مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (37) العدد (4) 2015
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (37) No. (4) 2015

عزل وتصنيف النوعين الجرثوميين *Pseudomonas pachastrellae* *Micrococcus brunensis* من تربة ملوثة بمركبات نفطية

الدكتورة أميمة ناصر *

(تاريخ الإيداع 7 / 6 / 2015. قبل للنشر في 2 / 8 / 2015)

□ ملخّص □

عُزل نوعان من الجراثيم من ترب ملوثة بمركبات نفطية، تم تمييز العزلتين الجرثوميتين ببعض الخصائص اعتماداً على تلوينها بطريقة غرام، وبعض الخصائص الشكلية والكيميائية الحيوية.

بينت النتائج عزل نوعان من الجراثيم، النوع الأول عصوي قصير سالب صبغة غرام، تميز بتفاعل سلبي تجاه اختباري اليوريا والنترات، وتفاعل إيجابي بالنسبة لاختبار سكر الغلوكوز فقط، والنوع الثاني من جراثيم المكورات العنقودية موجب صبغة غرام، تميز بتفاعل سلبي تجاه اختباري الجلاتين واستعمال السترات، كما أعطى تفاعل سلبي بالنسبة لاختبار سكر المالتوز والمانيتول، واستناداً إلى تصنيف بيرجي، وخلال فترة حضانة استمرت (48–72) ساعة، وعند درجة حرارة (37) درجة مئوية.

والجراثيم المعزولة هي نوعان: الأول *Pseudomonas pachastrellae* ، والثاني *Micrococcus brunensis*.

الكلمات المفتاحية: تلوث، بيئة، نفط، جراثيم البسيدوموناس، جراثيم الميكروكوكس.

* مدرسة – قسم الوقاية البيئية (اختصاص أحياء دقيقة) – المعهد العالي لبحوث البيئة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (37) العدد (4) 2015
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (37) No. (4) 2015

Isolation and identification of Pseudomonas pachastrellae, Micrococcus brunensis bacteria from soil polluted by petroleum

Dr. Omiema Nasser*

(Received 7 / 6 / 2015. Accepted 2 / 8 /2015)

□ ABSTRACT □

Two bacterial species were isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil. The isolates were characterized based on their gram reaction characteristics, morphological and biochemical properties.

The results showed two bacteria isolated the first isolated: gram negative short rod, urease and nitrate reduction test showed a positive result , and glucose test showed positive result.

And the second isolated: gram positive cocci, gelatin and Citrate utilization test showed a positive result , and maltose, mannitol test showed negative result.

They were then incubated at (37) ° C for (48- 72) hours.

This is based on comparison of results with Bergey Manual of systematic bacteriology.

The isolates were identified to be: *Pseudomonas pachastrellae* (X1)
Micrococcus brunensis (X2).

Key words: pollution, environment, Petroleum, *Pseudomonas pachastrellae. Micrococcus brunensis*..

***Assistant Professor-Department of Environmental Prevention (Microbiology) – Higher Institute for Environmental Research- Tishreen University- Lattakia- Syria.**

مقدمة:

تعد مشكلة التلوث البيئي قضية أساسية في هذا العصر، وقد حظي التلوث بالمركبات الهيدروكربونية الناتجة عن النفط أو مشتقاته أو الصناعات الأخرى [1,2]. باهتمام الكثير من الباحثين في السنوات الأخيرة، وخاصة بعد الكوارث الكبيرة التي تعرضت لها بعض المسطحات المائية التي كان تسرب النفط أو انسكابه عرَضاً فيها هو السبب الرئيس لها [3].

وقد بينت الكثير من الأبحاث أن الأضرار الناتجة عن التلوث بالمركبات الهيدروكربونية كثيرة لأنها سامة، وبعضها يسبب السرطان [4]، حيث تتفكك في البيئة مع مرور الزمن، مما يؤدي إلى انتشارها، وبالتالي تأثيرها السلبي على البيئة المائية، والأحياء الموجودة فيها (أسماك، رخويات، قشريات، طحالب، طيور...) و البيئة البرية (تربة، مياه جوفية) [5,6].

وتتم استعادة المركبات الهيدروكربونية بطرائق عديدة: ميكانيكية (الحواجز الطافية المطاطية، القواشط)، أو كيميائية (استخدام المشتتات) ولكن هذه الأخيرة تعد معالجة أولية ولابد من معالجة حيوية تليها [7,8,].

وسواء في الأوساط المائية أو في التربة تعد المعالجة الحيوية هي الطريقة الناجعة الأكثر نجاحاً في مختلف الأوساط البيئية، يمكن من خلالها بواسطة الأحياء الدقيقة هضم المركبات الهيدروكربونية إلى مواد قابلة للتحلل بشكل كامل أو شبه كامل [9,10,11]. وتعد طرائق المعالجة الحيوية هي الأفضل، لأنها ذات فعالية جيدة، وكفاءة عالية، والأكثر ملاءمة، والأقل تكلفة [12,13,14,15,16]. حيث تتضمن استراتيجيات المعالجة الحيوية الحصول على عزلات جرثومية نقية وجيدة في تحطيم المركبات الهيدروكربونية الضارة، أي استعمال الجراثيم لتحويل المركبات الملوثة للبيئة إلى منتجات غير مؤذية، وصديقة للبيئة [17,18,19].

أهمية البحث وأهدافه:

يعد النفط عصب الحياة في مختلف الدول المتطورة والنامية وتتعدد مجالات استخدامه في مختلف نواحي الحياة وتعد سورية من البلدان المنتجة للنفط منذ عشرات السنين وتحتوي على كميات كبيرة من الاحتياطات النفطية، التي يرافق استخراج النفط ونقله وتكريره واستخدامه مخاطر وأضرار بيئية عديدة على اليابسة والمصادر المائية، لذلك لا بد من أخذ هذه المخاطر بالاعتبار وإيجاد أفضل الطرائق العلمية الفعالة في معالجتها ، هذا وتعد المعالجة الحيوية من أهم الطرائق المتبعة في معالجة المناطق الملوثة بالمركبات الهيدروكربوينة الناتجة عن النفط أو المشتقات النفطية أو الصناعات الأخرى بسبب فاعليتها وإمكانية الحصول على الأحياء الدقيقة الفعالة في هذا المجال، وإمكانية تطبيقها مخبرياً وحقلياً، إضافة إلى تكاليفها الاقتصادية المنخفضة نسبياً ومحافظتها على خصائص البيئة إضافة إلى كونها الطريقة الوحيدة التي يمكن من خلالها معالجة بعض حالات التلوث مثل تلوث التربة بالنفط أو تلوث المصادر المائية بتراكيز منخفضة من المركبات الهيدروكربونية، وبالتالي تحويل الملوثات الخطرة إلى مواد أقل خطورة والارتقاء بآلية التفكك الحيوي. التي تعتمد بشكل أساسي على أحياء دقيقة معزولة متخصصة بتفكيك المركبات الهيدروكربونية.

وتأتي أهمية هذه الدراسة في عزل سلالات جرثومية من التربة الملوثة بمركبات نفطية والعمل على تصنيفها، بحيث يتم تنميتها وإكثارها لاحقاً وصولاً إلى محفز نشيط ليتم استخدامه في تفكيك المركبات النفطية الملوثة للأوساط البيئية المختلفة، وذلك في إطار المعالجة الحيوية.

يهدف البحث إلى:

1 -عزل جراثيم من ترب ملوثة بمركبات نفطية.

2 -تحديد وتنقية الجراثيم المعزولة بتنميتها على الأوساط الزرعية المغذية العامة والانتقائية والمعتمدة عالمياً.

3 -تصنيف الجراثيم المعزولة اعتماداً على بعض الخصائص الكيميائية الحيوية.

طرائق البحث ومواده:

1-جمع العينات : تم جمع عينات التربة من مواقع ملوثة بمركبات نفطية لسنوات عديدة في أكياس من البولي إيتيلين، التي جمعت بحدود (3-4) كغ، أخذت التربة من عمق (0-20) سم، ثم أحضرت إلى المختبر لإجراء الدراسة الحيوية.بهدف عزل الجراثيم منها [20,21,22].

2-تحضير محاليل التربة:

تم أخذ (1) غرام من تربة متجانسة، وأُكمل الحجم إلى (10) مل من محلول فوق أكسيد الفوسفات والصوديوم المعقم (Na2P2O7) ذو (0.025) مولاري (2.8) غ/ل في أرلنماير معقم سعة (50) مل، ووُضع على هزاز مغناطيسي بسرعة (250) دورة في الدقيقة مدة ساعتين، ثم تُركت جزيئات التربة لتهدئ لمدة (30) دقيقة ، تم تمديد السائل الطافي ، ووُضعت في أنابيب اختبار معقمة بشكل منفصل يحوي كل منها (9) مل ماء مقطر معقم، ثم حركت بشكل جيد للحصول على محلول أم بتركيز (10/1) من التربة ثم أخذ (1) مل من كل تركيز ووضع ضمن أنبوب اختبار يحوي (9) مل ماء مقطر ومعقم للحصول على تركيز (100/1) تكررت العملية نفسها لتحضير التركيز (1000/1). ووضع (0.5) مل من كل تركيز على سطح الطبق المتضمن أوساط زرع جرثومي صلبة عامة تم تحضيرها مسبقاً، وفرشت بشكل جيد على كامل الطبق. تم إجراء ثلاث مكررات لكل تركيز تركت الأطباق نصف ساعة ليجف ماء العينة، ثم حضنت بالدرجة °C (37) لمدة (24-72) ساعة، وذلك للتعرف على السلالات الجرثومية وعزلها [20,21,23] .

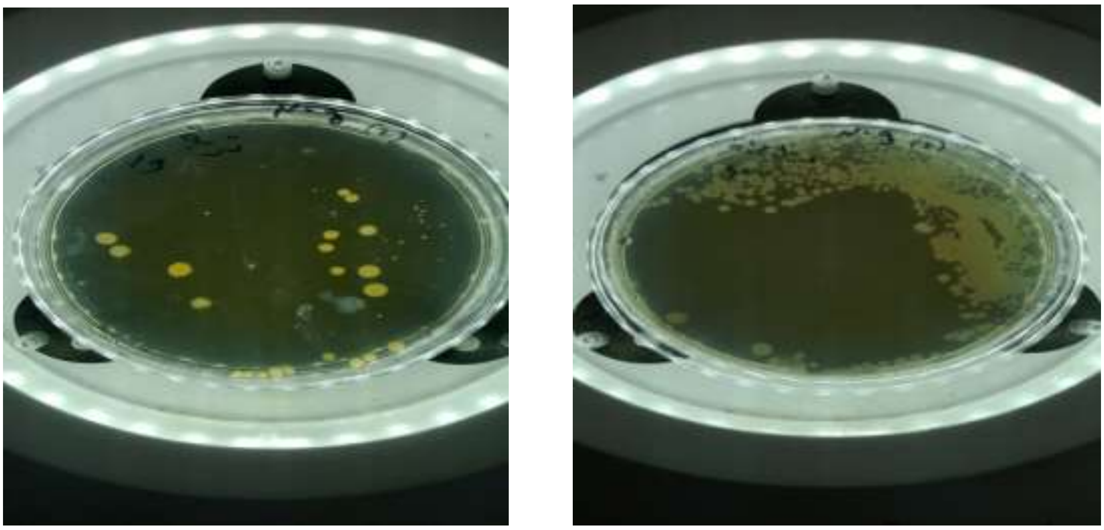
3- زراعة الجراثيم وتفريقها

تم زرع العينات على أوساط عامة واصطفائية مثل (Nutrient Agar, Macconkey Agar , Nutrient Broth, Bushnell-Haas, MSM ,Eosin Methylene Blue Agar (Motility Agar , LB Agar ,Mannitol salt Agar, BSM, Endo Agar

ثم أجري لها التلوين بطريقة صبغة غرام، وتقسيمها إلى جراثيم موجبة صبغة غرام، وجراثيم سالبة صبغة غرام، وبعد الحصول على مستعمرات نقية لكلا النوعين السالبة والموجبة صبغة غرام، تم انتقاء مستعمرات مفردة، حيث تم حلها بمحلول موقي (PBS1×) حسب عكارة (Mcfarland 2)، ثم أجري لها اختبارات حيوية كيميائية باستخدام الصفيحة، كما أجري للعينات اختبارات تخمير السكريات على الصفيحة، وحضنت بدرجة حرارة (37) درجة مئوية لمدة (24) ساعة، وتمت مراقبة النتائج لمدة (72) ساعة إضافية للتأكد من عملية التخمر، بالإضافة لما سبق تم إجراء مجموعة من اختبارات النمو بدرجات حرارة مختلفة (45,15,10) درجة مئوية، ودرجات ملوحة مختلفة(% NaCl) % (15, 10, 6.5)، وذلك فقط للجراثيم موجبة صبغة الغرام [24,25,26]. .

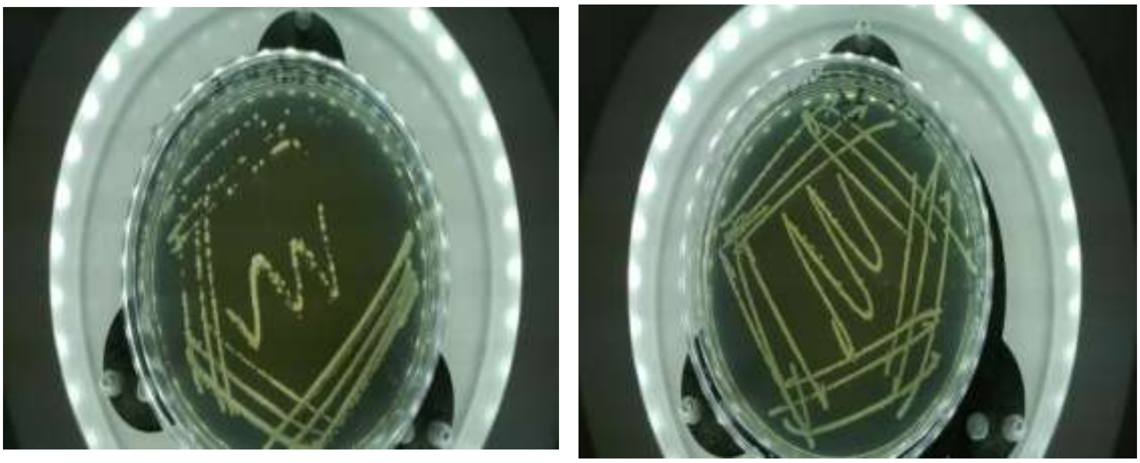
النتائج والمناقشة :

بينت النتائج ظهور أعداد كبيرة من الجراثيم بعد زراعة عينات التربة الملوثة بالنفط على الأوساط المغذية العامة والانتقائية، مثل وسط النترينت آغار، كما هو موضح في الشكلين (2 ,1)



الشكل 2 ,1: الجراثيم على الوسط المغذي النترينت آغار (nutrient agar)

تم عزل الجراثيم وتنميتها للحصول على سلالات جرثومية نقية بطريقة التخطيط على الطبق، وذلك على الوسط المغذي النترينت آغار، كما هو موضح في الشكلين (3,4).

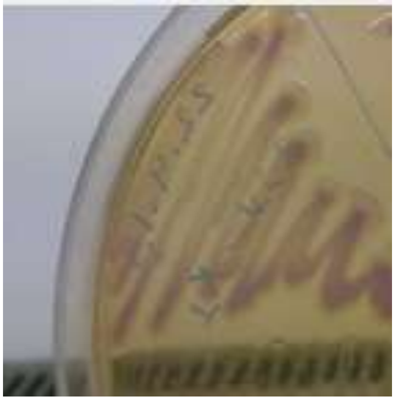


الشكل 3,4: السلالات الجرثومية بطريقة التخطيط على الطبق على وسط النترينت آغار

كما تم تنمية عينات التربة الملوثة بالنفط على أوساط اصطفائية مثل وسط الأيوزين أزرق الميتيلين (EMB)، حيث حققت السلالة الجرثومية الأولى (X1) نمو جيد على هذا الوسط المغذي، كما هو موضح في الشكل (5)، بينما لم يكن كذلك بالنسبة للسلالة الجرثومية الثانية المعزولة (X2).

الشكل 5: السلالة الجرثومية (X1) على الوسط المغذي (EMB)

كما تم تنمية عينات التربة الملوثة بالنفط على الوسط المغذي Macconkey Agar حيث حققت السلالة الجرثومية الأولى (X1) نمو جيد على هذا الوسط المغذي، كما هو موضح في الشكل (6)، بينما لم يكن كذلك بالنسبة للسلالة الجرثومية الثانية المعزولة (X2).

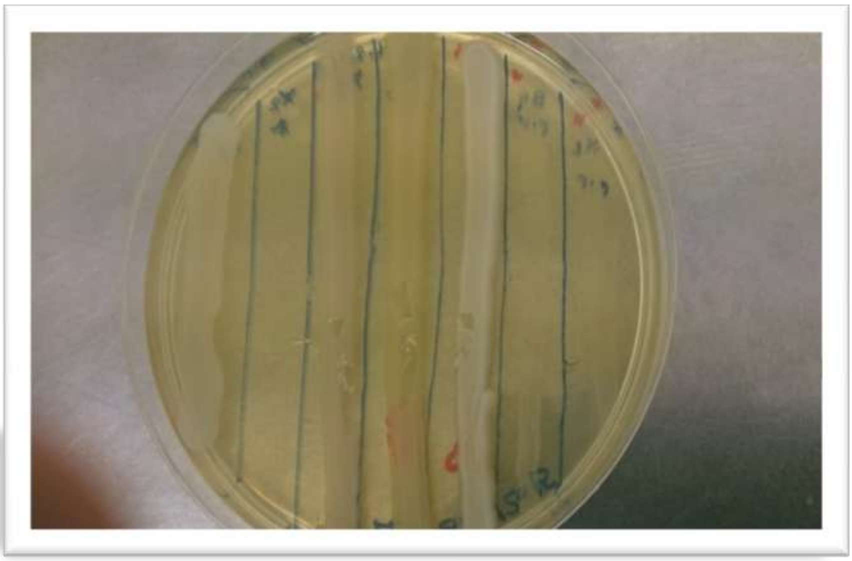


الشكل 6: السلالة الجرثومية (X1) على الوسط المغذي Macconkey Agar

كما تم تنمية عينات التربة الملوثة بالنفط على الوسط المغذي Mannitol salt Agar ، حيث حققت السلالتين الجرثوميتين المعزولتين نمو جيد على هذا الوسط المغذي، كما هو موضح في الشكل (7).

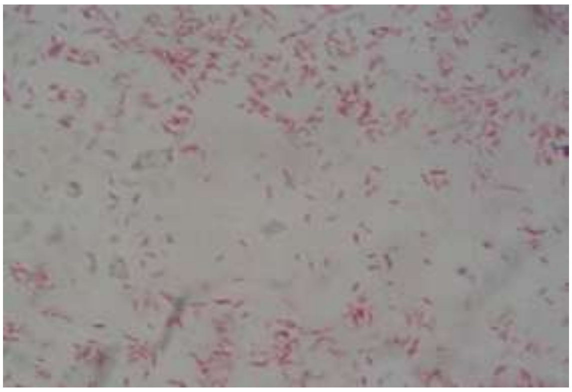
الشكل 7: السلالتين الجرثوميتين المعزولتين على الوسط المغذي Mannitol salt Agar

كما تم تنمية عينات التربة الملوثة بالنفط على الوسط المغذي LB Agar ، حيث حققت السلالتين الجرثوميتين نمو جيد على هذا الوسط المغذي، كما هو موضح في الشكل (8).

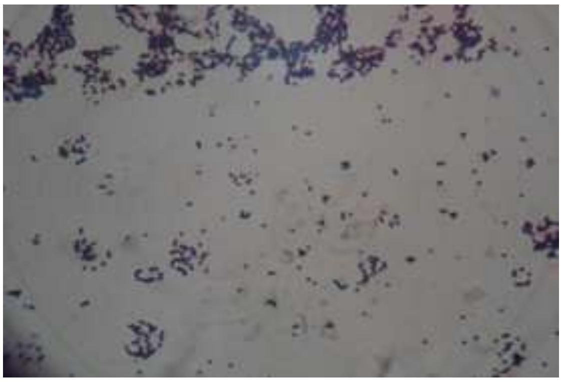


الشكل 8: السلالتين الجرثوميتين المعزولتين على الوسط المغذي LB Agar

بعد ذلك وبهدف التحديد الدقيق للسلالات الجرثومية المعزولة تم اعتماد تلوينها بطريقة صبغة غرام، حيث تبين أن السلالة الجرثومية الأولى المعزولة (**X1**) هي عبارة عن عصيات (0.5-1) ميكرون، سالبة صبغة غرام، كما هو موضح في الشكل (9)، بينما السلالة الجرثومية الثانية المعزولة (X2) هي مكورات عنقودية إيجابية صبغة غرام، كما هو موضح في الشكل (10).

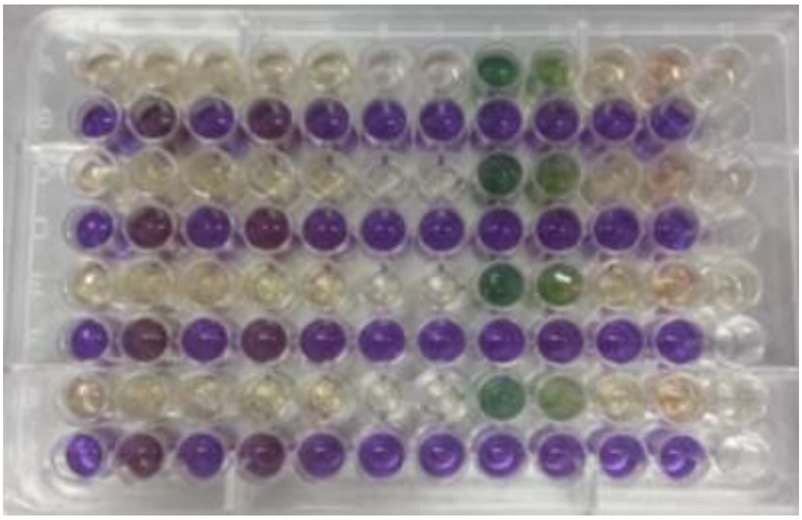


الشكل 9: التلوين بصبغة غرام للسلالة. (X1)

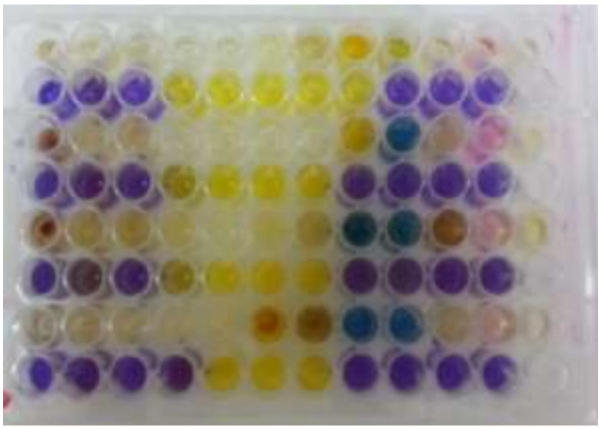


الشكل 10: التلوين بصبغة غرام للسلالة (A5)

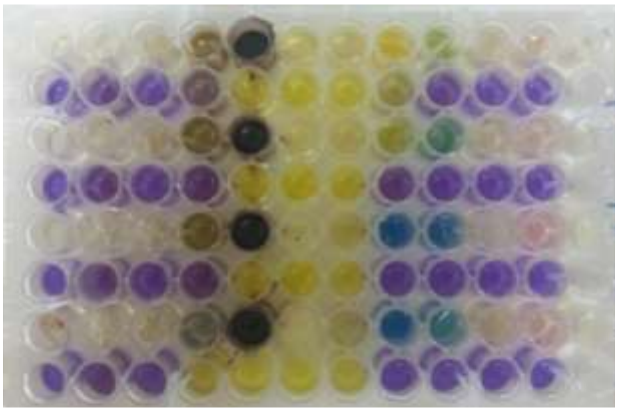
بعد التلوين بطريقة غرام لكلا السلالتين الجرثوميتين، تم انتقاء مستعمرات جرثومية مفردة، وتم حلها بمحلول موقي (PBS1×) حسب عكارة (Mcfarland 2)، ثم أُجري باستخدام الصفيحة الموضحة في الشكل (11)، بعض الاختبارات الحيوية الكيميائية مثل (الحركة، الأوكسيداز، الكاتالاز، النترات، الأندول، السترات، إطلاق غاز كبريت الهيدروجين، اليوريا، الجيلاتين)، ذلك للسلالتين الجرثوميتين المعزولتين ، كما هو موضح في الشكل (8) بالنسبة للسلالة الجرثومية الأولى المعزولة (X1)، وفي الشكل (12) بالنسبة للسلالة الجرثومية الثانية المعزولة (X2). وفي الجدول (1) بالنسبة للسلالتين الجرثوميتين المعزولتين. حيث يبين الجدول أن كلا السلالتين الجرثوميتين المعزولتين غير متحرك كما هو موضح في الشكل (13)



الشكل 11: الشكل العام للصفيحة قبل إجراء الاختبار



الشكل 12: شكل الصفيحة بعد إجراء الاختبار لـ (X1)



الشكل 13: شكل الصفيحة بعد إجراء الاختبار لـ(X2)

الجدول 1: بعض الاختبارات الحيوية الكيميائية للسلالتين الجرثوميتين المعزولتين (X2,X1)

sample	motility	oxidase	catalase	Nitrate	Indol	Citrate	H_2S	Urea	gelatin
X1	−	+	+	−	−	+	−	−	−
X2	−	+	+	+	−	−	−	+	−

هذا واستكمالاً للاختبارات الحيوية العديدة التي تم تطبيقها على السلالتين الجرثوميتين المعزولتين تم إجراء اختبار الحركة للسلالتين الجرثوميتين المعزولتين على الوسط المغذي Motility Agar ، فقد تبين أن السلالتين الجرثوميتين المعزولتين (X2,X1) عديمتا الحركة، كما هو موضح في الشكل (14).

الشكل 14: اختبار الحركة للسلالتين الجرثوميتين المعزولتين

كما أُجري للسلالتين الجرثوميتين المعزولتين اختبارات تخمير السكريات باستخدام الصفيحة، وذلك لتحديد مقدرتهما على تخمير أنواع مختلفة من السكريات، حيث حُضنت العينات في درجة حرارة (37) درجة مئوية لمدة (24) ساعة، وتمت مراقبة النتائج لمدة (72) ساعة إضافية، وذلك للتأكد من عملية التخمر، كما هو موضح في الجدول (2).

الجدول (2) اختبارات تخمير السكريات للسلالتين الجرثوميتين المعزولتين

sample	lactose	xylose	maltose	arabinose	glucose	raffinose	sucrose	fructose	dulcitol	mannitol
X1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
X2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

بالإضافة لما سبق تم إجراء مجموعة من اختبارات النمو للسلالة الجرثومية الثانية (A5) بدرجات حرارة مختلفة (45,15,10) درجة مئوية، حيث بينت النتائج مقدرة نمو السلالة الجرثومية (A5) بدرجات حرارة تتراوح بين (15-45) درجة مئوية، كما هو موضح في الجدول (3)، وكذلك تم اختبار نموها بدرجات ملوحة مختلفة(% NaCl) % (15, 10, 6.5)، حيث بينت النتائج عدم مقدرة السلالة الجرثومية (A5) على تحمل أي درجات ملوحة، كما هو موضح في الجدول (3)، كما بينت نتائج الاختبار أن هذه السلالة الجرثومية هي من الجراثيم الاختيارية، أي أنها تستطيع النمو في ظروف هوائية ولاهوائية على حد سواء، كما هو موضح في الجدول (1) وتتميز بعدم مقدرتها على حل الدم ، كما هو موضح في الجدول (3)، بالنسبة للخاصيتين السابقتين، وفي الشكل (11) بالنسبة للخاصية الثانية.

الجدول 3: اختبارات نمو السلالة الجرثومية الثانية A5 في درجات حرارة حرارة مختلفة (45,15,10) درجة مئوية، ودرجات ملوحة مختلفة(% NaCl) % (15, 10, 6.5)

Sample	aerobic	anaerobic	10˚C	15˚C	45˚C	hemolysis	NaCl 6.5%	NaCl 10%	NaCl
X2	+	+	-	+	+	-	-	-	-

يتبين مما سبق وبعد إجراء العديد من الاختبارات الحيوية والكيميائية على الجراثيم المعزولة من ترب ملوثة بمركبات نفطية، أن السلالتين الجرثوميتين المعزولتين من التربة الملوثة بالنفط الأولى منهما تعود للجنس بسيدوموناس *Pseudomonas*، وهذا يتوافق مع دراسات عديدة تم فيها عزل هذا الجنس من أوساط ملوثة بمركبات نفطية [27,28]، وتحديداً في هذه الدراسة تم عزل السلالة الجرثومية

Pseudomonas pachastrellae ، وإن مايؤكد إمكانية عزل هذا النوع من الأوساط الملوثة بالمركبات الهيدروكربونية النفطية هو وجود دراسات عديدة تم فيها عزل أفراد جنس البسيدوموناس *Pseudomonas* وإثبات مقدرتها على تحطيم الألكانات النفطية، والمركبات العطرية، بينت إحدى هذه الدراسات قدرة هذا الجنس على تخفيض مؤشر التلوث بالبنزن إلى (43.89%) [29,30,31,32].

بينما السلالة الجرثومية الثانية تعود للجنس ماكروكوكس *Micrococcus* ، وهذا يتوافق مع دراسات عديدة تم فيها عزل هذا الجنس من أوساط ملوثة بمركبات نفطية، حيث بينت إحدى هذه الدراسات قدرة هذه الجنس على تخفيض مؤشر التلوث ملوثة بالديزل إلى (23.46%) [24,32,33,34,35,36] ، وتحديدا في هذه الدراسة تم عزل السلالة الجرثومية *Micrococcus brunensis*.

الاستنتاجات والتوصيات:

1 تم الحصول على سلالتين جرثوميتين من الترب الملوثة بمركبات نفطية هما:
Micrococcus brunensis, Pseudomonas pachastrellae.

2 تتميز السلالة الجرثومية *Pseudomonas pachastrellae* *بأنها* جراثيم عصوية قصيرة سالبة صبغة غرام، غير متحركة، بينما تميزت السلالة الجرثومية *Micrococcus brunensis* بأنها جراثيم مكورة عنقودية موجبة صبغة غرام، غير متحركة.

3 بينت الاختبارات الحيوية والكيميائية أن السلالة الجرثومية *Pseudomonas pachastrellae* أعطت نتيجة تفاعل إيجابي بالنسبة للأكسيداز والكاتالاز والسترات، بينما أعطت نتيجة تفاعل سلبي بالنسبة للنترات والأندول واليوريا والجيلاتين وكبريت الهيدروجين، أعطت تفاعل إيجابي بالنسبة لسكر الغلوكوز.

4 بينت الاختبارات الحيوية والكيميائية أن السلالة الجرثومية *Micrococcus brunensis* أعطت نتيجة تفاعل إيجابي بالنسبة للأكسيداز والكاتالاز والنترات واليوريا، بينما أعطت نتيجة تفاعل سلبي بالنسبة للسترات والأندول والجيلاتين وكبريت الهيدروجين، وأعطت تفاعل إيجابي بالنسبة للسكريات الآتية (الغزيلوز، المالتوز، الأرابينوز، الغلوكوز، السكروز الفركتوز الغلوكوز، بينما أعطت نتيجة تفاعل سلبي بالنسبة لسكر اللاكتوز والمانيتول.

5 بينت الاختبارات أن السلالة الجرثومية *Micrococcus brunensis* قادرة على النمو في درجات حرارة مختلفة (45,15) درجة مئوية، لكن عدم مقدرتها على تحمل درجات الملوحة.

6 نوصي بمتابعة الدراسات في هذا المجال وازدياد النشاط البحثي، والتوجه حول تفسير آليات النشاط الحيوية لهذه السلالات الجرثومية المعزولة في تفكيك الملوثات الهيدروكربونية المختلفة.

المراجع:

[1] DIYAUDDEEN, B. W; WANDAUD, A. A. *Treatment Technologies for Petroleum Refinery Effluents*: A Review. Process Safety and Environmental Protection, 2011, 89: 95–10.

[2] GARGOURI, B. F; KARRY, N; MHIRI, F; ALOUI, S. *Application of a Continuously Stirred Tank Bioreactor (CSTR) for Bioremediation of Hydrocarbon-Rich Industrial Wastewater Effluents*. Journal of Hazardous Materials, 2011,189: 427–434.

[3] ADEKUNLE, A. A; ADEBAMBO, A. O. *Petroleum Hydrocarbon Utilization by Fungi Isolated from Detarium Senegalense (J. F Gmelin) Seeds*. Journal of American Science, 3(1), 2007.

[4] DOMDE, P. A. KAPLEY, P. Y; Purohit, J.H. *Impact of Bioaugmentation with a Consortium of Bacteria on the Remediation of Wastewater-Containing Hydrocarbons*. Env. Sci. Pollut., 14 (1), 2007, 7 – 11.

[5] PRADIPTA,R. B. *Evalution Of Biological Treatment For The Degradation Of Petroleum Hydrocarbons In A wastewater Treatment Plan*. 2005.

[6] BAKO, S. P; CHUKWUNONSU, B. D ; ADAMU, A. K. *Bioremediation of Refinery Effluents by Strains of Pseudomonas Eerugenosa and Penicillium janthinellum.* Applied Ecology and Environmental Research, 6(3), 2008, 49-60.

[7] GUO, L. Z; YUE, T. W; XIN, P. O; QIN,P. M, *Biodegradation of crude oil by Pseudomonas sp in the presence of rhamnolipids*. Journal of Zhejiang University Science ,10,2005.

[8] BASSAM, M; MOHAMMED, N. B, *Biodegradation of total organic carbons (TOC) in Jordanian petroleum sludg*e. Journal of Hazardous Materials,2005, P.120.

[9] AUDRONE, Z; VIKTORIJA, J; OLGA, B; DALIA, A; ZANETA, S, *Impact of heavy metals on the oil products biodegradation.* process.Waste Management , Vol.26,No.6,2008,P.500-507 .

[10] HEAD, I. M; MARTIN, J. D; ROLING, W. M, *Marine microorganisms make ameal of oil* .Nature Reviews Microbiology, Vol 4,NO,2006, P.173-182.

[11] NHEAD, I. M; MARTIN, J. D; LARTER, S. R, *Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil*. JOUR VOL , Nature 426 NO,2003,P.344–352.

[12] HAMZA, U. D; MOHAMMED, I.A; IBRAHIM, S. S, *Kinetics of Biological Reduction of Chemical Oxygen Demand from Petroleum Refinery Wastewater*. JOUR Researcher, VOL1,NO.2, 2009.

[13] OJO, O. A, *Petroleum Hydrocarbon Utilization by Native Bacterial Population from a Wastewater Canal Southwest Nigeria*. African Journal of biotechnology, VOL 5,NO.4, 2006, P. 333-337.

[14] VASCONCELLOS, S. P; CRESPM, E; CRUZ, G. F; SENATORE, D. B; SIMIONI, K. M; NETO, E. S; MARSAIOLI, A. G; OLIVEIRA, V. M, *Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin*. Organic Geochemistry. Vol 40, Issue 5,2009, 2009, P.574-588.

[15] FRANZETTI, A. D; GENNARO, P; BESTETTI, G; LASAGNI,, M; PITEA, D; COLLINA, E, *Selection of surfactants for enhancing diesel hydrocarbons-contaminated media bioremediation*. Journal of Hazardous Materials .Vol 152,NO.15, Issue 3, 2008 , 2008, P.1309-1316

[16] BENTO, F. M; CAMARGO, F.O; OKEKE, B. C; FRANKENBERGER, W. T, *Comparativebioremediation of soils contaminated with diesel oil bynatural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Bioresour.* Technol..VOL 96, 2005, 2005, P.1049–1055.

[17] LONG, H, *Wastewater treatment methods and disposal*. 3441, Empire road, U.S.A., 2007. www.water.me.vccs.edu/courses/ENV149/treatment.htm (Accessed 6th December, 2007).

[18] PLAZA, G. A; JANGID, K; LLUKASIK, G. N; JAWECKI, C.J; BERRY, R. L, *Reduction of Petroleum Hydrocarbons and Toxicity in Refinery Wastewater by Bioremediation.* Bull Environ. Contam. Toxicol., 81, 2008. P. 329–333.

[19] LEAHY, J. G; COLWELL, R. R, *Microbial degradation of hydrocarbons in the environment.* American Society of Microbiology. Microbiological Reviews, 54(3), 1990, P. 305-315.

[20] APHA, AWWA, WEF, "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", 20th Ed. Washington, 2000.

[21] API (Analytical Profile Index) 20E, “*Manual Procedure for Bacteriological Identification*”, #2019 2000.

[22] ARABABI, M. N; ANYAKORA, C, *Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Petroleum Contaminated Soils.* Iran. J. Chem. Chem. Eng. Vol. 28, No. 3, 2009

[23] KASTNER, M; BREUER, M. J; MAHRO, B, *Impact of Inoculation Protocols, Salinity, and pH on the Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Survival of PAH-Degrading Bacteria. Introduced into Soil,* Appl. Environ. Microbiol., 64(1), 1998, p. 359

[24] USMAN, D. H; IBRAHIM, A. M; ABDULLAHI, S, *POTENTIALS OF BACTERIAL ISOLATES IN BIOREMEDIATION OF PETROLEUM REFINERY WAST*EWATER. Journal of plied hytotechnology in Environmental Sanitation, Vol 1, N 3, 2012, P .131-138.

[25] QUN, L. XIAN, R. S; JIANS, G. Z; ZHENG, Q. Fan, *Isolation, identification and biodegradation ability of diesel oil degrading Pseudomonas sp. strain C7 from bilge water.* African Journal of Microbiology Research Vol. 6(5), 2012. pp. 1033-1040

[26] MOHAMMAD, R. S; SEYED, B. M; BITA, B. AHMAD , J J, *Isolation and Characterization of Bacteria Degrading n-Hexadecane from Soil. International Conference on Biological and Life Sciences IPCBEE vol.40*, 2012.

[27] ABDULRAHIM,A. Al-ZAHRANI and GABER, M. A. IDRIS. 2010: Biological Treatment of Hydrocarbon Contaminants: Petroleum Hydrocarbon uptake by Pseudomonas alkanolytica. JKAU: Eng. Sci., Vol. 21 No.1 pp: 39-53

[28] ANUPAMA, M. PADMA, S, *Isolation of Hydrocarbon Degrading Bacteria from Soil Contaminated with Crude Oil Spilles*. Indian Journal of Exprimental Biology. Vol. 47, 2009, pp. 760-765.

[29] KHODADOUST, A.P; BAGCHI, R; SUIDAN, M. T; BRENNER, R. C; SELLERS, N. G, *Removal of PAHs from Highly Contaminated Soils Found at Prior Manufactured Gas Operations*. Journal of Hazardous Materials, B80, 2000, p. 159.

[30] MICHAEL, D.; AITKEN , S. C; CHIKOMA, K; RANDALL, B. M, *Bacterial Biodegradation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. SUPERFUND BASIC RESEARCH PROGRAM (http://cmr.sph. unc.edu/SBRP/) , 2004.

31- علي، حسين. *مقارنة كفاءة التحطيم الإحيائي للمركبات الهيدروكربونية في المياه المصاحبة لعمليات الاستخراج النفطي بواسطة نوعين من الأحياء المجهرية (بكتريا وفطريات)* . وزارة العلوم والتكنولوجيا/ دائرة بحوث تكنولوجيا البيئة والمياه، بغداد، العراق، 2011.

[32] KARTHIKA, R; LORIN, G; ARHAYA, S; BHUVANESWARI, R, *Isolation and Identification of Microrganism from Diesel and Petrol Contaminated Soil.* International Journal of Advanced Research (2014), Volume 2, Issue 10, 676-682.

[33] BRINTO, E. Guyoneaud R, M; RANCHOU, A; VERBAERE, A; CRAPEZ, M; WASSERMAN, J; DURAN, u R, *Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay Brazil.* Research in Microbiology ,2006.

[34] ANTHONY, I. *Biodegradation alternative in the cleanup of petroleum hydrocarbon pollutants.* Biotechnology and Molecular Biology, Vol. 1 (2), pp. 2006, P 38-50,

[35] HAMZA, U. D; MOHAMMAED, I. A; IBRAHIM, S, brahim, S, *Identification of Microbial Constituents of Kaduna Petroleum Refinery Wastewater.* Proceedings of NETech Conference, A.B.U Zaria, Nigeria, 1(3), 2008, P 433-436.

[36] ODOKUMA, L. O; DICKSON, A. A, *Bioremediation of a Crude oil Tropical Rain Forest*. Global Journal of Environmental Sciences, 2(1), 2003, P 29-40.