جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى – كلية الزراعة

التشخيص الجزيئي لبكتريا Rhizobium و Bacillus المستعملة للمعالجة البايلوجية للتربة الملوثة بزيت الغاز

رسالة مقدمة الى مجلس كلية الزراعة في جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في العلوم الزراعية
(قسم علوم التربة والموارد المائية)

من قبل الطالبة
زينب عدنان حسين
بإشراف
أ. د فارس محمد سهيل

1444هـ 2023 م

بِسْمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحْمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

﴿قَالُواْ سُبْحَٰنَكَ لَا عِلْمَ لَنَآ إِلَّا مَا
عَلَّمْتَنَآ ۖ إِنَّكَ أَنتَ ٱلْعَلِيمُ ٱلْحَكِيمُ﴾

صـدَقَ الله الــعَظِيم

سورة البقرة الآية

الاهداء

إلى من وَصفنا بالمؤنسات الغَاليات ذكرتكَ الروحُ حُبّاً و عليكَ القلبُ صلّى

(سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم) .

الى الائمه المعصومين سلأم الله عليهم اجمعين .

الى فقيد قلبي.. لقد حققت الحلم الذي رسمنا يا أبي رغم قسوة فراقك ومافعلتة بنا الحياة لكن اقوى النساء كانت سندي وان كل ماانا عليه الان لانها أمي .

(رحمك الله ياأبي)

الى ملأذي وأماني، نجاتي وهداي ، قوتي في ضعفي ،الذي كلما ضاقت علي الأرض بما رحبت وجدت لديها متسعاً يحتويني ويخفف عني اثقال قلبي .. (أمي حفظها الله ورعاها)

الى الجبل الذي عندما تميل بي الدنيا أسند نفسي عليه عند الشدائد ،كيف لاأحبة ورب الكون قال سنشد عضدك ب أخيك . (الى اخي الغالي)

الى ذلك القلب الصافي كماءٍ عذب يجري في نهر وسط أزهار، ذلك القلب الأبيض كبياض الثلج ونقائه أنتِ روح مُتممة لروحي، أنتِ مرجعي حين ينتابني أي شعور، أنتِ دفتر أسراري.

(الى اختي وعائلتها حفظكم اللة من كل سوء)

الى صاحب القلب الكبير الذي يقدم كل شي بلا كلل اوملل .

(الى خالي ابو رسول وعائلة حفظكم اللة ورعاكم)

كل الرفاق أحبّه ، الا من شهد انهيارك وراهن على نجاتك دائماً ، هذا عزيز الروح .

(الى صديقات العمر: نور، اية ، افنان، حنين، دانيا ، دعاء)

الشكر والعرفان

الحَمدُ لله ربِّ العالمين و صلاةُ الله تُتلى كُل حِين على المحبوب الذي أضاءت قلوب المؤمنين ببركات أنواره و تجلَّت الأرواح في بديع أسراره .

أما بعد أتقدم بجزيل شكري وامتناني للرمز العلمي ومعلمي ومشرفي ومن خط لي الطريق الأستاذ الركتور **فارس محمد سهيل** لاقتراحه موضوع الرسالة والاشراف عليها ولما بذله من جهد وتوصيات سديدة ومتابعة مستمرة طيلة مدة الدراسة ، أتمنى له دوم الصحة والتوفيق .

واقدم شكري وأمتناني الى عمادة كلية الزراعة ورئاسة قسم علوم التربة والموارد المائية لدعمهم لي طول مدة الدراسة ، كما اتقدم بشكري الى اساتذتي الافاضل في قسم علوم التربة والموارد المائية والشكر موصول الى **(الدكتور علاء حسن ،والدكتور محمد علي عبود ، والدكتور احمد بهجت)** لمواقفهم النبيلة خلال مدة الدراسة .

كما اتوجه بخالص شكري وأمتناني الى الدكتور **نزار سليمان** على كل ماقدمه لنا من توجيهات ومعلومات قيمة ساهمت في أثراء موضوع دراستنا في جوانبها المختلفة ، كما اتقدم بشكري الى اعضاء لجنة المناقشة على تلبية دعوة المناقشة ، ونشكر من تحملة منهم عناء السفر وأخص بالذكر الأستاذ الدكتور **أدهام علي من محافظة الانبار** .

واخص بالشكر والامتنان الى الصديق الذي كان لي بمثابة الأخ والرفيق الداعم كنت أجد يدك هي أول يد تمتد لتخرجني من ضيقي وهمي **(عوف عبدالرحمن الجبوري)** ...

ولا انسى ان اقدم شكري الى زملائي في الدراسة لما قدمو لي من يد العون طول مدة البحث واخص بالذكر **(يوسف ، ميعاد ، مصطفى ، ياسر)**..

ومسك الختام اهدي شكري ودعائي الى كل من غاب اسمه وحضر فضله ، والى كل من مد يد العون والمساعدة ولم يبخل علي بنصيحة او دعاء .

زينب عدنان

الخلاصة

أجريت اربعة تجارب، الثلاثة الأولى تجارب مختبرية والتجربة الرابعة تجربة بايلوجية ، فضلا عن عزل وتشخيص بكتريا Rhizobium وBacillus بتقنية PCR ، نفذت التجربتان المختبريتان الأولى والثانية بهدف دراسة تأثير مستويات مختلفة من زيت الغاز في نشاط عزلات Rhizobium وخليط عزلات من بكتريا Bacillus تحت مدتي حضن و قابليتها على انتاج المستحلب الحيوي في الاوساط الصناعية السائلة الحاوية على مستويات من الزيت، وأجريت التجربة المختبرية الثالثة بهدف دراسة قدرة العزلات البكتيرية المعزولة محليا على تحلل زيت الغاز عن طريق تحرير CO_2 وبيان المتبقي منه ،اما التجربة الرابعة فقد نفذت في اصص بهدف دراسة قدرة العزلات البكتيرية ونبات الهرطمان على المعالجة الاحيائية والنباتية للتربة الملوثة بمستويات من زيت الغاز وتأثيرهما في نمو نبات الهرطمان.

تضمنت التجربة المختبرية الأولى على 30 معاملة نتجت من تداخل ثلاثة عوامل، الأول : التلقيح البكتيري لأربعة أنواع من Rhizobium (اللوبيا *Vigna anguiculata* L (R_1) والباقلاء *Vicia faba* (R_2) والفاصوليا Phaseolus (R_3) و الماش Vigna radiate (R_4) و خليط من بكتريا(*B. megaterium*، *B.pumilus*، *B.lichenitormis*، *B.amylolilguefaciens*) (B) ، والعامل الثاني : زيت الغاز وبثلاثة مستويات (0 و2 و4)% والعامل الثالث : مدة الحضن (4و8) أيام ، وتضمنت التجربة المختبرية الثانية و الثالثة والرابعة (تجربة الاصص) على 18 معاملة نتجت من تداخل عاملين، الأول: التلقيح البكتيري(6 معاملات)، والعامل الثاني : مستويات زيت الغاز (0 و2 و4) ، أظهرت النتائج:

1- انخفاض أعداد جميع العزلات معنويا بزيادة مستويات زيت الغاز من 0% الى (2%و4%) وعند الحضن في 4 أيام ، وسجلت العزلة (R3) أعلى الاعداد وأقلها عند المستوى 0% و4% ، اذ بلغت (65.5 و 20.0)*10^6 cfu ml^{-1}على الترتيب ، وسجلت العزلة R2 اعلى الاعداد عند المستوى 2% ولمدة حضن 8 أيام ، اذ بلغت (60.0)*10^6 cfu مل$^{-1}$. و

2- سجلت بكتريا Bacillus عند المستوى 0% أعلى تركيزآ للمستحلب الحيوي بلغ (27.75) ملغم لتر$^{-1}$، في حين سجلت عزلة الرايزوبيا (R4) وعند المستويين (2%و4%) أعلى تركيزآ للمستحلب الحيوي اذ بلغ (22.65و17.30) ملغم لتر $^{-1}$ على الترتيب .

3- سجلت أعلى كمية من CO_2 المتحررة عند المستوى(4%) ولجميع المعاملات، وقد اعطت عزلة الرايزوبيا (R4) عند المستوى(4%) أعطت أعلى كمية متحررة، اذ بلغت (390.40) ملغم 100 غم$^{-1}$ تربة ، وسجلت عزلة بكتريا Bacillus والعزلة R4 أقل كمية متبقية من زيت الغاز في التربة اذ بلغت (0.45 و1.25)مل 100 غم$^{-1}$تربة من أصل(2 و4)مل مضاف على الترتيب ، وسجلت عزلة بكتريا Bacillus وعزلة الرايزوبيا R4 أعلى كمية تحلل، اذ بلغت (1.55 ،2.75)مل من أصل (2و4) مل مضاف .

4- تفوقت عزلة الرايزوبيا (R4) في معدل ارتفاع النبات والوزن الجاف وطول الجذر، اذ سجلت (46.33سم، 8.57غم نبات$^{-1}$،29.22سم)على الترتيب، وسجلت عزلة Bacillus أعلى وزنآ جاف اذ بلغ (17.53و 5.40و3.66) غم نبات $^{-1}$عند المستوى(0% و 2% و 4%)على الترتيب ، وسجلت عزلتا الرايزوبيا (R1 و R4) أعلى عددآ للعقد الجذرية عند المستوى 2و 4% اذ بلغت (66.33 و 19.41) عقدة أصيص$^{-1}$ على الترتيب.

5- تفوقت عزلة Bacillus وعزلة الرايزوبيا (R4) أعلى كمية ممتصة بالنبات ، اذ سجلتا 89.89 و89.30)مل اصيص$^{-1}$ ، وسجلت عزلة Bacillus أعلى معدلآ ممتص من قبل نبات الهرطمان عند المستوى 4% ، اذ بلغت (198.83)مل اصيص$^{-1}$.

6- حققت العزلتان R4 و R3 اعلى نسبة للازالة الكلية، اذ بلغت 72.11 و64.94 % عند المستوى(2و4)% على الترتيب .

7- تفوقت بكتريا Bacillus بأعلى عدداً للبكتريا الكلية والبكتريا المذيبة للفوسفات اذ بلغ (31.55، 9.74)*10^6 cfu غم$^{-1}$تربة جافة على الترتيب ، في حين تفوقت عزلة (R3) في تسجيل أعلى عدداً للبكتريا المثبتة للنتروجين والتي سجلت(8.54)*10^6 cfu غم$^{-1}$ تربة جافة.

8- أظهرت نتائج تشخيص العزلات البكتيرية باستعمال تقنية PCR الحصول على 14 عزلة بكتيرية من مجموع (18) عزلة ، منها (12) عزلة من بكتريا الرايزوبيا و(2) من بكتريا. Bacillus ، اذ اظهرت (12) عزلة من الرايزوبيا قريبة للنوع *Rhizobium leguminosarum* ، والعزلتين من بكتريا. Bacillus قريبة من النوع *Bacillus pseudomycoides* استنادا إلى التتابع الوراثي لـ16S ribosomal RNA gene، وان عزلة Bacillus رقم (16) من *Bacillus pseudomycoides* تسجل لأول مرة بالعراق سجلت بأسم B.zafm حسب بيانات بنك الجينات National center for Biotechnology information(NCBI)

المحتويات

التسلسل	الفقرة	الموضوع	رقم الصفحة
1		الخلاصه	i
2	1	المقدمة	1
3	2	مراجعة المصادر	5
4	1-2	زيت الغاز	5
5	2-2	تلوث بيئة التربة بالمشتقات النفطية	5
6	3-2	تكنلوجية معالجة المشتقات النفطية	7
7	1-3-2	المعالجة الحيوية	7
8	1-1-3-2	التقنية النباتية أو المعالجة النباتية	8
9	2-1-3-2	المعالجة البيولوجية	11
10	3-1-3-2	المعالجة الاحيائية النباتية	13
11	4-2	بكتريا الرايزوبيا	16
12	1-4-2	صفات وفعاليات الرايزوبيا	16
13	2-4-2	دور الرايزوبيا في تحلل المشتقات النفطية	17
14	5-2	بكتريا Bacillus	18
15	1-5-2	صفات وفعاليات Bacillus	18
16	2-5-2	دور بكتريا Bacillus في تحلل المشتقات النفطية	20
17	6-2	تأثير المشتقات النفطية على نمو النبات	21
18	7-2	المستحلبات الحيوية	23
19	8-2	تفاعل سلسلة البلمرة (PCR)	25

20	9-2	استعمالات PCR	26
21	3	المواد وطرق العمل	27
22	1-3	المواد	27
23	1-1-3	الأجهزة المستعملة	27
24	2-1-3	المواد الكيميائية	28
25	2-3	طرائق العمل	30
26	1-2-3	تنشيط العزلات لبكتريا الرايزوبيا وBacillus	30
27	2-2-3	التجارب المختبرية	30
28	1-2-2	التجربة المختبرية الاولى	30
29	2-2-2	التجربة المختبرية الثانية	31
30	3-2-3	التجربة المختبرية الثالثة	32
31	3-2-3	التجربة البايلوجية	35
32	1-3-2-3	عوامل التجربة	35
33	2-3-2-3	تلقيح بذور نبات الهرطمان	37
34	3-3-2-3	تلويث التربة بزيت الغاز	38
35	4-3-2-3	تنفيذ التجربة	39
36	5-3-2-3	تحليل التربة الكيميائية والفيزيائية والاحيائية قبل الدراسة	40
37	6-3-2-3	الصفات والقياسات المدروسة	42
38	1-6-3-2-3	القياسات النباتية	42
39	1-1-6-3-2-3	ارتفاع النبات	42
40	2-1-6-3-2	حساب الوزن الجاف للجزء الخضري	42
41	3-6-3-2-3	طول الجذر	43
42	4-6-3-2-3	عدد العقد الجذرية ووزنها	43

43	3-2-6-3-2-	القياسات الكيميائية	43
44	3-2-6-3-2-1	كمية الهيدروكربونات الممتصة في المجموع الخضري للنبات	43
45	3-2-6-3-2-2	كمية الممتصة بالمجموع الجذري	43
46	3-2-6-3-2-3	كمية الممتصة بنبات الهرطمان	43
47	3-2-6-3-2-4	كمية الهيدروكربونات المتبقية بالتربة	43
48	3-2-3-6-3	عزل بكتريا الرايزوبيا من العقد الجذرية لنبات الهرطمان	44
49	3-2-3-6-4	تنقية عزلات بكتريا الرايزوبيا	44
50	3-2-3-6-5	عزل بكتريا Bacillus	45
51	3-2-3-6-6	تنقية وحفظ العزلات بكتريا Bacillus	45
52	3-2-3-6-3-7	تشخيص العزلات البكتيرية بوساطة تفاعل البلمرة PCR	46
53	3-2-2-7-3-8	التحليل الاحصائي	50
54	4	النتائج والمناقشة	51
55	4-1	التجارب المختبرية	51
56	4-1-1	التجربة المختبرية الاولى	51
57	4-1-1-1	تأثير مستويات مختلفة من زيت الغاز في اعداد الخلايا البكتيرية تحت مدد حضن مختلفة	51
58	4-1-2	التجربة المختبرية الثانية	56
59	4-1-2-1	قابلية العزلات البكتيرية من بكتريا الرايزوبيا وخليط بكتريا Bacillus على انتاج المستحلب الحيوي	56
60	4-1-3	التجربة المختبرية الثالثة	58
61	4-1-3 - 1	تحلل زيت الغاز بوساطة انواع من جنس الرايزوبيا وخليط من بكتريا Bacillus في تربة ملوثة من خلال قياس كمية CO_2 المتحرر	58

62	2-3-1-4	كمية زيت الغاز المتبقية في التربة	61
63	3-3-1-4	كمية ونسبة زيت الغاز المحللة ميكروبيا	63
64	2-4	التجربة البايلوجية	66
65	1-2-4	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في ارتفاع النبات	66
66	2-2-4	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في الوزن الجاف للمجموع الخضري	69
67	3-2-4	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في طول الجذر	71
68	4-2-4	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في عدد العقد الجذرية الفعالة	73
69	5-2-4	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في وزن العقد الفعالة	76
70	6-2-4	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في في كمية زيت الغاز الممتصة بالجزء الخضري لنبات الهرطمان	78
71	7-2-4	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغازفي كمية زيت الغاز الممتصة بالجزء الجذري لنبات الهرطمان	80
72	8-2-4	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغازفي كمية زيت الغاز الممتصة بواسطة نبات الهرطمان	83
73	9-2-4	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus .	85

	ومستويات زيت الغاز في كمية زيت الغاز المتبقية بالتربة		
74	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا . Bacillus ومستويات زيت الغاز المحللة ميكروبيا	10-2-4	87
75	كمية زيت الغاز المضافة والمزالة والمتحللة والمتبقي في التربة	11-2-4	90
76	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في الغازفي اعداد البكتريا الكلية	12-2-4	92
77	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا . Bacillus ومستويات زيت الغاز في الغازفي اعداد البكتريا المثبتة للنتروجين	13-2-4	94
78	تأثير انواع من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في الغازفي اعداد البكتريا المذيبة للفوسفات	14-2-4	96
79	تصنيف وتشخيص العزلات	15-2-4	98
80	تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للعزلات البكتيرية	1-15-2-4	98
81	الاستنتاجات والتوصيات	5	110
82	الاستنتاجات	1-5	110
83	التوصيات	2-5	111
84	المصادر	6	112
85	المصادر العربية	1-6	112
86	المصادر الاجنبية	2-6	116
87	الملاحق	7	157

ثبت الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
1	الأجهزة المستعملة في التجربة المختبرية	27
2	المواد الكيميائية المستعملة	28
3	الصفات الكيميائية والفيزيائية والحيوية للتربة المستعملة في الدراسة	36
4	معاملات التجربة	37
5	بعض صفات زيت الغاز	39
6	مكونات العدة وبلد المنشأ	48
7	المواد المستعملة في تفاعل PCR	49
8	تسلسل البادئ المستخدم في تضخيم PCR	49
9	البرتوكول المستعمل في جهاز PCR	49
10	تأثير مستويات مختلفة من زيت الغاز في اعداد الخلايا البكتيرية تحت مدد حضن مختلفة	55
11	قابلية العزلات البكتيرية من بكتريا البرايزوبيا و Bacillus على انتاج المستحلب الحيوي	57
12	تحلل زيت الغاز بوساطة انواع من الرايزوبيا وخليط Bacillus في تربة ملوثة من خلال قياس كمية CO_2 المتحررة	60
13	كمية زيت الغاز المتبقية بالتربة من تحلل مستويات زيت الغاز بوساطه انواع من بكتريا Rhizobium و خليط من بكتريا Bacillus (مل 100 غم $^{-1}$ تربة)	61
14	كمية ونسبة زيت الغاز المحللة مبكروبيا بوساطة انواع من بكتريا Rhizobium و خليط من بكتريا Bacillus(مل 100 غم $^{-1}$ تربة) .	64
15	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا ألـ Bacillus ومستويات زيت	68

	الغاز في ارتفاع النبات (سم)	
16	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillusومستويات زيت الغاز في الوزن الجاف للمجموع الخضري.	69
17	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillusومستويات زيت الغاز في طول الجذر.	73
18	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium و بكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في عدد العقد الجذرية الفعالة.	75
19	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في وزن العقد الفعالة	76
20	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في كمية زيت الغاز الممتصة بالجزء الخضري لنبات الهرطمان	80
21	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في كمية زيت الغاز الممتصة بالجزء الجذري لنبات الهرطمان	82
22	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في كمية زيت الغاز الممتصة بنبات الهرطمان	84
23	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في كمية زيت الغاز المتبقية بالتربة	87
24	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في كمية زيت الغاز المحللة ميكروبيا	89
25	كمية زيت الغاز النفط المضافة والمزالة والمتحللة في التربة .	91
26	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في اعداد البكتريا الكلية($cfu10^6$ غم تربة جافة	93
27	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز	95

	في اعداد البكتريا المثبتة للنتروجين($cfu10^6$ غم تربة جافة)	
28	تأثير عزلات من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus ومستويات زيت الغاز في اعداد البكتريا المذيبة للفوسفات	97
29	نتائج PCR ونتائج الترحيل الكهربائي DNA	100
30	نتائج تشخيص العزلات البكتيرية باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسلPCR 16S ribosomal RNA gene	101
31	تقدير الاختلاف التطوري بين التسلسلات لبكتريا Rhizobium	103
32	تقدير الاختلاف التطوري بين التسلسلات لبكتريا Bacillus	104

ثبت الاشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
1	الترحيل الكهربائي للهلام لاستخراج الحامض النووي الجيني من العينات البكتيرية على هلام الاكروز 1٪	99
2	شجرة التقارب الوراثية من تحليل MEGA X لعزلات الرايزوبيا المختلفة	102
3	شجرة التقارب الوراثية من تحليل MEGA X لبكتريا Bacillus	104

ثبت الملحقات

رقم الملحق	العنوان	رقم الصفحة
(1)	مستخلص الخميرة(YEM) Yeast extract	156
(2)	وسط الاكار المغذي (N.A Nutrien agar	156
(3)	وسط الاملاح المعدنية (BHM) Bushnell–Haas medium	157
(4)	و سط Pikovskaya s Medium	157
(5)	بيانات NCBI	158
ملحق(6)	الصور	159
صورة (1)	نمو العزلات : A تمثل النمو لمدة حضن 4 ايام ، B :تمثل النمو لمدة حضن 8 ايام .	159
صورة(2)	أثناء تسحيح بالحامض HCl للتجربة المختبرية الثالثة لقياس الـ CO2	160
صورة(3)	اثناء فترة التزهير لنبات الهرطمان	161

المقدمة

Introduction

يعد التلوث النفطي من أخطر أنواع التلوث بسبب الكميات الهائلة التي تلقى من النفط الخام ومنتجاته الى المحيط الحيوي وما يحتويه من مركبات سامة وضارة ، فساعد بذلك على تلوث الماء والهواء وأفسد التربة الزراعية ، فقد أدت التنمية الصناعية من زيادة انتاج البترول والصناعات البتروكيمياوية الى عدد من التأثيرات السامة التي تتعرض لها التربة والناتجة عن الانسكابات النفطية (Ahmed واخرون،2017) وتمتد هذه التأثيرات السامة إلى النباتات وديدان الأرض والى كل صور الحياة.

فقد تزايدت مشكلة تلوث التربة على مستوى العالم فاصبح عدد المواقع الملوثة بالهيدروكربونات رقما مخيفا، فقد أدى زيادة التلوث الى اختزال مساحات الاراضي الصالحة للزراعة ، لذا تعد معالجة الهيدروكربونات البترولية الملوثة للبيئة احد الاهداف الهامة لتجنب ضرر المحيط الحيوي، وهذا ما جعل التفكير في ايجاد حلول للتخلص من خطورة هذا التلوث بطريقة امنة لضمان صحة البيئة و سلامتها ، اذ وجد ان انجح طريقة لتحليل المركبات البترولية هي المعالجة البايولوجية والتي يمكن تصنيف استراتيجياتها إلى معالجة ميكروبية (تشمل المجتمعات الميكروبية) ومعالجة نباتية / جذرية (تشمل النباتات والمجتمعات الميكروبية)، اذ أن المعالجة الميكروبية والنباتية هما استراتيجيتان رئيسيتان للمعالجة الحيوية ، فعالتان في معالجة التربة الملوثة بالهيدروكربونات البترولية (Danil و Nna ، 2016).

تتم المعالجة الميكروبية باستخدام الكائنات الحية الدقيقة التي لها القدرة على استغلال مركبات الكربون الموجودة في النفط كمصدر للطاقة اللازمة لها ، اذ يمكن استخدام أنواعآ من البكتريا في ازالة التلوث

النفطي للتربة (الحمادي،2014a) ، اذ تعد التربة بيئة ملائمة لنمو وتكاثر انواع كثيرة من الكائنات الحية الدقيقة ومنها البكتريا ، اذ ان هناك انواع من الاجناس البكتيرية عزلت من المناطق الملوثة بالنفط الخام ومشتقاته لديها القدرة الانزيمية لاستخدام الهيدروكربونات النفطية كمواد غذائية وتحويلها الى غاز ثاني اوكسيد الكاربون وماء، وبذلك يتم تفكيكها وتحويلها الى مواد أخرى أقل سمية وأقل خطر على البيئة (Ukiwe واخرون ،2013)، ولهذا استخدمت التقنيات البيولوجية التي يطلق عليها عملية التحلل الحيوي Bioremediation في ازالة هذه الملوثات وتخليص البيئة منها .

أن التداخلات الرئيسة بين النباتات واحياء التربة المجهرية التي تحدث اثناء معالجة الجذور تنتج من افرازات جذور النباتات التي تحفز البكتريا المحللة للهيدروكربونات وتساعد على امتصاص الملوثات المرتبطة بجزيئات التربة ، مما يجعلها متاحة أكثر للبكتريا الجذرية المعززة لنمو النباتات Plant Growth– Promoting Rhizobacteria (PGPR) من خلال قدرتها على زيادة نمو الجذور عن طريق انتاج الهرمونات النباتية او توفير العناصر الغذائية ، أذ تعرف هذه العلاقة التكافلية باسم معالجة الجذور وهي مزيج من المعالجة البيولوجية و النباتية ، اذ عدت المعالجة الجذرية هي الاستراتيجية الأكثر نجاحًا وفعالية من حيث التكلفة ، اذ تعمل على إزالة جميع أنواع الملوثات النفطية (Lijuan ،2012).

تعد بكتريا الرايزوبيا من اكثر الاحياء التي لها القدرة على تثبيت النتروجين مع المحاصيل البقولية وتمتلك القدرة البيئية العالية لخفض تركيز الهيدروكربونات البترولية والملوثات العضوية مما يجعلها مفيدة لاعادة تأهيل التربة الملوثة لان عملها التأزري مع النباتات البقولية يعزز نمو النبات ويوفر خيارا واعدا لازالة الملوثات (Hao واخرون ، 2014). كما يعد جنس Bacillus من اجناس البكتريا التي لها القدرة

العالية على تحلل المشتقات النفطية في البيئات الملوثة لذلك تستطيع النمو في البيئات المختلفة (Dubey واخرون ،2020).

تتم دراسة الرايزوبيا باألساليب الجزيئية من اجل تحديد العلاقات بينه، وتحديد أنواع الرايزوبيا باستعمال PCR واستعمال وسائل الفحص الوراثي بصورة ادق وللكشف عن أنواع بكتريا الرايزوبيا عن طريق تحديد برايمرات PCR لأنواع الرايزوبيا على أساس تحليل تسلسل 16s RNA مقارنة مع متواليات او بيانات ثابتة بواسطة DNA ويتم الكشف عن الأشكال والأنواع عن طريق DNA بين سالالت من نفس النوع باستعمال PCR لتقيم تنوع الرايزوبيا وتبين REP و ERIC المتسلسل موجود في الرازوبيا وغيرها من بكتريا التربة السالبة لصبغة كرام وانها يمكن ان تستعمل في تصنيف البكتريا عن طريق استعمال PCR وعملية االأستنساخ والتمييز بين البكتريا من حيث الأنواع والسلاسل(Ahmad واخرون ،2013) .

ولعدم وجود دراسات في العراق حول المعالجة الجذرية بوساطة نبات الهرطمان (الجلبان) *Lathyrus Sativus* L.الذي يعد من المحاصيل البقولية العلفية المهمة ، ومن النباتات العشبية المفضلة للاستخدام في المعالجة الجذرية بسبب معدل نموها المرتفع والسريع ولها كتلة حيوية كبيرة، فضلا عن كونها اكثر تكيفا مع الضغوط البيئية والبايولوجية و باستعمال عدة انواع من الرايزوبيا وخليط من انواع من بكتريا Bacilus للتربة الملوثة بزيت الغاز هدفت الدراسة الى :

1- معرفة تأثير مستويات مختلفة من زيت الغاز في اعداد خلايا عزلات الرايزوبيا و خليط من انواع من بكتريا Bacillus تحت مدد حضن مختلفة ودراسة قابليتها على انتاج المستحلب الحيوي في الأوساط الصناعية السائلة .

2- امكانية تحلل زيت الغاز بوساطة انواع من الرايزوبيا وخليط من انواع بكتريا Bacillus وبيان نشاطها عن طريق تحرير CO_2 وبيان المتبقي من زيت الغاز .

3- معرفة تأثير عزلات البكتريا الرايزوبيا وخليط من انواع Bacillus وزيت الغاز في نمو نبات الهرطمان وتحديد امثل العزلات في اصابة النبات وفعاليتها في المعالجة الاحيائية والجذرية للتربة الملوثة بمستويات مختلفة من زيت الغاز.

4- تشخيص أنواع من بكتريا Rhizobium وبكتريا Bacillus بتقنية PCR .

2- مراجعة المصادر

Literature Review

2-1 زيت الغاز (Gas oil)

ان زيت الغاز هو سائل قابل للذوبان يتكون من خليط فاخر من الهيدروكربونات ذات الأوزان الجزيئية المتنوعة والمركبات العضوية السائلة البديلة وقد يكون سائلاً بلزوجة مخففة أويكون عالي اللزوجة ، وتكون كثافتة(1-1.7) غم م$^{-3}$ ويتكون من كاربون (83-87%) و الهيدروجين (10-14 %) والأوكسجين (0.05-1.5 %) و النتروجين (0.1-2 %) وكبريت (0.05-6%) (Hyne ، 2001) .ويعد احد المشتقات النفطية التي تساهم في تلوث التربة مع ازدياد الطلب عليه كوقود للسيارات والشاحنات والمولدات والمكائن الصناعية لكونه ينقل عبر مسافات طويلة مما يجعله معرض لحوادث التسرب ليصل الى الترب ويلوثها (Milic واخرون، 2009).

2-2 تلوث بيئة التربة بالمشتقات النفطية

يعتمد النشاط البشري على المشتقات البترولية لتلبية احتياجاته من الطاقة ومع ذلك فان استخدامها يؤدي الى تدهور البيئة وتلوثها (Xue، 2015) ، اذ أنها أخطر المواد وأكثرها انتشارا في التربة ، اذ تعد ملوثات بيئية موجودة على نطاق واسع في انظمة البيئة في الماء والهواء والتربة والرسوبيات (Liang واخرون ، 2017)، اذ يتم ادخالها الى البيئة طبيعيا من خلال التسربات النفطية وتصريف الهيدروكربونات البترولية اثناء خزنها ونقلها وتكريرها او المصادر البشرية مثل النفايات الصناعية البتروكيمياوية ونفايات معالجة قطران الفحم (Kuppusamy واخرون ، 2017) ، فضلا عن الانفجارات اثناء تطوير حقول المشتقات من خلال التسريب من الخزانات (Wang واخرون ، 2018)، اذ تطلق الملوثات على شكل

غازات الى البيئة المحيطة مما تسبب أخطارآ محتملة على السكان وكذلك الكائنات الحية الدقيقة (Ball، 2013) ، فقد بين Gonzalez-Gaya واخرون، (2019) أن المشتقات النفطية مواد غير متحللة وتمتص من قبل المواد العضوية ولكن يصعب تحللها ، لذا يجب اعادة تدوير الانسكابات الكبيرة أو التخلص منها بأكبر درجة ممكنة، ولكن في بعض الحالات من الصعب استعادة المواد المنسكبة مما تؤدي الى بقائها في المنطقة الملوثة وتشكل خطرآ مستمرآ على البيئة ، وهذا يدل على ان هناك تهديد مستمر اينما يتم استخدام المشتقات النفطية عندعدم القدرة على التعامل مع البيئات الملوثة خاصة في الظروف القاسية (Lea-Smith واخرون، 2015).

ان التربة هي العنصر الاساسي في الأنظمة البيئية الأرضية فقد توجد فيها غالبية التنوع البيولوجي للنباتات والحيوانات الأرضية ، اذ ان تلوثها بالهيدروكربونات يجعلها غير ملائمة لحياة عدد من الكائنات الحية كالنباتات والحيوانات والاحياء المجهرية وغير صالحة للزراعة كما أن المياه الملوثة تكون غير صالحة لسقي النباتات والحيوانات (Selim ، 2013) ، وان تلوث التربة والمياة بالمشتقات النفطية يشكل قلقآ عالميآ لاسيما في البلدان التي تزدحم بالسكان وتكمن خطورتها كونها مركبات مسرطنة وسامة (Mohammedواخرون، 2017) .

ان المشتقات النفطية الناجمة عن الحوادث المتكررة لها تأثير هائل في خصائص الوسط البيئي الملوث وتكمن خطورتها في كمياتها التي تلقى الى المحيط ، اذ ان احتراق نفط المصافي ذات تأثير سلبي على حيوية ومكونات التربة (Bao واخرون، 2014) ، اذ لايمكن ازالة الهيدروكربونات بدون تكسر شديد او هدرجة تفاعلات ، اذ تؤدي اضافتها للتربة الى تغليف دقائق التربة بحيث تصبح كارهة للماء فلايستطيع الماء الدخول الى دقائق التربة ، وان انخفاض الامتصاص يزداد بزيادة اضافة الملوثات الى