل التتابعي للجين المشفر لأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase Sequencing technique of Catechol 2,3 dioxygenase (gen C23O)	70
	الاستنتاجات والتوصيات	
.5	الاستنتاجات Conclusions	75
1.5	التوصيات Recommendations	76
	المصادر	
	المصادر العربية	77
	المصادر الانكليزية	78
	الملاحق Appendices	102
	الخلاصة الانكليزية Summary	A

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
1-2	اهم البكتيريا المحللة للنفط الخام والمعزولة من بيئات الماء والتربة	15
1-3	الاجهزة المختبرية المستعملة في الدراسة	25
2-3	المستلزمات والادوات المستعملة في الدراسة	26
3-3	المواد الكيمياوية والحيوية المستعملة في الدراسة	27
4-3	الاوساط الزرعية الجاهزة المستعملة في الدراسة	28
5-3	الصبغات والكواشف المستعملة في الدراسة	29
6-3	البادئ المستعمل في الدراسة	30
7-3	العُدد المختبرية المستعملة في الدراسة	30
8-3	المكونات اللازمة للتفاعل PCR للجين المشفر لأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase المستعمل في الدراسة	42
9-3	برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل لتضخيم الجين المشفر لأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase	43
1-4	اعداد العزلات البكتيرية موزعة حسب مصدر العزل	47
2-4	عدد ونسب العزلات البكتيرية المشخصة وتواجدها في مناطق العزل	48
3-4	توزيع العزلات البكتيرية ونسبها حسب مناطق العزل	50
4-4	الاختبارات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية المدروسة	52
5-4	معدل النمو بدلالة قياس التوصيلية الكهربائية للعزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام المختبرة في قدرتها على استهلاك الهايدروكاربونات النفطية (mc/cm)	60
6-4	معدل النمو بدلالة قياس التوصيلية الكهربائية للعزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام المختبرة في قدرتها على استهلاك الهايدروكاربونات النفطية (mc/cm)	61
7-4	معدل النمو البكتيري بدلالة قياس الكثافة الضوئية للعزلات السالبة لصبغة كرام المختبرة في قدرتها على استهلاك الهايدروكاربونات النفطية	63
8-4	معدل النمو البكتيري بدلالة قياس الكثافة الضوئية للعزلات الموجبة لصبغة كرام المختبرة في قدرتها على استهلاك الهايدروكاربونات النفطية	64
9-4	اعداد ونسب الجين المشفر لأنتاج انزيم Catechol 2,3dioxygenase في العزلات البكترية المحللة للمركبات الهايدروكاربونية	67

10-4	ارقام التسجيل للعزلات ونسبة التطابق الوراثي في العزلات المحلية والعزلات المسجلة في موقع بنك الجينات	74

قائمة الاشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
1-2	مشاركة المستحلبات الحياتية في امتصاص الهايدروكاربونات	17
2-2	تحلل مركب الكايتكول عبر مساري اورثو و ميتا (ortho and meta pathway)	23
1.4	نمو البكتريا المعزولة على اوساط غذائية مختلفة (A) بكتريا *Pseudomonas fluorescens* النامية على وسط اكار الستروماید ، (B) بكتريا *Escherichia coli* النامية على وسط الايوسين مثيل الازرق، (C) بكتريا *Staphylococcus aureus* النامية على وسط اكار ملح المانيتول	53
2.4	تشخيص Api 20 للعزلات البكتيرية	54
3.4	استهلاك الهايدروكاربونات النفطية من قبل العزلات البكتيرية على وسط الاملاح المعدنية الصلب	56
4.4	استهلاك النفط الخام من قبل العزلات البكتيرية على وسط الاملاح المعدنية السائل	59
5.4	الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز والذي يظهر نتائج فحص ال pcr الخاص للتحري عن الجين المشفر لأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase في العزلة *Pseudomonas fluorescens* حيث يمثل M:Marker 1500-100 pb والارقام (13,12,11,10,8,7,3,2) تمثل العزلات الموجبة للجين بناتج طولة553pb	67
6.4	الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز والذي يظهر نتائج فحص ال pcr الخاص للتحري عن الجين المشفرلأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase في الجرثومة *Escherichia coli* حيث يمثل M:Marker 1500-100 pb والارقام (23,22,20,12,8,7) تمثل العزلات الموجبة لجين Catechol 2,3 dioxygenase بناتج طولة553pb	68
7.4	الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز والذي يظهر نتائج فحص ال pcr الخاص للتحري عن الجين المشفر لأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase في جرثومة *Staphylococcus aureus*حيث يمثل الرقم (8) العزلة الموجبة للجين المشفر لأنزيم Catechol 2,2 dioxygenase بناتج طوله 553pb.	68
8.4	نتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين C23O في بكتريا *P.fluorescens* مقارنة مع الجين الاصلي لبكتريا (KF010862.1)*P.fluorescens* .	71
9.4	نتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين C23O في بكتريا *E.coli* مقارنة مع الجين	72

	الاصلي لبكتريا (CP019778.1) *E.coli* .	
10.4	نتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين C23Oفي بكتريا *S.aureus* مقارنة مع الجين الاصلي لبكتريا (CP023500.1) *S.aureus* .	73

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح الكامل
API 20	Analytical profile Index 20
OD	Optical Density
DNA	Deoxy Ribonucleic Acid
PCR	Polymerase Chain Reaction
EB	Elution Buffer
EDTA	Ethylene Diamin Tetra Acetic Acid
TBE	Tris-Borate –EDTA
U.V	Ultra Violet
BP	Base Pair
NCBI	National Community Biological Information
MEGA6	Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6
IMVC	Indol Methel Red Vogrs-Proskaur Citrate
C23O	Catechol 2,3 dioxygenase
NSO	Nitrogen Sulfur Oxygen
USEPA	United States Environmental Protection Agency

قائمة الملاحق

رقم الملحق	عنوان الملحق	الصفحة
1	نتائج الاختبارات التشخيصية لبكتريا *S.aureus ,E.coli ,P.fluorescens* بأستعمال نظام API20	111
2	أستمارة تسجيل العزلات البكتيرية *S.aureus ,E.coli , P.fluorescens* في بنك الجينات	114

الفصل الاول

المقدمة

Introduction

1- المقدمة Introduction

تعد الهايدروكاربونات النفطية مثل وقود الديزل والنفط الخام وزيوت التشحيم ونواتج التقطير النفطية من اكثر مصادر الطاقة والوقود استعمالاً في العالم وعلى نطاق واسع(Ganesh&Lin,2009) .وتقدر الاحتياجات الكلية للطاقة من النفط الخام في العالم حوالي 32% (Ghaly& MacDonald 2002, ويدخل النفط الخام كماده اولية في كثير من الصناعات فضلا عن كونه المصدر الرئيس للدخل القومي للعراق وعدة دول (Albaiges , 1989) .

وقد ادى وجود انواع مختلفة من السيارات والالات والمولدات الكهربائية الى زيادة استعمال المواد الهيدروكاربونية (Abioye *et al*.,2012) فمن اخطر المشاكل الحالية في العالم هي تلوث البيئة بالهايدروكاربونات النفطية (Nikhil *et al*.,2013).

والبيئة العراقية من البيئات التي تتعرض للتلوث الهايدروكاربوني من مصادر مختلفة اهمها مصافي النفط ومحطات توليد الطاقة الكهربائية التي تعمل بالنفط الاسود وينتج من تلوث التربة بالهايدروكاربونات تغييرفي العديد من الصفات الفيزيائية والكيمائية والحيوية للتربة مما يؤثر سلباً على الانتاج الزراعي فضلاً عن تأثيرها على الترب وقد يمتد هذا التأثير الى المياه الجوفية مما يوقف استعمالها كما تتسبب بأضرار كبيرة للبيئة المائية في الانهار والبحار والبحيرات عند وجودها فيها (Isinguzo &Bello,2005).

وتعد الهايدروكاربونات النفطية واحده من أهم الملوثات البيئية لكونها سامَّة لمعظم الكائنات الحية الموجودة في البيئة و بالاخص الاروماتية منها وبسبب طبيعتها الذائبة في الدهون فلهذه المركبات دورفي التلوث الكيميائي من خلال انتقالها خلال السلسلة الغذائية فضلا عن امتلاكها خصائص مسرطنة وخاصية التراكم الكيميائي (Zhuang *et al*.,2007).

ومن اجل حماية المحيط الحيوي من ضرر المركبات الهايدروكاربونية اعتمدت الكثير من الطرائق الفيزيائية والكيميائية والحيوية اللازمة لازالة هذه الملوثات (فهد وربيع ، 2010) اذ تضمنت التقنيات الكيميائية و الفيزيائية الحفر ونقل كمية كبيرة من المواد الملوثة خارج الموقع ومعالجتها مما يجعلها مكلفة ومن ثم تؤدي التكاليف المتزايدة اضافة الى الكفاءة المحدودة لهذه التكنلوجيا الى تطبيق تكنلوجيا بديلة تستغل قدرات الكائنات الحية الدقيقة في المعالجة الحيوية (Chaudhry *et al*.,2005)

فأفضل طرائق استعادة الترب والمياه الملوثة هي المعالجة الحيوية والتي تتضمن استعمال كائنات حية دقيقة تحلل الهايدروكاربونات النفطية السامة واستعمالها كمصدر وحيد للكاربون والطاقة مؤدية الى تحلل الملوثات بشكل كامل وبذلك تقل نسبة المواد ذات التأثير السام والمسرطن فضلا عن تقليل نسبة الكاربون العضوي (Zhuang *et al*., 2007) اضافة الى انخفاض كلفة المعالجة الحيوية ولا يصاحبها اضطراب بيئي وعدم الاتصال بين المشتغلين والنفايات (Declercq *et al*.,2012) .

وتتضمن طريقة المعالجة الحيوية اتجاهين احدهما يتمثل بزيادة نسبة التحلل التي تقوم بها الاحياء من خلال تهيئة ظروف بيئية ملائمة لنموها من حرارة ورقم هيدروجيني وتهوية وتطوير سلالات جرثومية محورة وراثيا ذات قدرات ايضية على تحليل هذه المركبات ومتكيفة على التواجد في المناطق الملوثة (Mazaheri Assadi &Tabataee, 2010) وترتبط نسبة حدوث التحلل البايولوجي بعوامل متعددة اهمها التركيب الكيميائي للملوثات ، الظروف البيئية المثلى التي تحفز فعالية التحلل الحيوي ، التفاعلات بين عدد الكائنات الحية ونوعها ، ديمومة انواع الهايدروكاربونات النفطية في الترب الملوثة ومدى تيسرها للأحياء المجهرية (Márquez-Rocha *et al*.,2001).

تمتاز الهايدروكاربونات بأستجاباتها المختلفة للتحلل المايكروبي ويحتاج ذلك الى فترات زمنية مختلفة في حين ان بعض هذه المركبات لايتحلل على الاطلاق مثل الهايدروكاربونات العطرية متعددة الحلقات عالية الوزن الجزيئي (Atlas &Bragg ,2009)ويتحدد التحلل الحيوي للهايدروكاربونات النفطية بوجود مادة النفط الخام اضافة الى مدى التلامس الحاصل بين الأحياء المجهرية وسطح جزيئات النفط كون هذه المواد كارهة للماء وقليلة الفائدة للأحياء المجهرية (Márquez-Rocha *et al*.,2001)

وتنتشر الاحياء المجهرية المحللة للنفط الخام في المناطق الملوثة وعلى نطاق واسع اذ تلعب دورا فعالا في ازالة الثلوث من الترب والمياه الملوثة بصورة ملحوظة (Azaizeh *et al*.,2011) اذ ان العديد من الاحياء المجهرية وصفت بقدرتها على تكسير الهايدروكاربونات النفطية كالبكتريا والفطريات وبعض الطحالب (Das &Chandran ,2011) .وتعد البكتريا من الاحياء المجهرية المؤهلة للمعالجة الحيوية للمخلفات النفطية اذ تعمل على تحطيم المواد العضوية والهايدروكاربونية واستعمالها كمصدر وحيد للكاربون والطاقة من خلال انتاجها مجموعة كبيرة من الانزيمات المحللة فضلا عن ادمصاصها للعديد من العناصر الثقيلة على جدارها الخلوي وانتشارها الواسع وقابلية نموها

السريع (Wolicka *et al.*,2009). ونظراً لكون البكتريا من الأحياء المجهرية المحللة للمركبات الهايدروكاربونية جاءت هذه الدراسة التي شملت الجوانب الاتية :

*عزل وتشخيص أنواع بكتيرية من بيئات مختلفة ذات فعالية ايضية في تحليل المركبات المعقدة واستهلاكها واختبار الاكثر كفاءة في التحلل الحيوي.

*دراسة كفاءة العزلات البكتيرية في تحليل الهيدروكاربونات النفطية الملوثة للتربة والمياه مختبرياً .

*التحري عن جين (*C23O* gene) المشفر لأنزيم catechol 2,3 dioxygenase المسؤول عن تحليل المركبات الهايدروكاربونية .

*دراسة تسلسلات القواعد النيتروجينية للسلالات الحاملة للجين وتحديد العلاقة الوراثية بين تلك العزلات

الفصل الثاني

أستعراض المراجع

Literature Review

2 - استعراض المراجع Leterature Review

1.2.التلوث الكيمائي: Chemical pollution :

يقصد بالتلوث اي تغير يحدث في المكونات البيئية سواء كانت حية او غير حية مما يؤدي الى خلل في التوازن البيئي نتيجة عدم قدرة الانظمة البيئية على استيعاب هذا التغيير (الصابريني والحمد ،1994)ويطلق مصطلح التلوث الكيميائي على وجود بعض المواد الكيميائية التي صنعت لاغراض خاصة او تلك التي ألقيت في المجاري المائية مع المخلفات الصناعية وهي من اخطر مصادر التلوث في هذا العصر اذ اسهمت المنشأت الصناعية المقامة على شواطئ الانهارَ او البحارَ او البحيرات بالتلوث العالي للمياه وذلك بسبب ما تلقيه من مخلفات ونواتج ثانويه في الماء (بدر ،2016).

ويعد النفط الخام ومشتقاته من اهم المواد العضوية التي تستعمل في مجال الصناعة في اغلب بلدان العالم وبالأخص الدول الصناعية ، وقد ظهرت مشكلة التلوث النفطي بصورة واضحة في نهاية القرن العشرين بسبب تطور الصناعة وعمليات نقل وتوزيع النفط الخام ومنتجاته حيث يصل الى المحيط الحيوي كميات كبيرة من النفط الخام ومشتقاته اضافة الى المخلفات الصناعية والتي تكون ناتجه من التسربات النفطية من اماكن الحفر والتنقيب واماكن الخزن فضلا عن عمليات التصريف غير المدروسة الناتجة من مخلفات المصانع ومصافي النفط ناهيك عن الحوادث العرضية والانسكابات النفطية مما يسبب تلوث التربة والمياه بالهايدروكاربونات النفطية اذ بلغت نسبة مايصل من الملوثات النفطية سنويا الى البيئة حوالي 2-8 مليون طن في مختلف انحاء العالم (Sharma & Pathak,2014)

وتعد المركبات الهايدروكاربونية احد مكونات النفط الخام حيث تصل نسبتها 50-98 % من محتوى النفط الخام الذي هو خليط معقد من الهايدروكاربونات التي ترتبط مع مركبات عضوية اضافة الى كميات قليلة من الاوكسجين والنتروجين والكبريت وكميات ضئيلة من المعادن (الجادر،2006) .

يتسبب تلوث التربة بالنفط بأضرار خطيرة على النظام البيئي اذ يجعل التربة غير مناسبة لأغراض للزراعة والصناعه والسياحة وقد تزداد الخطورة عند وصول التلوث الى البيئة المائية (Wilson &Jones,1993) ،وهناك مصادر للتلوث بالهايدروكاربونات لا دخل للانسان فيها مثل الهايدروكاربونات الناتجة من الكائنات الميتة والانشطة البركانية ونضح النفط الخام من البقع النفطية التي تكون قريبة من سطح الارض (Abdel-Shafy & Mansour ,2016).

وتعد الهايدروكاربونات العطرية متعددة الحلقات Polycyclic Aromatic Hydrocarbonمن اكثر المركبات الهايدروكاربونية خطرا على البيئة اذ تلوث الترب والمياه كما يمكن ان تنتقل خلال السلسله الغذائية وتتراكم في اعضاءجسم الحيوان (Armstrong *et al* ., 2004)

لابد من وضع مقاييس خاصة بقياس درجة التلوث يمكن بواسطتها معرفة مدى شدة الخطورة والتمكن من ايجاد حلول المناسبة لها وان هذه الحلول او المعالجات ينبغي ان تكون ذات كلفة قليلة واقل اثار جانبية واستعملت العديد من طرائق المعالجة الكيميائية والفيزيائية والحيوية لازالة التلوث الهايدروكاربوني وتعد المعالجه الحيوية من انسب الطرائق في الحد من الاثار السلبية للتلوث بالمركبات الهايدروكاربونية (Calvo *et al*.,2009).

2.2.مصير تسرب النفط في البيئات المائية

The fate of the oil spill in aquatic environments

بمجرد انسكاب النفط في البيئات المائية فأنه يبدأ بالانتشار فوق سطح الماء وتحدد كل من لزوجة النفط الخام وحجم البقعة النفطية السرعة التي ينتشر فيها النفط ، اذ ينتشر النفط منخفض اللزوجة بصورة اسرع من النفط عالي اللزوجة ويبدأ النفط بالانتشار على شكل بقعة نفطية مترابطة ولكن لا تلبث اذ تبدأ بالتفكك بصورة سريعة (Yakimov *et al*.,2004) وتتحلل الانواع النفطية عالية اللزوجة الى مجموعة من البقع التي تبدأ بالابتعاد عن بعضها ويتأثر انتشار هذه المجاميع بكل من تيارات المياه وتيارات المد والجزر فضلاً عن الاضطرابات المائية والامواج (Kock,2011) .

وتختلف الانواع النفطية ذات المصادر المختلفة اختلافاً كبيراً في الخصائص الفيزيائية والكيميائية ، وتعتمد الخصائص الفيزيائية للنفط على التركيب الكيميائي اذ يعتمد الوزن النوعي واللزوجة على نسبة المكونات الاسفلتية والراتنجية والشموع (ITOPF ,2011)

وتتباين اثار تسرب النفط على البيئة المائية العذبة و المالحة وفقا لمعدلات تدفق المياه وخصائص هذه البيئات فالمياه الراكدة او بطيئة الحركة مثل المستنقعات أو البحيرات تكون فيها الآثار شديدة قياسا بالمياه المتحركة وذلك لان النفط المسكوب فيها يبقى لفترات طويلة اذ تستغرق سنوات لاسترداد هذه البيئات حالتها الطبيعية ، أما عندما يتسرب النفط الى نهر متحرك سيكون التأثير أقل حدة وذلك لان تيار النهر يعمل كألية تنظيف طبيعية (Leahy& Colwell, 1990).

تعمل بعض انواع النفط على امتصاص الماء وبذلك تتحول الى مستحلب من النفط والماء مما يعمل على زيادة حجم المواد الملوثة ، ويتوقف معدل ذوبان النفط الخام على كل من انتشاره تركيبه ودرجة الحرارة فضلاً عن درجة تشتته في المياه (Cao *et al*.,2009) .

وتتميز المركبات الهايدروكاربونية الخفيفة بكونها ذات قابلية ذوبان محدودة في الماء في حين تكون المركبات الثقيلة منها غير قابلة للذوبان اصلاً في الماء وبذلك فأن الاذابة للمركبات الهايدروكاربونية لا تسهم في إزالة النفط من على سطح المياه ، وتعمل بعض الأنواع النفطية عالية اللزوجة على تكوين طبقة كثيفة من مركبات عالية الوزن الجزيئي والتي تشكل طبقة سطحية واقية وبذلك تصبح على هيئة رواسب ثابتة (Semple *et al*.,2003) .

للنفط الخام قدرة عالية على الانتشار والتفاعل بأشكال عديدة ليصل الى كل من الهواء والتربة والمياه ويتوقف ذلك على العوامل الفيزيائية كالانتشار اذ ينتشر بسرعة في المياه وينجرف بفعل الامواج الى مسافات واسعة مما يشكل خطراً كبيراً وتهديداً لتلوث المياه ، كما يتبخر بالحرارة العالية مما يعمل على تلوث الهواء الجوي كما له القابلية على التفكك والتشكل على هيئة مستحلب (خليط من الماء والنفط) (Venosa&Zhu,2003) ومن ثم لا يقتصر ضرر التلوث النفطي على جانب واحد فقط اذ يمتد ليشمل كافة اشكال حياة الانسان والكائنات الحية سواء كانت برية ام بحرية اضافة الى الطيور والنباتات (Zhu *et al*.,2009)

تكون اغلب الانواع النفطية ذات وزن نوعي منخفض اي انها تبقى طافية فوق سطح الماء الا في حالة تفاعلها مع مادة اكثر كثافة اذ تعمل على الالتصاق بها في حين تكون بعض الانواع ذات وزن نوعي قريب من الوزن النوعي لمياه البحر وقد يؤدي ذلك الى هبوطها الى قاع البحر وهنا يأتي دور البكتريا التي لها القابلية على تحلل الهايدروكاربونات النفطية وأستهلاكها كمصدر للطاقة اذ تفرز العديد من الانزيمات التي لها القابلية على افراز مواد مستحلبة تعمل على تقليل الشد السطحي (Singh & Ward 2004)

3.2.الاضرار البيئية والصحية التي تسببها الترسبات النفطية Health and environmental damage caused by oil deposits :

الترسبات النفطية هي مواد خطرة ذات سمية عالية ومسرطنة وتدخل الى البيئة نتيجة للنشاطات البشرية الخاطئة اذ ان طرائق معالجة هذه المواد وعمليات الخزن والنقل عندما تتم بصورة غير صحيحة

ستثير القلق اذ ان اكثر مكونات هذه المواد تعد مسرطنة وسامة ومطفرة للخلايا (Ubani *et al*., 2013)

وعند وجود الترسبات النفطية وتراكمها داخل الخزانات والانابيب الناقلة فإنها تؤثر بصورة سلبية على عمليات الانتاج النفطي والتصدير والتصفية اذ تعمل هذه الترسبات على تقليل القدرة الاستيعابية للخزن والنقل وبذلك تقل القدرة الانتاجية للنفط (Lima *et al*.,2011)

عند تفريغ الترسبات النفطية oil suldge في البيئة فأن المركبات الخفيفة سوف تتطاير في حين ان المركبات الثقيلة ستندمج مع الجسيمات الاخرى التي تتواجد في التربة وبذلك فأنها تكون محمية من اي هجوم من الميكروبات التي تتواجد في التربة وبذلك تصبح عملية القضاء عليها صعبة جدا اذ يحدد نوع التربة وخصائصها الكيميائية والفيزيائية تواجد وتأثير هذه الترسبات في البيئة (Ubani,2012) كما تتسبب الملوثات الناتجة من عملية تفريغ االترسبات النفطية التي تتولد اثناء العمليات الصناعية الى البيئة بالعديد من الأضرار البيئية الشديدة فهي تعد مصدراً خطراً يهدد جميع اشكال الحياة اذا لم يتم تصريفها والتخلص منها بصورة صحيحة ومناسبة (De Morais & Tornisiel,2009).

تتسبب الاندلاقات النفطية التي تنتج خلال الحوادث البيئية بأضرار كبيرة للبيئة كما يحصل عند تصريف كميات كبيرة من الترسبات الصناعية في وحدات تصفية معالجة النفط وبهذا سوف تتراكم وان الشكل غير الآمن في طريقة التصريف والتخلص من هذه الترسبات يتسبب بخطورة كبيرة (Mohan *et al* .,2011)ومن اكثر الطرائق الشائعة في التخلص وازالة هذه الترسبات هي طريقة التنظيف اليدوي اذ يدخل العامل الى داخل الخزان النفطي وبذلك تزال الترسبات النفطية بالعمل اليدوي ويمكن ازالة هذه الترسبات بطريقتين ،فأما ان توضع مضخات متمركزة داخل الخزان اذ تعمل على دفع الترسبات الى الخارج او ان يتم افراغها من الباب الخلفي للخزان وتمتاز هذه الطريقة بكون العامل يبقى في الخزان لفترات طويلة يعمل تحت تأثير هذه المواد السامة (Banat *et al* .,1991).

تحتوي الترسبات النفطية والتي تم التخلص منها سواء عن طريق حرقها او على شكل مخلفات صناعية نفطية على عدة مركبات سامة وضارة كالرصاص ،كبريتيد الهيدروجين والبنزين ايضا ان بيئة الخزان تكون سريعة الاشتعال كما تتحرر عند الانتهاء من التنظيف وعمليات ازالة هذه الترسبات واثناء

تهوية الخزان العديد من الغازات والابخرة السامة والتي تكون ضارة بالنظام البيئي (Heath *et al* ,2004)

للترسبات النفطية تأثير تراكمي في الجهاز العصبي المركزي للأنسان اذ تسبب ظهور العديد من الاعراض المرضية مثل الم في الرأس فقدان الذاكرة والدوار ،وبصورة عامة يتوقف تأثيرها على كل من شدة التعرض ومدته فقد يصل التأثير في الحالات الشديدة الى ان جسم الانسان يقوم بأنتاج مركبات الايبوكسيد والتي تملك خاصية مطفرة وتؤثر على كل من الجهاز المناعي وتكوين الاجنه اضافة الى الجلد والجسم والكلى والرئتين والكبد والطحال كما تتسبب ايضا بنقصان في الوزن (Ubani,2012) ومن المهم معرفته ايضا انه يصل تأثير مكونات المنتجات النفطية الى صحة الإنسان وبيئته والكائنات الحية الاخرى والتي تكون متواجدة في مواقع مجاورة او قريبة من وحدات الانتاج النفطي والمعالجة فالمركبات التي ترافق النفط الخام قد تعمل على تحفيز عمليات مختلقة توصف بأنها مضرة بالنظام البيئي في هذه المناطق (Asia *et al* .,2006)

4.2.تصنيف الهايدروكاربونات النفطية

Classification of petroleum hydrocarbons

الهايدروكاربونات النفطية توصف بأنها مركبات عضوية قابلة للاشتعال تتكون بصورة طبيعية في التشكيلات الجيولوجية تحت سطح الارض وتصنف على أساس تركيبها الجزيئي الى أربع مجاميع وهي :

1-الالكانات Alkanes

وتسمى ايضا بالبارفينات paraffins او الهايدروكاربونات المشبعة saturated hydrocarbonsصيغتها الكيميائية CnH2n+2وتتميز بسلاسل متفرعة وغير مقفلة من ذرات الكاربون مع ذرات الهيدروجين وتحتوي فقط على اواصر مفردة من كاربون -كاربون (C-C)بدون اي آصرة مزدوجة او ثلاثية بين ذرات الكاربون .

2- النفثينات Naphthenes

وتسمى ايضا الالكانات الحلقية Cycloalkanes تركيبها الكيميائي CnH2n تتشابه مع الالكانات ولكنها تتميز بوجود حلقة واحدة أو أكثر من ذرات الكاربون في تركيبها الكيميائي وهي مستقرة عموما وغير قابلة للذوبان نسبيا في الماء.

3- الاروماتية (العطرية) Aromatics

هي هايدروكاربونات تحتوي على اواصر مزدوجة ومفردة بالتناوب فيما بين ذرات الكاربون وتتميز بكونها اكثر مركبات النفط الخام سمية ولها العديد من الاثار المسرطنة والمزمنة واشتق مصطلح العطرية بسبب كونها مركبات ذات رائحة جذابة ويتراوح عدد حلقاتها من واحد الى ست حلقات وتعرف المركبات الاروماتية التي تحتوي حلقتين او اكثر بالمركبات الاروماتية متعددة الحلقات polycyclic aromatic hydrocarbons

4-الالكينات Alkenes

وتسمى ايضا اولفينات olefins او isoparaffins صيغتها الكيميائية CnH2n-2 وتتميز بسلاسل متفرعة او غير مقفله من ذرات الكاربون بأستثناء وجود الاواصر المزدوجة التي تربط بين ذرات الكاربون وغالبا ماترسم المركبات الاروماتية بصورة مشابهه ل cyclic alkenes ولكنها تختلف في تركيبها وخصائصها ولا تتواجد الالكينات عموما في النفط الخام ولكنها شائعة الوجود في المنتجات المكررة كالبنزين مثلا.(Xiuhua,2002)

5.2.النفط الخام Crude Oil:

ان معرفة خصائص النفط الخام وتركيبه تساعد في اختيار الاستراتيجية المناسبة للتخلص من الآثار الناجمه عن التلوث النفطي، يتكون النفط الخام من مزيج من الهايدروكاربونات المعقدة والتي تتراوح نسبتها فيه من 50-98% ،وتشمل المركبات الهايدروكاربونية المشبعة Saturated hydrocarbon الالكانات الاعتيادية , n- alkane الالكانات المتفرعة Branched alkane والالكانات الحلقية Cyclic alkane والمركبات الهايدروكاربونية الاروماتية Aromatic hydrocarbon المركبات الاروماتية أحادية الحلقة Monocyclic aromatic والمركبات الاروماتية متعددة الحلقات Polycyclic aromatic hydrocarbon اضافة الى احتوائهعلى مركبات

غير هايدروكاربونية تدعى بالمركبات القطبية NSO نتروجين، كبريت ،اوكسجين وبنسب قليلة تصل الى اقل من 10% كما يحتوي مركبات اسفلتية Aspheltene ترتبط معها المعادن النزرة مثل الكادميوم Cd,والنيكل , Niوالفناديوم V،والكوبلت Co (Okolo,2005)

ويصنف النفط الخام اعتمادا على الكثافة النوعية الى نفط خام ثقيل وخفيف فالنفط الخفيف تكون كثافته النوعية حوالي 0,8 أو أقل ويكون المحتوى الاساسي له مركبات هيدروكاربونية اضافة الى احتوائه على نسب قليلة من الكبريت والشمع ومركبات اسفلتية اما النفط الخام الثقيل فتصل كثافته النوعية حوالي 1

كما يمكن تصنيفه ايضا اعتمادا على تركيبه الكيميائي الى ثلاثة أنواع تتمثل بالنفط البرافيني الذي يحتوي على كميات كبيرة من شمع البرافين ولا يحتوي على الاسفلت مثل نفط خام كركوك والنوع المختلط وذلك بسبب اختوائه على الشمع (البرافين) و الاسفلتين معا مثل نفط الشرق الاوسط والنوع الثالث هو النوع الاسفلتي والذي يتكون من الاسفلت ولايحتوي على البرافين (API,2001).

6.2.المعالجة الحيوية Bioremediation:

تعرف المادة المتحلله حيويا بأنها المادة العضوية التي يمكن تحللها بفعل البكتريا لتنتج اشكالاً اخرى تكون اكثر ثباتا اضافة الى كونها غير مؤذية للبيئة (الجبوري ،2005) فالمعالجة الحيوية هي طريقة تستعمل لتحطيم او ازالة الملوثات البيئية بأستعمال كائنات حية دقيقة (Sarah &Laroe,2010) وتعد المعالجة الحيوية من أنسب الطرائق التي يتم اللجوء اليها في التخلص من الهايدروكاربونات النفطية اذ تمتاز بكفاءة عالية اضافة الى بساطتها فهي لا تحتاج الى ايدي عاملة وصديقة للبيئة لاتتضمن أي آثار جانبية (Thapa *et al* ,2012) وتعمل المعالجة الحيوية على احداث تغيير كيميائي في الملوثات بأستعمال انواع مختلفة من الاحياء الدقيقة اذ تستعمل هذه الاحياء المركبات الهايدروكاربونية كمصدر غذائي فتؤدي الى تكسر هذه المركبات وانتاج المزيد من الطاقة (عنانزة ،2002)

ومعظم الملوثات البيئية للمجتمع الحديث تقع ضمن المركبات العضوية كالهايدروكاربونات والمواد الحيوانية والنباتية وغيرها من المواد التي تنشأ من الكائنات الحية والعديد منها غير عضوية مثل النترات والفوسفات والسيانيد والمعادن الثقيلة ،وتتميز هذه الملوثات بتأثيرها المسرطن او السمي للأنسان والحيوان هذا بالاضافة الى ماتسببة من تشوهات خلقية (Yelebe *et al* .,2015)و يطلق على فعل

الانزيمات على هذه المواد مصطلح التحلل الحيوي biodegradation و تشير المعالجة الحيوية الى الاستعمال الامثل لعمليات التحلل الحيوي لازلة الملوثات السامة التي وجدت طريقها الى البيئة وهي تعد بديلاً فعالاً من حيث الكلفة والازالة الكاملة للملوثات مقارنة بالوسائل الفيزيائية التي لاتتضمن معالجة التربة واستعادة وضعها السابق (Roy *et al*.,2014) .

ويعد النفط الخام مادة ذات حركة محدوده ويلتصق على مكونات التربة بصورة قوية وبهذا فإن الملوثات النفطية تبقى عالقة في الاقدام الستة العليا من التربة وتلامس جذور النباتات بصورة مباشرة ولهذا لابد من توفير معالجة حيوية فعالة للملوثات النفطية (Schwab &Banks,2000)

ويتطلب حدوث المعالجة الحيوية ان تتواجد الاحياء المجهرية المحللة في المكان المناسب اضافة الى العوامل البيئية التي تشجع حدوث التحلل الحيوي ومن اهم الأحياء المجهرية هي البكتريا والفطريات والتي تمتلك قدرات فسيولوجية وايضية تمكنها من تحطيم الملوثات وتعمل هذه الاحياء المجهرية في حالة وجود مصادر الكاربون على انتاج الانزيمات والتي تعد مسؤولة عن مهاجمة الجزيئات الهايدروكاربونية وتشارك العديد من الانزيمات المختلفة والمسارات الايضية في عملية تحلل الهايدروكاربونات المحتوية على النفط لكن في حالة عدم وجود الانزيم المناسب فأن ذلك يؤدي الى اعاقة عملية مهاجمة هذه الجزيئات او سيعمل كحاجز لاستكمال تحلل الهايدروكاربونات (Haritash & Kaushik,2009)

1.6.2.انواع المعالجة الحيوية Types of bioremediation :

يمكن ان تقسم المعالجة الحيوية الى نوعين اساسين :

1-التوهين الطبيعي Natural Attenuation

الذي يمكن تطبيقة دون تدخل بشري عندما تكون الظروف الطبيعية مناسبة وفقا لتعريف وكالة حماية البيئة في الولايات المتحدة الامريكية USEPA يشير الى مجموعة من العمليات االفيزيائية والكيميائية والحيوية لازالة الملوثات السمية (Jussila ,2006)

2-المعالجة الحيوية المهندسة Engineered Bioremediation

عن طريق اضافة مواد تحفز نمو الكائنات الحية الدقيقة وتمتاز المعالجة الحيوية المهندسة بكونها أسرع من التوهين الطبيعي بسبب امكانية تحفيز التحلل المايكروبي عن طريق التحكم في كمية التلوث

،الاوكسجين ،المغذيات ،الرطوبة ، الاس الهيدروجيني ،ودرجة الحرارة وما الى ذلك (Yerushalmi *et al*.,2003).

2.6.2.طرائق المعالجة الحيوية Bioremediation methods :

1-المعالجة الحيوية داخل الموقع In-site Remediation

يتم تحديد التقنية التي تستعمل في المعالجة الحيوية ان كانت داخل الموقع او خارجة اعتمادا على تركيز التلوث وموقعه ،ففي هذه المعالجة يتم الاعتماد على الاحياء المجهرية المتواجدة اصلا في الموقع الملوث فقط عن طريق تحفيز هذه الاحياء او تضاف الى الموقع الملوث احياء مجهرية تتميز بقدرات عالية في تكسير المركبات الهايدروكاربونية كذلك فإن استعمال هذه الطريقة يعتمد على نوع الميكروبات الداخلية التي تتواجد في المناطق الملوثة ويعتمد نشاط هذه الميكروبات على كمية الاوكسجين المتوفر في الموقع اذ ان انخفاض نسبة الأوكسجين يقلل من نسبة التحلل الحيوي لذلك ترش كميات من الاوكسجين للحفاظ على نسبته وبسبب التكلفة العالية فقد استعيض ببيروكسيد الهيدروجين بتركيز 30%بدلا من الاوكسجين اذ ان كل لتر من هذه المادة يمكن ان يوفر 100 جزيئة من الاوكسجين (Fengerman &Nagabhushanam ,2005)

2- المعالجة الحيوية خارج الموقع Ex-situ Remedation

وهي طريقة متخصصة تستعمل عندما يكون مستوى التلوث متوسطاً او كبيراً اذ ان لها قابلية عالية في تحليل الهايدروكاربونات في المناطق الملوثة ولكن يجب ان يؤخذ بالحسبان ان يتم تعديل الظروف البيئية من حرارة ومغذيات ودالة حامضية وغيرها لتناسب ظروف النمو للأحياء المجهرية ومن ثم يتم نقل الملوثات من الموقع الاصلي الى المكان الذي يتم فيه إجراء المعالجة اذ يتم اختيار مكان جيد التهوية والحرارة وفيه تخلط هذه الملوثات مع مواد عضوية محتوية على احياء مجهرية ذات قابلية على تحليل مثل هكذا ملوثات وبذلك يتم تحليل هذه المواد الملوثة ،قد تتم المعالجة في حاويات كبيرة تحتوي بداخلها على أحياء مجهرية او أنزيماتها وتستعمل هذه الطريقة عندما يراد إزالة الملوثات السامة والتي تتواجد في التربة أو الفضلات الصلبة (Harms *et al* .,2011)

7.2.الاحياء الدقيقة المستعملة في تحلل الهايدروكاربونات

Microorganisms used in hydrocarbons degradation

تمتاز الاحياء المجهرية المحللة للهايدروكاربونات النفطية بكونها شائعة الوجود سواء كانت في البيئة المائية او البرية ويؤدي اختلاف الطرائق التي تتبع في فحص وجود وتعداد هذه الاحياء الى صعوبة في معرفة الاعداد الحقيقية لهذه الاحياء (Atlas,1981)

وتتواجد في التربة أنواع مختلفة من الأحياء المجهرية كالبكتريا والفطريات وغيرها من الأحياء وعلى الرغم من ان هذه الميكروبات لا تشغل سوى 5% من مساحة التربة الا انها مسؤولة عن اكثر من 80-90% من جميع العمليات التي تحدث في التربة مثل تحويل المواد العضوية وتدوير المغذيات وصيانة بيئة التربة اضافة الى انه اكثر من 90% من تدفق الطاقة في التربة تمر من خلال عمليات التحلل المايكروبي (Ulrich &Becker ,2006)

فمن خلال عمليات التحلل ودوران المغذيات تقوم الأحياء المجهرية في التربة بالتحكم في وظائف النظام البيئي .و بما ان الكائنات الدقيقة في التربة تكون مسؤولة عن الغالبية العظمى من العمليات الكيميائية الحيوية التي تحصل في التربة فإن اداء التربة يعتمد بشكل كبير على انشطتها إضافة الى ذلك يوفر تركيب المجتمع المايكروبي معلومات حيوية عن نوعية التربة وتغير استعمالها وصحة النظام البيئي وذلك لاستجابتها للتغيرات بسرعة كبيرة (Doran & Zeiss, 2000) .

وتكون الهايدروكاربونات النفطية في البداية صعبة التحلل وذات فائدة قليلة للأحياء المجهرية ويحدد وجود الاحياء المجهرية ومدى التصاقها على سطح المركبات الهايدروكاربونية مدى ذوبانية هذه المركبات والتخلص منها فالتلامس المباشر بين هذه الاحياء والمركبات هو أمر ضروري لحدوث عملية التحلل الحيوي في المنطقة الملوثة بالنفط الخام (Jaccobucci *et al* .,2001)

ويتضح من عدد كبير من الدراسات ان التغيرات في التوزيع والزيادة السكانية للأحياء الدقيقة المستهلكة للهايدروكاربونات يمكن ان يحصل عند تعرض البيئة للهايدروكاربونات النفطية (Atlas 1981,)واجريت اول دراسة حول استغلال الاحياء الدقيقة المركبات الهايدروكاربونية في عام 1895من قبل العالم Miyoshiاذ لاحظ امكانية العفن *Botrytis cinera* في استغلال شمع البرافين وفيما بعد عزلت العديد من الانواع البكتيرية والخمائر والاعفان والتي لها القدرة على استغلال النفط الخام

ومنتجاته كمصدر للطاقة (الكعبي ،2010) اذ تمتاز العديد من الاحياء المجهرية بأن لها القدرة على استغلال هذه الهايدروكاربونات كمصدر وحيد للكاربون والطاقة وذلك من اجل القيام بأنشطتها المختلفة وتتوزع هذه الاحياء تقريبا على نطاق واسع في الطبيعة (Jyothi *et al*., 2012) فالقدرة على تحلل الهايدروكاربونات النفطية لا تقتصر على اعداد قليلة من الاجناس الميكروبية اذ تشمل مجاميع متنوعة من البكتريا والفطريات اضافة الى الطحالب التي تتوزع على نطاق واسع في البحار والمياه العذبة والتربة (Sharma & Pathak, 2014) من المعروف ايضا ان اعداداً كبيرة من البكتريا قادرة على تحطيم الهايدروكاربونات معظمها معزولة من ترب ملوثة او من الرواسب (Haritash & Kaushik, 2009)

وقد اثبتت كل من الدراسات المختبرية والميدانية ان الكثير من المجتمعات الميكروبية تحت سطحية قادرة على استقلاب الملوثات (Mao *et al*.,2015) وتعمل الاحياء المجهرية على تحويل المركبات الهايدروكاربونية الى CO_2 وماء وأحماض عضوية ومواد كحولية وان معظم هذه النواتج يتطاير اما البعض منها فيذوب في الماء الذي يعمل بدوره على تخفيفها وايقاف انتشارها في العمود المائي وبذلك يقل التلوث البترولي ان لم ينتهِ بعد مدة وجيزة (حوالي 3 اشهر) في المناطق الملوثة وبالاخص اذ لم يتواجد تلوث بترولي جديد في المنطقة اذ تعمل هذه الكائنات على مهاجمة البقع النفطية وتكسرها فلا يبقى منها سوى كرات القار والتي لا تنجح في تكسيرها في البداية اذ تحتاج الى فترات اطول اضافة الى عوامل اخرى تساعد في عملية هدم وتكسير كرات القار(الكعبي ،2010)

ويعتمد استعمال الميكروبات للمركبات الهايدروكاربونية على كل من الطبيعه الكيميائية لهذه المركبات داخل خليط النفط وعلى المحددات البيئية (Adeline *et al*.,2009) وتدخل الهايدروكاربونات الى البيئة من خلال التخلص من النفايات و الانسكابات العرضية اضافة الى مبيدات الافات والخسائر اثناء النقل والتخزين والاستعمال وتعد البكتريا من اكثر الاحياء المجهرية قدرة على تحطيم المركبات الهايدروكاربونية أو إزالة السمية من الملوثات العضوية فهي فعالة اقتصاديا وصديقة للبيئة (Das & Chandran ,2011)

وبشكل عام فأن الاحياء الدقيقة المستهلكة للهايدروكاربونات في النظم البيئية غير الملوثة تكون أقل من 0.1% من المجتمع المايكروبي ولكن هذا العدد يمكن ان يرتفع ليصل الى ١٠٠%في النظم البيئية الملوثة بالنفط (الكعبي،2010) اذ يعتقد ان درجة الارتفاع تعكس مدى تعرض النظام البيئي للملوثات الهيدروكاربونية .ويوضح الجدول (2-1) بعض اهم البكتريا المحللة للنفط الخام المعزولة من

بيئات الماء والتربة ، وهنالك بعض أجناس البكتريا التي تستعمل الهايدروكاربوبات كمصدر للكاربون والطاقة مثل *Pseudomonas ,Achromobacter ,Arthrobacter ,Micrococcus ,Nocardia* وغيرها من الاجناس(Ogidi & Njoku, 2017) وتعمل ملوثات التربة على تغيير الخواص الفيزيائية والكيميائية لهيكل التربة مثل الاس الهيدروجيني للتربة والمواد العضوية الكلية والتوصيلية الكهربائية ونتيجة لذلك تظهر للمجتمعات للميكروبية استجابة عند التعرض للملوثات (Sutton *et al*.,2013)

جدول(2-1) يبين بعض اهم البكتيريا المحللة للنفط الخام والمعزولة من بيئات الماء والتربة

اسم البكتريا	المصدر
Pseudomonas, Escherichia coli	(Emtiazi *et al*., 2005)
Bacillus	(Gupte &Sonawdekar, 2015)
Acinatobacter	(Onur, 2015)
Alcaligenes , Corynebacterium, Pseudomonas	(Akeredolu &Akinnibosun,2017)
Actinomyces	(Shahaby *et al*., 2015)
Staphylococcus	(Nweke &Okpokwasili, 2003)
Stenotrophomonas	(Cunha, 2002)
Acromobacter,Micrococcus	(Saddoun,2003)
Vibrio,Aeromonas	(Ulukanli & Digrak,2002)
Klebsiella ,	(Nweke & Okpokwasili ,2003)
Alcaligenes, Rhodococcus, Streptomyces, Achromobacter	(Andria, 2008)
Actinocorallia , Rhizobium ,Klebsiella ,Pseudomonas	(Al-Bahry *et al* ., 2016)
Pasteurella , Flavimonas ,Leclerica,	(AlJanabi, 2008)
Proteus ,Chryseomonas ,E.coli , Pseudomonas	(Akpe *et al* ., 2015)
Serratia ,Enterobacter ,E.coli	(Al-Mayaly, 2010)

8.2اخذ المركبات الهايدروكاربونية Uptake hydrocarbon compounds:

تقوم الاحياء المجهرية بأخذ المركبات الهايدروكاربونية وتوصيلها الى مناطق معينه بداخل الخلية ليتم تمثيلها والحصول على الطاقة وهذا يتم اعتمادا على عوامل عديدة منها نوع المركبات الهايدروكاربونية وطبيعتها الكيميائية و الفيزيائية والكائن المستهلك لهذه المركبات (Wang *et al.*,2001) وهناك ثلاثة اساليب مقترحة لالية اخذ هذه المركبات وهي:

1.8.2.اخذ الهايدروكاربونات الذائبة uptaked dissolved hydrocarbon :

وفي هذا الاسلوب يتم الاعتماد فقط على الهايدروكاربونات الذائبة في الماء والتي تكون مقتصرة على الالكانات ذات السلاسل القصيرة وجد انه عند تنمية بعض الاحياء المجهرية في وسط يحتوي على مزيج من الالكانات التي تكون ذات اوزان جزيئية مختلفة فأنها تستهلك الالكانات ذات الوزن الجزيئي الواطئ بصوره اسرع وهذا يعود الى قدرة المركبات ذات الاوزان الجزيئية الواطئة على الذوبان بصورة اسرع ومن ثم سهولة اخذها من قبل الخلية (Zhang &Miller,1995).

2.8.2.آلية التلامس المباشر Direct Contact Mechanisms:

في هذه آلالية تعمل خلايا الاحياء المجهرية المستهلكة المركبات الهايدروكاربونية على اخذ هذه المركبات والتي تكون بتماس مباشر مع سطوح هذه الخلايا اذ تقوم بأحتجازها لتنقلها فيما بعد عبر غشائها الخلوي (Choi *et al.*,1999) .

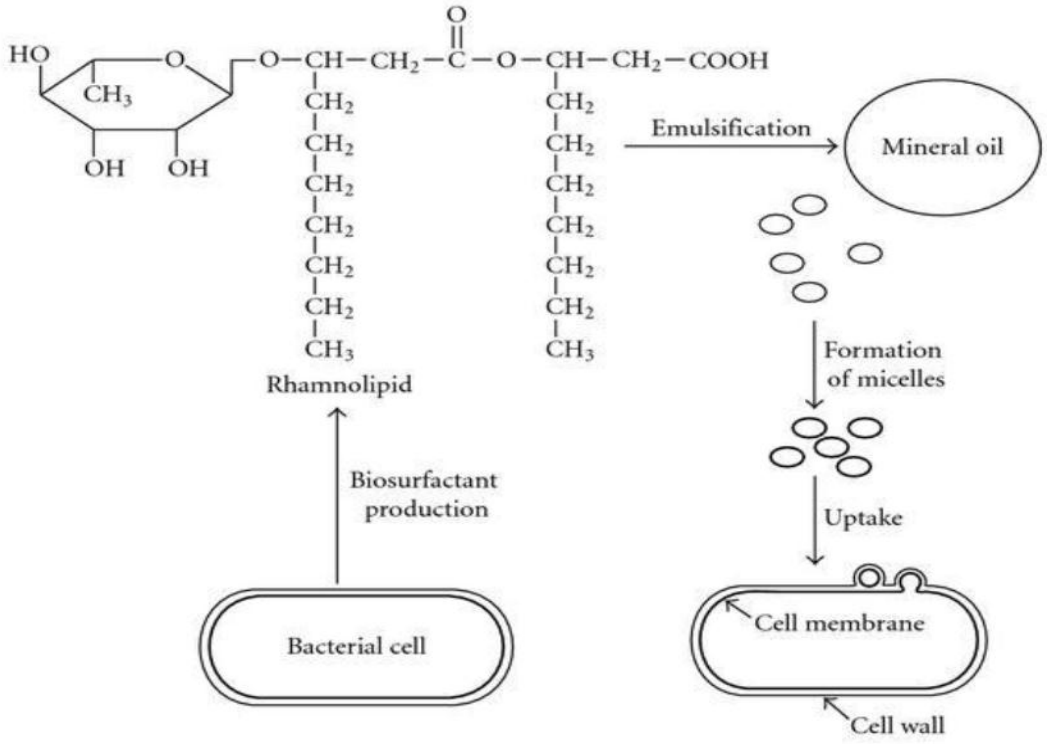
3.8.2.آلية الاستحلاب Emulsification Mechanisms:

الاستحلاب هو وجود سائلين لايذوبان في بعضهما بل يتشتت احدهما في الاخر وتعتمد درجة استقرارية المستحلب على طبيعة الخلط ، وتلاحظ هذه الظاهرة عند تنمية بعض انواع الاحياء المجهرية في وسط حاوي على الهايدروكاربونات فالمستحلبات الحياتية هي مركبات تفرز الى خارج الخلية اويتم انتاجها على سطح الخلايا وتكون بطبيعتها الكيميائية دهنية – سكرية glycolipid او دهنية – مفسفرة phospholipid وتحتوي على جزء كاره للماء وجزء محب للماء (Abdurrahim *et al.*,2009) .

وتنتج الاحياء المجهرية هذه المركبات لتسهيل أخذ المركبات العضوية التي تتصف بكونها قليلة الذوبان في الماء فتعمل هذه المستحلبات على زيادة الانتشار المائي لهذه المركبات ومن ثم زيادة ذائبيتها وجاهزيتها الحيوية(Jaysree *et al.*,2011) .

وتوجد آليتان تعمل المستحلبات الحياتية من خلالهما على زيادة تفكك المركبات قليلة الذوبان في الماء ففي آلالية الاولى تعمل هذه المستحلبات على زيادة المساحة السطحية للمهاجمة المايكروبية وذلك من خلال عملها على إذابة المركب الكاره للماء في داخل جزيئات صغيرة تدعى Micelleوبذلك تكون هذه المركبات جاهزة للأخذ من قبل الخلايا ، اما في آلالية الاخرى فتعمل المركبات المستحلبة على جعل سطوح الخلايا اكثر كراهية للماء ونتيجة لذلك يزداد الاتصال المباشر بين الخلايا والمركبات قليلة الذوبان بالماء (Rachedi *et al*.,2005) ويوضح الشكل (2-1) الآلية التي تساهم فيها المستحلبات الحياتية في امتصاص الهايدروكاربونات .

وتعد الالكانات من أكثر المركبات الهايدروكاربونية تحللا تليها الالكانات المتفرعة ،المركبات الهايدروكاربونية الاروماتية الاحادية ،الالكانات الحلقية ، وأخيراً الهايدروكاربونات الاروماتية متعددة النوى (van Hamme *et al*.,2003).



شكل (2-1) مشاركة المستحلبات الحياتية في امتصاص الهايدروكاربونات (Das &Chandran,2011)

9.2.اكسدة المركبات الهايدروكاربونية بفعل الاحياء المجهرية

Oxidation of hydrocarbons by microorganisms

تعتمد عملية التفكك الحياتي biodegradation و الاكسدة للمركبات الهايدروكاربونية على مجموعة عوامل منها نوع الكائن المجهري وتركيب المصدر الهايدروكاربوني وقابليته على الاكسدة اضافة الى طبيعة الانزيمات المحللة للمركبات الهايدروكاربونية (Zang *et al*.,2005) يتوسط عملية التحطيم الحياتي نظام انزيمي متخصص ففي عملية الاكسدة يوجد نوعان من التفاعلات الانزيمية ويشترك فيها نوعان من الانزيمات هما Dioxygenase, Monoxgyenase فالانزيم الاول يسهم بذرة اوكسجين واحدة الى التفاعل في حين تختزل الذرة الثانية من الاوكسجين الى ماء اما الانزيم الثاني فيسهم بذرتي اوكسجين في وسط التفاعل وتعتمد هذه التفاعلات على انزيمات الاحياء المجهرية المؤثرة ، طبيعة نواتج التفاعلات الانزيمية المتحررة ،وطبيعة المادة المجهز ة للوسط (Stringfellow,2001)

وتتضمن عملية الأكسدة اكسدة الهايدروكاربونات الاليفاتية اذ يعد النفط الخام المصدر الاساسي للمركبات الاليفاتية المشبعة وغير المشبعة وتعد الالكانات الطبيعية من أبسط المركبات القابلة للتحلل في الخليط الهايدروكاربوني النفطي بفعل الاحياء المجهرية (Karthikeyan *et al*.,1999)

اشار Rojo (2009) الى ان الالكانات الحلقية تمثل جزءا صغيرا من النفط الخام وهي مقاومة نسبيا للتفكك الحياتي ويتعقد التمثيل الحياتي لهذه المركبات في حالة عدم وجود مجموعة المثيل النهائية ضمن الحلقة.

ويمكن ان تصنف أكسدة الالكانات الى نوعين من الأكسدة هما الأكسدة الطرفية Terminal oxidation ففي هذه الطريقة تؤكسد المركبات الاليفاتية بواسطة مجموعة من الانزيمات يطلق عليها Monoxygenas systemوفيها يتم أكسدة ذرة الكاربون الطرفية لانتاج كحول اولي الذي يتحول الى الدهايد حامض دهني بفعل انزيمات الديهايدروجينيز ومن ثم يؤكسد الى الحامض الدهني الناتج من مسار اكسدة بيتا B-oxidationالى مركب اسيتل كو اي Acetyle Co A , (Ron&Rosenberg 2002)

اما النوع الثاني فهي الاكسدة تحت الطرفية Subterminal oxidation وهي اكثر انواع الاكسدة شيوعا في الاحياء المجهرية اذ تعمل على كل من الالكانات الواطئة C3 -C6 وطويلة السلسلة

وتحصل اكسدة اولية للمركبات الاليفاتية ينتج عنها كحول ثانوي ومن ثم يحصل سحب ذرة هيدروجين dehydrogenation اذ يتكون مركب كيتون المثيل وينتج حوامض ثنائية الكاربوكسيل والتي تدخل مسار اكسدة بيتا ليكون الناتج .Acetyle Co A (Rojo,2009) .

اما بالنسبة لاكسدة المركبات الهايدروكاربونية الاروماتية فتكون أكثر تعقيدا من أكسدة المركبات الاليفاتية لاحتياجها الطاقة لكسر الحلقة الاروماتية كذلك تختلف الانزيمات التي تشترك في هذه العملية عن الانزيمات المشتركة في اكسدة المركبات الاليفاتية ، وفيها تتفكك مجموعة متنوعة من المركبات الاروماتية الى مركبات وسطية تشمل protocatechuate ,catechol (Gulloto *et al*.,2008) اذ تتضمن عملية الاكسدة اضافة مجموعة الهيدروكسيل اولا hydroxylation لتكوين مركب ثنائي الهيدروجين وكسر الحلقة مكونة cis-muconateاو hydroxymuconic-semialdehyde وفي حالة وجود مجموعة الكيل في الحلقة الاروماتية فأنها تؤكسد اولا ومن ثم تدخل النواتج النهائية gentisate, catechol, protocatechuateالى احد المسارات الاتية وهي اورثوو ،ميتا ، بارا ليتم اكتمال عملية التفكك الحياتي (Malkawi *et al*.,2009) .

10.2.العوامل المؤثرة في التفكك الحيوي للهايدروكاربونات النفطية

Factors Affecting on biodegrediation of petroleum hydrocarbons

1.الاوكسجين :Oxygen

يعد الاوكسجين الجزيئي من العوامل المهمة في انظمة التفكك الحياتي اذ يتم استهلاكه من الاحياء في عملية التنفس اضافة الى عملة كمستقبل للالكترونات ومشاركته في التفاعلات المحفزة للأنزيمات ،وتعمل التراكيز القليلة من الاوكسجين على الحد من عملية التفكك الحياتي لذلك لابد من تزويد الاحياء المجهرية بكميات كافية منه (Atlas &Creniglia,1995)و تعمل انزيمات oxygenase systemوبوجود الاوكسجين الذري على المهاجمة الاولية للعديد من الجزيئات المتواجدة في الهايدروكاربونات النفطية ،وتتناسب سرعة التفكك الحيوي طرديا مع كمية الاوكسجين اذ تتباطأ عملية التفكك عند قلة الاوكسجين حتى تصبح بطيئة جدا في الظروف اللاهوائية وبذلك يعد الاوكسجين عاملا رئيساً يحدد سرعة التفكك الحياتي للنفط وعند غياب الاوكسجين يعمل كل من الكبريت او النتروجين كمستقبل الكتروني وذلك للأكسدة الجزيئية للمركبات الوسطية للهايدروكاربونات (Vidali, 2001)

2.الملوحة :Salinity

وهي أحد العوامل المهمة في عملية التفكك الحيوي إذ يزداد نشاط الاحياء المجهرية عند التراكيز الواطئة من الملوحة وبالعكس تسبب الملوحة العالية اختزال معدل التفكك الحيوي (Minai-Tehrani *et al.*,2009)وبذلك تكون العلاقة عكسية بين تمثيل الهايدروكاربونات والملوحة .وتنخفض ذائبية المركبات الاروماتية متعددة الحلقات مثل البايرين عند زيادة الملوحة لزيادة ادمصاص هذة المركبات من قبل الترسبات الطينية (Margesin& Schinner,2001)كذلك وجد ان للملوحة تأثيراً واضحاً على فعالية المستحلبات الحياتية (Ilori *et al.*,2005)

3.درجة الحرارة : Temperature

يحصل التفكك الحيوي للهايدروكاربونات في مدى واسع من درجات الحرارة ففي بيئات المياه العذبة يحدث التفكك الحيوي في مدى حراري يتراوح بين (20-30)م وفي بيئات المياه البحرية بين (15-20)م˚ اما بيئات التربة فيتراوح بين (30-40)م˚ (Venosa &Zhu,2003)

لاحظ Feitkenhauer و Märkl (2003)انه كلما انخفضت درجة الحرارة يكون معدل التفكك الحيوي بطيئا ويزداد التفكك كلما زادت درجة الحرارة اذ وجد انه عند زيادة درجة الحرارة من (20-35)م˚ يزداد معها تفكك النفثالين بمقدار عشر مرات .وتؤثر درجة الحرارة على الحالة الفيزيائية للهايدروكاربونات ففي درجات الحرارة المنخفضة تتحول الهايدروكاربونات من حالة سائلة الى حالة شمعية صلبة كذلك الهايدروكاربونات الذائبة تنخفض ذائبيتها وتترسب ، وهذه التغيرات في الحالة الفيزيائية لهذة المركبات تقلل من جاهزيتها الحياتية ومن ثم تقلل من تفككها الحيوي كما تؤثر درجة الحرارة على فعالية المستحلبات الحيوية (Ilori *et al.*,2005)

4.المستحلبات الحياتية: Emulsifiers

تتفاعل المستحلبات الحياتية المنتجة من قبل الأحياء المجهرية مع المركبات الهايدروكاربونية فتزيد من ذائبيتها وجاهزيتها الحياتية ومن ثم تسهيل عملية التفكك_الحياتي (Varjani & Upasani,2017)

وتوصل Johnsenوجماعته (2005) الى ان التفكك الحياتي للمركبات الاروماتية متعددة الحلقات الذي تنتجه بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* النامية على الفينانثرين والنفثالين هو

مستحلب حياتي يزيد من ذائبية هذه المركبات واستحلابها وأخذها من قبل الخلايا . ويلعب التركيب الكيميائي للمستحلب الحياتي دوراً واضحاً في التفكك الحيوي إذ وجد ان هناك علاقة قوية بين كل من تركيب المستحلب الحياتي ومعدل التفكك الحيوي للهايدروكاربونات (Cybulski *et al*.,2003).

5.المغذيات :Nutrients

للعناصر المغذية دور مهم في نمو وبناء الانزيمات المستعملة من قبل الاحياء المجهرية في عملية تكسير الهايدروكاربونات وتستهلك الاحياء المجهرية الكاربون كمصدر للطاقة وتحصل علية من الملوثات النفطية التي تضاف باستمرار الى البيئة ولكن هذه الكائنات لاتكتفي بالكاربون فقط انما تحتاج الى عناصر مغذية اخرى ،ومن اهم العناصر التي تحتاجها وبتراكيز عالية الفسفور والنتروجين اما الحديد والكبريت والمغنسيوم والصوديوم والكالسيوم وعناصر اخرى فتحتاجها بكميات قليلة (Atlas 1984,)اوضحت مصادرمتعددة ان زيادة مستويات النتروجين يتسبب بآثار سلبية على تحلل المواد الهايدروكاربونية وبالاخص على المركبات العطرية (Okolo ,2005)فالزيادة المفرطة في تركيز المواد المغذية قد تعمل على تثبيط عملية التحلل الحيوي (Chaillan *et al*.,2006).

6.الأس الهيدروجيني pH

الأس الهيدروجيني الامثل لتفكك الهايدروكاربونات في التربة يتراوح بين(6-8) اما في المياه الطبيعية فيتراوح بين (7-8.5) ويزداد التفكك الحيوي للهايدروكاربونات اعتماداً على فعالية المستحلبات الحياتية (Ilori *et al*.,2005).

11.2 انزيم Catechol 2,3 dioxygenase ودوره في عملية التحلل الحيوي للهايدروكاربونات النفطية :

تتوزّع المركبات الهايدروكاربونية في الطبيعة على نطاق واسع وعادة ما تكون الشاغل الرئيس ومحط الاهتمام وذلك بسبب سميتها للكائنات الحية فضلا عن ثباتها البيئي وعلى الرغم من ذلك يمكن استعمالها من قبل العديد من الانواع البكتيرية على اعتبارها مصدر للكاربون والطاقة ، وبسبب قدرة هذه الأحياء على النمو في وجود هذه المركبات فيمكن استخدامها كوسائل مختلفة في المعالجة الحيوية (Hupert –Kocurek *et al*.,2014)

العديد من المركبات الهايدروكاربونية الاروماتية مثل BTEX (بنزين ، تولوين ، اثيل بنزين ، زايلين) هي مركبات رئيسة للنفط الخام ويمكن ان تتحلل هذه المركبات الى مركبات اقل سمية ،وذلك من خلال عدة خطوات وبمسارات مختلفة فالتحلل الحيوي باستعمال الأحياء المجهرية هي طريقة شائعة لتحليل الهايدروكاربونات في البيئات الملوثة اذ تمّ عزل العديد من الأحياء المجهرية من مواقع ملوثة بالنفط الخام(تربة ، ماء) أظهرت قدرة واضحة في تحلل هذه المركبات (Hamzah *et al.*,2013)

وتعمل الأحياء المجهرية على استهلاك المركبات الهايدروكاربونية عن طريق نظام انزيمي متخصص ، وفي أغلب الأحيان تتم عملية تشفير هذه الانزيمات داخل البلازميدات أو قد تكون على الكروموسومات فعندئذ يتم حملها على الترانسبوزونات Transposons او قد تكون محاطة بتعاقبات الادخال Insertion sequences (Ibrahim ,2003)

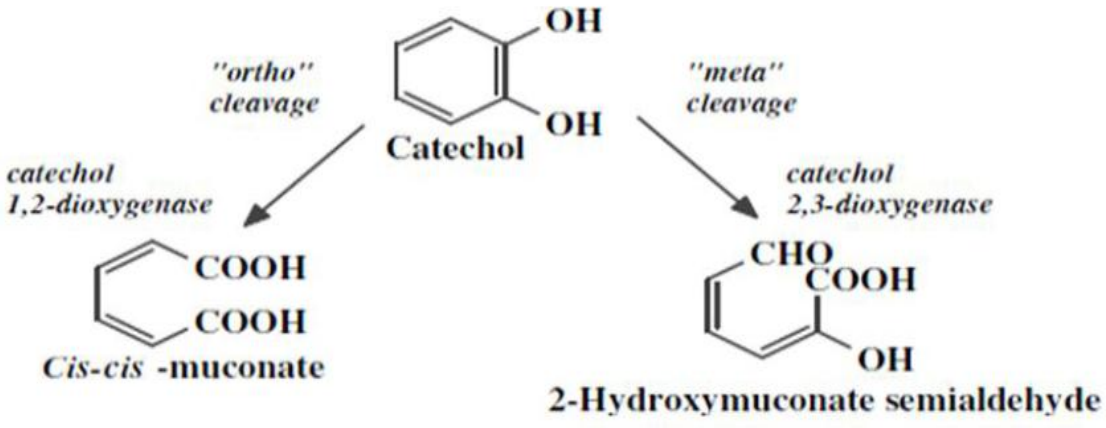
نظراً لأهمية انزيمات dioxygenase في عملية التحلل الحيوي فقد اكتسبت الكثير من الاهتمام ، ويمكن تصنيف هذه الانزيمات الى مجموعتين وفقاً لطريقة انفصال الحلقة الاروماتية الى Intradiol enzyme والتي تعمل على شقّ الحلقة الاروماتية بين مجموعتي الهيدروكسيل مثل Catechol 1,2 dioxygenase و Extadiol enzyme الذي يعمل على شقّ الحلقة الاروماتية بين ذرَّة كاربون لمجموعة هيدروكسيل hydroxylated carbon وذرَّة كاربون أخرى مجاورة لمجموعة غير هيدروكسيلية non hydroxylated carbon (Malkawi *et al.*,2009)

ويتواجد انزيم catechol 2,3 dioxygenase (C23O) في مدى واسع من الأنواع البكتيرية سواء كانت موجبة او سالبة لصبغة كرام ، ويكون المدى الحراري الأمثل لإفراز هذا الانزيم هو 30-50م°خلال عملية التحلل الحيوي لذلك فإنَّ الطبيعة المحبة للحرارة لإنزيمات البكتريا يمكن ان تضيف مزيداً من المزايا لأستعمالها في المعالجة الحيوية للمناطق الملوثة بالنفط خلال موسم الجفاف اما بالنسبة للرقم الهيدروجيني فيكون من 6-8 (Olukunle *et al.*,2015)

ويتكون التحلل الهوائي لمسارات الهايدروكاربونات من ثلاث خطوات ، ففي الخطوة الاولى يتم إدخال مجموعتين من الهيدروكسيل والتي يتم تحفيزها بواسطة انزيمات dioxygenase وذلك لإنتاج مركبات أروماتية ثنائية الهيدروكسيل والتي عادة ماتكون كايتكول Catechol الذي بدوره يكون أساساً للخطوة الثانية من الهدم عن طريق انشطار الحلقة الاروماتية بواسطة Catechol 1,2 dioxygenase و Catechol 2,3dioxygenase (Dokic *et al.*,2012) اما في الخطوة الاخيرة فتتحول نواتج

انشطار الحلقة الاروماتية الى مركبات اليفاتية صغيرة يتم استقلابها الى Carbondioxide خلال دورة الاحماض ثلاثية الكاربوكسيل (TCA cycle) Tricarboxylic acid cycle & Wiliams Sayers,1994)

أشار Tavakoliو Hamzah (2017) الى ان المركبات الاروماتية تضّم العديد من المركبات أهمها ثنائي الفينيل ، النفثالين ، التولوين و البنزوات التي تعمل الاحياء المجهرية الى تحويلها الى مركب وسطي هو كايتكول Catecho بعملية التحلل الميكروبي microbial degradationويخضع الكايتكول المتكون كمركب وسطي في هذه العملية الى الانشطار بفعل انزيمات Catechol 1,2 dioxygenaseو Catechol 2,3 dioxygenase ، اذ تعمل انزيمات intradiol enzyme (Catechol 1,2dioxygenase) على شطر اصرة C-C في الموقع 1,2 (ortho) position من الكايتكول لينتج cis,cis-muconic acid الذي بدورة يتحلل اكثر بواسطة مسار β-ketoadipate pathway ، في حين تعمل انزيمات extradiol enzyme (catechol 2,3 dioxygenase) على تحويل الكايتكول الى 2hydroxymuconic semialdehydeعن طريق كسر الاصرة C-C في الموقع 2,3 (meta) position وهو جزء من مسار α-ketoadipate pathway كما في الشكل (2-2)



شكل (2-2) تحلل مركب الكايتكول عبر مساري اورثو و ميتا (ortho and meta pathway) (Zeyaullah *et al*.,2009).

ولتجنب تراكم المركبات الوسطية السامة فقد طورت البكتريا العديد من الاستراتيجيات مثل التعبير عن (expression C23O) catechol 2,3 dioxygenase وإعادة التنشيط reactivating وتعطيل تثبيط C23O والتكرار الجيني gene duplications الذي يزيد من استهلاك الكايتكول او يعمل على الانتاج المتوازن للأنزيمات المسؤولة عن انتاج الكايتكول وتحلله (George & Hay,2012)

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3-المواد وطرائق العمل Meterials and Methods

1.3 الأجهزة والمستلزمات Instrument and Equipments

1.1.3 الأجهزة المستعملة Instruments

جدول (1.3)الاجهزة المختبرية المستعملة قيد الدراسة

التسلسل	اسم الجهاز	الشركة المصنعة
1	المازج الدوامي Vortex Mixer	Cyan (China)
2	المطياف الضوئي Spectrophotometre	Gallen kampe (England)
3	ثلاجة (براد) Refrigerator	Concord (Lebanon)
4	جهاز PCR Thermal Cycler	ABI (USA)
5	جهاز الاشعة فوق البنفسجية Ultraviolet trans illuminator	UV Products (USA)
6	جهاز الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis apparatus	Bio-Rad (Italy)
7	جهاز القطرة النانوية DNA-RNA Spectrophotometer	Biogroup (UK)
8	جهاز النبذ المركزي Eppendorf bench centrifuge	Optimal(Japan)
9	جهاز تقطير Distillor	GFI (Germany)
10	جهاز قياس الاس الهيدروجيني pH- meter	Martini(USA)
11	حاضنة Incubater	Memmert (Germany)
12	حاضنة هزازة Shaking Incubater	Gallen kampe (England)
13	حمام مائي Water bath	Marubeni (Japan)
14	صفيحة تسخين Hot plate	
15	فرن كهربائي Oven	Memmert (Germany)
16	كابينة تعقيم Hood	Marubeni

17	كاميرا رقمية Digital Camera	Sony (Japan)
18	مجهر ضوئي مركب Compound Light Microscope	Olympus (Japan)
19	مؤصدة Autoclave	Marubeni (Japan)
20	ميزان حساس Sensitive Balance	Sartorius(USA)

2.1.3 المستلزمات والأدوات المختبرية Equipment and Tools

استعملت المستلزمات والأدوات الآتية كما موضحة بالجدول (3 -2)

جدول (3-2) المستلزمات والأدوات المستعملة في الدراسة

ت	الادوات المستعملة	الشركة المصنعة
1	اسطوانات زجاجية Glass cylinder	AFMA (Jordan)
2	اطباق بلاستيكية Plastic petri dishes	
3	انابيب بلاستيكية دقيقة Plastic test tubes	Bioneer (Korea)
4	دوارق زجاجية بأحجام مختلفة Glass flasks	AFMA (Jordan)
5	شرائح زجاجية Slides	Slibrand (China)
6	عروة ناقل Loop full	KD SURGICALS (India)
7	ماصات دقيقة Micro pipettes	Slamed (German)
8	مرشحات دقيقة Filter paper	
9	مسحات معقمة Disposable swabs	AFMA (Jordan)

3.1.3 المواد الكيميائية والحيوية Chemical and Biological Substance

جدول (3-3) المواد الكيمياوية والحيوية المستعملة في الدراسة

ت	المادة الكيميائية	الشركة المصنعة
1	اكاروز Agarose	BDH (England)
2	الفا نفثول α-Naphthol	
3	بروميد الاثيديوم Ethidium –Bromide	Sigma (USA)
4	بيروكسيد الهيدروجين H2O2	BDH (England)
٥	ترس حامض الهيدروكلوريك Tris –HCL	
٦	ترس قاعدي Tris –base	
٧	حامض البوريك Boric acid	Merk (Germany)
8	سلم الحمض النووي القياسي DNA ladder (100-1500)	Bioneer (Korea)
9	فوسفات ثنائية البوتاسيوم K_2HPO_4	BDH (England)
10	كبريتات الصوديوم المائية $Na_2SO_4.7H_2O$	
11	كبريتات المغنسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$	
12	كحول اثيلي مطلق Absolute Ethanol 99%	
13	كحول الايزوبروبيل Isopropyl alcohol	Promega (USA)
14	كلوريد الامونيوم NH4CL	BDH (England)
15	كلوريد الصوديوم NaCl	Promega (USA)
16	كليسرول Glycerol	BDH (England)
17	ماء منزوع الايونات Di ionized water	
18	المثيل الاحمر Red Methyl	
19	محلول الترحيل TBE	

20	مسحوق الاكار	Agar	
21	نفط خام	Crude oil	حقول البصرة
22	هيدروكسيد البوتاسيوم	KOH	Promega (USA)
23	هيدروكسيد الصوديوم	NaOH	Fluke (Germany)
24	يوريا	Urea	BDH (England)

4.1.3 الأوساط الزرعية الجاهزة Culture Media

جدول (3-4) الاوساط الزرعية الجاهزة المستعملة في الدراسة

ت	اسم الوسط		الشركة المصنعة
1	الاكار المغذي	Nutrient agar	Oxoid (England)
2	أكار الدم	Blood agar	
3	أكارالستروماید	Citrimide agar	Himedia (India)
4	أكار ملح المانيتول	Mannitol salt agar	
5	المرق المغذي	Nutrient broth	Oxoid (England)
6	الماكونكي	MacConkey agar	
7	ايوسين مثيلين الازرق	Eosin methylene blue	Himedia (India)
8	نقيع القلب الدماغ السائل	Brain heart infusion broth	Oxoid (England)
9	وسط سايمون ستريت	Simmon citrate agar	

10	وسط ماء الببتون Pepton water medium	Himedia (India)

5.1.3الصبغات والكواشف Stains and Reagents

جدول (3-5) الصبغات والكواشف المستعملة في الدراسة

ت	اسم الصبغة او الكاشف	الشركة المصنعة
1	صبغة التحميل Loading dye	Bioneer (Korea)
2	صبغة السفرانين Safranine stain	Sigma (England)
3	صبغة المثيل الاحمر Methyl red	BDH (England)
4	صبغة بروميد الاثيديوم ethidium bromide Dye	Biobasic (Canada)
5	كاشف الاوكسديز Oxidase reagent	BDH (England)
6	كاشف بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide	SDI (Iraq)
7	كاشف كوفاكس Kovacs Reagent	India
8	محاليل صبغة كرام Gram stain solution	Syrbio (France)

6.3.1 البادئ primer

تم استخدام بادئ خاص بجين انزيم catechol 2,3 dioxygenase الذي يشفر لتحلل الهايدروكاربونات النفطية وذلك باستعمال موقع NCBI –Genbank وبرنامج تصميم البادئات primer3plus وتم تجهيز هذا البادئ عن طريق شركة Bioneer في كوريا كما في الجدول(3-6)

كانت درجة الحرارة للبادئ الامامي (Tm=56.3 C˚)اما البادئ العكسي (Tm=56.3C˚) أعتماداً على برنامج Optimase Protocol Writer. اما بالنسبة لـ Code الجين الاصلي المأخوذ منه البادئ فهو AJ544924.2 *Pseudomonas* sp. 1YB2 C23O gene for Catechol 2,3 dioxygenase ,strain 1YB2

جدول(3-6) البادئ المستعمل في الدراسة

المصدر	البادئ	التسلسلات		ناتج التضخيم
مصمم في هذه الدراسة	Catechol 2,3 dioxygenase	F*	CGAACGATTCATGACCGTGC	553bp
		R	TTCCAGGTCATGAGCAGCAG	

*البادئ الأمامي F: Forword : البادئ العكسي R: Rever

7.3.1 العّدد المختبرية The Laboratory Kits

جدول(3-7) العّدد المختبرية المستعملة في الدراسة

ت	العُدد	الشركة (المنشأ)
1	**عدة تشخيص API 20 System الذي يضم اشرطة الفحص فضلاً عن** API Suspension Medium,Incubation Box, Mineral Oil وكذلك يضم الكواشف الاتية VP2,VP1,James,TDA	BioMerieux (France)
2	**عدة أستخلاص DNA الجينومي DNA Genomic Extraction Kit وتضم المحاليل التالية لأجراء الفحص** GT Buffer 30 ml, GB Buffer 40 ml, W1 Buffer 45ml, Wash Buffer 100 ml, Elution Buffer 30 ml, GD Colum 100 pcs, 2ml collection tubes 100 pcs	Geneaid (Thailand)
3	**عدة مزيج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR** **Accupower® PCR PreMix** وتشمل مكوناتها _dNTPs (dATP ,dCTP ,dGTP ,dTTP) each :250 µM _Taq DNA polymerase 1U _Tris-HCl (pH 9.0) 10 µM _KCl 30 µM _$MgCl_2$ 1.5 µM _Loading dye	Bioneer (Korea)

2.3 طرائق العمل Methods

1.2.3التعقيم Sterilzation

عقمت جميع الأدوات الزجاجية المستعملة والتي تحتاج الى تعقيم جاف باستعمال الفرن الكهربائي عند درجة حرارة 180م لمدة ساعتين في حين عقمت جميع الاوساط الزرعية والمحاليل التي استعملت في هذه الدراسة والتي تحتاج الى تعقيم رطب بالمؤصدة (Autoclave) عند درجة حرارة 121م وضغط 15باوند/انج٢ ولمدة 15دقيقة اما بالنسبة للمحاليل التي تتأثر بالحرارة فعقمت باستعمال مرشحات غشائية milliporefilters(قطر الفتحة الواحدة 0.22 ملي مايكرون) (Greenwood *et al.*, 2012)

2.2.3تحضير الاوساط الزرعية Preparation of Culture Media

حضرت الاوساط الزرعية الجاهزة الموضحة في الجدول (3-4)وفقا لتعليمات الشركة الخاصة بكل وسط وضبط الاس الهيدروجيني لها وعقمت بحسب نوع الوسط الزرعي بالمؤصدة عند درجة حرارة 121م ولمدة 15دقيقة بعدها حضنت هذه الاوساط بعد الانتهاء من صبها في أطباق أو أنابيب وذلك بحسب متطلبات التجربة عند درجة حرارة 37م ولمدة 24ساعة للتأكد من عدم وجود اي تلوث بعدها تم حفظها في الثلاجة عند درجة حرارة 4 م لحين استعمالها.

فيما حضرت الاوساط التركيبية كما يأتي :-

1.2.2.3 وسط اكار الدم Blood Agar Medium

حضر وسط الدم الاساس وفقا لتعليمات الشركة المصنعة وذلك بإذابة 37.5غم من الوسط في 1 لتر من الماء المقطر ومن ثم عقم بالمؤصدة ثم ترك ليبرد الى درجة حرارة 45-50م وبعد ذلك اضيف اليه الدم بنسبة 5%ومزج بلطف ومن ثم صب في الاطباق وترك حتى يتصلّب وحفظ في الثلاجة بدرجة 4 م لحين استعماله (Cheesbrough,2006).

2.2.2.3 وسط الاملاح المعدنية السائل Mineral Salts Liquid Medium

استعمل هذا الوسط كوسط انتقائي لعزل البكتريا المفككة للهايدروكاربونات النفطية واختبار مقدرتها في استهلاك النفط الخام باعتباره مصدرا وحيدا للكاربون و الطاقة وحضر هذا الوسط بأذابة كل من 4غم من NH_4CL، 0.2 غم من$MgSO_4.7H_2O$ ، 0.1غم من NaCl ، 1.8غم من K_2HPO_4

0.01، غم من NaSO4.7H20 ، في لتر من الماء المقطروعدل الاس الهيدروجيني الى 7.2بعدها عقم بالمؤصدة ومن ثم اضيف نفط خام بنسبة 1 % (Jyothi *et al*.,2012).

3.2.2.3 وسط الاملاح المعدنية الصلب Mineral Salts Solid Medium

استعمل هذا الوسط لعزل وتنمية البكتريا المحللة للهايدروكاربونات النفطية واختبار قدرتها على استهلاك النفط الخام بـاعتباره مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة ، وذلك باستعمال وسط الاملاح المعدنية السائل المحضر وفقاً للفقرة (2.2.2.3) والمضاف له الاكار بنسبة 2 % بعد ذلك عقم بجهاز المؤصدة بدرجة 121 م ولمدة 15 دقيقة (Jyothi *et al*.,2012).

4.2.2.3 وسط اكار اليوريا Urea Agar Media

حضر هذا الوسط بأذابة 2.5 غم من وسط اليوريا في 95ملليتر من الماء المقطر ثم عقم بالمؤصدة بعدها برد الى درجة حرارة 45 م واضيف إليه 5ملليتر من محلول اليوريا المعقم بواسطة مرشحات دقيقة وصبّ فيما بعد بصورة مائلة (slant) بأنابيب معقمة وذات اغطية محكمة وحفظ في درجة حرارة 4 م لحين استعماله .استعمل هذا الوسط في التحرّي عن قابلية البكتريا في إنتاج انزيم اليوريز (Forbes *et al*., 2007).

5.2.2.3 وسط اكارالحركة Motility Agar Media

حُضر وسط المرق المغذي (Nutrient broth) بحسب تعليمات الشركة المصنعة وأضيف عليه 0.5% أكار ليعطي وسطاً شبه صلب ثم عقم بالمؤصدة ، وترك ليبرد وقبل أن يتجمد وزع في انابيب نظيفة ومعقمة (Macfaddin ,2000) .

3.2.3 تحضير الكواشف Preparation of Reagents

1.3.2.3كاشف الاوكسديز Oxidase Reagent

حضر بأذابة 1غم من كاشف N,N,N,N,Tetra methyle –p- phenylene diamine dihydrochlorideفي كمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 100ملليتر من الماء المقطر ووضع الكاشف في قنينة معتمة واستعمل هذا الكاشف في التحري عن قدرة البكتريا على إنتاج انزيم الاوكسديز (Macfaddin ,2000) .

2.3.2.3كاشف الكاتاليز Catalase reagent

حضر بإضافة 21مللتر من مادة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 70%الى 50مللتر من الماء المقطر ومن ثم اكمل الحجم الى 100مللتر للحصول على تركيز نهائي 3%بعدها حفظ الكاشف في قنينة معقمة ،استعمل في معرفة قدرة البكتريا على انتاج انزيم الكاتاليز (Macfaddin,2000).

3.3.2.3كاشف المثيل الاحمر Methylred Reagents

حضر بإذابة 0.1غم من صبغة احمر المثيل Azo methyl red في 300مللتر من الكحول الاثيلي بتركيز 95%بعدها اضيف اليه 200مللتر من الماء المقطر ثم حفظ الكاشف في قنينة معتمة بدرجة 4م ويستعمل للتحري عن قدرة البكتريا على تخمير سكر الكلوكوز (Brown,2007).

4.3.2.3 كاشف فوكس بروسكورVoges-Proskauer Rergents

يتألف هذا الكاشف من محلولين هما:

المحلول الاول : هيدروكسيد البوتاسيوم KOH 40% والذي حضر بإذابة 40غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في 100مليلتر من الماء المقطر

المحلول الثاني :الفا نفثول 5% والذي تم تحضيره بإذابة 5غم من الفا نفثول في 100مليلتر من الكحول الاثيلي (Forbes *et al* .,2007)

5.3.2.3 كاشف كوفاكس Kovacs Reagent

استعمل في اختبار الاندول ،اذ حضر بإذبة 5غم من مادة para-dimethyl aminobenzaldehyde في 75مليلتر من كحول الايزوبروبيل وذلك باستعمال حمام مائي بعدها اكمل الحجم الى 100مليلتر من HCL ليصبح الكاشف ذا لون اصفر شاحب ، ومن ثم حفظ الكاشف بقنينة معتمة في الثلاجة (Harley &Prescott,1996).

4.2.3 تحضير المحاليل Preparation of Solution

1.4.2.3المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline Solution

استعمل هذا المحلول في تخفيف العالق البكتيري ،وحضر بإذابة 0.85غم من كلوريد الصوديوم في 90مل من الماء المقطر ومن ثم اكمل الحجم الى 100مل بالماء المقطر بعدها عقم بالمؤصدة ثم حفظ في الثلاجة في درجة 4 م° لحين الاستعمال (Macfaddin,2000).

2.4.2.3 دارئ Tris base-Boric acid-EDTA (TBE)

حضر بإذابة 54 غم من Tris base و27.5 غم من حامض البوريك Boric acid في 20 مل من محلول EDTA تركيزه 0.5 مولاري ثم يضاف 900 مل من الماء المقطر ليكمل الحجم الى 1 لتر وضبط pH الى 8 وعقم بالمؤصدة وحفظ في الثلاجة بدرجة 4 م لحين استعماله في الترحيل الكهربائي (Sambrook & Russel,2001).

3.4.2.3 محلول صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium bromide

حضر بأذابة 0.05 غم من صبغة بروميد الاثيديوم في 9 مل من الماء المقطر بعدها اكمل الحجم الى 10 مل بالماء المقطر للحصول على تركيز نهائي 5 ملغم /مل ومن ثم حفظ المحلول بدرجة حرارة 4 م بالظلام لحين الأستعمال (Sambrook &Russel,2001).

4.4.2.3 محلول EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid)

حضر المحلول بأذابة 18.6 غم من مادة EDTA في 100مل من الماء المقطَّر وعدل الأس الهيدروجيني الى 8 باستعمال مادة هيدروكسيد الصوديوم NaOH وعقم بالمؤصدة (Bhalerao *et al* ,2010).

5.2.3 جمع العينات Collection of Samples

جمعت خلال الدراسة 200 عينة من مصادر مختلفة في مدينة الديوانية شملت تربة نصب المولدات ، تربة محال تبديل الدهن ، تربة معمل المطاط ، بعض مياه المبازل توزعت بواقع 50 عينة لكل محطة جمع ، جمعت عينات التربة في أكياس بلاستيكية معقمة وبوزن 1 كغم لكل محطة ، اما عينات ماء البزل فجمعت في قنانٍ زجاجية معقمة وبحجم 1 لتر لكل عينة ، ونقلت العينات بأسرع وقت

الى مختبر بحوث الأحياء المجهرية في قسم علوم الحياة ، كلية التربية جامعة القادسية واجريت عليها الاختبارات المطلوبة في اليوم نفسه .

6.2.3 زرع العينات Cultivation of Samples

اختلفت آلية الزرع بحسب طبيعة ومصدر العينات ، بالنسبة لعينات التربة لقح 1 غم من التربة في 50 مل من وسط الاملاح المعدنية السائل Minimal Salt Medium والمحضرعلى وفق الفقرة (2.2.2.3)والحاوي على 1% نفط خام Crude Oil كمصدر وحيد للكاربون والطاقة اما عينات الماء فقد لقح 1 مل من العينة في 50 مل من وسط الاملاح المعدنية وحضنت الدوارق في حاضنة هزازة Shaking incubater بسرعة 180 دورة في الدقيقة وبدرجة حرارة 37 م لمدة 7 ايام بعدها نشر 0.1 مل من وسط الاملاح المعدنية الذي زرعت فيه العينات وأظهر نمواً جرثومياً على اطباق من وسطي Macconkey agar وBlood agar وذلك بعد ان تم اجراء سلسلة من التخافيف المناسبة باستعمال المحلول الفسلجي (ثمانية تخافيف) اذ نقل 1 مل من المزروع البكتيري الى انبوبة تحتوي 9 مل من المحلول الملحي الفسلجي بعدها ينقل 1 مل من اول تخفيف الى الانبوبة الثانية وهكذا وصولا الى التخفيف الثامن .ومن ثمَّ حضنت الاطباق بدرجة 37 م˚ ولمدة24 ساعة وفيما بعد تم انتقاء المستعمرات المختلفة مظهريا وخططت على أطباق من الوسط نفسه (Liu *et al* .,2011).

7.2.3 العزل والتشخيص Isolation and Identification

أعيد زرع العزلات البكتيرية الغير مشخصة على كل من وسط اكار الماكونكي MacConkey agar ،وسط الايوسين أزرق المثيلين Eosin methylene blue ، والوسط الانتخابي لبكتريا السيدوموناس Citrimide agar ،ووسط اكار ملح المانيتول Mannitol Salt agar ، ووسط الدم Blood agar بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م.

1.7.2.3 التشخيص الزرعي Cultural Diagnosis

درست الصفات المظهرية للمستعمرات البكتيرية المعزولة بعد أن تم تنميتها على أوساط زرعيه مختلفة وتضمنت دراسة كل من الشكل والحجم والحافات والارتفاعات للمستعمرات .

2.7.2.3 التشخيص المجهري Microscopical Diagnosis

اخذت مستعمرة مفردة نقية نامية على وسط الاكار المغذي Nutrient agar بواسطة عروة ناقل معقم وتم وضعها على شريحة زجاجية مع بضع قطرات من الماء المعقم ومن ثم فرشت الخلايا وتركت حتى تجف وثبتت بأمرارها على اللهب ثلاث مرات وبصورة سريعة وصبغت بصبغة كرام وفحصت تحت العدسة الزيتية لملاحظة الشكل والترتيب الخلوي وطبيعة تفاعل البكتريا مع الصبغة (Brown,2007).

3.7.2.3 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Test

اجريت هذة الاختبارات على وفق الطريقة التي اوردها (Goldman & Lorrence,2009)

1.3.7.2.3 فحص الاوكسديز Oxidase Test

نقلت مستعمرة مفردة نامية بعمر 18 ساعة من على وسط الاكار المغذي ووضعت على ورقة ترشيح بعدها اضيفت اليها قطرة من كاشف الاوكسديز فعند تكون لوناً بنفسجياً خلال 5-10 ثواني فهو دليل على ايجابية الفحص اما عدم ظهور اللون البنفسجي او ظهوره بمرحلة متأخرة فيدل على سلبية الاختبار .

2.3.7.2.3 فحص الكاتاليز Catalase Test

نقل جزء من مستعمرة منماة لمدة 24 ساعة بوساطة عود خشبي معقم الى شريحة زجاجية نظيفة بعدها اضيفت اليه قطرة من محلول كاشف بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 3 % فظهور فقاعات غازية هو دليل على ايجابية الفحص ، استعمل هذا الفحص للتحري عن قابلية العزلة على انتاج انزيم الكاتاليز الذي يعمل على تحفيز تحرر الهيدروجين من بيروكسيد الهيدروجين .

3.3.7.2.3 اختبار المثيل الاحمر Methyl Red Test

استعمل هذا الاختبار للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج كميات كبيرة من حامض الفورميك او اللاكتيك نتيجة لأيض الكلوكوز اذ لقح وسط (MR-VP) بمستعمرات البكتريا وحضنت مدة 18-24 وبدرجة حرارة 37 م وبعد ذلك اضيف الى الوسط 5 قطرات من كاشف المثيل الاحمر فعند تغير لون الوسط الى الأحمر فهذا دليل على ايجابية الفحص .

4.3.7.2.3 اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization Test

استعمل هذا الاختبار للتحري عن قدرة العزلة البكتيرية على استهلاك السترات كمصدر للكاربون والطاقة وعلى استهلاك أملاح الأمونيوم كمصدر للنتروجين ،اذ لقحت الانابيب المحتوية على وسط سيمون ستريت بالعزلة البكتيرية وحضنت في درجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة عند تحول لون الوسط من الاخضر الى الازرق فهو دليل على النتيجة الموجبة .

5.3.7.2.3 اختبار فوكس بروسكور Voges –Proskauer

لقح الوسط (MR-VP medium)بالعزلة البكتيرية وحضن بعدها بدرجة حرارة 37م ولمدة 24ساعة بعدها اضيف 4 % من المحلول الاول هيدروكسيد البوتاسيوم KOH و 5 % من المحلول الثاني الفانفثول الى الوسط مع الرجّ فتغير لون الوسط خلال 5-15 دقائق الى اللون الاحمردليل على ايجابية الفحص اما تكون اللون الاصفر فيدل على سلبية الكشف ويجرى هذا الفحص لمعرفة قابلية العزلة البكتيرية على تكوين الاسيتون نتيجة لتخمر السكريات .

6.3.7.2.3 فحص قابلية البكتريا على الحركة Motility Test

لقح وسط الحركة بالبكتريا على شكل طعنة (stab) ومن ثم حضن لمدة 18-24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م° ان انتشار النمو حول مكان الطعنة يكون دليلاً على حركة البكتريا اما اذا اقتصر النمو في مكان الطعنة فقط فهذا يعني ان البكتريا غير متحركة .

7.3.7.2.3 فحص الاندول Indol Test

اجري هذا الفحص من خلال تنمية البكتريا في وسط ماء الببتون وحضنت لمدة 18-24 ساعة وبدرجة 37 م° بعدها اضيف ١-٢ قطرة من كاشف Kovacs Indol فظهور حلقة وردية او حمراء فهذا دليل على وجود انزيم Tryptophanase، اما ظهور حلقة صفراء فهذا يعني ان هذا النوع من البكتريا لاتفرز الانزيم المذكور ، الغرض من هذا الاختبار هو التحرّي عن البكتريا التي تفرز انزيم Tryptophanase الذي يعمل على تحليل الحامض الاميني التربتوفان Tryptophan الى حامض البايروفيك Pyruvic acid والامونيا NH3 والأندول.

8.3.7.2.3 اختبار انزيم اليوريز Urease Test

زرعت العزلة البكتيرية على وسط اليوريا المائل وحضنت عند درجة حرارة 37 م˚ ولمدة 24 ساعة فعند تغير لون الوسط من الاصفر الى الوردي فهذا يدّل على ان العزلة البكتيرية تنتج انزيم االيوريز الذي يعمل على تحليل اليوريا الى امونيا NH3 وغاز ثاني اوكسيد الكاربون CO2 وماء H2O ويرجع تحول لون الوسط من الاصفر إلى الوردي نتيجة لوجود الامونيا NH3 .

9.3.7.2.3 اختبار تحلل الدم Hemolysis Test

اجري هذا الاختبار من خلال تلقيح وسط الدم الصلب Blood agar بمستعمرة فتية بعمر 18-24 ساعة بعدها حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37 م˚ لمدة 24 ساعة فظهور مناطق شفافة حول المستعمرات هو دليل على قابلية البكتريا على تحلل الدم (Greenwood *et al.*,2012).

4.7.2.3 تشخيص بنظام API20

أجري اختبار Analytical Profile Index وهو نظام تشخيص دقيق في تصنيف البكتريا اجري للتأكد من دقة تشخيص العزلات البكتيرية ، يتضمن هذا النظام شريطاً يضم عشرين انبوباً دقيقاً تحتوي بداخلها مواد اساس منزوع منها الماء تستعمل حجرات للتفاعل وتتمّ اضافة الزيت لبعض الحفر لتوفير الظروف اللاهوائية ويتم حضن الشريط عند درجة حرارة 37م˚ لمدة 24 ساعة وبعد اضافة الكواشف الى انابيب معينة ، تعطي نتائج الفحص رقماً مكوناً من سبعة اعداد من خلاله نستطيع تعيين نتائج التصنيف بالاعتماد على جدول قياسي (Benson,2002).

8.2.3 حفظ العزلات البكتيرية Maintenance of Bacteria Isolates

A- الحفظ قصير الامد Short Term Maintenance

حفظت العزلات البكتيرية المشخصة وذلك بتلقيح وسط الاكار المغذي وحضنه في درجة 37م˚ ولمدة 24 ساعة بعدها حفظت في درجة حرارة 4 م˚ وجددت اعادة زراعة العزلات بشكل دوري شهرياً وذلك لتجديد حيويتها ولتجنب حدوث التلوث (Thomas,2007).

B- الحفظ طويل الامد Long Term Maintenance

لحفظ العزلات البكتيرية لفترة طويلة تم استعمال وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain heart infusion broth وأضيف اليه 15 % من الكليسرول Glycerol بعد ذلك لقحت الانابيب المحتوية على 5 مل من الوسط بالمزروع البكتيري ومن ثم احيطت سدادة الانابيب بواسطة شريط شمعي لاصق (parafilm) وحفظت بدرجة -20 م° (Stukus,1997).

9.2.3 اختبار قابلية العزلات البكتيرية على تفكيك الهايدروكاربونات النفطية

Testing The Ability of Isolates for Degradation of Oil Hydrocarbons

تمَّ الاعتماد على متغيرات عديدة لتمييز قدرة العزلات البكتيرية على تفكيك الهايدروكاربونات النفطية وذلك من خلال قياس كل من الكثافة الضوئية والتوصيلية الكهربائية (Sepahi *et al* .,2008) اذ تضمنت هذه الطريقة :

اولاً: تحضير اللقاح البكتيري Preparation of Bacterial Inoculums

نقلت 2-3 مستعمرات نامية على طبق الاكار المغذي الى انبوبة معقمة محتوية على٥مل من محلول ملحي فسلجي ثم رجّت الأنبوبة جيداً للحصول على عالق بكتيري متجانس ، بعدها اخذ 2 مل من هذا العالق الجرثومي و لقح به كل دورق من الدوارق التي تحتوي 150 مل من وسط الاملاح المعدنية ونفط خام بنسبة 1 % باعتباره مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة .

ثانياً: قابلية العزلات الجرثومية على تفكيك الهايدروكاربونات النفطية في الوسط السائل

استعملت دوارق سعة 250 مل ووزع فيها وسط الاملاح المعدنية بمقدار 150 مل بعدها اضيف النفط الخام بنسبة 1 % كمصدر وحيد للكاربون والطاقة وضبط الاس الهيدروجيني للوسط عند 7.2 ومن ثم لقح كل دورق بالعالق البكتيري(2 مل)وبثلاثة مكررات لكل عزلة اما نموذج السيطرة فتم تحضيره باستعمال وسط الاملاح مع إضافة النفط الخام من دون اضافة اللقاح البكتيري اليه ، ثم حضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة shaking incubator بسرعة 120 دورة في الدقيقة وبدرجة حرارة 37 م° لمدة ستة اسابيع وسجلت القراءات اسبوعياً لراشح المزرعة البكتيرية وتضمنت القياسات كل من

-تقدير الكثافة الضوئيةٌ Estimate the Optical Density باستعمال جهاز المطياف الضوئي لقياس النمو بدلالة الكثافة الضوئية وعلى طول موجي مقداره (600nm).

وقياس التوصيلية الكهربائية Electrical Conductivity اعتماداً على قياس التغيرات الحاصلة في التوصيلية الكهربائية للوسط الملقح بالبكتريا بوحداتmc/cm (Sepahi *et al*.,2008)

ثالثاً :درست قابلية العزلات البكتيرية في تفكيك المركبات الهايدروكاربونية النفطية في الوسط الصلب واستهلاكها كمصدر وحيد للكاربون والطاقة ، اذ لقحت أطباق وسط الأملاح المعدنية الصلب المضاف اليها 1 % نفط خام الذي تم تحضيره في الفقرة (3.2.2.3) بلقاح العزلات الجرثومية المشخصة وحضنت الأطباق لمدة سبعة أيام بدرجة حرارة 37 م˚.

3.3 تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction(PCR)

اجري هذا التفاعل للكشف عن جين Catechol 2,3 dioxygenase gene الذي له دور مهم في تحلل المركبات الهايدروكاربونية الاروماتية باستعمال بادئ جين المستعمل في الدراسة Catechol 2,3 dioxygenase gene والمصمم ببرنامج تصميم البادئات .

1.3.3 استخلاص الدنا الكلي Extraction of DNA

استخلص الدنا الكلي لكل من بكتريا *P.fluorescens, S.aureus ,E.coli* وذلك باستعمال عدة استخلاص Wizard Genomic Extraction Kit المنتجة من قبل شركة (Geneaid-Thailand)وذلك لاستعمالها في تفاعل البلمرة المتسلسل طبقاً للتعليمات المرفقة مع عدة الاستخلاص .

1-نقل 1 مليلتر من المزروع البكتري الذي تمَّ تنميته بعمر 24 ساعة على وسط Brain Heart Infusion Broth الى انابيب ابندروف سعة 1.5 مل بعدها رسبت الخلايا البكتيرية بجهاز الطرد المركزي بسرعة 14000-16000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقة كاملة ومن ثم سحب العالق بواسطة ماصَّة وترك الراسب .

2-اضيف 200 مايكرولتر من دارىء GT ومزجت المحتويات بصورة جيدة بواسطة مازج لمدة خمس ثوانٍ.

3-حضن المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق مع التقليب المستمر للانابيب خلال مدة الحضن وذلك لضمان التحلل الكامل للخلايا في المزيج ومن ثم ترك المزيج ليبرد .

4-اضيف 200 مايكرولتر من دارئ GB ومزجت المحتويات جيداً لمدة 10 ثوانٍ بواسطة المازج ومن ثم حضنت الانابيب بدرجة 70 م بحمام مائي لمدة 10 دقائق وترج الانابيب ثلاث مرات في اثناء مدة الحضن(كل 3دقائق) حتى يصبح المحلول رائقاً.

5-اضيف 200 مايكرولتر من الايثانول المطلق Absolute ethanol 99% ثم خلط المزيج بقوة .

6- تم وضع عامود GD filter colum في انبوبة الجمع Collection tube سعته 2مل ونقل له جميع الخليط .

7- نبذت الانابيب مركزياً بسرعة 14000-16000 دورة / دقيقة لمدة دقيقتين بعد ذلك تم نقل المحتويات االى انابيب جمع جديدة (اهملت انابيب الجمع ونقلت الفلاتر الى انابيب جمع جديدة).

8-اضيف 400 مايكرولتر من دارئ W1 الى عمود GD.

9- طردت الانابيب مركزيا بسرعة 16000 دورة /دقيقة لمدة 30 ثانية بعدها وضع GD في انابيب جمع (تهمل انابيب الجمع وتنقل الى انابيب جديدة).

10-اضيف 600 مايكرولتر من دارئ Wash buffer الى عمود GD للتخلّص من الدهون داخل العمود ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 16000 دروة / دقيقة لمدة 30 ثانية .

11- تم التخلص من الراسب ومن ثم اعيد الى جهاز الطرد المركزي لمدة 3 دقائق بسرعة 16000 دورة /دقيقة وذلك لتجفيف العمود .

12- تم نقل الاعمدة الحاوية على الحامض النووي الى انابيب ابندروف معقمة ومن ثم اضيف 100 مايكرولتر من دارئ الاذابة Elution Buffer المسخن مسبقاً يضاف الى مركز الانبوبة وترك لمدة 5 دقائق لكي يتشرب ثم طردت مركزياً بسرعة 16000 دورة /دقيقة لمدة 30 ثانية .

13- يحفظ بعد ذلك بدرجة - 20 م لحين إجراء فحص تفاعل سلسلة انزيم البلمرة.

2.3.3 تقدير نقاوة وتركيزالدنا Estimation Purity and Concentration of DNA

استعمل جهاز المطياف الضوئي DNA-RNA spectrophotometer لقياس تركيز ونقاوة الحامض النووي DNA اذ تم اضافة 1 مايكرولتر من DNA المستخلص الى الجهاز لتقدير التركيز بالنانوكرام /مايكرولتر (ng/µl)اما بالنسبة للنقاوة فقدرت من خلال الامتصاصية (OD) عند الطولين

الموجيين 260 /280 نانومتر ، والغرض من هذا القياس هو تحديد فيما اذا كانت العينة ملوثة بالحامض النووي الرايبوسومي RNA او البروتينات ، وان الامتصاصية المقبولة على الطولين الموجيين 260 / 280 لتركيز DNA النقي تكون 1.8-2 نانومتر كما في الخطوات الآتية :

1- تشغيل جهاز مطياف القطرة النانوية ومن ثم اختير برنامج قياس الحامض النووي نوع DNA.

2- تصفير ركيزة المقياس وذلك من خلال سحب 2 مايكرولتر من Free Nuclease Water باستعمال مايكروبايبيت معقمة ، وتوضع على سطح ركيزة المقياس واجراء التصفير ثم تنظف الركيزة باستعمال ورق نشاف .

3- أخذ 1 مايكرولتر من DNA المستخلص لكل عينة ووضع على ركيزة المقياس ومن ثمّ يشغل الجهاز وتقرأ النتيجة ثم تنظّف الركيزة لقياس العينة التالية (Sambrook&Russel,2001).

3.3.3 تحضير مزيج سلسلة تفاعل البلمرة PCR Master Mixture

حُضر مزيج الـ PCR بحسب تعليمات الشركة المصنعة وذلك باستعمال العدة **Accupower® PCR PreMix** المذكورة في جدول **العدد المختبرية (3-7)** وكالأتي :

1-حضر مزيج تفاعل ال PCR في الانابيب الموجودة في العدة القياسية والتي تضم جميع المكونات اللازمة لإجراء التفاعل اضافة الى مكونات الجدول (3-8)

جدول (3-8) المكونات اللازمة للتفاعل PCR للجين المشفر لأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase المستعمل في الدراسة

PCR Master Mix	Volume (µL)	Concentration
DNA template	**2.5**	**5-50ng/µl**
Forward primer	**1**	**10pmol**
Reveres primer	**1**	**10pmol**
Taq DNA Polymerase	**1**	**1U**
dNTPs	**2**	**250 µM**
PCR water	**12.5**	**1x**
Total volume	**20**	**_**

2-تمزج جميع مكونات انابيب التفاعل لمدة ٥ توانً بواسطة جهاز الطرد المركزي.

3-توضع انابيب التفاعل في جهاز المضخم الحراري (PCR Thermo cycler) وذلك لإجراء عملية تضخيم ال DNA (DNA Implification) تبعاً للظروف المثلى للدورات الحرارية للتفاعل لبكتريا *S.aureus* ,*E.coli* ,*P.fluorescens* والتي تتمثل بعمليات فصل الشريط DNA Denaturation ومن ثم ارتباط البادئات مع الشريط المنفصل Annealing وتطويل السلسلة Extension DNA

4.3.3 برمجة جهاز الدورات الحرارية Thermocycler PCR Programing

استعمل جهاز Thermocycler PCR لإجراء تفاعل البلمرة المتسلسل باستعمال برنامج Optimase Protocol Writer وتمت برمجة الجهاز كما في الجدول (3-9)

جدول (3-9) برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل المستعمل لتضخيم الجين المشفر لأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase

PCR step	Temperature (C°)	Time	Repeat
Initial Denaturation	95	2min	1
Denaturation	95	30Sec	30Cycle
Annealing	59..3	30Sec	
Extension	72	60Sec	
Final extension	72	5min	1
Hold	4	over night	_

5.3.3 الترحيل الكهربائي الهلامي Agarose Gel Electrophoresis

حضر هلام الاكاروز بحسب طريقة Lee وجماعته (2012) وكالاتي :

1-حضر الاكاروز بتركيز 1 % لترحيل نواتج ال PCR فيما حضر بتركيز 0.8 % لترحيل الدنا وذلك باستعمال دوارق زجاجية مقاومة للحرارة Erlenmeyer flask ثم أضيف المحلول المنظم (TBE buffer) بتركيز (0.5X) الى هلام الاكاروز ومزج جيداً وذلك من خلال تدوير الدورق.

2-ذوب الاكاروز مع المحلول المنظم بالتسخين في الصفيحة الحرارية ا الهزازة الممغنطة لمدة 30 دقيقة بعدها يخرج الدورق من الصفيحة ثم يهزّ حتى تمزج محتوياته جيداً وتكرّر هذه العملية لحين ذوبان الاكاروز بشكل كامل .

3- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة الغرفة ثم أضيفت صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium Bromide) الى المزيج ليصبح التركيز النهائي في هلام الاكاروز 0.5 مايكروكرام / مليلتر.

4- صب الهلام في القالب Tray وذلك بعد غلق حافتي القالب ووضع المشط Comb المكون للحفر في حافة القالب ثم يترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة بعد التصلب يتم إزالة المشط وتفتح فتحتا القالب ويوضع الهلام في حوض الترحيل الكهربائي.

5- اضيفت صبغة التحميل الى نماذج DNA المراد فصلها وذلك بواقع إضافة جزء واحد من هذه الصبغة الى كل خمسة أجزاء من DNA ، اذ تعمل هذه الصبغة على جعل حزم DNA مرئية كما تثقل ال DNA في حفر الهلام .

6- استعمل سلم القياس DNA Ladder (Sizer TM-100 DNA Marker Solution) بحجم(100-1500) زوج قاعدي وذلك لقياس حجم ال DNA المضخم .

7- اضيف محلول TBE buffer بتركيز 0.5X الى هلام الاكاروز وبعد ذلك يتم غلق غطاء الترحيل الكهربائي ثم توصل اقطاب حوض الترحيل بمجهز الطاقة بعدها يشغل جهاز الترحيل باستعمال تيار 100 فولت لمدة ساعة كاملة.

8- بعد انتهاء عملية الترحيل يتم فحص هلام الاكاروز الذي يحتوي على ناتج PCR وذلك بأستعمال مصدر الاشعة فوق البنفسجية U.V Light Source لتحديد الحزم وقياس الأوزان الجزيئية عند مقارنتها بالقيم القياسية للدنا القياسي DNA Marker.

4.3 طريقة تحليل التسلسل التتابعي للجين المشفر لأنزيم catechol 2,3 dioxygenase

catechol 2,3 dioxygenase sequencer method

تمَّ إجراء طريقة تسلسل الحمض النووي وذلك للتحري عن وجود علاقة وراثية للجين المشفر لأنزيم catechol 2,3 dioxygenase في عزلات جرثومة *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* و*Pseudomonas fluorescens* وذلك من خلال مقارنتها مع السلالات المسجلة عالميا في موقع NCBI-Genbank . إذ تم إجراء الاختبار وذلك بعد الحصول على نتائج تفاعل PCR للجين المشفرلأنزيم catechol 2,3 dioxygenase في العزلات الثلاثة وتم ارسال ناتج تفاعل PCR الى شركة Macrogen في كوريا الجنوبية وذلك لإجراء تسلسل الحمض النووي باستعمال جهاز AB DNA sequencing system . بعد الحصول على تسلسل قواعد الجين تم تحليلها باستعمال موقع NCBI-BLAST identity وفي النهاية تم تسجيل العزلات في موقع بنك الجينات NCBI-Genbank Submission، وكان رقم التسجيل للـ E.coliهو MH645352 وP.fluorescens هو MH645354 و S.aureus هو MH645353.

5.3 التحليل الاحصائي Statistical Analysis

تم تحليل كافة نتائج الدراسة الحالية باستعمال البرنامج الاحصائي Statistical Package of Social Sciences) SPSS الاصدار 23 وجرى تطبيق اختبار مربع كاي Chi-square test واختبار تحليل التباين الثنائي Two way ANOVA مع حساب اقل فرق معنوي LSD كما جرى اعتماد فترة الثقة Confidence interval مساويا الى ٩٥% وقيمة مستوى الاحتمالية أقل من 0.05 (P<0.05) (Al-Ukaelii & Al- Shaeb ,1998).

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

4- النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.4العزل والتشخيص Isolation and Diagnosis

جمعت خلال الدراسة (200) عينة من مصادر بيئية مختلفة تضمنت (تربة مولدة، تربة محال تبديل الدهن ، تربة معمل مطاط الديوانية و مياه المبازل) توزعت بواقع (50) عينة لكل منطقة جمع

وقد اظهرت نتائج النمو البكتيري بعد اجراء سلسلة من التخافيف على العالق البكتيري بعد ذلك نميت على وسطي الدم و الماكونكي ان (60) عينة بنسبة (30%) أظهرت نمواً موجباً للزرع البكتيري في حين أن (140) عينة بنسبة (70%) كانت سالبة اذ لم تظهر نمواً جرثومياً.

كانت منطقة العزل التي مصدر عيناتها مياه البزل هي الاعلى نسبة في عدد العزلات البكتيرية اذ بلغت (20) (33.33%) عزلة تليها تربة المولدة (16) (27%) عزلة ومن ثم تأتي تباعاً تربة معمل المطاط الديوانية وتربة محال تبديل الدهن التي بلغت (14) (23.3%) و(10) (17%) عزلة على التوالي واظهرت النتائج الاحصائية عدم وجود اختلاف معنوي بين مناطق العزل بأعداد العزلات البكتيرية المشخصة منها عند مستوى احتمالية 0.05 كما في جدول (4-1) .

وان الهدف من استعمال احياء مجهرية معزولة من مواقع ملوثة مسبقاً بالمركبات الهايدروكاربونية انها تمتلك مستوى تكيف عالٍ لاستهلاك هكذا مركبات وبالتالي فهي تحفز عملية التحلل الحيوي للهايدروكاربونات النفطية اذ ان تواجد الاحياء المجهرية المحللة للمركبات الهايدروكاربونية في الانظمة البيئية الغير ملوثة تشكل نسبة 0.1 % تقريباً من المجتمع المايكروبي في حين تشكل نسبة 100% من المجتمع المايكروبي في حالة الانظمة البيئية الملوثة مسبقاً بالهايدروكاربونات النفطية وبالتالي فأن تكيف الاحياء المحلله للنفط إضافة الى تثبيط النفط للأحياء غير المحللة له يفسر ارتفاع نسبة الاحياء المحلله للهايدروكاربونات النفطية في هكذا مواقع (الكعبي ،2010) .

جدول (4-1) اعداد العزلات البكتيرية موزعة حسب مصدر العزل

مناطق العزل	عدد العزلات	النسبة المئوية %
مياه البزل	20	33.33
تربة المولدة	16	26.66
تربة معمل المطاط	14	23.3
تربة محال تبديل الدهن	10	16.66
المجموع	60	100
X^2	4.622*	
P value	0.202	

*** لا توجد اختلافات معنوية بدلالة احصائية ($p < 0.05$)**

تميزت عزلات كل من بكتريا*S.aureus* , *P.fluorescens* , *E.coli* بتواجدها في جميع محطات الدراسة و كانت عزلات *E.coli* هي الأعلى تواجداً اذ بلغ عدد عزلاتها 23(38 %) تليها *P.fluorescenas* 15 (25 %) في حين سجلت *S.aureus* 10 (16.66%) لكن انحصر تواجد عزلات *Bacillus cereus* على العينات التي مصدرها تربة كل من المولدات ومحال تبديل الدهن ومعمل المطاط وبنسبة تواجد 5 (8.33%) في حين انحصر تواجد عزلات *Acinetobacter baumannii* على العينات التي مصدرها تربة كل من المولدة ومعمل المطاط وبنسبة 3 (5%) اما كل من بكتريا *Klebsiella pneumoniae* و *Proteus mirabilis* فأنحصر تواجدهما فقط في العينات التي مصدرها مياه البزل اذ سجلتا النسبة 3 (5%) و 1(1.6%) على التوالي لذلك تركزت هذه الدراسة على الانواع البكتيرية *S.aureus P.fluorescens , E.coli* كونها اظهرت تحللاً تاماً للنفط الخام وكانت الانواع الاكثر تكرراً في جميع العينات البيئية وأظهرت النتائج الاحصائية وجود اختلاف معنوي بين اعداد العزلات البكتيرية المشخصة وتواجدها عند مستوى احتمالية 0.05 كما في الجدول (4-2) .وجاءت نتائج العزل هذه قريبة مع نتائج البوغازي (2015) في عدد عزلات *P.fluoerscens* فقد كانت عزلاتها 12 عزلة في حين اختلفت معها في عدد عزلات *S.aureus* الذي بلغت (3) عزلات و*Bacillus* (19)عزلة ،كما كانت قريبة ايضاً من نتائج العبيدي (2004) فكانت عزلة واحدة لكل من

Acinetobacter و*Bacillus* في حين اختلفت معها في عدد عزلات *S.aureus* و*P.fluorescens* اذ بلغ عدد عزلاتهما (2) و(7) على التوالي .

جدول (4-2) عدد ونسب العزلات البكتيرية المشخصة وتواجدها في مناطق العزل

البكتريا	مناطق الجمع	عدد العزلات	النسبة المئوية%
Escherichia coli	**مياه البزل ، تربة المولدات و تربة معمل مطاط الديوانية وتربة محال الدهن**	**23**	**38.33**
Pseudomonas fluorescens	**مياه البزل ، تربة المولدات و تربة معمل مطاط الديوانية وتربة محال الدهن**	**15**	**25**
Staphylococcus aureus	**مياه البزل ، تربة المولدات و تربة معمل مطاط الديوانية وتربة محال الدهن**	**10**	**16.66**
Bacillus cereus	**تربة المولدات وتربة معمل مطاط الديوانية وتربة محال الدهن**	**5**	**8.33**
Klebsiella pneumoniae	**مياه البزل**	**3**	**5**
Acinetobacter baumannii	**تربة المولدات وتربة معمل مطاط الديوانية**	**3**	**5**
Proteus mirabilis	**مياه البزل**	**1**	**1.6**
المجموع		**60**	
X^2	**52.228***		
P value	**0**		

*** توجد اختلافات معنوية بدلالة احصائية ($p < 0.05$)**

وأظهرت نتائج التشخيص ان العزلات كانت معظمها تعود الى البكتريا السالبة لصبغة كرام اذ شكلت نسبة (75%) في حين كانت عدد العزلات الموجبة لصبغة كرام (25%) وتتفق هذه الدراسة مع الكثير من الدراسات التي توصل اليها الباحثون في ان البكتريا السالبة لصبغة كرام تكون هي الاكثر سيادة في تحلل الهايدروكاربونات النفطية(العبيدي 2004 ;2003, Nweke&Okpokwasili)يمكن تفسير السيادة للأنواع السالبة لصبغة كرام انها تحتوي على غلاف خارجي outer membrane الذي يقوم بحمايتها من المؤثرات الخارجية عن طريق تقليل النفاذية لأنواع مختلفة من الجزيئات كما يحتوي هذا الغلاف على الدهون التي تساعدها في الحصول على اكبر قدر ممكن من المركبات الهايدروكاربونية

من البيئة المتواحدة فيها فضلاً عن امتلاكها نظام انزيمي فعال في استهلاك المواد المعقدة (Budziniski *et al.*,2000).

ويبين الجدول (4-3) توزيع العزلات البكتيرية ونسبها بحسب مصدر العزل اذ كانت العزلات التي مصدرها مياه البزل هي الاعلى اذ بلغت 20 عزلة في حين بقية مصادر العزل بلغ عدد عزلاتها (16 , 14 , 10) لترب كل من المولدة ، معمل المطاط ، محال تبديل الدهن على التوالي. وقد سجلت بكتريا *E.coli* اعلى نسبة في العينات التي مصدرها مياه البزل اذ بلغ عدد عزلاتها 11(55%) ، في حين شكلت كل من *E.coli* و *P.fluorescens* اعلى النسب للعينات التي مصدرها تربة المولدة اذ بلغت النسبة 5 (31.25%) لكل منهما . وقد حافظت هاتان الجرثومتان أيضاً على اعلى النسب للعزلات التي مصدرها تربة معمل المطاط وكانت النسبة 4 (28.57%) لكل منهما. اما العزلات التي مصدرها تربة محال تبديل الدهن فأحتلت بكتريا *P.fluorescens* النسبة الاعلى مسجلة 4 (40%) عزلة.

وأظهرت النتائج الاحصائية لجدول (4-3) وجود فرق معنوي في عدد عزلات منطقة البزل اذ كان هناك تفوق واضح لعدد عزلات بكتريا *E.coli* على العزلات الاخرى اما بالنسبة لمناطق العزل الاخرى تربة المولدة وتربة محال تبديل الدهن وتربة معمل المطاط فلا توجد فروق معنوية في اعداد العزلات البكتيرية وقد يرجع هذا الى ان الظروف البيئية المعرضة لها تلك المناطق قد تتشابة تقريباً اذ تعيش هذه العزلات على مصادر طاقة متشابهة قد تكون البنزين او الكاز او الدهون الناتجة من المحركات .

جدول (4-3) توزيع العزلات البكتيرية ونسبها بحسب مناطق العزل

منطقة العزل	العدد الكلي للعزلات	البكتريا المعزولة	العدد	النسبة المئوية %	X^2	P value
مياه البزل	20	*Escherichia coli*	11	55	20*	0
		Staphylococcus aureus	3	15		
		Pseudomonas fluorescens	2	10		
		Klebsiella pneumoniae	3	15		
		Proteus mirabilis	1	5		
تربة المولدة	16	*Pseudomonas fluorescens*	5	31.25	4.219**	0.377
		Escherichia coli	5	31.25		
		Staphylococcus aureus	2	12.5		
		Bacillus cereus	2	12.5		
		Acinetobacter baumannii	2	12.5		
تربة معمل مطاط الديوانية	14	*Pseudomonas fluorescens*	4	28.57	3.036**	0.552
		Escherichia coli	4	28.57		
		Staphylococcus .aureu	3	21.42		
		Bacillus cereus	2	14.28		
		Acinetobacter baumannii	1	7.14		
تربة محال تبديل الدهن	10	*Pseudomonas fluorescens*	4	40	2.667**	0.446
		Escherichia coli	3	30		
		Staphylococcus.aureus	2	20		
		Bacillus cereus	1	10		
المجموع	60		60			

*** توجد اختلافات معنوية بدلالة احصائية ($p < 0.05$)**

*** *لا توجد اختلافات معنوية بدلالة احصائية ($p > 0.05$)**

تم تشخيص العزلات البكتيرية اعتماداً على الفحوصات المظهرية والمجهرية فضلاً عن الاختبارات الكيموحيوية جدول (4-4) و شكل (4-1)

ففي التشخيص الابتدائي اعتمد في هذه الدراسة على الصفات الزرعية للمستعمرات ، اذ تم زرع العينات في البداية على وسط الماكونكي الصلب اذ ظهرت عليه مستعمرات بكتريا *E.coli* صغيرة دائرية الشكل مرتفعة ذات حافة ملساء جافة ذات لون وردي نتيجة لتخمرها لسكر اللاكتوز (Setia *et al.*,2009) فيما تميزت مستعمراتها على وسط الايوسين مثيل الازرق بلون براق اخضر معدني ، ايضاً ظهرت البكتريا متحركة اذ تميزت بمناطق نمو منتشر حول منطقة الطعن وعند تصبيغها بصبغة كرام ظهرت خلاياها على شكل عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام (Chees , 2012) اما الاختبارات الكيموحيوية فكانت موجبة لاختبار الكاتليز واحمر المثيل وانتاج حلقة الاندول وسالبة لاختبار الاوكسديز واليوريز والفوكس بروسكور واستهلاك السترات (Reddy , 2010)

اما بكتريا*P.fluorescens* فقد ظهرت مستعمراتها على وسط الماكونكي بمظهر شاحب كونها غير مخمرة لسكر اللاكتوز وتميزت بحافات مسطحة ،فيما ظهرت على وسط اكار الستروميد الذي يعد وسطاً انتخابياً لجنس *Pseudomonas* بلون أخضر مصفر نتيجة افرازها صبغة الـ pyocyanin (Mathiyaznagan , 2011) في حين ظهرت خلاياها تحت المجهر على شكل عصيات سالبة لصبغة كرام متحركة حول منطقة الطعن وبالنسبة للأختبارات الكيموحيوية فقد كانت موجبة لاختبارات الاوكسديز والكاتليز واليوريز واستهلاك السترات وسالبة لاختبارات المثيل الاحمر والفوكس بروسكور (Macfaddin , 2000)

فيما ظهرت مستعمرات *S. aureus* دائرية نسبياً ومرتفعة قليلاً صفراء الى ذهبية على وسط اكار الدم وتحيط بها منطقة شفافة لكونها ذات قدرة على التحلل الكامل للدم من نوع بيتا β وذات لون اصفر ذهبي على وسط اكار ملح المانيتول ، وتميزت خلاياها تحت المجهر بأنها متجمعة على هيئة عناقيد غير منتظمة موجبة لصبغة كرام وغير متحركة (Bennett & Lancett,2001) اما بالنسبة للاختبارات الكيموحيوية فكانت موجبة لاختبارات الكاتليز واليوريز والمثيل الأحمر وفوكس بروسكور وسالبة لكل من الاوكسديز والاندول وإنتاج السترات.

كذلك شُخصت بكتريا *Proteus mirabilis*اعتماداً على ظاهرة الانثيال (Swarming) على وسط اكار الدم وكانت مستعمراتها ذات لون أصفر شاحب على وسط الماكونكي ، لعدم تخمرها

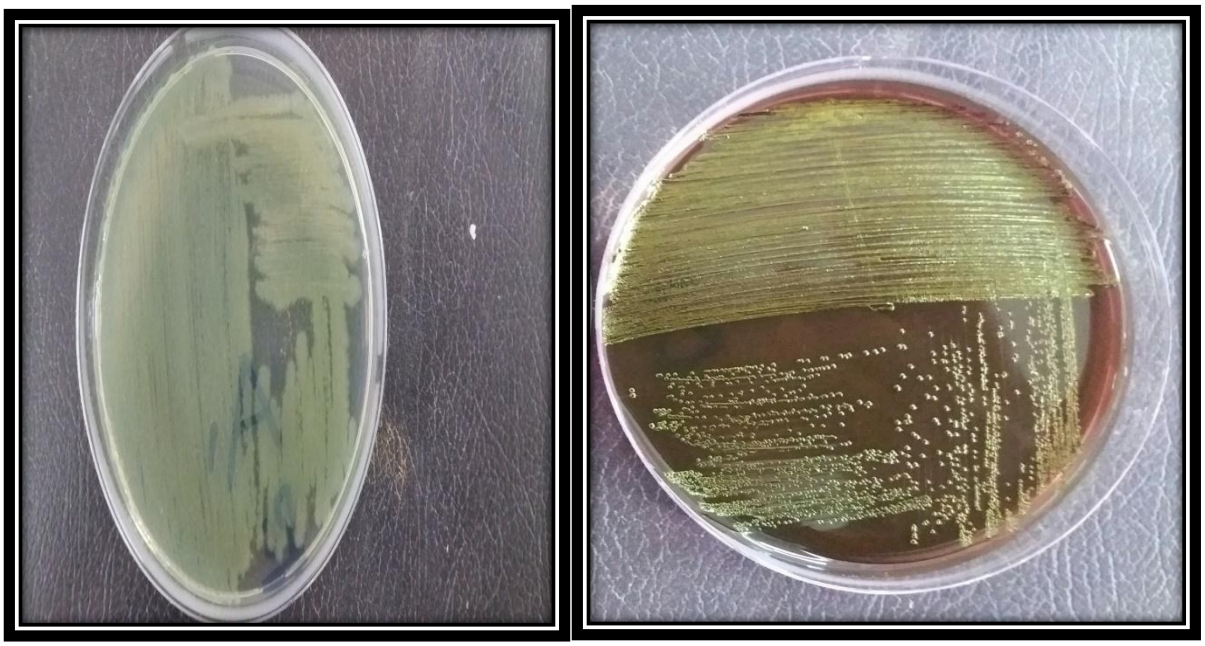
لسكر اللاكتوز (De Soyza *et al* .,2013) اما *Klebsiella pneumonia* فقد تميزت على وسط الماكونكي بمستعمرات كبيرة الحجم دائرية حافاتها منتظمة وردية اللون ذات قوام مخاطي و يرجع ذلك الى امتلاكها للمحفظة (Magesh *et al* ., 2011) في حين كان شكل مستعمرة *Bacillus cereus*منبسطاً جافاً ذات لون أبيض على وسط اكار الدم وكانت خلاياها محللة للدم موجبة لصبغة كرام ذات شكل عصوي (Nitschke & Pastore,2006) اما *Acinetobacter baumannii*فتميزت بمستعمرات محدبة مخاطية ذات لون ابيض كريمي ،غير محللة للدم ، اما خلاياها فكانت سالبة لصبغة كرام ذات شكل عصوي (Antunes *et al*.,2014) .

جدول(4-4) الاختبارات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية المدروسة

الاختبارات / العزلات	صبغة كرام	الأوكسيديز	الكاتليز	الحركة	اليوريز	اختبارات IMVC			
						C	VP	MR	I
Escherichia coli	_	_	+	+	_	_	_	+	+
Pseudomonas fluorescens	_	+	+	+	+	+	_	_	_
Staphylococcus Aureus	+	_	+	_	+	_	+	+	_
Klebsiella pneumonia	_	_	+	_	_	+	+	_	_
Proteus mirabilis	_	_	+	+	+	+	_	+	_
Bacillus cereus	+	_	+	+	_	+	+	_	_
Acinetobacter Baumannii	_	_	+	_	_	+	_	_	_

+: نتيجة موجبة للفحص

_ : نتيجة سالبة للفحص

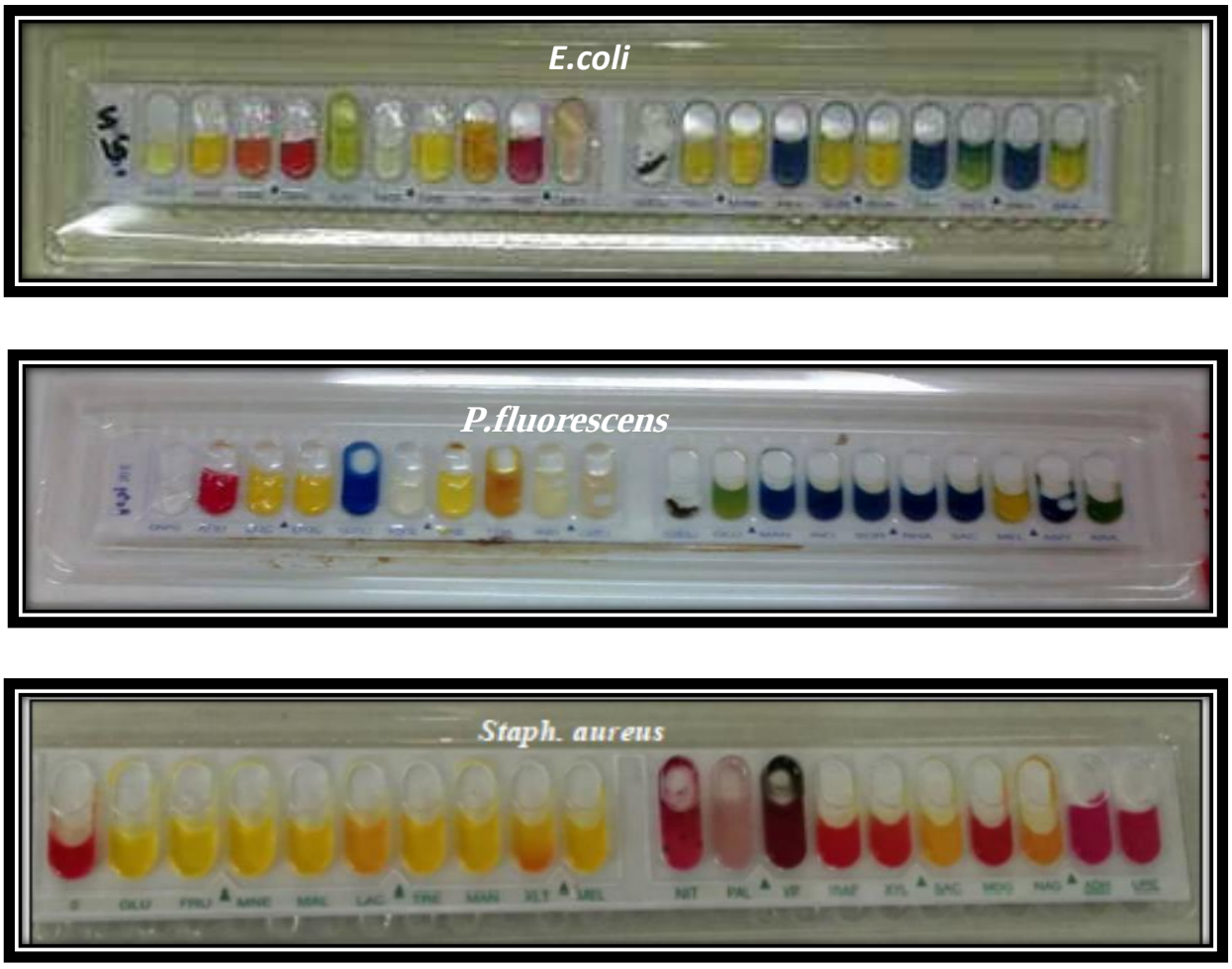


(B) **(A)**

(C)

شكل (4-1) نمو البكتريا المعزولة على أوساط غذائية مختلفة : (A)بكتريا *Escherichia coli* النامية على وسط الايوسين مثيل الأزرق ، (B) بكتريا *Pseudomonas fluorescens* النامية على وسط اكار السترومايد ، (C) بكتريا *Staphylococcus aureus* النامية على وسط اكار ملح المانيتول

استعمل نظام (API 20) Analytic Profile Indext 20 لتأكيد تشخيص العزلات البكتيرية ولإكمال الاختبارات الكيموحيوية المهمة ، فقد استعمل (Api 20 E) لتشخيص كل من *Pseudomonas fluorescens ,Escherichia coli* اما بالنسبة *Staphylococcus aureus* فقد استعمل نظام (.Api 20 staph) الخاص بتشخيص الانواع لهذا الجنس ، واكد العديد من الباحثين على اهمية استعمال هذا النظام التشخيصي لما يتميز به من سرعة ودقة في الكشف عن النوع البكتيري فضلاً عن التقليل من عملية التلوث المزرعي (Turton *et al*.,2008)



شكل (4-2) تشخيص Api 20 للعزلات البكتيرية

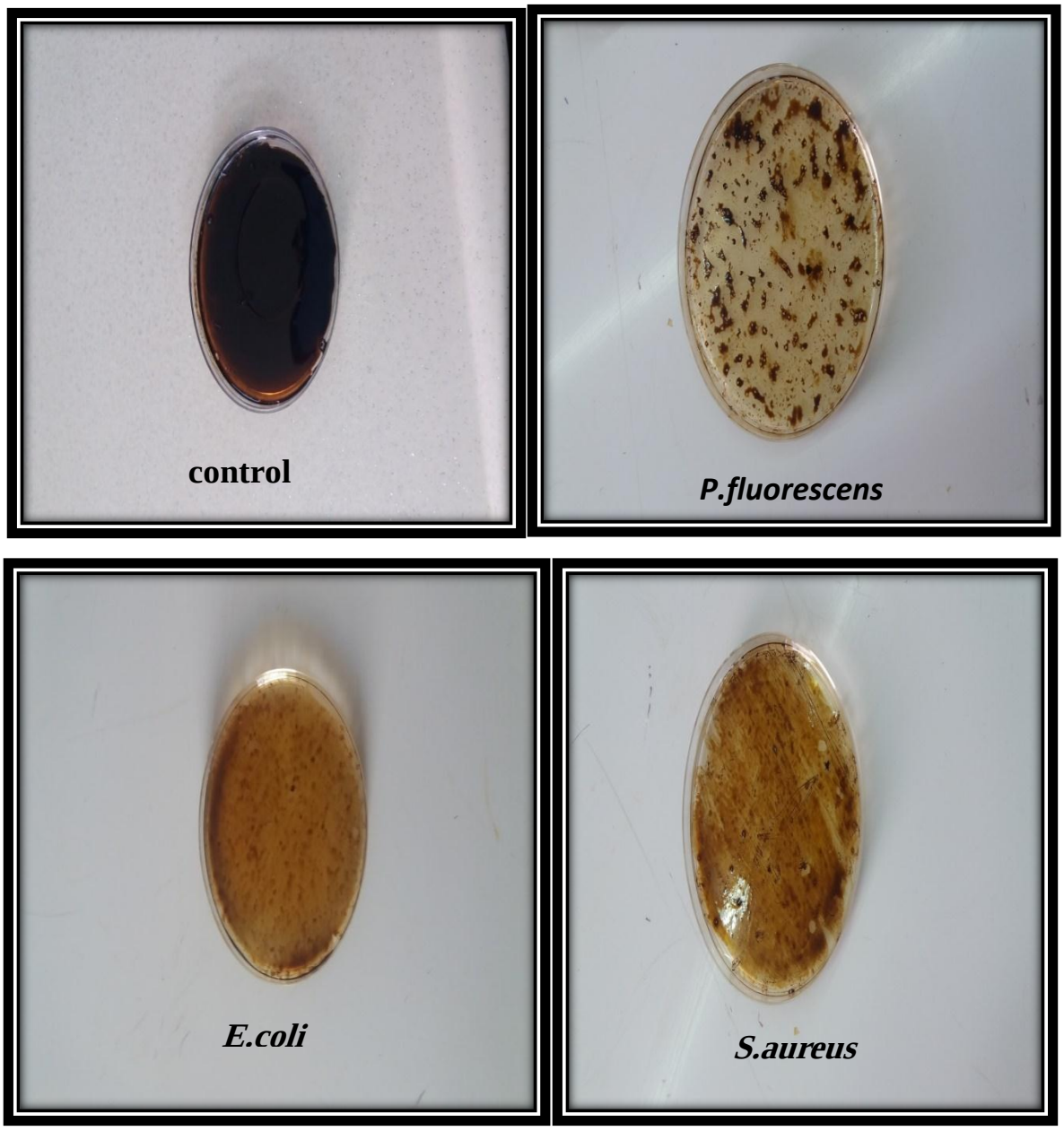
2.4. قدرة العزلات البكتيرية على النمو على وسط الاملاح المعدنية الصلب والمضاف اليه النفط الخام كمصدر للكاربون والطاقة

أظهرت النتائج قدرة العزلات البكتيرية العائدة لكل من لبكتريا *E.coli* ، *P.fluorescens*، *S.aureus* على تفكيك النفط الخام على وسط الاملاح المعدنية الصلب ، وكانت العزلة*P.*fluorescens رقم (12) والمعزولة من تربة المولدة من أكفأ العزلات في تحليل واستهلاك النفط الخام (الشكل4-3) تمكنت العزلات البكتيرية خلال مدة حضن اقصاها 7 ايام وبدرجة حرارة 37 م˚ من استهلاك النفط الخام بأعتباره مصدراً وحيداً للكاربون والطاقة وجاءت هذه النتيجة مماثلة لدراسات اجريت في هذا المجال البوغازي 2015; Sharma و Pathak، 2014) .

وترجع قدرة هذه العزلات في تفكيك المركبات الهايدروكاربونية الى امتلاكها مجموعة من الانزيمات التي تقوم بعملية تحليل المركبات الهايدروكاربونية مثل انزيم Catechol 2,3 dioxygenase الذي يعمل على تحليل هذه المركبات (Joshi &Walia,1996 ; Jyothi *et al* 2012,.) اضافة الى قدرة هذه العزلات على افراز مركبات كيميائية خارج خلوية ذائبة في الماء تعمل على تقليل الشد السطحي للوسط ، تدعى المستحلبات الحياتية Biosurfactant تفرزها العزلات البكتيرية اثناء استهلاك المركبات الهايدروكاربونية(Banat ,1995 ; 2012,. Eddouaouda *et al*)

كما قد ترجع قدرة هذه العزلات على تفكيك المركبات الهايدروكاربونية الى احتوائها على بلازميدات تكون في أغلب الأحيان بلازميدات ايضية ذات اوزان جزيئية كبيرة تشفر لعملية التحلل الحيوي كما تكون مسؤولة عن التنظيم الجزيئي لهذه العملية وجاءت هذه النتيجة مماثلة لدراسة اجراها كل من (Ma *et al*., 2006) و Hohnstock *et al*.,2000)

ويمكن ان تنتقل هذه البلازميدات بين الأجناس البكتيرية السالبة لصبغة كرام وبالأخص التي تعيش في بيئات ملوثة بالهايدروكاربونات النفطية (AL-Gelawi & Al-Saffar 2010)



شكل (4-3) استهلاك الهايدروكاربونات النفطية من قبل العزلات البكتيرية على وسط الاملاح المعدنية الصلب .

3.4 النمو على وسط الاملاح المعدنية السائل

بينت النتائج كما في الشكل (4-4) قدرة العزلات البكتيرية على النمو على وسط الاملاح المعدنية السائل المضاف الية النفط الخام واستهلاك النفط الخام خلال مدة حضن أمدها 6 اسابيع وبدرجة حرارة 37م˚ وعند متابعة التغيرات الفيزيائية والمظهرية التى تحصل لدوارق الحضن المحتوية على

وسط الاملاح المعدنية السائل المزود بالمصدر الكاربوني الوحيد النفط الخام والملقح بالعزلات البكتيرية لوحظ التحول الواضح في لون الدوارق خلال مدة الحضن إذ استهلكت العزلات جميع النفط الخام مع بقاء دوارق السيطرة من دون تغيير ،وتم ايضاً خلال مدة النمو المذكورة قياس كل من الكثافة الضوئية والتوصيلية الكهربائية ومعرفة التغيرات الحاصلة.

وقد استعمل في هذه الدراسة وسط الاملاح المعدنية السائل والذي يتميز بكونه يحتوي على العديد من العناصر المغذية والمحفزة التي تكون ضرورية في بقاء الاحياء المجهرية وبناء انزيماتها المهمَّة في عملية التحلل الحيوي اذ استعمل هذا الوسط في دراسات عديدة منها دراسات عديدة Prakash& Guru *et al.*,2013 ; Nilesh&Hardik ,2013; Ifran,2011) (.

اذ يعمل هذا الوسط على توفير ظروف ملائمة لنمو البكتريا المحللة للهايدروكاربونات ويعزز تكاثرها فهو يعمل على توفير عناصر مغذية تحفزها على تسريع عملية التفكك الحيوي للهايدروكاربونات ، اذ اشار Garapati (2012) الى ان العناصر المعدنية مثل (N,Mg,P,S) المتواجدة في هذا الوسط تعمل على المحافظة على التمثيل الغذائي وبذلك فهي تساعد البكتريا في انتاج مركبات داخل وخارج خلوية تتمثل بالانزيمات والمستحلبات الحيوية والتي لها دور كبير في عملية امتصاص المركبات الهايدروكاربونية وفي عملية الايض لها لتنتج طاقة وماء وCO2 و كتلة حيوية .

وذكر Ubani (2012) ان توفر عنصر الفسفور مهم لنمو الاحياء المجهرية فهو يدخل في تركيب كل من جزيئة ATP والاحماض النووية والغشاء الخلوي ، ويوفر K2HPO4 عنصرا الفسفور والبوتاسيوم في حين يكون NH4CL مصدراً مهماً للنتروجين ، ومن ثم فأن المركبات التي تحتوي على الفسفور والاخرى التي تحتوي على النتروجين يكون لها تأثيراً مهماً في نمو البكتريا على وسط الاملاح المعدنية المحتوي على الهايدروكاربونات النفطية وهذا ما أكدة Motamediوجماعته (2011) .

حضنت الدوراق الملقحة بالحاضنة الهزازة للحصول على الاوكسجين الذي يكون مهماً اذ تستعمله البكتريا في اكسدة وتحلل المركبات اللهايدروكاربونية (عبد الرضا ،2014) وقبل زرع العزلات البكتيرية ضبط الـ pH لوسط الاملاح المعدنية السائل بحدود 7.4-7.0 اذ ان البكتريا تنمو بصورة افضل عندما تكون تكون الدالة الحامضية قريبة من التعادل (Said ,2004)

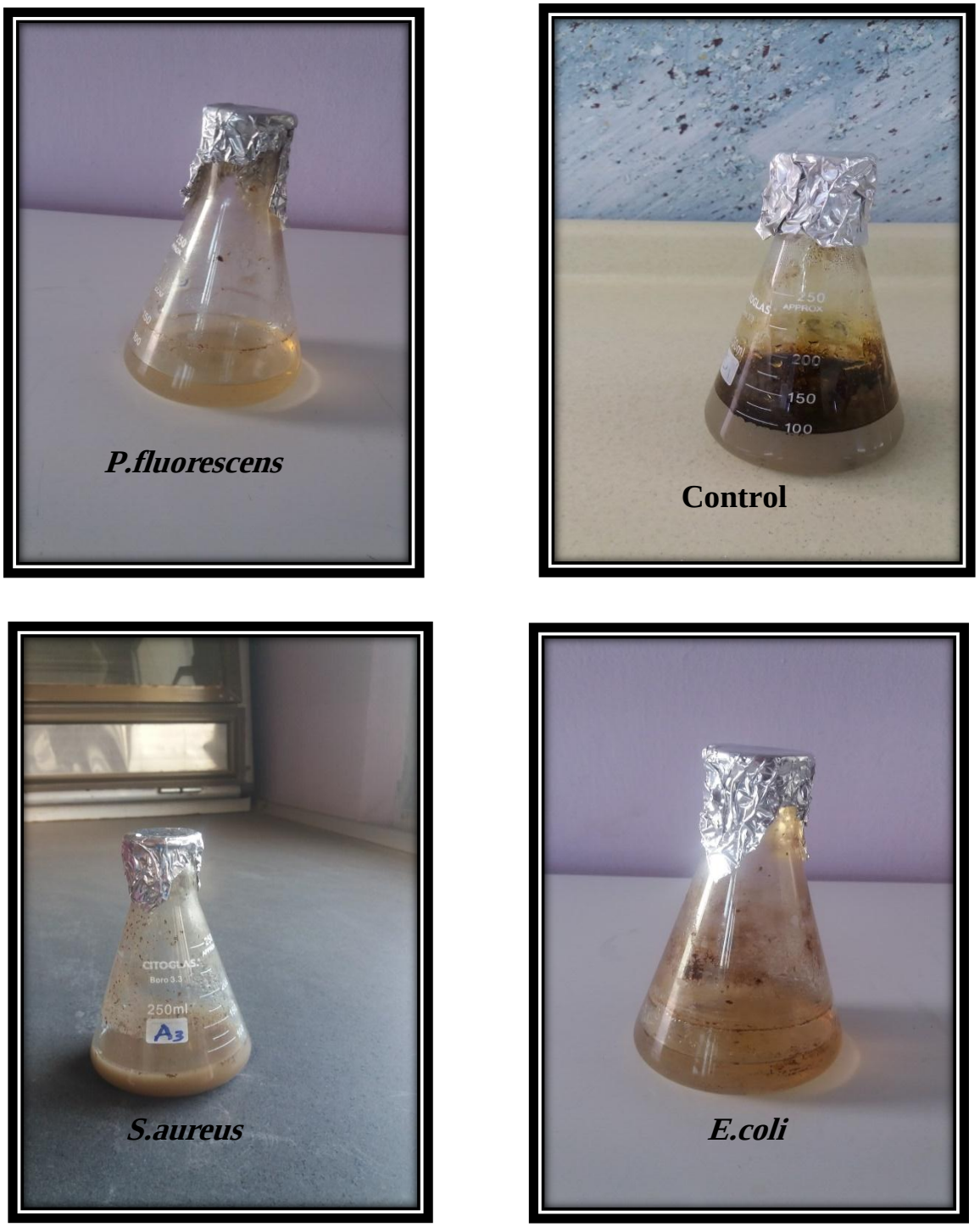
كما ضبطت درجة حرارة الحاضنة لتكون 37م˚ (Hussein ,2014)كما ذكر AtlasوBartha(1972) ان درجة الحرارة المنخفضة تعمل على اعاقة عملية التبخر للمركبات ذات

الوزن الجزيئي الواطئ والتي يكون قسم منها ذا تأثير سام على الاحياء المجهرية وبذلك فهي تعيق عملية التحلل الحيوي .

وفي هذه الدراسة تم الاعتماد على العزلات المفردة فهي تحدد اكثر العزلات كفاءة في تحلل المركبات الهايدروكاربونية وتعطي تصوراً عن كفاءة كل عزلة على حدة واي من العزلات قادرة على ان تتحمل العيش والنمو في الظروف البيئية القاسية في حين انه في حالة استعمال المزارع المختلطة على الرغم من ان التحلل فيها يكون اكثر كفاءة وتعطي نسب تحلل عالية الا ان هناك حالة شك وغموض في عدم معرفة اي من العزلات كانت اكثر كفاءة في عملية التحلل (Ghazali *et al* ., 2004 ; (Ganesh&Lin,2009

وترجع قابلية العزلات الجرثومية على النمو على الوسط الملحي السائل ونشاطها في تحلل المواد الهايدروكاربونية الى افرازها عوامل استحلاب Emulsifying agents(الجبوري ،2005) ، فعندما تقوم البكتريا بأستهلاك المركبات الهايدروكاربونية فأن هذه العملية تكون مصحوبة في اغلب الاحيان بأفراز هذه البكتريا مواداً مستحلبة الى البيئة او الوسط الغذائي الذي تنمو عليه اذ تعمل هذه المواد الى تقليل الشد السطحي وتزيد من اختراق وانتشار الماء مؤدية الى تعزيز نمو البكتريا وحجز المعادن وفصلها ويعمل الاستحلاب على جعل طبقة النفط على شكل قطيرات نفطية مستحلبة صغيرة وبذلك تزداد ذائبيتها وتمتزج بسهولة مع مكونات الوسط الملحي وفي نفس الوقت توفر مساحة سطحية تكون ملائمة لتماس الاحياء المجهرية مع هذه المركبات Nievas *et al*.,2008 ; Nguyen *et al*.,2008 ;البيضاني ، 2009).

كما يعزى نمو هذه العزلات على الملوثات الهايدروكاربونية الى انها ذات قدرة وكفاءة على التكيف او التطبع مع الظروف البيئية التي تحيط بها مع مرور الوقت و يؤدي هذا التكيف الى تعزيز قدرتها على تحلل واستهلاك الهايدروكاربونات الثقيلة الى هيدروكاربونات خفيفة قليلة السمية وهذا يتفق مع ما ذكره Abed وجماعته (2002) اذ ذكر انه عند تعرض مجاميع الاحياء المجهرية الى مستويات عالية من الهايدروكاربونات النفطية فأنها تظهر تكيفاً او تأقلماً عالياً للبيئة الملوثة التي تكون موجودة فيها هذه الاحياء .



شكل (4-4) استهلاك النفط الخام من قبل العزلات البكتيرية على وسط الاملاح المعدنية السائل

1.3.4تقدير النمو بدلالة التوصيلية الكهربائية

أظهرت نتائج حساب التوصيلية الكهربائية حصول زيادة في قيم التوصيلية الكهربائية لجميع العزلات البكتيرية أثناء مدة الحضن وذلك بالمقارنة مع السيطرة التي كانت قيم التوصيلية الكهربائية لها 7.2 mc/cm . .فالبنسبة للعزلات السالبة لصبغة كرام فقد سجلت بكتريا *P.fluorescens* المعزولة من تربة المولدة اعلى قيمة توصيلية كهربائية بلغت 12.7 mc/cm في الاسبوع الثالث بعدها *E.coli* (11.7)mc/cm ومن ثم*Acinetobacter baumannii, Klebsiella pneumonia* و *preteus mirabilis* وبقيم اقل كما في الجدول (4-5)

جدول(4-5) معدل النمو بدلالة قياس التوصيلية الكهربائية للعزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام و المختبرة في قدرتها على استهلاك الهايدروكاربونات النفطية مقاسة بوحدات (mc/cm)

العزلات	معدل النمو بدلالة التوصيلية الكهربائية ± قيمة الخطأ القياسي					
	الاسبوع الاول	الاسبوع الثاني	الاسبوع الثالث	الاسبوع الرابع	الاسبوع الخامس	الاسبوع السادس
السيطرة	7.2±0	7.2±0	7.2±0	7.2±0	7.2±0	7.2±0
تربة *Escherichia coli* المولدة	8.3±0.1	9.4±0.11	10.3±0.11	10.2±0.01	9.7±0.02	9.6±0.02
تربة *Escherichia coli* محلات الدهن	8.2±0.1	11.1±0.1	11.7±0.01	10.3±0.1	9.5±0.1	8.2±0.1
تربة *Esherichia coli* معمل المطاط	8.6±0.11	9.23±0.01	10.4±0.11	10.1±0.08	9.3±0.11	8.3±0.11
مياه *Escherichia coli* البزل	8.5±0.11	10.2±0.11	10.9±0.01	9.7±0.11	9.3±0.11	9.1±0.003
تربة *Pseudomonas fluorescens* المولدة	8.8±0.025	12.2±0.005	12.7±0.06	12.1±0.1	10.5±0.1	8.6±0.1
تربة *Pseudomonas fluorescens* محلات الدهن	9.1±0.11	9.9±0.11	10.2±0.06	10.2±0.1	9.6±0.1	8.7±0.06
تربة معمل *Pseudomonas fluorescens* المطاط	9.2±0.06	10.3±0.03	11.7±0.11	11.2±0.11	9.5±0.11	8.3±0.11
Pseudomonas fluorescens البزل	8.7±0.1	9.8±0.06	10.4±0.1	9.7±0.03	9.2±0.006	9.2±0.11
Klebsiella pneumoniae البزل	8.2±0.05	8.4±0.05	9±0.005	8.6±0.05	8.3±0.05	8.2±0.03
*Proteus mirabilis*البزل	8±0.03	8.2±0.05	8.8±0.05	8.7±0.03	8.4±0.05	8.1±0.03
*Acinetobacter baumannii*تربة المولدة	8.3±0.05	8.7±0.03	9.3±0.05	8.7±0.05	8.3±0.03	8.03±0.03
تربة معمل *Acinetobacter baumanii* المطاط	8.3±0.05	8.6±0.05	8.93±0.03	8.7±0.03	8.3±0.05	8.13±0.03
$LSD_{0.05}$	**للعزلات =1.428**		**للأوقات =1.411**		**للتداخل =1.468**	

وتتفق هذه النتائج مع (Hussein,2014) في كون بكتريا *P.fluorescens* اكثر الاجناس البكتيرية كفاءة في تحلل الهايدروكاربونات النفطية واستهلاكها وذلك لأحتوائها على العديد من انزيمات التحلل الحيوي وانتاجها مستحلبات حيوية لها دور كبير في تفكك الهايدروكاربونات المعقدة . اما بكتريا *E.coli* فقد جاءت بالمرتبة الثانية بنسب التحلل الحيوي فهي اما ان تحتوي على انزيمات التحلل الحيوي او ان تنتقل اليها الجينات المسؤولة عن التحلل من بكتريا أخرى محللة للهايدروكاربونات عبر البلازميدات بعملية التحول Transformation (Vasudevan *et al*.,2007).

اما بالنسبة للبكتريا الموجبة لصبغة كرام فقد تفوقت بكتريا *S.aureus* على بكتريا *Bacillus cereus* في معدلات النمو بدلالة التوصيلية الكهربائية كما في الجدول (4-6) وبالتالي فقد جاءت هذه النتائج متوافقة مع (Chang *et al*.,2011) في كون *Staphylococcus* هي من اهم البكتريا المحللة للهايدروكاربونات في حين اختلفت مع نتائج (Zhang *et al* .,2010) الذي اظهرت تفوق بكتريا *Bacillus* في هذا المجال.

جدول (4-6) معدل النمو بدلالة قياس التوصيلية الكهربائية للعزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام و المختبرة في قدرتها على استهلاك الهايدروكاربونات النفطية مقاسة بوحدات (mc/cm).

العزلات	معدل النمو بدلالة التوصيلية الكهربائية ± قيمة الخطأ القياسي					
	الاسبوع الاول	الاسبوع الثاني	الاسبوع الثالث	الاسبوع الرابع	الاسبوع الخامس	الاسبوع السادس
Staphylococcus aureus تربة المولدة	8.6±0.03	8.8±0.05	9.3±0.05	9±0.05	8.6±0.05	8.5±0.05
Stapylococcus aureus تربة محال الدهن	9.1±0.1	9.5±0.1	9.8±0.1	9.2±0025	8.3±0.005	8.3±0.06
Staphylococcus aureus تربة معمل المطاط	8.7±001	9.9±0.03	10.6±0.006	10.6±0.006	10.2±0.05	9.7±0.05
Staphylococcs aureus البزل	8.1±0.1	9.2±0.1	9.6±0.1	9.3±0.1	8.3±0.05	8.1±0.06
*Bacillus cereus*المولدة	8.4±0.05	8.8±0.05	9.3±0.05	9±0.005	8.6±0.05	8.3±0.05
Bacillus cereus تربة محال الدهن	8.2±0.05	8.7±0.05	9.3±0.33	9±0.01	8.5±0.05	8.33±0.03
Bacillus cereus تربة معمل المطاط	8.23±0.05	8.5±0.05	9.2±0.05	8.6±0.03	8.3±0.05	8.13±0.03
$LSD_{0.05}$	**للعزلات =1.212**		**للأوقات =1.231**		**للتداخل =1.301**	

ولوحظ ان معدل النمو قد بدأ بالزيادة تدريجياً الى ان وصل الى اقصى حد في الاسبوع الثالث من الحضن ومن ثم بدأ بالتنازل التدريجي ليصل في الاسبوع السادس الى اقل قيمة .

ان الزيادة الحاصلة في قيم التوصيلية الكهربائية تدل على وجود علاقة طردية بين التوصيلية الكهربائية وتركيز وتكافؤ الايونات اذ تزداد قيم التوصيلية عند زيادة تركيز هذه الايونات اذ ان زيادة الايونات في الاسبوع الثالث يعنى ان الجين شفر للانزيم الكايتكول وحلل المركبات الهايدروكاربونية وتحررت الايونات في الوسط الزرعي، ايضاً فأن للنواتج الايضية المتجمعة في الوسط سبب في زيادة التوصيلية الكهربائية اذ يؤدي استهلاك العزلات البكتيرية للهايدروكاربونات النفطية الى زيادة هذه النواتج وتعتمد التوصيلية الكهربائية على النواتج الايضية المتكونة وقابليتها على التأين في الماء وبالتالي تحصل زيادة في قيم التوصيلية الكهربائية وتتفق هذه الدراسة مع ما توصل اليه Gomezوجماعته (2002)

واظهرت النتائج الاحصائية ان هناك فروقاً معنوية في معدل نمو العزلات البكتيرية بدلالة التوصيلية الكهربائية ويعزى هذا الفرق بين العزلات البكتيرية في قدرتها على تحليل المركبات الهايدروكاربونية الى الاختلاف في القابليات الفسلجية والوراثية فيما بينها كما ان هذا الاختلاف لا يكون مقتصراً بحد ذاته على افراد الجنس الواحد فقط اذ لوحظ ان هناك اختلافات تتواجد بين سلالات النوع الواحد ايضاً ، كما قد تحمل بعض العزلات عناصر وراثية مختلفة كالعناصر الوراثية الانتقالية (Transposon) او البلازميدات والتي تكون حاملة لجينات التحلل الحيوي وبالتالي فهي تسهم في تنوع الاليات المستعملة في استهلاك المركبات الهايدروكاربونية ، وان صفة الاستهلاك للمركبات الهايدروكاربونية من قبل البكتريا ليس بالضرورة ان تكون صفة خاصة بالنوع نفسة اذ تكون صفة خاصة بالسلالة (Margesin & Schinner,2001).

2.3.4 تقدير النمو بدلالة الكثافة الضوئية

أظهرت النتائج قابلية جميع العزلات البكتيرية والمعزولة من مصادر بيئية مختلفة (تربة مولدة ، تربة محلات تبديل الدهن ، تربة معمل المطاط ، مياه البزل) على النمو على وسط الاملاح المعدنية واستعمال النفط الخام كمصدر طاقة وكاربون ويتفق هذا مع ما توصل الية كل من (Shekhar وجماعتة2015 ; Ramankutty وNedunchezhiyan 2015)

استعمل الطول الموجي 600 nm لقياس النمو بدلالة الكثافة الضوئية واظهرت النتائج قدرة العزلات على النمو على وسط الاملاح المعدنية المزود بالنفط الخام المستعمل في هذه الدراسة ، فالنسبة للعزلات السالبة لصبغة كرام فقد سجلت بكتريا *P.fluorescens* اعلى قيمة كثافة ضوئية تليها بكتريا *E.coli* ومن ثم بقية العزلات كما هو الحال في قياسات النمو بدلالة التوصلية الكهربائية مما يؤكد كفاءة هذه البكتريا في تحلل المركبات الهايدروكاربونية كما في الجدول(4-7)

جدول (4-7) معدل النمو بدلالة قياس الكثافة الضوئية للعزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام و المختبرة في قدرتها على استهلاك الهايدروكاربونات النفطية .

العزلات	معدل النمو بدلالة الكثافة الضوئية ± قيمة الخطأ القياسي					
	الاسبوع الاول	الاسبوع الثاني	الاسبوع الثالث	الاسبوع الرابع	الاسبوع الخامس	الاسبوع السادس
Escherichia coli تربة المولدة	0.201±0.00005	0.203±0.00003	0.203±0.00003	0.206±0.00003	0.206±0.003	0.204±0.006
Escherichia coli تربة محلات الدهن	0.205±0.003	0.205±0.003	0.215±0.0001	0.309±0.0003	0.309±0.003	0.300±0.005
Escherichia coli تربة معمل المطاط	0.203±0.00003	0.203±0.0003	0.204±0.00006	0.207±0.0006	0.203±0.0003	0.203±0.0003
Escherichia coli مياه البزل	0.202±0.0001	0.203±0.0001	0.212±0.0001	0.220±0.0003	0.220±0.003	0.219±0.003
Pseudomonas fluorescens تربة المولدة	0.211±0.00003	0.212±0.0003	0.219±0.0005	0.322±0.0005	0.320±0.005	0.319±0.003
Pseudomonas fluorescens تربة محلات الدهن	0.202±0.00003	0.202±0.0003	0.208±0.0005	0.217±0.0003	0.216±0.0003	0.216±0.0003
Pseudomonas fluorescens تربة معمل المطاط	0.208±0.00003	0.209±0.0001	0.302±0.0003	0.302±0.0003	0.297±0.003	0.290±0.005
Pseudomonas fluorescens مياه البزل	0.202±0.00002	0.204±0.0002	0.211±0.0002	0.290±0.0005	0.289±0	0.289±0.001
Klebsiella pneumoniae البزل	0.202±0.003	0.203±0.0002	0.205±0.0005	0.209±0.0001	0.203±0.005	0.201±0.003
Proteus mirabilis البزل	0.203±0.00009	0.203±0.0001	0.204±0.0002	0.206±0.0002	0.202±0.003	0.200±0.003
Acinetobacter baumannii تربة المولدة	0.201±0.0001	0.203±0.0005	0.205±0.0005	0.208±0.0005	0.204±0.003	0.202±0.001
Acinetobacter baumannii تربة معمل المطاط	0.202±0.0001	0.203±0.00006	0.203±0.0005	0.207±0.0003	0.203±0.00003	0.202±0.002
$LSD_{0.05}$	**للعزلات =0.069**		**للأوقات =0.048**		**للتداخل =0.071**	

ولوحظ انه بمرور مدة الحضن كانت هناك زيادة تدريجية في النمو واتفقت هذه النتائج مع Gu-Liang وجماعتة (2005) الذين اشاروا الى انه عند استهلاك البكتريا للمركبات الهايدروكاربونية فانه ستحصل زيادة تدريجية في نموها ، اذ بدأ معدل النمو يزداد تدريجياً ليصل الى اعلى قيمة في الاسبوع الرابع من الحضن وبعد الاسبوع الرابع بدأ معدل الكثافة الضوئية بالتناقص تدريجياً ليصل اقل قيمة في الاسبوع السادس اذ انه في العادة تقوم البكتريا باستهلاك الهايدروكاربونات البسيطة التركيب اولاً ومن ثم تستهلك المركبات المعقدة الأصعب تركيباً فاذا كانت البكتريا مستهلكة للهايدروكاربونات البسيطة فقط فإن اعداد الخلايا تزداد زيادة سريعة ثم تبدأ بالتناقص اما في حالة كون البكتريا تستهلك المركبات المعقدة اضافة الى المركبات البسيطة فأن اعداد الخلايا تستمر بالزيادة او تثبت نسبياً (Yoshida *et al.*,2005)

اما بالنسبة للعزلات الموجبة فقد تفوقت بكتريا*Staphylococcus aureus* على *Bacillus cereus* عند قياس الكثافة الضوئية كما هو الحال في تفوقها عند قياس التوصيلية الكهربائية كما في الجدول(4-8)

جدول (4-8) معدل النمو بدلالة قياس الكثافة الضوئية للعزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام و المختبرة في قدرتها على استهلاك الهايدروكاربونات النفطية .

العزلات	معدل النمو بدلالة التوصيلية الكهربائية ± قيمة الخطأ القياسي					
	الاسبوع الاول	الاسبوع الثاني	الاسبوع الثالث	الاسبوع الرابع	الاسبوع الخامس	الاسبوع السادس
Staphylococcus aureus تربة المولدة	0.205±0.0002	0.206±0002	0.209±0	0.209±0.0001	0.202±0	0.202±0.0001
Staphylococcus aureus تربة محال الدهن	0.207±0.0001	0.207±0.0001	0.212±0.002	0.224±0.002	0.219±0	0.219±0.005
Staphylococcus aureus تربة معمل المطاط	0.206±0.0003	0.206±0.0003	0.210±0.001	0.301±0.0003	0.300±0.00003	0.300±0.003
Staphylococcus aureus البزل	0.203±0.005	0.204±0.003	0.210±0.001	0.213±0.005	0.211±0.00003	0.210±0.003
Bacillus cereus المولدة	0.205±0.0002	0.206±0.0002	0.208±0.0003	0.211±0.0001	0.206±0.00003	0.202±0.002
Bacillus cereus تربة محال الدهن	0.203±0.0005	0.204±0.0005	0.207±0.0003	0.212±0.0001	0.207±0.0002	0.204±0.005
Bacillus cereus تربة معمل المطاط	0.202±0.0003	0.204±0.0001	0.206±0.001	0.210±0.0005	0.205±0.00005	0.203±0.003
$LSD_{0.05}$	**للعزلات =0.059**		**للأوقات =0.043**		**للتداخل =0.064**	

واظهرت النتائج الاحصائية وجود فروق احصائية بين العزلات البكتيرية في قيم الكثافة الضوئية و قد يرجع اختلاف العزلات في قدرتها على استهلاك الهايدروكاربونات النفطية الى اختلاف العزلات وراثياً وفسلجياً اضافة الى دور عملية الخلط الوراثي Genetic Recombination ، وتمتلك البكتريا انزيمات تشفر لها بلازميدات معينة والتي عن طريقها تستطيع البكتريا تحليل المركبات الهايدروكاربونية ومن ثم تستطيع هذه البكتريا مقاومة الظروف الصعبة والبقاء على قيد الحياة (Obayori&Salam, 2010 ; Althani *et al* .,2009).

ويرجع نمو العزلات البكتيرية على وسط الاملاح المعدنية المزود بالنفط الخام كمصدر للطاقة والكاربون الى النظام الانزيمي الفعال في استهلاك هذه المركبات المعقدة والسامة في الوقت نفسه وان العزلات تمتلك قابلية استهلاك كل من المركبات البسيطة التركيب والمعقدة كما ان المغذيات تكون متواجدة في الوسط بصورة كافية ولم تنفذ بالاضافة الى ان المواد الايضية السامة لم تتراكم الى الحد الذي تتضرر به الخلايا ويدخلها في طور الهلاك أذ ذكر Rokadeو Mali (2013) ان نفاذ المغذيات كالفسفور والنتروجين او انخفاض الدالة الحامضية (pH) نتيجة لتجمع المواد الايضية السامة وتراكمها اضافة الى نفاذ الهايدروكاربونات البسيطة التركيب وسريعة الاستهلاك وبقاء كل من الهايدروكاربونات الاروماتية متعددة الحلقات والمركبات الاسفلتية صعبة التحلل أو الاستهلاك فضلاً عن نقصان الاوكسجين وقلة التهوية هي احد اهم الاسباب التي تؤدي الى انخفاض الاعداد البكتيرية .

ادى نمو العزلات على الوسط الملحي الى عملية استحلاب النفط الخام اي انها ادت الى امتزاج النفط الخام مع مكونات الوسط الملحي ، اذ تفرز البكتريا مواد مستحلبة تؤدي الى التقليل من لزوجة النفط وتعمل على سهولة مزجة مع الطور المائي (Ramos *et al* .,1994).

وتتيح المستحلبات الحياتية عملية نمو الأحياء المجهرية على المركبات الهايدروكاربونية اذ تسهل عملية التصاق هذه الاحياء على المصادر الهايدروكاربونية ، كذلك فهي تعمل على خفض الشد السطحي وزيادة المساحة بين سطح المادة الغذائية والاحياء المجهرية مما يزيد من قابلية المادة على الدخول الى الخلية وتزداد سرعة تأيضها هذا بالاضافة الى استحلاب المصدر الكاربوني *(Samanta et al.*,2012)

4.4 التحري الجزيئي عن انتاج الجين المشفر لأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase

Molecular Screening of C23O gene

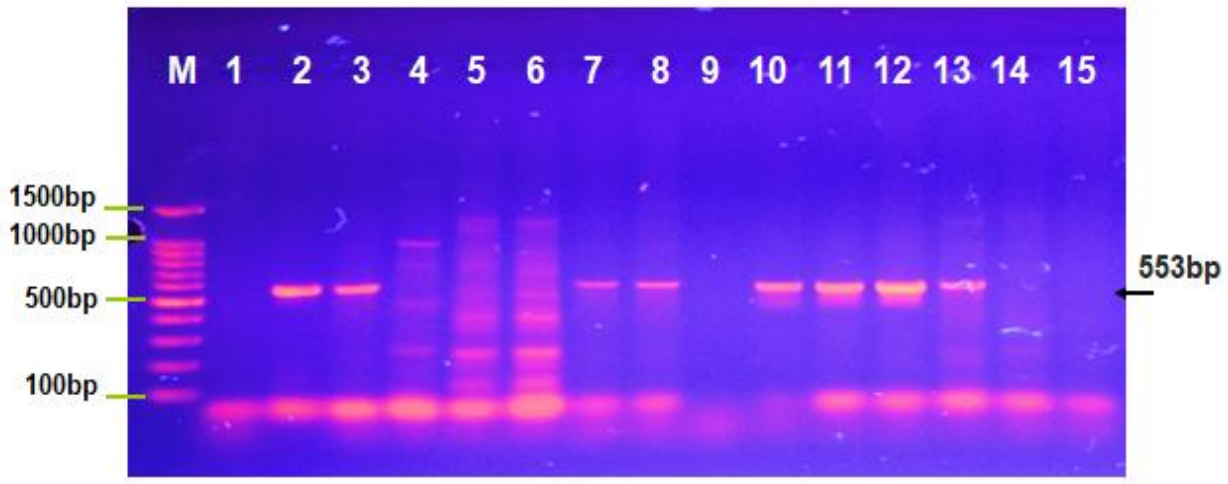
تم التحري جزيئياً عن الجين المشفرلأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase المنتج من قبل بكتريا *E.coli*، *P.fluorescens* و *S.aureus* وذلك لكونهم اعلى العزلات في نسب التحلل الحيوي، باستعمال بادئ خاص بجين (*C23O* gene) وذلك للتحري عن العزلات التى تمتلك هذا الجين باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل الذي يتميز بالتشخيص السريع والدقيق ، بعد انتهاء التفاعل تم ترحيل ناتج التضاعف على هلام الاكاروز بتركيز (1%) بعدها فحص الناتج تحت الاشعة فوق البنفسجية .

أستعملت 23 عزلة من *E.coli* و15 عزلة من *P.fluorescens* و 10 عزلات من *S.aureus* للتحري عن جين (*C23O* gene) الذي له دور مهم في تحلل المركبات الهايدروكاربونية .

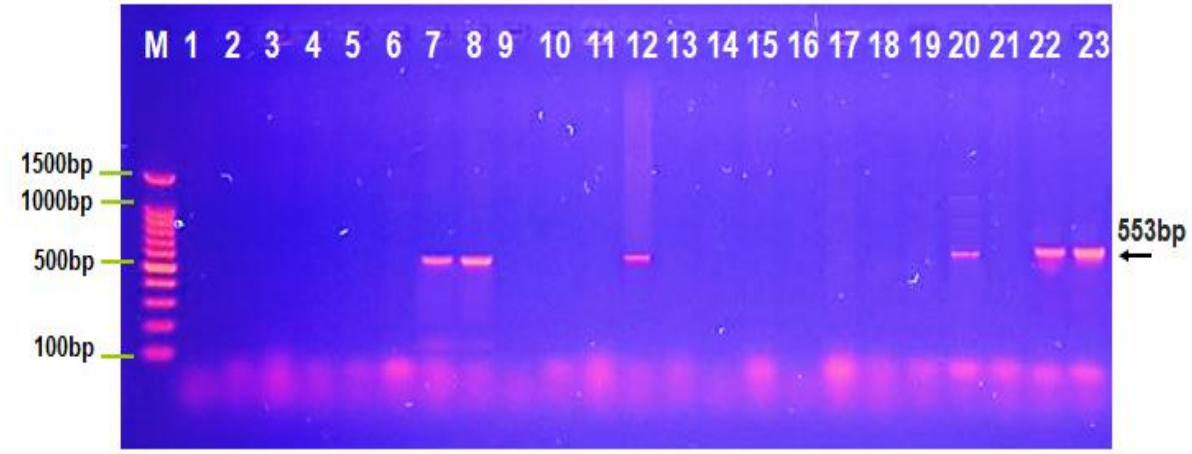
اظهرت نواتج تضخيم الجين بعد الترحيل على هلام الاكاروز والتصبيغ بصبغة الاثيديوم بروماید والتعريض للأشعة فوق البنفسجية تواجد الجين (C23O gene) المشفر لأنتاج انزيم Catechol 2,3 dioxygenase في 8 عزلات من *P.flourescens* اي بنسبة 53.33% شكل (4-5) و 6 عزلات من *E.coli* بنسبة 26.08% شكل (4-6) و عزلة واحدة من *S.aureus* وبنسبة 10% شكل (4-7) ، واظهرت النتائج الاحصائية وجود اختلاف معنوي بين العزلات البكتيرية المنتجة لأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase عند مستوى احتمالية 0.05 كما في جدول (4-9) وجاءت هذه النتائج متوافقة مع دراسة Jyothi وجماعته (2012) اذ حصل على عزلة واحدة فقط من *Staphylococcus aureus* محتوية على هذا الانزيم واتفقت ايضاً مع نتائج Walia وJoshi (1996) اذ كانت عدد عزلات *E.coli* المنتجة للأنزيم هي 6 عزلات وجاءت هذه الدراسة قريبة من دراسة Hussein (2014) بالنسبة لبكتريا *Pseudomonas* اذ شكلت نسبة (43%) في حين اختلفت معها بالنسبة لبكتريا *Staphylococcus* اذ كانت عزلاتها غير منتجة لهذا الانزيم .

جدول (4-9) اعداد ونسب الجين المشفر لأنتاج انزيم Catechol 2,3dioxygenase في العزلات البكترية المحللة للمركبات الهايدروكاربونية

البكتريا	العدد الكلي للعزلات البكتيرية	عدد العزلات المحتوية على الجين	النسبة المئوية %
P.fluorescens	15	8	53.33
E.coli	23	6	26.08
S.aureus	10	1	10
X^2		5.792	
P value		0.0455	



شكل (4-5) الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز والذي يظهر نتائج فحص ال pcr الخاص للتحري عن الجين المشفر لأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase في العزلة *Pseudomonas fluorescens* حيث يمثل M:Marker 1500-100 pb والارقام (13,12,11,10,8,7,3,2) تمثل العزلات الموجبة للجين المشفر لأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase بناتج طولة 553pb.



شكل (4-6) الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز والذي يظهر نتائج فحص ال pcr الخاص للتحري عن الجين المشفرلأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase في الجرثومة *Escherichia coli* حيث يمثل M:Marker 1500-100 pb والارقام (23,22,20,12,8,7) تمثل العزلات الموجبة لجين Catechol 2,3 dioxygenase بناتج طولة 553pb.

شكل (4-7) الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز والذي يظهر نتائج فحص ال pcr الخاص للتحري عن الجين المشفر لأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase في جرثومة *Staphylococcus aureus*حيث يمثل الرقم (8) العزلة الموجبة للجين المشفر لأنزيم Catechol 2,2 dioxygenase بناتج طوله 553pb.

الكايتكول هو مركب وسطي ينتج من استقلاب المركبات الهايدروكاربونية بواسطة البكتريا اذ تعمل هذه البكتريا على تحليله عن طريق مسار الانقسام ميتا (meta) بوساطة انزيم Catechol 2,3 dioxygenase الذي يعمل على تحويله من خلال عدة خطوات الى مركبات أقل سمية لها القدرة على الدخول في دورة كريبس مما يجعل هذه المركبات أكثر سهولة للاستهلاك من قبل البكتريا وبهذا فإن هذا الانزيم يلعب دوراً كبيراً في عملية التحلل الهوائي للمركبات الهايدروكاربونية النفطية (Joesaar *et al*.,2017)

وقد تعزى قدرة العزلات الجرثومية في تحليلها للمركبات الهايدروكاربونية الى احتوائها على مركبات عديدة أخرى غير انزيم Catechol 2,3dioxygenase ، اذ ذكر Eddouaouda وجماعته (2012) ان بكتريا *S. aureus* لها القدرة على افراز مستحلبات حيوية لها دور كبير في تحلل واستهلاك المركبات الهايدروكاربونية، كما اوضح كل من Cerqueira وجماعته (2011) و Smits وجماعته (2003) ان بكتريا *Pseudomonas* تفرز انزيمات مختلفة تساعدها في عملية التحلل الحيوي اهمها انزيم Rhamnosyltransferase المسؤول عن انتاج مستحلبات حيوية biosurfactant تدعى Rhmanolipids ، وانزيم Alkanhydroxylase المسؤول عن تكسير السلاسل الهايدروكاربونية وتحللها اذ يستطيع تكسير المركبات الالكانية ذات الطول (C16-C12-C11-C6) .

قد تحتوي بكتريا *P. fluorescens* على بلازميد plasmid يحمل موروثات لها دور كبير في تحلل الهايدروكاربونات النفطية وفي نفس الوقت قد ينتقل هذا البلازميد الى بكتريا اخرى مثل *E.coli* التى تفتقد لهذا البلازميد بعملية التحول البكتيري Transformationوتنتقل معه خاصية التحلل الحيوي فتصبح السلالة المستلمة التابعة لبكتريا *E.coli* لها القدرة على التحلل الحيوي ايضاً وهذا ما اكدتهُ الدراسة التي قام بها Vasudevan وجماعته (2007) .

ويحلل انزيم Catechol 2,3 dioxygenase الهايدروكاربونات الاروماتية عن طريق التصاق الحلقة العطرية مابين ذرة الكاربون لمجموعة الهيدروكسيل وذرة كاربون اخرى مجاورة لمجموعة غير هيدروكسيلية ، ويعمل هذا الانزيم على تحلل مركبات مختلفة كالنفثالين والزيلين والتولوين (Tikok&Shammri , 2011) فهو يؤكسد المركب الاروماتي ويحوله الى مركب كحولي ثنائي الهيدروكسيل بعدها يدخل في سلسلة من عمليات الاكسدة والاختزال تكون نتيجتها تكون حامض البايروفيك والذي بدوره يدخل في دورة كريبس (De jong *et al* ., 2004)

قد يكون أحد الأسباب الذي يجعل البكتريا السالبة لصبغة كرام أكثر فعالية في تحلل المركبات الهايدروكاربونية من البكتريا الموجبة هي انها تكون محاطة بجدار خلوي يكون اقل تعقيداً من جدار البكتريا الموجبة مع احتوائه عل طبقة رقيقة من ال piptedoglycan والتي بدورها تكون محاطة بالدهون المفسفرة على شكل طبقة خارجية وظيفتها حماية طبقة piptedoglycan الرقيقة من الاذابة بالالكانات السامة واطئة الوزن الجزيئي وهذا اشار إليه عبد الرضا (2013) .

1.4.4تقنية تحليل التسلسل التتابعي للجين المشفر لأنزيم Catechol 2,3 dioxygenase

Sequencing technique of Catechol 2,3 dioxygenase (gen C23O)

حلل التسلسل التتابعي لجين (*gen C23O*) في عزلات *Pseudomonas fluorescens* ، *Escherichia coli* ، *Staphylococcus aureus* باستعمال برنامج (MEGA6) وقورن مع التسلسل التتابعي للجين الاصلي للعزلة القياسية لكل من *Pseudomonas* التي تحمل الرقم التسلسلي (KF010862.1) و *Escherichia coli* التي تحمل الرقم التسلسلي (CP019778.1) **و** *Staphylococcus aureus* التي تحمل الرقم التسلسلي (CP023500.1)جدول (4-10)

اظهرت نتائج التحليل التتابعي لجين (genC23O) للعزلات *Pseudomonas fluorescens* ، *Escherichia coli* ، *Staphylococcus aureus* ان العزلة *Pseudomonas fluorescens* كانت متماثلة 100% مع جين العزلة القياسية التي تحمل الرقم التسلسلي (KF010862.1) شكل (4-8)

كما كانت *Escherichia coli* ايضاً متماثلة بنسبة 100% مع جين العزلة القياسية التي تحمل الرقم التسلسلي (CP019778.1) شكل (4-9)

في حين كانت نسبة التطابق 99 % في *Staphylococcus aureus* عند مقارنتها مع جين العزلة القياسية التي تحمل التسلسلي (CP023500.1) شكل (4-10) .

ان التطور الكبير في علم الأحياء الجزيئي استغل في العديد من التقنيات الحديثة والسريعة والمتطورة كالكشف عن العلاقات الوراثية بين العزلات فضلاً عن الطفرات الوراثية وتعد تقنية Sequencing technique واحدة من اهم التقنيات المستعملة في هذا المجال ، فهي إحدى طرائق التنميط الجيني Genotyping والتي لها دور كبير في الكشف عن الطفرات الوراثية اذ تعتمد هذه التقنية على التسلسلات المتكررة في الجينوم البكتيري (Ranjbar *et al* .,2014) .

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1022 bits(553)	0.0	553/553(100%)	0/553(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    CGAACGATTCATGACCGTGCTGACCTGATGGTTCGGTTCGACTTATTGCAGAGATTGCGC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    CGAACGATTCATGACCGTGCTGACCTGATGGTTCGGTTCGACTTATTGCAGAGATTGCGC  60

Query  61   AGATGAAAGAGATCAAGCATTTCATTAACGGTGCCTTCGTCGATTCGGCCAGCGGCCGCA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   AGATGAAAGAGATCAAGCATTTCATTAACGGTGCCTTCGTCGATTCGGCCAGCGGCCGCA  120

Query  121  CCTTCGAGGACATCAACCCGGTCAATGGCCAGGTGATCGGCCGCGTGCACGAGGCCGGCC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  CCTTCGAGGACATCAACCCGGTCAATGGCCAGGTGATCGGCCGCGTGCACGAGGCCGGCC  180

Query  181  GCGCCGAGGTCGACGCCGCGGTCAGGGCGGCACGCGCTGCGCTGAAGGGACCATGGGGGA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  GCGCCGAGGTCGACGCCGCGGTCAGGGCGGCACGCGCTGCGCTGAAGGGACCATGGGGGA  240

Query  241  AGATGACGGTGGCCGAGCGCGCTGAGATTCTGCATCGCGTGGCCGATGGCGTCACGGCGC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  AGATGACGGTGGCCGAGCGCGCTGAGATTCTGCATCGCGTGGCCGATGGCGTCACGGCGC  300

Query  301  GCTTCGATGAGTTTCTCGAGGCCGAATGCCTGGACACCGGCAAGCCCAAATCCCTGGCCA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  GCTTCGATGAGTTTCTCGAGGCCGAATGCCTGGACACCGGCAAGCCCAAATCCCTGGCCA  360

Query  361  GCCACATCGACATTCCGCGCGGCGCGGCCAATTTCAAGGTGTTCGCCGACCTGATCAAGA  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  GCCACATCGACATTCCGCGCGGCGCGGCCAATTTCAAGGTGTTCGCCGACCTGATCAAGA  420

Query  421  ACGTGCCGACCGAAGCCTTCGAGATGGCCACCCCGGACGGCGCCGGTGCACTCAACTACG  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421  ACGTGCCGACCGAAGCCTTCGAGATGGCCACCCCGGACGGCGCCGGTGCACTCAACTACG  480

Query  481  GCGTGCGCCGGCCCAAGGGGGTGATCGGCGTGATCAGCCCGTGGAACCTGCCGCTGCTGC  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481  GCGTGCGCCGGCCCAAGGGGGTGATCGGCGTGATCAGCCCGTGGAACCTGCCGCTGCTGC  540

Query  541  TCATGACCTGGAA  553
            |||||||||||||
Sbjct  541  TCATGACCTGGAA  553
```

الشكل (4-8): نتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين C23O في بكتريا *P.fluorescens* مقارنة مع الجين الاصلي لبكتريا (KF010862.1)*P.fluorescens* .

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1014 bits(549)	0.0	549/549(100%)	0/549(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    TCGATGAGGTCAATGGCGTGATTGCCAGCGCCCGCGAGCGTATTGCGGCATTCTCCCCTG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    TCGATGAGGTCAATGGCGTGATTGCCAGCGCCCGCGAGCGTATTGCGGCATTCTCCCCTG  60

Query  61   AACTGGTGGTGCTGTTTGCGCCAGATCACTACAACGGCTTTTTCTATGACGTGATGCCAC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   AACTGGTGGTGCTGTTTGCGCCAGATCACTACAACGGCTTTTTCTATGACGTGATGCCAC  120

Query  121  CGTTCTGTTTAGGCGTTGGAGCGACGGCAATTGGTGATTTCGGCAGTGCGGCAGGAGAGC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  CGTTCTGTTTAGGCGTTGGAGCGACGGCAATTGGTGATTTCGGCAGTGCGGCAGGAGAGC  180

Query  181  TGCCCGTGCCTGTGGAGCTGGCGGAGGCCTGTGCGCATGCCGTCATGAAGAGCGGGATCG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  TGCCCGTGCCTGTGGAGCTGGCGGAGGCCTGTGCGCATGCCGTCATGAAGAGCGGGATCG  240

Query  241  ATCTTGCCGTTTCTTACTGTATGCAGGTGGACCACGGGTTCGCCCAGCCGCTGGAGTTCC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  ATCTTGCCGTTTCTTACTGTATGCAGGTGGACCACGGGTTCGCCCAGCCGCTGGAGTTCC  300

Query  301  TGCTCGGTGGGCTGGATAAGGTGCCAGTTCTGCCTGTGTTCATCAACGGTGTCGCCACGC  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  TGCTCGGTGGGCTGGATAAGGTGCCAGTTCTGCCTGTGTTCATCAACGGTGTCGCCACGC  360

Query  361  CGCTGCCCGGTTTCCAGCGTACCCGCATGTTGGGTGAAGCCATTGGACGTTTCACCAGCA  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  CGCTGCCCGGTTTCCAGCGTACCCGCATGTTGGGTGAAGCCATTGGACGTTTCACCAGCA  420

Query  421  CTCTCAATAAACGCGTGCTGTTCCTGGGTTCCGGTGGGCTTTCCCATCAGCCGCCGGTGC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421  CTCTCAATAAACGCGTGCTGTTCCTGGGTTCCGGTGGGCTTTCCCATCAGCCGCCGGTGC  480

Query  481  CCGAACTGGCGAAAGCCGATGCCCATATGCGCGACCGTCTGTTGGGGAGCGGGAAAGATT  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481  CCGAACTGGCGAAAGCCGATGCCCATATGCGCGACCGTCTGTTGGGGAGCGGGAAAGATT  540

Query  541  TACCCGCCA  549
            |||||||||
Sbjct  541  TACCCGCCA  549
```

الشكل (4-9) نتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين C23O في بكتريا *E.coli* مقارنة مع الجين الاصلي لبكتريا *E.coli*(CP019778.1) .

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1014 bits(549)	0.0	551/552(99%)	0/552(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    TGACAACATTTTACAAAAACATTTTAGGACTATCCGTTAAAAGTTCTGACGATAATACAA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    TGACAACATTTTACAAAAACATTTTAGGACTATCCGTTAAAAGTTCTGACGATAATACAA  60

Query  61   CCGTATTATCTGTTGGGACTGGTGGCCATACTCTAACGTTACATTTATTAGAAGACGGCC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   CCGTATTATCTGTTGGGACTGGTGGCCATACTCTAACGTTACATTTATTAGAAGACGGCC  120

Query  121  GTCAGACTTCCCCACGTGAAGCAGGGCTTTTTCATATAGCATTTTTATTACCAACTACTG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  GTCAGACTTCCCCACGTGAAGCAGGGCTTTTTCATATAGCATTTTTATTACCAACTACTG  180

Query  181  AGGATCTAGCTAACTTCTTATATTTCGTGGCACaaaaaaaTATGGGCATCGGCGCTGGTG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  AGGATCTAGCTAACTTCTTATATTTCGTGGCACAAAAAAAATATGGGCATCGGCGCTGGTG  240

Query  241  ATCATTTAGTAAGTGAAGCTTTATATTTCAACGACCCCGAAGGTAATGGTATTGAAGTCT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  ATCATTTAGTAAGTGAAGCTTTATATTTCAACGACCCCGAAGGTAATGGTATTGAAGTCT  300

Query  301  ATCGCGATAGACCTTCATCTTCATGGGAATGGCAAAATGGCAAAGTTAAAATGGATACTT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  ATCGCGATAGACCTTCATCTTCATGGGAATGGCAAAATGGCAAAGTTAAAATGGATACTT  360

Query  361  TAGAAGTTGATAGCCAAACCTTATTAACACATCGTACTGATGAAGGTTGGCAAGGAATGC  420
            |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  TAGAAGTTGATAGCCAAACTTTATTAACACATCGTACTGATGAAGGTTGGCAAGGAATGC  420

Query  421  CAGCAAAAGGCATGATTGGACACTTACATTTAAAAACACATGATTTAGACGCAGCATATC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421  CAGCAAAAGGCATGATTGGACACTTACATTTAAAAACACATGATTTAGACGCAGCATATC  480

Query  481  AATGTTACATTGAACAATTAGGATTCCAACATGTGTCTGATTTTCCACGTGCGCTATTTA  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481  AATGTTACATTGAACAATTAGGATTCCAACATGTGTCTGATTTTCCACGTGCGCTATTTA  540

Query  541  TGTCAACGAATC  552
            ||||||||||||
Sbjct  541  TGTCAACGAATC  552
```

الشكل (4-10): نتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين C23Oفي بكتريا *S.aureus* مقارنة مع الجين الاصلي لبكتريا (CP023500.1) *S.aureus* .

لقد تم تحليل جين C230 لعزلة واحدة لكل من *P.fluorescens* و*E.coli* و*S.aureus* المحللات للمركبات الهايدروكاربونية وتمَّ ارسالها الى موقع NCBI-Genbank لتسجيل هذه البكتريا في بيانات NCBI للحصول على الرقم التسلسلي الخاص بكل عزلة في الموقع العالمي كما في الجدول (4-10) والملحق (2)

جدول (4-10)ارقام التسجيل للعزلات ونسبة التطابق الوراثي في العزلات المحلية والعزلات المسجلة في موقع بنك الجينات

العزلة الجرثومية	رقم التسجيل في موقع بنك الجينات	نسبة التطابق Homology sequence identity	
		العزلة القياسية	نسبة التطابق
Escherichia coli	MH645352	*Escherichia coli* (CP019778.1)	%100
Pseudomonas fluorescens	MH645354	*Pseudomonas sp.* (KF010862.1)	%100
Staphylococcus aureus	MH645353	*Staphylococcus aureus* (CP023500.1)	%99

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions & Recommendations

الاستنتاجات Conclusions

1- قدرة العزلات البكتيرية المشخصة في هذه الدراسة وباختلاف مصادر العزل على تفكيك الهايدروكاربونات النفطية واستهلاكها وتنوعت هذه العزلات مابين موجبة وسالبة لصبغة كرام مما يشير الى انه بالإمكان استعمال هذه البكتريا في المعالجة الحيوية للهايدروكاربونات النفطية .

2 - احتواء البيئة المحلية على أنواع بكتيرية عديدة لها القدرة على تحلل الهايدروكاربونات النفطية واستهلاكها .

3 -اظهرت بكتريا *E.coli* اعلى نسبة عزل في المناطق البيئية المختلفة وكانت أكثر تردداً في مياه البزل تليها بنسب العزل بكتريا *P.fluorescens* ثم *S.aureus* .

4- تفوقت بكتريا *P.fluorescens* على الانواع البكتيرية الاخرى في قدرتها على تحلل الهايدروكاربونات النفطية اذ تميزت بقدرتها العالية على استحلاب النفط الخام واستعماله كمصدر كاربون وطاقة ثم جاءت بعدها *E.coli* في حين احتلت *S.aureus* المرتبة الثالثة في فعالية التحلل الحيوي.

5 - يؤدي حدوث التلوث البيئي في مناطق معينة الى تواجد أنواع بكتيرية لها القدرة على تحلل الهايدروكاربونات النفطية اذ تتكيف هذه الأحياء على استهلاك هذه الملوثات واستعمالها كمصدر للطاقة والكاربون وبالتالي التخفيف من حدة التلوث البيئي .

6 - أثبت التحري الجزيئي عن الجين ($C_{23}O$ gene) المشفر لإنتاج انزيم Catechol 2,3 dioxygenase تفوق عزلات *P.fluorescens* على كل من عزلات *E.coli* و*S.aureus* في نسبة امتلاكها لهذا الجين اذا جاءتا بالمرتبة الثانية والثالثة على التوالي .

التوصيات Recommendations

1 ـ التوسع في دراسة الانواع البكتيرية التي لها القدرة على التحلل الحيوي والكشف جزيئياً عن جينات التحلل الحيوي التي تمتلكها وتحليل تسلسلات الحامض النووي لهذه الجينات للكشف العلاقة الوراثية وتحديد الطفرات لهذه الجينات.

2 ـإجراء دراسات حول طبيعة المجتمع البكتيري في المناطق الملوثة ودوره في عمليات التحلل الحيوي.

3 ـ التوسع في إجراء دراسات تخص الظروف البيئية المثلى التي تتطلبها عملية التحلل الحيوي بواسطة الاحياء المجهرية لتحسين هذه العملية قدر الإمكان ومحاولة الاستفادة منها بصورة اقتصادية.

4 ـ استعمال عزلات بكتيرية لأكثر من نوع واحد في مزارع مختلطة في المعالجة الحيوية ومعرفة الاختلاف بينها وبين استعمال العزلات المفردة في نسب االتحلل الحيوي.

5 ـ التحري جزيئياً عن انزيمات Catechol 1,2 dioxygenase و Rhamnosyltransferase المتواجدة في الأنواع البكتيرية والمسؤولة عن عملية التحلل الحيوي.

6 ـ من الضروري التعاون بين الجهات التي تعنى بمشكلة التلوث وذلك للتقليل من الأخطار الناجمة منها والتخلص من هذه الملوثات بطرق سليمة .

المصادر

References

المصادر العربية

البوغازي ، استبرق عبدالحسين سلمان (2015) عزل وتشخيص بعض انواع البكتريا المكسرة للهايدروكاربونات النفطية الاليفاتية في الترسبات النفطية لمحافظة البصرة .رسالة ماجستير .كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة البصرة.

البيضاني ، مريم فوزي حميد (2009) قابلية بعض انواع السيانوبكتريا على مراكمة الهايدروكاربونات الاروماتية وبعض العناصر الثقيلة . رسالة ماجستير .كلية التربية .جامعة البصرة .

الجادر، بثينة محمد صادق جعفر (2006) تأثير زيت الوقود في نشاط بكتريا الرايزوبيوم ونمو حاصل الفاصوليا ومقاومتها للمضادات الحياتية .رسالة ماجستير .كلية الزراعة .جامعة بغداد.

الجبوري، ياسين حسين عويد (2005) التحلل الحيوي لانواع من النفط الخام بفعل الجراثيم المعزولة من ترب مصافي العراق الشمالية .اطروحة دكتوراه. كلية التربية .جامعة تكريت.

الصابريني ، محمد السعيد والحمد ، رشيد حمد (1994) الانسان والبيئة (التربية البيئية) ص -105 104.

العبيدي ، امل علي حسين(2004) العوامل المؤثرة في التحلل الحيوي لمياه مخلفات وحدة المعالجة في مصفى الدورة – بغداد. رسالة ماجستير .كلية العلوم . جامعة بغداد.

الكعبي ،اسراء نجم عبدالله (2010)الاستصلاح الحيوي للترب الملوثة بالهايدروكاربونات النفطية والمتأثرة بالملوحة . رسالة ماجستير.كلية الزراعة . جامعة بغداد.

بدر، سناء قاسم (2016) خصائص خمائر البيئة النهرية لمحافظة البصرة وقابلية بعضها على المعالجة الحيوية للعناصر الثقيلة والهايدروكاربونات النفطية .اطروحة دكتوراه .كلية التربية للعلوم الصرفة .جامعة بغداد.

عبد الرضا ، فاضل نعمة .(2013) عزل انواع من البكتريا المكسرة للنفط من مصب شط العرب وتحسين قابليتها على تكسير الالكانات الاعتيادية . رسالة ماجستير , كلية التربية , جامعة البصرة , قسم علوم الحياة.

عنانزة ،خالد(2002) النفايات الخطرة والبيئة.الاهلية للنشر والتوزيع. المملكة الاردنية الهاشمية الطبعة الاولى.عمان.دار الطباعة الاردن.

فهد ،حارث جبار و ربيع ، عادل مشعان (2010) التلوث المائي مصادرة ومخاطرة ومعالجته .مكتبة المجتمع العربي للنشر والتوزيع الطبعة الاولى .

المصادر الانكليزية

Abdel-Shafy, H. I. & Mansour, M. S. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. Egyptian Journal of Petroleum, *25*(1): 107-123.

Abdurrahim, A. E.; Bashir, R.; Sandouk, R. & Elgammude, B. (2009). Isolation and characterization of rhamnolipid (Biosurfactant) from petroleum contaminated soil. Assiut University Bulletin for Environmental Researches, 12:95-106.

Abed, R. M.; Safi, N. M.; Köster, J.; De Beer, D.; El-Nahhal, Y.; Rullkötter, J. & Garcia-Pichel, F. (2002). Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. Applied and environmental microbiology, *68*(4): 1674-1683.

Abioye, O. P.; Agamuthu, P. & Abdul Aziz, A. R. (2012). Biodegradation of used motor oil in soil using organic waste amendments. Biotechnology research international, *2012*:1-8.

Adeline, S. Y.; Ting, C. & Aw, C. S. (2009). Hydrocarbon-degradation by isolate Pseudomonas lundensis UTAR FPE2.Malaysian Journal of Microbiology, *5*(2): 104-108.

Aislabie, J. M.; Balks, M. R.; Foght, J. M. & Waterhouse, E. J. (2004). Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and management. Environmental Science & Technology, *38*(5): 1265-1274.

Akeredolu D. &Akinnibosun F.I. (2017). Isolation of Bacteria and Physicochemical Analyses of Petroleum-Products Contaminated Soil from NNPC/PPMC Depot, Benin City, Nigeria. Int J Mol Biol Open Access 2(4).

Akpe, R.; Ekundayo, A. O.; Aigere, S. P. &Okwu, G. I. (2015). Bacterial degradation of petroleum hydrocarbons in crude oil polluted soil amended with cassava peels. American Journal of Research Communication, *3*(7): 99-118.

Al-Bahry, S. N.; Al-Hashmi, A.; Joshi, S. J.; Al-Wahaibi, Y. M.; Elshafie, A. E. & Al-Bemani, A. S.(2016) .Potential of Coastal Water Bacteria for Oil Spill Bioremediation. Int'l Journal of Advances in Agricultural & Environmental Engg(IJAAEE) ,3(1) :154-156.

Albaiges , J. (1989). Marine pollution Hem sere publishing cop., New york .

AL-Gelawi, M. H. & Al-Saffar, A. Z. (2010). Genetic improvement of some bacterial isolates in utilization of hydrocarbon compounds. Iraqi Journal of Science, *51*(2): 271-276.

Al-Janabi,J.D.(2008). Appreciation survey of natural biodegradation of crude oil which cause soil contamination and trying to diagnose the bacterial species which cause this biodegradation . Education collage , Tikrit University .

AL-Mayaly, I. K. (2010). Using of Some Bacterial Species to Treat Polluted Soils with Hydrocarbons. Ibn AL-Haitham Journal For Pure and Applied Science, 23(3): 5-14.

Al-Thani, R. F.; Abd-El-Haleem , D. A . & Al-Shammri , M. (2009) . Isolation and characterization of polyaromatic hydrocarbons-degrading bacteria from different Qatari soils. African Journal of Microbiology Research, *3*(11): 761-766.

Al-Ukaelii, S. A.& Al- Shaeb, S. M. (1998). Statically Analysis by used SPSS Program .Al-Shoroq house for Publishers and advertisement Amaan, Jordan.

Andria, V. (2008). Molecular analysis of hydrocarbon-degrading bacteria and Alkane Hydroxylase (alk) genes in association with highly tolerant plant species for phytoremediation of petroleum oil contamination in soil.

Antunes, L.; Visca, P. & Towner, K. J. (2014). Acinetobacter baumannii: evolution of a global pathogen. Pathogens and disease, *71*(3): 292-301.

API.American petroleum Institute(2001) Basic petroleum .date book. Washington.

Armstrong, B.; Hutchinson, E.; Unwin, J. & Fletcher, T. (2004). Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. Environmental health perspectives, *112*(9): 970.

Asia, O. ; Enweani, I. B. &Eguavoen I. O. (2006) . Characterization and treatment of sludge from the petroleum industry. African Journal of Biotechnology, 5 (5): 461-466.

Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. Microbiological reviews, *45*(1): 180.

Atlas, R. M. (1984). Pathways of hydrocarbon degradation. Petroleum Microbiology. Macmillan Publishing Company, New York, USA,: 1-15.

Atlas, R. M. & Bartha, R. (1972). Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. Canadian Journal of Microbiology, *18*(12): 1851-1855.

Atlas, R. & Bragg, J. (2009). Bioremediation of marine oil spills: when and when not–the Exxon Valdez experience. Microbial biotechnology, *2*(2), 213-221.

Atlas, R. M. & Cerniglia, C. E. (1995). Bioremediation of petroleum pollutants. Bioscience, 45(5): 332-338.

Azaizeh, H.; Castro, P. M. & Kidd, P. (2011). Biodegradation of organic xenobiotic pollutants in the rhizosphere. In Organic Xenobiotics and Plants (pp. 191-215). Springer, Dordrecht.

Banat, I. M. (1995). Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. Bioresource technology, *51*(1): 1-12.

Banat, I.M.; Samarah, N.; Murad,M.; Horne, R. &Banerjee, S . (1991). Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 7: 80-88.

Bennett, R. W. & Lancett ; G . A . (2001). *Staphylococcus aureus* in Bacteriological Analytical Manual Online January.Chapter 12 .U .S Food & Drug Adminstration Center for food Safty & Applied Nutrition.

Benson, H.J.(2002). Microbiological application : Laboratory manual in general microbiology, 8th ed. McGraw ‑Hill Co., Inc., New York.

Bhalerao, D. S.; Roushani, S.; Kinikar, A. G. & Akhter, I. (2010). Study of Metallo-beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in Pravara Rural Hospital. Pravara. Med. Rev. 2(3): 9-16.

Brown, A. (2007). Benson`s Microbiological Application Laboratory Manual in General Microbiology. 10thed. McGraw-Hill comp.Inc. USA., p: 102-263.

Budzinski, H.; Nadalig, T.; Raymond, N.; Matuzahroh, N. & Gilewicz, M. (2000). Evidence of two metabolic pathways for degradation of 2-methylphenanthrene by *Sphingomonas* sp. strain (2MPII). Environmental toxicology and chemistry, *19*(11): 2672-2677.

Calvo, C.; Manzanera, M.; Silva-Castro, G. A.; Uad, I. & González-López, J. (2009). Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. Science of the total environment, *407*(12): 3634-3640.

Cao, B.; Nagarajan, K. & Loh, K. C. (2009). Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. Applied microbiology and biotechnology, *85*(2): 207-228.

Cerqueira, V. S.; Hollenbach, E. B.; Maboni, F.; Vainstein, M. H.; Camargo, F. A.; Maria do Carmo, R. P. & Bento, F. M. (2011). Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. Bioresource technology, 102(23): 11003-11010.

Chaillan, F.; Chaineau, C.; Point, V.; Saliot, A. & Oudot, J. (2006). Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drill cuttings. Environmental Pollution 144: 255-265.

Chang, C. H.; Lee, J.; Ko, B. G.; Kim, S. K. & Chang, J. S. (2011). *Staphylococcus sp*. KW-07 contains nahH gene encoding catechol 2, 3-dioxygenase for phenanthrene degradation and a test in soil microcosm. International biodeterioration & biodegradation, *65*(1), 198-203.

Chaudhry, Q.; Blom-Zandstra, M.; Gupta, S. K. & Joner, E. (2005). Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment (15 pp). Environmental Science and Pollution Research, 12(1): 34-48.

Cheesbrough, M. (2006). District Laboratory Practice in Tropical Countries part 22nd ed. USA.Pp: 225-235.

Chess, T.(2012). Microb.18thedition.McGrowHill.United States.

Choi, D. H.; Hori, K.; Tanji, Y. & Unno, H. (1999). Microbial degradation kinetics of solid alkane dissolved in nondegradable oil phase. Biochemical engineering journal, 3(1): 71-78.

Cunha,B.A.(2002).Stenotrophomonas maltphilia medicine.Instantaccess to the mind medicine.Treatment medication follow- up miscall aneous Bioliography.pp:1-7.

Cybulski, Z.; Dziurla, E.; Kaczorek, E. & Olszanowski, A. (2003). The influence of emulsifiers on hydrocarbon biodegradation by Pseudomonadaceae and Bacillaceae strains.Spill Science & Technology Bulletin, 8(5): 503-507.

Das, N. &Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. Biotechnology Research International. 2011: 1- 13.

De Jong, R. M.; Brugman, W.; Poelarends, G. J.; Whitman, C. P. & Dijkstra, B. W. (2004). The X-ray structure of trans-3-chloroacrylic acid dehalogenase reveals a novel hydration mechanism in the tautomerase superfamily. Journal of Biological Chemistry, 279(12): 11546-11552.

De Morais, E.B. &Tornisielo, S.M.T.(2009). Biodegradation of oil refi nery residues using mixed-culture of microorganisms isolated from a land farming.Brazilian archives of biology and technology an international Journal,52(6) :1571-1578.

De Soyza, A.; Hall, A. J.; Mahenthiralingam, E.; Drevinek, P.; Kaca, W.; Drulis- Kawa, Z., ... & Burns, J. L. (2013). Developing an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel. Microbiologyopen, 2(6): 1010-1023.

Declercq, I.; Cappuyns, V. & Duclos, Y. (2012). Monitored natural attenuation (MNA) of contaminated soils: state of the art in Europe—a critical evaluation. Science of the Total Environment, 426: 393-405.

Dokic L.; Narancic T.; Nikodinovic-Runic J.; Bajkic S.,& Vasiljevic B.(2012) Four *Bacillus sp*. soil isolates capable of degrading phenol, toluene, biphenyl, naphthalene and other aromatic compounds exhibit different aromatic catabolic potentials. Archives of Biological Sciences , 63 (4): 1057-1067.

Doran, J. W. & Zeiss, M. R. (2000). Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality.Applied soil ecology, 15(1): 3-11.

Eddouaouda, K.; Mnif, S.; Badis, A.; Younes, S. B.; Cherif, S.; Ferhat, S., ... & Sayadi, S. (2012). Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation. Journal of basic microbiology, 52(4): 408-418.

Emtiazi, G.; Shakarami, H.; Nahvi, I. & Mirdamadian, S. H. (2005). Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas sp*. and transformed E. coli. African Journal of Biotechnology,4(2): 172.

Feitkenhauer, H. & Märkl, H. (2003). Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons at high temperatures. Water science and technology, 47(10): 123-130.

Fengerman, M. &Nagabhushanam, R.(2005). Bioremediation of aquatic and terrestrial, Science Publishers, Inc., NH, USA, pp:400.

Forbes, B. A.; Daniel, F. S. & Alice, S. W. (2007). Bailey and scott's diagnostic microbiology.12th ed. Mosby Elsevier company. USA.

Ganesh, A. & Lin, J. (2009). Diesel degradation and biosurfactant production by Gram-positive isolates. African journal of Biotechnology, 8(21) : 5847-5854.

Garapati , V.K. (2012) . Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons. Master's Thesis in Technology (Research) in Chemical Engineering , Department of Chemical Engineering , National Institute of Technology.

George, K. W. & Hay, A. (2012). Less is more: reduced catechol production permits *Pseudomonas putida* F1 to grow on styrene. Microbiology, 158(11): 2781-2788.

Ghaly, S. &MacDonald , N., (2002). "Bioremediation : An Innovativesolution for oil contamination . Afinal report . Arnetis Biotech challenge competition .Afinal report, Aventis Biotech challenge competition Halifax." Nova scotia: 1-15.

Ghazali, F. M.; Rahman, R. N. Z. A.; Salleh, A. B. & Basri, M. (2004). Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. International Biodeterioration & Biodegradation, 54(1): 61-67.

Goldman, E. & Lorrence, H. G.(2009). Practicl Handbook of microbiology. 2nd.Ed. Printed in the United States of America.

Gómez, R.; Bashir, R. & Bhunia, A. K. (2002). Microscale electronic detection of bacterial metabolism. Sensors and Actuators B: Chemical, 86(2-3): 198-208.

Greenwood, D.; Slack, R. C.; Barer, M. R. & Irving, W. L. (2012). Medical Microbiology E-Book: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control. With STUDENT CONSULT Online Access. Elsevier Health Sciences.

Gullotto, A.; Branciamore, S.; Duchi, I.; Caño, M. F. P.; Randazzo, D.; Tilli, S., ... & Briganti, F. (2008). Combined action of a bacterial monooxygenase and a fungal laccase for the biodegradation of mono-and poly-aromatic hydrocarbons.Bioresource technology, 99(17): 8353-8359.

Guo-liang, Z.; Yue-ting, W. U.; Xin-ping, Q. & Qin, M. (2005). Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. Journal of Zhejiang University Science B, 6(8): 725-730.

Gupte, A. & Sonawdekar, S. (2015). Study of Oil Degrading Bacteria Isolated From Oil Contaminated Sites. Int. J For Research In Applied Science & Engineering Technology, 3(2) :345-349.

Guru, G. S.; Panchal, M. R.; Ghosh, S. K. & Braganza, V. B. (2013). Isolation and enrichment of microbes for degradation of crude oil. International Journal of Engineering Science and Innovative Technology, 2(4): 144-147.

Hamzah, A.; Phan, C. W.; Abu Bakar, N. F. & Wong, K. K. (2013). Biodegradation of crude oil by constructed bacterial consortia and the

constituent single bacteria isolated from Malaysia. Bioremediation journal, 17(1): 1-10.

Haritash, A. K. & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Journal of hazardous materials, 169(1-3): 1-15.

Harley, J.P. &Prescott, L.M. (1996). Laboratory Exercises in Microbiology. 3rd ed., WCB/ McGraw-Hill Company, Inc.

Harms, H.; Schlosser, D. & Wick, L. Y. (2011). Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. Nature Reviews Microbiology, *9*(3): 177.

Heath ,G. ; Heath, R.A. &Dundr ,Z. (2004) . Paraffinic sludge reduction in crude oil storage tanks through the use of shearing and re suspen-sion, Acta Montanistica Slovaca , číslo, 3: 184-188.

Hohnstock, A. M.; Stuart-Keil, K. G.; Kull, E. E. & Madsen, E. L. (2000). Naphthalene and donor cell density influence field conjugation of naphthalene catabolism plasmids. Applied and environmental microbiology, 66(7): 3088-3092.

Hupert-Kocurek, K.; Wojcieszyńska, D. & Guzik, U. (2014). Activity of a carboxyl-terminal truncated form of catechol 2, 3-dioxygenase from *Planococcus sp*. S5. The Scientific World Journal, 2014 : 1-9.

Hussein, A. N. (٢٠١٤) Molecular detection of biodegradation and biosurfactant-producing bacteria isolated from hydrocarbon contaminated soils in the Diwaniya city/Al-Qadisiya governorate .Jornal of Al-Muthanna for Agricultural Sciences, 2(1) .

Ibrahim, M. K. (2003). Cloning and nucleotide sequence of catechol 2, 3-dioxygenase gene from the naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* NA3. International Journal of Agriculture & Biology, 5(4): 423-7.

Ilori, M. O.; Amobi, C. J. & Odocha, A. C. (2005). Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas spp*. isolated from a tropical environment. Chemosphere, 61(7): 985-992.

Isinguzo, N. S. & Bello, O. S. (2005). Polluted soil rehabilitation using genetically engineered mix microbial inoculum. Journal of Food Agriculture and Environment, 3(2): 299-301.

ITOPF. (2011). The International Tanker Owners Pollution Federation. Fate Of Marin Oil Spills, 2: 1-12.

Jacobucci,D.F.C.;Vasconcelos,C.K.;Matsuura,A.B;Falconi,F.A.&Durrant, L.R. (2001) Degradation of Diesel oil by Biosurfactant –producing Bacterial strain .The Association for environmental health and sciences. Food engineering faculty.Compaines state University . Unicamp Compaines-Brazil Advanced Tecnology.pp:1-8.

Jaysree, R. C.; Basu, S.; Singh, P. P.; Ghosal, T.; Patra, P. A.; Keerthi, Y., ... & Rajendran, N. (2011). Isolation of biosurfactant producing bacteria from environmental samples.Pharmacologyonline, 3: 1427-1433.

Jõesaar, M.; Viggor, S.; Heinaru, E.; Naanuri, E.; Mehike, M.; Leito, I. & Heinaru, A. (2017). Strategy of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* C70 for effective degradation of phenol and salicylate. PloS one, 12(3): 173-180.

Johnsen, A. R.; Wick, L. Y. & Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. Environmental pollution,133(1): 71-84.

Joshi, B. & Walia, S. (1996). PCR amplification of catechol 2, 3-dioxygenase gene sequences from naturally occurring hydrocarbon degrading bacteria isolated from petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. FEMS Microbiology Ecology, 19(1): 5-15 .

Jussila , M. M. (2006). Academic dissertation molecular bio-monitoring during rizoremediation of oil contaminated soil Finland, University of Helsinki. Doctor thesis**:** 68.

Jyothi, K. ; Babu, S. K.; Nancy Clara, K. &Kashyap, A. (2012). Identification and Isolation of Hydrocarbon Degrading Bacteria by Molecular Characterization. Bio Axis DNA Research Centre (P) Ltd, Hyderabad, Helix., 2: 105-111.

Karthikeyan, R.; Davis, L. C.; Mankin, K. R.; Erickson, L. E. & Kulakow, P. A. (1999). Biodegradation of jet fuel (JP-8) in the presence of vegetation.

Koch, E. (2011). Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Arthrobacter sp*. UG50 Isolated from Petroleum Refinery Wastes (Doctoral dissertation).

Lee, P. Y.; Costumbrado, J.; Hsu, C. Y. & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. Journal of visualized experiments: JoVE, (62): 1- 6.

Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological reviews, 54(3), 305-315.

Lima, T.M. ; Fonseca, A.F. ; Leão, B.A. ; Mounteer, A.H. ; Tótola, M.R. &Borges, A.C. (2011) Oil recovery from fuel oil storage tank sludge using biosurfactants, J.Bioremed Biodegrad , 2 (4) : 1-5.

Liu, T. ; Hou, J. ; Zuo, Y. ; Bi, S. and Jing , J. (2011). Isolation and characterization of a biosurfactant producing bacterium from Daqing oil-contaminated sites. Afr. J. Microbiol. Res. 5(21):3509-3514.

Ma, Y.; Wang, L. & Shao, Z. (2006). *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon- degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. Environmental Microbiology, 8(3): 455-465.

MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Williams and Wilkins. Baltimore. USA

Magesh, H.; Kamatchi, C.; Vaidyanathan, R. & Sumathi, G. (2011). Identification of plasmid-mediated quinolone resistance genes qnrA1, qnrB1 and aac (6')-1b-cr in a multiple drug-resistant isolate of *Klebsiella pneumoniae* from Chennai. Indian journal of medical microbiology, 29(3): 262.

Malkawi, H. I.; Fatmi, L. M. & Al-deeb, T. M. (2009). Mutational analysis of oil degrading genes in bacterial isolates from oil contaminated soil at the Jordanian oil refinery. World Applied Sciences Journal, 6(2): 208-220.

Mao, X.; Jiang, R.; Xiao, W. & Yu, J. (2015). Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: a review. Journal of hazardous materials, 285: 419-435.

Margesin, R. & Schinner, F. (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. Applied microbiology and biotechnology, 56(5): 650-663.

Márquez-Rocha, F. J.; Hernández-Rodrí, V. & Lamela, M. T. (2001). Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. Water, Air, and Soil Pollution, 128(3-4): 313-320.

Mathiyazhagan, N. (2011). Amplification of biosurfactant producing gene (rhlB) from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from oil contaminated soil. Int. J. Pharma Bio. Sci., 2(1):497-504.

Mazaheri Assadi, M. & Tabatabaee, M. S. (2010). Biosurfactants and their use in upgrading petroleum vacuum distillation residue: a review. International Journal of Environmental Research, 4(4): 549-572.

Minai-Tehrani, D.; Minoui, S. & Herfatmanesh, A. (2009). Effect of salinity on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) of heavy crude oil in soil. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 82(2): 179-184.

Mohan ,S.R.V. ; Devi, M.P. ; Reddy, M.V. ; Chandrasekhar ,K. ; Juwarkar ,A. &Sarma,P.N.(2011). Bioremediation of petroleum sludge un-der anaerobic microenvironment: influence of biostimulation and bioaugmentation. Environmental Engineering and Management Journal , 10(11*):* 1609-1616.

Motamedi, H.; Afifi, A. ; Leilavi , H. ; Alizadeh ,B. &Bahnamiry, M.A.(2011). Optimization of growth condition for hydrocarbon degrading bacteria isolated from oily sludge in order to achieve the most efficient conditions in environmental bioremediation. International Conference on Environmental, Biomedical and Biotechnology ,16: 94- 97.

Nguyen, T. T.; Youssef, N. H.; McInerney, M. J. & Sabatini, D. A. (2008). Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. Water research, 42(6-7): 1735-1743.

Nievas, M. L.; Commendatore, M. G.; Esteves, J. L. & Bucalá, V. (2008). Biodegradation pattern of hydrocarbons from a fuel oil-type complex residue by an emulsifier-producing microbial consortium. Journal of hazardous materials, 154(1-3): 96-104.

Nikhil, T.; Deepa, V.; Rohan, G. & Satish, B. (2013). Isolation, characterization and identification of diesel engine oil degrading bacteria from garage soil and comparison of their bioremediation potential. International Research Journal of Environment Sciences, 2(2): 48-52.

Nilesh , K. P. & Hardik , P. (2013). Isolation and screening of hydrocarb on degrading bacteria from soil near Kadi (Gujarat) region. International Journal of Research in BioSciences, 2(4) : 10-16.

Nitschke, M., & Pastore, G. M. (2006). Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. Bioresource technology, 97(2): 336-341.

Nweke,C.O & Okpokwasili,G.C.(2003).Dirlling fluid base oil biodegradation potential of a soil *Staphylococcus* species. African J. Biotecnology 2(9):293-295.

Obayori, O. S. & Salam, L. B. (2010). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: role of plasmids. Scientific Research and Essays, 5(25): 4093-4106.

Ogidi, O. I. & Njoku, O. C. (2017). A Review on the Possibilities of the Application of Bioremediation Methods in the Oil Spill Clean-Up of Ogoni Land. International Journal of Biological Sciences and Technology, *9*(6): 48.

Okolo, J. C. (2005). Odu,"Effects of soil treatments containing poultry manure on crude oil degradation in a sandy loam soil. In Applied ecology and environmental research.

Olukunle, O. F.; Babajide, O. & Boboye, B. (2015). Effects of Temperature and pH on the Activities of Catechol 2, 3-dioxygenase Obtained from Crude Oil Contaminated Soil in Ilaje, Ondo State, Nigeria. The open microbiology journal, 9: 84.

Onur, G. Ö. Z. D. E. (2015). Screening of biosurfactant producing and diesel oil degrading bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated surface waters (Doctoral dissertation, Dissertation, Middle East Technical University).

Prakash, B. & Irfan, M. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* is present in crude oil contaminated sites of Barmer region (India). J. Bioremed. Biodegrad, 2(5).

Ramankutty ,G. & Nedunchezhiyan ,J. (2015) Bioremediation of Soil Contaminated with Petroleum Products Using Associated Microbes. Journal of Applied Environmental and Biological Sciences., 5(1):56-62.

Ramos, J. L.; Díaz, E.; Dowling, D.; de Lorenzo, V.; Molin, S.; O'Gara, F., ... & Timmis, K. N. (1994). The behavior of bacteria designed for biodegradation. Nature Biotechnology, 12(12): 1349-1356.

Ranjbar, R.; Karami, A.; Farshad, S.; Giammanco, G. & Mammina, C. (2014). Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. New Microbiologica, 37(1): 1-15.

Rashedi, H.; Jamshidi, E.; Assadi, M. M. & Bonakdarpour, B. (2005). Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. International Journal of Environmental Science and Technology:(IJEST), 2(2): 121.

Reddy, K.R. (2010). Microbiology &Parasitology .4th ed. Paras Medical Puplisher. New Delhi.

Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria . Environmental microbiology, 11(10): 2477-2490.

Rokade, K. B. & Mali, G. V. (2013). Biodegradation of chlorpyrifos by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. International Journal of Pharma and Bio Sciences,4(2): 609-616.

Ron, E. Z. & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. Current opinion in biotechnology 13: 249-252.

Roy, A. S.; Baruah, R.; Borah, M.; Singh, A. K.; Boruah, H. P. D.; Saikia, N., ... & Bora, T. C. (2014). Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. International Biodeterioration & Biodegradation, 94:79-89.

Saadoun,I.(2003).Recovery of Pseudomonas spp. from chronically fule oil-polluted soil in Jordan and study their capability to degrade stort chain alkanes.Academic publishers word ,Journalof microbiology and Boitecnology ,19:1-4.

Said M. (2004). Novel technology for sustainable petroleum oily sludge management : Bio- Neutralization by Indigenous Fungal bacterial cultures . M.Sc. thesis, college of Civil Engineering , University of Concordia,pp: 103.

Samanta, A.; Pal, P.; Mandal, A.; Sinha, C.; Lalee, A.; Das, M., ... & Mitra, D. (2012). Estimation of biosurfactant activity of an alkaline protease producing bacteria isolated from municipal solid waste. Central European Journal of Experimental Biology , 1: 26-35.

Sambrook, J. & Russel, D.(2001). Detection of DNA on agarose gel.In:Sambrook J, Russel DW (eds) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York,pp: 514‑518.

Sarah , L. & Laroe,M. (2010). "Isolated and characterized of a novel polycyclic aromatic hydrocarbons -degrading bacteria ,*sphingopyxis sp*. strain M2R2 capable of passive spreading motility through soil." Environmental engineering science 27(6): 505-512.

Schwab,P.& Banks,K.(2000). Cleaning up petroleum spills with plants. Provided by purdue University News service.pp:1-3.

Semple, K. T.; Morriss, A. W. J. & Paton, G. I. (2003). Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. European journal of soil science, 54(4):809-818.

Sepahi. A. A; Golpasha. I. D. ; Emami, M. & Nakhoda. A. M. (2008). Isolation and characterization of crude oil degrading *Bacillus spp*. Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng., 5(3):149-154.

Setia, A.; Bhandari, S. K.; House, J. D.; Nyachoti, M. C. & Krause, D.O. (2009). Development and in vitro evaluation of an E.coli probioticabl to inhibit the growth of pathogenic K88 *Escherichia.coli* . J. Anim. Sci. 5 (4) : 1-24.

Shahaby, A. F.; Alharthi, A. A. & El-Tarras, A. E. (2015). Bioremediation of Petroleum Oil by Potential Biosurfactant-Producing Bacteria using Gravimetric Assay. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 4(5): 390-403.

Sharma, S. & Pathak, H. (2014). *Pseudomonas* in biodegradation. Int. J. Pure Appl. Biosci, 2(2): 213-222.

Shekhar, S. K.; Godheja, J. & Modi, D. R. (2015). Hydrocarbon bioremediation efficiency by five indigenous bacterial strains isolated from contaminated soils. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4(3): 892-905.

Singh, A. &Ward, O. P. (2004). Biodegradation and Bioremediation. Springer-Verlag,New York, 4: 209.

Smits, T. H.; Witholt, B. & Van Beilen, J. B. (2003). Functional characterization of genes involved in alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa*. Antonie Van Leeuwenhoek, 84(3): 193-200.

Stringfellow , W. T. (2001). "Biological upgrading of heavy oil for viscosity reduction." Applied and Environmental Microbiology 64(7): 2687-2699.

Stukus, P.E. (1997). Investigative Microbiology A laboratory Manual for General Microbiology. P-439-442.Harcourt Brace &Company.

Sutton, N. B.; Maphosa, F.; Morillo, J. A.; Al-Soud, W. A.; Langenhoff, A. A.; Grotenhuis, T.; Rijnaarts, H. H. & Smidt, H. (2013). Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. Applied and Environmental Microbiology 79: 619-630.

Tavakoli, A. & Hamzah, A. (2017). Characterization and evaluation of catechol oxygenases by twelve bacteria, isolated from oil contaminated soils in Malaysia. Biological Journal of Microorganism, 5(20): 71-80.

Thapa, B.; Kc, A. K. & Ghimire, A. (2012). A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. Kathmandu university journal of science, engineering and technology, 8(1): 164-170.

Thomas, L. (2007). Genetic methods for rapid detection of medically important nosocomial bacteria. Faculty of Medicine, Department of Medicine, The University of Sydney, Australia.

Titok, M. A. & Al-Shammri, F. J. H. (2011). Efficiency of Naphalene degradation by *Pseudomonas* bearing Nah-Plasmids in model soll system . AL-Qadisiya. J. of Vet. Med. Sci., 10(1) :121-130.

Turton, J. F.; Baklan, H.; Siu, L. K.; Kaufmann, M. E. & Pitt, T. L. (2008). Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella sp.* and comparison of isolates within these serotypes. FEMS microbiology letters, 284(2): 247-252.

Ubani ,O.; Atagana , H.I. &Thantsha ,M.S. (2013) . Biological degrada-tion. of oil sludge : A review of the current state of development. African Journal of Biotechnology , 12(47): 6544-6567.

Ubani, O. (2012) . Compost bioremediation of oil sludge by using different manures under laboratory conditions . M.Sc. thesis , College of Environmental Sciences, University of South Africa , pp:132.

Ulrich, A. & Becker, R. (2006). Soil parent material is a key determinant of the bacterial community structure in arable soils. FEMS Microbiology Ecology, 56(3): 430-443.

Ulukanli,Z. & Digrak ,M.(2002) Alkaliphilic microorganisms and habitats .Tubitak-Turk.J.Biol.26:181-191.Turkey.

Van Hamme, J. D.; Singh, A. & Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. Microbiology and molecular biology reviews, 67(4): 503-549.

Vandepitte, J.; Verhaegen, J.; Engbaek, K.; Rohner, P.; Piot, P.; Heuck, C. C., & Heuck, C. C. (2003). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization.

Varjani, S. J. & Upasani, V. N. (2017). Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. Bioresource technology, 232: 389-397.

Vasudevan, N.; Bharathi, S. & Arulazhagan, P. (2007). Role of plasmid in the degradation of petroleum hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens* NS1. Journal of Environmental Science and Health Part A, 42(8): 1141-1146.

Venosa, A. D. & Zhu, X. (2003). Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *S*pill Science & Technology Bulletin, 8(2): 163-178.

Vidali, M. (2001). Bioremediation. An Overview. Pure. Appl. Chem., , Academic Press, London. 73(1):1163-1172.

Wang, Z.; Fingas, M.; Owens, E. H.; Sigouin, L. & Brown, C. E. (2001). Long-term fate and persistence of the spilled Metula oil in a marine salt marsh environment: Degradation of petroleum biomarkers. Journal of Chromatography A, 926(2): 275-290.

Wiliams, P. A. & Sayers, J. R. (1994). The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas.* Biodegradation, *5*(3-4): 195-217.

Wilson, S. C. & Jones, K. C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Environmental pollution, 81(3): 229-249.

Wolicka, D.; Suszek, A.; Borkowski, A. & Bielecka, A. (2009). Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. Bioresource Technology, 100(13), 3221-3227.

Xiuhua, Z. (2002). The Classification of Hydrocarbons with Discriminant Analysis and the Family Component Analysis of Gasoline. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 30(1): 18-25.

Yakimov, M. M.; Gentile, G.; Bruni, V.; Cappello, S.; D'auria, G.; Golyshin, P. N. & Giuliano, L. (2004). Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria. FEMS Microbiology Ecology, 49(3): 419-432.

Yelebe, Z. R.; Samuel, R. J. & Yelebe, B. Z. (2015). Kinetic Model Development for Bioremediation of Petroleum Contaminated Soil Using Palm Bunch and Wood Ash. International Journal of Engineering Science Invention, 4(5): 40-47.

Yerushalmi, L.; Rocheleau, S.; Cimpoia, R.; Sarrazin, M.; Sunahara, G.; Peisajovich, A., ... & Guiot, S. R. (2003). Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil. Bioremediation Journal, 7(1): 37-51.

Yoshida, N.; Yagi, K.; Sato, D.; Watanabe, N.; Kuroishi, T.; Nishimoto, K., ... & Tani, Y. (2005). Bacterial communities in petroleum oil in stockpiles. Journal of bioscience and bioengineering, 99(2): 143-149.

Zang,G.; Yue-ting, W. U.; Xin-ping, Q. & Qin, M. (2005). Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. Journal of Zhejiang University-Science B, 6(8): 725-730.

Zeyaullah, M.; Abdelkafe, A. S.; Zabya, W. B. & Ali, A. (2009). Biodegradation of catechols by micro-organisms-A short review. African Journal of Biotechnology, 8(13):2916-2922.

Zhang, Y. & Miller, R. M. (1995). Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes. Applied and environmental microbiology, 61(6): 2247-2251.

Zhang, Z.; Gai, L.; Hou, Z.; Yang, C.; Ma, C.; Wang, Z., ... & Xu, P. (2010). Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. Bioresource technology, 101(21), 8452-8456.

Zhu, M.; Wang, H.; Su, H.; You, X. & Jin, W. (2009). Study on oxidation effect of ozone on petroleum-based pollutants in water. Modern Applied Science, *4*(1): 6.

Zhuang, X.; Chen, J.; Shim, H. & Bai, Z. (2007). New advances in plant growth-promoting *rhizobacteria* for bioremediation. Environment international, 33(3): 406-413.

الملاحق

Appendices

ملحق (1) جدول نتائج الاختبارات التشخيصية للعزلات البكتيرية *P.fluorescens* (A) ، (B)*E.coli* ، (C)*S.aureus* بأستعمال نظام API 20.

الاختبار	المادة الاساس	الانزيمات	النتيجة
ONPG	2-Nitrophenyl–B-D galactopyranoside	B-galactoside orthonitrophenyl – B-D-galactopyranosidase	–
ADH	Arginine	Arginine dehydrolase	+
LDC	Lysine	Lysine decarboxylase	+
ODC	Ornithine	Ornithine decarboxylase	+
CIT	Trisodium thiosulfate	Citrate utilization	+
H2S	Sodium thiosulfate	H2S production	–
URE	Urea	Urease	–
TDH	Tryptophane	Tryptophane deaminase	–
IND	Tryptophane	Indol production	–
VP	Sodium pyruvate	Aceton production	–
GEL	Gelatin	Gelatinase	+
GLU	Glucose	Fermintation / Oxidation	+
MAN	Manitol	Fermintation / Oxidation	+
INO	Insitol	Fermintation / Oxidation	+
SOR	Sorbitol	Fermintation / Oxidation	–
RHA	Rhamnose	Fermintation / Oxidation	–
SAC	Sucrose	Fermintation / Oxidation	+
MEL	Melibios	Fermintation / Oxidation	–
AMY	Amygdali	Fermintation / Oxidation	–
ARA	Arabinose	Fermintation / Oxidation	+

(A)

النتيجة	الانزيمات	المادة الاساس	الاختبار
+	Beta –galactosidase	Ortho-nitrophenyl - Galactoside	ONPG
+	Arginine dehydrolase	Arginine	ADH
+	Lysine decarboxylase	Lysine	LDC
_	Orninthine decarboxylase	Ornithine	ODC
_	Citrate Utilization	Sodium Citrate	CIT
_	H2S production	Sodium thiosulphate	H2S
_	Urease	Urea	URE
_	Tryptophane deaminase	Tryptophane	TDA
+	Indol production	Tryptophane	IND
_	Aceton production	Sodium pyruvate	VP
_	Gelatinase	Gelatin	GEL
+	Fermentation	Glucose	GIU
+	Fermentation	Mannitol	MAN
_	Fermentation	Inositol	INO
+	Fermentation	Sorbitol	SOR
+	Fermentation	Rhamnose	RHA
_	Fermentation	Sucrose	SAC
+	Fermentation	Melibiose	MEL
_	Fermentation	Amygdalin	AMY
+	Fermentation	Arabinose	ARA

(B)

النتيجة	المادة الاساس	الاختبار
+	Glucose	GLU
+	Fructose	FRU
+	Mannose	MNE
+	Maltose	MAL
+	Lactose	LAC
+	Trehalose	TRE
+	Mannitol	MAN
–	Xylitol	XLT
–	Melibiose	MEL
+	Potassium nitrate	NIT
+	β-naphthyl phosphate	PAL
+	Sodium pyruvate	VP
–	Raffinose	RAF
–	Xylose	XYL
+	Saccharose (sucrose)	SAC
–	Methyl-αD-glucopyranoside	MDG
+	Acetyl – glucosamine	NAG
+	Arginine	ADH
–	Urea	URE

(C)

ملحق (2) أستمارة تسجيل العزلات البكتيرية , *S.aureus ,E.coli* *P.fluorescens* في بنك الجينات .

LOCUS Seq1 550 bp DNA linear BCT 02-JUN-2018

DEFINITION Escherichia coli IQ-Earth isolate, catechol 2,3 dioxygenase gene, partial sequence.

ACCESSION Seq1

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Escherichia coli

ORGANISM Escherichia coli

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Enterobacteriaceae; Escherichia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 550)

AUTHORS Jassiem,B.H. and AlNashe,A.A.

TITLE Reduction of chemical contamination in different environments by biological treatment with hydrolysis bacteria for hydrocarbons compounds

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 550)

AUTHORS Jassiem,B.H. and AlNashe,A.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (02-JUN-2018) Department of Microbiology, College of Education, University of Al-Qadisiyah, Al-Jameaa, Diwanyia, Al-Qadisiyah 00964, Iraq

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:hassan_iq84@yahoo.com.

Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:3.

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..550

/organism="Escherichia coli"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="Escherichia coli IQ-Earth"

/isolate="Escherichia coli IQ-Earth"

/isolation_source="Soil"

/host="Environmental"

/db_xref="taxon:562"

/country="Iraq"

/note="[cultured bacterial source]"

BASE COUNT 88 a 154 c 176 g 132 t

ORIGIN

1 tcgatgaggt caatggcgtg attgccagcg cccgcgagcg tattgcggca ttctcccctg

61 aactggtggt gctgtttgcg ccagatcact acaacggctt tttctatgac gtgatgccac

121 cgttctgttt aggcgttgga gcgacggcaa ttggtgattt cggcagtgcg gcaggagagc

181 tgcccgtgcc tgtggagctg gcggaggcct gtgcgcatgc cgtcatgaag agcgggatcg

241 atcttgccgt ttcttactgt atgcaggtgg accacgggtt cgcccagccg ctggagttcc

301 tgctcggtgg gctggataag gtgccagttc tgcctgtgtt catcaacggt gtcgccacgc

361 cgctgcccgg tttccagcgt acccgcatgt tgggtgaagc cattggacgt ttcaccagca

421 ctctcaataa acgcgtgctg ttcctgggtt ccggtgggct ttcccatcag ccgccggtgc

481 ccgaactggc gaaagccgat gcccatatgc gcgaccgtct gttggggagc gggaaagatt

541 tacccgccac

//

LOCUS Seq2 552 bp DNA linear BCT 02-JUN-2018

DEFINITION Staphylococcus aureus IQ-Earth isolate, catechol 2,3 dioxygenase gene, partial sequence.

ACCESSION Seq2

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Staphylococcus aureus

ORGANISM Staphylococcus aureus

Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae; Staphylococcus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 552)

AUTHORS Jassiem,B.H. and AlNashe,A.A.

TITLE Reduction of chemical contamination in different environments by biological treatment with hydrolysis bacteria for hydrocarbons compounds

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 552)

AUTHORS Jassiem,B.H. and AlNashe,A.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (02-JUN-2018) Department of Microbiology, College of Education, University of Al-Qadisiyah, Al-Jameaa, Diwanyia,

Al-Qadisiyah 00964, Iraq

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:hassan_iq84@yahoo.com.

Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:3.

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..552

/organism="Staphylococcus aureus"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="Staphylococcus aureus IQ-Earth"

/isolate="Staphylococcus aureus IQ-Earth"

/isolation_source="Soil"

/host="Environmental"

/db_xref="taxon:1280"

/country="Iraq"

/note="[cultured bacterial source]"

BASE COUNT 177 a 104 c 107 g 164 t

ORIGIN

1 tgacaacatt ttacaaaaac attttaggac tatccgttaa aagttctgac gataatacaa

61 ccgtattatc tgttgggact ggtggccata ctctaacgtt acatttatta gaagacggcc

121 gtcagacttc cccacgtgaa gcagggcttt ttcatatagc atttttatta ccaactactg

181 aggatctagc taacttctta tatttcgtgg cacaaaaaaa tatgggcatc ggcgctggtg

241 atcatttagt aagtgaagct ttatatttca acgaccccga aggtaatggt attgaagtct

301 atcgcgatag accttcatct tcatgggaat ggcaaaatgg caaagttaaa atggatactt

361 tagaagttga tagccaaacc ttattaacac atcgtactga tgaaggttgg caaggaatgc

421 cagcaaaagg catgattgga cacttacatt taaaaacaca tgatttagac gcagcatatc

481 aatgttacat tgaacaatta ggattccaac atgtgtctga ttttccacgt gcgctattta

541 tgtcaacgaa tc

//

LOCUS Seq3 553 bp DNA linear BCT 02-JUN-2018

DEFINITION Pseudomonas Sp. IQ-Earth isolate, catechol 2,3 dioxygenase gene, partial sequence.

ACCESSION Seq3

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Pseudomonas sp.

ORGANISM Pseudomonas sp.

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas.

REFERENCE 1 (bases 1 to 553)

AUTHORS Jassiem,B.H. and AlNashe,A.A.

TITLE Reduction of chemical contamination in different environments by biological treatment with hydrolysis bacteria for hydrocarbons compounds

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 553)

AUTHORS Jassiem,B.H. and AlNashe,A.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (02-JUN-2018) Department of Microbiology, College of Education, University of Al-Qadisiyah, Al-Jameaa, Diwanyia, Al-Qadisiyah 00964, Iraq

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:hassan_iq84@yahoo.com.
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:3.

##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..553
/organism="Pseudomonas sp."
/mol_type="genomic DNA"
/strain="Pseudomonas Sp. IQ-Earth"
/isolate="Pseudomonas Sp. IQ-Earth"
/isolation_source="Soil"
/host="Environmental"
/db_xref="taxon:306"
/country="Iraq"
/note="[cultured bacterial source]"

BASE COUNT 106 a 171 c 182 g 94 t

ORIGIN

1 cgaacgattc atgaccgtgc tgacctgatg gttcggttcg acttattgca gagattgcgc
61 agatgaaaga gatcaagcat ttcattaacg gtgccttcgt cgattcggcc agcggccgca
121 ccttcgagga catcaacccg gtcaatggcc aggtgatcgg ccgcgtgcac gaggccggcc

181 gcgccgaggt cgacgccgcg gtcagggcgg cacgcgctgc gctgaaggga ccatgggggа

241 agatgacggt ggccgagcgc gctgagattc tgcatcgcgt ggccgatggc gtcacggcgc

301 gcttcgatga gtttctcgag gccgaatgcc tggacaccgg caagcccaaa tccctggcca

361 gccacatcga cattccgcgc ggcgcggcca atttcaaggt gttcgccgac ctgatcaaga

421 acgtgccgac cgaagccttc gagatggcca ccccggacgg cgccggtgca ctcaactacg

481 gcgtgcgccg gcccaagggg gtgatcggcg tgatcagccc gtggaacctg ccgctgctgc

541 tcatgacctg gaa

//

Summary

The study included the collection of 200 samples from various environmental sources, including the generators' soil, the oil change shop, the Al Diwaniyah rubber plant and the water of the drainage in the Al Diwaniyah governorate for the period from 2017-11-1 to 2018-4.1. The study aimed at identifying the dominance of bacterial species in contaminated soils and water for hydrocarbon compounds, studying their ability to decompose these compounds and conducting molecular studies of these species. Sixty bacterial isolates were identified in soils and water rich in hydrocarbon compounds.. *Escherichia coli* was the most common species with an isolation rate of 38.33% and the highest isolation rate was found in the drainage water followed by *Pseudomonas fluorescens* with a 25% isolation rate. The highest rate isolates were recorded in the generators' soil , As for *Staphylococcus aureus* came third place in the rate 16.6%, followed by some bacterial species characterized by low levels of hydrocarbons, namely *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Proteus mirabilis*, these percentages were 8.33%, 5%, 5% and 1.6%, respectively.

The ability of bacterial isolates to analyze and consume hydrocarbons was studied,the result showed the isolates of *P.fluorescens* exceeded other bacteria in their ability to decompose Hydrocarbons were highly efficient in emulsifying crude oil and its use as a source of carbon and energy, followed by *E.coli* and *S.aureus*, respectively.

As an indicator of the effectiveness of the growth of isolates on hydrocarbon sources, both electrical conductivity and optical density were measured, a

gradual increase in the values of electrical conductivity and all bacterial isolates was observed during the incubation period and the highest electrical conductivity values for all isolates during the third week of incubation period were recorded with *P.fluorescens* isolated from the soil of the generators was the highest electrical connection value at 12.7 mc / cm in the third week of the incubation, but this value decreased in the sixth week to reach 8.6 mc / cm followed by the second rank *E.coli* 11.7mc / cm and then *S.aureus* 10.6mc / cm .thereafter the rest isolates were rolled *Acinetobacte baumanii* 9.3mc/cm , *Bacillus cereus* 9.3mc/cm, *Klebsiella pneumoniae* 9mc / cm, and *Proteus mirabilis* 8.8mc/cm. All isolates showed different optical densities. The highest optical density values and all isolates in the fourth week of the incubation period were *P.fluorescens* isolated from the soil of generators highest light density of 0.322 in the fourth week of incubation and took this value down to 0.319 in the sixth week and came *E.coli* at the second place 0.309 third place followed by bacteria *S.aureus* 0.301 followed by the rest of the isolates *Bacillus cereus* 0.212, *Klebsiella pneumoniae* 0.209, *Acinetobacte baumannii* 0.208, *Proteus mirabilis* 0.206.

The $C_{23}O$ gene has been molecularly investigated that was coded for the production of Catechol 2,3 dioxygenase Analyst for hydrocarbon compounds by using polymerase chain reaction. The gene was found to be 8 isolates of *P.fluorescens* in the rate 53.33% . *E. coli* was found in 6 isolates with 26.08% while the gene was present in only one isolated of *S.aureus* and rate of 10%.

The sequencing results of $C_{23}O$ in the isolates of *P.fluorescens*, *E.coli* and *S.aureus* showed sequencing technique using 553bp of the $C_{23}O$ result of PCR interaction, both *P.fluorescens* and *E.coli* were identical with a standard

isolation gene with serial number (KF010862.1) for *P.fluorescens* and (CP019778.1) for *E.coli* in the rate 100% each, whereas *S.aureus* was 99% in comparison with the serial isolation gene (CP023500.1). Thus, this study proved that there are bacterial species with the ability to decompose hydrochloric compounds such as *P.fluorescens, E.coli, S.aureus*

Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and Scientific Research

AL-Qadisiyah University / College of Education

Department of Biology

Bacteriological and Molecular Characterization of Hydrocharbones Lysis Bacterial Species in Soils of Al-Qadisiya Governorate

Athesis

Submitted to the Council of College of Education / University of AL-Qadisiyah in Partial Fulfillment of the Requirements for Degree of Master in Biology / Microbiology

By

Baidaa Hussain Jassim

(B. Sc. Biol./College of Education/AL–Qadisiya University/2016)

Supervised by

Assist.Prof. Ali Abed Al-Rheem AL-Nashi

1440 A.H **2018 A.C**