مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية_ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (٤) العدد (٥) 2020
Tartous University Journal for Research and Scientific Studies- basic Sciences Series Vol. (4) No. (5) 2020

عزل وتحديد جراثيم في عينات مياه ملوثة من مصفاة بانياس

أ.د تميم عليا *

أ.م.د أميمة ناصر **

علا الشاخ ***

(تاريخ الإيداع ٢٠٢٠/٩/٢٢. قُبِل للنشر في ٢٨/ ١٠ /٢٠٢٠)

□ ملخّص □

يعد التلوث النفطي مشكلة بيئية خطرة، حيث يشكل ضرراً على البيئة والنظام البيئي، معظم الأبحاث ناقشت قدرة الجراثيم المعزولة على التحلل الحيوي للملوثات النفطية، الهدف من هذه الدراسة هو عزل وانتقاء جراثيم من مياه ملوثة بالمنتجات النفطية في منطقة بانياس، توصلت الدراسة إلى أربع عزلات جرثومية اثنان منها *Bacillus subtilis* ، *Bacillus cereus* صنفت تحت جنس *Bacillus* وعزلة *Staphylococcus aureus* وعزلة *Klebsella pneumonia* وذلك من خلال دراسة الصفات المزرعية، والشكلية والبيوكيميائية، واستخدام مجموعة التحليل أو التشخيص Analytical profile index (API) ، وتقانة الPCR .

كلمات مفتاحية :جراثيم –تلوث– نفط– تقانة PCR – تقانة API

*أستاذ دكتور – قسم الكيمياء البيئية–المعهد العالي لبحوث البيئة–جامعة تشرين–اللاذقية–سوريا

** أستاذ مساعد – قسم الوقاية البيئية– المعهد العالي لبحوث البيئة –جامعة تشرين–اللاذقية–سوريا

***طالبة دراسات عليا (دكتوراه)– قسم الوقاية البيئية–المعهد العالي لبحوث البيئة –جامعة تشرين–اللاذقية–سوريا

مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية_ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (٤) العدد (٥) 2020
Tartous University Journal for Research and Scientific Studies- basic Sciences Series Vol. (4) No. (5) 2020

Isolation And Identification Bacteria In Polluted Water Samples From Banias Refinery

Dr. Tamim Alia*
Dr. Omiema Nasser **
Ola ALshakh***

(Received 22 /9 /2020. Accepted 28/ 10 /2020)

□ABSTRACT □

Petroleum pollution has become a serious environmental problem, which can damage to the environment and ecosystems. Most research were carried out to isolate bacteria for bioremediation of petroleum polluted**.**

The aim behind this study was to determine and select bacteria from polluted water of petroleum contaminated**,** in addition to four genus isolated were obtained. Tow isolated were classified within the genus *Bacillus* and identified as *Bacillus subtilis* ،*Bacillus cereus*, One isolate was classified within the genus *Staphylococcus aureus,* and one isolate was *Klebsella pneumonia*. Through studying macroscopic, microscopic and biochemical characteristics, Analytical profile index (API), and technique PCR.

Key words: Bacteria, pollution , Petroleum, technique PCR, technique API

*Prof.Dr, Department of environmental Chemistry, Higher Institute for Environmental Research,University of Tishreen,Lattkia,Syria
** Prof.Dr,Department Department of environmental prevention, Higher Institute for Environmental Research,University of Tishreen,Lattkia,Syria
***postgraduate student (phd), Department of environmental prevention, Higher Institute for Environmental Research,University of Tishreen,Lattkia,Syria.

1) المقدمة:

تعد مشكلة التلوث النفطي المرافقة لعمليات استخراج النفط ومعالجته ونقله وتكريره مشكلة عالمية قبل أن تكون محلية، لما لها من أثار اجتماعية واقتصادية وبيئية، وأصبحت تحظى باهتمام الباحثين وتستحوذ على جهودهم العلمية والعملية، إذ تعد المعالجة الحيوية من التقنيات الواعدة جداً في هذا المجال، وتتجه الاستراتيجية المستقبلية لمعالجة التلوث النفطي حيوياً باستخدام كائنات حية دقيقة محددة باعتبارها حلاً واعداً عن استخدام مواد غير متجددة وعالية الكلفة [2,1].

كما أن مراقبة مجتمعات الكائنات الحية الدقيقة، وتحديد هويتها من المهام الأساس التي يجب أن تولى الاهتمام، على الرغم من أهمية مراقبة التنوع الحيوي، الذي تم تناوله في دراسات عديدة، إلا أن الدراسات التي ركزت على التعرف على مجتمعات الكائنات الحية الدقيقة الموجودة في المياه النفطية كانت قليلة، إذ تم التعرف على ما يقارب نحو (60) عزلة جرثومية، و(80) عزلة فطرية[3]، حيث أكدت الدراسات أن بنية المجتمعات الجرثومية المعزولة تعتمد في نموها على هذه الملوثات كمصدر وحيد للطاقة والكربون، ولدراسة الكائنات الحية الدقيقة بشكل ناجح، من الضروري تطوير المفاتيح المبسطة المستخدمة في التعرف عليها، وتنفيذ طرائق عزل بسيطة وفعالة ومنخفضة التكلفة[5,4].

2) أهمية البحث:

تأتي هذه الدراسة كمساهمة في مجال التعامل مع الملوثات النفطية بهدف تخفيف عبء التلوث البيئي الناتج عنها، وذلك من خلال عملية الاستقصاء والبحث عن كائنات حية دقيقة قادرة على تحمل ظروف التلوث البيئي بالمخلفات النفطية، حيث تساهم في الحد من صعوبة الحصول على عزلات حيوية نقية ذات كفاءة عالية في خفض التراكيز المرتفعة للملوثات النفطية وخاصة الهيدروكربونية بسبب الحصار في الوقت الراهن على القطر العربي السوري [6].

3) هدف البحث:

1) عزل الجراثيم من الأماكن الملوثة بالمنتجات النفطية.
2) انتقاء جراثيم قادرة على تحمل التراكيز العالية للملوثات النفطية.
3) تحديد قدرة الجراثيم على تحطيم الملوثات النفطية وتحويلها إلى مواد صديقة للبيئة.

4) مواد البحث وطرائقه:

4-1) الاعتيان:

جمعت عينات المياه الملوثة من حوض المعالجة البيولوجية من مصفاة بانياس في محافظة طرطوس في عبوات من البولي ايتيلين معقمة سعة (1) لتر من (4)عينات لـ (3) مواقع بمعدل (3) مكررات لكل موقع خلال الفترات الزمنية الممتدة من أب (2019) إلى نيسان (2020)، ونقلت إلى المختبر مباشرة لبدء عملية العزل والتفريق [7].

4-2) عزل الجراثيم وتفريقها وتوصيفها:

تمت عملية الكشف عن الجراثيم وعزلها، وتحديد هويتها بالاعتماد على الطرائق المعتمدة عالمياً وفق المراحل الآتية [10,9,8]:

4-2-1) مرحلة الإغناء والانتقاء الأولي الجراثيم:

حُضر وسط زراعة لعزل الجراثيم المفككة للمركبات الهيدروكربونية (Bushnell and Haas) (BH)، حيث أضيف لكل (1) لتر من الماء المقطر

K_2HPO_4 (1.0)غ، KH_2PO_4 (1.0)غ، NH_4NO_3 (1.0) غ، $MgSO_4$ (0.2)غ، $CaCl_2$ (0.02) غ، $FeCl_3$ (0.05)غ، وعدلت الـ pH إلى (7.2-7) بإضافة (NaOH, HCl)، وأضيف إلى الوسط الزيت بنسبة (1%) بإعتباره المصدر الوحيد للكربون، أضيفت (3) مل من العينة إلى حوجلة سعة (250) مل يحوي (100) مل من الوسط المحضر سابقاً، وحضنت في حمام مائي هزاز بمعدل (130) هزة في الدقيقة عند درجة حرارة (30) درجة مئوية لمدة (7) أيام [11].

4-2-2) العزل والزرع الجراثومي:

حُضر الوسط المغذي الصلب (Nutrient Agar) (NA) بإذابة (28) غ في (1000) مل من الماء المقطر، وعُقم في جهاز التعقيم (الأتوغلاف) عند درجة حرارة (121) درجة مئوية لمدة (15) دقيقة، وذلك لعزل وتفريق الجراثيم.أخذ (1) مل من وسط (BH) بعد عملية الحضن وزرعت على وسط (NA)، وذلك بعد القيام بسلسلة من التخفيفات حُضنت عند درجة حرارة (30) درجة مئوية لمدة (48) ساعة ، وفُرقت المستعمرات الجرثومية النامية بنقلها وزرعها على أطباق بتري حاوية وسط (NA)، وحُفظت للبدء بدراسة خصائصها الشكلية والبيوكيميائية.

4-3) دراسة خصائص الزرع الجرثومي والنمو والفحص المجهري :

حددّت الجراثيم المعزولة بالخطوات السابقة، من خلال دراسة الصفات العامة على الأوساط الزرعية (شكل المستعمرة ، لونها، ملمسها)، والصفات الشكلية (شكل الخلايا، صبغة غرام، الحركية)، المحددة للأجناس والأنواع، وقد استخدمت نوعين من API ال (API-20E) , (API-Staph) لتسهيل عملية التمييز بين الأنواع.

4-4) توصيف العزلات الجرثومية:

4-4-1) استخلاص الـ DNA الجينومي الجرثومي:

استنبتت المستعمرة الجرثومية المعزولة في وسط الاستنبات في الدرجة (37) درجة مئوية لمدة يوم، وأُخذ (1.5) مل من المستنبت الجرثومي، وثُفل لمدة (20) ثانية بسرعة (9000) دورة بالدقيقة، وضع فوق الراسب الجرثومي (500) ميكرولتر من موقي الـ TE، وأُضيف (50) ميكرو لتر من الليزوزيم (10) ملغ/مل، ورجَّ المزيج جيداً ثم تُرك لمدة ساعتين في حمام مائي، في درجة الحرارة (37) درجة مئوية، وتُرك ليلة كاملة في درجة حرارة (50) درجة مئوية، وأضيف (25) ميكرو لتر من البروتيناز K (20) ملغ/مل ، وحُضن المزيج في الدرجة (37) درجة مئوية لمدة ساعة، وأضيف (25) ميكرو لتر من الـ SDS (25%) مع الحضن لمدة ساعة. أضيف (200) ميكرو لتر من الـ NaCl (5 مول) و (750) ميكرو لتر من المزيج فينول-

كلوروفورم مع المزج الجيد، وتُفل المزيج بسرعة (1300) دورة بالدقيقة لمدة(5) دقائق. أضيف إلى الطافي (الحاوي على المادة الوراثية)(450) ميكرو لتر من الإيزوبربانول، وتفل المزيج بسرعة (13000) دورة بالدقيقة لمدة (45) دقيقة. أُضيف إلى الراسب (1) مل من الإيتانول K (70%) تُفل المزيج بسرعة(1300) دورة بالدقيقة لمدة (5) دقائق في الدرجة (4) درجة مئوية، ثم تُرك الراسب حتى يجف، وأضيف (50) ميكرو لتر من موقي الـ TE وحُفظ المزيج في المجمدة لحين الاستخدام.

4-4-2) تقانة (Polymeerase Chain Reaction) PCR:

حُضر مزيج تفاعل الـ PCR بحجم نهائي (25) ميكرو لتر وفق الآتي:

(0.2 mM dNTPs, 1 µl; Primer 5`20 Pmol/µl, 1 µl; Primer 3`20 Pmol/µl, 1.5 µl; $MgSO_4$ 50mM, 0.2 µl; High fidelity DNA polymerase 5 U, 1X Buffer 10X, H_2O; up to 25 µl)؛ ومُزج بشكل جيد. أضيف إلى المزيج (100ng/µl) من الـ DNA الجينومي المُستخلص.

تم التضخيم وفق برنامج الـ PCR الذي يتألف من خمس وثلاثين دورة، كما هو مُوضح في الجدول (1) :

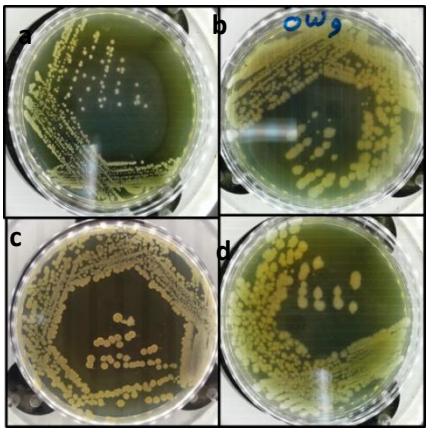
الجدول (1): التضخيم وفق برنامج الـ PCR

	Steps	Temperature	Duration
First denaturation		94°C	3 min
35 cycle	denaturation	94°C	30 sec
	annealing	52-59°C	45 sec
	extension	72°C	1 min
Final extension		72°C	10 min
Hold		4°C	forever

5) النتائج والمناقشة:

5-1) نتائج عزل الجراثيم وتصنيفها:

بعد دراسة كل من الصفات المزرعية والشكلية والبيوكيميائية للعزلات الجرثومية المأخوذة من حوض المعالجة البيولوجية وتصنيفها استناداً للمعايير العالمية وتصنيف بيرجي 2004 ، تم تحديد (4) عزلات جرثومية هي ***(1)Bacillus subtilis، (2)Bacillus cereus (3) Staphylococcus aureus، (4)Klebsella pneumonia***



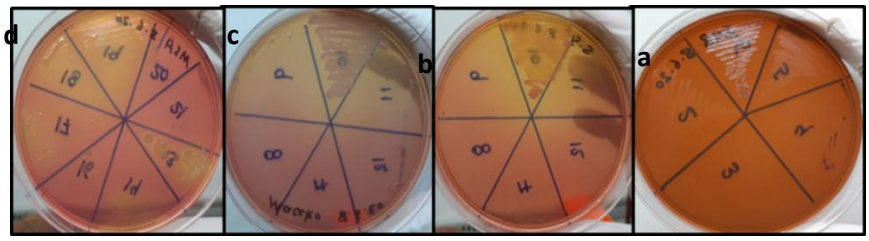
الشكل (1): العزلات الجرثومية النامية على الوسط الزرعي NA ، حيث (a) *Klebsella pneumonia*،
(b) *Staphylococcus aureus* ، (c) *Bacillus subtilis* ، (d) *Bacillus cereus*.

5-2) الصفات المزرعية للعزلات الجرثومية:

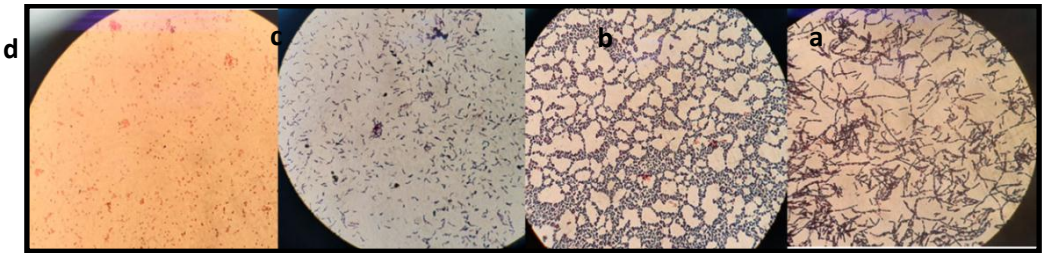
تم استنبات العينات على أوساط عامة واصطفائية ثم أجري لها تلوين غرام، حيث يظهر الجدول خصائص الزرع على المستنبت ولون المستعمرات النامية فكانت نتائج النمو موضحة في الجدول (2) على النحو الآتي:

الجدول (2): نتائج بعض الاختبارات البيوكيميائية للعزلات الجرثومية

العزلة الجرثومية	تلوين غرام	شكل المستعمرات	وسط PEMBA	وسط Macconkey agar	وسط SS	وسط MSA	وسط EMB
Staphylococcus aureus	+	مكورات عنقودية	–	–	–	أصفر	–
Bacillus subtilis	+	عصيات	أصفر	–	–	+	–
Klebsella pneumonia	–	عصورات	–	+	+	–	+
Bacillus cereus	+	عصيات	أزرق	–	–	زهري	–



الشكل (2): (a) وسط الـ EMB ، (b) وسط SS ، (C) وسطMacconkey ، (d) وسط MSA



الشكل(3): صبغة غرام للعزلات (a) *Bacillus cereus*،(b) *Staphylococcus aureus* ، (c) *Bacillus subtilis* ، (d) *Klebsella pneumonia*.

5-3) الاختبارات البيوكيميائية كفاءة API:

5-3-1) مجموعة الجراثيم إيجابيات صبغة غرام:

بعد التأكد من نقاوة المستعمرات تم انتقاء مستعمرات مفردة وحلها بمحلول PBS 1x حسب عكارة Mcfarland 2 ثم أجري لها اختبارات بيوكيميائية باستخدام تقانة الـ API والنتائج موضحة في الجداول (4-5-3).

الجدول (3): الاختبارات البيو كيميائية للعزلة الجرثومية *Bacillus subtilis* باستخدام تقانة API

1	Motility	+	9	Gelatin	+	17	Nitrate	+	25	Lactose	+
2	hemolysis	+	10	Catalase	+	18	VP	+	26	Mannitol	+
3	Growth at 45°C	+	11	Oxidase	+	19	Arabinose	+	27	Mannose	+
4	Growth at 65°C	-	12	Urea	-	20	Cellobiose	+	28	Raffinose	+
5	Growth at pH 5.7	+	13	Arginine	-	21	Fructose	+	29	Sorbitol	+
6	15% NaCl	+	14	Ornithine	-	22	Glucose	+	30	Sucrose	+
7	Anaerobic growth	-	15	Indole	-	23	Glycerol	+	31	Trehalose	+
8	Esculin	+	16	Citrate	+	24	Inositol	+	32	Xylose	+

ومن الجدول يتبين أن الجرثومة رقم (1) هي ***Bacillus subtilis***

الجدول (4): الاختبارات البيو كيميائية للعزلة الجرثومية *Bacillus cereus* باستخدام تقانة API

1	Motility	+	9	Gelatin	+	17	Nitrate	+	25	Lactose	-
2	hemolysis	+	10	Catalase	+	18	VP	+	26	Mannitol	-
3	Growth at 45°C	+	11	Oxidase	-	19	Arabinose	-	27	Mannose	-
4	Growth at 65°C	-	12	Urea	+	20	Cellobiose	+	28	Raffinose	-
5	Growth at pH 5.7	+	13	Arginine	+	21	Fructose	+	29	Sorbitol	-
6	15% NaCl	+	14	Ornithine	-	22	Glucose	+	30	Sucrose	+
7	Anaerobic growth	+	15	Indole	-	23	Glycerol	+	31	Trehalose	+
8	Esculin	+	16	Citrate	+	24	Inositol	-	32	Xylose	-

ومن الجدول يتبين أن الجرثومة رقم (2) هي ***Bacillus cereus***

الجدول (5): الاختبارات البيو كيميائية للعزلة الجرثومية *Staphylococcus aureus* باستخدام تقانة API

1	Colony diameter > 5 mm in 48h	+	9	15% NaCl	+	17	Catalase	+	25	Lactose	+
2	Pigment	+	10	Nitrate	+	18	Oxidase	-	26	Maltose	+
3	Aerobic Growth	+	11	VP	+	19	Arabinose	-	27	Mannitol	+
4	An-aerobic Growth	+	12	Arginine	+	20	Cellobiose	-	28	Mannose	+
5	Growth at 15°C	+	13	Urea	+	21	Fructose	+	29	Raffinose	-
6	Growth at 45°C	+	14	Coagulase-rabbit plasma	+	22	Galactose	+	30	Sucrose	+
7	Hemolysis	+	15	Esculine	-	23	Glucose	+	31	Trehalose	+
8	10% NaCl	+	16	Gelatine	+	24	Glycerol	+	32	Xylose	-

ومن الجدول يتبين أن الجرثومة رقم (3) هي ***Staphylococcus aureus***

5-3-2) مجموعة الجراثيم سلبيات صبغة غرام:

بعد التأكد من نقاوة المستعمرات تم انتقاء مستعمرات مفردة وحلها بمحلول PBS 1x حسب عكارة Mcfarland 2، ثم أجري لها اختبارات بيوكيميائية باستخدام تقانة الصفيحة API ، والنتائج موضحة في الجدول (6).

الجدول (6): الاختبارات الحيوية الكيميائية للعزلة الجرثومية *Klebsella pneumonia* باستخدام تقانة API

1	Motility	-	9	VP	+	17	Indole	-	25	Maltose	+
2	Pigment	-	10	Acetate	+	18	Arabinose	+	26	Mannitol	+
3	Oxidase	-	11	Citrate	+	19	Cellobiose	+	27	Mannose	+
4	Catalase	+	12	Tartrate	+	20	Dulcitol	+	28	Raffinose	+
5	Arginine	-	13	Esculine	+	21	Glycerol	+	29	Sorbitol	+
6	Ornithine	-	14	Gelatine	-	22	Glucose	+	30	Sucrose	+
7	Nitrate	+	15	Urea	+	23	Inositol	+	31	Trehalose	+
8	MR	-	16	P.alanine	-	24	Lactose	+	32	Xylose	+

ومن الجدول يتبين أن الجرثومة رقم (4) هي ***Klebsella pneumonia***

الشكل(4): الشكل العام للصفيحة قبل إجراء الاختبارات

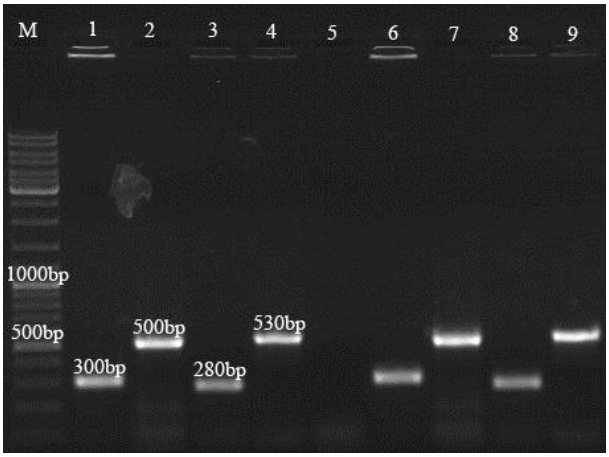
الشكل (5): شكل الصفيحة بعد إجراء الاختبارات

نتائج اختبار تقانة الـ PCR:

تم تصميم المرئسات المستخدمة في هذه الدراسة كما هو مبين في الجدول (7)

الجدول (7): المرئسات المستخدمة في تقانة الـ PCR

	Sequence 5`-3`	Gene	Product size (bp)	Annealing
Bacillus subtilis	TCTGCTCGTGAACGGTGCT	*gyr A*	300	59
	TTTCGCCTTATTTACTTGG			
Klebsiella pneumonia	ACCCACTACGGTCGCGTATG	*16s rDNA*	≈500	58
	CAAGACATCATGGCCCTTAC			
Staphylococcus aureus	GCGATTGATCGTGATACGGTT	*nuc*	280	52
	AGCCAAGCCTTCACGAACTAAAGC			
Bacillus cereus	TGCAACTGTATTACCACAACCT	*groEL*	530	55
	TACCACGAAGTTTGTTCACTACT			



الشكل(6) : هلامة الأغاروز 1%حيث: المسار M الواسم الجزيئي المعياري؛ 1 و 6: *B. subtilis* (عزلة من هذه الدراسة، وسلالة عيارية)؛ 2 و 7: *K. pneumonia* (عزلة من هذه الدراسة، وسلالة عيارية)؛ 3 و 8 *S. aureus* (عزلة من هذه الدراسة، وسلالة عيارية)؛ 4 و9: *B. cereus* (عزلة من هذه الدراسة، وسلالة عيارية).

تبين بعد تصنيف العزلات وفق الطرائق التقليدية وتقانة الصفيحة API وفق الطرائق الحديثة تقانة الPCR أن العزلات هي *Bacillus subtilis*، *Bacillus cereus*، *Klebsella pneumonia*، *Staphylococcus aureus* وهذا يتوافق مع دراسات أخرى، حيث تمكن الباحث (Hamza) عام (2012) من عزل جراثيم *Bacillus subtilis* كجراثيم مفككة للمركبات النفطية.[12]

وبالمقارنة مع دراسة للباحث (Musa) في نيجيريا عام (2015) توصلت دراسته إلى (4) عزلات جرثومية هي *Bacillus subtilis, Microccus Luteus, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis* [13]

6) الاستنتاجات:

- الحصول على (4) عزلات جرثومية هي *Bacillus subtilis*، *Bacillus cereus*، *Klebsella pneumonia*، *Staphylococcus aureus*
- تتميز هذه العزلات الجرثومية بقدرتها على تحمل التراكيز العالية للمركبات النفطية.

التوصيات :

- إمكانية استخدام العزلات الجرثومية *Bacillus subtilis*، *Bacillus cereus*، *Klebsella pneumonia*، *Staphylococcus aureus* في إعادة تأهيل المواقع الملوثة بالملوثات النفطية.
- متابعة العمل على تشخيص وعزل أنواع جرثومية من مياه وترب ملوثة بمشتقات نفطية مختلفة تضاف إلى البنك الوراثي المرجعي ليستفاد منه في تطبيقات حقلية.

المراجع:

[1]Shariati, S.R.P; Bonakdarpour, B; Zare, N; Ashtiani, F.Z. (2011). *The Effect Of Hydraulic Retention Time On The Performance And Fouling Characteristics Of Membrane Sequencing Batch Reactors Used For The Treatment Of Synthetic Petroleum Refinery Wastewater*. Biores. Tech., 102, 7692-7699

[2] Farajnezhad, H; Gharbani, P. (2012).*Coagulation Treatment Of Wastewater In Petroleum Industry Using Poly Aluminum Chloride And Ferric Chloride*. Inter. J. Res. Review. Appl. Sci., 13, 306-310.

[3] Saber, A; Hasheminejad, H; Taebi A; Ghaffari G. (2014). *Optimization of Fenton-based treatment of petroleum refinery wastewater with scrap iron using response surface methodology*. *Appl. Water Sci.*, No.**4**, 283-290.

[4] Al Hashemi,W; Maraqa, M.A; Rao, M.V; Hossain, M.M. (2015). *Characterization And Removal Of Phenolic Compounds From Condensate-Oil Refinery Wastewater*. Des. Water Treat., 54, 660-671

[5] Yuliwati, E; Ismail, A.F; Matsuura,T; Kassim, M.A; Abdullah, M.S. (2011), *Effect Of Modified PVDF Hollow Fiber Submerged Ultrafiltration Membrane For Refinery Wastewater Treatment*. Des., 283, 214-220.

[6] Ehrampoush, M.H; Moussavi, G.H.R; Ghaneian, M.T; Rahimi, S; Ahmadian, M. (2011). *Removal Of Methylene Blue Dye From Textile Simulated Sample Using Tubular Reactor And Tio2/UV-C Photocatalytic Process,* Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng, Vol 8, 35-40.

[7] NEILL,M.;OUINONES,A.;ACKERMAN,L. *Wastewater Sampling*: Operating Procedure. U.S. Environmental Protection Agency Svience And Ecosystem Support Division Athens, Georgia,2007.

fifth edition,1999,Addison weslely lonman, USA.

[9]Darft Syrian standred dss. *Drinking water analysis methods- enumeration of culturable micro-organismis-* colony count by inoculation in nutrient agriculture medium:100.20. 2012.

[10] Holt, J.G. *the shorter bergeys manual of determinative bacteriology*. Eight edition, Williams and wilkins, baltimor.1994.

[11] Laurelta,a.t; Mudiaga,l; Doris ,o.F.(2017*). Bioremediation of Diesel Contaminated Water Using Indigenous Hydrocarbon Degrading Bacteria*. Themed Section: Science and Technology, Vol. 3, NO.1, 352–360.

[12] Hamza1,S; Ibrahim, A; Mohammedand, A.S. (2012).*Potentials Of Bacterial Isolates In Bioremediation Of Petroleum Refinery Wastewater*. Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation, Vol,1. N, 3. 131-138.

[13] Musa,N.M; Abdulsalam,S; Suleiman,A.D.I;, Abdullahi,S.(2015). *Bioremediation Of Petroleum Refinery Wastewater Effluent Via.* Augmented Native Microbes. Journal of Emerging Trends in Engineering and Applied Sciences, 6(1): 1- 6.