التحلل الحيوي للملوثات العضوية في مياه مخلفات الصناعات النفطية باستخدام بكتيريا *Bacillus*

Biodegradation of organic pollutants in oil industry waste water by *Bacillus* Bacteria

شيماء فخري جاسم خالد فالح حسن وليد حسين سلمان
دائرة بحوث وتكنولوجيا البيئة والمياه/ وزارة العلوم والتكنولوجيا
Shaima Fakhry Jasime Khalid Falih Hassan Waleed Husain Salman
Dep Of Water & Environmental Technology \ Ministry of Science & Technology

المستخلص

استخدمت بكتيريا *Bacillus apiarus* ، *Bacillus filicolonicus* ، *Bacillus laterosporus* لخفض الملوثات العضوية من مياه المخلفات للتصريف النهائي لمحطة تصفية مخلفات الصناعات النفطية لمصفى الدورة في بغداد وخفض تراكيزها بدلالة العوامل المتطلب الكيميائي للاوكسجين (COD) والكاربون العضوي الكلي (TOC) والنيتروجين الكلي (TN) والفسفور الكلي (TP) في المختبر بظروف حرارة 25ºم واس هيدروجيني 5.8-6.8 ولفترة 18 ساعة وبنظام الدفعة (Batch system) اذ اظهرت بكتيريا *Bacillus apiarus*، *Bacillus filicolonicus* و *Bacillus laterosporus* قدرة في خفض تركيز COD بنسبة (82،88.5،94)% على التوالي وانخفض تركيز TOC بنسبة (73،82،84)% فيما كانت نسبة خفض تركيز TN(86،91،81)% وبمعنوية عالية P<0.01 لكل المعاملات لفترة ثمانية عشر ساعة معاملة واظهرت البكتيريا كفاءة عالية في خفض تركيز TP وبنسبة 100% وبمعنوية عالية خلال فترة ثمانية عشر ساعة من المعاملة .

Abstract

***Bacillus apiarus, Bacillus filicolonicus* and *Bacillus laterosporus* were used to degrade organic pollutants from final discharge of Al Dura wastewater treatment plant in Baghdad and reduce their concentrations by measuring Chemical Oxygen Demand (COD), Total Organic Carbon (TOC), Total Nitrogen (TN) and Total Phosphorus (TP) in laboratories conditions of 25^{o} c, pH 5.8-6.8 in batch culture system and 18hr period treatment, the bacteria *Bacillus apiarus, Bacillus filicolonicus* and *Bacillus laterosporus* showed ability to reduce COD concentration by(82, 88.5, 94)% and TOC concentration by (73, 82 ,84)% and TN concentration reduced by (86, 91, 81)% in 18 hr period treatment with highly significant differences P<0.01 for all bacterial treatments, the bacteria in the current study showed high ability to reduce TP concentration by 100% with highly significant differences P<0.01 for all bacterial treatments in 18hr period treatment.**

المقدمة

تعد مخلفات الصناعات النفطية من اخطر انواع المخلفات في البيئة المائية اذ تحوي العديد من المركبات السامة والمسرطنة ذات التاثير السلبي على الصحة العامة والبيئة مثل مركبات Benzo anthracene Dinitrotoluene, trinitrotoluene, lignite [1] ، اذ تتكون هذه المخلفات من مجموعة كبيرة من المركبات الاليفاتية والاروماتية واغلبها من المواد الهيدروكاربونية ذات السلاسل الكربونية الطويلة و المواد العضوية المعقدة التركيب والتي تدخل الى البيئة المائية من خلال تصريف مخلفات الصناعات النفطية الى المياه السطحية للانهار والبحيرات دون معالجة مناسبة مسببة خلل في توازن النظام البيئي وهلاك العديد من الكائنات المائية لما تحويه هذه المركبات من سمية عالية [2] .

تعد البكتيريا من الاحياء المجهرية الكفوءة في عمليات المعالجات الاحيائية لمياه المخلفات اذ تمتلك القدرة على افراز مجموعة كبيرة من الانزيمات المحللة التي تعمل على تكسير المواد العضوية والهيدروكاربونية وتحويلها

الى مواد ابسط وادمصاص الكثير من العناصر الثقيلة على جدارها الخلوي اضافة الى انتشارها في كل الجسم المائي ونموها السريع ، وتعد بكتيريا *Bacillus* ذات كفاءة عالية لتكسير المواد العضوية الذائبة بفعل انزيماتها المحللة [3] ، وقد اثبت [4] في دراستهم قدرة بكتيريا *Chromatium* و *Bacillus* في استهلاك الكبريتات بشكل كبير اضافة الى النترات والنتريت من المياه الملوثة وخفض تراكيزها بشكل كبير ، وبينت دراسة [5] قدرة بكتيريا *Bacillus* على خفض تراكيز الفوسفات والنترات والنتريت من المياه الملوثة وتحويلها الى حبيبات غذائية مخزونة داخل خلاياها .

تهدف الدراسة الحالية لاختبار كفاءة البكتيريا *Bacillus filicolonicus, Bacillus apiarus, Bacillus laterosporus,* في اختزال تراكيز الملوثات من مياه مخلفات الصناعات النفطية لمصفى الدورة بدلالة تراكيز المتطلب الكيميائي للاوكسجين (COD) و الكاربون العضوي الكلي (TOC) والنايتروجين الكلي (TN) والفسفور الكلي (TP) .

المواد وطرائق العمل

1. **الاوساط الزرعية المستخدمة**: Nutrient agar, Nutrient broth, Pseudomonas agar, Blood agar , base, Simmon citrate agar, Nitrate broth, Peptone water, Trypton soy broth, Starch agar, Casein agar, Nutrient gelatin, Urea agar, Brain heart infusion agar, Glucose – Phosphate broth.
2. **جمع العينات**

أ- جمعت نماذج من مياه مخلفات التصريف النهائي لمحطة تصفية مياه مخلفات الصناعات النفطية لمصفى الدورة في بغداد بوساطة قناني بلاستيكية Polyethylene سعة 10 لتر ، رشحت وعقمت باستخدام جهاز التفريغ (Vacuum) باستخدام اوراق ترشيح بحجم ثقوب 0.45 مايكرون لاستخدامها في تجارب خفض تراكيز المواد العضوية والهيدروكاربونية .

ب- جمع واحد كيلو غرام من التراب الملوث بمخلفات وقود الديزل بالقرب من مولد ديزل كهربائي لغرض عزل البكتيريا اذ تعد هذه الترب الملوثة بيئة مناسبة للعديد من الاجناس البكتيرية المحطمة للمواد الهيدروكاربونية .

3. عزل وتنمية البكتيريا: وزن واحد غرام من نموذج التربة ووضع في انبوب اختبار زجاجي معقم حاوي على تسعة مليلتر من الماء المقطر المعقم بواقع تخفيف 10^{-1} وتكمل التخافيف الى 10^{-2} و 10^{-3} ، وضعت الانابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 80م لفترة 20 دقيقة لقتل الخلايا البكتيرية الخضرية غير المكونة للسبور (spore) ، أخذ 0.1 مليلتر من كل تخفيف و نشر على طبق زجاجي معقم يحوي وسط Nutrient agar وحضنت الاطباق بحرارة 30 م° لمدة سبعة ايام . بعد ظهور المستعمرات تم عمل المسحات وصبغها بصبغة كرام لتشخيص الخلايا البكتيرية الخضرية والسبورات وموقعها بالخلية البكتيرية بالمجهر الضوئي المركب ، تم تنقية المستعمرات بعمل مزارع ثانوية و نقلها الى وسط Nutrient agar وبطريقة التخطيط وكررت العملية للحصول على مستعمرات نقية للبكتيريا و حفضت المستعمرات النقية بانابيب زجاجية معقمة وبشكل Slant على وسط Nutrient agar وبدرجة حرارة 10م وجددت العزلات كل اسبوعين [6،7] .
4. **تشخيص البكتيريا**: شخصت بكتيريا *Bacillus* باستخدام الاختبارات البايوكيميائية وفقا لما وصف من قبل [8] .
5. **حساب عدد الخلايا البكترية**

حسبت اعداد الخلايا البكتيرية في واحد مليلتر من العالق البكتيري باستخدام طريقة Hemocytometer (counting chumber) [9] و حسب المعادلة التالية:

عدد البكتيريا (خلية/مليلتر) = عدد الخلايا في 4 مربعات× 4 × 10

6. **الفحوصات الكيميائية ألمختبرية:** قيست تراكيز العوامل COD و TOC و TN و TP لعينة مياه التصريف النهائي لمحطة تصفية مياه المخلفات لمصفى الدورة في بغداد قبل وبعد المعاملة بالبكتيريا المنتخبة واعتمدت طرق التحليل القياسية العالمية [10] .
7. **التجارب:** استخدمت دوارق زجاجية نظيفة ومعقمة سعة واحد لتر حاوية على عينات مياه معقمة من التصريف النهائي لمحطة تصفية المخلفات لمصفى الدورة وبواقع 990 مليلتر والمضاف اليها عشرة مليلتر من المزرعة البكتيرية النقية ولكل نوع بكتيري *acillus filicolonicus, Bacillus apiarus, Bacillus laterosporus,* وبكثافة نمو بكتيري بحدود (900-1200) خلية/مليلتر لكل نوع وبواقع ثلاث مكررات مع

معاملة السيطرة الخاليه من البكتيريا ، تم تهوية الدوارق باستخدام مضخة هواء Air pump ولفترة ثمانية عشر ساعة واخذت نماذج للفحص بعد فترات ساعتين ، اربع ساعات و ثمانية عشر ساعة بعد ترشيحها لقياس تراكيز COD ، TOC ، TN ، TP واختيرت فترات المعاملة لملائمتها لساعات العمل في المختبرات .

نسبة الخفض = التركيز الاولي – التركيز النهائي/ التركيز الاولي × 100%

8. **التحليل الاحصائي :** تم تحليل النتائج احصائيا باستعمال اختبار تحليل التباين Analysis of Variation (ANOVA) وباستخدام البرنامج الاحصائي SPSS [11] .

النتائج والمناقشة

يوضح جدول (1) انواع بكتيريا *Bacillus* المعزولة من عينة تراب ملوث بمخلفات وقود الديزل بالقرب من مولدة ديزل كهربائية اذ تم عزل وتشخيص الانواع *B. apiarus, B. filicolonicus* و *B. laterosporus* وبالاعتماد على الاختبارات الكيموحيوية الموضحة في جدول (1) . وفي دراسة سابقة تم تشخيص 18 عزلة لبكتيريا *Bacillus* من الترب الملوثة بالمخلفات النفطية وزيوت السيارات اذ ان لهذه البكتيريا القدرة على افراز انزيمي Catalase و Protease اللذان يعملان على تحطيم الكثير من المواد العضوية والهيدروكاربونية المتواجدة في هذه الترب الملوثة [12] .

جدول (1): نتائج الاختبارات الكيموحيوية لتشخيص انواع بكتيريا *Bacillus*

البكتيريا / نوع الفحص	*B. apiarus*	*B. filicolonicus*	*B. laterosporus*
LV (egg yolk) reaction	-	-	+
Citrate utilization	+	-	-
V-P reaction	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+
Indole production	-	-	+
Growth in 7% NaCl	+	+	-
Starch hydrolysis	+	+	-
Casein hydrolysis	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+
Urease activity	+	-	-
Haemolysis (blood agar)	+	+	-
Catalase	+	+	+

يوضح جدول (2) نسبة خفض تركيز الكاربون العضوي الكلي (TOC) لعينة مياه التصريف النهائي لمحطة تصفية مخلفات مصفى الدورة بعد فترة(2،4،18) ساعة معاملة ببكتيريا *Bacillus filicolonicus, Bacillus apiarus, Bacillus laterosporus* اذ كان تركيز TOC لعينة مياه التصريف النهائي لمحطة تصفية المخلفات لمصفى الدورة قبل المعاملة 150 جزء بالمليون وانخفض الى 92، 95 ، 95 جزء بالمليون بعد ساعتين من المعاملة وبعد اربعة ساعات انخفض التركيز الى 70, 56 و 48 جزء بالمليون باستخدام البكتيريا على التوالي وبعد ثمانية عشر ساعة اصبح التركيز 28, 19 و 17 جزء بالمليون وبنسبة خفض 73, 82 و 84% على التوالي وبمعنوية عالية $P<0.01$ مقارنة بقبل المعاملة .

جدول (2): نسبة خفض تركيز الكاربون العضوي الكلي لمياه مخلفات مصفى الدورة بعد معاملة 2, 4 و 18 ساعة ببكتيريا *Bacillus*

ت	المعاملة	قبل المعاملة جزء بالمليون	بعد المعاملة جزء بالمليون 2 ساعة	4 ساعة	18 ساعة	نسبة الخفض بعد 18 ساعة %
1	Control	150	150	148	140	7
2	*Bacillus apiarus*	150	92	* 8.66 ± 70	** 2.89 ± 28	73
3	*Bacillus filicolonicus*	150	95	** 5.29 ± 56	** 3.61 ± 19	82
4	*Bacillus laterosporus,*	150	95	* 14.4 ± 48	** 11.5 ± 17	84

النتائج تمثل المعدل ± الانحراف المعياري

** **تمثل فروق عالية معنوية ($P<0.01$) مقارنة بقبل المعاملة**

* **تمثل فروق معنوية ($P<0.05$) مقارنة بقبل المعاملة**

يوضح جدول (3) نسبة خفض تركيز المتطلب الكيميائي للاوكسجين (COD) لعينة مياه التصريف النهائي لمحطة تصفية مخلفات مصفى الدورة بعد فترة (2، 4، 18) ساعة معاملة ببكتيريا *Bacillus filicolonicus, Bacillus apiarus, Bacillus laterosporus* اذ كان تركيز COD لعينة مياه التصريف النهائي لمحطة تصفية المخلفات لمصفى الدورة قبل المعاملة 2100 جزء بالمليون وانخفض الى 1998, 2033 و 2000 جزء

بالمليون بعد ساعتين من المعاملة وبعد اربعة ساعات انخفض التركيز الى 1583, 1317 و 1300 جزء بالمليون باستخدام البكتيريا على التوالي وبعد ثمانية عشر ساعة 383, 240 و 133 جزء بالمليون بنسبة خفض (82،88.5، 94)% على التوالي وبمعنوية عالية P<0.01 مقارنة بقبل المعاملة.

جدول (3): نسبة خفض تركيز المتطلب الكيميائي للاوكسجين لمياه مخلفات مصفى الدورة بعد معاملة (2،4 ،18) ساعة ببكتيريا *Bacillus*

ت	المعاملة	قبل المعاملة جزء بالمليون	بعد المعاملة جزء بالمليون 2 ساعة	4 ساعة	18 ساعة	نسبة الخفض بعد 18 ساعة %
1	Cont.	2100	2085	2085	1905	9
2	*Bacillus apiarus*	2100	1998	* 125.8 ± 1583	** 28.8 ± 383	82
3	*Bacillus filicolonicus*	2100	2033	* 28.8 ± 1317	** 17.3 ± 240	88.5
4	*Bacillus laterosporus,*	2100	2000	* 21.02 ±	** 57.7 ± 133	94

النتائج تمثل المعدل ± الانحراف المعياري

** تمثل فروق عالية معنوية (P<0.01) مقارنة بقبل المعاملة

* تمثل فروق معنوية (P<0.05) مقارنة بقبل المعاملة

يوضح جدول (4) نسبة خفض تركيز النيتروجين الكلي (TN) لعينة مياه التصريف النهائي لمحطة تصفية مخلفات مصفى الدورة بعد فترة (2،4،18) ساعة معاملة ببكتيريا *Bacillus filicolonicus, Bacillus apiarus, Bacillus laterosporus* اذ كان تركيز TN لعينة مياه التصريف النهائي لمحطة تصفية المخلفات لمصفى الدورة قبل المعاملة 320 جزء بالمليون وانخفض الى 297, 288 و 290 جزء بالمليون بعد ساعتين من المعاملة وبعد اربعة ساعات انخفض التركيز الى 193, 160 و 177 جزء بالمليون باستخدام البكتيريا على التوالي وبعد ثمانية عشر ساعة 45, 28 و 62 جزء بالمليون بنسبة خفض (86،91،81) % على التوالي وبمعنوية عالية P<0.01 مقارنة بقبل المعاملة.

جدول (4): نسبة خفض تركيز النيتروجين الكلي لمياه مخلفات مصفى الدورة بعد معاملة 2, 4 و 18 ساعة ببكتيريا *Bacillus*

ت	المعاملة	قبل المعاملة جزء بالمليون	بعد المعاملة جزء بالمليون 2 ساعة	4 ساعة	18 ساعة	نسبة الخفض بعد 18 ساعة %
1	Cont.	320	320	320	302	6
2	*Bacillus apiarus*	320	297	** 11.5 ± 193	** 8.66 ± 45	86
3	*Bacillus filicolonicus*	320	288	** 17.3 ± 160	** 2.89 ± 28	91
4	*Bacillus laterosporus,*	320	290	** 11.5 ±	** 2.89 ± 62	81

النتائج تمثل المعدل ± الانحراف المعياري

** تمثل فروق عالية معنوية (P<0.01) مقارنة بقبل المعاملة

* تمثل فروق معنوية (P<0.05) مقارنة بقبل المعاملة

يوضح جدول (5) نسبة خفض تركيز الفسفور الكلي (TP) لعينة مياه التصريف النهائي لمحطة تصفية مخلفات مصفى الدورة بعد فترة (2،4 ،18)ساعة معاملة ببكتيريا *Bacillus filicolonicus, Bacillus apiarus, Bacillus laterosporus* اذ كان تركيز TP لعينة مياه التصريف النهائي لمحطة تصفية المخلفات لمصفى الدورة قبل المعاملة 150 جزء بالمليون وانخفض الى 122, 132 و 125 جزء بالمليون بعد ساعتين من المعاملة وبعد اربعة ساعات انخفض التركيز الى 73, 70 و 62 جزء بالمليون باستخدام البكتيريا على التوالي وبعد ثمانية عشر ساعة 0, 0 و 0 جزء بالمليون بنسبة خفض (100، 100 ، 100)% على التوالي وبمعنوية عالية P<0.01 مقارنة بقبل المعاملة.

جدول (5): نسبة خفض تركيز الفسفور الكلي لمياه مخلفات مصفى الدورة بعد معاملة 2, 4 و 18 ساعة ببكتيريا *Bacillus*

ت	المعاملة	قبل المعاملة جزء بالمليون	بعد المعاملة جزء بالمليون 2 ساعة	4 ساعة	18 ساعة	نسبة الخفض بعد 18 ساعة %
1	Cont.	150	150	150	148	1.5
2	*Bacillus apiarus*	150	122	* 2.31 ± 73	** 0.0 ± 0	100
3	*Bacillus filicolonicus*	150	132	* 8.6 ± 70	** 0.0 ± 0	100
4	*Bacillus laterosporus,*	150	125	* 2.89 ± 62	** 0.0 ± 0	100

النتائج تمثل المعدل ± الانحراف المعياري

** تمثل فروق عالية معنوية (P<0.01) مقارنة بقبل المعاملة

* تمثل فروق معنوية (P<0.05) مقارنة بقبل المعاملة

أظهرت النتائج ان لبكتيريا *Bacillus laterosporus* كفاءة كبيرة في خفض تراكيز TOC و COD و TP وبنسبة خفض (84، 94 ، 100)% على التوالي فيما كانت نسبة خفض تركيز TN 81% من مياه مخلفات الصناعات النفطية لمحطة تصفية المخلفات في مصفى الدورة خلال ثمانية عشر ساعة معاملة وبمعنوية عالية

P<0.01 مقارنة بقبل المعاملة. اثبت [13] في دراستهم قدرة بكتيريا *Bacillus* في تحطيم المركبات الهيدروكاربونية للمخلفات النفطية واستهلاكها في عمليات النمو والتكاثر, كذلك توافقت النتائج مع [14] اذ اثبتوا في دراستهم قدرة بكتيريا *B. laterosporus* على تحطيم المركبات الهيدروكاربونية في المياه الملوثة وخفض تركيزها بنسبة 90%. اظهرت بكتيريا *Bacillus filicolonicus* قدرة في خفض تراكيز TOC و COD بنسبة 82 و 88.5% على التوالي وكفاءة كبيرة في خفض تراكيز TP و TN بنسبة 100 و 91% على التوالي خلال ثمانية عشر ساعة وبمعنوية عالية P<0.01 مقارنة بقبل المعاملة فقد اثبت [15] قدرة بكتيريا *Bacillus* في تحطيم المركبات الهيدروكاربونية والعضوية في الترب الملوثة وخفض تراكيز الملوثات النفطية بشكل كبير، و اظهرت بكتيريا *Bacillus apiarus* قدرة في خفض تراكيز TOC و COD و TN بنسبة (73،82،86) % على التوالي وخفض تركيز TN بنسبة 100% خلال ثمانية عشر ساعة معاملة وبمعنوية عالية P<0.01 مقارنة بقبل المعاملة.

اظهرت نتائج الدراسة الحالية القدرة العالية لبكتيريا *Bacillus* المنتخبة للدراسة في خفض تراكيز الملوثات النفطية اذ ان لهذه البكتيريا القدرة على افراز انزيمي Catalase و Protease اللذان يعملان على تحطيم الكثير من المواد العضوية ومركبات الفسفور والمتمثلة بمركبات $H_2PO_4^-$ و HPO_4^{-2} و PO_4^{-3} ومركبات النيتروجين كالامونيوم والنترات والنتريت والامونيا [16] . وفي دراسة [17] اثبت قدرة بكتيريا *B. filicolonicus* و *B. laterosporus* على انتاج انزيم hydrogenase الذي يعمل على تحطيم المواد الهيدروكاربونية في الترب الملوثة, اذ تعتمد البكتيريا في نشاطاتها التحليلية للمواد العضوية على اساس احتياجاتها لعناصر مهمة في عملية النمو والانقسام Macroelements كالكاربون والهيدروجين و الاوكسجين و النتروجين والفسفور و الكبريت كذلك تحتاج الى عناصر ثانوية Microelements كالكالسيوم والحديد والبوتاسيوم والصوديوم والمغنسيوم وبعض المعادن كالكوبلت والمنغنيز والنيكل والزنك ، اذ تعمل البكتيريا على تكسير السلاسل الطويلة للمواد العضوية في سبيل الحصول على عنصر الكاربون وتحرير الاوكسجين والهيدروجين [18] ، و من ملاحظة النتائج نلاحظ الانخفاض الطفيف بتراكيز المتطلب الكيميائي للاوكسجين والكاربون العضوي الكلي والنتروجين الكلي والفسفور الكلي لمعامل السيطرة وهذا ناتج بفعل التهوية وتنشيط عمليات الاكسدة الكيميائية ، كذلك ان لزيادة تراكيز الاوكسجين الاثر الكبير في زيادة فاعلية البكتيريا وتنشيطها لافراز الانزيمات المحللة والمحطمة للمواد الهيدروكاربونية في عينة الدراسة [19] .

كما اظهرت النتائج القدرة العالية لبكتيريا *B. filicolonicus, B. apiarus, B. laterosporus* على تحطيم واستهلاك مركبات الفسفور اذ كانت نسبة خفض الفسفور الكلي TP 100% خلال ثمانية عشر ساعة من المعاملة وبمعنوية عالية P<0.01 مقارنة بقبل المعاملة ولكل نوع بكتيري اذ تمتلك هذه البكتيريا القدرة على افراز انزيم hydroxybutyrate الذي له فاعلية كبيرة في خفض تراكيز مركبات الفسفور[20] اذ يعمل على تحويل هذه المركبات الى صيغة ابسط تمكن الخلية البكتيرية من الاستفادة منها في عمليات النمو [21] ، اذ تقوم البكتيريا باستهلاك الفسفور في عمليات بناء جدارها الخلوي وبناء السكريات المتعددة داخل خلاياها [22] .

المصادر

1. Farmer. A. (2009). Managing Environmental Pollution. Environmental Management series, Routledge, New York. Pp: 245-266.
2. Chapman, D, Jackson, J. and Krebs, F. (2007). Biological Monitoring In: Water Quality Assessments - A Guide to Use of Biota, Sediments and Water in Environmental Monitoring (2nd Ed.). UNESO/ WHO/ UNEP.
3. Mara, D. and Horan, N. (2003). Handbook of Water and wastewater Microbiological treatments. Academic Press, New York. Pp: 125-128.
4. Arts, P., Robertson, L.A. and Kuenen, J.G. (2007). Nitrification and denitrification by *bacteria* in aerobic batch and chemo stat cultures. FEMS Microbiol. Ecol., 18: 305–316.
5. Nwaogu, L. A., Onyeze, G. O. C. and Nwabueze, R. N. (2008). Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus.* African Journal of Biotechnology. Vol.7 (12), 1939-1943.

6. Mortimer, P. S, Heinz, S, Hans, G. T. and Asbeuth, B. (1981). The Prokaryotes. Handbook on Habitats, Isolation and identification of Bacteria. Vol.3. Berlin Heidelberg, New York. USA.

7. Reva, O. N, Sorokulova, I. B. and Smirnov, V. V. (2006). Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming and anaerobic bacteria. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51, 1361–1371.

8. Jennifer, M. P, Turnbull, P. C. and Gibson, J. R. (1983). A colour Atlas of Bacillus species. Wolfe Medical Publication. London. Pp: 324-350.

9. Santhini, K, Myla, Sajani, S. and Usharani, G. (2009). Screening of *Micrococcus* Sp from Oil Contaminated Soil with Reference to Bioremediation & Active Account. Botany Research International. Vol. (4): 248-252.

10. APHA (1998). Standard method for the examination of water and wastewater, 16th ed. American public Health Association, American water works Association and water pollution control federal, Washington, D.C.

11. العقيلي ، صالح رشيد و الشايب ، محمد سامر(1998) . استخدام البرنامج الاحصائي spss. مطبوعات جامعة بغداد . دار الشرق للطباعة . صفحة 358 .

12. Esin, E.E, Fikrettin, S. and Ayten, K. (2011). Determination of petroleum-degrading bacteria isolated from crude oil-contaminated soil in Turkey. African Journal of Biotechnology. Vol (9) pp. 441-449.

13. Kayode-Isola, T.M, Eniola, K.I.T., Olayemi, A.B. and Igunnugbemi, O.O. (2008). Response of Resident Bacteria of a Crude Oil-Polluted River to Diesel Oil. American-Eurasian Journal of Agronomy. 1 (1): 06-09.

14. Nelly, C, Borjana, T. and Boryana, N. D. (2009). Enhanced Hydrocarbon Biodegradation by a Newly Isolated *Bacillus laterosporus* Strain. Appl. Environ. Microbiol. 42: 408-421.

15. Atlas, R.M. and Bartha, R. (2005). Hydrocarbon Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. Adv. Microb. Ecol. 12: 287–338.

16. Graumann, P. (2007). Bacillus: Cellular and Molecular Biology 1st ed. Caister Academic Press. Pp. 322-330.

17. James, T. S. (2006). Incidence of Prosthecate Bacteria in a Polluted Stream. Appl. Microbiology. Vol. 22, p. 496-502.

18. Fry, J. C.; Gadd, G. M, Herbert, R. A, Jones, C.W. and Watson-Craik, I. A. (2009). Microbial Control of Pollution. Society of General Microbiology, Cambridge University Press, London. Pp: 34-38.

19. Michael, H. Gerardi (2006). Wastewater Bacteria. Williamsport, Pennsylvania USA. Pp. 78 – 95.

20. Schachman, H. K. (2010). Methods in Enzymology. Eds. Academic Press, New York, Vol. 4, pp. 32-71.

21. Arts, P, Robertson, L.A. and Kuenen, J.G. (2009). Nitrification and denitrification by *bacteria* in aerobic batch and chemo stat cultures. FEMS Microbiol. Ecol. 18: 305–316.

22. Luz, E. B. and Yoav, B. (2008). Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use with activated sludge. Water Research. 38: 4222–4246.