------مجلة علوم الرافدين، المجلد 23، العدد 4، ص95-111، 2012------

قابلية انواع بكتريا Micrococcus المعزولة من التربة على تحليل مركب الديزل

إيمان محمد طاهر عزيز **أديبة يونس شريف**

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 18/ 3 /2012 ؛ تاريخ القبول 30 /4 / 2012)

الملخص

تضمنت الدراسة الحالية التحري عن قابلية انواع بكتريا الـ Micrococcus على تحليل مركب الديزل إذ أظهرت نتائج الدراسة زيادة في معدلات نمو معظم عزلات *M.roseus* و*M.luteus* و*M.varians* إذ كان معدل أعدادها عند بداية التجربة 31×10^9 و30.4×10^9 للنـوعين *M.roseus* و *M.luteus* علـى التـوالي ووصلت إلى 36×10^8 و28.5×10^7 لهذين النوعين من البكتريا على التوالي اتفق ذلـك مـع الزيـادة فـي الامتصاصية الضوئية المتناسقة مع العدد البكتيري في حين لم تتمكن احدى عزلات *M.luteus* من النمو في الوسط الحاوي على الديزل.

كما تم اعتماد تقنيتي Gas-Chromatography GC و Infra-IR للتحري عن قابلية التحلـل إذ لـوحظ اختفاء أعداد كبيرة من الحزم العائدة للديزل المعامل بالعزلات الجرثومية. ولوحظ كذلك اختفـاء عـدد مـن الأواصر عند استخدام تقنية IR إذ ظهرت اواصر الحامض الكاربوكسيلي والأمايد والإسـتر فـي العينـات المعاملة بالعزلات الجرثومية المحللة.

الكلمات الدالة: بكتريا التربة، الديزل، مايكروكوكس، المصدر الكاربوني.

Ability of Micrococcus Isolated from Soil in Biodegradation Diesel

Eman M. T. Azeez **Adeeba Y. Shareef**

Department of Biology
College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

The study include investigation types of Micrococcus for degradation diesel. The results showed an increase in the growth rates for most strain of *M. roesus*, *M. luteus* and *M. varians* as the mean count were 31×10^9 and 30.4×10^9 for *M. roseus* and *M. luteus* respectively, at the beginning and reached 36×10^8 and 28.5×10^7 for mentioned species respectively at the end, An increase in photoabsorption was recorded during the experimental period which were corresponding with increased viable counts of bacteria belonging to the genera of *Micrococcus* whereas one strain of *M. luteus* didn't grow in the media containing Diesel.

Gas chromatography (GC) and Infrared-IR techniques was used for dictation hydrolysis of Diesel as indicators as disappearance of number of bands on diesel treated with the bacterial isolates used in the study, and the disappearance of number of bonds was observed using IR technique, the carboxylic acid, amid and ester bonds appeared in bacterial treated sample.

Keywords: Soil bacteria, Micrococcus, Diesel, hydrocarbonic source.

المقدمة

يختلف محتوى التربة من المجاميع البكتيرية إذ تحتوي على الأجناس المؤكسدة للكبريت والمثبتة للنتروجين والبكتريا المرضية والبكتريا المنتجة للمركبات المضادة للمايكروبات (Nester *et al*., 2001) وتتأثر الأحياء المجهرية للتربة بعوامل عدة منها درجات الحرارة والرطوبة ووجود المغذيات والأس الهيدروجيني للتربة وأن درجة التهوية تحدد الأحياء المجهرية فيها (Prescott *et al*., 2005).

وأن أغلب الأجناس البكتيرية في التربة تكون متغايرة التغذية الكيميائية إذ تستعمل الأجزاء النباتية والحيوانية الميتة مصدراً للطاقة والكاربون (Alexander, 1997). للبكتريا في التربة دور مهم في تحليل المركبات الهيدروكاربونية إذ إنها تستخدمها مصدراً للطاقة والكاربون وأن هناك أجناساً بكتيرية عديدة تم عزلها من المناطق الملوثة بالنفط الخام ومشتقاته وتم دراسة قابليتها لتحليل المركبات الهيدروكاربونية وهذه الأجناس تعد من أنواع البكتريا الصديقة للبيئة (Ojo, 2006) وأن اكتشاف النفط الخام وعمليات تكريره وزيادة شبكة الأنابيب الناقلة والحوادث التي تتعرض لها أدت إلى زيادة التلوث في اليابسة والماء (Al-Sayigh, 1978; Al-Dobouni, 1977) ولذلك استخدمت تقنيات عديدة للسيطرة على هذه الملوثات

ومنها التقنيات الكيميائية والفيزيائية والبايولوجية ومن أنجحها التقنيات البايولوجية التي يطلق عليها عملية التحليل الحيوي (Bioremediation) والتي تعرف على أنها استهلاك المواد الهيدروكاربونية كمصدر للطاقة والكاربون ومعدنتها إلى نواتج غير مؤذية للبيئة (Rivera-cruz *et al*., 2004) وتحدث هذه العملية بواسطة كائنات مجهرية متخصصة منها البكتريا وقد اوضحت دراسة Santhina وجماعته عام (2009) دور بكتريا Micrococcus في تحليل النفط الخام والديزل والنفط الأبيض وتم الاستدلال على قدرتها في تحليل هذه المركبات من خلال زيادة إنتاج غاز ثنائي أوكسيد الكاربون.

أن الأحياء المجهرية المحللة للمركبات الهيدروكاربونية تشكل أقل من 1% من المجتمع المايكروبي للتربة وتزداد هذه الأعداد عند التلوث إذ تصل إلى 10% من المجموع الكلي (Atlas, 2000). وأن عملية التحال الحيوي تعتمد على عوامل عديدة منها تركيب وتركيز النفط الخام ومشتقاته (Koren *et al*., 2003). ويعد الديزل أول وأكثر الملوثات للبيئة ويشكل أهم الأخطار على حياة الأنسان والأحياء الأخرى (Kramer and Van, 1990 ؛ Refaat *et al*., 2008). وتلعب أفراد النوع Micrococcus ولا سيما النوع *M.luteus* دوراً مهماً في تحليل النفط الخام والديزل والكيروسين (Okerentugba *et al*., 2003 ؛ Ojo, 2006).

وتهدف الدراسة إلى تحديد قابلية بعض الانواع العائدة لجنس Micrococcus المعزولة من التربة المحلية لتحليل مركب الديزل.

المواد وطرائق العمل

العزلات البكتيرية

استخدمت انواع من بكتريا Micrococcus المعزولة من التربة والتي تم الحصول عليها من قسم علوم الحياة وتم تشخيصها باستخدام الفحوصات الشكلية والبايوكيميائية والتي شملت اختبار الاوكسديز والكتاليز وتميع الجلاتين والحركة وتحلل النشا واختبار الاكسدة والتخمر واختزال النترات وتحلل الارجنين والنمو بتراكيز مختلفة من ملح الطعام ونوع تحلل الدم بالاعتماد على (Macfaddin, 1980 ; Collee *et al*., 1996; Koneman, 1997).

اختبار التحري عن قدرة البكتريا على استهلاك الديزل كمصدر للطاقة والكاربون:

اجري الاختبار بالاعتماد على Boboye وجماعته عام (2010) إذ تم استخدام دوارق زجاجية معقمة سعة 250 سم^3 حاوية على وسط Mineral salt medium (Goswam and Singh, 1991) وبواقع 99 سم^3 أضيف له (1) سم^3 من مادة الديزل المعقمة مصدراً للطاقة والكاربون والتي تم الحصول عليها من خزانات مصفى الكسك وجمعت باستخدام قنانٍ زجاجية نظيفة ومعقمة سعة 500 سم^3 لكل دورق. لقحت الدوارق بـ 3 سم^3 من وسط المرق المغذي الحاوي على 10^8 وحدة خلية/ سم^3 من بكتريا الـ Micrococcus وذلك بمقارنتها مع الأنبوب الثالث من أنابيب ماكفارلاند القياسية وحضنت الدوارق من ضمنها دوارق السيطرة

المتمثلة بالوسط غير الملقح في حاضنة هزازة عند سرعة 120 دورة/ دقيقة وبدرجة حرارة 30°م ولمدة 8 أيام، حسبت أعداد البكتريا النامية بعد 2، 4، 6، 8 أيام بطريقة العد بالأطباق كما تم قياس الكثافة الضوئية باستخدام جهاز المطياف الضوئي نوع Aquarius CECil 7200 الماني الصنع، عند الطول الموجي nm (600) وتم مقارنتها بأنبوب السيطرة الحاوي على المصدر الهيدروكاربوني والوسط غير الملقح وعدت زيادة الكثافة الضوئية دليلا على كثافة النمو وسجلت النتائج.

الكشف عن تحلل الديزل باستخدام الطرق الكيميائية المتخصصة والتي تشمل:

تم استخلاص الديزل المتبقي بالطريقة الموصوفة من قبل (Udeme and Antai, 1988) وكما يأتي:

أ- استخلصت كل عينة مرتين بإضافة Diethyle ether وبحجم مماثل لحجم الوسط باستخدام قمع فصل Separating funnel سعة (500) سم^3 إذ تم التخلص من الوسط ثم جمعت المستخلصات.

ب- مررت المستخلصات خلال ورق الترشيح Whatman No.1 الموضوع عليه كبريتات الصوديوم اللامائية Na_2So_4 وبعد اكتمال الترشيح غسل الديزل المتبقي على سطح أوراق الترشيح بقليل من Diethyle ether.

ج- وضعت المستخلصات في فرن Oven وبدرجة حرارة 40°م للتخلص من الـ Diethyle ether.

د- استخلاص الديزل من دوارق السيطرة بالطريقة نفسها.

1- استخدام طيف امتصاص الأشعة تحت الحمراء (Infrared (IR:

تم قياس طيف الأشعة تحت الحمراء للعينات المحللة بفعل انواع بكتريا الـ Micrococcus المستخدمة في هذه الدراسة باستخدام جهاز الأشعة تحت الحمراء نوع Fourier Transform from Infrared Spectrophotometer العلامة TENSOR27 المجهز من شركة Bruker الألمانية واجري القياس في قسم الكيمياء / كلية التربية / جامعة الموصل.

2- استخدام جهاز كروماتوكرافيا الغاز (Gas- Chromatography (G-C:

قيس تحلل الديزل بفعل الأنواع البكتيرية المستخدمة في هذه الدراسة باستخدام جهاز كروماتوكرافيا الغاز Gas-chromatography المجهز من شركة Varian الأمريكية وباستخدام عمود الفصل الكروماتوكرافي نوع Factor four vf-1ms capillary column، وتم القياس في الشركة العربية لكيمياويات المنظفات / بيجي.

النتائج و المناقشة

تم استخدام ثلاثة انواع من بكتريـا الـ Micrococcus والتـي شـملت *M.luteus, M.roseus, M.varians* وتم التمييز بين الانواع الثلاثة حسب ما مذكور في الجدول (1).

الجدول 1: الاختبارات الكيماحيوية المستخدمة في تشخيص أنواع الجنس Micrococcus.

الاختبارات / العزلات	الأوكسيدز	الكتاليز	اختزال النترات	إسالة الجلاتين	الحركة	نوع التحلل على أكار الدم	تحلل النشا	فحص OF	تحلل الأرجنين	النمو بتركيز 5% ملح الطعام NaCl	النمو بتركيز NaCl %7.5	لون المستعمرات
M.luteus	V	+	-	+	-	V	+	O	-	+	+	برتقالي
M.roseus	-	+	+	+	V	V	+	O	-	+	+	احمر
M.varians	-	+	+	V	-	V	+	O	V	+	+	عسلي

+ النتيجة موجبة، - النتيجة سالبة، V متباينة في النتيجة، / لم يجرى الاختبار، تحلل كامل للدم β، غير محللـة للـدم γ ، مخمرة لسكر الكلوكوز F، مؤكسدة لسكر الكلوكوز O، مخمرة ومؤكسدة لسكر الكلوكوز OF

1- التحري عن قابلية البكتريا المدروسة على تحليل الديزل من خلال حساب الاعداد الحيـة والامتـصاصية الضوئية

الجدول (2) يبين الأعداد الحية Viable count والامتصاصية الـضوئية (OD) لعـزلات *M.roseus* النامية على وسط مرق الأملاح المعدنية الحاوي على الديزل بنسبة 1%. إذ يلاحظ من الجدول أن معظـم العزلات أظهرت نمواً جيداً في أوقات التجربة إذ بلغ معدل أعداد البكتيريا 31×10^{9} في بداية التجربة (Zero time) وازداد معدل الأعداد ليصل الى 34×10^{10} و45.5×10^{9} و 49×10^{8} و36×10^{8} للأيام الثاني والرابع والسادس والثامن على التوالي، وأن التغير في الأعداد لم يكن معنوياً عند مستوى $P\leq 0.05$ و$P\leq 0.01$ مـا عدا العزلة التاسعة التي لم تظهر نمواً منذ اليوم الرابع للتجربة وكما موضح فـي الجـدول، أمـا بالنـسبة للامتصاصية الضوئية فقد أظهرت معظم العزلات زيادة في الكثافة الضوئية خلال أوقات التجربة المختلفـة متناسقة مع العدد البكتيري إذ كان معدل الامتصاصية 0.89 عند بداية التجربة مرتفعـاً إلـى 1.24 و1.12 و1.09 و0.95 للأيام الثاني والرابع والسادس والثامن على التوالي مع انخفاض طفيف لليوم الثامن، وأن هذا الانخفاض لم يكن معنويا عند $P\leq 0.05$ و$P\leq 0.01$ ، وأن العزلة التاسعة انخفضت درجة امتصاصها إلـى

0.8 و0.7 و0.6 و0.2 للأيام الثاني والرابع والسادس والثامن على التوالي يعود الانخفاض في الكثافة الضوئية فيها إلى تحلل البكتيريا وموتها عند نموها على الوسط الحاوي على الديزل.

شكلت المشتقات النفطية أكبر الملوثات البيئية والتي أثرت بشكل كبير على البيئة بما تتضمنه من مكونات حية وغير حية (Raven *et al.*,1993)، لذا لجأ أغلب الباحثين في مجال تنظيف البيئة إلى استعمال تقنيات عديدة وكان من أنجحها التقنيات البايولوجية (Barathi and Vasudevan, 2001)، ففي هذه الدراسة يلاحظ قدرة العزلات العائدة لبكتريا *Micrococcus roseus* على النمو على الديزل وذلك من خلال قياس الأعداد الحية والامتصاصية الضوئية لهذه العزلات وباستعمال طريقة التخافيف (Song and Bartha, 1990) تمت التجربة تحت الظروف الهوائية نظراً لاحتياج هذا النوع والعزلات العائدة له إلى الأوكسجين لعملية التحلل الحيوي فإن كل العزلات التي أظهرت نمواً متزايداً من البداية وإلى نهاية التحضين والعزلات التي تذبذبت في النمو خلال أوقات التجربة عند نموها على الديزل فإن ذلك قد يعود إلى تيسر المركبات الهيدروكاربونية الخاضعة للتحلل والتي تعد مواداً مغذية لها أو إلى تأقلمها للنمو وأن ازدياد أعداد البكتيريا يعكس مقدرة البكتيريا واستهلاكها بوصفها مصدراً للطاقة والكاربون (Wright *et al.*,1993 ؛Hazen *et al.*, 2003 ؛ Boboye *et al.*,2010).

أما العزلات البكتيرية التي أظهرت نمواً متزايداً منذ البداية وأظهرت انخفاضاً قليلاً في اليومين السادس والثامن سواء عند نموها على الديزل فإن ذلك قد يعود إلى انخفاض المغذيات المعدنية في وسط النمو وانخفاض مستوى المصدر الهيدروكاربوني نتيجة التحلل الحيوي والذي اتفق أيضاً مع قياس الامتصاصية التي تعد دليلاً للنمو البكتيري ومدى التحلل، وأن أغلب هذه العزلات العائدة لـ *M.roseus* ما عدا العزلة الرابعة عزلت من مناطق غير ملوثة ولكنها أظهرت قابلية لتحليل الديزل وذلك قد يعود إلى أن هذه التربة قد تكون تعرضت للتلوث ولكون العراق بلداً نفطياً فإن من المتوقع ظهور هذه النسبة من البكتيريا المحللة وأظهرت العزلة الرابعة قدرة عالية لتحليل الديزل لكونها عزلت من منطقة ملوثة بالنفط.

أما الجدول (3) فيبين الأعداد الحية Viable count والامتصاصية الضوئية للعزلات العائدة لنوعين *M.luteus* و*M.varians* النامية على وسط مرق الأملاح المعدنية الحاوي على الديزل بنسبة 1% إذ يلاحظ أن العزلات الأولى والثالثة والرابعة لـ *M.luteus* أظهرت نمواً كثيفاً وبمعدل عدد بلغ 30.4×10^{9} في بداية التجربة و 21.8×10^{10} و23×10^{9} و40×10^{9} و28.5×10^{7} للأيام الثاني والرابع والسادس والثامن على التوالي، وأظهرت الامتصاصية الضوئية زيادة في معدلها إذ بلغ 0.93 في بداية التجربة والذي ارتفع إلى 1.41 و1.17 و1.185 و0.83 للأيام الثاني والرابع والسادس والثامن للتجربة على التوالي.

أما سلالتا *M.varians* فقد كان نموها كثيفاً إذ بلغ معدل أعدادها 20.2×10^{9} و11.5×10^{10} و 57.5×10^{10} و 30×10^{10} و32×10^{9} خلال أيام التجربة على التوالي واستمر قياس الامتصاصية الضوئية مرتفعاً إذ كان 0.91 عند بداية التجربة وبلغ 1.28 و1.25 و0.85 للأيام الثاني والرابع والسادس والثامن

للتجربة على التوالي وأن الاختلاف في الأعداد البكتيرية للأوقات المختلفة للتجربة لم يكن معنوياً عند مستوى معنوية $P\leq 0.05$ و $P\leq 0.01$ أما بالنسبة للامتصاصية الضوئية فأظهرت وجود زيادة معنوية عند مستوى معنوية $P\leq 0.05$ و$P\leq 0.01$ إذ تبين من اختبار دنكن وجود زيادة معنوية في الامتصاصية في أيام التجربة عن اليومين الأول والثاني لها.

ليس من النادر تواجد أحياء مجهريه قادرة على استهلاك النفط إذ تشكل مصدراً للطاقة والكاربون للعديد من البكتيريا المستوطنة للتربة (Delille *et al.*,2002 ؛ Molina-Barahona *et al.*, 2004)، وقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما وجده Adebsoye وجماعته عام 2007 و Ilori وجماعته عام 2005 وBicca وجماعته عام 1999 الذين أكدوا أن زيادة الامتصاصية يعد دليلاً للنمو البكتيري وقدرة البكتيريا لاستهلاك هذه المصادر الهيدروكاربونية وذكر هؤلاء الباحثون أن وقود الديزل يعد مصدراً للطاقة لنمو عدد من الأحياء، أما عزلات *M.luteus* التي أظهرت نمواً متزايداً من بداية التجربة مع انخفاض طفيف في اليوم الثامن أو السادس والثامن، فقد كانت متفقة مع دراسة Boboye وجماعته عام 2010 إذ لوحظ أن الزيادة التدريجية للأعداد البكتيرية في الوسط الحاوي على الديزل بوصفه مصدراً مغذياً للبكتيريا، وكذلك ازدياد الامتصاصية الضوئية للوسط دلالة على تحال المصادر الهيدروكاربونية المختلفة، وأن النقصان في الأعداد الحية والامتصاصية يعود إلى النقصان في مستويات الديزل والمغذيات وهو يتفق أيضاً مع دراسة (Ilori and Amund, 2001) أما العزلات العائدة لهذين النوعين النامية على الديزل والتي أظهرت تذبذباً في الأعداد الحية والمتناسقة مع قياس الكثافة الضوئية، فإن ذلك قد يعود إلى صعوبة تحال المركبات النفطية وكذلك فإن النوعين *M.luteus* و *M.varians* تعد من محللات المركبات الهيدروكاربونية المشبعة بسرعة أكبر من تحال المركبات الأروماتية التي يستغرق تحللها وقتاً أطول (Ojo, 2006) وأن عملية التحال الحيوي تعتمد بالأساس على التركيب الكيميائي للملوث وتركيزه ونوع الكائن المجهري المحال.

أما العزلات العائدة للنوعين *M.luteus* و*M.varians* النامية على الديزل التي أظهرت تثبيطاً للنمو البكتيري خلال الأوقات الأولى للتجربة فإن ذلك يعود إلى أن النفط الخام ومشتقاته تحتوي على مركبات سامة (Supaka *et al.*, 2001).

الجدول 2: الأعداد الحية Viable count خلية/مل ودرجة الامتصاصية الـضوئية للعـزلات العائـدة للـ *M.roseus* النامية على الديزل.

ت	اسم البكتريا	زمن الصفر		بعد يومين		بعد 4 أيام		بعد 6 أيام		بعد 8 أيام	
		العدد	الامتصاصية الضوئية	العدد	الامتصاصية الضوئية	العدد	الامتصاصية الضوئية	العدد	الامتصاصية الضوئية	العدد	الامتصاصية الضوئية
1	*M. roseus*	30×10^{11}	0.9	30×10^{12}	1.47	65×10^{10}	1.22	10×10^{9}	1.2	40×10^{8}	1.0
2	*M.roseus*	30×10^{11}	0.68	30×10^{11}	1.48	80×10^{8}	1.42	70×10^{9}	1.5	35×10^{10}	1.9
3	*M.roseus*	30×10^{11}	1.02	30×10^{13}	1.09	65×10^{12}	1.04	85×10^{10}	1.5	30×10^{10}	1.1
4	*M.roseus**	30×10^{11}	0.56	30×10^{11}	1.65	30×10^{11}	1.6	42×10^{8}	1.44	30×10^{8}	0.8
5	*M.roseus*	12×10^{9}	1.12	63×10^{10}	1.3	12×10^{11}	1.36	30×10^{8}	0.9	20.6×10^{7}	0.9
6	*M.roseus*	80×10^{10}	0.84	60×10^{11}	1.5	50×10^{9}	0.98	60×10^{8}	0.85	30×10^{8}	0.6
7	*M.roseus*	28.8×10^{9}	1.0	16×10^{11}	1.44	50×10^{9}	0.9	80×10^{6}	1.1	85×10^{6}	1.2
8	*M.roseus*	18×10^{9}	0.98	30×18^{8}	0.73	30×10^{9}	1.3	70×10^{8}	1.35	40×10^{8}	1.12
9	*M.roseus*	10×10^{6}	0.72	30×10^{8}	0.88	N.G	0.7	N.G	0.6	N.G	0.2
10	*M.roseus*	30×10^{9}	0.84	30×10^{9}	1.3	30×10^{9}	1.24	23.4×10^{9}	1.1	60×10^{4}	1.0
11	*M.roseus*	60×10^{8}	1.08	30×10^{8}	0.9	30×10^{7}	0.85	15×10^{7}	0.8	11.2×10^{8}	0.82
12	*M.roseus*	30×10^{9}	0.74	30×10^{10}	1.15	67×10^{9}	1.0	40×10^{9}	0.9	30×10^{9}	0.8
13	*M.roseus*	18×10^{9}	1.20	30×10^{10}	1.27	38×10^{8}	1.1	62×10^{7}	1.01	29.2×10^{7}	1.0
	المعدل	31×10^{9}	0.89	34×10^{10}	1.24	45.5×10^{9}	1.12	49×10^{8}	1.09	36×10^{8}	0.95

* معزولة من منطقة ملوثة N.G = لا يوجد نمو

الجدول 3: الأعداد الحية Viable count خلية/مل ودرجة الامتصاصية الضوئية للعزلات العائـدة لنـوعي *M.luteus* و*M.varians* النامية على الديزل.

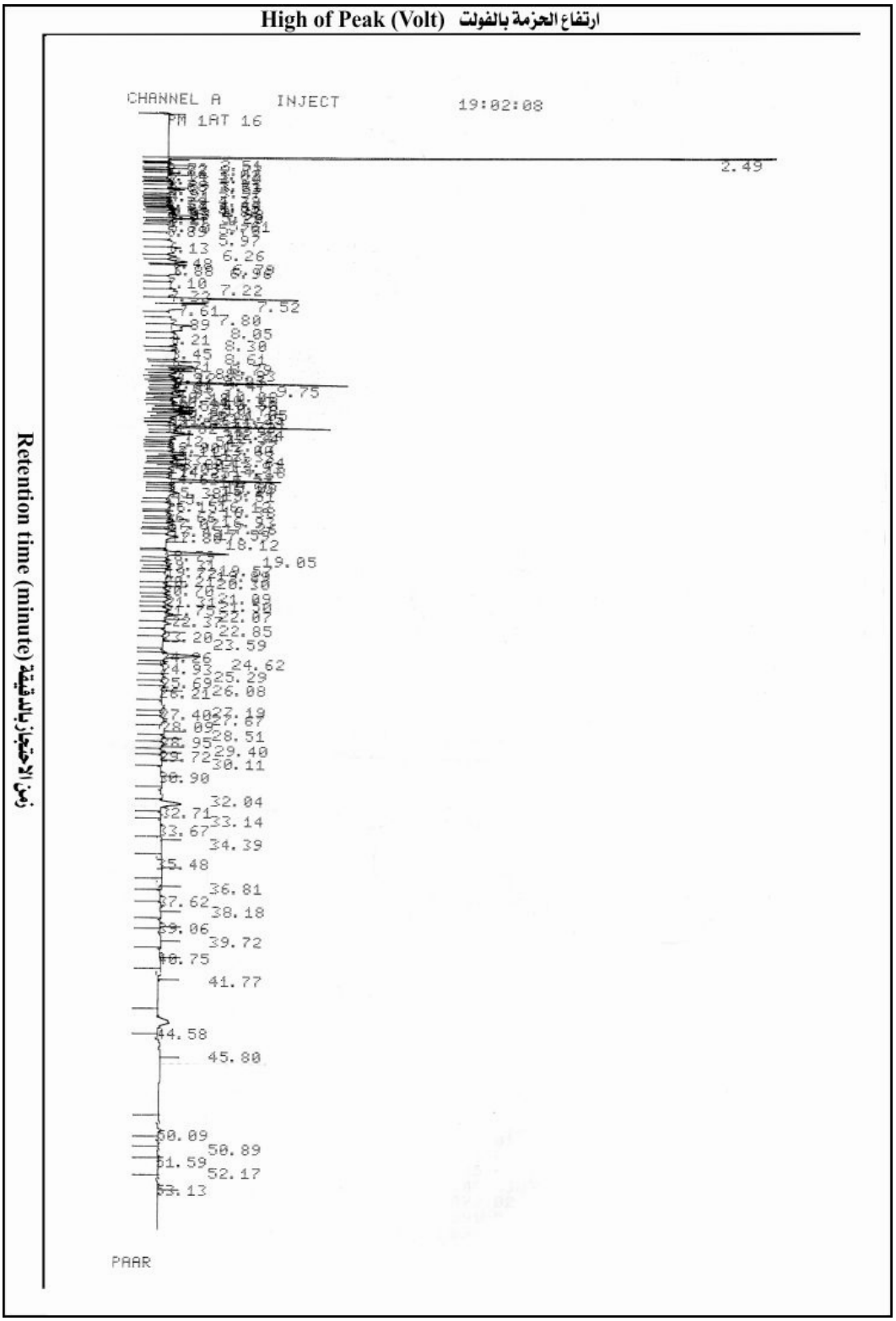
ت	اسم البكتريا	زمن الصفر		بعد يومين		بعد 4 أيام		بعد 6 أيام		بعد 8 أيام	
		العدد	الامتصاصية الضوئية	العدد	الامتصاصية الضوئية	العدد	الامتصاصية الضوئية	العدد	الامتصاصية الضوئية	العدد	الامتصاصية الضوئية
1	*M.luteus*	30×10^{9}	1.19	25.6×10^{10}	1.67	9×10^{9}	1.21	30×10^{8}	0.98	25.6×10^{6}	1.0
2	*M.luteus*	59×10^{8}	0.94	N.G	1.0	N.G	0.9	N.G	0.98	N.G	0.4
3	*M.luteus*	22.8×10^{9}	0.87	10×10^{10}	1.46	30×10^{9}	1.0	30×10^{10}	1.3	30×10^{9}	0.80
4	*M.luteus*	10×10^{9}	0.72	30×10^{10}	1.52	30×10^{10}	1.58	60×10^{9}	1.48	30×10^{7}	1.13
	المعدل	30.4×10^{9}	0.93	21.8×10^{10}	1.41	23×10^{9}	1.17	40×10^{9}	1.185	28.5×10^{7}	0.83
	M.varians	10.4×10^{9}	1.15	13×10^{10}	1.37	40×10^{9}	1.24	30×10^{9}	1.2	30×10^{8}	0.8
	M.varians	30×10^{9}	0.68	10×10^{11}	1.2	75×10^{10}	1.2	30×10^{11}	1.3	34×10^{10}	0.9

2- التحري عن قابلية البكتريا المدروسة على تحليل الديزل باستخدام تقنية Infrared (IR) و Gas- Chramatography (G-C)

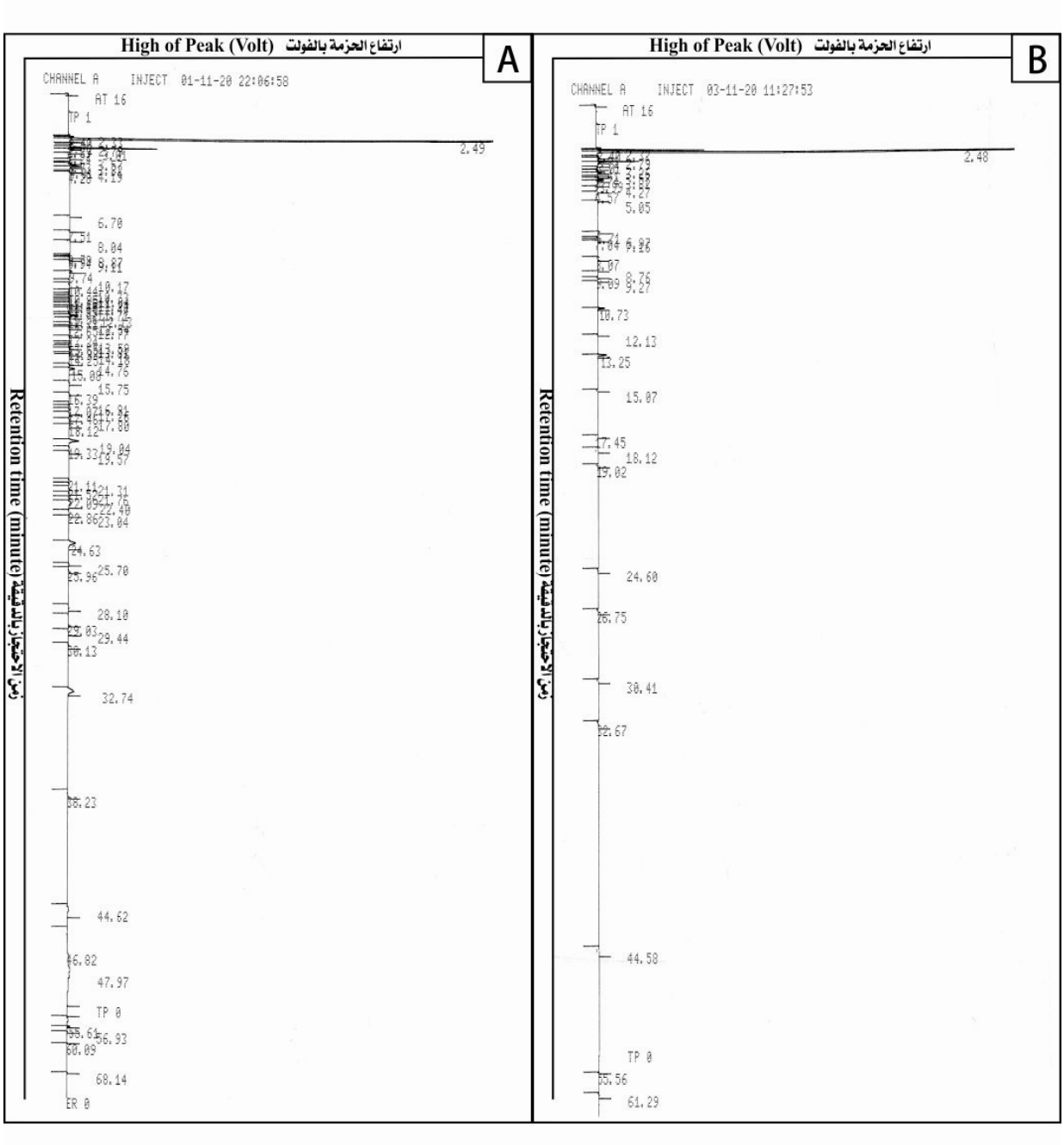
استعملت تقنية كروماتوكرافيا الغاز لقياس التحلل الحيوي للديزل المعامل بالعزلات البكتيرية المستعملة في هذه الدراسة إذ لوحظ أن عينة الديزل المعامل بالعزلات العائدة لنوع لـ *M.luteus* و*M.varians* فيلاحظ أنها أدت إلى اختفاء أعداد كبيرة من الحزم مقارنة مع أعداد الحزم الموجودة في عينة المقارنة الشكل (1 و2)، في حين أظهرت العزلة الثانية لـ *M.luteus* شكل للحزم مشابهة لعينة المقارنة وذلك لعدم تمكن هذه العزلة من النمو على الديزل. وأظهرت عينة الديزل المعاملة بالعزلات البكتيرية العائدة للنوع *M.roseus* اختفاء أعداد كبيرة من الحزم مقارنة مع أعداد الحزم الموجودة في عينة المقارنة.

استخدم عدد كبير من الباحثين تقنية Gas-Chromatography لبيان التحلل في أجزاء النفط الخام ومشتقاته إذ استعمل الباحث Salam وجماعته عام 2011 تقنية GC لدراسة التحلل الحيوي لكيروسين والديزل والنفط الخام بفعل أنواع البكتريا *Pseudomonas putida* و *Pseudomonas aeruginosa* وأظهرت دراستهم اختفاء الأجزاء الأليفاتية واختزال عدد كبير من الأجزاء الأورمائية وأن اختفاء الأجزاء الأليفاتية قد يعود إلى امتلاك البكتيريا للجينات اللازمة لعملية التحلل الحيوي التي قد يعود إلى امتلاكها للبلازميدات نتيجة تعرضها لهذه الملوثات (Cowan and Starfford, 2007).

استخدم الباحث Ojo عام 2006 تقنية GC لبيان التحلل الحيوي الحاصل للنفط الخام المعامل بالبكتريا *M.luteus* و*B.megaterium* إذ تبين حدوث عملية معدنة كلية للمركبات الأليفاتية ومعدنة جزئية للهيدروكاربونات الأروماتية، كما أشار الباحث Rahal وآخرون عام 2011 الى استعمال تقنية GC لدراسة تحلل TNT من قبل البكتريا *Sphingomonas sanguinis* و Corynobacterium وأثبتت دراستهم اختفاء أعداد كبيرة من حزم لـTNT مقارنة مع عينة الـ TNT غير المعامل بالبكتريا، وأظهرت دراسة Obayori وآخرين عام 2009 الاختفاء الكامل للحزم التي تعود إلى المركبات الأليفاتية والاروماتية بفعل البكتريا Pseudomonas إذ تبين قابلية هذه البكتريا لاستهلاك المركبات الأليفاتية والاروماتية، كما أشار Adebusoye وجماعته عام 2006 و Adebusoye وجماعته عام2007 إلى أن تقنية GC تعطي صورة واضحة عن مدى التحلل الحاصل في الديزل من قبل البكتريا *Ps.aeruginosa* و.Corynobacterium spp و*Acinetcbacter lwoffi*.



الشكل 1: نتائج تحليل الديزل باستخدام جهاز كروماتوكرافيا الغاز (GC) والمستخلص من وسط الأمـلاح المعدنية والمحضن لمدة 8 أيام (عينة المقارنة).



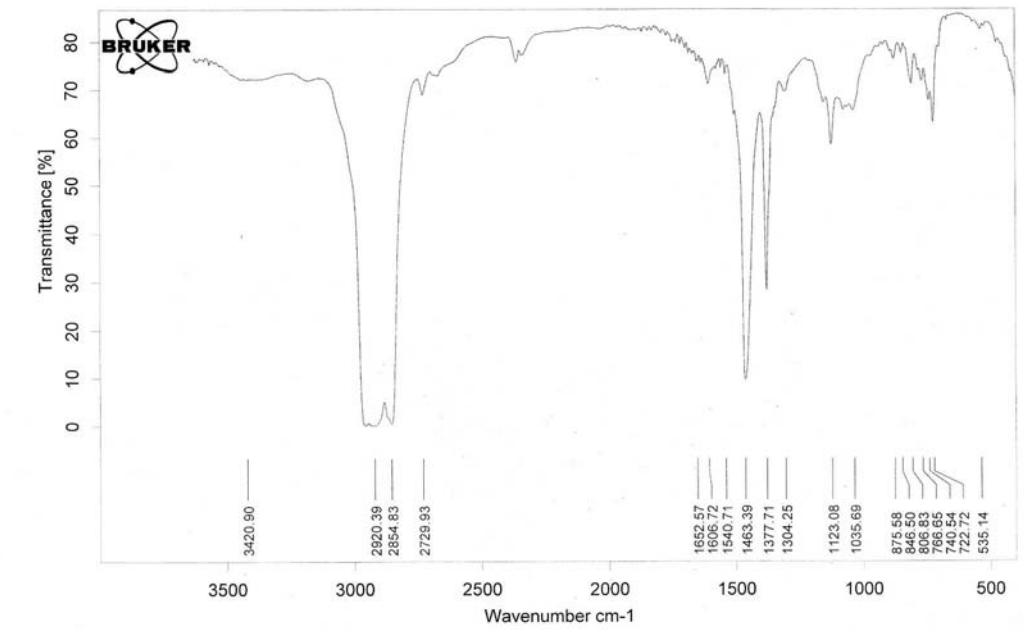
الشكل 2: نتائج تحليل النفط الأبيض باستخدام جهاز كروماتوكرافيا الغاز (GC) والمستخلص مـن وسـط الأملاح المعدنية والمحضن لمدة 8 أيام والمحلل بفعل البكتريا A وB

A: بكتريا *M.luteus*

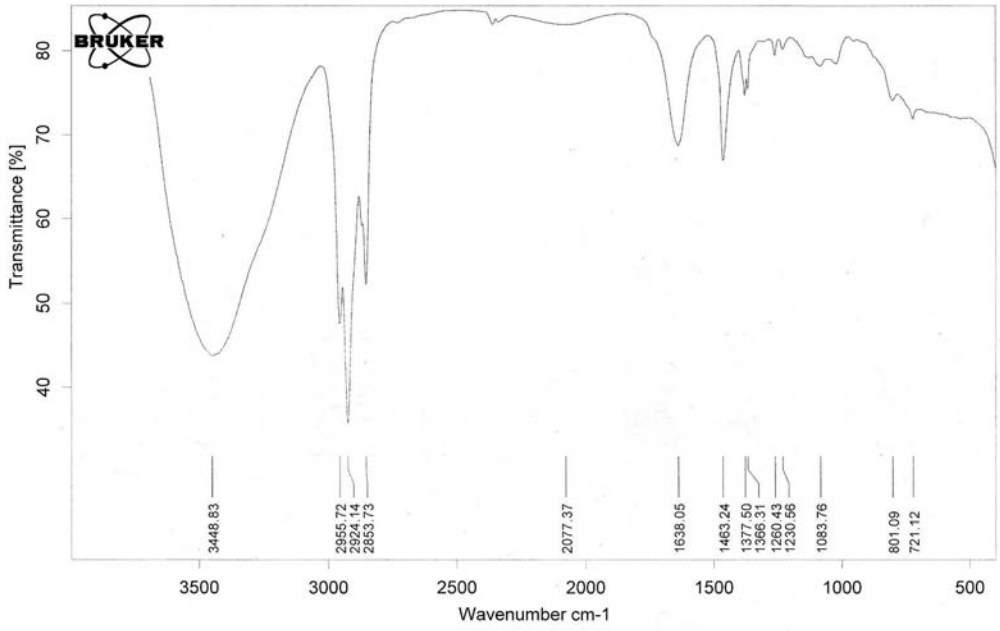
B: بكتريا *M.varians*

وتم استخدام تقنية IR (طيف الأشعة تحت الحمراء) لتحديد الأواصر المختلفة في المركبات إذ يبـين التأثير الذي يحدث في الأواصر الكيميائية chemical bonds الناتجة عن المعاملات المختلفة (بارخ، 1982)، وأن النفط الخام يعد من المركبات الهيدروكاربونية المعقدة الأليفاتية والأورماتية وعند قياس الديزل في وسـط الأملاح الحاوي عليه والملقح بالعزلات العائـدة للنـوع *M.roseus* والعـزلات العائـدة للنـوع *M.luteus* و*M.varians* فنلاحظ ظهور كاربونيل الأستر عند الحزمة ($1743cm^{-1}$) وحزمة متفرعة عنـد ($1377cm^{-1}$) التي تعود لمجاميع الأيزوبروبيل مما يدل على تحطم لتفرعـات الكـاربون وظهـور كاربونيـل الحـامض الكاربوكسيلي عند ($1709\ cm^{-1}$)، وكما مبين في الشكلين (3 و4).

وقد استخدمت هذه التقنية من قبل Ojo عام 2006 إذ لاحظ ظهور حزم عديـدة للهيـدروكاربونات الأروماتية والفينولات للـنفط الخـام المعامـل بـ *Bacillus megaterium* و *Micoroccus luteus* ، واستعمل Kebria وجماعته عام 2009 تقنية IR لقياس التغيير الحاصل في الديزل نتيجة تحللـه مـن قبـل بكتريا *Bacillus cereus* الذي اتفق مع (EPA, 1997) وتؤكد عدد من الدراسات على استعمال هذه التقنيـة في دراسة تحلل النفط الخام (الجبوري، 2005؛ الجبوري، 2004؛ الأسدي، 2000) كما أشار العبيدي عـام 2003 إلى التغييرات في مواقع الذرات والأواصر الذي يشير إلى دور العـزلات البكتيريـة فـي تحليـل المركبات الأروماتية.



الشكل 3: طيف امتصاص الأشعة تحت الحمراء لعينة الديزل الغير المعامل (المقارنة)



الشكل 4: طيف امتصاص الأشعة تحت الحمراء لعينة الديزل المعامل ببكتريا *M.roseus*

المصادر العربية

الأسدي، مهند جواد (2000). تحضير المواد الكاسرة للاستحلاب الجديدة وتقيمها لغرض استخدامها في حقول شركة نفط الجنوب، رسالة ماجستير، قسم الكيمياء، كلية العلوم – جامعة البصرة، البصرة-العراق.

الجبوري، محمود خلف (2004). دور بعض أجناس السيانوبكتريا في التحلل الحيـوي لـبعض المركبـات النفطية. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة تكريت/ صلاح الدين – العراق.

الجبوري، ياسين حسين عويد وسي (2005). التحلل الحيوي لأنواع من النفط الخام بفعل الجراثيم المعزولـة من ترب مصافي العراق الشمالية. أطروحة دكتوراه، قسم علوم الحياة، كلية التربية للبنات، تكريت – العراق.

العبيدي، إياد محمد (2003). دراسة التردي الحيوي وطيف الأشعة تحت الحمراء نماذج من نفـط كركـوك الخام المعامل بالسيانوبكتريا المثبتة للنتروجين. مجلة تكريت للعلوم الصرفة، **و**(1)، 52- 66.

ف.م. بارخ، طيف امتصاص الجزيئات العضوية، ترجمة عبد الحسين شربة، جاسم الراوي ومحمد العراقي، مديرية مطبعة جامعة الموصل، العراق.

المصادر الأجنبية

Adebusoye, S.A.; Llori, O.M.; Amund, O. O.; Teniola, O.D. ; Olatope, S.O. (2007). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon in a polluted tropical stream world. *J. Microbiol. Biotechnol. Diolo*., 1007/S11274-007-9345-3.

Adebusoye, S.A.; Llori, M. O.; Amund, O. O.; Teniola, O. D.; Olatope, S.O. (2006). Microbial degradation petroleum hydrocarbon in polluted tropical stream. *American Sci. J*., **2**(3), 48-57.

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

Alexander, M. (1997). "Biodegradation and Bioremediation". 2nd edn. Academic Press, London.pp.88-90.

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

Atlas, R.M. (2000). Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **35**(1-3), 317-327.

Barathi, S. ; Vasudevan, N. (2001). Utilization of petroleum hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescences* isolated from a petroleum contaminated soil. *Environment International*. **26**(5-6), 413-416.

Bicca, F.C.; Fleck, L.C. ; Zachio, M. A. (1999). Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus rubber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Rev. Microbiol*., **30**, 231-236.

Boboye, B.; Olukunle, O.F. ; Adetuyi, F.C. (2010). Degradative activity of bacteria isolated from hydrocarbon-polluted site in Ilaje ondo state, Nigeria. *Afr. J. Microbiol., Research*, **4**(23), 2484-2491.

Cowan, D.A.; Strafford, W. (2007). Metagenomic methods for the identification of active microorganism and genes in biodegradation processes. In: Environmental Microbiology. 3rd edn. As M Press, American Society for Microbiology, USA.

Delille, D.; Dellile, B. ; Pelletier, (2002). Effectiveness of bioremediation of crude oil contaminated subantractic interidal sediment: The Microbial Response. *Microb. Ecol*., **44**, 118-126.

EPA, (1997). Standard methods for evaluating solid waste : physical, chemical methods, Environmental protection agency-publication EPA530/SW846.

Goswami, P. ; Singh, H.D. (1991). Different modes of hydrocarbons uptake by two *Pseudomonas species*. *Biotechnology and Bioengineering*, **37**, 1-11.

Hazen, T.C.; Tien, A.J.; Worsztynowicz, A.; Altman, D.J.; Uifig, K. ; Manko, T.C. (2003). "Biopiles for Remediation of Petroleum-Contaminated Soils": A polish case study. Law rence Berkeley National laboratory. Institute for ecology of Industrial Areas. pp: 1-15. Poland.

Ilori, M.O.; Amobi, C.J. ; Odocha, A.C. (2005). Factor effecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* spp. Isolated from tropical environment. *Chemosphere*. **61**, 985-992.

Ilori, M.O. ; Amund, O.O. (2001). Production of peptidoglycolipid bioemulsifier by pseudomonas deruginosa grown on hydrocarbon. *Z. Naur for Sch*. **56c**, 547-552.

Kebria, Y.; Khodadi, A.; Anjidoust, H.G.; Budkoubi, A. ; Amoozegar, M.A. (2009). Isolation and characterization of a novel native Bacillus strain capable of degrading diesel fuel. *Int. J. Environ. Sc. Tech*., **6**(3), 435-442.

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

Kramer, P.G.N.; Vander Heijden, C.A. (1990). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH): carcinogenicity data and risk extrapolation. *Toxicol. Environ. Chem*., **16**(4), 341-451.

Molina-Barahona, L.; Rodriguez-Razdvez, R.; Hernandez-Velasco, M.; Vega-Jarquin, C.; Zapata-Perezo, Mendoza-Cantu, A. ; Albores, A. (2004). Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *App. Soil Ecol*., **27**(2), 165-175.

Murad, S.; Hasan, F.; Shah, A. A.; Abdul Hameed ; Ahmed, S. (2007). Isolation of phthalic acid degrading *Pseudomonas* spp. P1 from soil, Pak, *J. Bot*., **39**(5),1833-1841.

Nester, E.W.; Denise, G. Anderson, C.; Evans Roberts, J.R.; Nancy, N. P.; Martha, T. N. (2001). "Microbiology". 3rd edn. McGraw-Hill Inc., 1221.

Obayori, O.S.; Sunday, A. A.; Adams, O. A.; Ganiyuo, O.; Odunola, O. O., Rashid, A. A.; Llori, M. O. (2009). Differential degradation of crude oil (bonny light) by four Pseudomonas strains. *Environmental Sci. J*., **21**(2), 243-248.

Oboh, B.O.; Ilori, M. O.; Akinyemi, J.; Adebusoye, S. A. (2006). Hydrocarbon degrading potentials of bacteria isolated from Nigerian Bitumen (tarsand) deposit. *Nature and Science*, **4**(3).

Ojo, O.A. (2006). Petroleum hydrocarbon utilization by native bacterial population from a waste water canal south west Nigeria. *African J. Biotechno*., **5** (4), 333-337.

Okerentugba, P.O.; Ezeronye, O.U. (2003). Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial culture isolated from river and refinery effluent in Nigeria. *Afr. J. Biotechnol*., **2**(9), 288-292.

Prescott, L.M.; Harley, T.P. ; Klein, D.A. (2005). "Microbiology". 6th edn., McGraw-Hill Companies, Inc. USA.

Rahal, A.G.H. ; Moussa, L.A. (2011). Degradation of 2,4,6. Trinitrotoluene (TNT) by soil bacteria isolated from TNT Contamination soil. *Australian J. Basic and Appl. Sci.*, **5**(2), 8-17.

Raven, R.; Berg, L.R.; Johnson, G.B. (1993). "Enviroment Saunders". College publishing, Philadelphia. USA, 569 p.

Refaat, A.A.; Attia, N.K., Sibak, H.A.; El-Sheltawy, S.T.; Elbiwani, G.T. (2008). Production optimization and quality assessment of biodiesel from waste vegetable oil. *Int. J. Environ. Sci. tech*., **5**(1), 75-82.

Rivera-Cruz, M.D.C.; Ferrera-Cerrato, R.; Sanchez-Garcia, P.; Volke-Haller, V.; Fernandez-Linares, L. ; Rodriguez-Vazquez, Y.R. (2004). Decontamination of soil polluted with crude petroleum using indigenous microorganisims and aleman grass [*Echinochtoa poly stachya (H.B.K) Hitchc*] **38**(1), 1-12.

Salam, L.B.; Obayori, O. S.; Akashoro, O. S. ; Okogie, G. O. (2011). Biodegradation of bonny light crude oil by bacteria isolated from contaminated soil. *International J. Agriculture and Biology*. **13**(2), 245-250.

Santhini, K.; J. Myla, S. S.; Usharani, G. (2009). Screening of Micrococcus sp. from oil contaminated soil with reference to bioremediation. *Botany Research International*. **2**(4), 248-252.

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

Song, H.C. ; Bartha, R. (1990). Effect of jet fuel spills on the microbial community of soil. *Appl. Environ. Microbiol*, **56**, 6465.

Supaka, N.; Pairoh Pin Phani Chakran; Pattaragulwanit, K.; Thainyavarn, S.; TOshiomori ; Juntogjine, K. (2001). Isolation and characterization of a phenanthrene degrading *Sphingmonas* spp. Strain PS and its ability to degrade flouranthene and byrene via cometabolism. *Sci. Asia*,. **27**, 21-28.

Wright, M.A.; Frank, T.; Rondles, S. J.; Donald, E.; Brown, and John, I.H. (1993). Biodegradation of a synthetic lubricant by *Micrococcus roseus*. *Appli. Environ. Microboil*. **59** (4), 1072-1076.