كفاءة الرايزوبيا في تحلل زيت الوقود وأثره في خصائص التربة الحيوية

بثينة محمد صادق جعفر الجادر[1] ، بهاء عبد الجبارعبد الحميد [2]، صالح عبد الرضا الصالح البكري[3]
[2,1] قسم علوم التربة والمياه- كلية الزراعة – جامعة بغداد
[3] قسم التقانة الأحيائية- جامعة التكنولوجيا

المستخلص:
عزلت بكتريا من العقد الجذرية لجذور الماش (*Phaseolus aureus L.*)بهدف معرفة كفاءة هذه البكتريا في تحلل الهيدروكاربونات النفطية في التربة أذ تعُد هذه المشتقات أحد أهم الملوثات البيئية .أستخدمت عزلتان منتخبتان من بكتريا رايزوبيا وستة مستويات من زيت الوقود (0,1,2,3,4,5% W/W).حضنت عينات التربة ذات نسجة مزيجة طينية غرينية لمدد حضن 20 و40 و60 و80 يوماً . أستخدم تصميم تام التعشية بثلاثة مكررات لكل معاملة . أعتمدت قيم أقل فرق معنوي للمفاضلة بين المعاملات .أظهرت النتائج إن إضافة زيت الوقود والتلقيح ببكتريا الرايزوبيا والحضن أدت الى زيادة معنوية في معدل محتوى التربة من النتروجين الكلي المثبت (3.05 غم .كغم$^{-1}$) وزيادة محتوى التربة من الكاربون العضوي الكلي(59.93 غم .كغم$^{-1}$) مما أنعكس ذلك على زيادة المادة العضوية(103.31 غم .كغم$^{-1}$)ونسبة C:N أذ بلغت (22:18) وأنخفاض متبقي زيت الوقود(31.13 ملغم .كغم$^{-1}$) والأس الهيدروجيني للتربة (5.47) الناتج من تحلل وأستهلاك زيت الوقود من قبل بكتريا الرايزوبيا، رافقت ذلك زيادة في معدل نمو البكتريا الى (لوغاريتم 12.36) فأنعكس هذا على زيادة إزالة زيت الوقود من التربة من خلال زيادة عملية التحلل الحيوي.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences 40 (5):55-69 (2009) AL – Jader et al.

RHIZOBIA EFFICIENCY IN FUEL OIL DEGRADATION AND SOIL BIOLOGICAL PROPERTIES

B.M.S. AL – Jader[1] , B.A.AL –Hameed [2] , S.A.AL.AL-Bakr[3]
[1,2]Dept.of Soil and Water Scinces / College of Agriculture/ University of Baghdad [3] Dept.of Biotechnology / Univesity of Technology

ABSTRACT:
Bacterial isolates were collected from root nodules of *Phaseolus aureus L.* plants grown in soil to study its effect on fuel oil degradation and soil biological properties. Two types of *Rhizobium* isolates (IB_2 and IB_{10})and six levels of fuel oil (0,1,2,3,4, and % 5) have been used Soil samples (SiCL texture) have incubated for 20,40,60, and 80 days .A completely randomized design was used with three replications. Treatment values were tested by least significant difference.The results showed that the addition of fuel oil and *Rhizobium* inoculation led to a statistically significant increase in total nitrogin (3.05 g.kg $^{-1}$) and the total organic carbon (59.93 g.kg $^{-1}$) That was reflected to increasing organic matter (103.31 g.kg $^{-1}$) and increasing the C:N ratio of the soil(22.18) and decreasing that resedus (26.55 mg.kg $^{-1}$) and decreasing the pH (5.47) due to added fuel oil to the soil .However,bacterial growth was etimeted to be (Log 12.36) This was thought to be reflected on increasing activity of fuel oil removal from soil throughout increasing biodegradation.

المقدمة:

تشير الأحصائيات والوقائع الى أن أكثر من نصف سكان العالم والعراق خصوصاً يعانون حاليا من مشكلة التلوث البيئي إلا أن هذه المشكلة ستصبح من أخطر المشاكل البيئة في المستقبل القريب بسبب الزيادة في الكثافة السكانية ومخلفات الصناعة النفطية .

نتيجة للتقدم العلمي في مجال الأحياء المجهرية والتعرف على مواصفات هذه الأحياء وكفاءتها فقد أمكن الحصول من خلال هذه الكائنات الحية الدقيقة النافعة على الكثير من المنتجات النافعة للأنسان مثل بروتينات الخلية الواحدة والسكريات المتعددة والفيتامينات والمضادات الحيوية فضلا عن تنظيف البيئة من الملوثات (16,9) . أتجهت المؤسسات المعنية بالتلوث خلال العقود الأخيرة الى أستخدام أحياء مجهرية في التحلل الحيوي للملوثات (19,18) .يُعد التحلل الحيوي من أهم التقنات الحديثة وأفضلها وتعرف على أنها أستخدام الأحياء المجهرية لأزالة أو تفكيك الملوثات لاسيما المشتقات النفطية،وقد تكون هذه الأحياء الدقيقة (طحالب ،بكتريا وفطريات) وهي لاتترك أثاراً جانبية أو بقايا لملوثات صناعية أو زراعية (19).

إن أستهلاك وأستخدام الهيدروكاربونات من قبل الأحياء من العمليات المعقدة التي تحدث في التربة تحت الظروف الهوائية (23,22) كما أن العوامل الكيمياوية والفيزياوية والحيوية الموجودة في البيئة تغير من محتوى الخليط الهيدروكاربوني النفطي الملوث والتي تدعى بمجموعها بعوامل التجوية .يلعب التحلل الحيوي للهيدروكاربونات النفطية دوراً هاماً في هذه العوامل وهي هذه عملية معقدة تؤثرفيها بعض العوامل مثل طبيعة المركب الهيدروكاربوني ومجتمع الأحياء المجهرية وعوامل البيئة ذات العلاقة بفعالياتها الحيوية(2).

لوحظ بأن لبعض الأحياء القابلية في إحداث التغيرات في الهيدروكاربونات قبل تحويل حالتها الفيزيائية ، وقد لاتستطيع أستخدامها ،لذا فأن أحياء أخرى قد تقوم بأستخدام هذه المركبات التي قد تهيأت أصلا من قبل أحياء مجهرية أخرى وهذا مانطلق عليه ظاهرة الأيض التساهمي Co-metoblism والذي تستخدمه مصدراً للكاربون الخلوي والطاقة (15,12). كذلك فأن بعض الكاربوهيدرات يمكن أن تمتص من قبل بعض البكتريا أو أن الخلايا تفرز مواد مستحلبة يطلق عليها المستحلبات الحيوية Bioemulsifiers اذ تحول الهيدروكاربونات الى شكل ذائب كاذب (11,1) ووجد أن بعض البكتريا السالبة لصبغة كرام لها ألفة عالية للأرتباط بالسطوح الكارهة للماء ومنها بكتريا الرايزوبيا (1). كذلك بينت نتائج أبحاث أخرى أمتلاك هذه البكتريا المقدرة في تحلل الهيدروكاربونات النفطية وأمتلاكها مستقبلات خاصة لربط الهيدروكاربونات أوأنتاج مواد كيمياوية كالأنزيمات تساعد على أستحلاب وأستخدام الهيدروكاربونات مصدراً للكاربوني لبناء الخلاياها (5,1).

كان الهدف من هذه التجربة الحصول على عزلات بكتيرية كفوءة في أستغلال الزيوت الكاربوهيدراتية النفطية المضافة الى التربة بهدف تحسين بعض الخصائص الفيزيائية أو التي تطرح بشكل فضلات صناعية الى البيئة لغرض معالجة مثل هذه الترب والتخلص من سمية هذه المركبات وإزالة التلوث في الترب الزراعية .

المواد وطرائق العمل:

أخذت تربة ذات نسجة SiCL من العمق 0-30 سم المصنفة لتحت المجموعة Typic Torrifluvent من موقع كلية الزراعة – جامعة بغداد .جففت العينات هوائيا ثم طحنت ومررت من منخل قطر فتحاته 2 ملم .تم تقدير بعض الصفات الكيميائية والفيزيائية والأحيائية لتربة التجربة (جدول 1)وفق الطرق المعتمدة في(8) .

جدول 1. الصفات الكيميائية والفيزيائية والأحيائية لتربة التجربة.

الصفة	القيمة
الأيصالية الكهربائية Ece	2.3 دسي سيمنز.م$^{-1}$
الأس الهيدروجيني pH	7.65
النتروجين الكلي	0.91 غم. كغم$^{-1}$
الفسفور الجاهز	8.93 ملغم. كغم$^{-1}$
البوتاسيوم الجاهز	96.77 ملغم. كغم$^{-1}$
الرمل	117.6 غم. كغم$^{-1}$
الغرين	497.0 غم. كغم$^{-1}$
الطين	385.4 غم. كغم$^{-1}$
النسجة	Si C L
المادة العضوية	14.85 غم. كغم$^{-1}$
الكثافة الظاهرية ميكاغرام.م$^{-3}$	1.45

أضيف زيت الوقود المستلم من مصفى الدورة – بغداد والمبينة مواصفاته في الجدول 2 الى عينة التربة المعقمة بنسب 0, 1, 2 ,3, 4, 5 %على أساس الوزن الجاف لكل100غم تربة جافة بعد أستخلاصه بمادة Diethyl_ether (V/V) ثم مزج الزيت مع التربة ومزجت باليد بشكل جيد .مررت التربة وزيت الوقود عبر منخل2 ملم ، رطبت التربة بالماء المقطر لإيصال الشد الرطوبي الى 33 كيلوباسكال (1) .أضيفت عزلتان منتخبتان من بكتريا *Rhizobium sPP* المعزولة من العقد الجذرية لنباتات الماش بعد تشخيصها (8)

جدول.2 بعض مواصفات زيت الوقود المضاف للتربة .

الصفة	القياس
الوزن النوعي عند 15.6^{o} م	0.95
نقطة الوميض	56
الزوجة سنتي بويز 50^{o} م	120
درجة الانسكاب م^{o}	21
الكبريت المتبقي %	3.5
الكاربون المتبقي %	6.5
نسبة الماء والرواسب	1.0
القيمة الحرارية كيلو سعرة. كغم$^{-1}$	10500
عدد ذرات الكاربون	24

حضنت عينات التربة الممزوجة مع زيت الوقود والملقحة بالبكتريا المعزولة لمدد 20و40 و 60 80 يوماً عند درجة حرارة 28 م^{0} مع المحافظة على المحتوى الرطوبي للتربة عند السعة الحقلية . بعد الأنتهاء من كل مدة حضن تم قياس الكاربون الكلي العضوي والنتروجين الكلي ومتبقي زيت الوقود و الدالة الحامضية للتربة والنمو اللوغارتمي للبكتريا بطريقة التخافيف وصب الأطباق .أستخدم تصميم تام التعشية بثلاثة

مكـررات وأعتمـدت قـيم أقـل فـرق معنـوي للمقارنـة بـين المتوسطات.

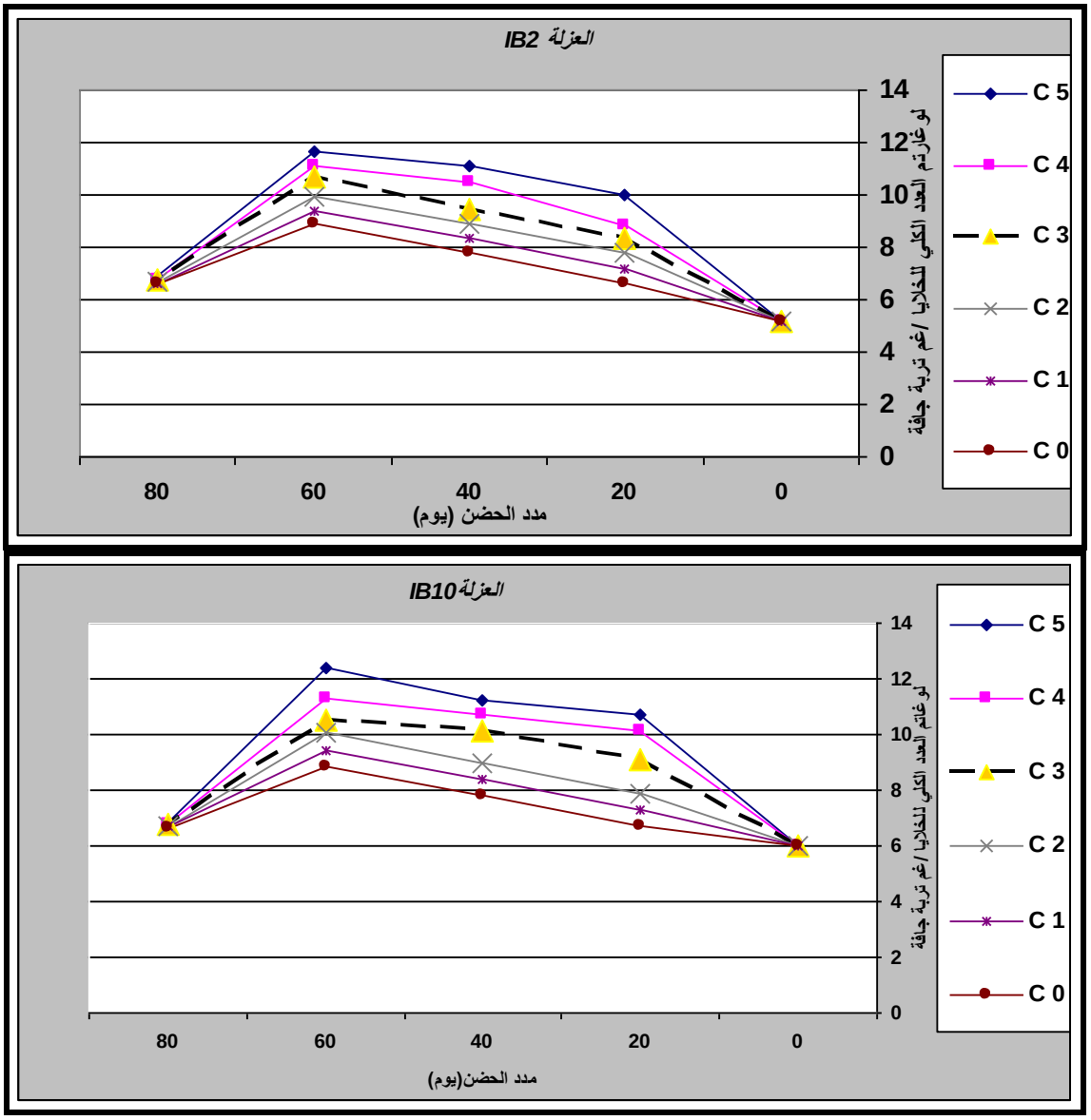
النتائج والمناقشة:

عزلت البكتريا من جذور نبات الماش ، اذ نمت هذه العزلات بشكل جيد في التربة الحاوية على زيت الوقود بنسبة (0 % و 1% و2 % و3 % و4 % و5 %) .كانت العزلات عصيات سالبة لملون كرام من الجنس *Rhizobium* في فحص وسط Bromothymol blue Agar وأن جميع العزلات أعطت نتيجة موجبة لفحص الكاتاليز و الاوكسيديز ، وهذا ما أشارت أليه نتائج بعض الباحثين(1).

يظهـر مـن الشـكل 1 أن أعـداد الخلايـا الحيـة قـد ازدادت بصـورة معنويـة وعلـى مسـتوى 0.01 خـلال مـدد التحضين الاربع (20،40, 60, 80 يوماً) مقارنة بالاعداد التـي سـجلت فـي بدايـة التجربـة (الـزمن صـفراً) وبـدأت بالانخفاض قليلاً في المدة الأخيرة .إذ بلغ لوغارتم النمو لخلايا الرايزوبيا عند (الزمن صفر)6.01 و5.15 Log خلية .غم$^{-1}$ تربـة جافـة علـى التتـابع لكلتـا العزلتينIB_{10} وIB_2. ازدادت الاعداد بعد مرور 20 يوما من التحضين لتصل الى 8.63و 8.11 Logخلية . غم$^{-1}$ تربة جافة للعزلتينIB_{10} وIB_2على التتابع، ثم ارتفعت في مدة التحضين الثانية بعد مرور 40 يومـاً الـى9.541 و9.33 Log خليـة . غـم$^{-1}$ تربـة جافـة العزلتينIB_{10} وIB_2. وازدادت ايضاً بعد مرور 60 يوماً من مـدة التحضـين إذ بلـغ اعلـى معـدل لاعـداد البكتريـا 10.42و10.28 Log خليـة . غـم$^{-1}$ تربـة جافـة للعزلتين IB_{10}وIB_2. بينما انخفضت خلال مدة التحضين الاخيرة 80 يوماً الـى6.72 و 6.73 Log خليـة .غـم$^{-1}$ تربـة جافـة للعزلتينIB_{10} وIB_2، الا انها بقيت اعلى مما كانت عليه في الزمن صفر . قد يعود سبب أنخفاض العدد بعد مرور 80 يوماً من التحضين الى موت بعض الخلايا لتناقص العناصر الغذائية في التربة ، فضلاً عن انه بعد 60 يوماً من التحضين ربمـا حصـلت تغيـرات غيـر ملائمـة فـي البيئـة لنمـو البكتريـا وخصوصـاً الأس الهيـدروجيني للتربـة ممـا ظهـر فـي خفـض اعداد البكتريا خلال مدة التحضين الاخيرة بعد 80 يوماً، وهذا يتماشى مع النتائج التي حصل عليها آخرون(6,1).

يبين الشكل 1 أرتفاع عدد خلايا الرايزوبيا مع زيادة مـدد التحضـين حتـى 60 يومـاً وعنـد جميـع مسـتويات أضـافة زيت الوقود و ثم انخفضت بعد تلك المدة. كان لاضافة زيت الوقود تاثير ايجابي في أعداد البكتريا ، فقد أدت اضافة 4,3,2,1, و 5 % زيت الوقود . 100g^{-1} تربـة جافـة الـى زيادة عدد خلايا بكتريا العقد الجذرية معنوياً للعزلة IB_2 إذ بلـغ (8.95,8.47,7.69,7.34) Log خليـة .غـم$^{-1}$ تربـة جافـة بالتتابع. بلـغ متوسـط مقارنتهـا 7.00 Log خليـة .غـم$^{-1}$ تربـة جافة .إلا أنها كانت أعلى من الأعداد في بداية التجربة أذ سجلت 5.15 Log خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة . في حين أزداد أعداد البكتريا للعزلة IB_{10} (9.42,8.97,8.50,7.92,7.56) Log خليـة .غـم$^{-1}$ تربـة جافـة قياسـاً بمتوسـط الأعـداد فـي معاملة مقارنتها 7.20 Log خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة و كانت أعلى من الأعداد في بداية التجربة أذ سجلت 6.01 Log خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة .

كـان التـداخل بـين زيـت الوقـود العـزلات ومـدد التحضين معنوياً إذ بلغت اعداد البكتريا ذروتها عند مستوى 5% زيت وقود ، وذلك بعد 60 يوماً من التحضين إذ بلغت اعدادها للعزلـة IB_{10} 12.36 Log خليـة .غـم$^{-1}$ تربـة جافـة وكان اقل عدد للبكتريا في مدة التحضين نفسها عند معاملة المقارنة إذ كانت اعدادها 8.87 Log خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة . في حين بلغت أعداد البكتريا للعزلة IB_2 11.66 Logخلية .غم$^{-1}$ تربة جافة وبفارق معنوي عن عدد البكتريا في نفس مدة التحضين لمعاملة مقارنتها 8.87 Iog خلية .غم$^{-1}$ تربة جافة وهذا يتماشـى مـع ماحصـل عليـه بعض البـاحثين (1). أظهـر التحليـل الاحصـائي وجـود فـروق معنويـة عنـد مسـتوى احتمـال 0.01 لتوليفـات بـين مسـتوى زيـت الوقـود والعـزلتين المنتخبتـين. تشـير هـذه النتـائج الـى أن البكتريـا أسـتطاعت أستغلال زيت الوقود مصدرا للكاربون والطاقة للقيام بفعالياتها الحيوية اي أنها تمتلك الأنزيمات المحللة لهذه المواد.وقد تكون لهذه البكتريا عدة أنظمة إنزيمية تعمل على تفكيك هذه المواد المعقدة وتحويلها الى مواد أبسط لتمكن البكتريا من الأستفادة منها، فضلا عن أن هذه البكتريا تمتلك جينات محمولة على الكروسـومات والبلازميـدات مسـؤولة عـن تخليـق الأنزيمـات المحللة المركبات النفطية (4,3).



شكل1. تأثيرزيت الوقود ومدة الحضن في أعداد الخلايا الحية لبكتريا الرايزوبيا(العزلة IB_2 وIB_{10}).

- **C = تركيز زيت الوقود ، IB = العزلة**

بينت نتائج التحليل الأحصائي في جداول 3 و4 و5 و6 وجود تـأثير معنـوي لأضـافة زيـت الوقـود أذ ادى ذلـك الـى زيـادة محتوى التربة من النتروجين . تفوقت معاملة زيت الوقود 5 % معنويا على بقية المستويات ، وتفوقت مستويات زيت الوقود علـى معاملـة المقارنـة لكلتـا العـزلتين . بلـغ متوسـط محتـوى النتروجين في التربة للمعاملات 5,4,3,2,1,0 % 100^{-1}g. تربـــــــة جافـــــــة بالعزلـــــــة IB_2 فكانـــــــت 2.31,2.26,2.30,2.30,2.03 و2.43 غـم .كغـم$^{-1}$ بالتتـابع أمـــا فـــي التربـــة الملقحـــة بالعزلـــة IB_{10} فكانـــت 2.56,2.53,2.36,2.36,2.12 و2.72غم .كغم$^{-1}$ بالتتابع.أن هذه النتائج تتفق مـع ماتوصـل اليـه آخـرون (6,5,3) . ان زيت الوقود يزيد تثبيت النتروجين الجوي بزيادة تحلل نواتجه التي تكون جاهزة لتمثيل النتروجين وأنتاج الطاقة مما يزيد من تثبيت النتروجين حيوياً (14).

أحتوت جميع معاملات التربة الملقحة على محتوى أعلى مـن النتـروجين تحـت جميـع المعـاملات مقارنـة بالتربـة غيـر الملقحـة وأظهـرت النتـائج المبينـة فـي الجـداول6,5,4,3 أن للتلقـيح أثـراً معنويـاً واضـحاً فـي زيـادة محتـوى التربـة مـن النتروجين الكلي فقد بلغ أدنى محتوى له 0.91 غم .كغم$^{-1}$ في معاملـة المقارنـة فـي حـين أرتفـع ليصـل2.48 غم .كغم$^{-1}$ عند التلقـيح بالعزلـة IB_2 ومـن دون فـرق معنـوي بـين العـزلتين . سـجلت العزلـة IB_{10} محتـوى التربـة مـن النتـروجين 2.24 غم .كغم$^{-1}$ أن أضافة اللقاح البكتيري ساعد كثيراً في تجهيز التربة

بالنتروجين الجوي المثبت حيويا وأن ذلك يعود الى المقدرة العالية لبكتريا الرايزوبيا الداخلة في التلقيح في تثبيت النتروجين الجوي حيوياً (17,7,5).

أما معاملات الحضن فأن نتائج التحليل الأحصائي والجداول 6,5,4,3 أظهرت عدم وجود فروق معنوية في متوسط محتوى النتروجين في الترب الملقحة بكلتا العزلتين رغم تفوقهما على معاملة المقارنة وتفوق معاملة 5 % على باقي المعاملات بلغ متوسط محتوى النتروجين في الترب الملقحة بالعزلة IB_2 عند مدد الحضن 20 و40 و60 و80يوماً 2.06و2.26 و2.33 و2.43غم .كغم$^{-1}$ بالتتابع .أما في التربة الملقحة بالعزلة IB_{10} فكانت 2.65,2.57,2.48,2.17غم .كغم$^{-1}$ بالتتابع.أن أنزيم النتروجينز هو المسؤول عن أختزالN_2 الى NH_3 في خلايا بكتريا الرايزوبيا وأن كفاءة عملية الأختزال N_2 تعتمد على تجهيز الكاربوهيدرات وتمثيل الأحماض الأمينية (10,7,4) يلاحظ من الجداول 3و4 و5 و6 وجود تداخلات معنوية بين زيت الوقود ومدد الحضن مع التلقيح البكتيري بالعزلتين تفوقت التوليفة 5 % + 80 يوماً في التربة الملقحة بالعزلة IB_{10} أذ سجلت 3.05 غم .كغم$^{-1}$ وبفارق معنوي عن معاملة مقارنتها التي سجلت 2.43 غم .كغم$^{-1}$ تلتها معاملة التوليفة 5 % + 80 يوما في التربة الملقحة بالعزلة IB_2 أذ سجلت 2.63 غم .كغم$^{-1}$ بينما أعطت معاملة المقارنة أقل فرق متوسط محتوى نتروجين في التربة أذ سجلت 0.91 غم .كغم$^{-1}$.ربما تأتي الزيادة في محتوى التربة من النتروجين الى زيادة الطاقة الناتجة من زيادة الكاربون المتأتي من تحلل زيت الوقود فزيادة نشاط الأنزيمات داخل الخلية ومنها أنزيم النتروجينيز المسؤول عن تثبيت النتروجين الجوي حيوياً (3) .

جدول 3 . تأثير العزلة وتركيز زيت الوقود في محتوى التربة من النتروجين الكلي (غم.كغم $^{-1}$) في مدة الحضن 20يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	1.84	2.12	2.12	2.03	2.09	2.18	2.06
IB_{10}	1.93	2.24	2.11	2.24	2.27	2.28	2.17
المعدل	1.89	2.18	2.11	2.13	2.18	2.23	2.11

LSD: للعزلة:*0.01، للتركيز:*0.03، التداخل:*0.04

جدول 4. تأثير العزلة وتركيز زيت الوقود في محتوى التربة من النتروجين الكلي (غم.كغم $^{-1}$) في مدة الحضن 40 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	1.93	2.31	2.31	2.26	2.33	2.41	2.26
IB_{10}	2.31	2.29	2.36	2.57	2.61	2.73	2.48
المعدل	2.12	2.30	2.33	2.42	2.47	2.57	2.37

LSD: للعزلة:*0.01، للتركيز:*0.02، التداخل:*0.03

جدول 5. تأثيرالعزلة وتركيز زيت الوقود في محتوى التربة من النتروجين الكلي(غم.كغم $^{-1}$)في مدة الحضن 60 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	2.05	2.39	2.35	2.29	2.39	2.50	2.33
IB_{10}	2.35	2.45	2.46	2.65	2.64	2.83	2.57
المعدل	2.20	2.40	2.42	2.47	2.53	2.66	2.45

LSD: للعزلة:*0.01 للتركيز:*0.02، التداخل:0.03

جدول 6. تأثير العزلة وزيت الوقود في محتوى التربة من النتروجين الكلي (غم.كغم $^{-1}$)في مدة الحضن 80 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	2.26	2.41	2.42	2.46	2.45	2.63	2.43
IB_{10}	2.43	2.48	2.51	2.68	2.75	3.05	2.65
المعدل	2.34	2.45	2.47	2.57	2.60	2.84	2.54

LSD: للعزلة:*0.01 ، للتركيز:*0.02، التداخل:*0.03

تبين نتائج الجداول 7و8و 9 و10 أن للتلقيح البكتيري أثراً أيجابيا في زيادة محتوى التربة من الكاربون العضوي . تفوقت التربة الملقحة بالعزلتين المنتخبتين على التربة غير الملقحة فبلغ معدل المحتوى عند المعاملات (بدون تلقيح و التلقيح بالعزلة IB_2 والتلقيح بالعزلة IB_{10}). سجلت التربة الملقحة بالعزلة IB_2 متوسطاً قدره 12.73 و13.46 و 24.79و29.33غم .كغم$^{-1}$ بالتتابع في حين سجلت العزلة IB_{10} متوسط مقداره 13.19و14.82 و27.14 و31.54غم .كغم$^{-1}$ بالتتابع ،بينما سجلت المقارنة 8.52 غم .كغم$^{-1}$.إن الزيادة الحاصلة في محتوى التربة من الكاربون تؤكد ماتوصل اليه آخرون(11,4) من أن هذه الزيادة قد نتجت من تحلل أجسام وخلايا الأحياء المجهرية بعد موتها .

يتبين من الجداول7و8 و 9 و10 أن مستويات زيت الوقود المضافة قد أدت الى زيادة معنوية في قيم محتوى التربة من الكاربون العضوي الكلي فقد أثر زيت الوقود في محتوى الكاربون العضوي الكلي الى الضعف عند مستويات الأضافة 1 % و2% و3% و4 % و5% زيت وقود . 100 غم $^{-1}$.للعزلة IB_2 فكانت 44.29, 41.71,36.90,34.14,20.07و48.08 غم .كغم$^{-1}$ بالتتابع .في حين بلغ الكاربون العضوي الكلي للعزلة IB_{10} 50.42,49.48,44.86,40.16,36.09,21.67 غم .كغم$^{-1}$ بالتتابع.

تبين بيانات وجداول 7و8 و 9 و10 أن لمدد التحضين اثراً أيجابيا ومعنويا في زيادة محتوى التربة من الكاربون العضوي الكلي فقد تفوقت معنوياً في مدد الحضن (80,60,40,20) يوماً للعزلةIB_2 40.40,33.51,28.93 و46.38 غم .كغم$^{-1}$ بالتتابع.وللعزلةIB_{10} 43.63,37.97,32.31 و48 .38 غم .كغم$^{-1}$ بالتتابع.

كذلك يتضح من الجداول 7و8 و 9 و10 أن هنالك تأثيرا معنويا لمعاملات التداخل بين كل من زيت الوقود ومدد الحضن والتلقيح البكتيري فقد أعطت معاملة التداخل 5 % + 80 يوماً في التربة الملقحة بالعزلة IB_{10} أعلى معدل بلغ 59.93 غم. كغم$^{-1}$.تلتها معاملة التداخل 4 % + 80 يوماً أذ سجلت 56.55 غم. كغم$^{-1}$ وبفارق معنوي عن معدل معاملة المقارنة التي بلغت 13.19 غم. كغم$^{-1}$.أما التربة الملقحة بالعزلة IB_2 فحققت معاملة التداخل 5 % +80 يوماً أعلى 55.51 غم. كغم$^{-1}$وبفارق معنوي عن معاملة مقارنتها 12.73 في حين سجلت معاملة المقارنة بدون تلقيح اقل معدل مقداره 8.54 غم. كغم$^{-1}$. إن زيادة الكاربون ناتج من تفكك الأصرة للتركيب الكيميائي لزيت الوقود الطويل السلسلة بفعل الأنزيمات المحللة التي تفرزها البكتريا(1).

جدول 7 . تأثير العزلة وتركيز زيت الوقود في محتوى من الكاربون العضوي (غم.كغم $^{-1}$)في مدة الحضن 20 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	12.73	26.57	29.49	32.41	34.92	43.01	28.93
IB_{10}	13.19	28.93	33.13	36.82	38.82	37.44	32.31
المعدل	12.96	27.75	31.31	34.62	36.87	40.22	30.62

LSD: للعزلة:*0.42، للتركيز:*0.73 ، التداخل:*1.03

جدول 8. تأثيرالعزلة وتركيز زيت الوقود في محتوى التربة من الكاربون العضوي (غم.كغم $^{-1}$) في الحضن 40 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	13.46	30.15	31.72	40.71	41.66	43.38	33.51
IB_{10}	14.82	32.45	37.19	43.57	49.40	50.40	37.97
المعدل	14.14	31.30	34.45	42.14	45.53	46.89	35.74

LSD: للعزلة:*0.44، للتركيز:*0.76 تداخل:*1.08

جدول 9 . تأثيرالعزلة وتركيز زيت الوقود في محتوى التربة من الكاربون العضوي(غم.كغم $^{-1}$)في مدة الحضن 60 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	24.79	38.13	39.09	43.87	46.10	50.45	40.40
IB_{10}	27.14	38.42	41.79	47.37	53.17	53.92	43.63
المعدل	25.97	38.27	40.44	45.62	49.63	52.18	42.05

LSD: للعزلة:*0.52، للتركيز:*0.90، التداخل:*1.27

جدول10. تأثيرالعزلة وتركيز زيت الوقود في محتوى التربة من الكاربون العضوي(غم.كغم $^{-1}$)في مدة الحضن 80 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	29.33	41.71	47.31	49.93	54.49	55.51	46.38
IB_{10}	31.54	44.54	48.55	51.69	56.55	59.93	48.38
المعدل	30.44	43.13	47.93	50.81	55.52	57.72	47.38

LSD: للعزلة:*0.44، للتركيز:*0.76، التداخل:*1.08

توضح نتائج الجداول 11 و12 و13و14 أن معدل محتوى المادة العضوية في التربة قد سار بنفس الأتجاه الذي سار فيه محتوى التربة من الكاربون العضوي الكلي فقد تفوق مستوى أضافة 5 % زيت وقود . 100 غم $^{-1}$ بمعدل 74.14و86.90 و92.96 و103.31غم .كغم$^{-1}$ على معاملة المقارنة معنوياً أذ أعطت محتوى مادة عضوية 54.38,46.80,25.55,22.73 غم .كغم$^{-1}$ بالتتابع للعزلة IB_{10} ولم تحصل فروق معنوية بين المستويين الرابع والخامس في حين سجلت معاملة المقارنة 14.85 غم .كغم$^{-1}$ بينما سجلت العزلة IB_2 محتوى مادة عضوية بلغ 64.55 و74.79 و86.98 95.69 غم .كغم$^{-1}$ بالتتابع وبدون فرق معنوي عن المستوى الرابع من أضافة زيت الوقود . كما تفوق التلقيح البكتيري بالعزلة IB_{10} معنويا في محتوى التربة من المادة العضوية (84.13,75.23,65.47,55.88) غم .كغم$^{-1}$على العزلة IB_2 في محتوى المادة العضوية (79.96,69.66,57.78,49.55) غم .كغم$^{-1}$ بالتتابع ..

أشارت نتائج جداول 11 و12 و13 و14 الى وجود تداخل معنوي للتلقيح البكتري ومستويات زيت الوقود .فبلغت معاملة المقارنة للعزلة IB_{10} 54.38. غم .كغم$^{-1}$.في حين أعطى التداخل 103.31غم .كغم$^{-1}$. في نفس مدة الحضن 80 يوماً بينما سجلت المقارنة العزلة IB_2 50.57 غم .كغم$^{-1}$. أعطى مستوى التداخل 5 % زيت وقود 95.69 غم .كغم$^{-1}$.في نفس مدة الحضن 80 يوماً. تعزى زيادة المادة العضوية

في التربة الى تحلل زيت الوقود بفعل بكتريا الرايزوبيا فضلاً عن أحتواء زيت الوقود على نسبة عالية من الكاربون.

جدول 11. تأثير العزلة وتركيز زيت الوقود في محتوى التربة من المادة العضوية (غم/كغم $^{-1}$) في مدة الحضن 20 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	21.95	45.81	48.93	55.88	60.21	64.55	49.55
IB_{10}	22.73	49.87	57.12	63.48	66.92	74.14	55.71
المعدل	22.34	47.84	53.02	59.68	63.56	69.34	52.63

LSD: للعزلة:*0.90، للتركيز:*1.57، التداخل:*2.22

جدول 12. تأثير العزلة وتركيز زيت الوقود في محتوى التربة من المادة العضوية (غم/كغم $^{-1}$) في مدة الحضن 40 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	23.20	51.98	54.96	70.19	71.82	74.79	57.78
IB_{10}	25.55	55.95	64.12	75.12	85.17	86.90	65.47
المعدل	24.38	53.96	59.40	72.65	78.49	80.84	61.62

LSD: للعزلة:*0.76، للتركيز:*1.32، التداخل:*1.87

جدول 13 . تأثير العزلة وتركيز زيت الوقود في محتوى التربة من المادة العضوية (غم/كغم $^{-1}$) في مدة الحضن60 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	42.74	65.74	67.40	75.63	79.47	86.98	69.66
IB_{10}	46.80	66.24	72.04	81.67	91.67	92.96	75.23
المعدل	44.77	65.99	69.72	78.65	85.57	89.97	72.44

LSD: للعزلة:*0.89، للتركيز:*1.55,التداخل:*2.20

جدول 14. تأثير العزلة وتركيز زيت الوقود في محتوى التربة من المادة العضوية (غم/كغم $^{-1}$) في مدة الحضن 80 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	50.57	71.91	81.57	86.08	93.95	95.69	79.96
IB_{10}	54.38	76.79	83.71	89.11	97.49	103.31	84.14
المعدل	52.47	74.35	82.64	87.59	95.72	99.50	82.02

LSD: للعزلة:*0.76، للتركيز:*1.32، التداخل:*1.87

أدى زيت الوقود ولكافة المستويات (الجداول15-18) الى زيادة معنوية في نسبة C:N بالمقارنة بمعاملة القياس فقد بلغ متوسط C:N بدون أضافة زيت الوقود 6.90 و 6.62 و 12.07و 12.97 بالتتابع للعزلة IB_2 و6.76 و6.41 و 11.51و12.98على التتابع لمستويات أضافة زيت الوقود للعزلة IB_2. في حين بلغ متوسط C:N لمستويات أضافة زيت الوقود 17.22,14.53.13.99 و 18.53 للعزلة IB_{10} على التتابع في حين بلغ متوسط C:N لمستويات أضافة

زيت الوقود للعزلة IB_{10} 15.10,14.35 ,16.83و18.27. أن تكاثر البكتريا يحتاج الى وجود طاقة ،كاربون عضوي عال ونتروجين معدني واطئ مما يؤدي الى عملية التمعدن البطيئة وأستمرارية النمو والتكاثر للخلايا البكتريا (3). يعزى أيضاً السبب الى أحتواء زيت الوقود على نسبة C:N واطئة .أثرت مستويات زيت الوقود تأثيراً واضحاً في هذه الصفة فقد أزدادت C:N بزيادة مستوى زيت الوقود المضاف 4,% % 0 1, % 2,% 3, % و5 % بالتتابع الى زيادة قدرها 18.41,17.02,14.81,14.17 بالتتابع لكلا العزلتين مقارنة بمعاملة المقارنة.

لنفس الجداول أظهرت النتائج وجود تداخل معنوي بين مستويات أضافة زيت الوقود والتلقيح البكتيري بالعزلات المنتخبة . أعطت معاملة المقارنة 6.41 أدنى قيمة لنسبة C:N في مدة الحضن 40 يوماً دون أضافة زيت وقود ،في حين أعطت مستوى أضافة لزيت الوقود 4 % أعلى قيمة 22.18 للعزلةIB_2 بينما كان تأثير التداخل بين التلقيح بالعزلة IB_{10} ومستويات زيت الوقود أذ بلغ متوسط C:N 20.56 عند مستوى أضافة زيت وقود 4 % ومدة حضن 80 يوماً أن التداخل في هذه الصفة واضحاً.أن نشاط الأنزيمات يزداد بزيادة المواد ذات النسبة الواطئة .كذلك فأن لمحتوى النتروجين الكلي تأثيراً كبيراً في زيادة نشاط الأنزيمات مما أدى الى زيادة عملية التحلل الحيوي لزيت الوقود ومن ثم زيادة الكاربون العضوي فضلاً عن زيادة تثبيت النتروجين الجوي حيوياً مما يؤدي الى تكوين تربة ذات C:N واطئة وبتالي زيادة أعداد البكتريا.

جدول 15 . تأثير العزلة وتركيززيت الوقود في محتوى التربة من (C/N) في مدة الحضن20 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	6.90	11.67	13.03	15.96	16.71	19.72	13.99
IB_{10}	6.76	13.69	15.60	16.55	17.10	16.42	14.35
المعدل	6.83	12.68	14.31	16.25	16.91	18.07	14.17

LSD: للعزلة:*0.16، للتركيز:*0.28،التداخل:*0.40

جدول 16. تأثير العزلة وتركيززيت الوقود في محتوى التربة من (C/N) في مدة الحضن40 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	6.62	13.05	13.71	17.96	17.87	17.97	14.53
IB_{10}	6.41	14.17	15.76	16.90	18.92	18.41	15.10
المعدل	6.51	13.61	14.73	17.43	18.40	18.19	14.81

LSD: للعزلة:*0.17،للتركيز:*0.29،التداخل:*0.42

جدول 17 . تأثير العزلة وتركيززيت الوقود في محتوى التربة من (C/N) في مدة الحضن60 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	12.07	16.11	17.58	19.13	19.28	20.15	17.22
IB_{10}	11.51	15.68	16.99	17.83	19.83	19.13	16.83
المعدل	11.79	15.89	16.78	18.48	19.55	19.64	17.02

LSD: للعزلة:*0.23، للتركيز:*0.40، التداخل:*0.57

جدول 18 . تأثير العزلة وتركيززيت الوقود في محتوى التربة من (C/N) في مدة الحضن80 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	12.97	17.26	19.50	20.26	22.79	19.11	18.55
IB_{10}	12.98	17.91	19.31	19.23	21.42	19.60	18.27
المعدل	12.98	17.58	19.40	19.75	21.37	19.36	18.41

LSD: للعزلة:*0.19 للتركيز :*0.33 ،التداخل:*0.47

لوحظ أيضاً تباين الأس الهيدروجيني النهائي بالأنخفاض عن الأس الهيدروجيني الأبتدائي بأختلاف العزلة البكتيرية فقد تفوقت معنوياً في مدد الحضن (80,60,40,20) يوماً 5.56,6.73,6.72 و5.56 بالتتابع للعزلة IB_2 في حين بلغ للعزلة IB_{10} ولمدد التحضين المختلفة 6.57,6.79,7.07 و6.57 بالتتابع.كما كان لأضافة مستويات مختلفة من زيت الوقود دوراً واضحا جداً في تباين الأس الهيدروجيني للتربة بالتتابع للعزلتين IB_{10} وIB_2 أذ بلغ متوسط الأس الهيدروجيني 7.15, 6.76, 5.56 و5.56 بالتتابع.من ناحية أخرى أعطت معاملة المقارنة 7.65 في حين أنخفضت الى 5.47 في مدة الحضن 80 يوما عند مستوى 5 % زيت وقود للعزلة IB_{10} .في حين أعطى مستوى الأضافة 5 % قيمة 5.21 للعزلة IB_2 في مدة الحضن الأخيرة مما ادى الى خفض أعداد البكتريا في الشكل 1.أن أنخفاض الحموضة يدل على تفكك التركيب الكيميائي المعقد لزيت الوقود الى وحدات أبسط تركيباً أكثر ذائبية ويسهل أستغلالها من قبل البكتريا. كما أن تحلل زيت الوقود ينتج عنه تحرر نسب عالية من الأحماض العضوية والأمينية والدهنية ممايسهم في خفض pH.

جدول 19 . تأثير العزلة وتركيززيت الوقود في الأس الهيدروجيني للتربة في مدة الحضن 20يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	7.24	7.14	7.43	7.18	7.21	7.26	7.24
IB_{10}	7.26	6.77	7.10	7.12	7.08	7.12	7.07
المعدل	7.25	6.95	7.26	7.15	7.14	7.19	7.15

LSD: للعزلة:*0.03 ، للتركيز :*0.05 ، التداخل:*0.07

جدول 20 . تأثير العزلة وتركيززيت الوقود في الأس الهيدروجيني للتربة في مدة الحضن 40 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	6.79	6.71	6.54	6.72	6.74	6.85	6.73
IB_{10}	6.92	6.75	6.79	6.85	6.77	6.73	6.79
المعدل	6.85	6.73	6.66	6.79	6.75	6.79	6.76

LSD: للعزلة:*0.05 ، للتركيز :*0.87 ، التداخل:*0.12

جدول 21 . تأثير العزلة وتركيززيت الوقود في الأس الهيدروجيني للتربة في مدة الحضن 60 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	6.51	6.55	6.50	6.62	6.62	6.60	6.56
IB_{10}	6.48	6.50	6.65	6.51	6.63	6.57	6.57
المعدل	6.49	6.57	6.58	6.56	6.62	6.58	6.56

LSD: للعزلة:*0.04، للتركيز:*0.08،التداخل:*0.11

جدول 22 . تأثير العزلة وتركيززيت الوقود في الأس الهيدروجيني للتربة في مدة الحضن 80يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	6.55	5.77	5.14	5.33	5.41	5.21	5.56
IB_{10}	6.23	5.14	5.48	5.35	5.75	5.47	5.57
المعدل	6.39	5.45	5.31	5.34	5.58	5.34	5.56

LSD: للعزلة:*0.12 ،للتركيز: 0.08 ، التداخل:*0.30

أما بالنسبة لكمية زيت الوقود المتبقي فقد لوحظ وجود تباين معنوي بأختلاف المزرعة البكتيرية ومدد التحضين المختلفة . أن أنخفاض كمية زيت الوقود المتبقي بعد 80 يوماً من الحضن يعطي مؤشراً على أستهلاك هذا الزيت من قبل الكائنات المجهرية المستخدمة أظهرت بيانات الجداول 26-23 تأثيراً معنوياً ، أذ سجلت العزلة IB_2 متبقي زيت وقود 61.72 و58.88 و50.88 و48.08 ملغم.كغم$^{-1}$ في حين سجلت العزلة IB_{10} متبقي زيت الوقود (31.12,40.92,47.12,53.01)ملغم.كغم$^{-1}$ فبينما سجلت المقارنة صفراً، ويعود السبب في ذلك لأستهلاك العالي لزيت الوقود الى أن البكتريا في التربة الملوثة بزيت الوقود قامت بتفكيك زيت الوقود الى أحماض كربوكسيلية وكيتونات والدهايدات ونواتج وسطية(17,13,6). كذلك أشارت النتائج الى تداخل معنوي بين مستويات أضافة زيت الوقود وتلقيح البكتيري فبلغت معاملة المقارنة للعزلتين IB_2 وIB_{10} (صفراً) ملغم.كغم$^{-1}$ في الوقت الذي أعطى مستوى الأضافة % 5الذي يعادل 5000 ملغم.كغم$^{-1}$ زيت وقود .كغم$^{-1}$ تربة جافة أذ أعطى هذا المستوى متبقي زيت وقود29.53 ملغم.كغم$^{-1}$ للعزلة IB_2 في حين بلغت أعلى نسبة أزالة من متبقي زيت الوقود26.55 ملغم.كغم$^{-1}$ وذلك عند أستخدام العزلة IB_{10} في 80 يوماً من التحضين جدول 26. أن هذا الرقم المنخفض يعطي مؤشراً على قابلية أستهلاك زيت الوقود وكفاءة التحلل من قبل الكائنات المستخدمة في المزرعة البكتيرية في التربة 20، 21 ، 22.

جدول 23. تأثير العزلة و زيت الوقود في متبقي زيت الوقود(ملغم.كغم$^{-1}$)في مدة الحضن 20يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	0.00	45.19	74.54	79.22	84.60	86.79	61.72
IB_{10}	0.00	40.68	69.68	62.79	70.59	74.35	53.01
المعدل	0.00	42.94	72.11	71.01	77.59	80.57	53.36

LSD: للعزلة:*1.04، للتركيز:*1.80،التداخل:*2.55

جدول 24 . تأثير العزلة و زيت الوقود في متبقي زيت الوقود (ملغم.كغم$^{-1}$)في مدة الحضن 40 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	0.00	41.19	69.17	76.98	82.59	83.59	58.88
IB_{10}	0.00	39.27	63.64	57.61	62.36	62.36	47.12
المعدل	0.00	40.23	66.41	67.29	72.09	72.97	53.00

LSD: للعزلة:*0.54، للتركيز:*0.94 ، التداخل:*1.32

جدول 25 . تأثير العزلة و زيت الوقود في متبقي زيت الوقود (ملغم.كغم$^{-1}$)في مدة الحضن60 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	0.00	38.34	65.59	70.35	78.21	52.78	50.88
IB_{10}	0.00	35.19	58.59	52.87	55.81	43.08	40.92
المعدل	0.00	36.76	62.09	61.61	67.01	47.93	45.90

LSD: للعزلة:*0.73، للتركيز:*1.28، للتداخل :*1.81

جدول 26 . تأثير العزلة و زيت الوقود في متبقي زيت الوقود(ملغم.كغم$^{-1}$)في مدة الحضن 80 يوماً

التركيز / العزلات	تركيز زيت الوقود %						المعدل
	0	1	2	3	4	5	
IB_2	0.00	34.15	59.11	64.88	70.81	29.53	43.08
IB_{10}	0.00	29.60	42.88	44.20	43.52	26.55	31.12
المعدل	0.00	31.88	50.99	54.54	57.16	28.04	37.10

LSD: للعزلة: *1.32 ، للتركيز:*2.29 ، التداخل:*3.24

نستنتج من النتائج ضرورة أعتماد أسلوب المعالجة البايولوجية كواحدة من الطرائق المعالجات المهمة على مستوى القطر ، خصوصا وأن الترب الزراعية تشهد تلوثاً عالياً وبمختلف الملوثات وبضمنها الهيدروكاربونات النفطية ،أذ أن التجربة الحالية أضافت أنواعاً جديدة من الأنواع المحلية المقاومة مثل *Pseudomonas,Rhizobium Phaseoli* والتي على أساسها وأساس ما سبقتها من دراسات قريبة المفهوم ممكن أن تبرمج على شكل مشاريع تصميمية لمحطات معالجة تكون أساس عملها المعالجة البايولوجية وذلك للتقليل أو الحد من التلوث.

المراجع:

1-الجادر، بثينة محمد صادق جعفر.2006.تأثير زيت الوقود في نشاط بكتريا الريزوبيوم ونمو وحاصل الفاصولياء ومقاومتها للمضادات الحيوية . رسالة ماجستير ، قسم علوم التربة والمياه،كلية الزراعة،جامعة بغداد. ع ص232.

2- بهية ،محمد حسن صبري .1998.تأثير زيت الوقود في بعض الصفات الفيزيائية وعلاقته بشكل التبلور ونعومة دقائق الجبس في الترب الجبسية .رسالة ماجستير ،قسم التربة ، كلية الزراعة ، جامعة بغداد .ع ص56.

3. Adam,G.;and H.Ducan.2003.The effect of diesel fuel on common (Vicia sativa L.) plants. Journal of Environmental Geochemistry and Health . 25: 123-130.

4. Adok, A.; and T. Orughbani .2007.Removal of crude petroleum hydrocarbons by hetrotrophic bacteria in soils amended with nitrogenous fertilizer plant effluents. African Journal of Biotechnology .6(13):1529 -1535.

5. Antonio, R .M ., ; I . Lucas , . K . D. L. Balkwill and.T.Romero.2001 . Nitrogen – fixing nodules with ensifer adhaerens harboring *Rhizobium tropici* symbiotic plasmid .Applied and Environmental Microbiology .67(7):3264-3268.

6. Basu, S. S., M. J. Karbarz, and C. R. H.Raetz.2002.Expression cloning and characterization of the C_{28} acyltransferase of lipid A biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*. J. Biol. Chem. 277:28959-28971.

7. Biedermannova,.E and, J.Vondrys.1992. Effect of seed inoculation on the fixation capacity of molecular nitrogen and above ground productivity and below ground biomass of peas (*Pisum satium*L.*)* Rostlnna Vyroba.38(2):134-150 .

8. Bruah ,T.C.,and P .Barthakur.2000. A Text Book of Soil Analysis , New Delhi, India ,pp .329.

9. Caldwell, M. E., R. M. Garrett, R. C. Prince, and J. M. Suflita. 1998. Anaerobic biodegradation of long-chain *n*-alkanes under sulfate-reducing conditions. Environ. Sci. Technol. 32:2191-2195.

10 . Carlson, R. W.;.J. Sanjuan.;U.R. Bhat,.;J. Glushka,.;H.P. Spaink.; A;.Wijfjes,. H. M., Van Brussel;. A. N. N.; Stokkermans, T. J. W.; Peters, N. K. and G. Stacey,. 1993. The structures and biological activities of the lipo-oligosaccharide nodulation signals produced by type-1 and type-2 strain of *Bradyrhizobium japonicum.* J. Biol. Chem., 268: 18372-18381.

11. Casellas, M., M. Grifoll, J. M. Bayona, and A. M. Solanas. 1997. New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. F101. Appl. Environ. Microbiol. 63:819-826.

12. Chang, J. H., S. K. Rhee, Y. K. Chank, and N. H. Chang. 1998. Desulfurization of diesel oils by a newly isolated dibenzothiophene-degrading *Nocardia* sp. strain CYKS2. Biotechnol. Prog. 14:851-855.

13. Charles, T., and P. Aneja,. 1997. Megaplasmid and chromosomal loci for the PHB degradation pathway in *Rhizobium meliloti*. Genetics 146:1211-1220.

14. Chen, Y.P.; A .R. Glenn, and M.J Dilworth .1985. Aromatic metabolism in *Rhizobium trifolii* –Catechol 1,2,-dioxygenase.Arch Microbil 141:225-228.

15. Daly,E.J.,H,j., M.R.T. Dale,.1988 .The effects of oil spill chemicals on carbon translocation rates in *Phaseolus vulgaris* L . Environ Pollut.52:151-163.

16. Ewa, K.; J. Wszelaka.; O. Marchut and S. Bielecki.2008.The effect of nitrate and ammonium ions on kinetics of diesel oil degradation by *Gordonia alkanivorans* S7 . International Biodeterioration & Biodegradation 61(3) :214-222.

17. Jennifer, L. K;. John N;. K. .L. Hung . and T.Jack.2005. Trevors the effects of perennial ryegrass and *alfalfa* on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil . Environmental Pollution. 133(3): 455-465.

18. Kato,T.,. M. Haruk;,. I. Manaka; .T.Morikawa. and ,M..S.Kanaya. 2001.Isolation and characterizoin of psychrotrophic from oil – reservoir, water and sands. Appl. Microbial Biotechnol. 55:794-800.

19. Veliev, M. G. B . Danielsson, M . A . Salmanov, S. R . Alieva and N. R. Bektashi.2008.Biodegradation of Baku oil and hydrocarbons by micromycetes .Journl Petroleum Chemistry. 48(1): 55–61.

20. Mueller, J.G., S.M. Resnick, M.E. Shelton, and P.H. Pritchard.2001. Effect of inoculation on the biodegradation of weathered Prudhoe Bay crude oil, Journal of Industrial Microbiology, 10:95-102.

21. Olivier. P;. C. Rafin and E. Veignie.2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. International Biodeterioration & Biodegradation. 54(1): 45-52.

22. Raeid, M.;.M. Abed, and J. Koster.2005.The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with *Cyanobacteria* in the degradation of oil compounds. International Biodeterioration & Biodegradation. 55 (1):29-37.

23. Rodrigo, J.;S. Jacques, C. O.Benedict.;. F. M. Bento.; S. Aline.; .M.T, C.R. Peralba A. Flavio;. And, O. Camargo.2008.Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic

hydrocarbons contaminated soil Bioresource Technology, 99 (7): 2637-2643.