



دولة ليبيا  
وزارة التعليم العالي والبحث  
العلمي جامعة سبها - كلية العلوم  
قسم النبات



بجث مقدم لاستكمال متطلبات الحصول على درجة البكالوريوس

بعنوان:

---

---

عزل وتشخيص بكتريا (Bacillus) من الترب الملوثة بالنزيت و استجابتها

للمضادات الحيوية

---

---

اعداد الطالبات

جود يوسف حسن

فايزة عبد الله أبو بكر اخويط

إشراف الأستاذة/ حواء عمر فتح الباب

العام الجامعي: 2020\_2021

# الآية القرآنية

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ  
يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا اتَّقُوا اللَّهَ حَقَّ تَقَاتِهِ لَعَلَّكُمْ تُرْحَمُونَ

وَأَطِيعُوا أَمْرَ اللَّهِ وَأَطِيعُوا أَمْرَ الرَّسُولِ وَأَطِيعُوا أَمْرَ إِمَامِهِ ع  
وَأَطِيعُوا أَمْرَ الْوَالِدِ الطَّيِّبِ وَالْطَّيِّبَاتِ وَالْطَّيِّبَاتِ وَالْطَّيِّبَاتِ

(الآية 88) سورة هود

الإهداء

إلى سراج الأمة المنير وشفيعها النذير البشير.....

محمد (صلى الله عليه وسلم)

إلى من علمني العطاء بدون انتظار .

إلى من أحمل اسمه بكل افتخار .

أرجو من الله أن يمد في عمرك لترى ثماراً ربما حان قطافها بعد طول انتظار وستبقى كلماتك نجوم أهتدي فيها

اليوم وفي الغد وإلى الأبد .

(والدي العزيز)

إلى ملاكي في الحياة .

إلى معنى الحب وإلى معنى الحنان والتفاني .

إلى بسملة الحياة وسر الوجود .

إلى من كان دعائها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي إلى أغلى الحبايب .

(أمي الحبيبة)

إلى ملاذي وقوتي وسندي بعد الله سبحانه . . . وتوائم روحي من عشت معهم أجمل الذكريات .

(إخوتي وأخواتي)

إلى القلعة الحصينة التي ألتجأ إليها عند شدتي .

(صديقاتي)

## كلمة الشكر

إن أيا إنجاز أو نجاح قد يصل إليه الشخص مهما كان المجال المعني ليس بمجهود فردي بحد ذاته إنما هو حصيلة جهود جماعية من

عدة أشخاص مختلفي المواهب والقدرات . فمن هذا المنطلق أتقدم بحالص الشكر والتقدير والامتنان إلى أساتذتنا

الفاضلة:

أ. / (حواء عمر فتح الباب)

لقبولها الإشراف على هذا البحث والتي منحتنا من وقتها وجهدها وفيض علمها الشيء الكثير والتي كانت نصائحها

وتوجيهاتها القيمة الضوء الذي أثار لنا الدرب ورسم لنا طريق النجاح ما يجعلني مدينة لها بهذا العرفان طيلة حياتي و

فأسأل الله العليّ القدير أن يجعل هذا البحث في ميزان حسناتها .

كما أتقدم بآيات الشكر والتقدير لجميع أساتذتي الكرام (في قسم علم النبات) كما يسعدني أن أعبر عن خالص شكري

وتقديري لكل موظفات وفنيات المعامل بالقسم .

## فهرس المحتويات

رقم الصفحة	المحتويات	ر.ت
أ	الآية القرآنية	.1
ب	الإهداء	.2
ج	كلمة الشكر و التقدير	.3
<b>الفصل الأول</b>		
2	المقدمة	.4
4	الدراسات السابقة	.5
5	الهدف من الدراسة	.6
<b>الفصل الثاني</b>		
7	مواد وطرق العمل	.7
7	موقع الدراسة	.8
7	المواد المستخدمة	.9
8	جمع العينات	.10
9	تحضير الأوساط	.11
10	طريقة العمل	.12
10	تشخيص العينات	.13
11	الاختبارات الكيميائية الحيوية	.14

### الفصل الثالث

16	النتائج والمناقشة	.15
24	التوصيات	.16
26	الخلاصة	.17
	الفصل الرابع	
27	المراجع	.18

## فهرس الجداول

رقم الصفحة	الجدول	ر.ت
7	جدول (1) يوضح الأجهزة والأدوات المستعملة في الدراسة	.1
8	جدول (2) يوضح الأوساط الزراعية المستخدمة في الدراسة	.2
8	جدول (3) يوضح الكواشف والصبغات المستخدمة في الدراسة	.3
14	جدول (4) يوضح المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة	.4
20	جدول (5) يوضح الخصائص المورفولوجية للمستعمرات البكتيرية المعزولة المكونة للأبواغ	.5
20	جدول (6) يوضح الصفات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية المكونة للأبواغ	.6
21	جدول (7) يوضح نتائج اختبار الحساسية	.7

## فهرس الأشكال

رقم الصفحة	الأشكال	ر.ت
17	شكل (1) يوضح نمو البكتيريا على وسط Nutrient agar	.1
17	شكل (2) يوضح اختبار السترات	.2
18	شكل (3) يوضح تخمر البكتيريا لسكر اللاكتوز	.3
18	شكل (4) يوضح بكتيريا Bacillus-subtilis تحت المجهر	.4
19	شكل (5) يوضح بكتيريا Bacillus Macerans تحت المجهر	.5
19	شكل (6) يوضح بكتيريا Bacillus cereus تحت المجهر	.6
19	شكل (7) يوضح بكتيريا Bacillus badius تحت المجهر	.7
21	شكل (8) يوضح منطقة التثبيط	.8
23	شكل (9) يوضح الشاهد	.9
23	شكل (10) يوضح منطقة التثبيط	.10



## الفصل الأول

### المقدمة

أدى تطور التكنولوجيا في القرن العشرين إلى زيادة حادة في استهلاك النفط في العالم إذ يتم استخراج النفط بكميات هائلة من باطن الأرض , ثم ينقل النفط المستخرج بواسطة وسائل نقل برية أو بحرية أو بواسطة أنابيب طويلة إلى مناطق مختلفة حيث يتم استغلاله كمصدراً للطاقة ومادة خام أساسية في صناعات مختلفة للعديد من المركبات والمنتجات الكيميائية ، وأثناء المراحل المختلفة من التعامل مع النفط من استخراج ونقل ومعالجة واستعمال قد تحصل أخطاء تؤدي إلى تلوث البيئة.. وتقف الصناعة النفطية وراء العديد من المشاكل البيئية التي تتعرض لها التربة والناجحة عن انسكاب وتلوث أسطح التربة بالمواد النفطية . لقد أدى إهمال الإنسان وسعيه وراء التكنولوجيا الحديثة إلى الإخلال بالتوازن الطبيعي للبيئة المحيطة به, فساعد بذلك على تلوث الماء والهواء وأفسد التربة الزراعية ( AL-Dobouni , 1977) و( AL-Sayigh , 1978) و (Lai , 2001) هذا ما جعل التفكير في إيجاد حلول لتخلص من خطورة هذا التلوث وبطريقة صحية من الأمور الهامة لضمان صحة وسلامة البيئة وقد وجد أنّ أنجح طريقة لتحليل النفط هي بواسطة بكتيريا لها القدرة على استغلال مركبات الكربون الموجودة في النفط كمصدر للطاقة اللازمة لها , حيث يمكن استخدام البكتيريا في مكافحة التلوث النفطي للتربة مثل استعمالها في البقع النفطية البحرية , وهناك الكثير من أنواع البكتيريا لديها القدرة الأنزيمية لاستخدام الهيدروكربونات النفطية كمواد غذائية وتحويلها إلى غاز ثاني أكسيد الكربون وماء , إلى جانب المواد الخلوية , مثل البروتينات والأحماض النووية , وبذلك يتم تفكك هيدروكربونات النفط الخام وتحللها مما يعد فائدة عظيمة لتحويلها إلى أصناف

أخرى أقل سمية وخطراً على البيئة . (عبدالرزاق ، 2012 ) و (عزيز وآخرون 2012)

## 1-1 المخاطر الناجمة عن التلوث بالنفط الخام ومشتقاته:

مع ازدياد عمليات إنتاج واستهلاك النفط زادت مخاطر التلوث البيئي الذي وصل إلى السطوح المائية والتراب , والتلوث النفطي من أشد أنواع التلوث خطورة بسبب الكميات الهائلة التي تلقى من النفط الخام ومنتجاته إلى المحيط الحيوي وما يحتويه من مركبات سامة وضارة (الخفاف وخضير, 2000) وتمتد التأثيرات السامة لهيدروكربونات النفط الخام إلى النباتات وديدان الأرض (Wilson et al.,2002) و (Juteau et al., 2003) ويحدث سنوياً ما يقارب 14000 حالة تدفق للنفط الخام إلى المحيط الحيوي وهذا يعكس حجم المخاطر البيئية الناجمة عن وصول كميات هائلة من النفط الخام إلى المحيط الحيوي (Zhus et al ., 2004) و (Philips, 2003)

## 1.2 بكتريا Bacillus Cereus

تمتاز الخلايا البكتيرية التابعة لجنس Bacillus بكونها عصوية الشكل ، ( Rod shape ) ، مفردة ، مستقيمة ، متحركة بمجموعة من الاوساط المحيطة بها فالنوع Bacillus Cereus يقارب طوله ما بين 1.5 - 2.5 مايكرومتر و أحيانا قد يصل الى 3.5 مايكرومتر ، موطنها الطبيعي التربة و هي موجبة لصبغة جرام تنمو هوائيا و أختياريا و تتميز بتكوينها سبوراً مركزي الموقع اهليجي الشكل و تستطيع النمو في بيئات ملحية و تتحمل مستوى ملوحة يتراوح بين 2% الى 25% من ملح كلوريد الصوديوم ، و تكون أبواغ هذه البكتريا مقاومة لدرجات الحرارة العالية اذ تستطيع تحمل درجة حرارة تصل الى 70م لمدة 10 دقائق و تتحمل تركيز 50 % من الكحول الايثيلي لمدة ساعة واحدة و تمتلك حبيبات دهنية مكونة من مادة ( b- hydroxyl- ) . (Poly- butyrate

### 1.3 الخصائص العامة:

يكون شكلها على هيئة شريط مع حواف مستديرة يبلغ عرضها حوالي 1ميكرون وطولها 2-3 ميكرون. تم العثور عليها بشكل فردي أو سلاسل صغيرة.

عند تعرضها لعملية الصبغ . تأخذ البكتيريا اللون البنفسجي النموذجي للبكتيريا الموجبة الغرام. هذا يرجع إلى الببتيدوغليكان الموجود في جدار الخلية.

ومن ناحية أخرى, عندما تزرع البكتيريا على أجار الدم, لوحظ نمط انحلال دم كامل . هذا يضعها ضمن مجموعة بكتيريا بيتا الحالة للدم, القادرة على التسبب في تحلل كامل لكريات الدم الحمراء .

### 1.4 الأمراض التي تسببها:

بشكل عام تعتبر البكتيريا العصبية آمنة وغير ضارة للإنسان. ومع ذلك, نظراً لوجودها في التربة وفي أمعاء بعض الحيوانات, فمن الممكن أن تصيب بعض الأطعمة.

على الرغم من ذلك , فقد تم توثيق حالات قليلة جداً من التسمم الغذائي بهذه البكتيريا. يشير معظمها إلى المرضى الذين يعانون من كبت المناعة., والذين لا يكون جهاز المناعة لديهم قادراً تماماً على أداء وظيفته.

### 1.5 الهدف من الدراسة :

- 1- عزل البكتريا الموجبة لصبغة جرام المخمرة لسكر اللاكتوز
- 2- تشخيص البكتريا الموجبة لصبغة جرام المخمرة لسكر اللاكتوز باستخدام الأوساط الزراعية و إجراء الاختبارات البيوكيميائية
- 3- إجراء اختبارات الحساسية لمعرفة مدى مقاومة البكتريا المخمرة للمضادات الحيوية .

الفصل الثاني

الدراسات السابقة

## 2-الدراسات السابقة

### 2-1 المضادات الحيوية ANTIBIOTICS

تعرف المضادات الحيوية بانها مواد عضوية تنتجها كائنات حية دقيقة خاصة كالبكتريا و الفطريات أثناء نموها ، و قد تكون صناعية او شبه صناعية و هي قادرة بتركيز منخفض القضاء على كائنات دقيقة اخرى مثل البكتيريا ( الامين ، 2008 ) .

#### 1.2.1 مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية Antibiotic resistance of bacteria

ظاهرة مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية تعتبر ظاهرة بيولوجية مهمة جدا ، و هي تعني ان الجرثومة اصبحت غير متأثرة بهذا المضاد عند تعرضها له ، ففي الوقت الذي توجد فيه عزلات حساسة من جنس بكتيري معين للمضاد الحيوي نجد عزلات اخرى من نفس الجنس كيفت نفسها معه و اصبحت مقاومة ، و غير متأثرة به و تورث هذه الميزة للاجيال البكتيريا الناتجة منها ( الامين ، 2008 ) .

#### 2-2 تقسم المضادات الحيوية CLASSIFICATION OF ANTIBIOTIC :

- 1.2.2 مضادات الحيوية الكابحة لتصنيع جدار الخلية البكتيرية .
- 2.2.2 مضادات الحيوية التي تؤثر على وظيفة الغشاء الخلوي
- 3.2.2 مضادات الحيوية التي تعطل تصنع البروتينات داخل الخلية .
- 4.2.2 مضادات الحيوية التي تعيق العمليات الايضية
- 5.2.2 مضادات الحيوية التي تعيق انتاج الاحماض النووية . ( الامين ، 2008 )

#### 2.3 تأثير البنسلين على البكتيريا العنقودية:

أظهر البنسلين عند اكتشافه فعالية عالية مضادة للمكورات العنقودية الذهبية ، حيث يعمل البنسلين على تثبيط تكوين الروابط "الببتيدوجليكونية" التي توفر الصلابة والقوة لجدار الخلية ، مما يؤدي الى موتها . على الرغم من ذلك فإن مشكلة مقاومة البنسلين أصبحت شائعة وازدادت

في الآونة الأخيرة لتصبح نسبة المقاومة قريبة من 100% في معظم دول العالم المضادات الحيوية التي استخدمت لعلاج الالتهابات الناتجة عن البكتيريا العنقودية الذهبية منها : الأريثروميسين ، سيفالوسبورين ، كلينداميسين ، لينوميسين .

## الفصل الثالث

### المواد و طرق العمل



### 3- مواد و طرق العمل :

**3.1 موقع الدراسة :** اجريت هذه الدراسة في معامل كلية العلوم ، جامعة سبها -

قسم النبات بتاريخ (20-3-2020) .

### 3.2 جمع العينات

ثم جمع 4 عينات بشكل عشوائي من ترب ملوثة بالزيت في مواقع مختلفة داخل مدينة سبها (تربة من محطات البنزين و تربة من محلات تغيير زيوت السيارات) .

### 3.3 عزل البكتريا من التربة : طريقة التخفيف

ناخذ 1 جرام من التربة عن طريق الميزان الحساس ثم نضعها في أنابيب اختبار بها 9 مل ماء مقطر لعمل التخفيفات ( 1/10-1/100-1/1000 - 1/10000 )

### 3.4 تحضير الأوساط الغذائية :

تم تحضير الأوساط الزراعية حسب تعليمات الشركات المصنعة لها و الموجود على العلب الخاصة بكل وسط .

### 3.5 تحضير محلول العكارة ماكفرلاند :

حضر هذا المحلول مختبريا كما يأتي :

المحلول (أ) : أذيب 1.75 جرام من كلوريد الباريوم المائي  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  في 100 مليلتر من الماء المقطر المعقم .

المحلول (ب) : أضيف 1 مليلتر من حامض الكبريتك المركز  $H_2SO_4$  إلى 99 مليلتر من

الماء المقطر . أضيف 0.5 مليلتر من المحلول (أ) إلى 99.5 مليلتر من المحلول (ب)

للحصول على عكارة بتركيز (  $1.5 \times 10^8$  ) خلية / مليلتر ، و مزجت جيدا في قنينة زجاجية معتمة و محكمة الغلق لمنع تبخره و حفظت في مكان مظلم لحين الاستعمال Vandepitte *et al.* ( 2003 ) .

### 3.6 تحضير المعلق البكتيري :

بواسطة إبرة ثم اخذ قليل من المستعمرة البكتيرية النامية بعد 24 ساعة ، ووضعت في أنبوبة خاصة معقمة محتوية على 5ملم من المحلول الملحي (Normal Saline) و رجعت محتوياتها في الأنبوبة باستخدام الرجاج الكهربائي و ثم الحصول على المعلق البكتيري المتجانس جاهز للاستخدام مقارنة بالمحلول كلوريد الباريوم للحصول على تركيز  $1 \times 10^5$  مل (W.H.O.1977)

### 3.7 تشخيص العينات identification :

تم تشخيص عينات البكتريا النامية اعتمادا على

### 3.8 الصفات المظهرية morphological characteristics :

عن طريق ملاحظة الصفات المظهرية للبكتريا النامية بشكل مستعمرات مثل القوام و الرائحة ، شكل المستعمرات ، اللون ، و الشفافية ، حدود المستعمرات ، كثافة النمو ، قابليتها على التخمير سكر اللاكتوز في أوساط المكونكي .

### 3.9 التشخيص المجهرى microscopic examination

3.9 باستخدام صبغة غرام : أخذت مسحة من مستعمرة بكتيرية مفردة بواسطة الناقل المعقم ووضعت على شريحة زجاجية نظيفة و ثبتت المسحة من مستعمرة بكتيرية مفردة بواسطة الناقل

المعقم ووضعت على شريحة زجاجية نظيفة و ثبتت المسحة و صبغت بصبغة غرام و بعد جفاف الشريحة فحصت مجهريا لملاحظة طبيعة تصبغ الخلايا البكتيرية و شكلها و تجمعاتها .

### 3.10 الاختبارات الكيميائية الحيوية biochemical tests

#### 1.3.10 اختبار الكتاليز catalase test

**الكتاليز :** هو أنزيم منتشر في الكائنات الحية تتضمن و وظائفه تحفيز تحلل بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء و أكسجين . يتم إجراء هذا الاختبار عن طريق نقل جزء من مستعمرة على شريحة زجاجية بواسطة لوب أو عيدان خشبية ثم وضع قطرة من بيروكسيد الهيدروجين H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ثم ملاحظة ظهور الفقاعات حيث تكون النتيجة موجبة بظهور الفقاعات و سالبة عند عدم

ظهورها . 2.4.5.3.2

#### 2.3.10 فحص احمر المثيل : Methyl Red test

يستخدم هذا الفحص لتحديد قدرة بعض الميكروبات على إنتاج كمية كبيرة من الحامض عند تخمر الجلوكوز ، وفق مسار يسمى مسار تخمر الحوامض الخيطية و التي بدورها ستخفض حموضة الوسط الغذائي إلى درجة متدنية تصل إلى أقل من 4 فعند إضافة كاشف المثيل الأحمر حيث سيتم تغيير لون الكاشف عند هذه الدرجة من الحموضة . فيتغير لون الكاشف من الأصفر إلى الأحمر . إن الاوساط المستخدمة في هذا الاختبار هو methyl red vogasproskeur (MR-VP) . لقت الأنابيب الحاوية على وسط MR-VP بالمستعمرات البكتيرية النقية ، حضنت لمدة 24 ساعة و درجة 37 م بعد ذلك أضيفت قطرات من كاشف المثيل الأحمر . أن تحول الوسط إلى اللون الأحمر دليل على ايجابية الفحص .

### 3.3.10 فحص فوكس بروسكور Vogesproskauer :

يستخدم هذا الفحص لتحديد قدرة بعض الميكروبات على تخليق مركب متعادل يسمى "Acetyl methyl carbonile (Acetoin) من الجلوكوز ، حيث يتم تكسير الجلوكوز جزئياً بواسطة البكتريا لينتج حمض البيروفيك الذي يتحول بعدها إلى مادة ال Acetoin" بما يدعى تخمر الجلوكوز جزئياً . استخدم كاشف باريت الذي يتكون من 1 مللتر من 40% KOH و 3 مللتر الفا نفتانول في الايثانول المطلق . لقت الأنايب MR-VP بالمستعمرات النقية ، و بعد الحضانة لمدة 24 ساعة و بدرجة 37 م أضيفت قطرات من كاشف فوكس بروسكار ، أن تحول الوسط إلى اللون الأحمر دليل على ايجابية الفحص و أن بقاء الوسط بدون تغيير يعتبر نتيجة سالبة .

### 4.3.10 القابلية على استهلاك السترات Citrate utilization test :

يستخدم للكشف عن البكتريا التي لها القدرة على تكسير مادة السترات و استخدامها كمصدر وحيد للكربون . فتحلل السترات إلى Oxaloacetate Acetate و يتبع ذلك تكون البايروفات و ثاني اكسيد الكربون ، بواسطة أنزيم Citrate aldolase الذي ينتج من قبل العديد من البكتريا . لقت الأطباق الحاوية على وسط سيمون ستريت بطريقة التخطيط على السطح المائل بالعزلة البكتيرية و حضنت لمدة 24 ساعة و بدرجة 37 م . عند تغير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق دليل على قدرة البكتريا على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون . أما عند احتفاظ الوسط بلون الكاشف الأخضر فان النتيجة تكون سالبة .

### 5.3.10 اختبار تخمر السكريات :

لقت الاطباق الحاوية على وسط ( مكوني أجار ) بطريقة التخطيط بالمستعمرات البكتيرية على سطح الطبق ، و الحضانة لمدة 24 ساعة بدرجة 37م . لوحظت التغيرات الحاصلة ، لوحظ التخمر بتغير لون الكاشف من الأحمر إلى الأصفر دليل على قدرة البكتريا على تخمر سكر اللاكتوز و الجلوكوز . و ملاحظة تكون الغاز على شكل فقاعات أسفل الوسط .  
( Baure at el, 1966 ) .

### 6.3.10 اختبار الحساسية للمضادات الحيوية antibiotic sensitivity test :

اختبرت حساسية العزلات أربعة أنواع من المضادات الحيوية على وفق طريقة ( Baure at el, 1966 ) ، حيث زرعت العزلات البكتيرية التي تم الحصول عليها على الوسط المغذي (muller hinton agar) ، بعدها وضعت أقراص المضادات الحيوية بواقع أربع أقراص لكل طبق على سطح الوسط بواسطة ملقط معقم باللهب . حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة ، ثم قرأت النتائج بقياس أقطار التنشيط حول كل قرص و قورنت مع أقطار التنشيط القياسية .

جدول (1) يوضح المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة

ت	اسم المضادات	الرمز	التركيز mg/ ml
1	Cephalothin	Ce	30Mg
2	Pincillin-G	P	10Mg
3	Fusidic acid	FD	10Mg
4	Metronidazole	MTZ	5Mg

الفصل الرابع

مناقشة النتائج

## 4- النتائج و المناقشة

### 4-1 عزل و تشخيص

**1.4.1 الصفات المزرعية :** أظهرت نتائج الفحص الزراعي أن عينة رقم (1) أعطت صفات بكتريا ( Bacillus ) حيث لم تستطع النمو في وسط الماكونكي لذلك لم تستطع تخمير سكر اللاكتوز .

**2.4.1 الفحص المجهرى :** أوضحت نتائج الفحص المجهرى باستخدام التصبيغ بصبغة جرام أنها عصيات ( موجبة ) غرام ظهرت على هيئة مفردة او مزدوجة او بشكل سلاسل قصيرة ( Holt el., 1994 ) .

### 3.4.1 التشخيص الكيمياءى الحيوى :

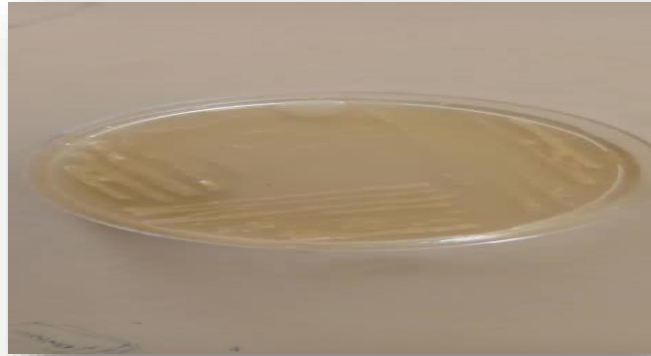
يشير الجدول (2) الى نتائج الفحوصات الكيميائية الحيوية التي اعتمدت لتشخيص بكتريا

( Bacillus ) و كانت مطابقة للصفات التشخيصية العالمية لبكتريا ( Bacillus ) حسب

توصيف ( Holt el., 1994 ) .

العزلات البكتريا	الشكل	الحافة	اللون
<b>Cereus Bacillus</b>	جذرية	خيطية	بنية
<b>Macerans Bacillus</b>	دائرية	كاملة	بنية
<b>Subtilis Bacillus</b>	دائرية	كاملة	رمادي
<b>Badius Bacillus</b>	جذرية	خيطية	بنية

جدول (2) يوضح الخصائص المورفولوجية للمستعمرات البكتيرية المعزولة المكونة للابواغ



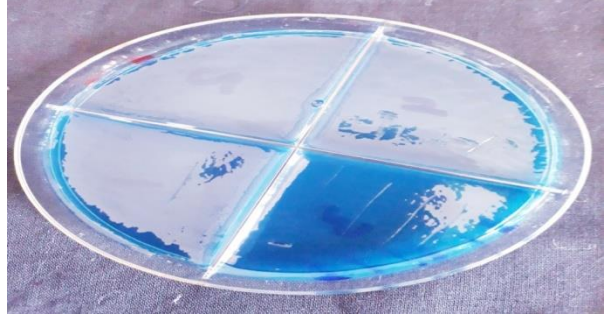
شكل ( 1 ) يوضح نمو البكتيريا على Nutrient agar

جدول (3) الصفات الكيموحيوية للعزلات البكتريا المكونة للابواغ

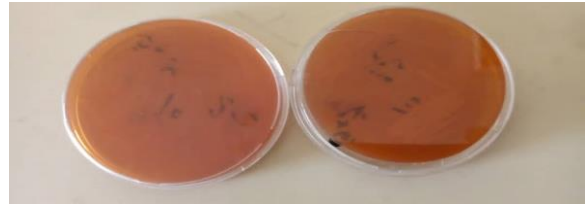
الاختبار	Bacillus Cereus	Bacillus Macerans	Bacillus Badius	Bacillus Subtilis
<b>Catalase</b>	+	+	+	+



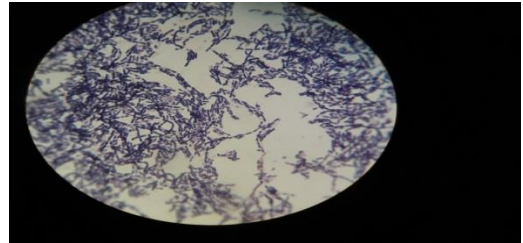
+	-	+	-	اختبار تخمر السكريات
-	-	-	-	Methyl Red test
+	+	+	+	Vogesproskauer
+	-	-	-	Simmon Citrate



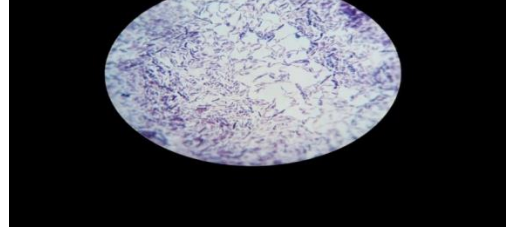
شكل (2) يوضح اختبار السترات



شكل (3) يوضح تخمر سكر اللاكتوز



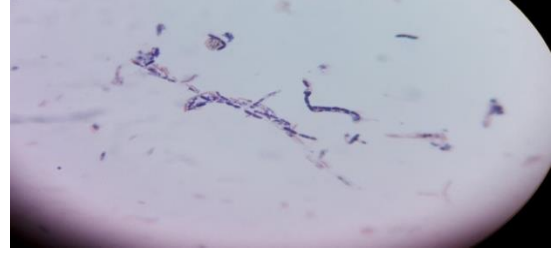
شكل (4) يوضح بكتيريا Bacillus-subtilis تحت المجهر



شكل (5) يوضح بكتيريا Bacillus Macerans تحت المجهر



شكل (6) يوضح بكتيريا Bacillus cereus تحت المجهر



شكل (7) يوضح بكتيريا Bacillus badius تحت المجهر

## 2-4 اختبار المضادات الحيوية :

المضادات الحيوية المستخدمة هي : ( Fusidic acid – Metronidazole- pincillin - Cephalothin )

جدول رقم (4) يوضح نتائج اختبار الحساسية

ت	اسم المضاد	قطر التثبيط
---	------------	-------------

-	pincillin	1
14	Cephalothin	2
-	Metranidazole	3
24	Fusidic acid	4



شكل (8) يوضح منطقة التثبيط



شكل (10) يوضح منطقة التثبيط

بينت نتائج فحص أربع عينات لتراب ملوثة بالزيت على البيئة المغذية nutrient agar على نمو بعض المستعمرات البكتيرية من (*Bacillus*) من عينات تراب ملوثة بالبترول بعد أيام من

التحضير بدرجة حرارة 37م و بنسبة 20% من العينات الكلية المدروسة في حين استبعدت عينات اخرى لم يظهر بها نمو في المستعمرات بشكل ملحوظ و قد تميزت المستعمرات الايجابية و النامية في الاطباق بلون بنفسجي على أنها بكتيريا عصوية موجبة بصبغة غرام عند قراءة أقراص المضادات الحيوية وجد أن تم قياس ( منطقة التثبيط ) وهي منطقة شفافة محيطة بالقرص المضاد الحيوي ومن ضمنها قطر القرص نفسه الخالية من النمو الجرثومي بالمليمتر بواسطة مسطرة مدرجة .

وكانت نتائج اختبار أربعة عزلات من (*Bacillus*) التي تم الحصول عليها من مواقع ترب مختلفة ، تجاه مضادات حيوية مختلفة تبين هذه العزلات في حساسيتها لتلك المضادات إذ كانت جميع (*Bacillus*) مقاومة بدرجة عالية للمضادين *Metranidazole* و *Pincillin* ومن جانب آخر أظهرت هذه العزلات حساسية عالية تجاه المضادات *Fusidic*, *Cephalothin*, *acid* و يبدو من خلال النتائج أن مقاومة هذه العزلات لهذه المضادات قد يكون بسبب انتشار العديد من البكتريا الخيطية في التربة و إنتاجها للمضادات الحيوية الذي أدى إلى امتلاك هذه العزلات للمقاومة بمرور الزمن كما قد تكون كمية الاقراص المستخدمة في الاختبار غير كافية لتثبيط هذه البكتريا أو بسبب المقاومة الطبيعية للعصيات السالبة لصبغة جرام للعديد من المضادات الحيوية مع العلم أن تراكيز هذه الاقراص هي من شركات عالمية .

## الخلاصة

ثم جمع 4 عينات بشكل عشوائي من تربة ملوثة بالزيت في مواقع مختلفة داخل مدينة سبها (تربة من محطات البنزين و تربة من محلات تغيير زيوت السيارات) .

بينت نتائج فحص أربع عينات لتربة ملوثة بالزيت على البيئة المغذية nutrient agar على نمو بعض المستعمرات البكتيرية من (Bacillus) من عينات تربة ملوثة بالبتروك بعد التحضين بدرجة حرارة 37م من العينات الكلية المدروسة و قد تميزت المستعمرات بالاجابية بلون بنفسجي على أنها بكتيريا عصوية موجبة بصبغة غرام .

أما بالنسبة لاختبار الحساسية ، نلاحظ ظهور ( منطقة التثبيط ) وهي منطقة شفافة محيطة بالقرص المضاد الحيوي .

## التوصيات

- 1- يمكن عزل أكثر من نوع واحد من البكتيريا الموجودة في التربة الملوثة بالهيدروكربونات.
- 2- استهلاك الهيدروكربونات النفطية يعتمد بشكل كبير على النظام الجيني.
- 3- العزلات البكتيرية تنمو بشكل كبير على البنزين وأقل على الديزل.
4. التلوث بالنفط ومشتقاته يضيف باستمرار الكربون إلى البيئة الذي تستهلكه البكتيريا والأحياء الدقيقة الأخرى كمصدر للكربون.

## الفصل الخامس المراجع

## أولا : المراجع العربية :

- 1- الامين ، محمد ( 2008 ) : البحث في المعالم الوراثية لبلازميدات السالمونيلا المعزولة من عينات عشوائية لمرضى يعانون من اعتلالات معوية بمنطقة سبها - براك ، جامعة سبها - ليبيا
- 2- الخفاف، عبد علي ، ثعبان كاظم خضير 2000 . الطاقة وتلوث البيئة . الفصل الثاني، تلوث البيئة، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، الطبعة الأولى، عمان، الأردن، 61 صفحة
- 3- عبد الرزاق هالة عبد الحافظ (2012) اختبار قابلية العزلة المحلية *Nocardia* على إنتاج المستحلبات الحياتية و استهلاك النفط الخام . مجلة مركز بحوث التقنيات الاحيائية ، المجلد السادس - العدد الثاني - العراق .
- 4- عزيز ايمان محمد ( 2012 ) ، قابلية بكتريا *Micrococcus* المعزولة من التربة على تحليل مركب الديزل - الموصل . رسالة ماجستير . كلية العلوم . قسم علوم الحياة . جامعة الموصل .



## ثانيا : المراجع الاجنبية :

Al-Dobouni, I. A. K. (1977). Qaiyarah crude oil studies to assess potentials. -5

A thesis of

Master of Science. Department of Chemistry. College of Science–University of Mosul–Iraq.

-6 Al-Sayigh, H.Y. 1978. Studies on Q ai y 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.

7- Juteau, P., Bisailon, J.G., Lepine, F., Ratheau, V., Beaudet, R. and Villemur, R., 2003. Improving the biotreatment of hydrocarbons –contaminated soils by addition of activated sludge taken from the waste water treatment facilities of an oil refinery. Bioremediation. 14: 31–40.

8- Lai, B., Mishra, S., Bhattacharya, D. and Sarma, P.M., 2001. Biotechnological approach to manage oily sludge. Proc of the 4th Int. Petr. Conf & Exhib 195 – 196. R and D centre. Indian oil Corp.

-11 Philips, U.A. and Traxler,R.W . 1963 Microbial degradation of asphalt apple . Microbiol. 11:235–238

Rahman K.S, Rahman T, Lakshmanaperumalsamy ,P.and Banat, I.M .2002

Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station

soils. J basic microbiol 42:284-291

-12 Wilson, J.J., Hatcher, J.F. and Goudey, J.S., 2002. Ecotoxicological

endpoints for contaminated site remediation. hydroqual laboratories Ltd,

Calgary. Ann 1st super sanita. 38(2): 143-147.

-13 Zhu, X., Venosa, A.D., Suidan, M.T. and Lee, K., 2004. Guidelines for the

bioremediation of oil-contaminated salt marshes. national risk management research

laboratory. Office of Res and Development USA. Environ Protec. Agency, Cincinnati,.

- المواد :

### 1.3.3 الاجهزة و الادوات : استخدمت الاجهزة و الادوات الواردة في الجدول ادناه

جدول (5) الاجهزة و الادوات المستعملة في الدراسة

اسم الجهاز	ث
فرن كهربائي	1
مجهر ضوئي	2
جهاز طرد المركزي	3
حاضنة	4
ميزان حساس	5
حمام مائي	6
المؤصدة	7
الثلاجة	8
أنايبب بلاستيكية	9

أطباق بتري بلاستيكية	10
شرايح زجاجية	11
جهاز قياس الأس الهيدروجيني	12
ماصات زجاجية مختلفة الاحجام	13
سرنجات معقمة مختلفة الاحجام	14
جهاز تقطير	15
مصباح بنزن	16
عروة ناقلية	17
مرشحات غشائية	18

جدول (6) الاوساط الزراعية المستخدمة في الدراسة

اسم الوسط الزراعي	الغرض من استعماله
الماكونكي أغار	استعمل للتفريق بين البكتريا المخمرة و غير المخمرة لسكر اللاكتوز
أغار المغدي	استعمل هذا الوسط لغرض تنمية و تنقية العزلات البكتيرية
أغار مولر هنتون	استعمل لغرض إجراء فحص الحساسية
أغار سيمون سترات	استعمل لمعرفة قدرة البكتريا على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكربون
وسط احمر المثيل - فوكس بروسكور	استعمل لغرض الكشف عن التحلل الكلي و الجزئي لسكر الجلوكوز
المرق المغدي	أستعمل لغرض تنمية و تنشيط البكتريا و تحضير العوالق البكتيرية المختلفة

جدول (7) الكواشف و الصبغات المستخدمة في الدراسة

اسم الكاشف	الغرض من الاستخدام
كاشف فوكس بروسكار	استعمل هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على التحليل الجزئي للسكريات
كاشف المثيل الأحمر	استعمل هذا الكاشف للكشف عن قدرة البكتريا على أنتاج حامض كنواتج نهائي للتحلل الكامل للسكريات
صبغة غرام	استعملت لدراسة الخصائص المظهرية لخلايا البكتريا المعزولة تحت القوى الكبرى للمجهر الضوئي المركب .
محلول ماكفرلاند	استعمل هذا المحلول لإعطاء عدد تقريبي للخلايا البكتيرية (1.5*10)



الفصل السادس

الملاحق



