مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية_ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (٨) العدد (٦) ٢٠٢٤

Tartous University Journal for Research and Scientific Studies –Basic Sciences Series Vol. (8) No. (6) 2024

عزل وتوصيف جزيئي لبكتريا من ترب ملوثة بالديزل

أ.د. أميمة ناصر*

أ. د. أيمن المريري**

رهف ابراهيم***

(تاريخ الإيداع ٢٠٢٤/٨/٢٧ – تاريخ النشر ٢٠٢٤/١٢/٢٢)

□ ملخّص □

تم عزل وتنميط نوعين من البكتريا المعزولة من تربة ملوثة بالديزل في محافظة حماه خلال الفترة الممتدة من (١-٢٠/٥/٢٠٢٣)، وميزت العزلات البكتيرية ببعض الخصائص اعتماداً على تلوينها بطريقة غرام، وتبعاً للخصائص اللونية على الأوساط الزرعية العامة والنوعية والانتقائية، وبعض الخصائص الكيميائية الحيوية والبيولوجيا الجزيئية PCR.

بينت النتائج عزل نوعين من البكتريا وهذه العزلات هي (A) عصيات الزائفة سالبة غرام، والنوع (B) العصوية الرقيقة إيجابية غرام، وذلك خلال فترة حضانة استمرت (٢٤-٤٨) ساعة، عند درجة حرارة (٣٧) مئوية.

الكلمات المفتاحية: جراثيم، الزائفة، العصوية الرقيقة، تلوث، ديزل، البيولوجيا الجزيئية .

***أستاذ في المعهد العالي لبحوث البيئة في جامعة تشرين.**

****أستاذ في الهيئة العامة للطاقة الذرية السورية.**

*****طالب دراسات عليا (دكتوراه)**

مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية_ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (٨) العدد (٦) ٢٠٢٤

Tartous University Journal for Research and Scientific Studies –Basic Sciences Series Vol. (8) No. (6) 2024

Isolation and molecular characterization of bacteria from diesel-contaminated soil

Dr. Omiema Nasser [*]
Dr. Ayman Almriri [**]
Rahaf Ibrahem [***]

(Received 27/8/2024.Accepted 22/12/2024)

□ABSTRACT □

Two types of bacteria were isolated from diesel-contaminated soil in Hama Governorate were isolated and genotyped during the period extending from (1-20/5/2023), and the bacterial isolates were distinguished by some characteristics based on their staining using the Gram method, and according to the color characteristics of the general, specific and selective culture media.some biochemical properties, and molecular biology PCR.

The results showed the isolation of two types of bacteria. These isolates are (A) Gram-negative *Pseudomonas putida*, and (B) Gram-positive *Bacillus subtilis*, during an incubation period that lasted (24-48) hours, at a temperature of (37) C°.

Keywords: bacteria, *pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*, pollution, diesel, molecular biology (PCR).

[*]Professor in Higher Institute for Environmental Research in Tishreen University,
[**] Doctor in the Atomic Energy Commission in Syria
[***]PHD student

المقدمة:

تعد الملوثات النفطية، وخاصة المركبات الهيدروكربونية في الديزل، إحدى أخطر المشكلات البيئية الحالية التي تتعرض لها الكائنات الحيوة والمكونات غير الحية في النظام البيئي، حيث يستخدم في العديد من مولدات الكهرباء كوقود (Head *et al.*,2006; Zargar *et al.*, 2022) يظهر زيت الديزل في درجة حرارة الغرفة بشكل سائل منخفض الذوبان في الماء، قليل اللزوجة، قابل للاشتعال بأكسجين الهواء. درست مكونات عينة وقود الديزل من قبل العديد من شركات الوقود والطاقة والباحثين باستخدام مقياس الامتصاص الطيفي، وبينت النتائج أنه يتكون بشكل رئيس من الهيدروكربونات التي تتراوح من (C8–C22) إلى جانب تراكيز مختلفة من الهيدروكربونات كالبنزين والتولوين والإيثيل، ويشمل ذلك: الألكانات المتفرعة كالبارافينات، السيكلو ألكانات كالنفثينات، الهيدروكربونات العطرية متعددة النوى كالنفثالين والألكينات كالأوليفينات والتي تؤثر على الخصائص الحيوية والفيزيوكيميائية للتربة، حيث يغير نفوذيتها، ويخفض درجة تهويتها، وبالتالي انخفاض معدل نمو النبات فيها، مما ينعكس سلباً على الزراعة والاقتصاد . (Zhnga *et al.*,2007; Varjani *et al.*,2017)

لقد ارتبطت الأمراض والأضرار التي لحقت بالجهاز التنفسي والعصبي للإنسان بالمنتجات البترولية كالديزل، فقد يحدث التعرض المباشر للديزل أثناء تعبئة السيارات بالوقود أو العمل في صناعة البترول إلى إصابتهم بالعديد من الأمراض، مثل: التهاب الجلد، تلف الأعضاء الداخلية (كالرئتين، والكبد، والكلى، والأمعاء)، السرطان، الاضطرابات العصبية، بالإضافة إلى دوار وغثيان وصداع نتيجة استنشاق بخاره
. (Mandal *et al.*, 2012; Naila, 2015; Titah *et al.*, 2018)

تمت معالجة الترب الملوثه بزيت الديزل بطرائق فيزيائية وكيميائية دون فائدة تذكر (Zhang *et al.*, 2007)، لذلك اتجهنا نحو المعالجة الحيوية في إطار مايسمى التكنولوجيا الخضراء للمواقع الملوثة بالهيدروكربونات، حيث تعد الجراثيم أكثر الكائنات الحية الدقيقة كفاءة في تفكيكها(Carpintero *et al.*, 2017; AL–Hawash *et al.*, 2018)، وتستخدم لتفكيك المواد السامة إلى مركبات أقل سمية أو غير سامة ومواد أخرى مثل: ثاني أكسيد الكربون، الأحماض الدهنية والماء، من أجل الحصول على الطاقة والمواد الغذائية (Nwadinigwe and Onyeidu, 2012). تعد هذه الطر يقة من أفضل الطرائق لأنها صديقة للبيئة، وذات تكاليف منخفضة .

(Trindade *et al.*, 2005; Al–Dhabi *et al.*, 2020; Goveas *et al.*, 2022). توصلت العديد من الدراسات إلى سلالات جرثومية تابعة لأجناس مختلفة قادرة على تفكيك المركبات الهيدروكربونية مثل *Pseudomonas* sp. و Bacillus sp. و *Klebsiella* sp. و *Micrococcus* sp. تم توصيف هذه الجراثيم وفق تقنية البيولوجيا الجزيئية التي تعتمد على إكثار نسخ الحمض النووي (DNA) خارج النظام الحيوي، (أي في المختبر)، حيث يتم استنساخ قطعة محددة من الحمض النووي ومضاعفة إنتاجها من أجل إجراء اختبارات ودراسات إضافية عليها (Kalliopii *et al.*, 2006; Phulpoto *et al.*, 2016) .

أهمية وأهداف البحث

أهمية البحث:

تكمن أهمية هذه الدراسة في عزل سلالات جرثومية من ترب ملوثة بالديزل متكيفة مع البيئة المحلية وقادرة على تفكيك المركبات الهيدروكربونية، يمكن استخدامها وتوظيفها لاحقاً في المعالجة الحيوية، خاصة بعد تفاقم مشكلة التلوث النفطي في الوضع الراهن في الجمهورية العربية السورية، نتيجة تراكم كميات كبيرة من هذه الملوثات خلال

السنوات الأخيرة، الأمر الذي يشكل عبئاً بيئياً واقتصادياً وصحياً، لذا نسعى إلى اعتماد، واستثمار طريقة آمنة بيئياً وذات مردود اقتصادي.

أهداف البحث:

- عزل وتحديد هوية جراثيم من تب ملوثة بزيت الديزل.
- تنميط الجراثيم المعزولة باستخدام الطرائق الوراثة الجزيئية (PCR).

مواد وطرائق البحث:

١-جمع العينات:

جمعت عينات التربة من عدة مواقع في محطة تعبئة وقود (سلحب) في محافظة حماه من شهر شباط من العام (2022) حتى شهر حزيران من العام (2023). وضعت العينات في أكياس من البولي إيتيلن وأخذت العينات من عمق (5-15) سم بوساطة أداة حادة معقمة. نقلت إلى المختبر لعزل وتصنيف الجراثيم. (Garrity *et al.*, 2005; Vos *et al.*, 2009)

٢- عزل الجراثيم:

أخذ (1) غ من التربة في بالون يحوي (9) مل ماء مقطر معقم حيث مزجت جيداً، ورجّت (٥) دقائق، ورشّحت. أخذ منها بوساطة ماصة معقمه (1) مل، نقلت كمية من الرشاحة بوساطة أبرة الزرع الجرثومي، وزرعت بطريقة الفرش على الأوساط الزرعية المغذية العامة والنوعية والانتقائية مثل (Nutrient agar, Nutrient Broth، Macconkey agar ، Motility agar ، Eosin Methylene Blue agar(EMB) .(Holt, 1994; Atlas, 1984)

٣- الطرائق التقليدية لتصنيف العزلات الجرثومية:

صنفت الجراثيم وفق الطرائق التقليدية اعتماداً على دراسة الصفات العامة على الأوساط الزرعية (شكل المستعمرة، لونها وملمسها، لزوجتها، حوافها وارتفاعها) والصفات الشكلية (شكل الخلايا، أبعادها)، تلوينها بصبغة غرام (عصوية، كروية) ونمط التجمع (مفرد، ثنائي، سلسلي، عقدي، عنقودي)، الحركة. والصفات الحيوية الكيميائية كاختبار (الأوكسيداز، الكاتالاز، اليوريا، الأندول، تخمر السكر، السترات .....) المحددة للأجناس والأنواع وفق الطرائق المعتمدة مرجعياً (Holt.,1994; Cappuccino.,1999)، حيث أجريت الاختبارات بعد الحصول على مستعمرات نقية مستفردة بطريقة التخطيط البسيط والمتعامد، وحضنت بدرجة حرارة (37) درجة مئوية لمدة (24) ساعة. تمت مراقبة النتائج لمدة (٤٨) ساعة. بالاعتماد على دليل بيرجي(Garrity *et al.*, 2005; Garrity *et al.*, 2004; Vos *et al.*, 2009)

4-الطرائق الوراثية لتصنيف السلالات الجرثومية المعزولة:

صنفت الجراثيم وفق طريقة البيولوجيا الجزيئية اعتماداً على محتواها من الأحماض النووية وتسلسلها، وتتمتع هذه الطريقة بدقة أكبر في تنميط الجراثيم، والتي تمتلك تنوعاً واختلافاً كبيرين في المادة الوراثية يساعدان في تمييزها عن بعضها، حيث يتم ترحيل المادة الوراثية للجراثيم على هلامة ويطبق عليها ضمن الرحلان الكهربائي (gel-electrophoresis) بعد القيام بعملية تضخيم مورثي لمورثة محافظة (Sunita *et al.*, 2013; Subathra *et al.*, 2013)

4-١- استخلاص الـ DNA الجينومي البكتيري:

استنبت مستعمرة بكتيرية معزولة في سط الآغار المغذي، وحُضنت في الدرجة ٣٧°م لمدة ليلة كاملة.

أخذ ١.٥ مل من المستنبت البكتيري وثُقِّل بسرعة ١٤٠٠٠ دورة/د لمدة ٥ دقائق.

وضع ٥٧٦ مكل من موقي الـ TE فوق الراسب البكتيري، ثم أضيف ٣٠ مكل صوديوم دوديسيل سلفات (SDS 10%) و٣ مكل بروتيناز K (20 مغ/مل) وحضن بحرارة ٣٧°م لمدة ساعة مع الرج ١٠٠٠ دورة/د.

أضيف ٨٠ مكل من محلول CTAB NaCl و١٠٠ مكل من كلوريد الصوديوم (٥ مول) ومزجت جيداً وحضنت بحرارة ٦٥°م لمدة ساعة.

أضيف حوالي ٧٠٠ مكل من كلوروفورم إيزوأميل الكحول (١:٢٤) ومزج جيداً وثفل لمدة ٥ دقائق بالسرعة القصوى ١٤٠٠٠ دورة/د.

نقل الطافي إلى أنبوب جديد وأضيف له حوالي ٦٠٠ مكل كلوروفورم إيزوأميل الكحول (١:٢٤:٢٥) ومزج جيداً وثفل لمدة ٥ دقائق بالسرعة القصوى ١٤٠٠٠ دورة/د.

نقل الطافي إلى أنبوب جديد وأضيف له سدس حجمه من الإيزوبروبانول ومزج بلطف حتى بدء ترسب خيوط الدنا ثم ثفل لمدة ٥ دقائق بالسرعة القصوى ١٤٠٠٠ دورة/د.

رمى الطافي وغسل الدنا بـ ١ مل من الإيتانول ٧٠% وثفل لمدة ٥ دقائق بالسرعة القصوى ١٤٠٠٠ دورة/د.

رمى الطافي وجفف الراسب باستخدام جهاز تركيز الحموض النووية في الهي العامة للطاقة الذرية السورية.

أضيف ٢٠ مكل من موقي الـ TE، وحفظ المزيج في المجمدة (-٢٠°م) لحين الاستخدام.

(Caio *et al.*, 2014; Green and Sambro, 2017).

٤-٢- تصميم المرئسات:

صُممت المُرَئِّسات لمورثة *gyrB* في جينوم العامل الممرض *P. putida* (الجدول ١)، وذلك بالمقارنة مع تسلسل هذه المورثة *gyrB* في عدة أنواع جرثومية باستخدام برنامج Genious في هيئة الطاقة الذرية قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية على اعتبار أن هذه المورثة هي من المورثات المحافظة ضمن هذا النوع الجرثومي.

تم تنميط الأنواع الجرثومية العائدة للعصوية الرقيقة *B. subtilis* بالاعتماد على الكشف عن مورثات محافظة (مورثة *gyrA*) ضمنها باستخدام مرئسات لهذه المورثات (Fazelikia *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022) وتضخميها باستعمال تقانة التضخيم التسلسلي وهذه المورثات موضحة في الجدول.

الجدول (1) المرئسات المستعملة في تفاعل التضخم المتسلسل

Bacteria	Sequence 5`-3`	Gene	Tm°C	Size bp
Pseudomonas putida	CGCCGATGGCTGTTGTCGGT	*gyrB*	55	480
	CCGTGGTCGCCACCTTGTTCT			
Bacillus subtilis	TCTGCTCGTGAACGGTGGT	*gyrA*	53	300
	TTTCGCCTTATTTACTTGG			

٤-٣- التفاعل السلسلي للبوليميراز Polymerase chain reaction (PCR):

وضع في أنبوب التفاعل: x مكل (١ – ٠.٢ مكغ) من الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين، الـ DNA (المُحَضَّر من عينات الجراثيم المعزولة) مع ١ مكل من البادئة اليسرى للمورثة (١٠

بيكومول/للتفاعل)؛ و١ مكل من البادئة اليمنى للمورثة؛ بالإضافة إلى ١ مكل من dNTPs و٢ وحدة

أنزيمية من أنزيم الـ DNA بوليميراز و٣ مكل من $MgSO_4$ و٥ مكل من موقي الـ 10X. يُتَمَّم الحجم

النهائي للتفاعل إلى ٥٠ مكل بإضافة الماء المقطر.

استغرقت مدة التفاعل حوالي ٣٥ دورة في جهاز الـ PCR ضمن البرنامج الآتي:

١. مرحلة فك تضاعف خيط الدنا: ٩٥°م لمدة ٥ دقائق.

٢. مرحلة التضخيم ٣٥-٣٧ دورة: ٩٥°م لمدة ٣٠ ثانية، 52-65°م لمدة ١ دقيقة، ٧٢°م لمدة ١ دقيقة.

٣. مرحلة الاستطالة: ٧٢°م لمدة ١٠ دقائق.

تمت إضافة شاهد سلبي بحيث يُحَضَّر المزيج كاملاً ولكن عوضاً عن الـ DNA يُضاف الماء.

كما هو موضح في الجدول (٢) (Linacre & Templeton, 2014).

٤-٤- الرحلان الكهربائي:

أخذ ١ غ من الآغاروز ويُحل في ١٠٠ مل من الـ TAE 1X (pH 7).

أذيب الآغاروز في الميكروويف حتى تمام الذوبان.

حضَّرت عينات الـ DNA المراد ترحيلها باستعمال بفر التحميل ٦X بحجم نهائي يساوي ١٥ مكل.

أضيف (وبحذر شديد) إلى الهلامة السائلة ٣ مكل من بروميد الإيتيديوم لإظهار عصائب الترحيل.

وضعت أمشاط الرحلان، ثم تُصب الهلامة مع الحفاظ على عدم ظهور فقاعات وعلى تمام استقامة

الهلامة وتُترك لتجف.

نقلت الهلامة بعد تحريرها إلى وعاء الرحلان، وأُضيف موقي الرحلان بشكل يغمر الآبار المتشكلة.

وضع الواسم الجزيئي Marker والعينات في الآبار.

غطِّي جهاز الرحلان وتُجَهَّز الإلكترودات بحيث تم تمرير التيار الكهربائي من القطب السالب إلى القطب الموجب، ويُشَغَّل الجهاز بشدة ٨٠ أمبير لمدة ساعتيْن تقريباً.

فحص الهلامة بواسطة جهاز الـ gel documentation الذي يُظهر العصائب.

الجدول (٢) المواد المستخدمة في التفاعل التسلسل للبوليميراز

Materials	Volume	Final conc.
Buffer 10X	2.5 µl	1X
MgSO4 (50 mM)	1.5 µl	3 mM
dNTPs (10 µM)	1 µl	0.4 µM
Taq DNA polymerase (5U)	0.2 µl	1 U
Primers (10 µM)	2 µl	0.8 µM
DNA (100 ng)	2 µl	
H2O	15.8 µl	
Total volume	25 µl	

استخدام جهاز التدوير الحراري PCR من شركة Techne TC-512 وأجري التفاعل باستخدام البرنامج الحراري كما هو موضح في الجدول (٣):

الجدول (٣) البرنامج الحراري المستخدم

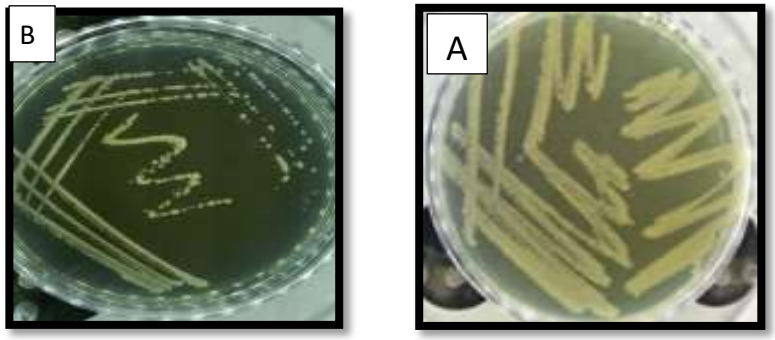
Steps		Tm °C	Time
First denaturation		95	3 min
35 cycle	Denaturation	95	30 sec
	Annealing	53-55	45 sec
	Extension	72	1 min
Final extension		72	10 min
Hold		4	∞ min

النتائج والمناقشة:

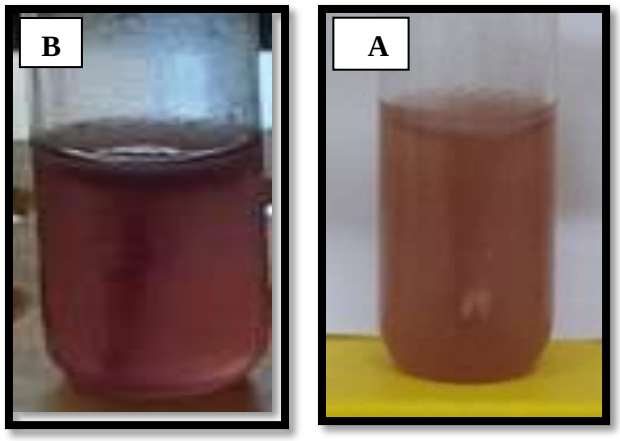
١- نتائج الزرع الجرثومي والفحص المجهري:

بينت النتائج بعد دراسة كل من الصفات المزرعية والشكلية للجراثيم المعزولة من التربة الملوثة بالديزل. تم تصنيف عزلتين جرثوميتين (A) *Pseudomonas putida* و (B) *Bacillus Subtilis* كالآتي (Whitman *et al.*, 1984)

نمت العزلة الجرثومية (A) على وسط الآغار المغذي بشكل مستعمرات بلون بني مصفر، حيث كانت ذات ملمس ناعم، وبلون كريمي مائل للبياض على وسط البسيدوموناس، وبلون وردي على وسط ماكونكي آغار، وقد بدت خلايا هذه العزلة تحت المجهر بعد تلوينها بطريقة غرام بشكل عصيات سالبة صبغة غرام، كما نمت العزلة الجرثومية (B) على وسط الآغار المغذي بشكل مستعمرات بلون أصفر باهت، وأعطت مستعمرات شفافة على وسط الباسيلوس، بدت خلايا هذه العزلة تحت المجهر بعد تلوينها بطريقة غرام بشكل عصيات إيجابية صبغة غرام. الشكل (١). وبينت النتائج أن كلتا العزلتين هما جراثيم متحركة على وسط الحركة، الشكل (٢).



الشكل (1) المستعمرات الجرثومية النامية على وسط الآغار المغذي حيث (A) *P. putida* و(B) *B. subtilis*



الشكل (2) المستعمرات الجرثومية النامية على وسط Motility agar حيث (A) *P. putida* و(B) *B. subtilis*

٢- نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية للعزلات الجرثومية:

أبدت العزلة(A) نتائج إيجابية لبعض الاختبارات الكيميائية الحيوية مثل (الكاتالاز، الأوكسيداز، الغلوكوز)، وسلبية لاختبارات (المانيتول والأندول والنترات) الجدول (٣).

كما أبدت العزلة (B) نتائج إيجابية لبعض الاختبارات الكيميائية الحيوية مثل (الكاتالاز، النترات، السيترات، الغلوكوز، المانيتول)، وسلبية لبعض الاختبارات البيوكيميائية مثل (الأكسيداز واليوريا والآرجنين) الجدول (٤).

الجدول (٣) الاختبارات الكيميائية الحيوية للعزولة الجرثومية (A)

Pseudomonas putida									
Motility	Hemoly	Fluorens	Arginine	H2S	Indole	Nitrate	Ornithine	Esuline	Gelatine
+	–	+	+	–	–	–		–	–
Catalase	Urea	Oxidase	Acetate	Arabino	Citrate	Fructose	Glucose	Glycerol	Inositol
+	–	+	+	+	+	+	+	+	–
Maltose	Mannos	Mannitol	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose	Starch		
–	–	–	–	–	–	–	–		

وقد توافقت نتائج هذه الدراسة مع دراسة (Pawar) في انكلترا (2015) الذي عزل هذه الجراثيم من ترب ملوثة بمركبات هيدروكربونية عطرية، كما توافقت مع نتائج دراسة Qun وآخرون (٢٠١٢) الذين عزلوا هذه الجراثيم من تربة ملوثة بالديزل، وأثبتوا قدرتها على تفكيك المركبات الهيدروكربونية بنسبة (٧٥.٩%) في درجة الحرارة (٣٠) م°، ومع نتائج دراسة Déziel وآخرون (١٩٦٦).

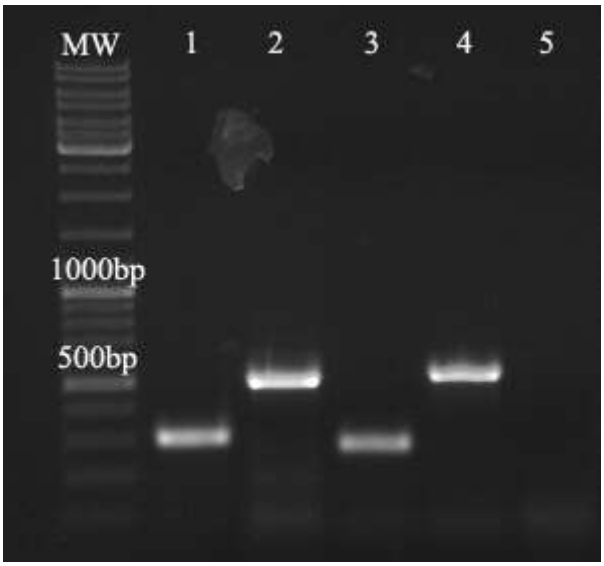
الجدول (٤) الاختبارات الكيميائية الحيوية للعزولة الجرثومية (B)

Bacillus Subtilis									
Motility	Hemoly	Esculin	Gelatin	Starch	Catalase	Oxidase	Urea	Arginine	Ornithine
+	+	+	+	+	+	–	–	–	–
Indole	Citrate	Nitrate	VP	Arabino	Cellobio	Fructose	Glucose	Glycerol	Inositol
–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	Mannitol	Mannose	Maltose	Raffinos	Sorbitol	Sucrose	Trehalos	Xylose	
+	+		+	+	+	+	+	+	

والعزلة الجرثومبة الثانية (B) *Bacillus subtilis* عزلت أيضاً من تربة ملوثة بزيت الديزل، وقد توافقت نتائج هذه الدراسة مع دراسة Wu وآخرون (٢٠٢٣) الذي عزل هذه البكتريا من ترب ملوثة بمركبات نفطية، وتوافقت مع نتائج دراسة Limaa وآخرون (٢٠٢٠) في البرازيل الذين عزلوا هذه الجراثيم من تربة ملوثة بالديزل، ومع دراسة Chikere وآخرون (٢٠١٤) ودراسة Christos وآخرون (٢٠٠٦).

٣-نتائج الطرائق الوراثية لتصنيف السلالات الجرثومية المعزولة:

أظهرت نتائج تحليل نواتج تفاعل البلمرة التي أجري تفاعل PCR للعينات الجرثومية باستخدام مرئسات لمورثات محافظة ضمن الجنس المدروس، إذ تعد هذه المورثة قاعدة تحدد أماكن ارتباط البروتينات الريبوزومية، كما أن لها دور في بدء عملية تركيب البروتينات وتساهم في ربط تحت الوحدتين 30s و50S بالتالي تم التأكيد على أن العزلة الجرثومية (A) هي *P. putida* والعزلة الجرثومية (B) هي *B. subtilis*، كما هو مبين في الشكل (٣).



الشكل ٣: ناتج ترحيل تفاعل PCR على هلامة آغاروز 1%: المسار MW: واسم جزيئي معياري، المسار 1: مورثة *gyrA* لدى بكتيريا *B. subtilis*، المسار 2: مورثة *gyrB* لدى بكتيريا *P. putida*، المسار 3: مورثة *gyrA* لدى بكتيريا *B. subtilis* (عزلة عيارية – هيئة الطاقة الذرية السورية)، المسار 4: مورثة *gyrB* لدى بكتيريا *P. putida* (عزلة عيارية –هيئة الطاقة الذرية السورية)، المسار 5: شاهد سلبي بدون DNA.

توافقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة Veerapagu وآخرون (٢٠١٩) حيث تم عزل *pseudomonas* sp. و *B. subtilis* من تربة ملوثة بالمركبات الهيدروكربونية الناتجة عن التلوث النفطي.

كما أثبتت الدراسات أن العزلة *B. subtilis* من البكتيريا المرافقة لوجود المركبات الهيدروكربونية، وبالتالي تتوافر بصورة طبيعية في البيئات التي تعاني التلوث النفطي بالديزل، بالتالي يمكن استخدامها في معالجة التلوث الناتج عن المركبات الهيدروكربونية (Yengejeh *et al.*, 2014; Obi *et al.*, 2016).

كما أكدت دراسة Abdulla وآخرون (٢٠١٩) بعد أن عزل بكتريا *P. putida* و *B. subtilis* من مواقع ملوثة بالديزل في العراق إمكانية تطبيق المعالجة الحيوية للمركبات النفطية من خلال استخدام هذه البكتريا المعزولة من البيئة المحلية.

الاستنتاجات والتوصيات:

١- تم عزل وتنميط البكتريا الآتية: (A) *P. putida* و (B) *B. subtilis* من العينات الملوثة بالديزل نتيجة عمليات الزرع والتلوين والاختبارات الحيوية الكيميائية.

٢- تم تأكيد تنميط العزلات البكتيرية في اختبار البلمرة المتسلسل PCR.

٣- تعد تقانة PCR من أفضل وأدق الطرائق في تحديد المحتوى الوراثي وتغيراته عند تشخيص البكتريا.

المراجع:

ABDULLA, K.J., ALI, S.A., GATEA, I.H., HAMEED, N.A. AND MAIED, S.K. Bio-degradation of crude oil using local bacterial isolates. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, University of Kerbala, Kerbala City, Iraq. 2019. 17–18 /11/ .

ATLAS, M.R. Microbiology Fundamentals &Applications second edition Maxwell McMillan, NY, U.S.A, 805p. 1984.

AL-DHABI, N.A., ESMAIL, G.A. AND ARASU, M.V. Sustainable conversion of palm juice wastewater into extracellular polysaccharides for absorption of heavy metals from Saudi Arabian wastewater. *Journal of Cleaner Production*, **2020. 277**(2).

AL-HAWASH, A.B., Li, S., ALHUJAILY, A., ZHANG, X., DRAGH, M.A., ABBOOD, H.A. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *Egypt. J. Aquat. Res*, 2018, vol. 44, 71–76.

4- CAIO FERNANDO DE OLIVEIRA; THIAGO GALVÃO DA SILVA PAIM; KELI CRISTINE REITER; ALEXANDRE RIEGER; AND PEDRO ALVES D'AZEVEDO. . Evluation of Four Different and Extraction Methods in Coagulase-Negative Staphylococci Clinical Isolates. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014.Vol. 56, No.1, 29–33.

CARPINTERO-TEPOLE,V; BRITO-DE LA FUENTE, E; AND TORRESTIANA-SANCHEZ, B. Microfiltration of oil in water (O/W) emulsions: Effect of membrane microstructure and surface properties. *Chem. Eng. Res. Des*. 2017.Vol.126, 286.

CHIKERE, CHIOMA BLAISE ; BERTHA EKWUABU, CHIOMA. Culture-dependent characterization of hydrocarbon utilizing bacteria in selected crude oil-impacted sites in Bodo, *Ogoniland, Nigeria*. Department of Microbiology, University of Port Harcourt, P.M.B. 5323, Port Harcourt, Rivers State, Nigeria. 2014.

CHRISTOS MEINTANIS KALLIOPI I. CHALKOU, KONSTANTINOS AR. KORMAS & AMALIA D. KARAGOUNI. Biodegradation of Crude Oil by Thermophilic Bacteria Isolated from a Volcano Island. *springe* , 2006. v 17, p3–9.

DÉZIEL E, PAQUETTE G, VILLEMUR R, LEPINE F, BISAILLON J . Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol*,1966. 62:1908–1912.

FAZELIKIA S., ABTAHI S.A., KARGAR M., JAFARINIA M. Evaluation of effective factors in biocement production by *Bacillus* spp. isolated from lime soils of southern Iran. *Journal of Microbial World*. 2021; 14(3): 20-31. DOI: 10.30495/jmw.2021.690434.

GARRITY G. M.; BELL J. A. AND LILBURN T. G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Edition, *Springer, New York Berlin-Heidelberg*, 401.2004.

GREEN MR, SAMBRO J. Isolating DNA from Gram-Negative Bacteria. *Cold . Spring Harb Protoc*. 2017. Jan 3; (1).

GOVEAS, L.C., SELVARAJ, R., VINAYAGAM, R., ALSAIARI, A.A., ALHARTHI, N.S. AND SAJANKILA, S.P. Nitrogen dependence of rhamnolipid mediated degradation of petroleum crude oil by indigenous pseudomonas sp. WD23 in seawater. *Chemosphere*, 2022. 304(n/a).

GARRITY G. M.; BRENNER D. J.; KRIEG N.R.; STALEY J. T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. *Springer, USA, 2nd Edition*, 2005. Vol. 2, P. 1-1135.

HEAD, M., JONES, D.M., ROLING, W.F. Marine microorganisms makes a meal of oil. *Nat Rev Microbiol*, 2006. vol 4,173–182.

HOLT, J.G. the shorter bergeys manual of determinative bacteriology. Eight edition, Williams and wilkins, baltimor.1994.

LIMAA, S. D. ; OLIVEIRA*A* , A. F. ; GOLIN*A,B* , R.; LOPES*A* , V. C. P. ; CAIXETA*A,B* , D. S. ; LIMA*A,B* , Z. M. ; MORAIS*A,B*, E. B. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated groundwater in the Southern Amazon, Brazil. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Faculdade de Arquitetura, *Engenhariae Tecnologia, Universidade* . 2020.

LINACRE A; TEMPLETON J.E.L. Forensic DNA profiling: state of the art, Res. REP. *Forensic Med*. SCI .2014. Vol. 4, 25 – 36.

LIU Y, ŠTEFANIČ P, MIAO Y, XUE Y, XUN W, ZHANG N, SHEN Q, ZHANG R, XU Z, MANDIC-MULEC I. Housekeeping gene gyrA, a potential molecular marker for *Bacillus* ecology study. AMB Express. 2022; 26;12(1):133. doi: 10.1186/s13568-022-01477-9. PMID: 36287351; PMCID: PMC9606167.

MANDAL, KUMAR; SARMA, MANAB;JEYASEELAN, PAUL ;VEERANNA A ,CHANNASHETTAR ; SINGH, BINA ; LAL1, BANWARI. large scale bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated waste at indian oil reflneries: case studies. Bengal Engineering and Science University, Shibpur, PO: Botanic Garden, Dist: *Howrah, West Bengal, India.* 2012.

NAILA, TASMIN. A Dissertation submitted to brac university in partial fulfilment of the requirements for the degree of bachelor of science in biotechnology. Department of Mathematics and Natural Sciences Biotechnology Programme BRAC University Dhaka, Bangladesh. 2015.

NWADINIGWE, ALFREDA O; ONYEIDU, EKENE G. Bioremediation of Crude Oil- Polluted Soil Using Bacteria and Poultry Manure Monitored through Soybean Productivity. *Pol. J. Environ. Stud*. 2012. Vol. 21, No. 1, 171-176.

OBI, L.U., ATAGANA, H.I. AND ADELEKE, R.A. Isolation and characterisation of crude oil sludge degrading bacteria. *Springer Plus*, 2016. 5(1), 1–13.

PAWAR, M. The Effect of Soil PH on Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHS). University of Hertfordshire.2015.

PHULPOTO, A. H. ; QAZI, M. A. ; MANGI, S; AHMED, S.; KANHAR, N. A. Biodegradation of oil-based paint by Bacillus species monocultures isolated from the paint warehouses. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2016. 13:125–134.

QUN LUO, XIAN-RONG SHEN, JIAN-GUO ZHANG, ZHENG-QIU FAN. Isolation, identification and biodegradation ability of diesel oil degrading *Pseudomonas* sp. strain C7 from bilge water. *African Journal of Microbiology Research* . 2012. Vol. 6(5), pp. 1033-1040.

SUNITA J., VARJANI ; DOLLY P., RANA; BATEJA, S.; VIVEK N., UPASANI. Isolation and Screening for Hydrocarbon Utilizing Bacteria (HUB) from Petroleum Samples. *Department of Microbiology, M. G. Science Institute, Ahmedabad , Gujarat, India*. 2013.

TITAH,HARMIN ;PRATIKNO,HERMAN ;PUTERA,RISKY. Isolation and Screening of diesel Degrading bacteria from ship dismantling facility at tanjungjati . Department of ocean engineering ,faculty of marine technology. 2018.

TRINDADE, P., SOBRAL, L. RIZZO, A. LEITE, S., SORIANO, A. *Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: A comparison study*. Chemosphere, vol. 58, 2005 515–522.

VARJANI, S. J., UPASANI, V. N. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2017.02-6.

VEERAPAGU, M., JEYA, K.R., KALAIVANI, R., JEYANTHI, K.A. AND GEETHANJALI, S. Screening of hydrocarbon degrading bacteria isolated from oil contaminated soil. *The Pharma Innovation Journal*, 8(6), 69–72. 2019.

VOS, P., GARRITY, G., JONES, D., KRIEG, N.R., LUDWIG, W., RAINEY, F.A. AND WHITMAN, W.B. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edition. *United States, New York: Springer science*. 2009.

WHITMAN,W.B., PARTE,A.C.,bergeys manual of systematic bacteriology. springer, 1984. vol. 3.

WU, B., XIU, J., YU, L., HUANG, L., YI, L. AND MA, Y. Degradation of crude oil in a co-culture system of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa. *Front Microbiol*, 2023. 14(n/a).

YENGEJEH, JALIL ZADEH;, SEKHAVATJOU, R.; MAKTABI, M.S.; , KHADIVI, S.; ARBAB SOLEIMANI. The Biodegradation of Crude Oil by Bacillus subtilis Isolated from Contaminated Soil in Hot Weather Areas. Department of Environmental Engineering, Khouzestan Science and Research Branch, *Islamic Azad University, Ahvaz, Iran*.2014.

ZARGAR, A.N., LYMPERATOU, A., SKIADAS, I., KUMAR, M. AND SRIVASTAVA, P. Structural and functional characterization of a novel biosurfactant from *Bacillus* sp. IITD106. *Journal of Hazardous Materials*, 2022. 423(2).

ZHANG, J. Feasibility Investigation Of Oily Wastewater Treatment By Combination Of Zinc And PAM In Coagulation/Flocculation. *J. Hazard. Mater*, 2007. *vol.* 147**,** 991-996.