



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى/ كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

استخدام انواع من الاحياء الدقيقة في الازالة الحيوية للتخلص من الفينول ضمن محافظة ديالى/ العراق

اطروحة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة

من قبل الطالب

خالد ضياء عبدالواحد الجاجاني

بكالوريوس علوم الحياة 1996-1997 / جامعة بغداد
ماجستير علوم حياة 2001-2002 / جامعة بغداد

بإشراف

أ.د. نجم عبدالله جمعة الزبيدي

آيار/ 2021 م

شوال / 1442هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي

النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي عَمِلُوا لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ ﴿٤١﴾﴾

صدق الله العظيم

[سورة الروم : ٤١]

إقرار المشرف

أشهد بأن إعداد هذه الأطروحة الموسومة (استخدام انواع من الاحياء الدقيقة في الازالة الحيوية للتخلص من الفينول ضمن محافظة ديالى/ العراق) التي قدمت من قبل الطالب (خالد ضياء عبدالواحد الجاجاني) قد جرت بإشرافي في قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في علوم الحياة.

 التوقيع:

المشرف: أ.د. نجم عبدالله جمعة الزبيدي

المرتبة العلمية: أستاذ

كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى

التاريخ: 2021/ 1 / 10

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المتوافرة نرشح هذه الأطروحة للمناقشة

 التوقيع:

رئيس القسم: أ.م.د. ذكري عطا ابراهيم

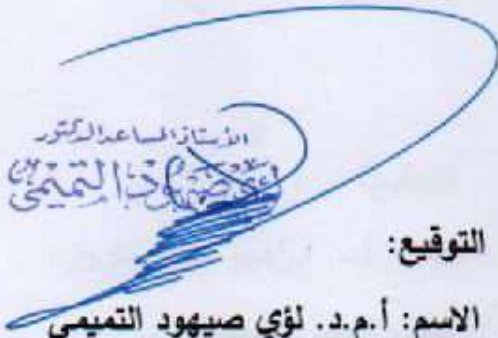
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ: 2021/ 1 / 10

إقرار المقوم اللغوي

أشهد ان هذه الأطروحة الموسومة (استخدام انواع من الاحياء الدقيقة في الازالة الحيوية للتخلص من القينول ضمن محافظة ديالى/ العراق) التي قدمت من قبل الطالب (خالد ضياء عبدالواحد الجاجاني) قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية، وصُحح ماورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية، وبذلك أصبحت الأطروحة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الامر بسلامة الاسلوب وصحة التعبير.

الأستاذ المساعد الدكتور
التوقيع: 

التوقيع:

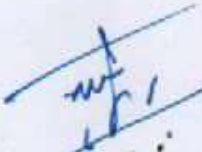
الاسم: أ.م.د. لؤي صيهود التميمي

اللقب العلمي: أستاذ مساعد

التاريخ: 2021/ 2 / 13

إقرار المقوم العلمي

أشهد ان هذه الأطروحة الموسومة (استخدام أنواع من الاحياء الدقيقة في الازالة الحيوية للتخلص من الفينول ضمن محافظة ديالى/ العراق) التي قدمت من قبل الطالب (خالد ضياء عبدالواحد الجاجاني) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية، وبذلك أصبحت الأطروحة مؤهلة للمناقشة.

 التوقيع:

الاسم: أ.د. إبراهيم مهدي عزوز

اللقب العلمي: أستاذ

التاريخ: 2021/ /

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه نشهد بأننا إطلعنا على الأطروحة الموسومة
(استخدام انواع من الاحياء الدقيقة في الازالة الحيوية للتخلص من الفينول ضمن محافظة
ديالى/ العراق) المقدمة من قبل الطالب (خالد ضياء عبدالواحد الجاجاني) وقد ناقشنا الطالب
في محتوياتها ووجدنا أنها جديرة بالقبول بدرجة (إمتياز) لنيل درجة الدكتوراه في علوم الحياة.

رئيس اللجنة:

 التوقيع:

الاسم: أ.د. فكرت مجيد حسن

المرتبة العلمية: أستاذ

الجامعة : جامعة بغداد

التاريخ: 2021 / 6 / 21

عضو لجنة مناقشة:

 التوقيع:

الاسم: أ.د. ابراهيم عمر سعيد

المرتبة العلمية: أستاذ

الجامعة : جامعة تكريت

التاريخ: 2021 / 6 / 21

عضو لجنة مناقشة:

 التوقيع:

الاسم: : أ.د. كاظم هاشم ياسين

المرتبة العلمية: أستاذ

الجامعة : الجامعة المستنصرية

التاريخ: 2021 / 6 / 21

عضو لجنة مناقشة:

 التوقيع:

الاسم: أ.م.د. رباب مجيد عبد

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

الجامعة : جامعة ديالى

التاريخ: 2021 / 6 / 20

عضو لجنة مناقشة:

 التوقيع:

الاسم: أ.م.د. مثنى عبدالقادر صالح

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

الجامعة : جامعة ديالى

التاريخ: 2021 / 6 / 20

مصادقة العمادة

السيد العميد

 التوقيع:

الاسم : أ.م.د. غالب ادريس عطية

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

الجامعة: جامعة ديالى

التاريخ: 2021 / 7 / 5

مشرفاً:

 التوقيع:

الاسم: أ.د. نجم عبدالله جمعة الزبيدي

المرتبة العلمية: أستاذ

الجامعة : جامعة ديالى

التاريخ: 2021 / 6 / 27

الإهداء

إلى ...المبعوث رحمة للعالمين ... و خاتم النبيين والمرسلين ...
سيدنا محمد المصطفى صل الله عليه وآله وصحبه وسلم .
إلى ...الحاضرين الغائبين والدي و... والدتي
إلى من سهرت الليالي وأنارت لي دربي ووفقني الله
بدعائها...زوجتي الحبيبة.

إلى...قرة عيني...وأزهاري..أولادي الأحباء

إلى .. من آزرني في طموحي وأبهجهم فرحتي
وسروري أخواني وأخواتي الأعزاء .

إلى كل من علمني حرفاً...وكان شمعة تحترق لتضيء دربي
أساتذتي الأفاضل .
إلى كل من خصني بالدعاء وتحمل معي أعباء مسيرتي هذه
أتقدم لهم بثمره جهدي المتواضع

خالد

الشكر و التقدير

اللهم ربنا تقبل منا إنك انت السميع العليم ، وتب علينا ياربنا إنك انت التواب الرحيم وإهدنا ووفقنا إلى الحق والطريق المستقيم.. والحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد الأنبياء والمرسلين وعلى آله وصحبه الطيبين الطاهرين .

فإنني أرى من العرفان وأنا أنهي كتابة أطروحتي، أن أتقدم بجزيل الشكر وفائق الإمتنان إلى أستاذي المشرف الفاضل الأستاذ الدكتور (نجم عبدالله جمعة الزبيدي) لمساندته لي طيلة مدة البحث والدراسة وإبداء النصح والآراء العلمية السديدة والملاحظات القيمة بما كان له الأثر الاكبر في إنجاز هذه الأطروحة.

كما اتوجه بالشكر الجزيل إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وإلى رئاسة قسم علوم الحياة فيها و إلى عمادة كلية العلوم / جامعة ديالى ورئاسة قسم علوم الحياة فيها، لتوفيرهم المساعدة الممكنة لإتمام هذا البحث.

ولايفوتني ان اشكر زملائي طلبة الدراسات العليا وإلى كل من شد أزري ومدّ يد العون والمساعدة لإخراج هذه الأطروحة بهذه الصورة .. متمنيا للجميع الموفقية والنجاح..

والله ولي التوفيق

خالد

الخلاصة

نفذت الدراسة الحالية اختبار أسلوب الإزالة الإحيائية الإنزيمية للمركبات الفينولية والتي تعد إحدى أهم الملوثات في البيئة المائية بإتباع أسلوب التقييد الإنزيم ي على دعامات مختلفة شملت السيليكا الحيوية لجب الدايتوم وبعض الأغشية البوليمرية من نوع البولي اكريل نايتزل PAN و البولي اكريل امايد PAA وقد تم الإستعانة بالإنزيم C12O catechol 1,2-dioxygenases (EC 1.14.13.1) والذي تم استخلاصه وتنقيته من المبيضات *Candida albicans* التي عزلت خلال الدراسة الحالية من التربة الملوثة بالمواد النفطية ومشتقاتها البتروكيميائية .

تم جمع 161 عذلة من الدايتومات النهرية من مواقع النمذجة البالغ عددها 10 مواقع على مقطع نهر دىالى المار في بعقوبة خلال المدة من شباط إلى حزيران من عام 2018 وقد بلغ عدد الاجناس الدايتومية التي تم تشخيصها 18 جنسا، شملت 15 جنسا تعود الى رتبة جانبية التناظر جميعها من الدايتومات القاعية ، منها 4 اجناس قاعية متحركة ، وتم عزل وتشخيص 3 اجناس تعود الى رتبة شعاعية التناظر Centrales جميعها من الدايتومات الهائمة . وكانت أعلى اعداد للدايتومات القاعية المعزولة في موقع النمذجة D7 ، إذ بلغت 17 نوعا ، بينما بينما كانت أقل اعدادها في الموقع D2 ، إذ بلغت 13 نوعا . وكانت أعلى اعداد للدايتومات الهائمة تقع ضمن موقعي النمذجة D6 و D8 بواقع 3 أنواع . كانت أعلى قيم لمؤشر بالمر للتلوث العضوي في المواقع D7 و D8 و D4 و D6 ، إذ بلغت 33 و 29 و 25 و 23 على الترتيب. مما يدل على ان مياه نهر دىالى في تلك المواقع تعاني من تلوث عضوي عالي ومؤكد. بينما بلغت أعلى قيم للمؤشر الدايتومي التغذوي TDI 80.9 ، 77.6 في الموقعين D7 و D4 على الترتيب مما يدل على وجود حالة إثراء إغذائي Hypertrophy في مياه تلك المواقع ناجمة عن التلوث العضوي العالي، إذ انخفضت قيم مؤشر التنوع الدايتومي DQI التي تم تسجيلها في الموقعين D7 و D4 والتي بلغت 19.1 و 22.4 على الترتيب.

تم عزل وتشخيص 5 أنواع من المبيضات *Candida sp.* من التربة الملوثة بالمواد البتروكيميائية الموجودة في أراضي المولدات الكهربائية المحلية و كراجات تصليح و غسل وتشحيم السيارات في بعض الأحياء الصناعية والسكنية في مدينة بعقوبة وهي *C. parapsilosis*

و *C. ciferrii* و *C. tropicalis* و *C. albicans* و *C. famata*. وكانت منطقة الصناعة الاولى أفضل منطقة عزلت منها المبيضات ، إذ بلغت نسبة العزلات الموجبة 45% بواقع 27 عينة موجبة من اصل 60 نموذجا وإن أكثر نسب المبيضات قد عزلت من تربة أرضية كراجات تصلح السيارات ، فقد كانت أعلى النسب تعود للمبيضات *C. albicans* ، إذ بلغت 83% تليها *C. tropicalis* بنسبة 75% ثم المبيضات *C. parapsilosis* بواقع 58 % . وكانت أعلى معدلات المستعمرات CFU في مزارع التركيز الفينولي 25 ملي مولار من تربة أرضية كراجات تصلح السيارات ، إذ بلغت 7.5 ± 6.2 . وقد تبين ان هنالك فروقا معنوية في القدرة التحليلية للفينول بين أنواع المبيضات المعزولة ، إذ أن أقل قيم لمعدلات الفينول المتبقية كانت في مزارع المبيضات *C. parapsilosis* خلال فترة حضانة 6 ايام وفي درجة 30 درجة مئوية ، إذ بلغت 11.3 ± 3.9 ملي مولار، ويتضح ذلك جليا من خلال معدلات كتلتها الحيوية العالية إذ بلغت 1.6 ± 0.6 ملغم. مل⁻¹ في نفس الظروف. كما تبين ان هنالك فروقا معنوية في القدرة التحليلية للكاتيكول بين أنواع المبيضات المعزولة ، إذ أن أقل قيم لمعدلات الكاتيكول المتبقية كانت في مزارع المبيضات *C. albicans* خلال فترة الحضانة 6 ايام في درجة 30 درجة مئوية ، إذ بلغت 14.2 ± 7.7 ملي مولار. وكانت معدلات كتلتها الحيوية عالية ، إذ بلغت 1.8 ± 0.6 ملغم. مل⁻¹.

ان أعلى فعالية نوعية لتنقية الإنزيم (C12O) كانت ضمن المرحلة الثانية من خطوات التنقية المتمثلة بالترسيب بكبريتات الامونيوم AS 2% (وزن/حجم) ، إذ بلغت 14.56 وحدة. ملغم⁻¹ بعد إنجاز التنقية بمقدار 6.6 ضعفا بمعدل استعادة نشاط 78.3 % . وقد كان النشاط التحفيزي الأمثل للإنزيم يقع ضمن الرقم الهيدروجيني 6.5-8.5 ودرجة حرارة 25 درجة مئوية. وقد أعطى أسلوب تقييد الإنزيم (C12O) على دعامات السليكا الحيوية لجب الدايتومات DFS/G، إزاحة مضاعفة بمقدار 20 درجة مئوية عن الحد الحراري الأمثل لنشاط الإنزيم ، ضمن جميع مراحل التنقية ، إذ بلغت نسب تحطيم الكاتيكول من خلاله عند الدرجة الحرارية 45 درجة مئوية 93 % و 87.2 % و 85% في مراحل الترسيب بكبريتات الامونيوم AS والترسيب بكبريتات الستربتومايسين SS والمستخلص الإنزيم ي الخام CEE على الترتيب . بينما كانت الإزاحة بمقدار 10 درجة مئوية فقط في حالة التقييد على الدعامات البوليمرية من نوع البولي اكريل نايتрил/ الزجاج PAN/G و البولي اكريل اميد PAA/G . وبالمقابل فإن الإنزيم (C12O) غير

المقيد لم يظهر إزاحة عن حده الحراري الأمثل وكانت أعلى قيم لنشاطه ضمن الدرجة الحرارية المثلى والبالغة 25 درجة مئوية . بينما أعطى أسلوب تقييد الإنزيم (C12O) على دعامات السليكا الحيوية لجب الدايتومات DFS/G ، إزاحة بمقدار 1.5 درجة للرقم الهيدروجيني الأمثل لنشاط الإنزيم ضمن جميع مراحل التنقية فقد بلغت أعلى معدلات نسب تحطيم الكاتيكول من خلاله عند الرقم الهيدروجيني القاعدي 9 – 10 91.8 % و 86.5 % و 85.0 % في المراحل AS و CEE و SS على الترتيب .بينما لم تظهر اساليب تقييد الإنزيم على PAN/G و PAA/G مثل تلك الإزاحة خلال مرحلة التنقية الإنزيم بكبريتات الستربتومايسين SS ولكنها اقتصرت على المراحل الاولى في التنقية الإنزيم ، اذ استطاعت ان تحرف الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنزيم (C12O) بمقدار 1.5 درجة ايضا ضمن مرحلتي التنقية AS و CEE فقد بلغت معدلات التحطيم الكاتيكول من خلالها عند الرقم الهيدروجيني القاعدي 9 – 10 79.0 % و 71.8 % على الترتيب في حالة التقييد PAN/G و تليها حالة التقييد PAA/G بالنسب المئوية 71.8 % و 62.0 % على الترتيب. وبالمقابل فان الإنزيم (C12O) غير المقيد لم يظهر إزاحة عن الرقم الهيدروجيني الأمثل وكانت أعلى قيم لنشاطه ضمن الرقم الهيدروجيني الأمثل 6.5–8.5 . وربما يعزى السبب في تلك النتائج الى دور المساحة السطحية الكبيرة و الجاهزة للتقييد التساهمي للإنزيم (C12O) في السليكا الحوية لجب الدايتوم مقارنة مع المساحة السطحية لمسامات نوعي الأغشية البوليمرية المستخدمة قيد الدراسة.

قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	ت
I	الخلاصة	1
IV	قائمة المحتويات	2
IX	قائمة الجداول	3
XII	قائمة الاشكال	4
XIV	قائمة اللوحات	5
XV	قائمة المختصرات	6
XVI	قائمة الملاحق	7
1	المقدمة	8
4	استعراض المراجع	9
48	المواد وطرائق العمل	10
87	النتائج والمناقشة	11
158	الاستنتاجات والتوصيات	12
165	المصادر	13
206	الملاحق	14
	Abstract	15
المقدمة		
1	المقدمة	1
استعراض المراجع		
4	استعراض المراجع	2
4	التلوث البيئي بالتسربات النفطية	1-2
5	التسربات النفطية في الأنظمة البيئية للتربة	1-1-2
5	التسربات النفطية في الأنظمة البيئية المائية	2-1-2
7	التسربات النفطية في الأنظمة البيئية الهوائية	3-1-2
8	مخاطر التلوث بالهيدروكربونات النفطية	2-2
9	مصادر الفينول وتأثيراته الصحية	1-2-2

استعراض المراجع		
11	مصادر الكاتيكول وتأثيراته الصحية	2-2-2
12	مسار التحلل الحيوي للمركبات الفينولية	3-2-2
14	أساليب إزالة المركبات الفينولية	4-2-2
19	مصير الهيدروكربونات النفطية في البيئة	3-2
21	العوامل المؤثرة في التحلل الحيوي للهيدروكربونات النفطية	1-3-2
22	التحطيم الحيوي للمركبات الهيدروكربونية النفطية	2-3-2
23	دور الخمائر في تحليل المركبات الفينولية	1-2-3-2
24	دور الطحالب الدقيقة في تحليل المركبات الفينولية	2-2-3-2
26	الطحالب كمؤشرات حيوية للتلوث العضوي في المياه	1-2-2-3-2
27	الطحالب كمؤشرات حيوية للحالة الإغذائية في المياه	2-2-2-3-2
28	تطبيقات الإزالة الإحيائية	4-2
32	عوامل الإزالة الإحيائية للملوثات النفطية	5-2
32	الكائنات الحية الدقيقة التي تستخدم النفط (الوفرة والتنوع)	1-5-2
33	الإنزيمات المحللة للملوثات الهيدروكربونية العطرية	2-5-2
36	تقنيات الإزالة الإحيائية	6-2
36	إختيار الخمائر الواعدة في الإزالة الإحيائية	1-6-2
37	إختيار الإنزيمات الواعدة في الإزالة الإحيائية	2-6-2
39	خصائص الدياتومات في التطبيقات الإحيائية	3-6-2
42	تقييد الجزيئات الحيوية في سيليكات الدياتوم	4-6-2
44	تقنية تقييد الإنزيمات	5-6-2
46	تقنية تقييد الخلايا الميكروبية	6-6-2
47	الكائنات الدقيقة المهندسة وراثياً	7-6-2
المواد وطرق العمل		
48	المواد وطرائق العمل	3
48	مواقع الدراسة	1-3
48	مواقع جمع العينات المتعلقة بعزل الدياتومات	1-1-3
48	مواقع جمع العينات المتعلقة بعزل الخمائر	2-1-3
51	متطلبات الدراسة	2-3

المواد وطرق العمل		
51	المواد المستعملة في الدراسة	1-2-3
51	المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة	1-1-2-3
53	الايوساط الزراعية المستعملة في الدراسة	2-1-2-3
53	الدوائر المستعملة في الدراسة	3-1-2-3
53	الاجهزة المستخدمة في الدراسة	2-2-3
55	النمذجة البيئية وإستزراع العينات	3-3
55	النمذجة البيئية وإستزراع العينات المائية	1-3-3
55	النمذجة البيئية للعينات المائية	1-1-3-3
55	إستزراع العينات المائية	2-1-3-3
57	عزل الدائتومات وتشخيصها	3-1-3-3
58	المعاملة بالمضادات الحيوية والفطرية	4-1-3-3
58	تحضير المزارع الاحادية للدائتومات	5-1-3-3
59	اختبار مزارع الدائتومات المنفردة	6-1-3-3
60	تحضير عينة الدائتومات للفحص والتصوير المجهرى	7-1-3-3
61	تنمية مزارع الدائتومات وتربيتها مختبريا	8-1-3-3
61	استخدام الديتومات لتقييم مياه نهر دىالى	9-1-3-3
64	النمذجة البيئية و إستزراع عينات التربة	2-3-3
64	النمذجة البيئية لعينات التربة	1-2-3-3
64	إستزراع عينات التربة	2-2-3-3
65	عزل خمائر المبيضات	3-2-3-3
67	تشخيص خمائر المبيضات	4-2-3-3
67	استخدام وسط الكروم الصلب	1-4-2-3-3
67	اختبار الانبوب الجرثومي	2-4-2-3-3
68	اختبار التخمر	3-4-2-3-3
68	التصبغ بصبغة كرام والفحص المجهرى المظهري (المورفولوجي)	4-4-2-3-3
69	التشخيص بنظام الفايترك	5-4-2-3-3
69	الاختبار الاولى لقدرة الخمائر التحليلية للمركبات النفطية	6-4-2-3-3

المواد وطرق العمل		
70	المزارع الاحادية للخمائر	5-2-3-3
70	تحضير المزارع الاحادية للخمائر	1-5-2-3-3
70	حفظ المزارع الاحادية للخمائر	2-5-2-3-3
70	قدرة بقاء الخمائر وتحطيمها لبعض المركبات الفينولية	4 - 3
70	اختبار قدرة الخمائر في تحطيم المركبات الفينولية	1-4 - 3
71	تقدير متبقي الفينول في مزارع الخميرة الفرعية	1-1-4 - 3
73	تقدير متبقي الكاتيكول في مزارع الخميرة الفرعية	2-1-4 - 3
75	المتطلب البيوكيميائي للاوكسجين أثناء تحلل للمركبات الفينولية	2-4 - 3
75	قياس الاوكسجين الذائب بطريقة ونكلر	1-2 - 4 - 3
76	قياس الاوكسجين الذائب بوساطة جهاز DO-meter	2-2 - 4 - 3
77	تقدير الكتلة الحيوية للخمائر على أساس الوزن الجاف	3-4 - 3
77	الاستخلاص الانزيمي من الخمائر المنتقة ذات القدرة التحليلية	5-3
77	الاختبار الابتدائي النوعي للكشف عن نشاط انزيمات Dioxygenase	1-5 - 3
78	استخلاص وتنقية الانزيم catechol 1,2-dioxygenase	2-5 - 3
80	تحديد التركيز الكلي للبروتين الانزيمي	3-5 - 3
80	خطوة اذابة وتنظيف الانزيم	4-5 - 3
80	تقييد الانزيم (C12O) catechol 1,2-dioxygenase	6 - 3
80	تحضير اغشية مواد التقييد	1-6-3
81	تحضير السليكا الحيوية لجب الدايتومات	1-1 - 6 - 3
81	تقييد سيليكاجب الدايتومات والبولي اكريل امايد والبولي اكريل نايتريل	2-1 - 6 - 3
82	تثبيت اغشية مواد التقييد على دعامة الزجاج	2-6-3
82	التحوير الاميني والتشيط الكيميائي لأغشية مواد التقييد	3-6-3
83	تقييد الانزيم على اغشية التقييد المحورة والمنشطة كيميائياً	4-6-3
85	اختبارات فعالية التقييد الانزيمي	7-3
86	التحليل الاحصائي	8-3

النتائج والمناقشة		
87	النتائج والمناقشة	4
87	الدايتومات	1-4
87	الفحوصات الفيزيائية والكيميائية لعينات المياه	1-1-4
89	عزل وتشخيص الدايتومات	2-1-4
91	الدايتومات كمؤشرات حيوية	3-1-4
91	الدايتومات كمؤشرات حيوية للتلوث العضوي	1-3-1-4
95	الدايتومات كمؤشرات حيوية للحالة التغذوية	2-3-1-4
102	تنقية مستعمرات أو اتحادات الدايتومات	4-1-4
105	خمائر المبيضات	2-4
105	عزل خمائر المبيضات من نماذج التربة الملوثة	1-2-4
108	تشخيص خمائر المبيضات المعزولة من نماذج التربة الملوثة	2-2-4
108	خصائص النمو المظهرية لخمائر المبيضات المعزولة	1-2-2-4
111	خصائص المستعمرات المظهرية لخمائر المبيضات المعزولة	2-2-2-4
113	فحوصات التخمر الكيموحيوية لخمائر المبيضات المعزولة	3-2-2-4
114	التشخيص بنظام الفايترك لخمائر المبيضات المعزولة	4-2-2-4
116	عد مستعمرات خمائر المبيضات المعزولة	3-2-4
116	عد مستعمرات خمائر المبيضات ضمن المزارع الفينولية	1-3-2-4
120	عد مستعمرات خمائر المبيضات ضمن المزارع الكاتيكولية	2-3-2-4
124	اختبارات قدرة الخمائر على تحطيم المركبات الفينولية	4-2-4
124	تقدير متبقي الفينول في مزارع الخمائر الفرعية	1-4-2-4
128	تقدير متبقي الكاتيكول في مزارع الخمائر الفرعية	2-4-2-4
132	المتطلب البيوكيميائي للأوكسجين في المزارع الفينولية للخمائر	5-2-4
139	الكتلة الحيوية للخمائر في المزارع الفرعية للمركبات الفينولية	6-2-4
139	الكتلة الحيوية للخمائر في المزارع الفينول الفرعية	1-6-2-4
142	الكتلة الحيوية للخمائر في مزارع الكاتيكول الفرعية	2-6-2-4
145	التقييد الإنزيمي	3-4
145	إستخلاص وتنقية الإنزيم catechol 1,2-dioxygenase (C12O)	1-3-4

النتائج والمناقشة		
147	اختبار فعالية الإنزيم (C12O) في التحطيم الحيوي للكاتيكول	2-3-4
147	اختبارات الحد الحراري الأمثل للإنزيم (C12O)	1-2-3-4
153	اختبارات الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنزيم (C12O)	2-2-3-4
الاستنتاجات والتوصيات		
158	الاستنتاجات والتوصيات	5
158	الاستنتاجات	1-5
164	التوصيات	2-5
المصادر العربية والاجنبية		
165	المصادر باللغة العربية	
167	المصادر باللغة الانكليزية	
الملاحق		
206	الملاحق	
Abstract		
	Abstract	

قائمة الجداول

رقم الجدول	الموضوع	الصفحة
1-2	الآثار الخطرة للهيدروكربونات النفطية على البيئة	10
2-2	الثوابت الحركية Kinetic constants للتحلل الحيوي للفينول أو الكاتيكول وفقاً لنموذج هالدين Haldane's model	17
3-2	مقارنة التحلل الحيوي للفينول بتركيز أولية تتجاوز 1000 ملغم . لتر ⁻¹ في تجارب المزارع الفرعية.	18
1-3	المواد الكيميائية المستعملة في هذه الدراسة	51
2-3	الايوساط الزراعية المستعملة في هذه الدراسة	53
3-3	الدوائر المستعملة في هذه الدراسة	53
4-3	الاجهزة المستخدمة في هذه الدراسة	53
5-3	القيم العددية لتصنيف التلوث العضوي التي حددها Palmer (1969)	62

رقم الجدول	الموضوع	الصفحة
6-3	مديات قيم DTI ومايقابلها من الحالة التغذوية وتصنيف فئة جودة المياه	63
1-4	متوسط قيم المعلمات الفيزيائية والكيميائية لعينات المياه المأخوذة من مقطع نهر ديالى المار في قضاء بعقوبة خلال فترة الدراسة	87
A -2 -4	توزيع انواع الدياتومات المعزولة من مواقع النمذجة عبر مقطع نهر ديالى في مدينة بعقوبة	90
B -2 -4	توزيع اجناس الدياتومات المعزولة من مواقع النمذجة عبر مقطع نهر ديالى في مدينة بعقوبة	91
3 -4	نقاط الدياتومات المعزولة كمؤشر حيوي للتلوث العضوي في مواقع أخذ عينات المياه عبر مقطع نهر ديالى في مدينة بعقوبة	92
A -4 -4	الوفرة النسبية للدياتومات المعزولة كمؤشر حيوي للحالة التغذوية في مواقع	97
B -4 -4	أخذ عينات المياه عبر مقطع نهر ديالى في مدينة بعقوبة	98
5 -4	اعداد المستعمرات المنفردة (CFU لكل 100 مايكروليتر) للدياتومات المعزولة والمشخصة من نماذج مياه مواقع أخذ العينات على مقطع نهر ديالى المار في قضاء بعقوبة	103
6 -4	نقاط وجود المبيضات المعزولة في محطات أخذ عينات التربة الملوثة بالملوثات النفطية والبتروجينية في بعض احياء مدينة بعقوبة	106
7 -4	الاعداد والنسب المئوية لخمائر المبيضات المعزولة من عينات التربة المأخوذة من المناطق الصناعة في بعض الاحياء السكنية التابعة لقضاء بعقوبة	107
8 -4	خصائص النمو المظهرية للمبيضات المعزولة من نماذج التربة على الاوساط الزرعية السائلة	109
9 -4	خصائص المستعمرات المظهرية للمبيضات المعزولة قيد الدراسة على اطباق الأوساط الزرعية الصلبة	111
10 -4	نتائج فحوصات تخمر السكريات لخمائر المبيضات المعزولة قيد الدراسة	113
11 -4	النسب المئوية للاحتمالية في تشخيص المبيضات المعزولة من عينات التربة المأخوذة من بعض الاحياء السكنية والصناعية في مدينة بعقوبة	114
12 -4	اعداد المستعمرات CFU لكل 100 مايكروليتر للمبيضات المعزولة من نماذج التربة على الاوساط الزرعية الصلبة المكملة بالفينول	116

رقم الجدول	الموضوع	الصفحة
13 -4	اعداد المستعمرات CFU لكل 100 مايكروليتر للمبيضات المعزولة من نماذج التربة على الاوساط الزرعية الصلبة المكملة بالكاتيكول	121
14 -4	تركيز الفينول المتبقي (ملي مولار) في المزارع الفرعية للخمائر قيد الدراسة في 30 درجة مئوية ولمدة حضانة مختلفة وتركيز إبتدائي للفينول 20 ملي مولار	125
15 -4	تركيز الكاتيكول المتبقي (ملي مولار) في المزارع الفرعية للخمائر قيد الدراسة في 30 درجة مئوية ولمدة حضانة مختلفة وتركيز إبتدائي للكاتيكول 40 ملي مولار	129
16 -4	معدل المتطلب البيوكيميائي للاوكسجين المذاب (ملغم . لتر ⁻¹) المستهلك من قبل الخمائر قيد الدراسة في المزارع الفينولية والكاتيكولية	133
17 -4	معدل الكتلة الحيوية (ملغم . مل ⁻¹) للخمائر قيد الدراسة النامية في المزارع الفينولية والكاتيكولية في ظروف حضانة BOD	136
18 -4	معدل الكتلة الحيوية (ملغم . مل ⁻¹) للمبيضات النامية في مزارع الفينول الفرعية في 30 درجة مئوية ولمدة حضانة مختلفة وتركيز إبتدائي للفينول 20 ملي مولار	139
19 -4	معدل الكتلة الحيوية (ملغم . مل ⁻¹) للمبيضات النامية في مزارع الكاتيكول الفرعية في 30 درجة مئوية ولمدة حضانة مختلفة وتركيز إبتدائي للكاتيكول 40 ملي مولار	142
20 -4	بيانات تنقية الإنزيم catechol 1,2-dioxygenase من خمائر المبيضات <i>C. albicans</i>	146
21 -4	معدلات النسب المئوية للتخطيم الحيوي للكاتيكول (%) ذو التركيز الابتدائي 40 ملي مولار بفعل إنزيم C120 الحر والمقيد في وسط متعادل (pH: 6.5-8.5) ودرجات حرارية مختلفة ولمدة 3 ايام	148

رقم الجدول	الموضوع	الصفحة
22 - 4	معدلات النسب المئوية للتخطيط الحيوي للكاتيكول (%) ذو التركيز الابتدائي 40 ملي مولار بفعل إنزيم C12O الحر والمقيد في درجة حرارة ثابتة 25 درجة مئوية و دالة حامضية pH مختلفة ولفترة 3 ايام .	154

قائمة الاشكال

رقم الشكل	الموضوع	الصفحة
1-2	التفاعلات المتضمنة أيض النواة العطرية	13
2-2	التفاعلات المحتملة بين مادة التربة والهيدروكربونات الملوثة	20
3-2	مخططات المسارات ortho- cleavage و meta-cleavage لاستقلاب الفينول ومشتقاته بفعل الكائنات الحية الدقيقة المحللة .	34
4-2	الخطوات العامة التي اقترحها Sutherland وآخرون (2004) للتنقيب الإحيائي bioprospection للتوصل الى الإزالة الإحيائية الأنزيمية	38
5-2	التصوير بالمجهر الإلكتروني الماسح SEM للدايتوم <i>T. pseudonana</i> (a) بنية الخلية بأكملها ، و (b) نقطة مقربة لسطح الصمام.	39
6-2	الخلية الدايتومية <i>T. pseudonana</i>	42
7-2	كيميائية التحوير لسطح السليكا الحيوية	43
1-3	مواقع أخذ عينات المياه على مقطع نهر دىالى المار في قضاء بعقوبة	49
2-3	مواقع أخذ عينات التربة من مناطق بعض الأحياء السكنية والصناعية في قضاء بعقوبة	50
3-3	كيميائية التقييد الانزيمي على اغشية التقييد	84
1-4	توزيع قيم المؤشرات الحيوية للدايتومات المعزولة من مواقع أخذ العينات الواقعة على مقطع نهر دىالى المار في بعقوبة	93

رقم الشكل	الموضوع	الصفحة
2-4	معدلات النسب المئوية للعينات الموجبة لعزلات المبيضات من مصادر التربة قيد الدراسة	108
3-4	النسب المئوية لاحتمالية التشخيص بنظام الفايتهك Vitek لخمائر المبيضات المعزولة قيد الدراسة	115
4-4	اعداد المستعمرات CFU لكل 100 مايكروليتر للمبيضات المعزولة من نماذج التربة على الاوساط الزرعوية الصلبة المكملة بالفينول	117
5-4	اعداد المستعمرات CFU لكل 100 مايكروليتر للمبيضات المعزولة من نماذج التربة على الاوساط الزرعوية الصلبة المكملة بالكاتيكول	122
6-4	تركيز الفينول المتبقي (ملي مولار) في المزارع الفرعية للخمائر قيد الدراسة في 30 درجة مئوية ولمدة حضانة مختلفة وتركيز ابتدائي للفينول 20 ملي مولار .	126
7-4	النسبة المئوية للتحطيم الحيوي للفينول والكاتيكول(%) في المزارع الفرعية للمبيضات المعزولة قيد الدراسة بعد 4 ايام حضانة	127
8-4	تركيز الكاتيكول المتبقي (ملي مولار) في المزارع الفرعية للخمائر قيد الدراسة في 30 درجة مئوية ولمدة حضانة مختلفة وتركيز ابتدائي للكاتيكول 40 ملي مولار .	130
9-4	النسبة المئوية للتحطيم الحيوي للفينول والكاتيكول(%) في المزارع الفرعية للمبيضات المعزولة قيد الدراسة بعد 5 ايام حضانة	131
10-4	معدل المتطلب البيوكيميائي للاوكسجين الذائب (ملغم / لتر) في مزارع الخمائر الفينولية والكاتيكولية	134
11-4	معدل الكتلة الحيوية (ملغم / مل) للخمائر النامية في المزارع الفينولية والكاتيكولية في ظروف حضانة BOD	137
12-4	معدل الكتلة الحيوية (ملغم / مل) للمبيضات النامية في مزارع الفينول الفرعية في 30 درجة مئوية ولمدة حضانة مختلفة وتركيز ابتدائي للفينول 20 ملي مولار	140
13-4	معدل الكتلة الحيوية (ملغم / مل) للمبيضات النامية في مزارع الكاتيكول الفرعية في 30 درجة مئوية ولمدة حضانة مختلفة وتركيز ابتدائي للكاتيكول 40 ملي مولار .	143

الصفحة	الموضوع	رقم الشكل
150	معدل النسب المئوية للتخطيط الحيوي للكاتيكول (%) ذو التركيز الابتدائي 40 ملي مولار بفعل إنزيم catechol 1,2-dioxygenase الحر والمقيد في وسط متعادل: (pH: 6.5-8.5) ودرجات حرارية مختلفة ولفترة 3 ايام	14 - 4
156	معدلات النسب المئوية للتخطيط الحيوي للكاتيكول ذو التركيز الابتدائي 40 ملي مولار بفعل إنزيم catechol 1,2-dioxygenase الحر والمقيد في درجة حرارة 25 درجة مئوية و دالة حامضية pH مختلفة ولفترة 3 ايام	15 - 4

قائمة اللوحات

الصفحة	الموضوع	رقم اللوحة
104	مجموعة الصور لمستعمرات او تجمعات الدايتومات المعزولة والمشخصة من تخافيف العينات المائية المأخوذة من مواقع النمذجة المحددة على مقطع نهر دىالى المار في قضاء بعقوبة	1-4
110	مجموعة الصور للخصائص المجهرية والمظهرية لخمائر المبيضات المعزولة والمشخصة من تخافيف عينات التربة الملوثة المأخوذة من بعض الاحياء الصناعية والسكنية في قضاء بعقوبة	2-4
112	مجموعة صور مستعمرات خمائر المبيضات المعزولة والمشخصة من تخافيف عينات التربة الملوثة المأخوذة من بعض الاحياء الصناعية والسكنية في قضاء بعقوبة	3-4

قائمة المختصرات

ANSP	Academy of Natural Sciences, Philadelphia
ASTDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
CBS	Centraalbureau voor Schimmelfcultures, Boarn
CFU	Colony Forming Units
DMF	N,N-dimethylformamid
DQI	Diatom Quality Index
DTI	Diatoms Trophic Index
EPA	Environmental Protection Agency
GEMs	Genetically Engineered Microorganisms
IRMS	Iraqi Rivers Maintaining System
NEPC	National Environment Protection Council
PAHs	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PHC	Petroleum hydrocarbon contamination
PPI	Palmer Pollution Index
SEM	Scanning Electron Microscope
UNEP	United Nations Environment Programme
WHO	World Health Organization

قائمة الملاحق

الصفحة	الموضوع	رقم الملحق
206	موقع قضاء بعقوبة بالنسبة لمحافظة ديالى والعراق	1-3
207	ترميز نماذج عينات المياه العذبة من مواقع النمذجة الواقعة على نهر ديالى	2-3
207	ترميز نماذج عينات التربة من بعض مناطق الاحياء السكنية والصناعية في قضاء بعقوبة	3-3
208	تركيب الوسط الزراعي (f/2) المحور	4-3
208	مكونات الوسط الزراعي WC medium لتنمية دايتومات المياه العذبة المعزولة من المياه ذات الاس الهيدروجيني المتعادل الى القاعدي	5-3
209	مكونات الوسط الزراعي PM medium لدايتومات المياه العذبة المعزولة من المياه ذات الاس الهيدروجيني الحامضي	6-3
210	مؤشر التلوث العضوي لاجناس الطحالب	7-3
210	مؤشر التلوث العضوي لانواع الطحالب	8-3
211	مكونات الوسط الملحي المعدني MSM mineral salt medium	9-3
211	اسلوب الاضافة المحور على تقدير متبقي الفينول بالطريقة اللونية باستخدام الكاشف aminoantipyrine-4	10-3
212	اسلوب الاضافة المحور لتقدير متبقي الكاتيكول بالطريقة اللونية Fujita واخرون (1985)	11-3
213	اسلوب الاضافة لتقدير الاوكسجين المذاب بطريقة ونكلر في مزارع الخمائر المعاملة بالفينول او الكاتيكول	12-3
214	اسلوب اختبار فعالية التقييد الانزيمي المحور بالطريقة اللونية Fujita واخرون (1985)	13-3
216	المنحنى القياسي للفينول	1-4
216	المنحنى القياسي للكاتيكول	2-4
216	المنحنى القياسي للكتلة الحية للخمائر	3-4

Introduction

1- المقدمة

حظيت معالجة وتجديد البيئة الملوثة بالمواد الخطرة بإهتمام متزايد على مدى العقود القليلة الماضية مع زيادة الوعي العالمي حول الآثار الضارة المحتملة للملوثات على الصحة العامة والبيئة (Ghosal وآخرون، 2016). إن الأنشطة البشرية والصناعية وخاصة فيما يتعلق بالتسرب النفطي ضمن الممرات المائية والإحتراق غير الكامل للوقود الأحفوري لها دور كبير في تراكم الملوثات الهيدروكربونية في البيئة وأن تراكم النفط ومشتقاته يشكل مخاطر ومشاكل بيئية هامة، إذ أن العديد من الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات (PAHs) تظهر سمية عالية وخصائص سرطانية في الإنسان والحيوان على حد سواء (Costantini وآخرون ، 2009). ولذلك إزدادت الدراسات حول التلوث البيئي بمركبات الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات خلال العقود الأخيرة (Barret وآخرون ، 2010 ؛ Herold وآخرون ، 2011).

وتعد المعالجة الحيوية Bioremediation واحدة من التقنيات الصديقة للبيئة الأكثر أماناً ونظافة و فعالية من حيث التكلفة لتطهير المواقع الملوثة بمجموعة واسعة من الملوثات (Silva وآخرون، 2012). تعرف "المعالجة الحيوية" على أنها العملية التي تتم عن طريق عوامل بيولوجية مختلفة مثل البكتيريا والخمائر والفطريات والطحالب والنباتات الراقية كأدوات رئيسية في معالجة البقع النفطية Oil spills والمعادن الثقيلة الموجودة في البيئة (Bhatnagar و Kumari ، 2013). إن المعالجة الحيوية للمواقع الملوثة بالهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات باستخدام تقنية التحلل البيولوجي biodegradation technique هي بديل فعال للحد من هذه المشاكل البيئية (Silva وآخرون ، 2012). وإن من المزايا الرئيسة للمعالجة الحيوية مقارنة بالمعالجة التقليدية: التكلفة المنخفضة ، الكفاءة العالية ، تقليل الحمأة الكيميائية والبيولوجية ، الانتقائية لمعادن محددة (Krastanov وآخرون ، 2013).

إن العديد من الكائنات الحية الدقيقة مثل ، البكتيريا ، البكتيريا الخضراء المزرقة ، الطحالب الخضراء ، والفطريات. لها القدرة على تحليل مختلف المكونات النفطية تحت ظروف بيئية مختلفة والسبب في قدرتها على ذلك هو من خلال ما توفره من الانزيمات التي تلعب دورا في تحليل المكونات النفطية فالتحلل النفطي يتم تدريجيا عن طريق الايض المتسلسل لمركباته (Costantini وآخرون ، 2009 ؛ Krastanov وآخرون ، 2013).

وتقدم تقنية المحفزات الحيوية Biocatalysts طرق جديدة في تحسين استراتيجيات المعالجة الحيوية للملوثات ، حيث ان التطبيق الحديث للتقنيات او الادوات الجزيئية Molecular tools في التحفيز الحيوي قد تؤدي الى تحسين البحث في مجال التنقيب البيولوجي Bioprospecting research ، وزيادة كفاءة الاستخلاص الانزيمي على المستوى الانتاجي من الناحية الكمية والنوعية (التخصص الانزيمي) وهذا بالتاكيد يكون له تكلفة عالية (Silva وآخرون ، 2012).

لقد اجريت العديد من الدراسات المكثفة خلال العقود الاخيرة على انزيمات Dioxygenases المحللة للحلقة العطرية (بنوعيتها ذات التأثير الخارجي وذات التأثير الداخلي) لما لها من دور مهم في مجال المعالجة الحيوية (Hupert-Kocurek وآخرون ، 2012). إن التحلل البيولوجي الهوائي للمركبات الفينولية يتم عبر مسارات معينة ويلعب الكاتيكول أو مشتقاته دوراً رئيسياً فيها، إذ يتم استقلاب هذه المواد الوسيطة بعد ذلك بواسطة مسار الإنشقاق الداخلي intradiol أو الإنشقاق الخارجي extradiol لحلقة النواة العطرية بواسطة إنزيمات dioxygenases (Caposio وآخرون ، 2002). إن الخطوة الأولى للتحلل البيولوجي للفينول تتضمن تحويله إلى كاتيكول عبر انزيمات معينة منها انزيم phenol hydroxylases ، والذي يتضمن عمله ربط مجموعة هيدروكسيل في الموقع ortho-position للحلقة العطرية (Krastanov وآخرون ، 2013 ؛ Filipowicz وآخرون ، 2020). إن تقييد الإنزيمات على حوامل او دعائم مختلفة يعد تحدياً مهماً في مجال التكنولوجيا الحيوية وحتى الآن تم فحص ومناقشة مجموعة كبيرة ومتنوعة من الأنظمة المصممة في هذا المجال وإن الهدف الرئيسي من تقييد الانزيمات هو الحصول على إنزيمات مستقرة وقابلة لإعادة الاستخدام مع مقاومة العوامل البيئية المختلفة (Lei و Yang ، 2007 ؛ Mateo وآخرون ، 2007 ؛ Guzik وآخرون ، 2014). إذ يعمل التقييد على تحسين التحكم في التفاعل من خلال إمكانية استخدام اشكال مختلفة للتفاعل، وعلاوة على ذلك فإن الإنزيمات المقيدة تبدي درجة عالية من الانتقائية والخصوصية (Garcia-Galan وآخرون ، 2011 ؛ Guzik وآخرون ، 2014). ولقد ثبت أن تقييد انزيمات dioxygenases ، الذي تتصف باستقرارية عمل منخفضة ، يسمح بزيادة في قيمتها من ناحية التكنولوجيا الحيوية (Wojcieszynska وآخرون ، 2012 ؛ Wojcieszynska وآخرون ، 2013 ؛ Guzik وآخرون ، 2014). بالمقابل ، فإن انزيمات polyphenol oxidases و peroxidases هي إنزيمات تتطلب في أغلب الأحيان حوامل الكترونية لإتمام نشاطها بفاعلية ، لذلك، فإن تقييد

هذه الإنزيمات على الحوامل غير القابلة للذوبان يسهل بناء أنظمة مستقرة لسلسلة انتقال الإلكترونات (Singh وآخرون ، 2011).

تعد الدايتومات من الطحالب احادية الخلية الواسعة الانتشار القادرة على القيام بعملية البناء الضوئي والتي بإمكانها ترسيب جدار خلوي سلكوني بترتيب عالي الدقة وفريد من نوعه يدعى الغطاء أو الجب Frustule التي تتصف بهيكلها المسامي الذي يتضمن وجود مسامات مايكروية - نانوية Micro- to Nano porous structure والتي لها دور مهم في زيادة المساحة السطحية للجدار مع امكانية تحويلها بسهولة (Neville وآخرون ، 2011؛ Medarevic وآخرون ، 2016). إن استخدام السيليكا الحيوية للدايتوم كدعامة لتقييد الإنزيمات جاء بسبب مزاياها المختلفة مثل الأصل الطبيعي والتكلفة المنخفضة ووجود مجموعات الهيدروكسيل فضلا عن كونها غير سامة، هذه الامور مهمة للغاية لأن استخدام البوليمرات ذات الأصل البترولي كدعامات تقييد امر لايجبذ لكونها سامة في الغالب ، مما يجعلها سبباً رئيسياً للتلوث (Luckarift وآخرون ، 2004).

لذا تهدف هذه الدراسة الى :

- 1- عزل وتشخيص بعض أنواع الدايتومات القاعية والهائمة من مصادر نهريّة واستخدامها كمؤشرات بيولوجية للتلوث والحالة التغذوية.
- 2- عزل وتشخيص خمائر المبيضات القادرة على تحمل التلوث الهيدروكربوني في التربة الملوثة بالملوثات النفطية والبتروكيميائية واختبار تحملها وقدرتها التحليلية لبعض المركبات الفينولية (الفينول والكاتيكول).
- 3- اختيار أفضل الإنزيمات المعزولة والمنقاة من سلالات خمائر المبيضات من حيث القدرة التحليلية للفينول أو الكاتيكول في المياه.
- 4- تقييم فعالية التقييد الانزيمي على السيليكا الحيوية للدايتومات وبعض الاغشية البوليمرية في المعالجة الحيوية الإنزيمية للملوثات لبعض الملوثات الفينولية في المياه.

Literature review

2- استعراض المراجع

1-2 التلوث البيئي بالتسربات النفطية

يؤدي الإستخدام المكثف للمنتجات البترولية إلى تلوث جميع أجزاء البيئة تقريبًا بواسطة الهيدروكربونات hydrocarbon (HC) وبشكل خاص في مناطق الإنتاج البترولي ، إذ تخضع البيئة للتلوث بالزيوت الخام المنتجة في مواقع الإنتاج النفطي ، ويعد التلوث بالهيدروكربونات البترولية Petroleum hydrocarbon contamination (PHC) قضية ذات أهمية كبرى في جميع أنحاء العالم. إذ تمثل هذه المركبات أكثر الملوثات البيئية شيوعًا والتخلص منها أمر إلزامي (Rizzo وآخرون، 2020)، فالتلوث الهيدروكربوني ظاهرة منتشرة تؤثر على صحة الإنسان والبيئة بما في ذلك الهواء والماء والتربة (Espinoza-Tofalos وآخرون، 2020).

إن الهيدروكربونات ذات الأصل النفطي، على الرغم من كونها مصادر طاقة أساسية وإحدى المواد الخام اللازمة لأنواع مختلفة من الصناعات (Varjani و Upasani، 2016) ، يتم تصنيفها على أنها ملوثات ذات أولوية (Costa وآخرون، 2012)، فالعديد منها مثل الهيدروكربونات الأروماتية عديدة الحلقات Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) صعبة التحلل recalcitrant وخطيرة للغاية لأنها يمكن أن تكون سامة للدم ومسببة للسرطان ومشوهة للأجنة teratogenic (Souza وآخرون، 2014؛ Meckenstock وآخرون، 2016) . وبناءً عليه وعلى مدى عقود من الزمن إزداد الوعي بحماية البيئة منها وخاصة الآن بعد أن تم الاعتراف بالتلوث كأحد أكثر القضايا خطورةً ويجب على المجتمع مواجهتها (Rizzo وآخرون، 2020).

تختلف مصادر التلوث البيئي الناجم عن المواد الهيدروكربونية مثل حوادث نقل الوقود بواسطة السفن والناقلات ، والتسربات من الخزانات الأرضية ومحطات الخدمة و عمليات استخراج النفط ومعالجته ، وإطلاق النفايات الزيتية الناتجة عن الصناعات التي تستخدم النفط في إنتاج المواد البلاستيكية والمذيبات والأدوية ومستحضرات التجميل (Alberti وآخرون، 2011؛ Chaudhary و Kim، 2019). إن إزالة هذه الملوثات من البيئة أمر إلزامي ويمكن الوصول إليه من خلال اساليب الإزالة الفيزيائية و الكيميائية أو بيولوجية (Varjani، 2017؛ Espinoza-Tofalos وآخرون، 2020) ، ولقد أظهرت الأساليب الإحيائية العديد من المزايا مقارنة بالمعالجات

الفيزيائية و الكيميائية التقليدية كونها أكثر فعالية من حيث قلة التكلفة وتسمح بتمعدن الملوث العضوي بالكامل (Varjani، 2017، Dagchio وآخرون، 2017). ولهذا السبب تمت دراسة الإزالة الإحيائية على نطاق واسع فهي تقنية صديقة للبيئة وتُستخدم لإزالة الهيدروكربونات في الأنظمة البيئية الأرضية والمائية والهوائية (Abbasian وآخرون، 2015، Rizzo وآخرون، 2020).

2-1-1 التسربات النفطية في الأنظمة البيئية للتربة

ترتبط المركبات البترولية بمكونات التربة ومن الصعب إزالتها أو تحطيمها (Barathi و Vasudevan، 2001)، ويؤدي التلوث النفطي في التربة إلى عدم توازن نسبة الكربون إلى النيتروجين (C:N) في موقع الانسكاب لأن النفط الخام هو في الأساس خليط من الكربون والهيدروجين مما يؤدي هذا إلى نقص النيتروجين في التربة الملوثة بالزيت وبالتالي يؤخر نمو البكتيريا و استخدام مصادر الكربون علاوة على ذلك فإن التراكيز الكبيرة من المواد العضوية القابلة للتحلل في الطبقة العليا من التربة تستنزف إحتياطيات الأوكسجين في التربة وتبطل معدلات إنتشار الأوكسجين في الطبقات العميقة (Olajire و Essien، 2014).

2-1-2 التسربات النفطية في الأنظمة البيئية المائية

يمثل نقل البترول عبر العالم إحتماالية متكررة لأنسكاب النفط في البيئة البحرية وفي الواقع إن التلوث بالهيدروكربونات البترولية قد أثر و ألحق الضرر بمحيطات العالم والبحار والمناطق الساحلية ويمثل تهديداً دائماً لإستدامة صحة كوكب الأرض (Yard، 2011؛ Paniagua- Michel و Rosales، 2020). عند حدوث الأنسكاب النفطي يتم في البداية إجراء مجموعة خطوات الإزالة تتضمن عمليات الاسترداد recovery و التخلص disposal و الإحتواء containment للملوثات النفطية وبعد ذلك يتم إتباع الطرائق التقليدية لإزالة النفط من النظم البيئية المائية مثل التنظيف الميكانيكي والتنظيف الكيميائي والتحليل الميكروبي ويكاد يكون التنظيف الميكانيكي للزيت المنسكب والمشتت مستحيلاً في النظم البيئية المائية "المحمية" و إن التحليل الميكروبي هو الآلية الرئيسية للقضاء على النفط المنسكب والمشتتات التابعة له ضمن البيئة المائية (Ventikos وآخرون، 2004).

في النظم البيئية المائية يبدو أن تشتت dispersion واستحلاب emulsification النفط في بقع الأنسكابات النفطية يعد من المتطلبات الأساسية لتحلل الحيوي السريع إذ تميل الكتل الكبيرة من الزيت النفطي mousse أو كرات القطران tar balls أو التراكيز العالية من الزيت في البيئات الهادئة إلى الاستمرار أو البقاء ثابتة بسبب المساحات السطحية المحدودة المتاحة لنشاط الاحياء المائية الدقيقة ، أما بالنسبة الى الأجزاء البترولية التي تحتوي على مكونات الإسفلت فهي لا تتحلل بكميات كبيرة (Uzoigwe و Okpokwasili، 2012) ، لذلك غالبا ما يتم العثور على كريات القطران العائمة في البيئة البحرية بكميات متزايدة لأنها عمليا مواد مؤكسجة ذات وزن جزيئي عالي وهي تقاوم التحلل الميكروبي (Ventikos وآخرون ، 2004 ؛ Tanase وآخرون ، 2013).

من بين العديد من الدراسات التي أجريت على التحلل الحيوي الميكروبي للملوثات المتعلقة بالزيوت تم تخصيص أكثر من 80 % منها للتحلل الحيوي البكتيري ، إذ تعد البكتيريا أكثر الكائنات الحية الدقيقة التي تمت دراستها وقد تمت دراسة مشاركتها أثناء تمعدن الهيدروكربونات في الماء (Tanase وآخرون ، 2013). ووجد ان الخميرة *Yarrowia lipolytica* التي تستخدم الألكانات كركائز كارهة للماء وتحللها بكفاءة عالية مثل الدهون الثلاثية (الدهون والزيوت) والألكانات والأحماض الدهنية ولوحظ أنها تمثل الخميرة السائدة أثناء تحلل الألكانات وإنتاج المستحلب emulsifier النفطي (Hassanshahian وآخرون، 2012). وقد أظهرت بعض الدراسات أن خلايا العوالق النباتية تتراكم عليها جزيئات الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات (PAHs) من مياه البحر المحيطة والتي من شأنها أن تخلق منطقة غنية بالهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات حول الغلاف الطبيعي للعوالق النباتية وبالتالي تجذب البكتيريا المحللة للهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات لإستعمار تلك المنطقة (Binark وآخرون ، 2000؛ Paniagua-Michel و Rosales، 2020).

قد يؤثر التلوث بالنفط على البيئة بوحدة أو أكثر من الآليات التالية بحسب (Yard، 2011):

- 1) الاختناق الذي يؤثر على الوظائف الفسيولوجية للكائن الحي.
- 2) تسبب السمية الكيميائية تأثيرات مميتة أو شبه مميتة أو تسبب خللاً في الوظائف الخلوية.

(3) التغيرات البيئية ، وبشكل رئيس فقدان الكائنات الحية الرئيسية من المجتمع واستيلاء الأنواع الانتهازية على الموائل .

(4) الآثار غير المباشرة ، مثل فقدان الموطن أو المأوى وما يترتب على ذلك من القضاء على الأنواع المهمة بيئياً.

2-1-3 التسربات النفطية في الأنظمة البيئية الهوائية

تعتبر المركبات العطرية أحادية الحلقة في الغلاف الجوي ذات أهمية كبيرة نظراً لتأثيرها على تكوين الأوزون وقدرتها على تكوين الهباء Aerosol العضوي الجوي وتشمل مصادرها الرئيسية عمليات إحترق الفحم والنفط والبنزين (Ng وآخرون ، 2007 ؛ Jaber وآخرون ، 2020). إن المواد العطرية أحادية الحلقة المستبدلة هي شبه متطايرة وهي تقسم بين الغاز الجوي ومراحل الجسيمات ومن بينها يحظى الفينول بأهمية خاصة فيما يتعلق بجودة الهواء لأنه يعتبر أحد الملوثات الرئيسية المدرجة من قبل وكالة حماية البيئة الأمريكية نظراً لأنه يمثل خطراً على كل من البشر والكائنات الحية البيئية (TOXNET، 2019). وفي دراسة حديثة أجريت من قبل Jaber وآخرون ، (2020) لقياس معدلات التحلل الحيوي للفينول والكاتيكول وهما من الملوثات النفطية المعروفة بواسطة واحدة من أكثر السلالات المحللة للمركبات الهيدروكربونية نشاطاً في السحب والتي تم اختيارها اعتماداً على فحوصات سابقة عن السحب (*Rhodococcus enclensis*). وجدوا ان التحلل الحيوي للكاتيكول كان أسرع بنحو 10 مرات من التحلل الحيوي للفينول . وقد تضمنت الدراسة أيضاً مقارنة معدلات فقد الكيمائي للفينول والكاتيكول في كل من الطورين الغازي والمائي مع معدل التحلل الحيوي في الطور المائي تحت الظروف الجوية وظهرت النتائج أن معدلات التحلل في الطور المائي بالعمليات الكيميائية والإحيائية لكلا المركبين متشابهة مع بعضها البعض وانه خلال ساعات النهار من المتوقع أن يتجاوز التحلل الحيوي للكاتيكول تحلله بالنشاط الكيميائي ضمن الطور المائي فقد بلغ مقدار تحلل الكاتيكول الحيوي حوالي 17% من إجمالي الكاتيكول في النظام متعدد الأطوار (الطور الغازي والمائي) ضمن الغلاف الجوي.

وجد ان هناك معدلات تحلل بيولوجي للمركبات العضوية في الهواء من قبل العديد من سلالات البكتيريا (Fankhauser وآخرون ، 2019) ، إذ تؤدي أكسدة الفينول بواسطة جذور

$\text{OH}^\bullet$ إلى تكوين الكاتيكول في الطور الغازي (Xu و Wang، 2013) والطور المائي (Hoffmann وآخرون، 2018) وفي الطور البيئي الغازي- المائي (Pillar وآخرون، 2014). و ان المزيد من أكسدة الجذور $\text{OH}^\bullet$ للكاتيكول المتكون يؤدي إلى منتجات فتح النواة العطرية. وتشير دراسة نموذجية حديثة متعددة الأطوار إلى أن عمليات فقدان الطور المائي الرئيسية للعطريات مع مجموعتين من الهيدروكسيل لا تشمل فقط تفاعلات $\text{OH}^\bullet$ و $\text{NO}_3^\bullet$ في السحب ولكن أيضاً التفاعلات مع O_3 و $\text{HO}_2^\bullet$ (Hoffmann وآخرون، 2018).

توجد بحوث عديدة تتحدث عن إمكانية التحلل المائي للفينول في الطور الغازي الى الكاتيكول من خلال إنزيمات phenol monooxygenases و phenol hydroxylases وتتحدث أيضاً عن دور الأنزيم catechol 1,2-dioxygenases في فتح النواة العطرية للكاتيكول وهذه الإنزيمات مسؤولة عنها جينات موجودة ضمن جنس *Acinetobacter* و *Pseudomonas* المنتمين إلى بكتيريا كاما البروتينية Gamma-proteobacteria، وهي فئة رئيسية من البكتيريا الموجودة في السحب (Lallement وآخرون، 2018؛ Hoffmann وآخرون، 2018؛ Jaber وآخرون، 2020).

2-2 مخاطر التلوث بالهيدروكربونات النفطية

بمجرد وصول الهيدروكربونات النفطية إلى البيئة يحدث الضرر الحيوي الأولي عن طريق منع إمداد المياه والمغذيات والأوكسجين والضوء مما يؤثر على خصوبة التربة ونمو وإنبات النبات (Fuentes وآخرون، 2014؛ Onwurah وآخرون، 2007). توجد الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات في البيئة بشكل أساسي في التربة والرواسب بتركيز مختلفة مسببة أضراراً بيئية كبيرة (Dong و Lee، 2009). فبعد أن تختلط مع الماء تميل الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات إلى التسرب إلى الأرض إذ تستمر وتزيد مدة بقائها مما يقلل من جودة وإنتاجية التربة ويجعلها غير مناسبة للزراعة والإستثمار (Ou وآخرون، 2004).

إن الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات سامة بتركيز منخفضة ويمكن أن تكون مسرطنة أو مطفرة للحياة البرية والبشر وقد يحدث إمتصاص مثل هذه المواد الكيميائية غير التقليدية من التربة الملوثة عن طريق الإبتلاع أو الإستنشاق أو التعرض الجلدي للتربة أو الغبار الملوثة و نظراً

لإستمرار وجود الهيدروكربونات العطرية النفطية في النظام البيئي لأوقات طويلة من الزمن يمكن أن تتراكم في الحيوانات والأنسجة النباتية وتنتقل عبر السلسلة الغذائية مسببة الموت أو الطفرات الجينية في الحيوانات والبشر (Chandra وآخرون، 2013). يمكن أن يتسبب التعرض المتكرر لجرعات شبه مميتة من هذه المركبات في العديد من الإعاقات الفسيولوجية مما يؤدي إلى عدد من الآثار الصحية بما في ذلك تلف الكبد وفقر الدم الانحلالي وفقدان الوزن وتدهور الجهاز الهضمي وضعف جهاز المناعة (Paruk وآخرون، 2016). إن وجود الهيدروكربونات الأليفاتية أيضاً يمكن أن يؤثر سلباً على الفلورا الدقيقة microflora في التربة والبنية المنتجة للأغشية الزيتية oil films والبقع slicks ويحد من تبادل الأوكسجين والمغذيات في التربة (Militon وآخرون، 2010). وقد تؤثر الهيدروكربونات الأليفاتية أيضاً على الجهاز العصبي مما يسبب الدوار والصداع والتعب وتنميل الأطراف والرعشة وشلل الأطراف المؤقت وفقدان الوعي بتركيزات عالية (Adgate وآخرون، 2014).

أن العديد من الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات (PAHs) تظهر سمية عالية وخصائص سرطانية في الإنسان والحيوان (Costantini وآخرون، 2009). ولهذا السبب زادت الدراسات حول التلوث البيئي بمركبات الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات خلال العقود الأخيرة (Barret وآخرون، 2010؛ Herold وآخرون، 2011؛ Singh و Chandra، 2014). وتشمل الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات (PAHs) مجموعة من الملوثات العضوية ذات الأولوية و الأهمية البيئية والصحية العامة بسبب خصائصها السامة، والسمية الجينية genotoxic، والمطفرة mutagenic، و المسببة للسرطان carcinogenic، ووجودها في كل مكان فضلاً عن خصائصها المقاومة أو مايعرف بعنادها recalcitrance البيئي (Ghosal وآخرون، 2016). والجدول 1-2 يمثل بعض الدراسات السابقة عن الآثار البيئية الخطرة للهيدروكربونات النفطية على البيئة.

2-2-1 مصادر الفينول وتأثيراته الصحية

الفينول Phenol هو أحد أهم المركبات العطرية السامة الناجمة عن الصناعة والتي تدخل في الطبيعة ومكونات النظام البيئي ويتم إطلاق مشتقات الفينول من البتروكيماويات والكيماويات والأدوية والخشب ومصانع معالجة الورق ولب الورق وتصنيع فحم الكوك وصناعات المبيدات

Singh و Chandra ، 2014 ؛ Gagol وآخرون ، 2018). وقد تم تضمين الفينول كواحد من الأكثر المركبات خطورة في قائمة الملوثات البيئية لوكالة الحماية البيئية Environmental Protection Agency (EPA) (Costantini وآخرون ، 2009) . وتم إدراج الفينول كملوث ذي أولوية من قبل وكالة حماية البيئة الأمريكية (AUS ، 2002) وهو أكثر النفايات السائلة الصناعية خطورة مع الحد الأدنى من السمية عند 1 ملغم . لتر⁻¹ الذي وضعته منظمة الصحة العالمية (WHO) كمعيار لتركيز الفينول في مياه الشرب (Pradeep وآخرون ، 2015 ؛ Patel وآخرون ، 2016).

الجدول 1-2: الآثار الخطرة للهيدروكربونات النفطية على البيئة		
المصادر References	الآثار الخطرة Hazardous effects	المعلومات Parameters
Yoshida وآخرون ، (2006) Peterson ، (2001)	تقلل خصوبة التربة ، وتؤثر على الخصائص الفسيولوجية للتربة ، وتأثيرها السلبي على إنبات البذور.	البيئة الزراعية
Carneiro وآخرون ، (2010) Torres وآخرون ، (2008)	موت النباتات والحيوانات الطبيعية (انسكاب الزيت يسبب ظروف لاهوائية) ، الطيور المائية تعاني من انخفاض حرارة الجسم Hypothermia ، الغرق ، فقدان القابلية على الطيران ، التسمم ، والضعف التناسلي في الأسماك.	الحياة المائية
Lewis وآخرون ، (2008) Chen وآخرون ، (2008) Lee وآخرون ، (2012)	الأمراض الشديدة (احمرار الجلد ، سرطان الجلد ، سرطان الجيوب الأنفية ، سرطان الجهاز الهضمي وسرطان المثانة) ، التأثير على الجهاز العصبي المركزي ، الاكتئاب ، وعدم انتظام ضربات القلب	البشر
Carneiro وآخرون ، (2010) Torres وآخرون ، (2008) Gelin وآخرون ، (2003) Peterson ، (2001)	اختلال التوازن في النظام البيئي البحري ، التغيير الفيزيائي والكيميائي للموائل الطبيعية ، واختلال في السلسلة الغذائية.	النظام البيئي
Gelin وآخرون ، (2003) Cameiro وآخرون ، (2010) Torres وآخرون ، (2008)	النباتات المغطاة بالزيت غير قادرة على البناء الضوئي	النباتات
Lewis وآخرون ، (2008)	قد يتسبب التعرض للنفط الخام في تلف الرئتين والكبد والكلية والأمعاء والأعضاء الداخلية الأخرى	الحيوانات

يستخدم الفينول ومركباته على نطاق واسع في الصناعة لإنتاج البوليمر الراتنجي polymeric resin وتكرير الزيوت ومنتجات التجميل والمنتجات الطبية المختلفة (Michalowicz و Duda ، 2007). علاوة على ذلك فإن هذه المركبات قد تكون عبارة عن المنتجات الثانوية

الرئيسية التي تكونت أثناء عمليات صناعية معينة (BoczkaJ وآخرون ، 2017). إذ يتم اكتشافها في الغالب في المصانع والنفائات الصناعية السائلة على سبيل المثال تحويل الفحم وكذلك المصافي والصناعات الدوائية (BoczkaJ و Fernandes ، 2017).

تمت دراسة تأثير الفينول ومركباته على الكائنات الحية منذ القرن التاسع عشر منذ أن تم استخدام الفينول كمبيد بيولوجي ومن المحتمل أن يكون للمركبات الفينولية تأثير سام على مستوى الغشاء لأنه ينجم عن الارتباط العالي بين السمية والكراهية للماء hydrophobicity وهذا الاستنتاج مدعوم بملاحظة أن الفينول يغير وظيفة الغشاء ويؤثر على نسب البروتين إلى الدهن (protein: lipid) في الغشاء (Komarkova وآخرون ، 2003).

إن إستنشاق الفينول يسبب تهيجاً Irritation، فقدان الشهية Anorexia، فقدان الوزن التدريجي Progressive weight loss، الإسهال Diarrhea، الدوار Vertigo، إفراز اللعاب Salivation، ولون البول الداكن Dark coloration of the urine (EPA ، 2002). يسبب التعرض المتكرر للفينول تلفاً كلوياً Renal damage، أمراض القلب والأوعية الدموية Cardiovascular diseases، والوفاة للبالغين والأطفال (ASTDR ، 2014، Kumar ؛ وآخرون ، 2018). تسمى آلية التأثير السام للفينول بالتخدير القطبي polar narcosis أو التخدير الثاني narcosis II ويمكن أن يشمل هذا التأثير آليتين أو أكثر من الآليات السامة بما في ذلك التفاعل الفيزيائي مع مكونات الأغشية (Michalowicz و Duda ، 2007). ومع ذلك فإن الفينول أسهل في التحلل مقارنة بالمواد العطرية الأخرى (Fernandes وآخرون ، 2018).

2-2-2 مصادر الكاتيكول وتأثيراته الصحية

الكاتيكول Catechol، هو مركب فينولي يستخدم على نطاق واسع في صناعة الدباغة ومستحضرات التجميل والصناعات الدوائية ولكنه أيضاً يطلق في البيئة كنفائات صناعية ومصدر تلوث بيئي (Chen وآخرون ، 2013). يستخدم الكاتيكول كمطهر موضعي وكاشف وكما مادة حافظة مضادة للفطريات على بذور البطاطا وفي مجال التصوير الفوتوغرافي و صبغات الفراء فضلا عن ذلك انه مضاد للأكسدة في العديد من فروع الصناعة بما في ذلك المطاط والصناعات الكيميائية والمستحضرات الدوائية (Schweigert وآخرون ، 2001 ؛ Liu وآخرون ، 2014).

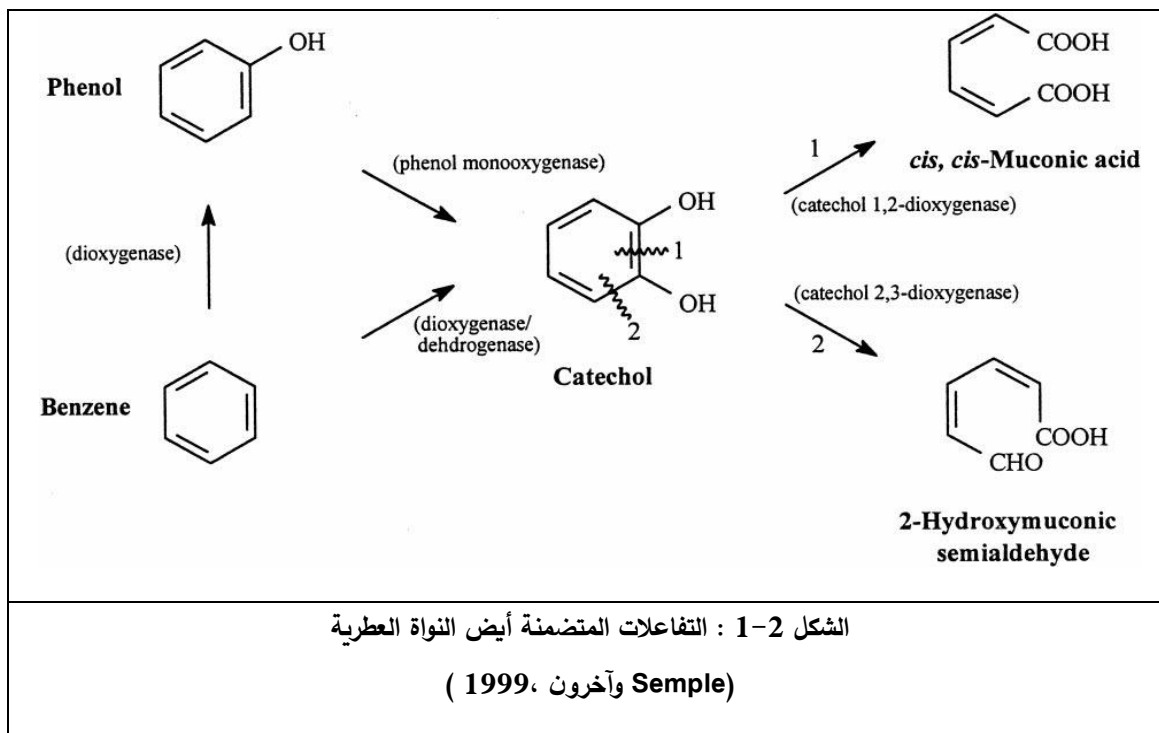
علاوة على ذلك فإن الكاتيكول و hydroquinone تعد نواتج تفاعلية للبنزين (السيد ، 2007 ؛ Bukowska وآخرون ، 2009). الكاتيكول سام للإنسان والحيوان حتى لو كان بتركيز منخفضة للغاية . وبالتالي، فمن الضروري تطوير طريقة او الية للكشف السريع والفعال عن الكاتيكول. (Tsai و Li ، 2007 ؛ Kumar وآخرون، 2018). وبسبب تواجد هذه المركبات بشكل شائع في البيئة واحتمالية تعرض الإنسان والحيوانات لتأثيراتها على حد سواء لا زالت الدراسات جارية نحو التحري عن اليات فعاليتها السمية اتجاه الخلايا (Hori وآخرون، 2008 ؛ Michałowicz وآخرون، 2008 ؛ Liu؛ 2008 وآخرون ، 2014).

تشير الدراسات السابقة، إلى أن مشتقات الفينول ومن ضمنها الكاتيكول قد غيرت العديد من المقاييس او البارامترات الكيميائية الإحيائية في كريات الدم الحمراء مثل نشاط إنزيم دسميوتيز الأكسدة اللحظية superoxide dismutase ، وإنزيمات كاتالاز وبيروكسيداز الجلوتاثيون peroxidase and catalase glutathione (Bukowska، 2003 ؛ Bukowska، 2004)، ونشاط إنزيم acetylcholinesterase الغشائي (Bukowska و Hutnik ، 2006)، و إنزيم ATP-ase (Duchnowicz وآخرون، 2005) وكذلك مستوى اختزال الجلوتاثيون (Bukowska، 2004). وأظهرت دراسات أخرى إن المركبات العطرية 2,4-dichlorophenol، و 2,4-dimethylphenol والكاتيكول كشفت عن خصائص مؤكسدة وتسببت في تكوين أنواع تفاعلية الاوكسجين Reactive Oxygen Species (ROS) في كريات الدم الحمراء (Bukowska وآخرون ، 2007). كذلك لوحظ أن الكلوروفينول chlorophenols يحث على الاكسدة الفائقة للدهون lipid peroxidation في خلايا الدم الحمراء (Duchnowicz و Koter، 2003).

2-2-3 مسار التحلل الحيوي للمركبات الفينولية

ان التحلل الحيوي الهوائي للمركبات الفينولية يتم عبر مسارات معينة ، إذ يلعب الكاتيكول أو مشتقاته دوراً رئيسياً فيها . اذ يتم استقلاب هذه المواد الوسيطة بعد ذلك بواسطة مسار الأنشقاق الداخلي أو الأنشقاق الخارجي لحلقة النواة العطرية بواسطة إنزيمات dioxygenases (Caposio وآخرون ، 2002). وفي حالة الفينول فان الخطوة الأولى للتحلل الحيوي تتضمن تحويل الفينول إلى كاتيكول عبر إنزيمات معينة منها إنزيم phenol hydroxylases والذي يتضمن عمله ربط مجموعة هيدروكسيل في الوضع ortho-position للحلقة العطرية (Krastanov وآخرون

2013، Filipowicz وآخرون، 2020). ويتحلل الكاتيكول بشكل أكبر عن طريق ortho-cleavage أو meta-cleavage بواسطة إنزيم catechol 1,2-dioxygenases أو إنزيم 2,3-catechol dioxygenases ، على التوالي وكما هو مبين في الشكل 1-2 ، إذ تضيف هذه الإنزيمات ذرتين من الأوكسجين إلى الحلقة العطرية للكاتيكول ويليهما انقسام في الروابط الكيميائية ومن ثم فتح نواة الحلقة العطرية إذ يحتوي الأنزيم Catechol 1,2- (C12O) dioxygenase (EC 1.13.11.1) على ايون الحديدك Fe^{3+} كمجموعة مساعدة prosthetic group وينتمي إلى الإنزيمات التي تمكن من انقسام الكاتيكول كإنشقاق داخلي intradiol (مسار انشقاق ortho-cleavage) مما ينتج عن ذلك المركب الحامضي *cis,cis*-muconic acid (Tsai وآخرون، 2005؛ Filipowicz وآخرون، 2020). وفي حالة الأنزيم catechol 2,3-dioxygenases (C23O) (EC 1.13.11.2) فإنه يحتوي على ايون الحديدوز Fe^{2+} كمجموعة مساعدة أو يستخدم أيونات معدنية ثنائية التكافؤ لشق الحلقة العطرية للكاتيكول كإنشقاق خارجي extradiol (*meta*-cleavage) وهذا يؤدي إلى إنتاج المركب 2-hydroxymuconic semialdehyde وخلال الخطوات التالية لعملية التحلل يتم تحويل منتجات الأنقسام الحلقي هذه إلى مركبات أليفاتية يمكنها أن تدخل بسهولة ضمن دورة حمض الكربوكسيليك (Tsai وآخرون، 2005؛ Zeyaulah وآخرون، 2018).



ركزت العديد من الدراسات على التحلل الحيوي للفينول ومشتقاته فيما يتعلق بمسارات التحلل الحيوي، فقد وصف Middelhoven (1993) تقويض مركبات البنزين عن طريق الخمائر الكيسية ascomycetous والبازيدية basidiomycetous والخمائر الشبيهة بالفطريات ولقد وجد ان المسار الأيضي في خمائر جنس المبيضات *Candida sp.* و *Trichosporon sp.* ، يتضمن تحويل الفينول إلى الكاتيكول عن طريق الأنشطار الأورثوي لحلقة البنزين.

تمت دراسة تحليل المركبات الفينولية بواسطة خميرة المبيضات *Candida tropicalis* HP15 من قبل Krug وآخرون، (1985 a) الذين وصفوا امكانية تثبيط الركيزة الفينولية والقدرة على التحليل الحيوي للعديد من المركبات الفينولية بما في ذلك المركبات المستبدلة substituted compounds. وتمت أيضاً دراسة خصائص الأنزيم phenol hydroxylase والأنزيم catechol 1,2-oxygenase (Krug وآخرون، 1985b). وتمت دراسة أكسدة الفينول بواسطة الخميرة *C. tropicalis* من قبل Neujahr وآخرون (1974) ، ولقد لاحظوا أن نطاق المركبات القابلة للتحلل مقيد أكثر مما هو عليه في حالة الخميرة *Trichosporon cutaneum* إذ لا تستطيع *C. tropicalis* أكسدة المركبات العطرية التالية tri-hydroxy-phenols ، cresols ، hydroxybenzoates ، benzoate ، xylene إلخ ، بينما حدد Chang وآخرون (1998) درجة الحموضة المثلى عند 7 ودرجة الحرارة المثلى البالغة 32 درجة مئوية للخميرة *C. tropicalis* وقرينتها fusant (سلالة مركبة جينيا) وأظهرت البيانات تحللاً أفضل للفينول الذي تم تلقيه مع السلالة القرينة وكذلك حساسية أقل لتثبيط الفينول مقارنة بسلالة المقارنة (السيطرة). بينما كانت السلالة القرينة أكثر حساسية لتغيرات الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة من سلالة الضبط أو المقارنة control.

2-2-4 أساليب إزالة المركبات الفينولية

تحتاج مياه الصرف المحتوية على الفينولات والمركبات السامة الأخرى إلى إزالة دقيقة قبل تصريفها الى المسطحات والمستودعات المائية الكبيرة المستقبل لها وتعتبر الإزالة الإحيائية وإمتصاص الكربون النشط واستخراج المذيبات والأكسدة الكيميائية والطرائق الكهروكيميائية من أكثر الطرائق إستخداما لإزالة الفينول ومركباته من مياه الصرف الصحي (السعدي، 2002). ولقد ركز الاهتمام الحديث بالطرائق الأنزيمية لإزالة الفينول على إستخدام إنزيمات tyrosinase

أو peroxidase لإزالة الفينول منخفض التركيز الموجود في مياه الصرف الصحي (العمر، 2000 ؛ Zynek وآخرون، 2011). إن استخدام peroxidase له عيب يتمثل في الكميات المتكافئة من H_2O_2 المطلوبة كعامل مؤكسد بينما يتطلب إنزيم tyrosinase الأوكسجين O_2 فقط كعامل مؤكسد (Bayramoglu وآخرون، 2013).

هنالك العديد من الأساليب المتبعة في إزالة المركبات الفينولية من الماء ومنها الإمتزاز باستخدام العديد من المواد الماصة، والأكسدة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية و H_2O_2 ، والإزالة بالموجات فوق الصوتية و المحفزات الأنزيمية (Komarkova وآخرون، 2003) و من الأساليب الأخرى أيضاً الأكسدة الإحيائية، فقد درس Garcia وآخرون (1997) إمكانية تقليل محتوى الفينول عن طريق التحلل الحيوي في الركام التخمرى Stillage الناجم عن المخلفات الصناعية التي تحتوي كمية عالية من الملوثات الفينولية إذ استخدموا أنواع الفطريات *Geotrichum candidum* و *Aspergillus tereus* بنجاح في هذا المجال وعلى الرغم من أن كلا النوعين قد تصرف بطريقة مماثلة في الإزالة الإحيائية للمحتوى الفينولي ولكن *G. candidum* كانت أفضل في إزالة الفينولات من ركام التخمر Stillage .

إن استخدام الإزالة الإحيائية لتحليل الملوثات الفينولية عادة ما يتم إجراؤها من خلال الطريقة الهوائية ومع ذلك قد لاقت الإزالة الفينولية صعوبات في هذا المجال لأن الفينول كان له تأثير مشبط على الخلايا ومضاد للبكتيريا فهو يعمل كعامل تنشيط للغشاء الخلوي مما يزيد من نفاذية غشاء السيتوبلازم ويسبب تسرب مادة السيتوبلازم (Rigo وآخرون، 2010). لقد تم العثور على القليل من المعلومات حول استخدام مزارع الخميرة النامية على المركبات الفينولية في الأبحاث العلمية (Páca وآخرون، 2002 ؛ Komarkova وآخرون، 2003) وخاصة الكاتيكول الذي يعتبر أكثر سمية من الفينول (Kumar و Kumar، 2005). وهناك بعض الدراسات عن الكائنات الحية الدقيقة المحللة للسموم phenolytic والتي تظهر سلوكاً مختلفاً من حيث قدرتها على تحليل هذه المركبات السامة ولقد كان التحلل الحيوي للفينول وأشكاله المتفرعة بواسطة المزارع الميكروبية محوراً للبحث لفترة طويلة (Kumar و Kumar، 2005 ؛ Yan وآخرون، 2005). وتعتبر معرفة حركية النمو growth kinetics ضرورية جداً لفهم قدرات الكائنات الحية الدقيقة في عمليات التحليل وعمليات الإزالة وهناك العديد من الدراسات المتعلقة بتحليل المركبات

الفينولية والتي تم تلخيصها في الجدول 2-2. وفي دراسة أجريت من قبل Rigo وآخرون (2010) قيموا من خلالها التحلل الحيوي للكاتيكول بواسطة سلالة المبيضات *Candida parapsilopsis* وقد أظهرت النتائج التي حصلوا عليها أن أعلى تركيز من الكاتيكول تسبب في فترة تطبع lag period أطول مما يدل على أن المزارع المتأقلمة يمكن أن تحلل تمامًا تركيز الكاتيكول الابتدائي والبالغ 910 ملغم. لتر⁻¹ خلال 48 ساعة وتم التحقق من ذلك باستخدام نموذج هالدين Haldane's model لإثبات صحة البيانات التجريبية بشكل كافٍ فيما يتعلق بحركية النمو على مدى تركيز الكاتيكول الابتدائي المدروس والذي تراوح من 36 إلى 910 ملغم. لتر⁻¹. وكانت الثوابت التي تم الحصول عليها من خلال نموذج هالدين هي $\mu_{max} = 0.246$ ساعة⁻¹ ؛ $K_s = 16.95$ ملغم. لتر⁻¹ ؛ $K_i = 604.85$ ملغم. لتر⁻¹.

وبالنظر إلى سمية الفينول فإنه يجب إزالته أو يجب تقليل تراكيزه بشكل كبير من النفايات قبل التخلص منها في البيئة وتشمل إزالة النفايات المحتوية على الفينول كل من الطرائق الفيزيائية والكيميائية والإحيائية وتشتمل الطرائق الفيزيائية-الكيميائية على الامتزاز Adsorption ، إستخلاص المذيبات Solvent extraction ، الأكسدة الكيميائية بالأوزون Ozone oxidation والكلورة Chlorination (Kumar وآخرون ، 2018). وفي الوقت الحاضر تعد الطريقة الإحيائية أكثر تفضيلاً مقارنة بالطرائق الفيزيائية والكيميائية بسبب تكلفتها وتوليدها مركبات وسيطة سامة وغير قابلة للتحلل (Lika و Papadakis ، 2009). وقد درست الإزالة الميكروبية للمركبات العضوية صعبة التحلل recalcitrant compound على نطاق واسع نظراً لاحتمالية تمعدن Mineralization تلك المركبات العضوية السامة و أجريت دراسات مختلفة لتحليل أو استقلاب الفينول ومشتقاته إلى مركبات غير سامة قابلة للتحلل الحيوي باستخدام الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتيريا ، الفطريات ، والطحالب (Lika و Papadakis ، 2009؛ Kumar وآخرون ، 2018). ومع ذلك وبسبب سمية الفينول للكائنات الحية الدقيقة فإن الإزالة الإحيائية للنفايات السائلة المحتوية على الفينول كانت صعبة ونتيجة لذلك تم تكريس الكثير من الجهود البحثية لتحسين كفاءة إزالة الأنظمة الإحيائية المختلفة (Yotova وآخرون ، 2009). ومن بين الهيدروكربونات العطرية يعتبر الفينول المكون الأساسي الذي يمنع نمو الخلية خاصة عندما يتجاوز تركيزه 500 ملغم. لتر⁻¹. لذلك فإن عزل الكائنات الحية الدقيقة التي يمكنها تحمل سمية الفينول بتركيز عالية يعتبر أمر مهم للغاية (Yotova وآخرون ، 2009؛ Liu وآخرون ، 2011).

الجدول 2-2: الثوابت الحركية Kinetic constants للتحلل الحيوي للفينول أو الكاتيكول

وفقاً لنموذج هالدين Haldane's model

المصادر	K_i (ملغم.لتر ⁻¹)	K_s (ملغم.لتر ⁻¹)	μ_{max} (ساعة ⁻¹)	التحلل الحيوي	المزرعة
(Rigo وآخرون، 2010)	604	16.95	0.246	الكاتيكول	<i>Candida parapsilopsis</i>
(Alegre و Rigo، 2004)	298	11.2	0.174	الفينول	<i>Candida parapsilopsis</i>
(Yan وآخرون، 2005)	207.9	11.7	0.48	الفينول	<i>Candida tropicales</i>
(Beyenal وآخرون، 1997)	345	85	-----	الفينول	<i>Fusarium flocciferum</i>
(Monteiro وآخرون، 2000)	470	1 >	0.534	الفينول	<i>Pseudomonas putida</i>
(Kumar و Kumar، 2005)	99.9	29.9	0.326	الكاتيكول	<i>Pseudomonas putida</i>

بينت الدراسات أن هنالك بعض سلالات البكتيريا (Kumar وآخرون، 2005) و الفطريات (Tsioulpas وآخرون، 2002) وخاصة سلالات معينة من الخمائر مثل *Candida maltosa* (Fialova وآخرون، 2004) و *Candida tropicalis* (Juarez-Ramirez وآخرون، 2001) ؛ Jiang وآخرون، 2005) و *Trichosporon cutaneum* (Aleksieva وآخرون، 2002) قادرة على تحويل الفينول إلى ثنائي أكسيد الكربون و الماء وهي تتحمل سمية الفينول بتركيز 500 ملغم. لتر⁻¹ أو أعلى. ولوحظ أن أنواع المبيضات *Candida spp.* وأنواع الجنس *Trichosporon spp.* قادرة على تحليل الفينول بشكل فعال عند تراكيز تزيد عن 1000 ملغم. لتر⁻¹ (Fialova وآخرون، 2004 ؛ Jiang وآخرون، 2005 ؛ Juarez-Ramirez وآخرون، 2001). ويُعرف الجنس *Trichosporon* بامتلاكه القدرة على تحطيم المركبات أحادية الحلقة العطرية الاحادية monoaromatic compounds (Liu وآخرون، 2011).

إن البحث عن سلالات جديدة من الخمائر المحللة للفينول لا يزال ذا أهمية علمية وصناعية كبيرة وفي العقود الأخيرة ذكرت دراسات عديدة حول السلالات المحللة للفينول والتي تمتلك قابلية تحمل سمية الفينول بتركيز تزيد عن 1000 ملغم.لتر⁻¹ وكما مبين في الجدول 2-3.

وفي دراسة اجريت من قبل Liu وآخرون (2011) تم فحص سلالة الخميرة *Trichosporon montevidense* PHE1 القدرة على تحليل الفينول وتم التحقق من تحملها لسمية الفينول من خلال عملية التحلل في تجارب المزارع الفرعية الدفعية لتوضيح إمكانية تطبيقها في إزالة النفايات المحتوية على الفينول. إذ تم عزل سلالة خميرة جديدة قادرة على تحليل الفينول

بتركيز عالية باستخدام الفينول كمصدر وحيد للكربون من عينات التربة في حقل نفط Huabei ، مقاطعة Hebei ، جمهورية الصين الشعبية. وتم التعرف على السلالة بطريقة تسلسل الحمض النووي وتعيين *Trichosporon montevidense* PHE1 وقد أظهرت السلالة تحمل ممتاز لسمية الفينول بتركيز يصل إلى 2500 ملغم . لتر⁻¹ وكذلك أظهرت الدراسة ان إزالة للفينول تجاوزت 99.5% في 18 ساعة بالنسبة للفينول وبتركيز ابتدائي يبلغ 1200 ملغم . لتر⁻¹ .

وقد تم التوصل الى أن الخمائر هي من أهم عوامل التحلل الحيوي للفينول (Karimi و Hassanshahian، 2016 ؛ Patel و Rajkumar ، 2009). وقد سجلت أنواع الخميرة مثل *Trichosporon* spp. (Liu وآخرون ، 2011) و *Saccharomyces cerevisiae* (Patel و Rajkumar ، 2009) و *Candida* spp. (Kuntiya وآخرون ، 2013 ؛ Zhou وآخرون ، 2011) على أنها قادرة على تحليل الفينول لغاية 200 و 800 و 1000 ملغم.لتر⁻¹ على الترتيب.

الجدول 2-3: مقارنة التحلل الحيوي للفينول بتركيز أولية تتجاوز 1000 ملغم . لتر⁻¹ في تجارب المزارع الفرعية

المصدر	الحرارة (C°)	وقت التحليل ساعة	الكتلة الإحيائية المحقونة	تركيز الفينول ملغم . لتر ⁻¹	المزرعة
(Santos و آخرون ، 2001)	30	120	500 ملغم. لتر ⁻¹	1880	<i>Trichosporon</i> sp. LE3
(Liu وآخرون ، 2011)	30	18	760 ملغم. لتر ⁻¹	1200	<i>Trichosporon montevidense</i> PHE1
(Liu وآخرون ، 2011)	30	<24	950 ملغم. لتر ⁻¹	2000	<i>Trichosporon montevidense</i> PHE1
(Jiang وآخرون ، 2005)	30	66	<50 ملغم. لتر ⁻¹	2000	<i>Candida tropicalis</i>
(Jiang وآخرون ، 2010)	30	65	OD ₆₀₀ 0.065	2400	<i>Candida tropicalis</i> mutant CTM 2
(Tsai وآخرون ، 2005)	30	72	OD ₆₀₀ 0.02	1880	<i>Candida albican</i> TL
(Tsai وآخرون ، 2005)	30	240	OD ₆₀₀ 0.02	2256	<i>Candida albican</i> TL
(Fialova وآخرون ، 2004)	23.5	72	OD ₄₀₀ 0.1	1300	<i>Candida maltosa</i>
(Fialova وآخرون ، 2004)	23.5	>90	OD ₄₀₀ 0.1	1700	<i>Candida maltosa</i>

2-3 مصير الهيدروكربونات النفطية في البيئة

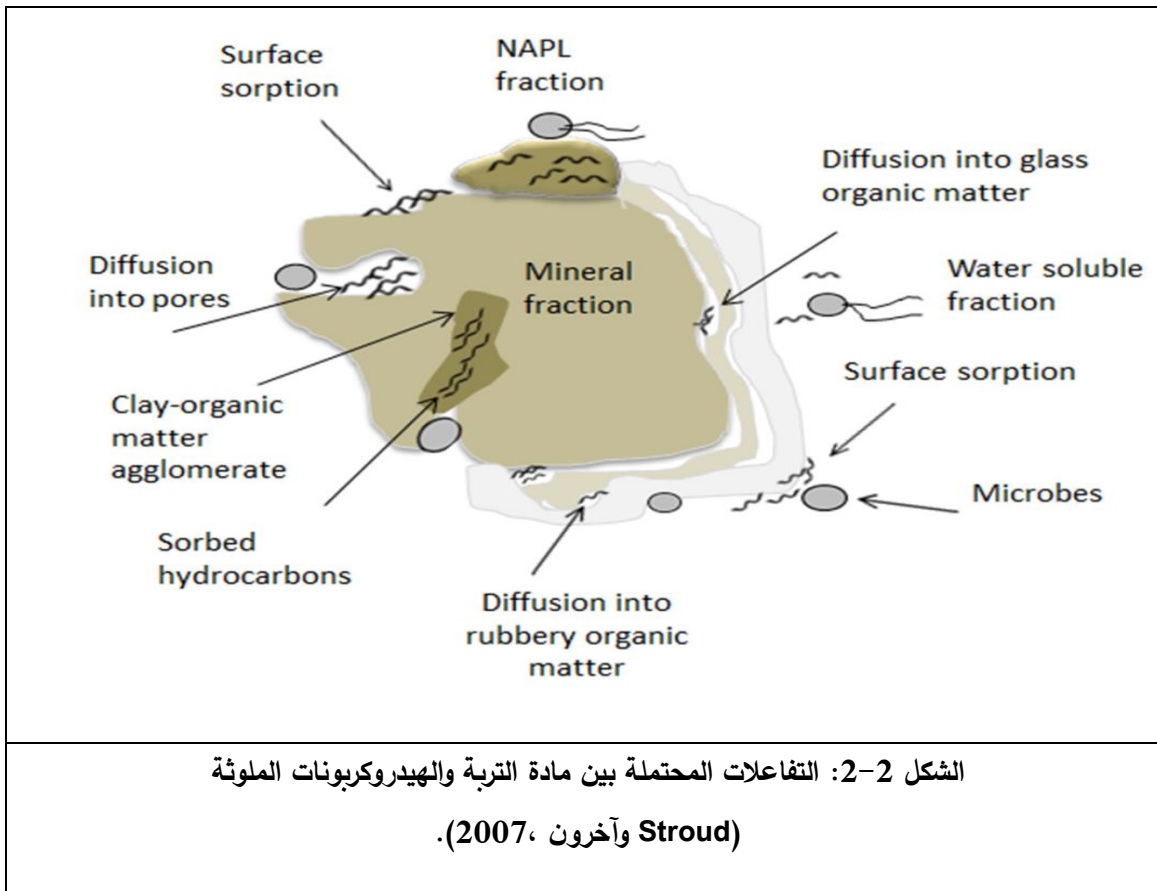
بالنظر إلى طبيعة ومدى التلوث الهيدروكربوني في التربة ومن أجل التنبؤ بمدى نجاح نهج إزالة التلوث النفطي فإن فهم مصير وسلوك هذه الملوثات في البيئة أمر ضروري ففي أثناء الأنسكاب النفطي تحدث التجوية ويخضع الزيت لمجموعة متنوعة من العمليات الفيزيائية والكيميائية (Koshlaf و Ball ، 2017). يمكن أن تغير هذه العمليات تكوين وخصائص الزيت فهي تؤثر على درجة تحلل الهيدروكربونات وعزلها والتفاعل مع ميكروبات التربة (Baboshin و Golovleva، 2012 ؛ Koshlaf و Ball ، 2017). يعتمد مصير وانتشار هذه المركبات في باطن الأرض على لزوجة الزيت وكميته في البيئة الأرضية ويتأثر مصير الهيدروكربونات البترولية في البيئة بما يأتي (Stroud وآخرون ، 2007):

(أ) التكوين والخصائص الفيزيائية للتربة مثل حجم دقائق التربة والمسامية و محتوى المادة العضوية و النفاذية و المساحة السطحية.

(ب) الخواص الفيزيائية و الكيميائية وتركيب المنتجات البترولية بما في ذلك معامل إنتشار الهواء وقابلية الذوبان في الماء ونقطة الغليان.

يمكن أيضاً أن تتأثر قابلية التحلل الحيوي للهيدروكربونات البترولية بالتركيز والتوافر الحيوي bioavailability للملوثات إذ يعرف التوافر الحيوي للهيدروكربونات إلى جزء الملوثات التي يمكن إستخدامها أو تحويلها من قبل المجتمع الميكروبي في التربة (Koshlaf و Ball ، 2017) ويعتبر الإمتصاص أيضاً عاملاً مهماً يؤثر على التحلل الكامل للملوثات العضوية في التربة إذ يؤدي إنخفاض إمتصاص جزء الهيدروكربون إلى زيادة مقاومة إمتزازه مما يؤدي إلى زيادة الثبات داخل المادة العضوية للتربة (Baboshin و Golovleva، 2012). وفي حالة التربة الملوثة بالهيدروكربونات البترولية يجب أخذ جزأين هيدروكربونيين في نظر الإعتبار عند إختيار الإزالة الإحيائية : الجزء الاول يمثل الهيدروكربونات الممتزة بشكل لا رجعة فيه ؛ هذا الجزء غير متوافر بيولوجياً ويعتبر غير قابل للتحلل. اما الجزء الثاني فهو الجزء المتوفر بيولوجياً والذي يمكنه الإمتصاص والانتشار في دقائق التربة كجزء قابل للذوبان في الماء (Baboshin و Golovleva، 2012 ؛ Koshlaf و Ball ، 2017).

يمكن تجزئة الهيدروكربونات البترولية وعزلها داخل التربة عن طريق الإمتصاص للمواد العضوية أو إنتشارها في داخل البنية ثلاثية الأبعاد للمادة العضوية (الراوي وآخرون ،1986) ويلخص الشكل 2-2 هذه التفاعلات (Stroud وآخرون، 2007). وبعد حدوث الأنسكاب النفطي الأولي تصبح التفاعلات الفيزيائية أكثر تعقيداً ويُعرف هذا بالتلوث المعمر aged contamination (Golovleva و Baboshin، 2012). ان الجزء القابل للتحلل من الملوثات العضوية في التربة هو الجزء الذي يتم إمتصاصه بسهولة من وإلى جزيئات التربة ويتواجد بالطور او الحالة المائية ولقد ثبت جيداً أنه مع زيادة التفاعل بين جزيئات التربة والملوثات سيكون هناك إنخفاض نسبي في القدرة على استخراج الملوثات والتحلل الحيوي (العاني ، 1980 ؛ Stroud وآخرون ، 2007). وتعتبر الأجزاء الهيدروكربونية التي يتم إمتصاصها بإحكام على المواد العضوية للتربة أكثر تمرّداً ومقاومة للتحلل مقارنة بالهيدروكربونات المتطايرة أو القابلة للذوبان وهذا إعتبار مهم جداً عند تصميم أو تطبيق استراتيجية لتحليل التربة الملوثة إذ تميل الهيدروكربونات النفطية إلى الإمتصاص بقوة في التربة (Golovleva و Baboshin، 2012).



2-3-1 العوامل المؤثرة في التحلل الحيوي للهيدروكربونات النفطية

إن الغرض الرئيسي من معالجة المواقع الملوثة هو تقليل مخاطر الملوثات على صحة الإنسان و البيئة من خلال تطبيق تقنيات الإزالة المثلى (Perelo، 2010). إن تطبيق تقنيات الإزالة الإحيائية في البيئة الفعلية (الحقل) يمثل تحدياً إذ إن التحلل الحيوي للهيدروكربونات في التربة يتم من خلال عدد من العوامل البيئية والإحيائية التي تختلف من موقع إلى آخر (Stroud وآخرون، 2007) وتشمل المعلمات (المتغيرات) التي تؤثر على الإزالة الإحيائية أمور مختلفة منها طبيعة وتركيز الملوثات ونوع وبنية التربة ووجود الكائنات الدقيقة المحللة للملوثات وإمكانية بقائها ويمكن للظروف البيئية مثل درجة الحموضة (الأس الهيدروجيني) في التربة والمياه ، وتوافر الأوكسجين ومحتوى المغذيات أن تحد أيضاً من عملية الإزالة الإحيائية عن طريق منع نمو الميكروبات المحللة للهيدروكربونات و / أو تقليل التوافر الحيوي للملوثات وجاهزيتها للهجوم الميكروبي (Koshlaf و Ball، 2017) .

يمكن أن يؤدي التوافر الحيوي المحدود من الهيدروكربونات للكائنات الدقيقة إلى عملية إزالة بيولوجية أقل فعالية عن طريق الحد من معدل تحلل الهيدروكربونات وإن التفاعل بين الميكروبات المحللة للهيدروكربونات ومادة التربة والملوثات يلعب دوراً مهماً في عملية الإزالة الإحيائية وتعتبر المادة العضوية في التربة من أهم العوامل التي لها تأثير سائد على التفاعلات بين التربة والملوثات العضوية (Baboshin و Golovleva، 2012). وتتحكم النسبة المئوية للمواد العضوية في التربة في تقسيم الهيدروكربونات البترولية إلى الجزء العضوي من التربة ومدى الإمتصاص مما يؤثر على معدل التحلل (Liu وآخرون، 2014).

إن معدل تحلل الملوثات البترولية يكون أعلى بشكل عام خلال المرحلة المبكرة عندما تكون الملوثات متاحة بيولوجياً بسهولة على النقيض من الملوثات في مرحلة الإزالة الثانية إذ سيكون التوافر الحيوي محدود نتيجة عزل الهيدروكربونات وبشكل عام ، بمجرد الوصول إلى هذه المرحلة لا يحدث مزيد من التحلل خلال بقية الإزالة (Perelo، 2010).

2-3-2 التحطيم الحيوي للمركبات الهيدروكربونية النفطية

إن الدراسات المايكروبيولوجية في المجال النفطي شخّصت أكثر من 200 نوع من أنواع البكتيريا ، الخمائر ، والفطريات التي تمتلك القدرة على تحطيم الهيدروكربونات النفطية والتي يمكن تقسيمها أو ترتيبها من حيث الأهمية بحسب (Fan و Krishnamurthy، 1995) الى المجاميع التالية :

- (1) البكتيريا متغايرة التغذية heterotrophic bacteria .
- (2) الفطريات fungi .
- (3) البكتيريا الهوائية aerobic bacteria .
- (4) البكتيريا الخيطية actinomycete .
- (5) الميكروبات ذاتية التغذية الضوئية photoautotrophic microbes .
- (6) البكتيريا شحيحة التغذية oligotrophic bacteria .

لقد تم التحري عن امكانية إستخدام العديد من أنواع الخمائر مثل *Candida maltose* و *Candida tropicalis* و *Candida apicola* مع الالكانات المتعددة والتي مثلت الخطوة الاولى في تحطيم المركبات الحلقية ويوجد في العديد من الأنظمة البيئية بشكل اعتيادي مجتمع ميكروبي أصيل indegiuos consertia قادر على التحليل الحيوي للزيت على نطاق واسع شريطة أن تكون الظروف البيئية مؤاتية لنشاط التحليل الأيضي للمركبات النفطية (Chandra وآخرون، 2013 ؛ Liu وآخرون، 2014). وهناك العديد من المزايا للاعتماد على الكائنات الحية الدقيقة الأصلية بدلاً من إضافة الكائنات الحية الدقيقة لتحلل الهيدروكربونات منها أن تكون المجموعات الطبيعية قد تطورت خلال سنوات عديدة إذ يتم تكيف هذه الكائنات الدقيقة للبقاء والانتشار في تلك البيئة الملوثة فضلاً عن قدرتها على الاستفادة من هذه الملوثات كمصدر للغذاء والطاقة (Chandra وآخرون ، 2013).

تتوزع الهيدروكربونات بين مجموعة متنوعة من الميكروبات وتوجد هذه المجموعة من الكائنات الحية الدقيقة في النظم البيئية الطبيعية وتقوم إما بشكل مستقل أو تآزري باستقلاب

الهيدروكربونات المختلفة. وفي كثير من الأحيان عندما تكون كمية الكائنات الحية الدقيقة كافية في البيئة الملوثة قد لا تكون هناك حاجة إلى إجراء التعزيز أو التلقيح الميكروبي كخطوة من خطوات الإزالة البيولوجية (Olajire و Essien، 2014). إن الكائنات الحية الدقيقة (البكتيريا والفطريات) لها معدلات مختلفة في استخدام وتحلل الهيدروكربونات في التربة أو الماء وينعكس هذا المعدل على وحدات المستعمرات المتكونة (CFU) للكائنات المعزولة.

2-3-2 دور الخمائر في تحليل المركبات الفينولية

الخمائر كائنات دقيقة وحيدة الخلية تصنف إلى جانب العفن والفطر ضمن مملكة الفطريات (Alfenore وآخرون، 2004). وعلى الرغم من أن الخمائر كائنات وحيدة الخلية إلا أنها تمتلك تنظيمًا خلويًا مشابهًا لتلك الموجودة في الكائنات الحية الراقية بما في ذلك البشر فعلى وجه التحديد يوجد محتواها الجيني داخل نواة وهذا يصنفها على أنهم كائنات حقيقية النواة على عكس نظيراتها وحيدة الخلية بدائيات النوى كالبكتيريا (Thapa وآخرون، 2015). ومن الخصائص المهمة الأخرى للخمائر أنها تتكاثر بسرعة ويسهل معالجتها وراثيًا وإن الوقت اللازم لمضاعفة الخميرة حوالي 90 دقيقة علاوة على ذلك تم الانتهاء من دراسة الجينوم الخاص بها وتنظيمه (Ben-Sassi وآخرون، 2006).

تعد الفطريات فعالة في تحليل مدى واسع من الجزيئات العضوية ويعود السبب في ذلك إلى إنتاجها للإنزيمات الخارج خلوية (Extracellular enzymes) فضلا على قدرتها على تكوين كتلة حيوية Biomass كبيرة خلال فترة قياسية (Ellis وآخرون، 2007). وقد تمكن Chang وآخرون (1998) في وقت مبكر من عزل *Candida tropicalis* وملاحظة دورها في تحليل التراكيز العالية من مركبات الفينول ومشتقاته المكلورة. وذكر Lika و Papadakis (2009) أن أنواع الخميرة مثل *C. tropicalis* وأنواع *Trichosporon* و *Rhodotorula* وكذلك فطر الرشاشية السوداء *Aspergillus niger* و *Phaenarochoetes chrysoporum* قد استخدمت في الإزالة الحياتية للفينول (Kumar وآخرون، 2018).

إن من المهم جداً اختيار الأنواع الفطرية الملائمة لتحطيم الفينول بهدف الوصول إلى الإزالة الناجعة للمركبات الفينولية وقد استخدمت في هذا المضمار كلتا الطريقتين الهوائية واللاهوائية في تحطيم الفينول ومشتقاته ولكن وجد أن استخدام الاحياء الدقيقة في الطريقة الهوائية

له فعالية أكثر في إزالة الملوثات الفينولية (Al-Khalid و El-Naas ، 2012 ، Kumar وآخرون ، 2018). ولقد اقترح نهج مثير للاهتمام من قبل مؤلفين آخرين (Chandra وآخرون ، 2011) قاموا بتحسين البروتوكول من أجل عزل البكتيريا القادرة على إزالة الفينولات من مياه الصرف الصحي والطين وقد امكن استخدام طريقتهم مع الخمائر بنجاح مع بعض التعديلات (Bevilacqua وآخرون.، 2012). تم عزل عزلة خميرة محلية من منطقة ملوثة بخليج أبو قير في الإسكندرية بمصر وتم تشخيصها وفقاً للتسلسل الجيني الجزئي اعتماداً على 18s RNA ، على أنها خميرة *Candida tropicalis* وقد أظهرت العزلة فاعلية عالية في التحلل الحيوي لزيت البترول وكذلك بعض الهيدروكربونات (Farag و Soliman ، 2011). في الواقع يمكن أن يكون استخدام الخمائر وسيلة واعدة من بين الكائنات الحية الدقيقة لإزالة النفايات الفينولية ضمن المياه العادمة لمطاحن زيت الزيتون إذ أن الخمائر أكثر تكيفاً ومقاومة للتراكيز العالية من الفينولات وقيم الأس الهيدروجيني المنخفضة لنفايات مطاحن إنتاج الزيوت ، مما يسمح لها بالسيطرة والنمو في هذه البيئة (Ben-Sassi وآخرون ، 2006).

2-2-3 دور الطحالب الدقيقة في تحليل المركبات الفينولية

مقارنة مع البكتيريا والفطريات تم إيلاء إهتمام قليل نسبياً للتحلل الحيوي للمركبات الهيدروكربونية الاروماتية PAHs بواسطة الطحالب الدقيقة (البكتيريا الزرقاء، الدياتومات وغيرها) وتعتبر الطحالب المجهرية واحدة من المنتجين الرئيسيين في النظم البيئية المائية وتلعب أدواراً حيوية في مصير الملوثات الهيدروكربونية الاروماتية ضمن تلك البيئات فمن المعروف أن العديد من سلالات الطحالب الدقيقة تقوم باستقلاب النفثالين والفينانثرين والأنثراسين والباتامينيوم وغيرها من الملوثات الهيدروكربونية الاروماتية (Ghosal وآخرون ، 2016). وقد تم الإبلاغ عن دور سلالة JCM التابعة لجنس *Oscillatoria* sp. في أكسدة naphthalene إلى 1-naphthol و أن *Cyanobacterium agmenellum* strain PR-6 يمكنها تحويل phenanthrene إلى phenanthrene trans-9 و 10-dihydrodiol و 1-methoxyphenanthrene (Narro وآخرون ، 1992). وفي دراسة أخرى تم الإبلاغ عن دور سلالة الطحالب الدقيقة *Prototheca zopfii* المقيدة ضمن رغوة polyurethane في زيادة تراكم خليط الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات PAHs على مادة التقييد عند تنميتها ضمن مزيج من ركائز الهيدروكربونات

الأليفاتية والهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات وعلى الرغم من أن تلك السلالة المقيدة تمكنت أن تحلل الألكانات n-alkanes إلا أن معدل تحليلها للهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات كان أقل بكثير ومع ذلك فإن تراكم الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات لم يضعف من تحلل الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات بينما تمكنت الخلايا الحية الحرة غير المقيدة لتلك السلالة من تقليل تركيز كل من الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات و الألكانات بشكل مرض (Ueno وآخرون ، 2008). ولقد قام Hong وآخرون بفحص التراكم والتحلل الحيوي للمركبين phenanthrene و fluoranthene بواسطة نوعين من الدايتومات وهما *Skeletonema* و *costatum* و *Nitzschia* sp. النامية في النظام البيئي المائي لشجيرة المنغروف mangrove (المنغروف هي شجيرة أو شجرة صغيرة تنمو في المياه المالحة الساحلية أو قليلة الملوحة) وقد لوحظ أن السلالات كانت قادرة على تراكم وتحليل phenanthrene و fluoranthene في وقت واحد إلا أن قدرة تراكم الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات وتحليلها من قبل *Nitzschia* sp. كانت أعلى مما هي عليه في *S. costatum* (Hong وآخرون ، 2008). وفي دراسة حديثة من قبل Patel وآخرون تم الإبلاغ عن التحلل الحيوي للمركبين anthracene و pyrene بواسطة طحلب *Anabaena fertilissima* (Patel وآخرون ، 2016). أجريت دراسة هي الأولى من نوعها حول الدور التآزري للكائنات الحية الدقيقة الطحلبية- البكتيرية في التحلل الحيوي للملوثات العطرية التي اشتملت على المركبات salicylate و phenol و phenanthrene ضمن مرحلة إزالة واحدة ولقد وجد أن السلالة *Chlorella sorokiniana* التابعة الى صنف الطحالب الخضراء نمت مع تلك المركبات العطرية الثلاثة بتركيزات مختلفة وأظهرت تأثيرات مثبطة متزايدة من خلال الترتيب salicylate > phenol > phenanthrene ومع ذلك تم تحقيق إزالة مرضية (> 85%) فقط في النظام الذي يحتوي على كل من البكتيريا والطحالب المحتضنة تحت ظروف إضاءة مستمرة مما يشير إلى العلاقة التآزرية بين الطحالب والبكتيريا في إزالة الملوثات العضوية (Borde وآخرون ، 2003) كذلك تم الإبلاغ أيضاً عن اتحاد طحالب مع بكتيريا يتكون من *Chlorella sorokiniana* و *Pseudomonas migulae* لتحلل phenanthrene تحت ظروف التمثيل الضوئي وبدون مصدر خارجي للأوكسجين (Munoz وآخرون ، 2003). تشير هذه الدراسات مجملها إلى أن الطحالب الدقيقة يمكن إستخدامها منفردة أو مع البكتيريا كمرشح محتمل للتحلل الحيوي للهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات. ومع ذلك ، هناك حاجة إلى مزيد

من البحث لتحسين كفاءتها لتطبيقها بنجاح في الإزالة الإحيائية للبيئة الملوثة بالهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات (Ghosal وآخرون، 2016).

2-3-2-1 الطحالب كمؤشرات حيوية للتلوث العضوي في المياه

تتمتع الدياتومات بميزة جيدة في تحديد جودة المياه واكتشاف التلوث في مجرى المياه ويمكن إعتدائها في تقييم المواقع العامة وتقييم جودة المياه في العديد من المواقع و تحديد كونها ممتازة أو جيدة أو ضعيفة (Torrisi وآخرون ، 2010 ؛ Marhoon وآخرون ، 2020). تم نشر قائمة تضم أكثر من 850 نوعاً من الطحالب بناءً على تقارير عدد كبير من الباحثين ووفقاً لهذه القائمة فإن العديد من أجناس الطحالب لديها أنواع تنمو جيداً في المياه التي تحتوي على تركيز عالٍ من النفايات العضوية ومن بينها الأنواع المسجلة في العديد من الدراسات فقد تم التأكيد على الطحالب الخضراء *Chlamydomonas* و *Euglena* والطحالب العصوية مثل *Diatoms* و *Navicula* و *Synedra* والطحالب الخضراء المزرقة مثل *Oscillatoria* في تحملها للتلوث العضوي (Palmer، 1969 ؛ Zahraw وآخرون ، 2018). وقد تم تأكيد دور الجنس *Navicula* sp. ليكون مؤشراً جيداً للتلوث العضوي لأن الأنواع التابعة لهذا الجنس تتواجد بشكل جيد في المناطق الأكثر تلوثاً والتي لا يمكن أن توجد فيها الأنواع الأخرى (Suphan وآخرون، 2012 ؛ Abdulwahid ، 2016).

على مستوى الأنواع تم الإبلاغ عن النوع *Euglena viridis* التابع الى صنف الطحالب اليوجلينية Euglenophyta والنوع *Nitzschia palea* التابع الى صنف الطحالب العصوية Bacillariophyta و الأنواع *Oscillatoria limosa* و *O. tenuis* و *O. princeps* التابعة الى صنف الطحالب الخضراء المزرقة Cyanophyta على انها تتواجد بشكل اكبر من أي نوع آخر في المياه الملوثة عضوياً (Palmer، 1980 ؛ Zahraw وآخرون ، 2018). وفي دراسة اجريت من قبل Zahraw وآخرون (2018) ، لتقييم نظام الإزالة لتصريف الشركة العامة لصناعة الزيوت النباتية العراقية في مدينة بغداد وجدوا ان الأنواع المهيمنة من الطحالب المتواجدة في مياه التصريف لتلك المنشأة هي 24 نوع من الطحالب العصوية Bacillariophyceae و تليه 6 أنواع من الطحالب الخضراء المزرقة Cyanophyceae ثم يليها نوع واحد من الطحالب اليوجلينية Euglenophyceae. تم إجراء العديد من هذه الدراسات لتقييم جودة المياه بناءً على

أدلة العوالق النباتية وخاصة الدياتومات (Suphan وآخرون ، 2012؛ Yung وآخرون، 2012؛ Alghanimy وآخرون ، 2015؛ Abdulwahid ، 2016؛ Ali وآخرون ، 2017؛ El-Serehy وآخرون ، 2018؛ Marhoon وآخرون ، 2020).

2-2-2-3-2 الطحالب كمؤشرات حيوية للحالة الإغذائية في المياه

هناك العديد من المؤشرات البيولوجية المختلفة التي يمكن إستخدامها لتحديد الحالة البيئية للجسم مائي مثل: اللاقاريات الكبيرة macro invertebrates ، والنباتات المائية ، والطحالب ، وخاصة الدياتومات كلها تستخدم في أبحاث جودة المياه (Torrisi وآخرون ، 2010؛ Martín و Fernández، 2012). وفي هذا الصدد تم إنشاء فهارس للدياتومات القاعية للمياه الجارية Benthic diatoms إذ أن الدياتومات القاعية أكثر موثوقية لهذا الغرض فهي تظل في موقعها ما لم تزعجها بعض الحوادث المفاجئة و هذا يعني أنها تعكس خصائص المياه في المنطقة التي تعيش فيها على العكس من ذلك فإن الدياتومات العوالق (الهائمات) Planktonic diatoms عندما تجري المياه تتحرك معها لذلك عندما يقوم الباحث بجمع الدياتومات العوالق التي نمت في اتجاه التيار قد تعكس هذه الطحالب خصائص مائية أخرى غير تلك الموجودة في موقع أخذ العينات (Werner وآخرون ، 2003؛ Martín و Fernández ، 2012). تعتمد نوعية وكمية الدياتومات على الحالة الإغذائية للنظام البيئي المائي وتستخدم هذه الطحالب كأدوات تشخيصية في الرصد الحيوي وكمؤشرات بيولوجية (Werner وآخرون ، 2003؛ Hassan و Shaawiat، 2015). وقد توصل العديد من الباحثين الى أن مكون الدياتومات وهيمنتها يعكس جودة المياه في النظم البيئية للمياه الجارية lotic ecosystems في العراق (Salman وآخرون ، 2013؛ Hassan وآخرون ، 2014؛ Hassan و Shaawiat ، 2015).

نظرًا لأن الدياتومات تستمد مغذياتها مباشرة من عمود الماء وتمتلك عمر جيل قليل بالأيام بدلاً من الأشهر أو السنوات لذلك يُعتقد أن هذه الامور قد تجعل منها أداة موثوقة لتقييم الاثراء الإغذائي utrophication في الأنهار (Holmes وآخرون ، 1999). تم تطوير مؤشرات الدياتوم لأنه وجد أنها تستجيب لتدرجات جودة المياه بما في ذلك العناصر الغذائية و تراكيز الأيونات والحمولة العضوية (Kelly وآخرون ، 1995؛ Tan وآخرون ، 2017). أظهرت الدراسة التي اجريت من قبل Tan وآخرون (2017) أن مؤشرات الدياتوم تستجيب للعوامل البيئية

القصى مثل تغيير إستخدام الأراضي والعوامل القريبة بما في ذلك جودة المياه عبر حوضين مائيين شبه استوائيين فقد وجدوا أن إداء مؤشر الدياتوم التغذوي (TDI) في جنوب شرق كوينزلاند South East Queensland و 10 مؤشرات دياتومية أخرى في أعلى نهر هان Han River كان جيداً وكان هناك أكثر من 50 % من التباين الملحوظ في مؤشرات الدياتومية من خلال المتغيرات البيئية. وقد ذكرت Bellinger و Sige (2010) أن الدياتومات تستخدم كمؤشرات حيوية وأن هذه المجموعات من الطحالب لديها القدرة على مقاومة التغيير في الظروف البيئية في الانظمة البيئية للمياه الجارية lotic ecosystem وقد استخدمت الطحالب القاعية الملتصقة على النباتات epiphytic كمؤشرات حيوية ومراقبة بيولوجية لنوعية مياه النهر (Bellinger وآخرون 2006، 2007).

2-4 تطبيقات الإزالة الإحيائية

ظهرت في السنوات الأخيرة تقنيات مختلفة لإدارة مخلفات النفط والنفايات السائلة الملوثة بالهيدروكربونات وتعتبر الإزالة الإحيائية هي واحدة من أكثر المعالجات إستخداماً على نطاق واسع بسبب انخفاض تكلفتها وكفاءتها العالية (Van Hamme وآخرون ، 2003) ، إن التحلل الحيوي للهيدروكربونات من قبل التجمعات الطبيعية للكائنات الحية الدقيقة هو العملية الرئيسية التي تعمل على تنقية البيئات الملوثة بالهيدروكربونات ولقد تمت دراسة هذه الآلية ومراجعتها على نطاق واسع (Pinzon-Martinez وآخرون ، 2010 ، Farag و Soliman ، 2011). تستخدم عملية الإزالة الإحيائية عوامل مختلفة مثل البكتيريا والخميرة والفطريات والطحالب والنباتات الراقية كأدوات رئيسية في إزالة الأنسكابات النفطية والمعادن الثقيلة الموجودة في البيئة (Bhatnagar و Kumari ، 2013).

تعرف "الإزالة الإحيائية" على أنها العملية التي تتم عن طريق عوامل بيولوجية مختلفة وفي المقام الأول الكائنات الحية الدقيقة لتحليل الملوثات البيئية وتحويلها إلى أشكال أقل سمية وتم تسجيل أول براءة اختراع لعامل إزالة بيولوجية في عام 1974 بإستخدام سلالة من بكتيريا *Pseudomonas putida* لتحطيم التلوث بالبترول (Prescott وآخرون ، 2002). لقد حددت وكالة حماية البيئة الأمريكية عوامل الإزالة الإحيائية على أنها تشمل كل من المزارع الميكروبيولوجية ، الإنزيمات ، المغذيات ، المضافات التي تزيد بشكل كبير من معدل التحلل

الحيوي للتخفيف من تأثير مختلف أنواع الملوثات البيئية (EPA ، 2002 ، Bhatnagar و Kumari ، 2013). تشمل المزايا الرئيسية للإزالة الإحيائية مقارنة بالإزالة التقليدية ما يأتي :
التكلفة المنخفضة ، الكفاءة العالية ، تقليل الحمأة sludge الكيميائية والإحيائية ، الأنثائية لمعادن محددة ، عدم الحاجة إلى مغذيات إضافية وتجديد مادة الإمتصاص الحيوي Regeneration of biosorbent وإمكانية استعادة المعادن Metal recovery (Farag و Soliman ، 2011).

يمكن أن تحدث الإزالة الإحيائية في الأنظمة البيئية من تلقاء نفسها عن طريق التوهين الطبيعي Natural attenuation و الإزالة الإحيائية الذاتية Intrinsic bioremediation أو تحفيزها بإضافة الأسمدة لتعزيز التوافر الحيوي Biostimulation وتعد عمليات : التنفيس الحيوي Bioventilation ، المفاعلات الإحيائية Bioreactor ، التعزيز الحيوي Bioaugmentation ، التسميد العضوي Composting ، زراعة الأراضي Land farming ، الإزالة النباتية Phytoremediation ، و الترشيح الجذري Rhizofiltration كلها أمثلة على تقنيات الإزالة الإحيائية (Li و Li ، 2011). وفقا لـ Nyer (1998) فإن مصطلح الإزالة الإحيائية Bioremediation يشير الى جميع التفاعلات الكيميائية الإحيائية وعمليات التوهين أو التضعيف الطبيعي Natural attenuation التي تشمل جميع العمليات الإحيائية وغير الإحيائية المستخدمة للحد من مستويات الملوثات اذ يمثل التحلل الحيوي Biodegradation الميكانيكية الاساسية للحد من الملوثات القابلة للتحلل . وإن مثل هكذا اسلوب يوفر مخاطر منخفضة ضمن المواقع الملوثة فضلا عن كونه طريقة بديلة مناسبة للحد من التلوث على صعيد التكلفة وكفاءة الإزالة (Peixoto وآخرون ، 2011).

لقد تم تحسين تقنيات الإزالة الإحيائية بعد حدوث تسرب 41 مليون لتر من البترول من ناقلة النفط Exxon Valdez في ألاسكا في عام 1989 وقد تم إنفاق أكثر من 10 ملايين دولار على الدراسات التي رعتها شركة Exxon على الإزالة الإحيائية من عام 1993 إلى عام 1997 وتم إنجاز العديد من براءات الاختراع في هذا المجال (Santos وآخرون ، 2011؛ Peixoto وآخرون ، 2011). أن الإزالة الإحيائية في المواقع الملوثة تتم عن طريق التعزيز الحيوي بإدخال أو حقن الميكروبات المحللة للملوثات الى موقع التلوث أو عن طريق اتباع نهج التحفيز الحيوي بإستخدام

العناصر الغذائية أو الظروف الملائمة لتحفيز المجتمع الميكروبي الأصيل للقيام بدوره في تحليل الملوثات ضمن موقع التلوث (Alcalde وآخرون ، 2006 ؛ Santos وآخرون ، 2011).
يضاف الى ذلك امكانية إستخدام الإنزيمات المعزولة من تلك الميكروبات بشكل مباشر بعد تنقيتها لتحويل الملوثات الى مركبات غير سامة او اقل سمية (van Hamme وآخرون ، 2003 ؛ Alcalde وآخرون ، 2006 ؛ Santos وآخرون ، 2011).

تعتمد الإزالة الإحيائية للمواقع الملوثة بالمركبات العضوية على تحفيز النشاط التقويضي للكائنات الدقيقة القادرة على إستخدام الملوثات العضوية الملوثة كمصدر للكربون والطاقة (Bosco وآخرون ، 2019). ان المجتمع الميكروبي في نظام بيئي معين أمر بالغ الأهمية لحدوث التحلل الحيوي للملوثات (Balaban وآخرون ، 2019) وفي الواقع ان التكيف البكتيري يُعرّف بأنه عملية تطورية تحدث فيها تحولات في تكوين المجتمع الميكروبي أو تحدث وفرة في الاستجابة وفقا للتغيرات في الظروف البيئية ومحتوى الملوثات ، والتي يمكن من خلالها تحسين معدل التحلل الحيوي للمادة الكيميائية الملوثة للبيئة (Rizzo وآخرون ، 2020). من ناحية أخرى لا يؤدي وجود إمكانات ميكروبية دائماً إلى تحلل حيوي في الموقع نظراً لأن العديد من القيود مثل الكتلة الإحيائية غير الكافية ، إستخدام مجموعة واسعة من الركائز ، التثبيط التنافسي competitive inhibition ، أو الكبت بالنواتج catabolite repression يمكن أن تمنع العملية برمتها (Balaban وآخرون ، 2019).

من هذا المنظور فإن تحليل وتوصيف الكائنات الحية الدقيقة المشاركة في عمليات التحلل الحيوي لهما أهمية قصوى لتحقيق النجاح النهائي للإزالة الإحيائية وعلاوة على ذلك من الضروري معرفة الخصائص الجيولوجية والهيدروجيولوجية والجيوكيميائية للبيئة التي تعيش فيها تلك الكائنات الحية ، لأن العديد من العوامل الأخرى قد تؤثر على أنشطتها (Chandra وآخرون ، 2013؛ Varjani ، 2017). وفي دراسة حديثة أجريت من قبل Rizzo وآخرون (2020) كان الهدف الرئيسي منها هو تحليل المجتمعات الميكروبية في التربة والينابيع والمياه الجوفية من موقع دراسة في جنوب إيطاليا والذي يتميز بوجود الهيدروكربونات ذات الأصل الطبيعي تمكنوا من الكشف عن هيمنة أنواع الشعبة البكتيرية *Proteobacteria* في تلك البيئة وأيضاً تم الكشف عن وجود مؤكسد هيدروكربوني أصلي من الكائنات الدقيقة التابعة لشعبة أخرى كأنواع من جنس

Flavobacterium و *Gordonia* وتمكنوا كذلك من عزل وتحديد 11 سلالة من بكتريا *Proteobacteria* مؤكسدة للهيدروكربون وقد مهدت نتائجهم الطريق لمزيد من التحقيقات في مجال (1) استغلال كل من قدرة التحليل للعزلات البكتيرية و / أو الاتحادات للتجمعات الميكروبية لإزالة المواقع الملوثة بالهيدروكربونات و (2) القدرة على إنتاج جزيئات ذات تأثير معزز لاسترداد restoration مكونات الزيت الملوثة .

يعتمد نجاح عملية التعزيز الحيوي على القدرة التنافسية للسلالات الملقحة في البيئات المختلفة (Alcalde وآخرون ، 2006). كذلك فإن هناك معوقات لإستخدام الكائنات المحورة وراثيا Genetically modified organisms (GMOs) لتحسين كفاءة تحليل البترول فيما يتعلق بالتشريعات البيئية الدولية (Rizzo وآخرون ، 2020 ؛ Alcalde وآخرون ، 2006) وفي كلتا الحالتين سواء إستخدام السلالات من النوع البري Wild-type strains أو الكائنات المحورة وراثيا لابد من الانتباه الى تقييم الاثار المحتملة من ادخال تلك الكائنات الدقيقة المحللة بوجود الميكروبات الاصلية Indigenous microbes في موقع التلوث (Santos وآخرون، 2011). اما فيما يتعلق بأسلوب التحفيز الحيوي فإنه من المفيد ان يطبق فقط على البيئات التي توجد فيها الكائنات الحية الدقيقة المحللة للبترول بشكل طبيعي Indigenous microorganisms ، لذلك فان البحث عن استراتيجيات علاج بيولوجي بديلة أمر بالغ الأهمية لزيادة فعاليتها في مواقع التلوث المختلفة (Peixoto وآخرون ، 2011).

لماذا إستخدام الإزالة الإحيائية كأداة في البيئة الملوثة بالهيدروكربونات البترولية:

(1) الإزالة الإحيائية هي نهج صديق للبيئة وبالتالي فهو مقبول من قبل الجمهور كعلاج في إزالة الملوثات.

(2) الإزالة الإحيائية أقل تكلفة مقارنة بالتقنيات التقليدية الأخرى (ردم الأرض land filling أو الحرق incineration).

(3) يمكن إجراء الإزالة الإحيائية في الموقع ويكون اضطراب الموقع في حده الأدنى.

(4) يقضي على النفايات ويقضي أيضاً على فرصة المسؤولية المستقبلية المرتبطة بإزالة المواد الملوثة والتخلص منها. (Singh و Chandra ، 2014).

2-5 عوامل الإزالة الإحيائية للملوثات النفطية

2-5-1 الكائنات الحية الدقيقة التي تستخدم النفط (الوفرة والتنوع)

ان الكائنات الدقيقة المفككة للهيدروكربونات Hydrocarbonoclastic هي العوامل الرئيسية لتحليل الهيدروكربونات البترولية بسبب قدراتها الأيضية المرتبطة بذلك الامر وقد أكدت الدراسات حول تحليل الهيدروكربونات النفطية أن العديد من الميكروبات (البكتيريا والفطريات بشكل أساسي) قادرة على تحليل الهيدروكربونات البترولية وإستخدامها كمصدر وحيد للكربون لعملية التمثيل الغذائي والطاقة وأن البكتيريا هي أكثر العوامل المحللة للبتروك نشاطاً وهي تعمل كمواد تحليل أولية لمجموعة واسعة من المكونات المستهدفة الموجودة في التربة والمياه والحمأة (Varjani و Upasani، 2016). تم الإبلاغ عن الكائنات الحية التي تنتمي إلى أجناس مختلفة على أنها مفككة هيدروكربونية تُظهر إمكانية تحليل أجزاء مختلفة من الهيدروكربونات النفطية إذ تم عزل العديد من هذه الكائنات الحية من التربة أو طبقات المياه الجوفية وتشمل المجموعات البكتيرية النموذجية: *Mycobacterium spp.* و *Arthrobacter spp.* و *Marinobacter spp.* و *Achromobacter spp.* و *Alcaligene spp.* و *Corynebacterium spp.* و *Flavobacter spp.* و *Micrococcus spp.* و *Nocardia spp.* و *Pseudomonas spp.* و *Koshlaf و Ball، 2017).*

ان العديد من الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتيريا و البكتيريا الخضراء المزرقة و الطحالب الخضراء ، والفطريات لها القدرة على تحليل مختلف المكونات النفطية تحت ظروف بيئية مختلفة والسبب في قدرتها على ذلك هو من خلال ما توفره من الإنزيمات اللازمة لتحليل المكونات النفطية فالتحلل النفطي يتم تدريجيا عن طريق الايض المتسلسل لمركباته ويمكن أن تكون ألبينات المسؤولة عن إنتاج الإنزيمات التي تحلل النفط موجودة على الحمض النووي الكروموسومي أو البلازميد (Peixoto وآخرون، 2011).

تتضمن الإزالة الإحيائية إستخدام العديد من الكائنات الحية الدقيقة أو النباتات لإزالة البيئة الملوثة بالجزئيات العضوية التي يمكن أن تكون حية أو غير حية أو طبيعية أو معدلة وراثيًا فمن الصعب للغاية كسر أو تخفيف جزئيات المعادن الثقيلة السامة عن طريق تحويلها إلى

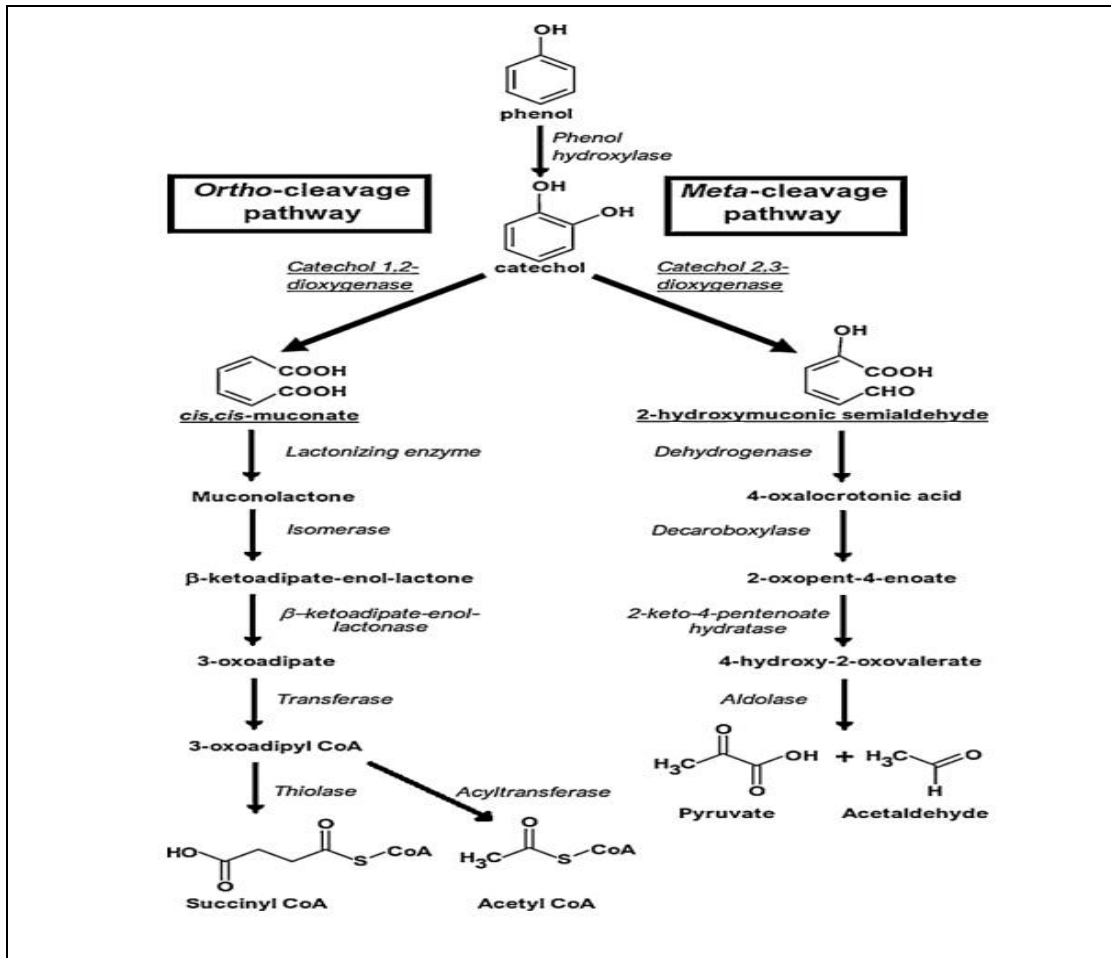
منتجات غير ضارة (Li و Li ، 2011). تم دراسة مجموعة واسعة من الكائنات الحية الدقيقة (البكتيريا ، والبكتيريا الأثرية ، والخمائر ، والفطريات ، والطحالب) والنباتات لإستخدامها في عمليات الإزالة الإحيائية كمواد ممتزة biosorbents للعديد من الملوثات (Bhatnagar و Kumari ، 2013). ولقد وصف (Dubey وآخرون ، 2011 ؛ Brahmbhatt وآخرون ، 2012) تطبيق الإزالة الإحيائية بإستخدام الكائنات الحية الدقيقة في المواقع الملوثة بالأنسكابات النفطية بإستغلال القدرة التقويضية لتغذية الكائنات الحية الدقيقة على الزيت. واستخدمت أنواع مختلفة من اجناس الخميرة مثل *Candida* و *Clavispora* و *Debaryomyces* و *Leucosporidium* و *Pichia* و *Rhodospiridium* و *Rhodotorula* و *Sporidiobolus* و *Sporobolomyces* و *Stephanoascus* و *Trichosporon* و *Yarrowia* في عملية الإزالة الإحيائية وظهرت بوضوح خصائص التحلل الحيوي للملوثات البترولية (Csutak وآخرون ، 2010 ؛ Bhatnagar و Kumari ، 2013).

2-5-2 الإنزيمات المحللة للملوثات الهيدروكربونية العطرية

يتحقق التحفيز على تحليل الملوثات الهيدروكربونية العطرية من خلال إنزيمات مختلفة فعلى سبيل المثال يتم عن طريق إدخال الأوكسجين الجزيئي إلى الركيزة (المحفزة بإنزيمات oxygenases) ، أو إضافة مجموعتين من الهيدروكسيل (المحفزة بإنزيمات dioxygenases) أو إضافة ذرة واحدة من الأوكسجين إلى الهيدروكربون (المحفزة بإنزيمات monooxygenases) (Wentzel وآخرون ، 2007). ويتم التنشيط من خلال آليتين مختلفتين هوائية أو لاهوائية فمن الناحية الهوائية يتم إستخدام الأوكسجين كمستقبل إلكتروني ويحدث التقويض اللاهوائي بمعدلات أبطأ مقارنة بالتحلل الميكروبي الهوائي (Koshlaf و Ball ، 2017).

يتم تحفيز وتخليق الإنزيمات الرئيسية المحللة للركائز الاروماتية بكميات كبيرة وملائمة فقط عند تواجد تلك الركائز او مايمثلها تركيبيا ويبين الشكل 2-3 مسارات انشقاق حلقة الفينول بالتحلل الاوكسجيني وتكوين المركبات الوسطية من خلال مسار الايض المركزي وفي نقطة تفرع عند تكوين مركب الكاتيكول catechol اما ان يتأكسد بالانشقاق intradiol o-cleavage او الانشقاق extradiol m-cleavage . وكلا التفاعلين لأنشقاق الحلقة تتم من خلال تحفيز إنزيمات الاكسدة المتخصصة في هذا المجال specific dioxygenases . ان ناتج مسار

الأنشقاق الحلقي *o*-cleavage هو المركب *cis, cis*-muconate الذي يتحول فيما بعد الى مركب غير مستقر هو enollactone والذي بدوره يتحلل مائياً الى المركب oxoadipate وهو حامض ثنائي مجموعة الكربوكسيل يتأكسد أيضاً ليكون succinate و acetyl-CoA (Olajire و Essien، 2014). اما بالنسبة لمسار الأنشقاق *m*-cleavage extradiol والذي يتم استقلابه بواسطة إنزيمات التحلل المائي لتكوين acetaldehyde و pyruvate وكما هو مبين في الشكل (2-3) والتي يعاد الانتقاع منها فيما بعد ضمن مسار الايض المركزي (Hupert-Kocurek وآخرون ، 2012؛ Olajire و Essien، 2014). ان أنواع الخمائر التي تسمى *Geotrichum sp* ، *Rhodotorula mucilaginosa* ، *Candida lipolytica* ، *Trichosporon mucoides* والتي تم عزلها من المياه الملوثة اظهرت امكانية تحليلها للمركبات النفطية (Kumari و Abraham ، 2011 ؛ Olajire و Essien، 2014).



الشكل 2-3: مخططات المسارات ortho-cleavage و meta-cleavage لاستقلاب الفينول ومشتقاته بفعل الكائنات الحية الدقيقة المحللة (Paisio وآخرون ، 2014).

على مدى العقود الماضية تمت دراسة الإنزيمات catechol 1,2-dioxygenases و catechol 2,3-dioxygenases على نطاق واسع لدورها الرئيسي في انقسام الحلقة العطرية للكاتيكول ويلعب الأنزيم catechol 1,2-dioxygenases دوراً مهماً في مسارات التحلل للمركبات العطرية المختلفة وهو موجود بشكل واسع في الكائنات الحية الدقيقة (Filipowicz وآخرون، 2020). إن هذه الإنزيمات نشطة أيضاً في بعض السلالات البكتيرية التي تعود لجنس *Acinetobacter* و *Arthrobacter* و *Pseudomonas* و *Sphingomonas* و *Geobacillus* و *Rhodococcus* (Kalediene و Giedraityte، 2009). وفي حالة الخمائر تم العثور على نشاط إنزيمات dioxygenases في المبيضات *Candida tropicalis* (Long وآخرون، 2016)، *Candida albicans* (Tsai وآخرون، 2005) و *Trichosporon cutaneum* (Aleksieva وآخرون، 2002). تجدر الإشارة إلى أن Margesin وآخرون (2005)؛ Margesin وآخرون (2003) تمكنوا من عزل وتمييز الخميرة المحللة للفينول والمتكيفة مع البرودة مع النشاط الأنزيمي C12O من منطقة جبال الألب الجليدية والهيدروكربونات البترولية المحتوية على تربة جبال الألب في النمسا على التوالي ومع ذلك حتى الآن نادراً ما يتم اكتشاف نشاط الكاتيكول 2,3-dioxygenases بين الخمائر. ومن المثير للاهتمام أنه تم تأكيد نشاط C23O في سلالة الخميرة المتكيفة مع البرودة والتي تنتمي إلى *Rhodotorula* sp. المعزولة عن جبال الألب الجليدية (Margesin وآخرون، 2003).

تشير الدراسات حول استقلاب الفينول قد أجريت بشكل أساسي للبكتيريا. ومن ثم فإن المعلومات المتعلقة بدراسة الأنشطة الأنزيمية لأنزيمات catechol 1,2-dioxygenases و catechol 2,3-dioxygenases المشاركة في استقلاب الفينول والتحقيق في منتجاتها بين سلالات الخميرة محدودة نوعاً ما و على الرغم من ذلك استخدم باحثون طريقتين أو نهجين مختلفتين للتحقيق في نشاط هذه الإنزيمات بين سلالات الخميرة يركز النهج الأول على فحص الأنشطة الأنزيمية للخميرة النقية أو المشوبة recombinant yeast لأنزيمات catechol dioxygenases (Giedraityte و Kalediene، 2009؛ Filipowicz وآخرون، 2020). بينما يركز النهج الثاني على تحديد أي من أنشطة إنزيمات catechol dioxygenases المحتملة موجودة في سلالات الخميرة التي تم فحصها ومع ذلك في النهج الثاني لم يتم فحص النشاط الأنزيمي لأنزيمات معينة أو تركيز منتجات التحلل الحيوي (Margesin وآخرون، 2003؛

Margesin وآخرون، 2005). وفي دراسة حديثة أجريت من قبل Filipowicz وآخرون (2020) جمعوا من خلالها بين هذين النهجين من خلال تحديد أيًا من الأنشطة الأنزيمية المذكورة أعلاه موجود في سلالات الخميرة التي تم اختبارها مما سمح لهم بتشخيص مسار استقلاب الفينول من خلال تحديد نواتج النشاط الأنزيمي للأنزيمين C12O و C23O في مزارع الخميرة أي المركبين *cis,cis*-muconic acid و 2-hydroxymuconic semialdehyde على الترتيب.

وفي دراسة أخرى أجريت من قبل Tsai و Li (2007) تم تنقية الأنزيم catechol 1,2-dioxygenase من *Candida albicans* TL3 وهي من الكائنات حقيقية النواة وتعود إلى المبيضات التي تمتلك قدرة عالية على التحمل للفينول ولها نشاط قوي في تحليل الفينول تم خلال تلك الدراسة تنقية الأنزيم إلى درجة التجانس homogeneity ووجد أن الأنزيم ثنائي الوحدات المتماثلة homodimer بوزن جزيئي للوحدة الفرعية يبلغ 32000 دالتون وكل وحدة فرعية هي أحادية الحديد وكانت درجة الحرارة المثلى ودرجة الحموضة 25 درجة مئوية و 8.0 على التوالي وقد أظهر تحليل الركيزة أن الأنزيم المنقى كان C12O.

2-6 تقنيات الإزالة الإحيائية

2-6-1 إختيار الخمائر الواعدة في الإزالة الإحيائية

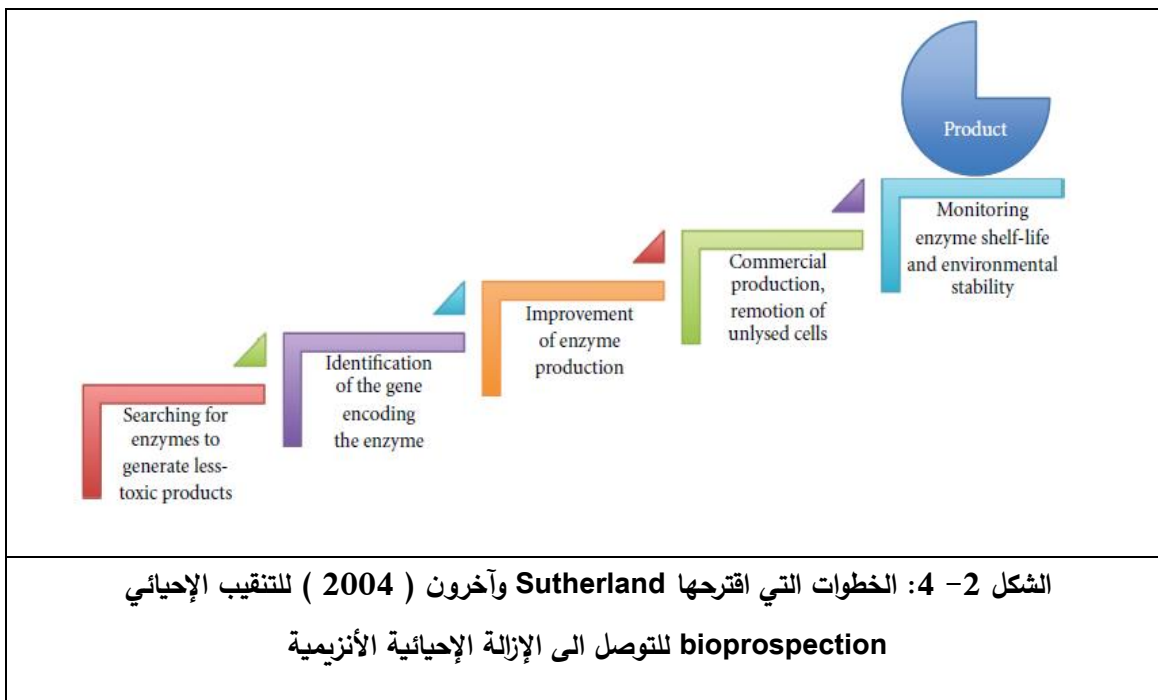
إن إختيار الخمائر التي يُقصد بها أن تكون بداية وظيفية للإزالة الإحيائية للمياه الملوثة بالنفط عملية معقدة تتطوي على خطوات مختلفة ويجب ان تقترح مخطط محتمل على وجه التحديد فبعد عزل سلالات الخمائر يجب تمييز الخمائر وتحديدتها أو تشخيصها و بعد ذلك يمكن دراسة بعض العزلات الواعدة فيما يتعلق بخصائصها الوظيفية كإزالة الفينول (Taccari و Ciani، 2011؛ Bevilacqua وآخرون، 2012). ويمكن إستخدام نهج متعدد المتغيرات لإختيار افضل السلالات في ظل الظروف المختبرية يتضمن عزل وتشخيص الخمائر، التوصيف التكنولوجي (متطلبات والصفات الأنزيمية)، التوصيف الوظيفي كإزالة الفينول أو تقليل نسبة BOD/COD أو إزالة اللون من المياه العادمة، إختيار السلالات الواعدة والتحقق من صحتها (Sinigaglia وآخرون 2010؛ Bevilacqua وآخرون، 2012). ومن إهم المتغيرات التي يجب تقييمها عند إختيار السلالات الواعدة من الخمائر هي :

- (1) استخدام عوامل مساعدة coadjutants: تم الإبلاغ عن إمكانية تعزيز التمثيل الغذائي للخميرة بإضافة بعض المكونات على سبيل المثال اقترح Sinigaglia وآخرون (2010) استخدام كبريتات الامونيوم $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ بمعدل 1.5 - 6.0 غم.لتر⁻¹.
- (2) درجة الحرارة والتحرك: اقترح Taccari و Ciani (2011) ، أسلوب إزالة حيوية مع التحريك 100 - 150 دورة في الدقيقة وعند درجات حرارة عالية نسبياً لزيادة إنتاجية العملية.
- (3) حالة الخلايا (حرة أو مقيدة في المفاعل الحيوي): يمكن إزالة الملوثات من المياه العادمة بواسطة الخلايا الحرة أو باستخدام الطريقة التي اقترحها Ettayebi وآخرون (2003) إذ قاموا بتقييد سلالة من *Geotrichum candidum* على حبيبات ألجينات الصوديوم Na-alginate وتمكنوا من زيادة نسبة إزالة الملوث بمقدار 2-2.2 ضعف.
- (4) عامل التخفيف: تم اقتراح تخفيف 10 أضعاف لزيادة معدلات الإزالة الإحيائية الفطرية بواسطة *Aspergillus Goii* و *A. niger* و *Pleurotus ostreatus* (Afify وآخرون ، 2009). وتم تأكيد استخدام عامل تخفيف 3 أضعاف لمعالجة المياه العادمة لمطحنة الزيتون (Bevilacqua وآخرون ، 2012).
- (5) نوع العملية (الهوائية أو اللاهوائية): يمكن أن يؤدي استخدام الإزالة الإحيائية الهوائية إلى زيادة العائد باستخدام *G. candidum* لتقليل محتوى COD والأحماض الفينولية والدهنية إذ لوحظ زيادة نفاذ الركيزة أثناء الإزالة الهوائية (Martin وآخرون ، 1993).

2-6-2 إختيار الإنزيمات الواعدة في الإزالة الإحيائية

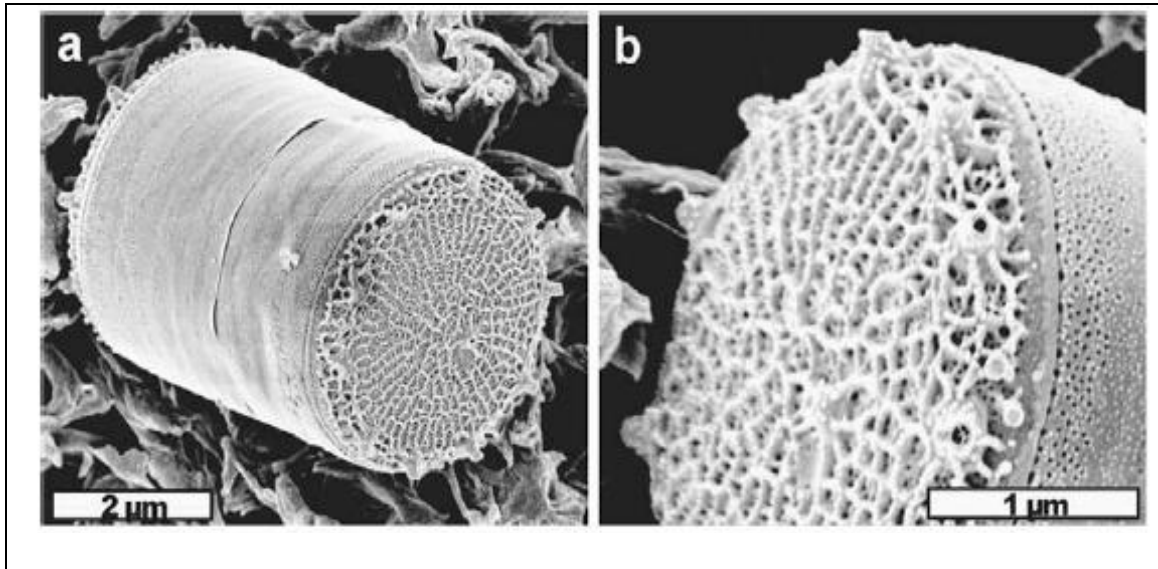
يمكن توضيح بعض المزايا في جانب الإزالة الإحيائية الأنزيمية منها إمكانية زيادة القدرة الأنزيمية في الظروف المختبرية (Sutherland وآخرون ، 2004) كذلك فإن استخدام الإنزيمات المعزولة لا يولد نواتج ثانوية سامة (Peixoto وآخرون ، 2011) فضلا على أن القدرة التنافسية الخلوية سوف لن تكون ضرورية أو ملحة (Alcalde وآخرون ، 2006). لخص Sutherland وآخرون (2004) الجوانب الرئيسة التي يجب مراعاتها من التنقيب إلى الإنتاج في جانب الإزالة الإحيائية الأنزيمية بمايلي:

- 1- يجب ان يكون الأنزيم الذي تم اختياره لتطبيق الإزالة الإحيائية له القدرة على تحليل الملوثات المستهدفة بإقل مقدار من النواتج السمية و لا يعتمد على العوامل المساعدة Cofactors في عمله مما يزيد تكاليف العملية على المستوى التجاري.
 - 2- تحديد الجين المشفر للأنزيم الذي وقع الاختيار عليه ، واذا لزم الامر محاولة تحسين الإنتاجية الأنزيمية لذلك الأنزيم .
 - 3- تنتج الشركات التجارية إنزيماتها عن طريق التخمير الصناعي على نطاق واسع ؛ وتتم إزالة الخلايا غير المرغوب فيها أثناء الإزالة النهائية.
 - 4- إن عملية تنقية الأنزيم Purification of enzymes من المواد الاخرى القابلة للذوبان في سائل التخمير Fermented liquor ليست مطلوبة من أجل الإزالة البيئية وهو الامر الذي يسهل من عملية الإنتاج وخفض التكاليف.
 - 5- يجب تقييم العمر الافتراضي Shelf-life والاستقرار البيئي Environmental stability للأنزيم الذي تم اختياره لضمان فعالية الأنزيم ضد الملوثات المستهدفة .
- ويمكن استقراء الخطوات والإعتبرات التي حددها Sutherland وآخرون (2004) للإزالة الإحيائية الإنزيمية لأي ملوث من خلال الشكل 2-4.



2-6-3 خصائص الدياتومات في التطبيقات الإحيائية

الدياتومات طحالب أحادية الخلية واسعة الانتشار تعود الى شعبة الطحالب الذهبية Chrysophyta صنف الطحالب العصوية Bacillariophyceae و التي تضم رتبتين هما جانبية التناظر (الريشية) Pennales وشعاعية التناظر (المركزية) Centrales (Patrick و Reimer، 1975 ؛ Hinton و Maulood، 1980) . وهي قادرة على القيام بعملية البناء الضوئي وبإمكانها ترسيب جدار خلوي سلكوني بترتيب عالي الدقة وفريد من نوعه يدعى الجب Frustule و تتصف بهياكل ذات مسامات مايكروية- نانوية Micro-Nano porous وكما هو مبين في الشكل 2-5 مما يساهم في زيادة المساحة السطحية للجدار مع امكانية تحويلها بسهولة وتعطي مقاومة ميكانيكية عالية للجدار (Medarevic وآخرون ، 2016).



الشكل 2-5: التصوير بالمجهر الالكتروني الماسح SEM للدياتوم *T. pseudonana* (a) بنية الخلية بأكملها ، و (b) لقطة مقربة لسطح الصمام. (Hildebrand وآخرون ، 2018)

لقد لوحظت أنواع من الدياتومات ذات هياكل غطائية بخصوصية عالية والتي تم حفظها من جيل إلى آخر وقد تلقى موضوع تخليقها الحيوي وتطبيقاتها إهتمام خاص خلال العقود الاخيرة خاصة في المجال المتنامي لعلم النانو Nanoscience والتقنيات النانوية Nanotechnology (Sheppard وآخرون ، 2010 ؛ Medarevic وآخرون ، 2016). إن العدد الكبير من المسامات ذات الحجم المايكروية و النانوية مع وجود السليكون النانوي أعطى غطاء الدياتوم

مساحة سطحية عالية ومسامية أمكن إستغلالها للعديد من التطبيقات الإحيائية مثل: الفصل الجزيئي ، النقل الدوائي Drug deliver ، تقييد الجزيئات Immobilization molecules ، الاستشعار الغازي والحيوي Bio and gas sensing (Bayramoglu وآخرون ، 2013 ؛ Medarevic وآخرون ، 2016). إن جب الدايتوم يتألف بشكل رئيسي من مكونات غير عضوية (السليكا الغير متبلورة) واخرى عضوية (الببتيدات ، البروتينات ، البروتينات السكرية او الكلايكلية ، وسلسلة طويلة من عديد الامينات) (Bayramoglu وآخرون ، 2013).

إن نمو الدياتومات مسؤول عن حوالي 25% من إنتاج الغذاء الأولي العالمي (Neville وآخرون ، 2011). وعلى الرغم من وجود الدياتومات بكثرة في جميع المسطحات المائية المفتوحة إلا أن إستزاعها عمل شاق بسبب عوامل مختلفة مثل الصمغ اللزج sticky mucilage الذي تنتجه الدياتومات والذي يوفر وسطاً جيداً لنمو البكتيريا والحساسية المنخفضة للمضادات الإحيائية بالنسبة للبكتيريا التي تلوث مزارع الدايتومات وضعف قابلية بقاء الدياتومات بعد التطهير البكتيري ولقد أتبعت إجراءات متنوعة منها فيزيائية وكيميائية (المعاملة بالموجات فوق الصوتية أو الطرد المركزي ، المعاملة بالمضادات الإحيائية للحصول على المزارع الاحادية axenic cultures النقية وعزل الدايتومات الفردية للمزارع أحادية النسيلة monoclonal culturing) (Gautam وآخرون ، 2016).

تعتبر اللدونة الفسيولوجية physiological plasticity للدياتومات تجاه العوامل البيئية مثل درجة الحرارة والملوحة وشدة الضوء وتراكيز العناصر الغذائية هي مفاتيح قدرتها على البقاء والنمو في أنواع مختلفة من البيئات (Ramirez وآخرون ، 2015). ومن المهم وبشكل خاص توافر تراكيز السيليكات (المغذيات الكبيرة) والسيليونيوم (المغذيات الدقيقة) في وسط المزرعة للدياتومات إذ تعد السيليكات ضرورية كمكونات لجدار الخلية وكمنظم إستقلابي في غيابه يتم إعاقة تخليق البروتينات والحمض النووي والكلوروفيل والكاروتين ويتم تقليل البناء الضوئي والتحلل السكري glycolysis (Poulsen و Kro"ger ، 2004).

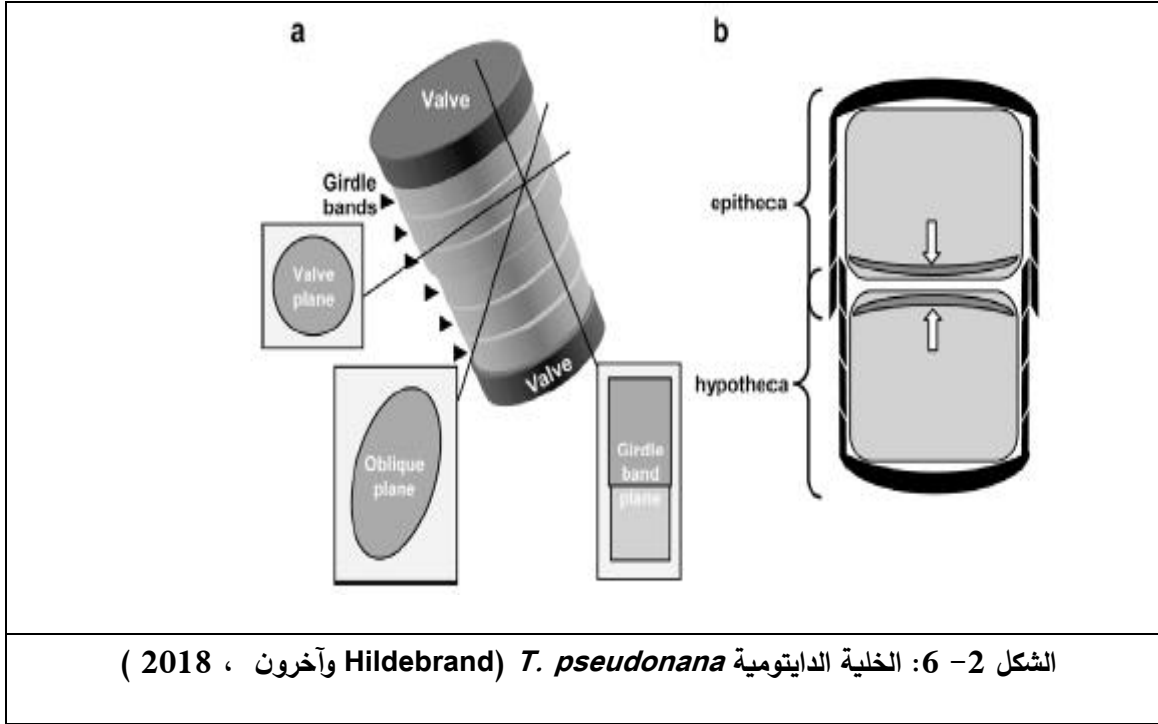
منذ ما يقارب 50 عام مضت تم التعرف على ان تكوين الجب الدايتومي يحدث داخل

عضيات غشائية مطمورة تدعى حويصلات ترسيب السليكا Silica Deposition Vesicles SDV وبعد اكتمال تكوين السليكا يتم ترسيبها على سطح خلية الدايتوم من خلال الطرد الخلوي

لمحتويات الحويصلة المرسبة للسيليكا SDV (Medarevic وآخرون، 2016). وقد شخّصت لحد الآن ثلاث مجاميع من الجزيئات العضوية تشارك في تكوين جب الدايتوم وهي : silaffin ، silacidins ، وسلسلة طويلة من عديد الامينات (LCPAs) (Neville وآخرون، 2011). أما مجاميع المكونات العضوية الأخرى التي تم تشخيصها فهي لا تشارك في عملية التخليق الحيوي للسيليكا بل تساهم في منع تحلل السيليكا في البيئة المائية (Lim وآخرون، 2015).

إن فهم اليات التخليق الحيوي للسيليكا مع الخرائط الجينومية الحديثة لنوعين من الدايتومات *Thalassiosira pseudonana* و *Phaeodactylum tricornutum* (Sheppard وآخرون، 2010) له أهميه خاصة في تطوير الاجهزة الطبية الإحيائية من خلال الدايتومات. فضلا عن ذلك وجود مجموعات سيلانول Silanol groups الفعالة التي تغطي السطح وتمكنه وظيفياً للإرتباط مع مجاميع كيميائية مختلفة فتعطي فرصاً كبيرة لضبط الخصائص الفيزيائية والكيميائية لجب الدايتومات للحصول على الخصائص المطلوبة للتطبيق الحيوي (Medarevic وآخرون، 2016).

ينقسم الهيكل النانوي للدايتوم إلى نصفين متساويين تقريباً يتناسبان معاً fit together تماماً مثل طبق البتري وكما هو مبين في الشكل 2-6 أحدهما يدعى epitheca يتداخل مع الآخر الذي يدعى hypotheca مثل غطاء صندوق مرتبط بأشرطة متصلة معاً على شكل حزام girdle مصنوع أيضاً من أكاسيد السيليكون غير المتبلورة (Mazumder وآخرون، 2014). وفي أثناء تكاثر الدايتومات ، يتم انفصال نصفي جب الدايتوم ويتم تخليق الصمامات والاحزمة الجديدة داخل الخلايا intracellular ضمن عضيات متخصصة تسمى حويصلات ترسيب السيليكا SDVs (Poulsen و Kroger، 2004). ونظراً لأن هذه المواد ذات البنية النانوية ثلاثية الأبعاد المُصنَّعة بشكل طبيعي هي نتيجة لعمليات خلوية معقدة يتم التحكم فيها وراثياً فهي مرتبة ومستقرة بدرجة عالية ولها أهمية كبيرة في الأبحاث لخصائصها الميكانيكية والضوئية والإلكترونية واعتماداً على أنواع الدايتومات وظروف النمو يمكن أن تظهر جيب الدايتومات مجموعة واسعة من الأشكال (Medarevic وآخرون، 2016).

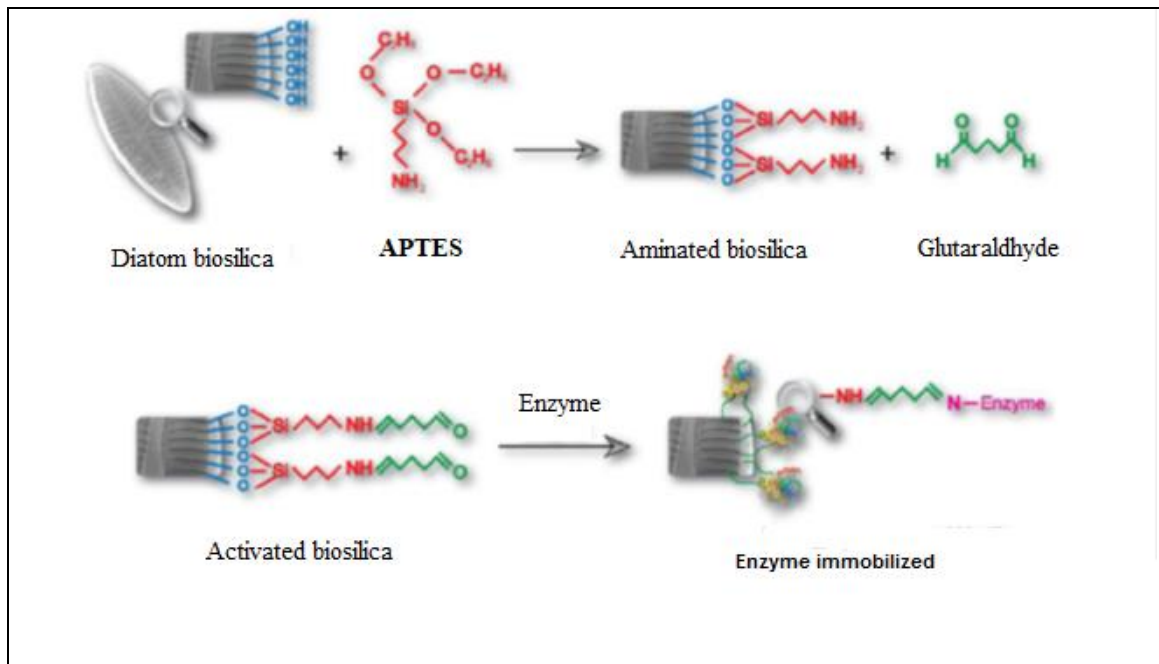


2-6-4 تقييد الجزيئات الحيوية في سيليكات الدايتوم

إن المساحة السطحية العالية والمتخصصة لغمد الدايتوم و مجاميع السيلانول على السطح الدايتومي ، المسامية العالية ونفاذية المسام جعلتها مناسبة بشكل خاص لتقييد الجزيئات الكبيرة . وعلى الرغم من ان ادمصاص البروتين البسيط على غمد الدايتوم يبدو كوسيلة سهلة إلا أن العديد من العوامل ممكن أن تؤثر في كمية البروتين المدمص مما يشكل عائقا لتحسين تلك العملية (Medarevic وآخرون ، 2016) . في دراسة أجريت من قبل Lim وآخرون (2015) أظهرت إختلافات ملحوظة في قدرة إدمصاص البروتين بين دايتومات مختارة من الرتبة الشعاعية التناظر Centric diatom والرتبة جانبية التناظر Pennate diatom وجدوا أن إدمصاص البروتين على هياكل الدايتوم السليكاتية يتأثر بمساحة السطح وحجم المسام والكيمياء السطحية لسيليكات الدايتوم وكذلك درجة حموضة محلول البروتين وكانت آلية الإدمصاص المهيمنة هي الإمتزاز الكيميائي Chemisorption (الترابط الهيدروجيني بين مجموعة الهيدروكسيل ضمن سيليكات الدايتوم والمجموعات الأمينية أو مجموعات الكربوكسيل ضمن البروتينات) وهو أمر مرغوب فيه لأن الإمتزاز الفيزيائي Physisorption يمكن أن يسبب تمسخ البروتين. وتحرى Wang وآخرون (2012) عن تجمع أنواع مختلفة من الجسيمات مثل البروتينات، الجسيمات الشحمية وجزيئات

الكربون بعد التبخير على غمد الدايتوم ووجدوا أن العامل الرئيسي لتجميع الجسيمات هو المساحة السطحية الكبيرة لغمد الدايتوم وقد أكد ذلك عدم وجود بروتين متجمع على الغمد المطلي بالحديد المرتبط مع مجموعة الكربونيل ضمن مساحة سطحية قليلة بشكل ملحوظ.

لقد تم الإبلاغ عن عدد قليل من الطرائق لتقييد الأنزيم على السيليكا الإحيائية للدايتوم وإستخدامها كدعامة لتقييد الإنزيمات ويمكن تفضيل السيليكا الإحيائية على المواد الأخرى بسبب مزاياها المختلفة مثل الأصل الطبيعي ، غير السامة ، التكلفة المنخفضة ، ووجود مجموعات الهيدروكسيل وهذه الأمور مهمة للغاية لأن إستخدام البوليمرات ذات الأصل البترولي كدعامات تقييد أمر لا يحبذ لكونها سامة في الغالب مما يجعلها سبباً رئيساً للتلوث (Poulsen وآخرون ، 2007) . إن تحويل السيليكا الإحيائية للدايتوم المعاملة مسبقاً بالحامض والبلازما بإستخدام 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) تؤدي الى التنشيط الوظيفي لمجاميع الامين NH_2 على السيليكا الإحيائية لتتفاعل مع الكلوتارالديهيد وبالتالي تزويد مواقع تفاعلية لتقييد الإنزيم إذ يعتبر الكلوتارالديهيد عامل ربط متقاطع ثنائي الوظيفة شائع لتقييد الإنزيمات على الدعائم المنشطة أمينياً (تحتوي مجاميع امين فعالة ونشطة وظيفياً) وهذه التقنية متعددة الإستخدامات وتستخدم بنجاح لتقييد الإنزيمات على المواد المختلفة (Barbosa وآخرون، 2012 Bayramoglu وآخرون ، 2013) ويمكن توضيح هذه التقنية كما هو مبين في الشكل 2-7.



الشكل 2-7: كيميائية التحويل لسطح السيليكا الحيوية (Bayramoglu وآخرون ، 2013).

في دراسة أجريت من قبل Bayramoglu وآخرون (2013) تم تطبيق تقنية التقييد لأنزيم التايروسينيز Tyrosinase بنجاح على جسيمات السيليكا الإحيائية للدايتوم من خلال تحويلها بمعاملتها بمادة 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) ومن ثم تنشيطها باستخدام الكلوتارالديهايد ولوحظ إن تقييد إنزيم التايروسينيز على السيليكا الإحيائية للدايتوم عزز كل من الاستقرار الحراري والخزني للأنزيم مقارنة مع الصورة الحرة للأنزيم في حين فقد التايروسينيز الحر كامل نشاطه خلال 5 أسابيع تخزين وفي 4 درجات مئوية ضمن دارئ الفوسفات بتركيز 0.1 مولار و pH: 7.0 أما إنزيم التايروسينيز المقيد فإنه فقد حوالي 33 % من نشاطه خلال تخزين لمدة 8 أسابيع وعلى الرغم من أن عملية التقييد قللت من نشاط الأنزيم وافتته للمادة الأساس فقد أظهر إنزيم التايروسينيز المقيد فعالية أعلى حتى في إزالة الفينول، الباراكريسول وأستات الفينيل خلال 12 ساعة بالمقارنة مع فعالية الأنزيم الحر و إن الإنزيمات المقيدة يمكن فصلها بسهولة من المحلول المحيط بها ومن ثم إعادة استخدامها عدة مرات إن تقنية التقييد على السيليكا الإحيائية للدايتوم تبدو تقنية واعدة لتصنيع المفاعلات الإحيائية منخفضة التكلفة لإزالة المياه العادمة (Goldhahn وآخرون، 2020).

2-6-5 تقنية تقييد الإنزيمات

تعمل الإنزيمات بشكل طبيعي كمحفزات متجانسة في المحاليل المائية إلا أن استخدامها المخمرات بنظام الدفعات يحمل بعض العيوب منها أن تكون إزالة الإنزيمات بعد الإنتاج صعبة لأنها تذوب في محلول التفاعل و غالبًا ما يتم استخدام الإنزيمات فقط لمرة واحدة وتبقى كشوائب في منتج التفاعل و تعتبر المخمرات بنظام الدفعات أقل إنتاجية من طرائق المخمرات المستمرة (Yigitoglu و Temocin، 2010). يستخدم التقييد الأنزيمي على دعائم صلبة على نطاق واسع للتغلب على تلك المشاكل إذ يسمح التقييد الأنزيمي بفصل أبسط للمحفز الحيوي (الأنزيم) عن محلول التفاعل لأنه يحول الطبيعة المتجانسة لجزيئات الأنزيم المذاب إلى نظام غير متجانس (Goldhahn وآخرون، 2020) وبالتالي يمكن فصل الهجينة النانوية المقيدة للأنزيم عن محلول التفاعل من خلال التقنيات المعروفة مثل الترشيح أو النذب المركزي.

يؤدي تقييد الإنزيمات الموجودة فيها أو على المواد العضوية أو غير العضوية الصلبة إلى حل مشكلة إعادة الاستخدام reusability وفي بعض الحالات يمكن أن يعزز استقرار الأنزيم

من خلال تقييده بعدة أساليب أهمها الإمتزاز الفيزيائي physisorption أو التقييد بالإرتباط التساهمي covalent attachment أو التحميل الضمني *in situ incorporation* أثناء تكوين المادة الصلبة (البلمرة العضوية organic polymerization أو الهلام غير العضوي inorganic sol-gel (Poulsen وآخرون، 2007؛ Sheppard وآخرون، 2012).

في دراسة حديثة أجريت من قبل Goldhahn وآخرون (2020) تم فيها استخدام الخشب الطبيعي كبديل صديق للبيئة بالتقييد الأنزيمي إذ يوفر الهيكل الطبيعي للخشب دعامة مسامية مستقرة ميكانيكياً مع مساحة سطحية داخلية عالية تسمح بتدفق إتجاهي للسوائل تم من خلالها تقييد الإنزيمات عن طريق الادمصاص بوساطة الجسيمات النانوية وبعد فحص هجن التقييد (الخشب- الأنزيم) لإنزيم laccase وجدوا أن بالإمكان إزالة هجن (الخشب - الأنزيم) بسرعة وبشكل كامل من محلول التفاعل وأن هذه الهجن تسمح بإعادة الاستخدام المتعدد إذ أجريت من خلالها سلسلة من 25 دورة تفاعل متتالية للأنزيم المقيد مع نشاط إسترداد في الدورة الأخيرة بنسبة 90% من النشاط الأقصى.

لقد ثبت أن تقييد الأنزيم هو وسيلة فعالة لتعزيز الأداء التحفيزي للأنزيمات (Rodrigues وآخرون، 2011؛ Bayramoglu وآخرون، 2012). إذ تتمتع الإنزيمات المقيدة بالعديد من المزايا مقارنة بالإنزيمات الحرة القابلة للذوبان مثل الثبات الحراري والتخزين العالي والفصل السهل عن وسط التفاعل (Menale وآخرون، 2012). هناك العديد من العوامل التي تؤثر على استعادة النشاط وإعادة استخدام الإنزيمات في عملية التقييد منها إختيار الدعامة المقيدة واختيار إستراتيجية التقييد (Ortega وآخرون، 2009). إن من أهم الأمور التي يجب ملاحظتها بعد تقييد الإنزيمات هي التغيرات في نشاط الأنزيم ودرجة الحموضة المثلى واللفة للركيزة والاستقرار الأنزيمي (Ortega وآخرون، 2009؛ Bayramoglu وآخرون، 2012) ويعتمد مدى هذه التغيرات على مصدر الأنزيم ونوع الدعامة المقيدة وطريقة التقييد ويرتبط الإستقرار طويل الأمد للأنزيم المقيد في الغالب بإستقرار مادة التقييد ولقد ساعدت نتائج التقييد الأنزيمي في إطالة عمر أجهزة الاستشعار والمفاعلات الإحيائية (Ortega وآخرون، 2009؛ Menale وآخرون، 2012).

في العقود الأخيرة تم استخدام جزيئات السيليكا على نطاق واسع كداعم لتقييد الإنزيمات المختلفة وتوفرت طرائق مختلفة لتحضير جسيمات السيليكا الاصطناعية لتقييد الأنزيمو من ناحية

أخرى فإن السيليكا الإحيائية التي تنتجها الدياتومات هي مواد منخفضة التكلفة تعرض العديد من الميزات المثيرة للاهتمام لمجموعة واسعة من تطبيقات التكنولوجيا الإحيائية مثل تقييد الأنزيم وفصل الجزيئات الإحيائية (Lee وآخرون، 2012). وفي ظل ظروف تجريبية معينة قد تضعف تفاعلات الوحدة الفرعية للإنزيمات وقد تميل الإنزيمات المتعددة الوحدات multimeric إلى الانفصال مما يسبب تعطيل سريع لعمل الأنزيم (Menale وآخرون، 2012؛ Rodrigues وآخرون، 2011). لذلك قد يمنع التقييد متعدد النقاط للإنزيمات متعددة الوحدات تفكك الوحدة الفرعية عن طريق الارتباط التساهمي للوحدات الفرعية لجزيئات الأنزيم، فضلا عن ذلك فإن تقييد الأنزيم متعدد الوحدات على الدعامة المنشطة بالكلوتارالديهيد عبر الارتباط التساهمي متعدد النقاط يمكن أن يعزز أيضاً استقرار الأنزيم وسيكون أكثر أهمية عندما تكون ركيزة الأنزيم عامل معطل أو مشط (Rodrigues وآخرون، 2011). إن الفينول ومشتقاته عوامل تسميح (مغيرة لطبيعة المواد) قوية بتركيز معينة (Costantini وآخرون، 2009) وبالتالي يمكن أن توفر طريقة التقييد الأنزيمي بالكلوتارالديهيد ثباتاً إضافياً للأنزيم المقيد لغرض الاستخدام المتكرر (Bayramoglu وآخرون، 2012).

2-6-6 تقنية تقييد الخلايا الميكروبية

لقد كانت هناك أبحاث مستفيضة خلال العقدين الأخيرين فيما يتعلق بموضوع استخدام الخلايا الميكروبية المقيدة كمحفزات حيوية Biocatalysts فقد أستخدمت خلايا البكتريا المقيدة على أسطح متنوعة وب نطاق واسع في مجال تحطيم سموم متنوعة (Kumar وآخرون، 2018)، إذ تتمتع الخلايا المقيدة بمزايا على الخلايا الحرة نظراً لإمكانية تطبيقاتها المتعددة لفترة طويلة من الزمن وإمكانية زيادة التمثيل الغذائي ونفاذية جدران الخلايا وإمكانية زيادة كثافة الخلايا في خليط التفاعل وبالتالي زيادة سرعة العمليات المحفزة (Pazarlioglu و Telefoncu، 2005). وعادة يتم استخدام دعائم مختلفة لتقييد الخلايا الميكروبية وهناك القليل من المنشورات حول تقييد الخلايا على الأغشية البوليمرية وتعد الأغشية البوليمرية مناسبة جداً لتقييد الخلايا الميكروبية والإنزيمات ويمكن استخدامها في النطاق الصناعي خاصة إذا تم استخدامها على شكل وحدة غشاء حلزوني توفر مساحة سطح غشاء كبيرة (Hua وآخرون، 2005). وقد أجريت دراسة من قبل Godjevargova وآخرون (2006) حول إمكانية تقييد خلايا سلالة الخميرة *Trichosporon*

cutaneum R57 على أغشية polyamide و polyacrylonitrile لغرض التحقق في قدراتها على تحليل الفينول ووجدوا أن هناك إختلاف في كفاءة كل نظام تقييد من خلال مدى التحلل الحيوي للفينول بتركيز ابتدائي 1.0 غم. لتر⁻¹ فقد أكمل نظام تقييد الخميرة على polyacrylonitrile عملية التحلل الحيوي للفينول في مدة 45 ساعة في حين أن نظام تقييد الخميرة على polyamide استغرق مدة 51 ساعة لاتمام ذلك الامر. وفي دراسة أخرى أجريت من قبل Kumar وآخرون (2018) تهدف إلى تقييم دور الخلية الحرة والمقيدة بإستخدام الجينات الصوديوم لسلالة *Candida tropicalis* NPD1401 في تحليل الفينول وجدوا أن خلية الخميرة المقيدة حلت الفينول بكفاءة تصل إلى 98 % من تركيز فينول ابتدائي يبلغ 1000 ملغم. لتر⁻¹ بينما خلايا الخميرة الحرة كانت كفاءتها في تحليل الفينول 63 % لنفس التركيز الابتدائي من الفينول تحت ظرف 9 أيام من الحضانة ووجدوا ان إعادة إستخدام خرزات الجينات الصوديوم المقيدة للخمائر المخزنة بعد 15 يوماً نجح في تحليل 62.1 % من الفينول في وسط الملح المعدني MSM .

2-6-7 الكائنات الدقيقة المهندسة وراثياً

تشمل جوانب التكنولوجيا الإحيائية في الإزالة الإحيائية تطبيق الكائنات الدقيقة المهندسة وراثياً Genetically Engineered Microorganisms (GEMs) إذ تمتلك هذه الكائنات الدقيقة المعدلة وراثياً إمكانات هائلة في إزالة التلوث البيئي وتوفر تقنيات الهندسة الوراثية إمكانية تجهيز الكائنات الحية المعروف عنها بقائها ونشاطها عند إدخالها في بيئات معينة وبالإمكانات التقويمية المرغوبة (Poulsen وآخرون، 2007). تلعب الكائنات الحية المعدلة وراثياً دوراً مهماً في التحلل الحيوي للهيدروكربونات متعددة الحلقات (PAHs) والتي توجد في التربة بسبب الانسكابات أو تسرب المنتجات البترولية ولقد كان أول كائن معدّل وراثياً للإزالة الإحيائية هو بكتريا *Pseudomonas* الذي قدمه الدكتور Dr. Anand Mohan Chakrabarty في الولايات المتحدة وأثبت فعاليته في إزالة البيئة الملوثة بالهيدروكربون البترولي (Singh و Chandra، 2014).

Materials and Methods

3- المواد وطرائق العمل

3-1 مواقع الدراسة

شملت الدراسة مواقع مختلفة في قضاء بعقوبة / مركز محافظة ديالى / العراق - كما هو مبين في الملحق 3-1 متمثلة بنهر ديالى وبعض احياء المناطق السكنية والصناعية ، بهدف جمع نماذج عينات المياه العذبة fresh water لتغطية جزء الدراسة المتعلق بعزل وتشخيص وتنمية مزارع الدايئومات وتقييم مستوى التلوث العضوي والحالة التغذوية لنهر ديالى، وكذلك شملت الدراسة جمع نماذج عينات التربة الملوثة بالملوثات النفطية والبتروكيمياوية من بعض الاحياء السكنية والصناعية ضمن قضاء بعقوبة لتغطية الجزء المتعلق بعزل الخمائر وتشخيصها وتتميتها واختبار قدرتها التحليلية للملوثات الفينولية لغرض الاستخلاص الانزيمي منها .

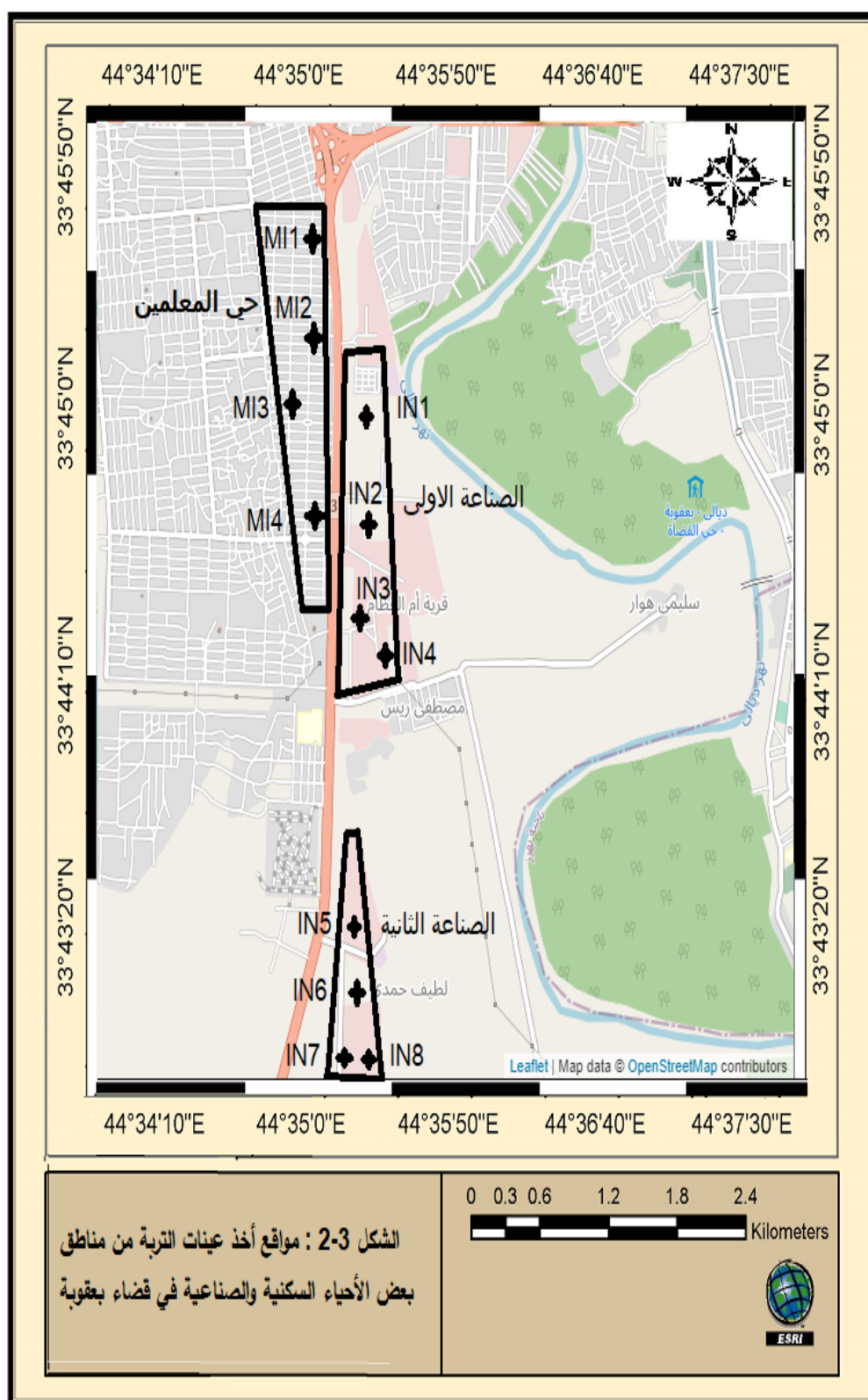
3-1-1 مواقع جمع العينات المتعلقة بعزل الدايئومات

شملت الدراسة المتعلقة بعزل وتشخيص وتنمية مزارع الدايئومات ، مقطع نهر ديالى المار في قضاء بعقوبة / مركز محافظة ديالى / العراق ، المحصور بين خطي العرض (33.70 ° و 33.78 °) ، لغرض جمع عينات المياه العذبة البالغ عددها 90 عينة من مواقع النمذجة البالغ عددها 10 مواقع والمبينة مواقعها في الشكل 3-1 ، خلال المدة من شباط إلى حزيران من عام 2018 ، وبواقع 3 نماذج لكل موقع نمذجة وبثلاثة مكررات ، وكما هو موضح في الملحق 3-2. وأخذت العينات وفقا للطرق القياسية المتبعة بحسب (Kelly واخرون ، 1998).

3-1-2 مواقع جمع العينات المتعلقة بعزل الخمائر

أخذت نماذج عينات التربة السطحية بعمق 5-10 سم ، لغرض عزل وتشخيص الكائنات الحية الدقيقة المستخدمة قيد الدراسة من مناطق التربة الملوثة بالملوثات النفطية والبتروكيمياوية والارضيات الملوثة بزيوت المحركات و المولدات الكهربائية المحلية ومحلات غسل وتشحيم وتصليح السيارات في ثلاث مناطق للاحياء السكنية والصناعية التابعة إلى قضاء بعقوبة ، والتي شملت : منطقة الصناعة الاولى ، منطقة الصناعة الثانية ، و حي المعلمين وكما هو مبين في الشكل 3-2. وقد بلغ عدد العينات المأخوذة 180 عينة خلال المدة من ايلول إلى تشرين الثاني

الشكل 1-3 : مواقع أخذ عينات المياه على مقطع نهر دجلة في قضاء بعقوبة



3-2 متطلبات الدراسة

3-2-1 المواد المستعملة في الدراسة

3-2-1-1 المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة

الجدول 1-3 : المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة			
المنشأ	الشركة المجهزة	اسم المادة الكيميائية	ت
Poland	POCH S. A	Alkaline iodide azide reagent	1
UK	Radox, Antrim.	Aminoantipyrine	2
Poland	POCH S. A	Amphotericin B	3
USA	Sigma Aldrich	Catechol (Standard)	4
USA	Sigma Aldrich	Cis,cis-muconic acid	5
Germany	Merck, Darmstadt,	CoCl ₂ .6H ₂ O	6
UK	Radox, Antrim.	Coomassie brilliant blue	7
Germany	Merck, Darmstadt.	Diaminohexane-1,2	8
UK	Radox, Antrim	Crystal violet	9
USA	Sigma Aldrich	CuSO ₄ .5H ₂ O	10
Poland	POCH S. A	EDTA	11
USA	Sigma Aldrich	Ethanol 95%	12
Poland	POCH S. A	FeCl ₃ .6H ₂ O	13
UK	Radox, Antrim.	Glutaraldehyde	14
UK	Radox, Antrim.	H ₂ O ₂	15
Germany	Merck, Darmstadt.	H ₂ SO ₄	16
Poland	POCH S. A	K ₃ Fe(CN) ₆	17
USA	Sigma Aldrich	Lugols' iodine	18
Poland	POCH S. A	Malachite green	19
UK	Radox, Antrim.	Mercaptol ester NOA 61	20
USA	Sigma Aldrich	MnCl ₂ .4H ₂ O	21
UK	Radox, Antrim.	Mn SO ₄ . 4HO ₂	22
UK	Radox, Antrim.	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	23

المنشأ	الشركة المجهزة	اسم المادة الكيميائية	ت
USA	Sigma Aldrich	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	24
UK	Radox, Antrim.	NaI	25
USA	Sigma Aldrich	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	26
USA	Sigma Aldrich	NaNO_3	27
USA	Sigma Aldrich	NaOH	28
UK	Radox, Antrim.	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	29
USA	Sigma Aldrich	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	30
UK	Radox, Antrim.	NH_4Cl	31
Poland	POCH S. A	$\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	32
USA	Sigma Aldrich	N,N-dimethylformamid	33
UK	Radox, Antrim.	penicillin G	34
USA	Sigma Aldrich	Phenol red	35
USA	Sigma Aldrich	Phenol(Standard)	36
UK	Radox, Antrim.	Phenylfluorone	37
UK	Radox, Antrim.	Polyoxyethelene monolauryl	38
USA	Sigma Aldrich	Safranin	39
Germany	Merck, Darmstadt.	Salicyalic acid	40
USA	Sigma Aldrich	Starch	41
Germany	Merck, Darmstadt.	Streptomycin	42
UK	Radox, Antrim.	Thiamine HCl	43
USA	Sigma Aldrich	Tween 80	44
USA	Sigma Aldrich	Vitamin B12	45
Poland	POCH S. A	Vitamin H	46
UK	Radox, Antrim.	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	47

3-2-1-2 الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة

الجدول 2-3 : الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة			
ت	الوسط الزرعي	الشركة المجهزة	
1	Chrom agar Candida	Merck, Darmstadt.	Germany
2	Cornmeal agar	Randox, Antrim.	UK
3	Sodium acetate agar	Merck Millipore	Germany
4	Yeast Nitrogen Base YNB	Difco.	USA

3-2-1-3 الدوائى المستعملة في الدراسة

الجدول 3-3 : الدوائى المستعملة في الدراسة				
ت	اسم الدوائى او البفر	المصدر	المواصفات البفرية	
			التركيز	pH
1	Ammonia buffer solution	Randox, Antrim./ UK	50 ملي مولار	6-5
2	Phosphate buffer	Sigma Aldrich/ USA	0.1 مولار	7
3	Potassium phosphate buffer	Sigma Aldrich/ USA	50 ملي مولار	8.5-6.5
4	Tris-acetate buffer	Difco./ USA	50 ملي مولار	10-9
5	Tris-HCl buffer	Difco./ USA	20 ملي مولار	8
6	Sodium acetate buffer	Randox, Antrim./ UK	50 ملي مولار	6-5
7	Sodium bicarbonate	Difco./ USA	0.1 مولار	7

3-2-2-3 الاجهزة المستخدمة في الدراسة

الجدول 4-3 : الاجهزة المستخدمة في الدراسة			
ت	الجهاز	الشركة	المنشأ
1	Aquarium thermometer	Zeal	UK
2	Autoclave	ALab Tech	Korea
3	BOD-incubator	Kubota	Germany
4	Centrifuge	Hettich EBA 20C	Germany

المنشأ	الشركة	الجهاز	ت
USA	Suntex	Coloni counter	5
UK	Gallen Kamp	Cooling centrifuge	6
Germany	WTW	Conductivity Meter Bench Type (EC, TDS, Salinity & Temp.)	7
Germany	WTW	DO-meter	8
Germany	inoLab® Cond	Durham tubes	9
USA	Diagnostic Auto.Inc.	ELIZA-microplate reader	10
Germany	PLM	Hemocytometer chamber	11
Germany	inoLab® Cond	Laminar air flow	12
Germany	Meiji	Light microscope	13
Germany	WTW	Magnetic hot plate	14
Germany	Leica	Microscopic camera	15
Germany	ECOCELL	Oven	16
Germany	WTW	pH- meter	17
Germany	KERN ALS 220-4N	Sensitive balance	18
Korea	ALab Tech	Shaking incubator	19
Germany	Julabo SW23	Shaking water-bath	20
UK	Gallen Kamp	Sonicator	21
USA	® BioMerieux	Spectrophotometer	22
Germany	inoLab® Cond	Spin-coater	23
Germany	inoLab® Cond	Syringe sterile filter 0.22 micron	24
Germany	WTW	Vacuum pump	25
USA	® BioMerieux	Vitek compact2 system diagnosis	26
Germany	WTW	Vortex	27

3-3 النمذجة البيئية وإستزراع العينات

1-3-3 النمذجة البيئية وإستزراع العينات المائية

1-1-3-3 النمذجة البيئية للعينات المائية

جمعت عينات المياه العذبة بوساطة قناني بلاستيكية نظيفة و مصنوعة من مادة البولي اثيلين وبحجم 2 لتر، وقد شملت النمذجة مناطق الجرف للجسم المائي littoral regions بالنسبة للعينات النهرية المأخوذة من مواقع النمذجة المحددة على مقطع نهر ديالى المار في قضاء بعقوبة ، وقد تم الحصول على خلايا الدياتومات القاعية benthic diatoms والملتصقة عن طريق الكشط باستعمال فرشاة الأسنان على سطح الحصى والصخور والنباتات وتم تجميعها في ماء الغسل washing water ، ثم خزنت العينات في الظلام عند 4 درجات مئوية لحين معالجتها (Cimarelli واخرون ، 2015).

قيمت بعض العوامل الفيزيائية والكيميائية للعينات كما وصفت في (Gautam واخرون ، 2017). وقد شملت قياس المتغيرات او المسمات التالية : المتطلب البيوكيميائي للاوكسجين BOD ، فحص النترا Nitrate ، وفحص المحتوى الكلي للفوسفات Total phosphate ، تبعا لبروتوكولات قياسية (عباوي وحسن ، 1990) فضلا عن اجراء قياسات موقعية في موقع اخذ العينات إذ تم أخذ قياسات درجة حرارة عينات المياه ، التوصيلية الكهربائية Electrical Conductivity ، الاس الهيدروجيني pH ، ومعدل تدفق المياه Water flow ، باستخدام المعدات الميدانية . وتم فحص هذه البيانات وتحليلها للحصول على رؤية واضحة عن الظروف البيئية الملائمة لنمو الدياتومات من حيث الملوحة ، درجة الحرارة ، الاس الهيدروجيني ، والمغذيات nutrients (Ramirez واخرون، 2015).

2-1-3-3 إستزراع العينات المائية

تضمنت خطوات استزراع العينات المائية ما يلي بحسب (Gautam واخرون ، 2015) :

1. نبذت أجزاء من عينات المياه بمقدار 250 مل باستخدام جهاز النبذ المركزي ولثلاث مرات باستخدام ماء منزوع الايونات عالي النقاوة MilliQ water وبمعدل 3000 دورة . دقيقة⁻¹ ولمدة 5 دقائق ، وفي كل مرة يتم الاحتفاظ بالراسب pellet وإهمال الراشح supernatant.
2. استخدم 50 مايكروليتر من الراسب لغرض اعداد الشرائح الزجاجية (السلايدات) slides باتباع طريقة (Biggs و Kilroy، 2000).
3. شخصت الدايتومات بشكل اولي من خلال استخدام قواعد بيانات الدايتوم عبر الانترنت؛ أكاديمية العلوم الطبيعية ، فيلادلفيا Academy of Natural Sciences, Philadelphia (ANSP) (https://diatom.ansp.org/algae_image/) ، الدايتومات في الولايات المتحدة (<https://westerndiatoms.colorado.edu/>) ، وقاعدة بيانات صور الطحالب Algal في الهند (<http://indianalgae.co.in/>) (AIDI) ، كما تم اعتماد المصادر (Patrick و Reimer ، 1975؛ Hinton و Maulood ، 1980) في تشخيص انواع الدايتومات المعزولة قيد هذه الدراسة.
4. نشر الجزء المتبقي من الراسب على اطباق الوسط الزرعي الصلب f/2 المحور modified f/2 media plates الذي تم تعقيمه مسبقا بالمؤصدة autoclave في درجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند. انج⁻² والمبينة مكوناته في الملحق 3-4 بحسب (Guillard و Lorenzen ، 1972؛ Vinayak وآخرون ، 2014) واحتفظ بها في ظروف الضوء والعتمة 16 : 8 ساعة على الترتيب وفي درجة حرارة 25 درجة مئوية وبمعدل كثافة ضوء 18000 شمعة . م⁻² (lumen per m²).
5. بعد مرور 7 أيام ومن خلال الفحص المجهرى على القوة التكبيرية 10 X و لوحظ على الاوساط الزرعية الصلبة ، انتشار مستعمرات مجتمع الدايتومات ذات اللون البني المختلطة مع البكتريا والطحالب الخضراء مع وجود بعض الخيوط والأبواغ الفطرية أيضا.
6. تم تعليم المستعمرات المنفردة للدايتومات البنية اللون في اطباق الوسط الزرعي الصلب، باستخدام أقلام التلوين على ظهر طبق البتري وبعدها تم التقاط تلك المستعمرات المنفردة تحت

المجهر الضوئي ، بوساطة لوب البلاتين المعقم ومن ثم تخطيطها على أطباق بتري حاوية على الوسط الزراعي الصلب من $f/2$ المحور.

3-3-1 عزل الدايتومات وتشخيصها

تضمنت خطوات عزل الدايتومات مايلي بحسب (Cimarelli وآخرون ، 2015؛ Gautam وآخرون ، 2015):

1- لوحظت الاطباق التي تم زراعتها بعد أيام قليلة للتحقق من انفرادية axenicity مزارع الدايتومات مجهريا.

2- أجري الاستزراع المتعاقب sub culturing ولعدة مرات لغرض انتاج مزارع منفردة ونقية من الدايتومات. وذلك لاحتمالية ظهور الملوثات مثل البكتريا ، الطحالب الخضراء ، و الفطريات خلال دفعة الاستزراع المنفردة axenic culture الاولى لنماذج المياه.

3- اجري النبد المركزي بعد عمل معلق من المزارع المنفردة للدايتومات للتخلص من الملوثات الحية الدقيقة ، إذ تعد عملية النبد المركزي ، افضل طريقة للتخلص من الملوثات المتمثلة بالبكتيريا ، السبورات الفطرية ، والطحالب الخضراء لكون الدايتومات ثقيلة لما تمتلكه من جدران سليكونية القوام فهي تترسب وتبقى في القعر بينما تبقى الملوثات البكتيرية والسبورات الفطرية والطحالب الخضراء طافية في الاعلى (Gautam وآخرون ، 2015).

4- تم التخلص من محلول المادة الطافية باهمال الراشح ، ومن ثم غسل الراسب بالماء منزوع الايونات عالي النقاوة و أجري بعد ذلك النبد المركزي بمعدل 3000 دورة . دقيقة⁻¹ و كرر من 5- 6 مرات.

5- لقح الراسب مرة ثانية على وسط استزراع الدايتومات تحت ظرف حجرة التدفق الهوائي laminar air flow .

3-3-1-4 المعاملة بالمضادات الحيوية والفطرية

1- التقطت الخلية الدايتومية بعد انتقائها بحذر ودقة من مستعمرات الدايتومات بواسطة لوب البلاتين المعقم وتمت العملية تحت المجهر الضوئي وفي حجرة التدفق الهوائي (اللامينر).

2- استزرعت المستعمرات الدايتومية المنتقاة بعناية ودقة في الخطوة السابقة تسلسليا في اطباق تتضمن وسط زرعي جديد تم تعقيمه بالمؤسسة autoclave في درجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند. انج² ومن ثم معاملته بإضافة خليط من من المضادات الحيوية يتكون من 170 مايكروغرام . مل⁻¹ من penicillin G ، 85 مايكروغرام . مل⁻¹ من streptomycin ، و 2.5 ملغم. لتر⁻¹ من amphotericin B بنسبة 1:0.5 لمدة 18 ساعة (Kroth و Bruckner، 2009).

3- حفظت اطباق الاستزراع الملقحة والمعاملة بالمضادات الحياتية ومبيدات الفطريات في درجة حرارة الغرفة ، وتم مراقبتها بعد كل يوم لاحق باستعمال المجهر الضوئي على القوة التكبيرية 40X و 100X.

3-3-1-5 تحضير المزارع الاحادية للدايتومات

لغرض تحضير المزارع الاحادية للدايتومات monoculture preparation for diatoms تم اجراء الخطوات التالية بحسب (Guillard و Lorenzen ، 1972 ، Cimarelli واخرون ، 2015):

1- تم عمل سلسلة تخفيف serial dilution لمزرعة مستعمرات الدايتومات المختلطة ، بهدف الحصول على مزرعة دايتومية نقية pure culture (axenic culture).

2- بعد ذلك عزلت الاجناس والانواع المفردة من خليط الدايتومات بعملية الفصل الخلوي المتمثلة بالنقاط خلايا دايتومات مفردة من 30-50 ميكروتر من عينات سلسلة التخفيف وتم ذلك باستخدام قوة الشفط او السحب لانبوب شعري معقم sterile capillary tube ذي قطر 5 ملم عوضا عن استخدام ماصة غيلسون Gilson pipette المجهزة بفوهة ضيقة.

3- لقحت خلايا الدايتومات المفردة النقية في اطباق حاوية على وسط زرعي جديد ، لملاحظة ظهور المستعمرات الاحادية المفردة النقية axenic monoclonal diatom colonies .

4- تم تلقيح كل خلية دايتومية معزولة في 20 مل من الوسط الزرعي f/2 ووضعت في حاضنة هزازة Shaking incubator لمدة 12 ساعة / 12 ساعة دورات من إضاءة في ضوء - ظلام عند درجة حرارة ثابتة 18 درجة مئوية وبعدها نقلت المزرعة الى دوارق مائلة العنق neck flasks سعة 600 مل.

5. رصدت كثافة الخلايا في مزارع الدايتومات يوميا باستخدام حُجَيْرَةُ عد الكريات hemocytometer counting chamber وبمساعدة مجهر ضوئي مقلوب عند التكبير 10 X أو 40 X وحصدت خلايا الدايتومات في مرحلة النمو الأسّي exponential growth phase ، أي بعد مدة حضانة تبلغ 14- 20 يوما عن طريق كشط قاع فلاسك المزرعة ثم الترشيح باستعمال مرشح 0.45 مايكرون مع جهاز التفريغ vacuum filtration والغسيل مع 50 مل من الماء المقطر المعقم لإزالة المكونات المتبقية من وسط f / 2.

6- تم حفظ صمامات الدايتومات وخبزنها في الايثانول المطلق (100)%.

3-3-1-6 اختبار مزارع الدايتومات المنفردة

تم التأكد من نقاوة المزرعة الدايتومية المنفردة من خلال تلقيح الدايتومات المعزولة في محلول السكروز إذ تم تحضير محلول السكروز 2 مولار باستخدام الماء المعقم ثم اضيف 50 مايكروليتر من مزرعة الدايتوم المنفردة بعد معاملتها باحمر الفينول phenol red ككاشف إلى انبوب نبذ دقيق micro centrifuge (انبوب ايندروف) سعة 1.5 مل حاوية على 1 مل من محلول السكروز المحضر انيا وتمت مراقبته من حيث (العكورة turbidity ، التغير اللوني ، طور اللون الاحمر ، وظهور الفقاعات) وبعد مرور (24 و 48 و 72) ساعة (Boczar وآخرون، 1988) فمن المعروف ان البكتريا لاتستخدم السكروز للتخمير تم بعدها تحضير السلايدات (الشرائح الزجاجية) لعينات الدايتومات ولوحظت تحت القوة التكبيرية (40X) للمجهر الضوئي للتأكد من وجود اي خلايا بكتيرية من عدمه ضمن هذه المزرعة (Cimarelli وآخرون ، 2015).

3-3-1-7 تحضير عينة الدايتومات للفحص والتصوير المجهرى

من اجل اعداد عينة الدايتومات للفحص بواسطة المجهر الضوئي تم إتباع خطوات تنظيف عينة الدايتومات المبينة في ادناه وهي ضرورية لإزالة المادة العضوية التي يمكن أن تغطي اغماد جب الدايتومات إذ استعملت المعاملة الحامضية والتي تمثل الطريقة الشائعة لإزالة اغلب المواد العضوية من سطح الدايتومات بحسب (Mazumder وآخرون ، 2014):

1- تم رج دورق مزرعة الدايتوم لمدة 5 دقائق من اجل تفريق الدايتومات.

2- اخضع 10 مل من العينة للنبد المركزي بمعدل 5000 دورة. دقيقة¹⁻ ولمدة 10 دقائق.

3- اعمل الراشح وتم غسل الراسب بالماء مضاعف التقطير (DDW) double distilled water ولثلاث مرات.

4- اضيف 37 % من المحلول المائي لحامض الهيدروكلوريك HCl، ثم اجري النبد المركزي بمعدل 3000 دورة . دقيقة¹⁻ ولمدة 10 دقائق ووضعت في حمام مائي بدرجة 60 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة.

5- تم سحب الحامض باستخدام ماصة واعيد غسل الراسب بالماء مضاعف التقطير ولثلاث مرات أيضاً، وبعدها تم تخزين اغماد جب الدايتومات النظيفة في الايثانول المطلق لتجنب تلوثها بالنمو البكتيري.

6- ولإجراء الفحص بالمجهر الضوئي ، تم أخذ 20 مايكروليتر من عالق الدايتومات في الايثانول بواسطة الماصة ووضع على غطاء الشريحة المربع rectangular cover slip ثم جفف بالفرن oven بدرجة 60 - 70 درجة مئوية لمدة يومين الى ثلاثة أيام.

7- تم الفحص باستعمال القوة التكبيرية 40X و 100X لمجهر ضوئي مزود بكاميرا تصوير من نوع Leica Microsystems Type DM LB2 with DC-200 camera ، المانية المنشأ.

3-3-1-8 تنمية مزارع الدائتومات وتربيتها مختبريا

نميت مزارع الدائتومات مختبريا باستخدام الاوساط الزرعية WC medium للدائتومات المعزولة من مياه ذات اس هيدروجيني متعادل الى قاعدي و PM medium للدائتومات المعزولة من مياه ذات اس هيدروجيني حامضي ، المقترحة من قبل Guillard و Lorenzen (1972) والمبينة مكوناتها في الملاحق 3-5 و 3-6 ، مع قليل من التحوير بإضافة كمية مضاعفة من sodium meta-silicate باعتبارها مصدر اساسي لتكوين الهياكل النانوية لأغطية جب frustule الدائتومات وكذلك تخفيض الاس الهيدروجيني pH من 7 الى 6.23 لجعل الوسط الزراعي يميل الى الحامضية وتم تربية مزارع دائتومات المياه العذبة في كل من الأوساط الصلبة والسائلة بحسب مصادر عزلها واعتمادا على الاس الهيدروجيني لعينات المياه التي عزلت منها (Guillard و Lorenzen، 1972؛ Mazumder، وآخرون ، 2014).

3-3-1-9 استخدام الديتومات لتقييم مياه نهر ديالى

تم استخدام نوعين من المؤشرات البيولوجية التي تعتمد على الدائتومات والهائمات النباتية في تقييم التلوث العضوي لمياه نهر ديالى في المقطع المار في قضاء بعقوبة ، وهما مؤشر بالمر للتلوث العضوي Palmer Pollution Index (PPI) بحسب طريقة (Palmer، 1969) ومؤشر الدائتومات التغذوي Diatoms Trophic Index (DTI) و Diatom Quality Index (DQI) بحسب طريقة (Kelly و Whitton، 1995).

أولاً: الدائتومات كمؤشر للتلوث العضوي في نهر ديالى

تم حساب مؤشر بالمر (Palmer، 1969) لجميع مواقع نمذجة العينات المائية قيد الدراسة اعتمادا على معامل التلوث العضوي لكل جنس او نوع من الدائتومات التي تم عزلها وتشخيصها في هذه الدراسة والموجودة ضمن قوائم بالمر للطحالب التي تتحمل التلوث العضوي المبينة في الملاحق 3-7 و 3-8 ومن خلال تحديد العدد الإجمالي لمجموع النقاط Total score التي سجلها كل جنس اونوع ضمن موقع النمذجة الواحدة وبالرجوع الى القيم العددية لتصنيف التلوث العضوي التي حددها بالمر والمبينة في الجدول 3-5 ادناه ، وتم تحديد مستوى حالة التلوث العضوي لتلك المواقع على مقطع نهر ديالى المار في بعقوبة.

الجدول 3-5 : القيم العددية لتصنيف التلوث العضوي التي حددها (Palmer ، 1969)		
تفسير النتائج		القيم العددية
خالي من التلوث العضوي	Lack of organic pollution	10 - 0
تلوث عضوي معتدل	Moderate pollution	15 - 11
احتمال تلوث عضوي عالي	Probable high organic pollution	20 - 16
تلوث عضوي عالي مؤكد	Confirms high organic pollution	21 او اكثر
(Soni و Thomas ، 2014)		

ثانياً: الدايتومات كمؤشر تغذوي ونوعي في نهر ديالى

تم حساب مؤشر الدايتوم التغذوي TDI كدليل على التلوث العضوي وفقاً للمعادلة

الموضوعة من قبل (Kelly و Whitton، 1995) والمبين في ادناه :

$$TDI = \sum a_j v_j s_j / \sum A_j V_j \times 25 - 25$$

إذ أن:

a_j : تمثل نسبة وفرة النوع الدايتومي j في العينة.

s_j : حساسية التلوث يعبر عنها بمقدار 1-5 للنوع الدايتومي j .

V_i : قيم المؤشر يعبر عنها بمقدار 1-3 .

S : قيم الحساسية وهي كالتالي :

1= يفضل تركيزات منخفضة للغاية من العناصر الغذائية.

1 = favoured by very low nutrient concentrations.

2= يفضل تركيزات منخفضة من المغذيات.

2 = favoured by low nutrient concentrations.

3= يفضل تركيزات وسيطة من العناصر الغذائية.

3 = favoured by intermediate concentrations of nutrients.

4= يفضل تركيزات عالية من العناصر الغذائية.

4 = favoured by high concentrations of nutrients.

5= يفضل تركيزات عالية جدًا من العناصر الغذائية.

5 = favoured by very high concentrations of nutrients.

ملاحظة : قيم S_j و V_i تم الحصول عليها من جداول خاصة اعدت من قبل Kelly و Whitton (1995).

ولغرض تفسير النتائج يمكن الاعتماد على مديات قيم TDI ومايقابلها من الحالة التغذوية وتصنيف فئة جودة المياه وتستخدم فئة جودة المياه وكما مبين في الجدول 3-6:

الجدول 3-6 : مديات قيم TDI ومايقابلها من الحالة التغذوية وتصنيف فئة جودة المياه		
مديات قيم DTI	الحالة التغذوية	فئة جودة المياه
< 35	oligotroph	I
35-50	olig-mesotrophy	II
51-60	mesotrophy	III
61-75	eutrophy	IV
> 75	hypertrophy	V
(Szczepocka و Rakowska، 2011)		

ولغرض حساب قيم مؤشر التنوع الدايتومي Diatoms Quality Index (DQI) يمكن

اتباع المعادلة التالية بحسب Kelly واخرون (1998) :

$$DQI = 100 - TDI$$

اما حساب النسبة المئوية للدايتومات التي تتحمل التلوث Percent Pollution Tolerant

Valves (%PTV) فيتم من خلال المعادلة التالية بحسب Kelly واخرون (1998):

$$\%PTV = \frac{\text{العدد الكلي للدايتومات المتحركة}}{\text{العدد الكلي باستثناء الهائمات}} \times 100$$

3-3-2 النمذجة البيئية وإستزراع عينات التربة

3-3-2-1 النمذجة البيئية لعينات التربة

تم سحب نماذج من عينات التربة الملوثة بالملوثات النفطية والبتروكيمياوية وزيت المحركات من بعض المناطق والاحياء السكنية والصناعية التابعة لقضاء بعقوبة ، والتي شملت ارضيات محلات غسل وتشحيم وتصليح السيارات والمولدات المحلية ، إذ اخذت النماذج من التربة السطحية بحدود عمق 5 - 10 سم باستخدام طريقة الكشط بواسطة المغرف اليدوي وبوزن يبلغ 1 كغم لكل نموذج وعبئ النموذج في كيس نايلون اسود اللون مثبت عليه بطاقة تعليم النموذج والتي تتضمن معلومات عن موقع وتاريخ جمع النموذج اضافة الى رمز النموذج ومن ثم وضع في كيس نايلون شفاف محكم الغلق وحفظت العينات في المختبر بدرجة حرارة الغرفة لحين معالجتها.

3-3-2-2 إستزراع عينات التربة

تم استزراع عينات التربة المستخدمة قيد الدراسة بحسب الاسلوب المحور من قبل (Bevilacqua وآخرون ، 2012) مع بعض التعديلات والذي تضمن الخطوات الاتية :

1- مزج نموذج التربة جيدا مع الماء المقطر في درجة حرارة الغرفة وتحريكه لمدة ساعتين ومن ثم تركه لمدة معينة تتراوح بين 30 - 60 دقيقة.

2. أخذت الطبقة العليا الرائقة من الماء بمقدار 10 مل وحقنت في 140 مل وسط ملحي معدني MSM mineral salt medium، تم تعقيمه مسبقا بالمؤصدة Autoclave ، في درجة حرارة 121 درجة مئوية تحت ضغط 15 باوند . انج²⁻ . ولمدة 15 دقيقة والمبينة مكوناته في الملحق 3-9 بحسب (Chandra وآخرون ، 2011 ؛ Bevilacqua وآخرون ، 2012) .

2. تم اكمال الوسط الملحي معدني ضمن مجموعتين من التراكيز الاولى (المزارع ذات التراكيز الفينولية) تحتوي على تدرج تراكيز مختلفة من الفينول phenol 5 و 10 و 15 و 20 و 25 ملي مولار والثانية (المزارع ذات التراكيز الكاتيكولية) تحتوي على تدرج تراكيز مختلفة من الكاتيكول catechol 10 و 20 و 30 و 40 و 50 ملي مولار ، وضبط الاس الهيدروجيني pH الى 7.

3. حضنت المزارع عند 30 درجة مئوية مع التحريك ضمن حاضنة هزازة وبمعدل 200 دورة في الدقيقة لمدة ثلاثة أيام.

3-3-2 عزل خمائر المبيضات

عزلت خمائر المبيضات *Candida albicans* من عينات التربة المستزرعة في الوسط الملحي من خلال اتباع الخطوات المحورة الآتية بحسب (Tsai وآخرون، 2005):

1- أخذت الطبقة العليا من التخافيف 10^{-3} - 10^{-5} من الوسط الملحي المعدني لاستزراع العينات ، بمقدار 10 مل وحقنت في 140 مل من الوسط الزراعي السائل Yeast Nitrogen Base (YNB) 0.67 % (وزن/ حجم) المعقم بالترشيح الفائق باستخدام syringe sterile filter 0.22 مايكرون ، وضمن مجموعتين من التراكيز الأولى (المزارع ذات التراكيز الفينولية) تحتوي على تدرج تراكيز مختلفة من الفينول phenol 5 و 10 و 15 و 20 و 25 ملي مولار والثانية (المزارع ذات التراكيز الكاتيكولية) تحتوي على تدرج تراكيز مختلفة من الكاتيكول catechol 10 و 20 و 30 و 40 و 50 ملي مولار ، وضبط الاس الهيدروجيني pH الى 7.

2- وضعت المزارع في حاضنة هزازة shaking incubator لمدة اسبوعين بمعدل 150 دورة . دقيقة⁻¹ وبدرجة حرارة 30 درجة مئوية.

3- بعد انقضاء مدة الحضانة ، وعندما كانت الكثافة الضوئية OD Optical Density الناتجة عن الامتصاصية على الطول الموجي 600 نانومتر والتي تم قياسها في جهاز المطياف ، تبلغ تقريبا 1.65 اي عندما تصل المزرعة الى مرحلة النمو الأسّي exponential growth phase تم اخضاع 0.1 مل من الوسط الزراعي الناتج للنشر spreading على اطباق الاكار المتضمن نفس الوسط الزراعي YNB 0.67 % (وزن/ حجم) قسم منها يحتوي على تراكيز الفينول بالنسبة للمجموعة الاولى من المزارع (الفينولية) والقسم الاخر يحتوي على تراكيز الكاتيكول بالنسبة للمجموعة الثانية من المزارع (الكاتيكولية).

4- وخططت ايضا على اطباق من الوسط الزراعي الصلب MSM agar المكمل باضافة 50 مايكروغرام.مل⁻¹ من الأمبيسلين كمضاد حيوي مثبط للنمو البكتيري. وقسم منها يحتوي على

تراكيز من الفينول بالنسبة للمجموعة الاولى من المزارع (الفينولية) والقسم الاخر يحتوي على تراكيز من الكاتيكول بالنسبة للمجموعة الثانية من المزارع (الكاتيكولية).

5- وضعت المزارع في الحاضنة وبدرجة حرارة 30 درجة مئوية ، وبعد مرور 24 ساعة ، تم الحصول على السلالات القادرة على التحمل والنمو في تراكيز مختلفة من الفينول او الكاتيكول. ومن ثم اجري الاستزراع التسلسلي Sequential cultures لغرض الحصول على سلالات نقية (Tsai واخرون، 2005؛ Farag و Soliman ، 2011).

6- تم تحديد سلالات الخمائر ذات القدرة العالية على النمو وتحمل تراكيز الفينول او الكاتيكول في مجموعتي المزارع وتم تشخيصها بشكل اولي استنادا إلى خصائصها المورفولوجية والفيزيولوجية والكيميائية ومن خلال الموقع Centralbureau voor Schim- melcultures, Boarn, Netherlands (CBS) فضلا عن اجراء اختبار الفايترك لتشخيص الخمائر باستخدام اوساط زرعية تشخيصية واختبارات تشخيصية مختلفة و التي سيرد ذكرها لاحقا. ومن اجل التحري عن مصدر الكربون ، يضاف مباشرة كمية مناسبة من الفينول أو الكاتيكول، الجلوكوز، أو cis,cis- muconic acid ، إلى المستنبت الزرعي YNB 0.67% (وزن / حجم) ، ثم عقمت جميع الاوساط الزرعية عن طريق الترشيح الفائق باستخدام 0.22 syringe sterile filter مايكرون قبل الاستخدام. ثم وضعت جميع فلاكسات المستنبتات او المزارع في حاضنه هزازة بمعدل 150 دورة .دقيقة⁻¹ وبدرجة حرارة 30 درجة مئوية. وتم تربية السلالة المعزولة في قارورة زجاجية تحتوي على 140 مل من الوسط الزرعي YNB 0.67% (وزن/ حجم) في درجة حرارة 30 درجة مئوية.

7- تم وبشكل دوري اجراء سلسلة تخافيف للعينات الملوثة بالمركبات النفطية وتخطيطها على الوسط MSM agar المكمل باضافة 50 مايكروغرام.مل⁻¹ من الأمبيسيلين كمضاد حيوي مثبط للنمو البكتيري (Bleve واخرون ، 2012).

3-3-2-4 تشخيص خمائر المبيضات

3-3-2-4-1 استخدام وسط الكروم الصلب

تم تخطيط مزارع الخمائر المعزولة قيد الدراسة على أطباق حاوية على وسط الكروم الصلب Chrom agar Candida medium (CaC) 4% (وزن/حجم) لغرض لتشخيص المبيضات قيد الدراسة والتي تم عزلها من نماذج التربة الملوثة بالمركبات النفطية والذي تم تعقيمه عن طريق الترشيح الفائق باستخدام 0.22 syringe sterile filter مايكرون قبل الاستخدام ثم وضعت في الحاضنة لمدة 48 ساعة وبدرجة حرارية 30-37 درجة مئوية، إذ ان لهذا الوسط القدرة على تشخيص ثلاثة انواع من خمائر المبيضات وهي (*C. albicans* على شكل مستعمرات خضراء ، *C. tropicalis* على شكل مستعمرات زرقاء ، و *C. krusei* على شكل مستعمرات وردية) (Collins وآخرون ، 2004 ؛ Duane وآخرون ، 2006).

3-3-2-4-2 اختبار الأنبوب الجرثومي

تم استخدام إختبار الأنبوب الجرثومي (GTT) Germ tube test في تشخيص *Candida albicans* الذي يسمح بتشخيصها وبشكل موثوق خلال 2-4 ساعات، إذ تم اجراءه بإستخدام مستعمرة فرعية subcultured colony نامية على وسط زرعي صلب بحسب طريقة (Ha وآخرون ، 2011) من خلال إضافة جزءًا صغيرًا من المستعمرة (مع ملاحظة ان الإفراط في التلقيح over inoculation يمكن ان يؤدي الى التثبيط الذاتي autoinhibition في انتاج الأنبوب الجرثومي) الى انبوبة اختبار تحتوي 0.5 مل من مصل الانسان human serum وتم وضعها في حاضنة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 3 ساعة وبعدها تؤخذ قطرة لغرض الفحص تحت المجهر الضوئي ، إذ يلاحظ ان التكوين الاولي للانبوب الجرثومي القصير لا يرافقه حصول تقلص في منطقة الانبثاق من البوغ البرعمي ويعد ذلك صفة تشخيصية للنوعين *Candida albicans* و *Candida dubliniensis*.

3-3-2-4-3 اختبارات التخمر

تختلف اختبارات التخمر Fermentation tests عن تلك المستخدمة في التشخيص البكتريولوجي في كون تركيز سكر الكلوكوز المستخدم هو 3 % ، تستخدم في هذا الاختبار انابيب دورهام Durham tubes من اجل الكشف عن تكوين الغاز ، ويعد حجم 10 مل من الوسط الزرع مفضل لتشجيع حصول التخمر بدلا من الاكسدة. وبناءا على ذلك تم تلقيح جزءا صغيرا من الخميرة قيد الاختبار في مجموعة من الاوساط السكرية (كلوكوز glucose ، مالتوز maltose ، لاكتوز lactose ، رافينوز raffinose ، و كالاكتوز galactose وتم حضن المزارع على درجة حرارية 25-30 درجة مئوية ولمدة 7 ايام ويعد انتاج الغاز دليل واضح على حصول التخمر (Collins وآخرون ، 2004).

3-3-2-4-4 التصبغ بصبغة كرام والفحص المجهرى المظهري (المورفولوجي)

تم إجراء التصبغ بصبغة كرام وفقاً للطريقة الموصوفة في (الحديثي، 1983).

ومن خلال الفحص المجهرى والمظهري تم تشخيص الخمائر والفطريات بالاعتماد على الصفات المظهرية للمستعمرة على الطبق من حيث اللون وطبيعة الغزل الفطري والصفات الدقيقة للغزل الفطري تحت المجهر وطبيعة تكوين الكونيدات وتجمعاتها اعتماداً على (Moris وآخرون ، 2008). وتم أخذ قليل من الغزل الفطري من حافة النمو الفطري بواسطة ناقل معقوف Transfer Loop بعمر 3 أيام ووضع على وسط شريحة زجاجية ثم أضيفت إليه قطرة من صبغة اللاكتوفينول الزرقاء وبعد تثبيت غطاء الشريحة فحصت تحت المجهر الضوئي بقوة التكبيرية 10 X و 40X لمشاهدة شكل وطبيعة المستعمرة ، وجود وطبيعة الغزل الفطري من عدمه وشكل وحجم البوغ وطريقة نشوئه ، الخيوط الفطرية الزائفة pseudomycelia ، الابواغ المفصلية arthrospores ، الابواغ المتدثرة chlamydospores ، والكبسولات capsules (Collins وآخرون ، 2004) وتم تشخيص الخمائر اعتماداً على الصفات المظهرية والكيموحيوية (Barnett وآخرون ، 2002).

3-3-2-4-5 التشخيص بنظام الفايترك

تم تشخيص سلالات الخمائر المعزولة باستخدام التشخيص بنظام الفايترك Vitek compact2 system diagnosis في (مختبرات النخبة / بغداد - فرع الواثق). يُعد نظام الفايترك من الأنظمة التشخيصية الحديثة والسريعة في تشخيص الخمائر والبكتيريا ، إذ يعطي نتائج دقيقة تصل دقتها إلى 99% ولغرض التأكد من عزلات الخمائر إستُخدِمَ النظام أعلاه وحسب تعليمات الشركة المجهزة له وفقاً لـ (Pincus، 2020):

1- تم زرع عزلات الخمائر على الوسط الزرعي MSM agar وحُضِنَت بدرجة حرارة 37 درجة مئوية ولمدة 24 ساعة.

2- تم تحضير عالق من مزرعة الخميرة التي يرام تشخيصها واستخدمت عصا معقمة وذلك لنقل مستعمرة واحدة على ان تكون منفردة ونقية من كل طبق إلى أنابيب اختبار حاوية على 3 مل من المحلول الملحي الفسلجي (محلول مائي لكلوريد الصوديوم بتركيز 0.45 إلى 0.50 % ، ثم خُفِّفَت عكورة النمو للحصول على عالق كثافته تتراوح بين 1.80 - 2.20 وهو مدى عكورة المعلق المستخدمة للتلقيح الخاص ببطاقة تشخيص الخمائر والكائنات التي تشبه الخميرة (YST) وتم ذلك باستخدام جهاز قياس العكارة turbidity meter نوع DensiChek™ ، والذي يكافئ 1.5×10^8 خلية. مل⁻¹.

3- تم تلقيح البطاقة التشخيصية للخمائر، من نوع (YST) بمعلق الخمائر المعزولة قيد الدراسة .

3-3-2-4-6 الاختبار الاولي لقدرة الخمائر التحليلية للمركبات النفطية

يتم اجراء الاختبار الاولي للقدرة التحليلية Preliminary test for degradation ability ،بالنسبة للمركبات الاروماتية النفطية من قبل الخمائر التي تم عزلها وتنقيتها في الخطوات السابقة من خلال تنميتها في اطباق الوسط الزرعي YNB 67 % (وزن/حجم) واطباق الوسط الزرعي MSM agar ، التي تحتوي النفط بتركيز 0.5 % (حجم/حجم) ثم توضع الاطباق في الحاضنة في درجة حرارة 30 درجة مئوية لمدة اسبوع واحد ويتم اختيار سلالة خمائر المبيضات التي تظهر مقدرة تحليلية عالية للنفط لغرض استخدامها في هذه الدراسة واستخلاص الانزيمات المحللة منها (Farag و Soliman ، 2011).

3-2-3-5 المزارع الاحادية للخمائر

3-2-3-5-1 تحضير المزارع الاحادية للخمائر

لغرض تحضير المزارع الاحادية النقية axenic culture للخمائر المعزولة أنتقيت المستعمرات المنفردة والنقية لخمائر المبيضات بعد ان تم عزلها و تنقيتها بالمعاملة بالمضادات الحياتية وباستعمال لوب البلاتين المعقم أنتقيت المستعمرات بحذر وبحسب الخصائص المورفولوجية للمستعمرات الخاصة بكل نوع منها واجري لها استزراع متعاقب مكرر duplicates في اطباق بتري حاوية على الوسط الزراعي MSM agar المكمل باضافة 50 مايكروغرام.مل⁻¹ من الأمبيسيلين كمضاد حيوي مثبط للنمو البكتيري (Bleve وآخرون ، 2012).

3-2-3-5-2 حفظ المزارع الاحادية للخمائر

تم حفظ مزارع الخمائر على وسط زرع صلب ومائل slope agar مزود بالاملاح المعدنية الضرورية MSM agar لديمومتها مع الفينول كمصدر وحيد للكربون والطاقة ، وتم الحفظ في 4 درجة مئوية (Stiborova وآخرون ، 2003).

3-4 قدرة بقاء الخمائر وتحطيمها لبعض المركبات الفينولية

3-4-1 اختبار قدرة الخمائر في تحطيم المركبات الفينولية

تم تنمية الخمائر المعزولة والمشفعة ضمن مجموعتين من المزارع الاساسية احدهما مكملة مع الفينول والاخرى مع الكاتيكول بمقدار 5 % في دوارق زجاجية حاوية على 500 مل من الوسط الزراعي MSM و YNB 67 % (وزن/حجم) (Farag و Soliman ، 2011) ، واختبرت قدرتهما على النمو وتحطيم المركبات الفينولية (الفينول والكاتيكول) من خلال اختبارهما ضمن مجموعتين من المزارع الفرعية الاولى تضمنت تركيز فينولي 20 ملي مولار والمجموعة الثانية من المزارع الفرعية تضمنت تدرج تركيز كاتيكولي 40 ملي مولار وقد اختبرت هذه المزارع

من خلال حقنها بكثافة اولية لخلايا الخمائر initial cell density (ICD) من المزرعة الاساسية ، تبلغ 0.02 لكل 1 مل من الوسط الزرعي والتي تم تحديدها باستخدام المطياف على الطول الموجي 600 نانومتر وبثلاثة مكررات (Tsai وآخرون ، 2005). ثم نقلت المزارع الفرعية بعد مزجها جيدا الى ظروف حضانة مختلفة من حيث المدة الزمنية بحسب نوع الفحوصات التي اجريت عليها والتي شملت :

1. تقدير المتبقي من التركيز الابتدائي للفينول 20 ملي مولار ، بعد اضافة الخميرة الى المزارع الفرعية في مدة حضانة مختلفة : 1 و 2 و 3 و 4 و 5 و 6 ايام وفي درجة حرارة 30 درجة مئوية وكما هو مبين في الملحق 3-10.

2. تقدير المتبقي من التركيز الابتدائي للكاتيكول 40 ملي مولار ، بعد اضافة الخميرة الى المزارع الفرعية في مدة حضانة مختلفة : 1 و 2 و 3 و 4 و 5 و 6 ايام وفي درجة حرارة 30 درجة مئوية وكما هو مبين في الجدول الملحق 3-11.

3. تقدير المتطلب البيوكيميائي للاوكسجين الذائب في المزارع الفرعية الفينولية والكاتيكولية بعد اضافة الخمائر في مدة حضانة 5 ايام و على درجة حرارة 20-25 درجة مئوية (مولود وآخرون ، 1990) بإستعمال حاضنة BOD وكما مبينة في الملحق 3-12.

4. تقدير الكتلة الحيوية للخمائر قيد الحياة في المزارع الفرعية الفينولية والكاتيكولية بطريقة الوزن الجاف من خلال العلاقة بين الامتصاصية مع الوزن الجاف الموصوفة في (Gargouri وآخرون ، 2015).

3-4-1-1 تقدير متبقي الفينول في مزارع الخميرة الفرعية

تم تقدير قيم تراكيز الفينول المتبقي بعد اضافة الخميرة الى المزارع الفرعية للفينول بالطريقة اللونية 4-aminoantipyrine colorimetric method إذ أن قيم تركيز الفينول المتبقي والموجود في الراشح يعتمد على انتاج صبغة الأنثيبيرين الحمراء antipyrine dye (Liu وآخرون ، 2011) وقد تضمنت خطوات الفحص بعد التحوير مايلي:

- 1- حضرت محاليل قياسية بحجم 1.5 مل ضمن انابيب ايندروف Eppendorf سعة 1.5 مل تحتوي على ركيزة الفينول القياسي بتركيز 20 ملي مولار والتي تم تحضيرها من محلول خزن للفينول القياسي الذي تم تحضيره مسبقا بتركيز 0.1 مولار وباستخدام الماء المعقم المنزوع الايونات Sterile Deionized Water (SDIW) على ان تكون من ضمنها اضافة الخميرة 100 مايكروليتر من مزرعة الخميرة قيد الدراسة.
- 2- خلطت جيدا وتركت في مدة حضانة مختلفة : 1 و 2 و 3 و 4 و 5 و 6 ايام وعلى درجة حرارة 30 درجة مئوية من خلال وضعها في الحمام المائي الهزاز shaking water bath.
- 3- قيست الامتصاصية على الطول الموجي 600 نانومتر لغرض تقدير الكتلة الحيوية للخمائر لاحقا من خلال العلاقة مع الوزن الجاف بحسب طريقة (Gargouri وآخرون ، 2015).
- 4- اجري النبذ المركزي باستخدام micro centrifuge بمقدار 4000 دورة. دقيقة⁻¹ لمدة 10 دقيقة على 1.5 مل من عينات الوسط الزرعي.
- 5- أستخدم 150 مايكروليتر من الرائق لتقدير الفينول المتبقي بوساطة الطريقة اللونية 4-aminoantipyrine المحورة لقياس الامتصاصية بجهاز قارئ الصفيحة الميكروية microplate reader وأستخدم الراسب في الخطوة الاخيرة الخاصة لتقدير الكتلة الحيوية للخمائر قيد الحياة بعد المعاملة.
- 6- استخدم 150 مايكروليتر من الرائق واضيفت اليه 25 مايكروليتر من 20 % محلول كلوريد الامونيوم NH_4Cl المحضر في محلول دارئ الامونيا ، 50 مايكروليتر من محلول فيروسيانيد البوتاسيوم $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 8 % مع ضبط الاس الهيدروجيني للمحلول الى pH: 7.9-10 و من ثم اضافة 50 مايكروليتر من محلول الكاشف اللوني 4-aminoantipyrine 2 % لكي ينتج بتفاعله مع الفينول صبغة برتقالية ، تحت الظروف القاعدية .
- 7- بعد خلط المحلول جيدا ترك لمدة 10 دقائق للتفاعل وإنتاج اللون وبعدها تمت قراءة طيف الامتصاص اللوني على الطول الموجي 500 نانومتر باستخدام microplate reader.

8- حد الكشف لتركيز الفينول بهذه الطريقة يبلغ 0.1 ملغم . لتر⁻¹ لذلك وفي حال وجود تراكيز فينولية اقل من حد الكشف بهذه الطريقة لايلاً الى تخفيف الراشح ويستخدم في التحليل بشكل مباشر .

9- تم تحضير المنحني القياسي calibration curve باستخدام محلول الفينول القياسي standard phenol بتركيز 0 و 3 و 6 و 9 و 12 و 15 و 18 و 21 و 24 و 27 و 30 ملي مولار من محلول خزن الفينول ذي تركيز 0.1 مولار (تجرى نفس الخطوات والاضافات باستثناء استبدال اضافة الخميرة بالماء المعقم منزوع الايونات) ومن ثم قيست الامتصاصية على الطول الموجي 500 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف لكل تركيز لرسم المنحني القياسي بين التركيز بوحدة ملي مولار و الكثافة الضوئية optical density (O.D.) الناتجة عن الامتصاصية وبعده استخراج معادلة الميل ليتم الاستفادة منها في تقدير قيم تراكيز الفينول المتبقية للعينات المدروسة المبينة اعلاه.

3-4-1-2 تقدير متبقي الكاتيكول في مزارع الخميرة الفرعية

تم تقدير قيم تراكيز الكاتيكول المتبقي بعد اضافة الخميرة الى المزارع الفرعية للكاتيكول وفقاً للطريقة المحورة لطريقة Fujita وآخرون (1985) وهي طريقة لونية تستخدم جهاز المطياف spectrophotometrically وهذه الطريقة تقيس الكاتيكول المتكون اعتماداً على التفاعل اللوني للكاتيكول مع الحديد الثلاثي (III) iron والكاشف phenylfluorone (a xanthene dye) و يبلغ الحد الأدنى للكشف عن الكاتيكول في هذه الطريقة 10 مايكرومولار وقد تضمنت خطوات الفحص بعد التحويل مايلي:

1- حضرت محاليل قياسية بحجم 1.5 مل ضمن انابيب ابندروف سعة 1.5 مل تحتوي على ركيزة الكاتيكول القياسي بتركيز 40 ملي مولار والتي تم تحضيرها من محلول خزن للكاتيكول القياسي تم تحضيره مسبقاً بتركيز 0.1 مولار و باستخدام الماء المعقم منزوع الايونات على ان تكون من ضمنها اضافة الخميرة 100 مايكروليتر من مزرعة الخميرة قيد الدراسة.

2- خلطت جيداً وتركت في مدة حضانة مختلفة: 1 و 2 و 3 و 4 و 5 و 6 ايام وعلى درجة حرارة 30 درجة مئوية من خلال وضعها في الحمام المائي الهزاز.

- 3- قيست الامتصاصية على الطول الموجي 600 نانومتر لغرض تقدير الكتلة الحيوية للخمائر لاحقا من خلال العلاقة مع الوزن الجاف بحسب طريقة (Gargouri وآخرون ، 2015).
- 4- تم اجراء النبذ المركزي باستخدام micro centrifuge بمقدار 4000 دورة . دقيقة⁻¹ لمدة 10 دقيقة على 1.5 مل من عينات الوسط الزراعي.
- 5- أستخدم 150 مايكروليتر من الرائق لتقدير الكاتيكول المتبقي بوساطة طريقة Fujita وآخرون (1985) لقياس الامتصاصية بجهاز قارئ الصفيحة الميكروية وأستخدم الراسب في الخطوة الاخيرة الخاصة لتقدير الكتلة الحيوية للخمائر قيد الحياة بعد المعاملة.
- 6- استخدم 150 مايكروليتر من الرائق واضيفت اليه 75 مايكروليتر من دارئ بيكربونات الصوديوم بتركيز 0.1 مولار والمكون من (كربونات الصوديوم Na_2CO_3 0.1 مولار - كربونات الصوديوم الهيدروجينية NaHCO_3 0.1 مولار).
- 7- اضيفت 20 مايكروليتر من polyoxyethelene monolauryl ether المذابة بالميثانول (Acros Organics) او (Tween 80) بتركيز 5 % (حجم/حجم) الذي تمت اذابته بالميثانول ايضا عند التحضير.
- 8- اضيفت 15 مايكروليتر من كبريتات الامونيوم - ثلاثي الحديد iron (III) ammonium sulfate بتركيز 1 ملي مولار $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.
- 9- اضيفت 15 مايكروليتر من الكاشف اللوني Phenylfluorone (Acros Organics) $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{O}_5$ بتركيز 1 ملي مولار (وزن/حجم) وقد تمت الاذابة بالميثانول عند التحضير.
- 10- بعد خلط المحلول جيدا ترك لمدة 1- 2 دقيقة للتفاعل وإنتاج اللون الاحمر وبعدها تم قراءة طيف الامتصاص اللوني على الطول الموجي 630 نانومتر باستخدام جهاز قارئ الصفيحة الميكروية.
- 11- حد الكشف لتركيز الكاتيكول بهذه الطريقة يبلغ 10 مايكرومولار (Tao وآخرون ، 2004) لذلك وفي حال وجود تراكيز كاتيكولية اقل من حد الكشف بهذه الطريقة لايلجأ الى تخفيف الراشح ويستخدم في التحليل بشكل مباشر.

12- حضر المنحني القياسي بإستخدام الكاتيكل القسائي بتركيز 4 و 8 و 12 و 16 و 20 و 24 و 28 و 32 و 36 و 40 ملي مولار من محلول خزن الكاتيكل ذي تركيز 0.1 مولار (تجرى نفس الخطوات والاضافت باستثناء استبدال اضافة الخميرة بالماء المعقم منزوع الايونات) ومن ثم قيست الامتصاصية على الطول الموجي 630 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف لكل تركيز لرسم المنحني القياسي بين التركيز بوحدة (ملي مولار) و الكثافة الضوئية O.D. الناتجة عن الامتصاصية وبعده تم استخراج معادلة الميل ليتم الاستفادة منها في تقدير قيم تراكيز الكاتيكل المتبقية للعينات المدروسة المبينة اعلاه.

3-4-2 المتطلب البيوكيميائي للاوكسجين أثناء تحليل للمركبات الفينولية

لقياس المتطلب البيوكيميائي Biochemical Oxygen Demand (BOD) لابد من قياس كمية الاوكسجين الذائب Dissolved Oxygen في نماذج العينات (الابتدائي والنهائي) والتي تمت من خلال اسلوبين و من ثم اخذ معدل القرائتين والاسلوبين هما :

3-4-2-1 قياس الاوكسجين الذائب بطريقة ونكلر

اتبعت طريقة ونكلر Winkler method الموضحة في (كاظم، 2008؛ عباوي وحسن ، 1990؛ مولود واخرون ، 1990) والتي تم تحويلها بما يتوافق مع هذه الدراسة ويمكن اختصارها بالخطوات التالية:

1- تم تحضير مجموعتين من المحاليل قياسية بحجم 250 مل ضمن قناني خاصة بمواصفات قنينة ونكلر (معتمة ، بسعة 250 ، وذات غطاء قابل للبرغ) ، المجموعة الاولى تحتوي على ركيزة الفينول القياسي بتركيز 20 ملي مولار والمجموعة الاخرى تحتوي على ركيزة الكاتيكل القياسي بتركيز 40 ملي مولار والتي تم تحضيرها من محاليل خزن للفينول والكاتيكل القياسي على ان تكون من ضمنها اضافة الخميرة بمقدار 16.7 مل من مزرعة الخميرة قيد الدراسة بكثافة اولية لخلايا الخمائر (ICD) من المزرعة الاساسية تبلغ 0.02 على الطول الموجي 600 نانومتر لكل 1 مل من الوسط الزراعي وعملت ستة قناني لكل معاملة اي 6 مكررات .

2- قيست كمية الاوكسجين الذائب الابتدائي (قبل الشروع باضافة الخميرة) (D_0) بإستخدام احدى قناني المكررات لنفس المعاملة وتم اخضاعها لخطوات طريقة ونكلر لقياس الاوكسجين الذائب و

إخذت قنينة ثانية من المكررات ولنفس المعاملة لقياس الاوكسجين الذائب باستخدام جهاز قياس الاوكسجين DO-meter ، كما واخذت قنينة ثالثة من المكررات ولنفس المعاملة لغرض قياس الامتصاصية فيها على الطول الموجي 600 نانومتر لتقدير الكتلة الحيوية للخمائر من خلال علاقة الامتصاصية مع الوزن الجاف (Gargouri وآخرون ، 2015) ثم اجري عليها النبذ المركزي بمقدار 4000 دورة. دقيقة⁻¹ لمدة 10 دقيقة لغرض اخذ الراسب واستخدامه في تقدير الكتلة الحيوية للخمائر قيد الحياة بعد المعاملة. اما القناني الثلاثة الاخرى لمكررات نفس المعاملة فقد وضعت في حاضنة BOD لمدة 5 ايام وبدرجة حرارة 20-25 درجة مئوية ثم اجريت عليها نفس القياسات ليتم قياس كمية الاوكسجين الذائب النهائي (D₅) والكتلة الحيوية.

3- تم حساب كمية الاوكسجين الذائب وفقا للمعادلة الآتية :

$$\text{كمية الاوكسجين الذائب} = \frac{(\text{حجم ثايوسلفات الصوديوم}) \times 200 \times \text{عياريته } 0.025}{\text{حجم الماء المراد فحصه } 50 \text{ مل}}$$

ملغم. لتر⁻¹

إذ أن : الرقم 200 يمثل 1 مل من ثايوسلفات الصوديوم ذي العيارية 0.025 ع والتي تعادل 1 ملغم من الاوكسجين الذائب في اللتر الواحد من عينة الماء ذات حجم 200 مل .

4- تم احتساب المتطلب البيوكيميائي (BOD) للعينات من خلال المعادلة الآتية :

$$\text{BOD ملغم. لتر}^{-1} = \text{كمية الاوكسجين الذائب (D}_0\text{)} - \text{كمية الاوكسجين الذائب (D}_5\text{)}$$

3-4-2-2 قياس الاوكسجين الذائب بواسطة جهاز DO-meter

تم قياس كمية الاوكسجين الذائب في المزارع الفينولية والكاتيكولية المعاملة بالخمائر قيد الدراسة باستعمال جهاز قياس الاوكسجين الذائب (DO-meter) من نوع Oxi 3210-WTW وتعد هذه الطريقة صالحة لاكثر انواع المياه وينصح باستخدامها خاصة في حالة وجود تداخلات

ايونية لايمكن التغلب عليها حتى في حالة تطبيق تحويلات ونكلر(عباوي وحسن ، 1990) وتم تحديد كمية الاوكسجين الذائب الابتدائي (قبل الشروع باضافة الخميرة) (D_0) و كمية الاوكسجين الذائب النهائي (D_5) بعد مرور خمسة ايام من اضافة الخميرة باستخدام حاضنة BOD بدرجة حرارة 20-25 درجة مئوية.

3-4-3 تقدير الكتلة الحيوية للخمائر على أساس الوزن الجاف

تم تقدير تركيز الكتلة الحيوية للخمائر من خلال تحديد وزنها الجاف بحسب طريقة (Liu وآخرون، 2011) إذ أخذ الراسب من الخطوات السابقة لتقدير الفينول والكاتيكول في مزارع الخمائر وتم غسله لمرتين على الأقل بأسلوب النبذ المركزي باستخدام الماء المعقم المنزوع الايونات وبعدها جففت الى وزن ثابت في درجة حرارية تبلغ 80 درجة مئوية وبعدها تم تحديد وزنها الجاف. والذي تم الاستفادة منه في تقدير الكتلة الحيوية للخمائر من خلال العلاقة بينه والامتصاصية للوسط الزراعي للمزارع الفرعية للفينول والكاتيكول بعد حقنها بالخمائر قيد الدراسة وعلى الطول الموجي 600 نانومتر باستخدام جهاز المطياف. ومن خلال رسم منحنى قياسي وفقاً للعلاقة المحددة في الخطوات السابقة بين الكثافة الضوئية الناجمة عن الامتصاصية والوزن الجاف للكتلة الحيوية (Gargouri وآخرون ، 2015).

3-5 الاستخلاص الانزيمي من الخمائر المنتقا ذات القدرة التحليلية

3-5-1 الاختبار الابتدائي النوعي للكشف عن نشاط انزيمات Dioxygenase

بعد ان تم تحديد انواع المبيضات ذات القدرة التحليلية للمركبات الفينولية تم اجراء فحص نوعي لتحديد وجود أنشطة الإنزيمات Catechol 1,2-dioxygenase و Catechol 2,3-dioxygenase وفقاً للنهج المتبع من قبل Filipowicz وآخرون (2020)، إذ تم اختبار مزارع الخميرة ذات القدرة التحليلية العالية للكاتيكول من خلال استخدام الصفيحة الميكروية (96 حفرة) للتحري عن نشاط الانزيم Catechol 1,2-dioxygenase ،اذ تم تحضيرمحلول يحتوي على 0.004% من الفينول الأحمر phenol red ، 1 ملي مولار EDTA و 10 ملي مولار من الكاتيكول ثم تم ضبط الاس الهيدروجيني بمقدار 7.5 باستخدام هيدروكسيد الأمونيوم. واضيف الى 150 ميكروليتر من هذا المحلول 50 ميكروليتر من مزرعة الخميرة السائلة لكل خميرة محللة

للكاتيكول بعد ان ضبطت الامتصاصية لمزارع الخميرة بمقدار 1 على الطول 600 نانومتر .
ويعد هذا الاختبار موجبا اذا تغير لون العينات التي تم فحصها من الأحمر إلى الأصفر البرتقالي
في غضون 10 دقائق عند وضعها في الظلام في درجة حرارة الغرفة ، إذ يعد هذا التغير اللوني
بسبب وجود نشاط لانزيم Catechol 1,2-dioxygenase.

أما تحديد نشاط Catechol 2,3-dioxygenase فقد تم كما هو موصوف بواسطة
Filipowicz وآخرون (2020)، إذ تمت إضافة 150 ميكرو لتر من المحلول المحتوي على 90
ملي مولار من الكاتيكول في محلول 50 ملي مولار من دارئ tris-acetate بدرجة الحموضة
7.5 إلى 50 ميكرو لتر من المزرعة السائلة للخميرة ذات القدرة التحليلية للكاتيكول بعد ان
ضبطت الامتصاصية لمزارع الخميرة بمقدار 1 على الطول 600 نانومتر. وعند حدوث تكوين
لون أخضر - بني خلال ساعتين في العينات التي تم فحصها عند وضعها في الظلام في درجة
حرارة الغرفة ، يدل ذلك فحص موجب ناجم عن نشاط الانزيم Catechol 2,3-
dioxygenase.

3-5-2 استخلاص وتنقية الانزيم catechol 1,2-dioxygenase

تم استخلاص وتنقية الانزيم catechol 1,2-dioxygenase من خميرة *Candida albicans*
وتقدير فعالية الانزيم وفقا للطريقة الموصوفة من قبل Tsai و Li (2007) ، إذ نمت مزارع
الخميرة *C. albicans* ذات القدرة التحليلية للكاتيكول في 8 دوارق ايلرنماير سعة 2 لتر في
درجة حرارة 30 درجة مئوية على ان يحتوي كل دورق 800 مل من الوسط الزراعي MSM او
YNB 0.67 % (وزن/ حجم) و 10 ملي مولار من الفينول بمقدار كثافة خلايا ابتدائي ICD
من المبيضات *C. albicans* يبلغ OD 0.02 ناجمة عن امتصاصية باستخدام جهاز المطياف
على الطول الموجي 600 نانومتر وتم البدء بحصد خلايا الخميرة عندما وصل نمو السلالة الى
مرحلة طور الثبات Stationary phase اي عندما بلغت الكثافة الضوئية الناجمة عن
الامتصاصية تقريبا 1.4 على الطول الموجي 600 نانومتر ونقلت خلايا المبيضات المحصودة
الى التجميد بدرجة حرارية منخفضة تصل الى دون الصفر المئوي وقد استخدم لهذا الغرض فريز
الثلاجة تمهيدا لاجراء خطوات التنقية الانزيمية وقد أجريت جميع عمليات تنقية الإنزيم عند درجات
حرارية منخفضة تتراوح بين (صفر إلى 6) درجات مئوية وفقاً للخطوات التالية:

(1): **المستخلص الانزيمي الخام** : تمت إذابة الخلايا المجمدة من المبيضات *C. albicans* التي تم حصادها من مزرعة الخميرة في مرحلة طور الثبات بمقدار 30 غم (وزن رطب) ثم تعليقها في 150 مل من دارئ Tris-HCl 20 ملي مولار ، pH: 8.0 (الدارئ A) بعدها اجري تحطيمها باستخدام مذبذب الموجات فوق الصوتية Kubota 200 M بتذبذب 180 واط لمدة 20 دقيقة مقسمة على فترات كل فترة 2 دقيقة في حاوية زجاجية محكمة الغلق وبحجم 30 مل (مع مراعاة تبريد العينة بالثلج بين فترات التحطيم للخلايا) و تم فصل وإزالة الخلايا السليمة Intact cells وحطام الخلايا cell debris عن طريق النبذ المركزي باستخدام جهاز النبذ المركزي المبرد cooling centrifuge عند $20000 \times g$ لمدة 40 دقيقة وبذلك تم الحصول في هذه الخطوة على المستخلص الانزيمي الخام CEE crude enzyme extract في السائل الطافي supernatant fluid (الجزء - 1) (Fraction -1).

(2): **التجزئة بكبريتات الأمونيوم**: اضيفت كبريتات الأمونيوم المطحونة الى المستخلص الانزيمي الخام CEE الذي تم الحصول عليه في الخطوة السابقة للحصول على نسبة تشبع 30 % (وزن / حجم) مع التحريك المستمر و تقليب الخليط لمدة 30 دقيقة ثم اجري النبذ المركزي على المحلول باستخدام جهاز النبذ المركزي المبرد عند ($20000 \times g$) لمدة 20 دقيقة ثم اهلل الراسب واضيفت كبريتات الأمونيوم الى الراشح للحصول على نسبة تشبع 55 % مع التحريك والتقليب المستمر لمدة 30 دقيقة اجري النبذ المركزي على المحلول باستخدام جهاز النبذ المركزي المبرد عند $20000 \times g$ لمدة 20 دقيقة وتم تعليق الراسب باذابته في 18 مل من الدارئ A ، والذي يمثل (الجزء - 2) (Fraction -2).

(3): **معاملة بكبريتات الستربتومايسين** : تم اضافة كبريتات الستربتومايسين بتركيز 2% (وزن / حجم) المحضر باستعمال الدارئ (A) الى (الجزء - 2) بتركيز محلول نهائي 1 % (حجم / حجم) اي 1 مل من كبريتات الستربتومايسين لكل 100 مل مع التحريك المستمر للمحلول لمدة 30 دقيقة ثم اجري النبذ المركزي على المحلول باستخدام جهاز النبذ المركزي المبرد عند $20000 \times g$ لمدة 20 دقيقة ثم اهلل الراسب وتم الحصول على الراشح (السائل الطافي) وهو يمثل (الجزء - 3) (Fraction -3) .

3-5-3 تحديد التركيز الكلي للبروتين الانزيمي

تم تحديد التركيز البروتيني للمستخلصات الانزيمية بطريقة برادفورد بحيث تم تعريف وحدة واحدة من النشاط او الفعالية الانزيمية لانزيمات قيد الدراسة ، على أنها كمية الإنزيم التي تكون 1 ميكرومول من المنتج لكل دقيقة عند 40 درجة مئوية وتم التعبير عن الفعالية النوعية specific activity بوحدة واحدة U لكل ملغم من البروتين (Hupert-Kocurek وآخرون ، 2012).

3-5-4 خطوة اذابة وتنظيف الانزيم

أجريت خطوة اذابة وتنظيف الانزيمات بهدف القضاء على التداخلات المحتملة مثل الأملاح ، السكريات إذ تم وضع 1 مل من المستخلص الانزيمي الخام CEE في أنبوب اختبار (في ثلاث مكررات) مع إضافة 3 مل من الأسيتون / الإيثانول عند 0 درجة مئوية بنسبة 1:3 (حجم/ حجم) في كل أنبوب ثم أخذت إلى التجميد العميق deep freezing (اقل من الصفر المئوي) لمدة 1 ساعة لترسيب البروتين وبعد ذلك تم اجراء النبذ المركزي للأنايبب عند $g \times 1800$ لمدة 3 دقائق وتم إزالة الجزء القابل للذوبان وتم تكرار إجراء التنظيف ثلاث مرات وبعد تبخر خليط الأسيتون / الإيثانول بالكامل (عند درجة حرارة الغرفة) تمت إذابة البروتينات بمقدار 1 مل من محلول دارئ الفوسفات 0.1 مول. لتر⁻¹ ذي الاس الهيدروجيني pH:7 (Da Silva وآخرون ، 2013).

3-6 تقيد الانزيم catechol 1,2-dioxygenase (C12O)

3-6-1 تحضير اغشية مواد التقيد

شملت الدراسة التقيد الانزيمي للإنزيمات قيد الدراسة على ثلاثة انواع من مواد التقيد وهي : غشاء (سليكا جب الدايتوم) Diatom Frustule Silicon (DFS) ذات الترشيح النانوي بحجم المسام (المايكرولية - النانوية) ، غشاء (البولي اكريل اميد) Polyacrylamide (PAA) ذات الترشيح الدقيق microfiltration بمعدل حجم مسام 0.2 مايكرومتر، وغشاء (البولي اكريل نايتريل) Polyacrylonitrile (PAN) ذات الترشيح الدقيق ultrafiltration بمعدل حجم مسام 0.01 مايكرومتر والتي تم تحضيرها كما موضح في ادناه.

3-6-1-1 تحضير السليكا الحيوية لجب الدايتومات

استخدمت الطريقة القياسية في ازالة المواد العضوية والكربونية من نماذج الدايتومات التي تم الحصول عليها من النهر تبعا لطريقة Abrantes واخرون المحورة (Abrantes واخرون ، 2005)، وهي بإختصار تتم من خلال الخطوات التالية :

1. تم امرار 2 غرام من نماذج الدايتومات التي جمعها في الخطوات السابقة في بيكر ذو حاجز تفلون Teflon beaker و تسخينها الى درجة 60 درجة مئوية في محلول 30 % H_2O_2 (وزن/وزن) لمدة 2 ساعة.

2. غسلت عينة الدايتومات لثلاث مرات باستعمال الماء المقطر وجهاز النبذ المركزي بمعدل 2000 دورة لمدة 5 دقيقة ثم تم نقل الراسب المتكون الى بيكر ذو حاجز تفلون واضيف له 20 مل من محلول H_2SO_4 30 % (حجم/ حجم) ووضع في حاضنة بدرجة حرارة 105 درجة مئوية لمدة 12 ساعة.

3. تم غسل جسيمات السليكا الحيوية للدايتوم بالماء النقي وجففت في درجة حرارة 40 درجة مئوية.

3-6-1-2 تقييد سيليكاجب الدايتومات والبولي اكريل امايد والبولي اكريل نايتريل

تم استخدام تقنية انقلاب الطور phase inversion technique لتحضير اغشية التقييد التي شملت غشاء (سليكا جب الدايتوم) (DFS) Diatom Frustule Silicon ، غشاء (البولي اكريل Polyacrylamide (PAA)) ، وغشاء (البولي اكريل نايتريل) Polyacrylonitrile (PAN) وذلك من خلال اتباع الطريقة المحورة بحسب (Wu واخرون ، 2017) وهي كالتالي :

1- تم غمر 2 غم من مواد التقييد (DFS او PAN او PAN) في محلول يحتوي 8 غم من مادة N,N-dimethylformamid (DMF) ومع التحريك والتقليب المستمر في درجة حرارة 60 درجة مئوية ولمدة 4 ساعة لتكوين محلول من ماده هلامية متجانسة homogeneous gel.

2- تم وضع المحلول الهلامي المتجانس في مضخة تفريغ في درجة حرارة 37 درجة مئوية ولمدة 12 ساعة لضمان الخروج التام للفقاعات الهوائية.

3-6-2 تثبيت اغشية مواد التقييد على دعامة الزجاج

تم تثبيت اغشية (سليكا جب الدايتوم/ الزجاج) Diatom Frustule Silicon/ Glass (DFS / G) واغشية (البولي اكريل امايد / الزجاج) Polyacrylamide/Glass (PAA) واغشية (البولي اكريل نايتريل/ الزجاج) Polyacrylonitrile/Glass (PAN/G) ، وذلك من خلال اتباع الطريقة المحورة بحسب (Hlubikova واخرون، 2012) وهي كالتالي:

1. تم ترسيب مادة استر الميركابتول Mercaptol ester من نوع NOA 61 كبوليمر قابل للتطويع باستخدام الحرارة على شكل طبقة رقيقة وعلى مساحة 1.5 سنتيمتر مربع من شريحة زجاجية وتم ذلك بمساعدة النبذ بوساطة جهاز spin-coater مع اجراء عملية التطويع بالحرارة.
2. وضعت 10-20 مايكروليتر من المحلول الهلامي المتجانس لمواد لاغشية التقييد (DMF- DFS) او (DMF-PAA) او (DMF-PAN) على شكل طبقة رقيقة فوق الشريحة الزجاجية التي تم طليها استر الميركابتول مسبقا على ان لايتجاوز وزنها 250 ملغم وتم توزيعها على كامل الشريحة بمساعدة النبذ بوساطة جهاز spin-coater مع اجراء عملية التطويع بالحرارة واعيدت عملية المعالجة هذه مرة اخرى للحصول على الالتصاق الامثل.
3. وضعت الشرائح الزجاجية بعد تثبيت اغشية التقييد عليها في طبق بتري يحتوي على ماء منزوع الأيونات مع التحريك برفق لضمان التحويل الكامل للمادة الهلامي المتجانسة إلى حالة صلابة بحسب تقنية انقلاب الطور.
6. تم النقاط الشرائح المنتظمة التقييد واهمال الاخرى غير المنتظمة ، ثم تم غسلها بالماء المقطر 3-4 مرات. بعد ذلك ، تم نقلت الشرائح الزجاجية التي تم الحصول عليها إلى دورق لتخزينها لمزيد من الاستخدام.

3-6-3 التحويل الاميني والتنشيط الكيميائي لأغشية مواد التقييد

تم التحويل الاميني الكيميائي لاغشية مواد التقييد بعد تثبيتها على الزجاج من خلال اتباع الخطوات المحورة بحسب (Godjevargova واخرون ، 2006) وهي كالتالي:

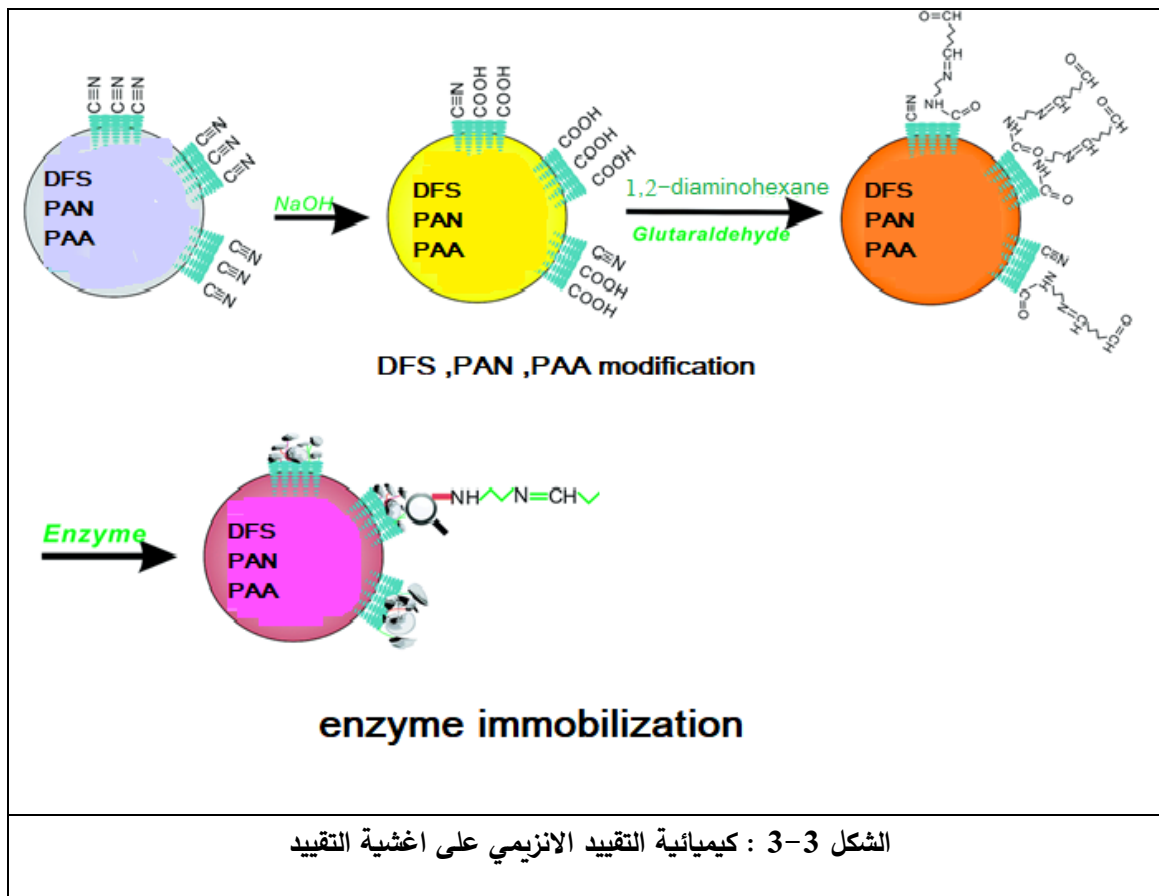
1. تمت معالجة أغشية مواد التقييد المثبتة على الشرائح الزجاجية والتي شملت : أغشية (DFS / G) ، (PAA / G) ، و (PAN/G) ، مع 10% من المحلول المائي لهيدروكسيد الصوديوم NaOH في درجة حرارة 50 درجة مئوية ولمدة 60 دقيقة.
2. بعد الغسل الكامل للأغشية بالماء المقطر ، تمت معالجتها بمحلول مائي بنسبة 10% 1,2-diaminohexane لمدة 60 دقيقة عند 40 درجة مئوية وسمح لها بالتفاعل مع التحريك المستمر في جهاز الرجّاج المغناطيسي (200) دورة / دقيقة. ، وبعدها تم تبريدها في درجة حرارة الغرفة .
3. تم غسلها بالأسيتون والايثانول لإزالة متبقيات الكواشف. ثم تجفيفها في درجة حرارة 40 درجة مئوية ولمدة 12 ساعة إلى وزن ثابت مقداره تقريبا 250 ملغم.
4. تم نقل الشرائح الزجاجية المثبت عليها أغشية التقييد DFS و PAA و PAN المحورة امينيا ، الى محلول مائي 5 % من الكلوتارالديهايد glutaraldehyde المحضر في دارئ الفوسفات Phosphate buffer ذي المواصفات البفرية بتركيز 0.1 مولار ؛ pH: 7.0 . ليتم تفاعل ارتباط الغلوتارالديهايد في درجة حرارة 35 درجة مئوية ولمدة 3 ساعة وبعد انقضاء مدة التفاعل ، تم غسل الاغشية المنشطة بالكلوتارالديهايد بالتتابع مع 0.1 مولار من محلول الحامضي acetic acid و 0.1 مولار من دارئ الفوسفات.

3-6-4 تقييد الانزيم على اغشية التقييد المحورة والمنشطة كيميائياً

- بعد اتمام اجراء التحويل الاميني والتنشيط الكيميائي بالغلوتارالديهايد لاغشية التقييد المثبتة على الشرائح الزجاجية ، تمت خطوات التقييد الانزيمي للانزيمات قيد الدراسة على تلك الاغشية من خلال الخطوات التالية بحسب (Wu واخرون، 2017).
1. تمت المعاملة الفورية للشرائح الزجاجية المثبت عليها أغشية التقييد DFS و PAA و PAN المحورة والمنشطة ، بمحلول الانزيم C12O قيد الدراسة ، المحضر في 4 مل من دارئ الفوسفات ذي المواصفات البفرية تركيزه 0.1 مولار ، pH: 7.0 والذي يحتوي بروتين بمقدار (16.7) ملغرام. مل⁻¹ المكافئ الى 256.3 وحدة انزيمية.مل⁻¹ .

2. وضعت الشرائح الزجاجية في حاضنة بدرجة حرارة 22 درجة مئوية ولمدة 8 ساعة لاتمام التفاعل. وبعد انقضاء مدة التفاعل تم غسل الاغشية المقيدة عليها الانزيم قيد الدراسة باستعمال دارئ الفوسفات Phosphate buffer بتركيز 0.1 مولار و pH: 7.0.

3. تم خزن الاغشية المقيدة عليها الانزيم في نفس الدارئ الى حين استخدامه والشكل 3-3 يبين كيميائية التقييد الانزيمي على اغشية التقييد .



4. تم تحديد كمية البروتين المقيد على اغشية DFS و PAA و PAN بطريقة Bradford method (Bradford, 1976). إذ تم تحديد تركيز الانزيم باستعمال مصل الالبومين البقري BSA Bovine Serum Albumin كبروتين قياسي. وتم حسابه من خلال المعادلة الاتية:

$$\frac{(C2 - C1) \times V}{w} = m$$

إذ أن:

m : الكمية الكلية للبروتين المقيد على اغشية التقييد المنشطة (ملغرام.غرام⁻¹).

C1: التركيز الابتدائي للإنزيم في وسط التقييد (ملغرام . مل⁻¹).

C2: التركيز النهائي للإنزيم في وسط التقييد (ملغرام . مل⁻¹).

V: حجم التفاعل (مل).

W: وزن اغشية التقييد المنشطة (غرام).

3-7 اختبارات فعالية التقييد الانزيمي

تم اختبار فعالية الانزيم المقيد Catechol 1,2-dioxygenase (EC 1.14.13.1) من خلال تقدير متبقي الكاتيكول بالطريقة اللونية Fujita وآخرون (1985) مع اجراء تحويل في طريقة الاضافة وكما هو موضح في الملحق 3-13 بما يتناسب مع الدراسة الحالية وباستخدام علب بلاستيكية specimen cup لكل اختبار مزودة بغطاء قابل للبرغ screw cap من نوع (QT) بسعة 60 مل على ان يكون الحجم الكلي للمواد المضافة في علبة الاختبار 60 مل فقط وقد تضمنت طريقة العمل والاضافات لكل علبة اختبار بعد التحويل مايلى :

1. لغرض اختبار مدى تاثير اختلاف الاس الهيدروجيني ودرجات الحرارة على فعالية الانزيم catechol 1,2-dioxygenase تم اضافة 32 مل من دورائ مختلفة بتركيز 50 ملي مولار، إذ استخدم دارئ خلات الصوديوم (pH: 5.0 – 6.0) sodium acetate buffer عند اجراء اختبار الفعالية في الوسط الحامضي واستخدم دارئ فوسفات البوتاسيوم (pH: 6.5–8.5)

potassium phosphate buffer عند اجراء اختبار الفعالية في الوسط المتعادل واستخدم دارئ Tris–acetate buffer (pH: 9.0 –10) عند اجراء اختبار الفعالية في الوسط القاعدي.

2. تم اضافة 4 مل من الانزيم C12O الحر (الذائب) او الانزيم المقيد على اغشية التقييد قيد الاختبار بوزن 250 ملغم على ان يكون التركيز المضاف في كلتا الحالتين 17.6 ملغم .مل⁻¹ أو ما يعادل فعالية انزيمية 256.3 وحدة.مل⁻¹ ولقد تمت الاضافة الانزيمية على اساس اختبار حالات الانزيم المختلفة والتي شملت : الانزيم الذائب (الحر) ، والانزيم المقيد واختبرت ثلاثة انواع للتقييد الانزيمي وهي كالاتي : التقييد على (جب الدايثوم/ الزجاج) DFS/G ، التقييد على (البولي اكريل اميد / الزجاج) PAA/G ، والتقييد على (البولي اكريل نايتريل/ الزجاج) PAN/G ، فضلا عن اختبار فعالية الانزيمات الذائبة والمقيدة في مراحل تنقية مختلفة شملت : المستخلص الانزيمي الخام CEE ، الترسيب بكبريتات الستربتومايسين SS ، والترسيب بكبريتات الامونيوم AS .

3. اضيفت ركيزة الكاتيكل بحجم 24 مل وبتركيز 40 ملي مولار الى خليط التفاعل وبمجرد اضافة الركيزة يبدأ التفاعل الانزيمي.

4. خلطت محاليل التفاعل في كل علبة اختبار جيدا وتركت بظروف حضانة مختلفة في حمام مائي هزاز من حيث درجة الحرارة: 15 ، 25 ، 35 ، 45 ، 55 درجة مئوية ولمدة 3 ايام.

5. بعد انقضاء مدة حضانة التفاعل تم اضافة 1.6 مل من بيروكسيد الهيدروجين H₂O₂ بتركيز 5 % (حجم / حجم)، لغرض تثبيط فعالية الانزيم catechol 1,2-dioxygenase .

6. تم سحب اجزاء من محلول التفاعل aliquots واجريت عليه نفس خطوات الطريقة اللونية الموصوفة من قبل Fujita وآخرون (1985) لتقدير متبقي الكاتيكلوكما هو مبين في الملحق 13-3.

3-8 التحليل الاحصائي

تم التحليل الاحصائي وفق تصميم القطاعات العشوائية Completely Randomized Blok Design (CRBD) و التصميم العشوائي الكامل Completely Randomized Design (CRD) بمستوى معنوية 0.05 و 0.01 (الراوي ، 2000) ، باستخدام نظام SPSS الإصدار 22 لسنة 2019.

4- النتائج والمناقشة

1-1-4 الفحوصات الفيزيائية والكيميائية لعينات المياه

الجدول 4-1: متوسط قيم المعلمات الفيزيائية والكيميائية لعينات المياه المأخوذة من مقطع نهر ديالى المار في قضاء بعقوبة خلال فترة الدراسة										
مواقع النمذجة على نهر ديالى										المتغيرات
D10	D9	D8	D7	D6	D5	D4	D3	D2	D1	
0.61	0.52	0.49	0.43	0.72	0.68	0.41	0.58	0.64	0.47	تدفق المياه متر.ثانية ⁻¹
19.6	19.2	19.0	18.3	22.0	21.3	16.8	19.4	20.1	17.5	حرارة الماء (° سيليزية)
7.0	6.7	6.8	6.6	7.3	7.6	6.7	7.4	7.1	6.4	pH
845	724	677	667	1053	993	621	701	831	635	EC مايكروسيمنز.سم ⁻¹
2.60	3.55	3.75	3.85	2.20	2.33	4.31	2.92	2.51	3.72	BOD ملغم.لتر ⁻¹
9.63	8.81	11.0	10.6	8.72	9.15	10.2	9.17	8.43	10.6	النترات الكلي ملغم.لتر ⁻¹
0.31	0.37	0.40	0.43	0.30	0.33	0.48	0.39	0.35	0.46	الفوسفات الكلي ملغم.لتر ⁻¹
CRD-ANOVA-One Way sample					P.value (α 0.05) = 15.75				F = 25.8*	

إذ بلغ متوسط قيم تدفق المياه في نهري دالي بين مناطق النمذجة 0.56 متر.ثانية¹ وبانحراف قياسي يبلغ 0.56 ± 0.12 متر.ثانية¹ وكانت الفروقات في متوسط قيم معدلات تدفق مياه النهر بين مواقع النمذجة معنوية ، إذ كانت أعلى قيم لتدفق المياه في مواقع النمذجة D6 و D5 و D2 والتي بلغت قيمها 0.72 و 0.68 و 0.64 متر.ثانية¹ على الترتيب ، بينما كانت أقل قيم لتدفق المياه في مواقع النمذجة D4 و D7 و D1 والتي بلغت قيمها 0.41 و 0.43 و 0.47 متر.ثانية¹ على الترتيب. بينما بلغ متوسط قيم الدرجات الحرارية للمياه بين مناطق النمذجة 19.3 درجة سيليزية وبانحراف قياسي يبلغ (19.3 ± 1.6) درجة سيليزية .وكانت الفروقات في متوسط قيم الدرجات الحرارية للمياه بين مواقع النمذجة معنوية ، إذ كانت أعلى قيم للدرجات الحرارية في مواقع النمذجة D6 و D5 و D2 والتي بلغت قيمها 22.0 و 21.3 و 20.1 درجة سيليزية على الترتيب ، بينما كانت أقل قيم للدرجات الحرارية في مواقع النمذجة D4 و D1 و D7 والتي بلغت قيمها 16.8 و 17.5 و 18.3 درجة سيليزية على الترتيب .

أما متوسط قيم الاس الهيدروجيني للمياه بين مناطق النمذجة فقد بلغ 6.96 وبانحراف قياسي يبلغ 6.96 ± 0.38 وكانت الفروقات في متوسط قيم الاس الهيدروجيني للمياه بين مواقع النمذجة معنوية ، إذ كانت أعلى قيم للاس الهيدروجيني في مواقع النمذجة D5 و D3 و D6 والتي بلغت قيمها 7.6 و 7.4 و 7.3 على الترتيب. وقد تبين ان متوسط قيم التوصيلية الكهربائية EC للمياه بين مناطق النمذجة بلغت 774.7 مايكروسيمنز.سم¹ وبانحراف قياسي يبلغ 774.7 ± 151.1 وكانت الفروقات في متوسط قيم التوصيلية الكهربائية للمياه بين مواقع النمذجة معنوية ، إذ بلغت أعلى قيم للتوصيلية الكهربائية في مواقع النمذجة D6 و D5 و D10 والتي كانت قيمها 1053 و 993 و 845 مايكروسيمنز.سم¹ على الترتيب. وقد تبين أن متوسط قيم المتطلب البيوكيميائي للاوكسجين BOD للمياه بين مناطق النمذجة بلغت 3.17 ملغم.لتر¹ وبانحراف قياسي يبلغ 3.17 ± 0.75 ملغم.لتر¹ وكانت الفروقات في متوسط قيم المتطلب البيوكيميائي للاوكسجين للمياه بين مواقع النمذجة معنوية ، إذ بلغت أعلى قيم BOD في مواقع النمذجة D4 و D7 و D8 والتي بلغت قيمها 4.31 و 3.85 و 3.75 ملغم.لتر¹ على الترتيب.

وبالنسبة لمتوسط قيم المحتوى الكلي للنترات بين مناطق النمذجة فقد بلغ 9.63 ملغم.لتر¹ وبانحراف قياسي يبلغ (9.63 ± 0.91) ملغم.لتر¹ وكانت الفروقات في متوسط قيم المحتوى

الكلية للنترات في المياه بين مواقع النمذجة معنوية ، إذ كانت أعلى قيمة للمحتوى الكلي للنترات في موقع النمذجة D8 والتي بلغت 11.02 ملغم.لتر⁻¹ تليها مواقع النمذجة D1 و D7، إذ بلغت 10.60 ملغم.لتر⁻¹ في كليهما ، ثم موقع النمذجة D4 وكانت قيمة المحتوى الكلي للنترات فيها يبلغ 10.21 ملغم.لتر⁻¹ . بينما بلغ متوسط قيم المحتوى الكلي للفوسفات في المياه بين مناطق النمذجة 0.38 ملغم.لتر⁻¹ وبانحراف قياسي يبلغ 0.38 ± 0.06 ملغم.لتر⁻¹ وكانت الفروقات في متوسط قيم المحتوى الكلي للفوسفات في المياه بين مواقع النمذجة معنوية ، إذ بلغت أعلى قيم للمحتوى الكلي للفوسفات في مواقع النمذجة D4 و D1 و D7 وكانت 0.48 و 0.46 و 0.43 على الترتيب ملغم.لتر⁻¹ .

4-1-2 عزل وتشخيص الدايتومات

تم خلال هذه الدراسة عزل وتشخيص مجموعة من دايتومات المياه العذبة في 10 مواقع للنمذجة واقعة على مقطع نهر ديالى المار في مدينة بعقوبة ، وقد بلغ عدد العزلات الدايتومية التي تم عزلها وتشخيصها 161 بواقع 18 جنسا منها 15 جنسا تعود الى رتبة جانبية التناظر (الريشية) Pennales جميعها من الدايتومات القاعية Benthic diatoms منها 4 اجناس قاعية متحركة Motile diatoms وهي *Navicula sp.* و *Nitzschia sp.* و *Pinnularia sp.* و *Gyrosigma sp.* و 11 جنسا قاعية غير متحركة وهي *Cocconeis sp.* و *Synedra sp.* و *Pleurosigma sp.* و *Gomphonema sp.* و *Diatoma sp.* و *Amphora sp.* و *Melosira sp.* و *Fragilaria sp.* و *Eunotia sp.* و *Achanthes sp.* و *Cymbella sp.* ، كذلك تم عزل وتشخيص 3 اجناس تعود إلى رتبة شعاعية التناظر (المركزية) Centrales جميعها من الدايتومات الهائمة Plankton diatoms وهي *Cyclotella sp.* و *Stephaenodiscus sp.* و *Coscinodiscus sp.*

بلغ أعلى مستوى للتنوع في أنواع الدايتومات القاعية خلال هذه الدراسة في موقع النمذجة D7 ، إذ بلغ عدد الانواع المعزولة منه 17 نوعا يليه الموقعين D3 و D6 ، إذ بلغ عدد الانواع المعزولة منها 16 نوعا ، بينما كانت اقل اعداد من انواع الدايتومات القاعية المعزولة في الموقع D2 ، إذ بلغ عدد الانواع المعزولة منه 13 نوعا ، يليه المواقع D4 و D8 و D9 و D10 بواقع 14 نوعا لكل موقع نمذجة وكان أعلى مستوى للتنوع في أنواع الدايتومات الهائمة يقع ضمن موقعي

النمذجة D6 و D8 بواقع 3 انواع يليها الموقع D9 بواقع نوعين فقط بينما لم يتم عزل اي نوع من الدايئومات الهائمة ضمن موقعي النمذجة D1 و D5 وكما هو مبين في الجدول A-2-4 .

الجدول 4 - 2 - A: توزيع انواع الدايتومات المعزولة من مواقع النمذجة عبر مقطع نهر ديالى في مدينة بعقوبة			
الدايتومات المعزولة			مواقع أخذ العينات
الدايتومات الهائمة	الدايتومات القاعية		
	غير متحركة	متحركة	
0	12	3	D1
1	11	2	D2
1	12	4	D3
1	9	5	D4
0	11	4	D5
3	12	4	D6
1	10	7	D7
3	9	5	D8
2	11	3	D9
1	11	3	D10
13	108	40	المجموع الكلي

أما بالنسبة للتنوع في أجناس الدايئومات القاعية خلال هذه الدراسة فقد كانت أعلى اعداد الاجناس في مواقع النمذجة D1 و D9 و D10 ، إذ بلغ عدد الاجناس التي تنتمي اليها العزلات 13 جنسا تليها المواقع D2 و D3 و D5 و D6 بواقع 12 جنسا ، بينما كانت اقل اعداد أجناس الدايئومات القاعية في مواقع النمذجة D4 و D7 و D8 ، إذ بلغ عدد الاجناس التي تنتمي اليها العزلات 10 اجناس فقط . وكانت أعلى اعداد لاجناس الدايئومات الهائمة خلال هذه الدراسة تقع ضمن موقعي النمذجة D6 و D10 بواقع 3 اجناس ولم يتم عزل اي جنس من الدايئومات الهائمة ضمن موقع النمذجة D1 يليه المواقع D4 و D7 و D9 ، إذ بلغ عدد الاجناس المعزولة منها جنسا واحدا فقط ، وكما هو مبين في الجدول B-2-4.

الجدول 4- 2- B: توزيع اجناس الدياتومات المعزولة من مواقع النمذجة عبر مقطع نهر دىالى في مدينة بعقوبة			
الدياتومات المعزولة			مواقع أخذ العينات
الدياتومات الهائمة	الدياتومات القاعية		
	غير متحركة	متحركة	
0	9	4	D1
2	8	4	D2
2	8	4	D3
1	7	3	D4
2	9	3	D5
3	9	3	D6
1	7	3	D7
2	7	3	D8
1	10	3	D9
3	9	4	D10
17	83	34	المجموع الكلي

4-1-3 الدياتومات كمؤشرات حيوية

4-1-3-1 الدياتومات كمؤشرات حيوية للتلوث العضوي

يلاحظ من الجدول 4-3 احتساب قيم نقاط تواجد جميع انواع واجناس الدياتومات القاعية والهائمة المعزولة خلال فترة الدراسة لغرض اعتمادها كمؤشر حيوي للتلوث العضوي في مواقع أخذ عينات المياه عبر مقطع نهر دىالى في مدينة بعقوبة وبحسب طريقة (Palmer، 1969). ويتضح من خلال احتساب مجموع النقاط لمؤشر بالمر للتلوث العضوي Palmer Pollution Index (PPI) ان أعلى مجموع لقيم المؤشر PPI كانت ضمن مواقع النمذجة D7 و D8 و D4 و D6 وكما هو مبين في الشكل 4-1، إذ بلغت 33 و 29 و 25 و 23 على الترتيب.

الجدول 4-3 : نقاط الدياتومات المعزولة كمؤشر حيوي للتلوث العضوي في مواقع

أخذ عينات المياه عبر مقطع نهر ديالى في مدينة بعقوبة

مواقع أخذ العينات										PP I	انواع الدياتومات
D10	D9	D8	D7	D6	D5	D4	D3	D2	D1		
+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	3	<i>Navicula</i> sp.(others)
+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	3	<i>N. lanceolata</i>
+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	3	<i>N. cryptotenella</i>
-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	1	<i>N. cryptocephala</i>
-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	3	<i>N. gregaria</i>
-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	3	<i>Nitzschia</i> sp.(others)
-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	5	<i>N. palea</i>
-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	3	<i>N. fonticola</i>
-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	3	<i>N. amphibia</i>
-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	1	<i>N. acicularis</i>
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	3	<i>N. commutata</i>
-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	2	<i>Synedra</i> sp.(others)
-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	3	<i>S. ulna</i>
+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	1	<i>Gomphonema</i> sp.(others)
-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	1	<i>G. acuminatum</i>
-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	1	<i>G. gracile</i>
+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	1	<i>G. parvulum</i>
-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	1	<i>G. olivaceum</i>
-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	1	<i>Melosira</i> sp.(others)
+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	2	<i>M. varians</i>
-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	2	<i>Cyclotella meneghiniana</i>
+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	1	<i>Cyclotella striata</i>
-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	1	<i>Cyclotella ocellata</i>
17	20	29	33	23	14	25	18	12	15	مجموع النقاط	

PPI: مؤشر بالمر للتلوث العضوي Palmer Pollution Index

المفتاح: + = موجود ؛ - = غير موجود

وبحسب مجموع نقاط مؤشر بالمر للتلوث العضوي (Palmer، 1969) ، لكل موقع نمذجة تفسر النتائج وفقا للقيم التالية:

0 - 10: خالي من التلوث العضوي Lack of organic pollution.

11 - 15: تلوث عضوي معتدل Moderate pollution.

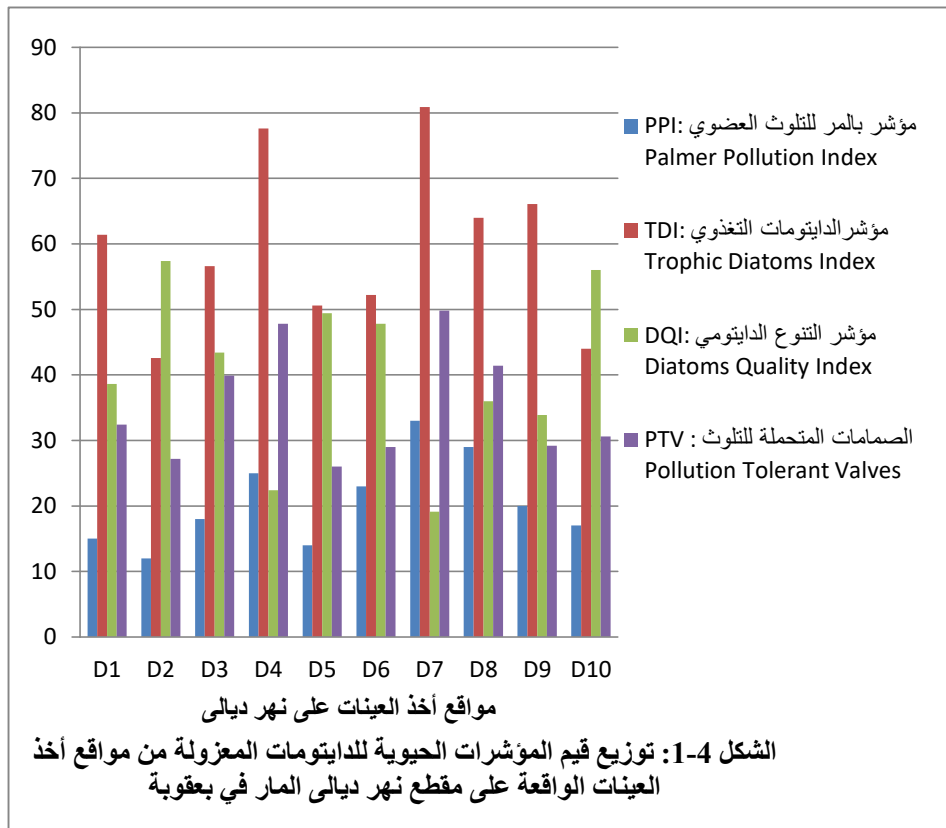
16 - 20: احتمال تلوث عضوي عالي Probable high organic pollution.

21 او اكثر: تلوث عضوي عالي مؤكد Confirms high organic pollution.

مما يدل على ان مياه نهر ديالى في تلك المواقع تعاني من تلوث عضوي عالي ومؤكد وربما

يعود سبب ذلك الى سيادة اجناس الدياتومات القاعية من الرتبة ريشية التناظر مثل *Navicula* و

Nitzschia بشكل عام وسيادة انواع الدايتومات القاعية *N. lanceolata* و *N. cryptotenella* و *N. gregaria* التابعة للجنس *Navicula* وكذلك *N. palea* و *N. amphibia* التابعة للجنس *Nitzschia* بشكل خاص ضمن تلك المواقع ، لما تمتلكه تلك الاجناس من قيم تحمل عال للتلوث العضوي وفقا لما بينه Palmer (1969)، وأن اجناسا مثل *Euglena*، *Oscillatoria* ، *Stigeoclonium* ، *Nitzschia* ، *Navicula* ، *Chlamydomonas*، *Scenedesmus* ، *Ankistrodesmus* ، تتواجد في المياه الملوثة عضويا وتم دعم ذلك من قبل (Ramakrishnan، 2003، Jafari و Gunale، 2006، Abdulwahid، 2016). فضلاً عن ذلك سيادة الجنس *Cyclotella* والانواع التابعة له وخاصة *C. meneghiniana* وهذا يتفق مع ما ذكره (Zahraw وآخرون، 2018) ، إذ ان الدايتومات من رتبة الشعاعية التناظر مثل جنس *Cyclotella* يمكن ان تتواجد في المياه الملوثة .



قد يكون احد اهم اسباب التلوث العضوي العالي والمؤكد في تلك المواقع هو قلة قيم تدفق المياه وزيادة في معدلات التحلل اللاهوائي للفضلات الناجمة عن الانشطة البشرية والصناعية للمناطق المحاذية لذلك الموقع من النهر وخاصة المواقع D7 و D8 و D6 ، وهذا يتوافق مع

مذكره Jafari و Gunale (2006)، بأن زيادة التحضر والتصنيع في هذا المجال تشكل تهديداً خطيراً للغاية إذ أنها تخلق دائماً زيادة كمية النفايات السائلة التي يتم تصريفها من جميع الأنواع الى مياه الأنهار العذبة والتي تتواءم مع ارتفاع نسبة المغذيات فيها (الشمري، 2006). او قد يكون السبب الفضلات الناجمة عن النشاط الزراعي والحيواني وخاصة في الموقع D4 وم ايرافق ذلك من تصريف للملوثات الناجمة عن استخدام الاسمدة والمبيدات الى مياه النهر (عباوي وحسن، 1990؛ Bhardwaj وآخرون، 2008). كذلك فإن تأثيرات الأنشطة البشرية على البيئة الطبيعية، مثل تحويل الغابات إلى منطقة زراعية، أو تدهور الغطاء الخضري canopy riparian zone (المظلة الخضرية) على ضفاف النهر قد أثرت بشكل مباشر أو غير مباشر على معايير جودة المياه في المجاري المائية وهذا يتوافق مع (Carr وآخرون، 2005؛ Tan وآخرون، 2017).

فضلاً عن ذلك فإن تلك النتيجة تتوافق مع ماتم تسجيله من قيم مرتفعة من BOD في مواقع النمذجة D4 و D7 و D8 والتي بلغت قيمها (4.31 و 3.85 و 3.75) ملغم.لتر⁻¹ على الترتيب والمبينة في الجدول 1-4 وهي قيم مياه مشكوك فيها Doubtful water من حيث امكانية إستخدامها لاغراض الشرب والاستعمال المنزلي بحسب تصنيف منظمة الصحة العالمية WHO (مولود وآخرون، 1990؛ عباوي وحسن، 1990؛ التشريعات البيئية العراقية، 1988) مما يدل على زيادة اعداد الكائنات الدقيقة فالمتطلب البيوكيميائي للاوكسجين هو مقياس لكمية الأوكسجين الذي يستهلك من البيئات المائية بواسطة الكائنات الدقيقة الهوائية لمتطلباتها الأيضية أثناء تكسير المواد العضوية، فتميل الأنظمة ذات المتطلب البيوكيميائي للاوكسجين المرتفع إلى ان تكون ذات تراكيز منخفضة من الأوكسجين الذائب (سلمان، 2006؛ Bhardwaj وآخرون، 2008؛ الصفدي، 2008).

يظهر في الجدول 3-4 ان هناك احتمال تلوث عضوي عالي Probable high organic pollution في مواقع أخذ العينات D9 و D3 و D10 وكما هو مبين في الشكل 1-4 أيضاً، إذ بلغت مجموع نقاط قيم مؤشر بالمرا PPI فيها 20 و 18 و 17 على الترتيب. وربما يعود سبب ذلك الى الانخفاض النسبي في تواجد اجناس الدايتومات القاعية من رتبة شعاعية التناظر مثل مثل Navicula و Nitzschia وبالمقابل زيادة في تواجد الاجناس مثل Synedra، Gomphonema، Melosira والانواع العائدة لها (Palmer، 1969)، فضلاً عن الندرة

النسبية لتواجد جنس *Cyclotella* والانواع التابعة لها لما تمتلكه تلك الاجناس والانواع الدايتومية بنوعيتها القاعية والهائمة من قيم مرتفعة نسبياً من مؤشر بالمر للتلوث العضوي (Palmer، 1969 ؛ Lowe، 1973؛ Zahraw وآخرون، 2018). وربما يعود السبب في احتمالية وجود تلوث عضوي في تلك المواقع الى قلة النشاط البشري والحضري والصناعي في تلك المواقع واقتصار التلوث العضوي فيها على مصادر ملوثات النشاط الزراعي السائد فيها وهذا يتوافق مع ماتوصل اليه (العادلي، 1992؛ Carr وآخرون، 2005؛ Tan وآخرون، 2017) وكذلك (اليقوبي، 2000؛ Bhardwaj وآخرون، 2008) عن دور النشاط الزراعي في زيادة تصريف الملوثات العضوية الى المياه السطحية.

ويتضح أيضاً من الجدول 4-3 ، ان مواقع أخذ العينات المائية D1 و D5 و D2 الواقعة على مقطع نهر دىالى المار في بعقوبة كانت تعاني تلوث عضوي معتدل Moderate pollution وكما هو مبين في الشكل 4-1 أيضاً ، إذ بلغت مجموع نقاط قيم مؤشر بالمر PPI فيها 15 و 14 و 12 على الترتيب. وهذه النتيجة تتوافق مع ماتم تسجيله في هذه الدراسة من قيم BOD منخفضة لاسيما في مواقع النمذجة D6 و D5 و D2 والتي بلغت قيمها 2.20 و 2.33 و 2.51 ملغم.لتر⁻¹ على الترتيب والمبينة في الجدول 4-1، وهي قيم مياه نظيفة الى حد ما Fairly clean water مما يدل على قلة تواجد الكائنات الدقيقة ومن ضمنها الدايتومات القاعية والهائمة (مولود وآخرون، 1990؛ عباوي وحسن، 1990؛ Chapman، 1996). وربما يعود السبب الرئيسي في اعتدال التلوث العضوي في تلك المواقع الى ندرة النشاط الحضري والصناعي لاسيما في الموقعين D1 و D2 واقتصارها على التلوث الناجم عن النشاط الزراعي (اليقوبي، 2000) وزيادة معدلات تدفق مياه النهر الناجم عن قلة تعرج النهر في الموقعين D5 و D2 ومايرافقه من زيادة في معدلات التحلل الهوائي للملوثات العضوية (Bhardwaj وآخرون، 2008).

4-1-3-2 الدايتومات كمؤشرات حيوية للحالة التغذوية

يبين الجدولين 4-4 و 4-4 B احتساب متوسط قيم الوفرة النسبية لجميع الانواع والاجناس الدايتومية المعزولة والمشخصة والتي توزعت على مواقع أخذ العينات الواقعة على مقطع نهر دىالى المار في بعقوبة والتي على اساسها تم احتساب قيم مؤشر الدايتومات التغذوي TDI و مؤشر التنوع الدايتومي DQI و النسبة المئوية للصماتات المحتملة للتلوث PTV % بالاعتماد

على جداول خاصة وبحسب الطريقة المتبعة من قبل (Kelly و Whitton، 1995؛ Kelly وآخرون، 1998). ويتضح من النتائج المبينة ان أعلى قيم للمؤشر TDI كانت ضمن الموقعين D7 و D4 على نهر ديالى والتي بلغت 80.9 ، 77.6 على الترتيب مما يدل على وجود حالة تغذوية مفرطة Hypertrophy في مياه النهر ضمن تلك المواقع .ارتفاع قيم نسبة الدايتومات المحتملة للتلوث العضوي PTV % ، إذ بلغت قيمها 49.8 و 47.8 على الترتيب وكما هو مبين في الشكل (4-1) وهذا يتوافق مع ما تم تسجيله خلال هذه الدراسة بأن تلك المواقع تعاني من تلوث عضوي عالي ومؤكد حسب مؤشر بالمر (Palmer، 1969) ولاسيما الموقعين D7 و D4 وتتوافق تلك النتيجة مع ما تم تسجيله خلال هذه الدراسة من قيم منخفضة لتدفق المياه في مواقع النمذجة D4 و D7 والتي بلغت قيمها 0.41 و 0.43 متر.ثانية⁻¹ على الترتيب والمبينة في الجدول 4-1 الناجمة عن تعرج مسار النهر في تلك المواقع وبالتالي تقل فرصة الإمتزاج السطحي للأوكسجين مع المياه مما يقلل نسبة الأوكسجين في المياه وهذا بدوره يسمح بحدوث تحلل لاهوائي للملوثات العضوية ، فضلاً عن قيم النترات المرتفعة نسبياً ضمن الموقعين D7 و D4 ، إذ بلغت 10.60 و 10.21 ملغم.لتر⁻¹ على الترتيب وما يقابلها من قيم BOD المرتفعة في مواقع النمذجة D4 و D7 والتي بلغت قيمها 4.31 و 3.85 ملغم.لتر⁻¹ على الترتيب والمبينة في الجدول 4-1 الناجمة عن دور الذي تقوم به البكتيريا الهوائية بتحويل NH_4^+ إلى نترت NO_2^- ونترات NO_3^- من خلال النترجة nitrification بينما تحول البكتيريا اللاهوائية والاختيارية NO_3^- و NO_2^- إلى غاز N_2 من خلال عملية عكس النترجة denitrification (Dodds وآخرون، 1998؛ Bhardwaj وآخرون، 2008).

تدعم العناصر الغذائية ، مثل الفوسفات PO_4^{3-} نمو الطحالب والنباتات الأخرى التي تشكل المستويات الأدنى من السلسلة الغذائية ومنها الدايتومات القاعية والهائمة . ومع ذلك ، فإن المستويات الزائدة من العناصر الغذائية من أي مصدر يمكن أن تسبب نمواً مفرطاً للنباتات المائية Eutrophication (الإثراء الاغتنائي) (Zahraw وآخرون، 2018) وهذا يتوافق من جهة مع ما تم تسجيله خلال هذه الدراسة من قيم مرتفعة للمحتوى الكلي للفوسفات لاسيما في الموقعين D4 و D7 التي بلغت 0.48 و 0.43 ملغم.لتر⁻¹ على الترتيب والمبينة في الجدول 4-1 وهي تفوق التركيز المسموح به بحسب نظام صيانة الانهار العراقية Iraqi Rivers Maintaining System (IRMS) والذي يبلغ 0.4 ملغم.لتر⁻¹ (نظم صيانة الانهار العراقية IRMS، 1967).

الجدول 4-4 - A: الوفرة النسبية للدياتومات المعزولة كمؤشر حيوي للحالة التغذوية في مواقع أخذ عينات المياه عبر مقطع نهر دبالى في مدينة بعقوبة

مواقع أخذ العينات										DTI		انواع الدايتومات
الوفرة النسبية (a) للدياتومات المعزولة										v	s	
D10	D9	D8	D7	D6	D5	D4	D3	D2	D1			
رتبة ريشية التناظر (Pennales)												
-	-	-	-	6	8	-	-	-	-	2	2	<i>Cocconeis sp.(others)</i>
4	-	-	-	8	9	-	-	6	-	2	4	<i>C. pediculus</i>
5	11	-	-	5	3	-	7	4	-	2	3	<i>C. placentula</i>
3	12	10	-	-	-	13	-	5	-	1	4	<i>Navicula sp.(others)</i>
4	23	25	29	15	8	32	20		18	2	5	<i>N. lanceolata</i>
5	-	-	18	-	-	-	-	-	-	2	5	<i>N. cryptotenella</i>
-	-	-	7	8	-	10	5	3	-	1	4	<i>N. cryptocaphala</i>
-	11	16	13	9	5	18	-	-	15	1	5	<i>N. gregaria</i>
-	-	-	2	11	-	9	4	2	9	1	4	<i>Nitzschia sp.(others)</i>
-	-	15	11	-	-	-	13	-	-	1	5	<i>N. palea</i>
-	-	-	-	7	-	27	-	-	12	2	3	<i>N. fonticola</i>
-	-	-	9	-	6	17	-	-	-	3	5	<i>N. amphibia</i>
-	12	9	5	-	8	-	6	3	-	1	4	<i>N. acicularis</i>
3	-	7	-	-	-	-	-	-	-	1	4	<i>N. commutata</i>
-	-	5	-	9	7	-	-	-	-	1	4	<i>Synedra sp.(others)</i>
-	9	-	6	-	-	-	-	-	-	1	3	<i>S. ulna</i>
8	-	4	11	-	6	5	-	-	4	0	0	<i>Pleurosigma sp.</i>
15	4	10	7	-	-	5	9	7	3	3	1	<i>Pinnularia sp.</i>
5	11	6	2	-	3	-	6	4	-	1	3	<i>Gomphonema sp.(others)</i>
-	14	-	-	9	-	-	8	4	17	1	3	<i>G. acuminatum</i>
-	-	12	5	-	6	-	-	-	-	1	3	<i>G. gracile</i>
7	-	-	14	-	-	31	6	-	19	3	5	<i>G. parvulum</i>
-	21	17	-	8	-	13	4	6	-	2	5	<i>G. olivaceum</i>
5	-	-	-	4	3	-	4	3	-	1	2	<i>Diatoma sp.(others)</i>
3	10	-	-	9	7	-	5	5	-	3	5	<i>D. vulgare</i>
4	-	-	-	1	2	-	2	4	11	2	2	<i>D. tenue</i>
5	-	-	-	2	2	-	2	4	7	1	2	<i>D. tenuis</i>
-	6	5	4	-	-	7	-	3	9	1	5	<i>Amphora sp.(others)</i>
4	14	16	7	-	-	22	-	-	14	2	5	<i>Amphora pediculus</i>
-	7	8	10	-	4	9	5	-	10	1	5	<i>Amphora ovalis</i>
-	4	-	9	-	-	-	-	-	6	0	0	<i>Melosira sp.(others)</i>
3	-	20	12	9	-	16	-	-	-	2	4	<i>M. varians</i>
-	7	3	-	3	-	5	3	-	-	1	2	<i>Fragilaria sp.(others)</i>
-	-	7	-	-	-	9	4	6	-	2	2	<i>F. brevistriata</i>
5	-	-	-	5	2	7	-	4	-	2	3	<i>F. vaucheriae</i>
-	9	-	5	-	-	-	3	-	7	1	2	<i>F. galeries</i>

الجدول 4-4 - B: الوفرة النسبية للدياتومات المعزولة كمؤشر حيوي للحالة التغذوية في مواقع أخذ عينات المياه عبر مقطع نهر دياي في مدينة بعقوبة

مواقع أخذ العينات										DTI		انواع الدياتومات
الوفرة النسبية (a) للدياتومات المعزولة										v	s	
D10	D9	D8	D7	D6	D5	D4	D3	D2	D1			
4	-	-	-	3	6	-	6	5	15	2	5	<i>Gyrosigma</i> sp.
-	2	4	3	9	-	2	-	3	6	3	1	<i>Eunotia</i> sp.(others)
-	6	8	4	-	-	5	-	-	2	3	1	<i>E. exigua</i>
-	-	1	6	-	10	3	8	-	4	3	1	<i>E. incisa</i>
-	10	5	2	6	-	9	8	-	-	1	3	<i>Achanthes</i> sp.(others)
11	-	9	2	15	-	-	13	5	7	2	1	<i>A. oblongella</i>
-	1	-	-	5	3	-	7	-	13	2	4	<i>Cymbella</i> sp.(others)
8	6	-	-	7	12	-	-	-	8	3	1	<i>C. affinis</i>
-	2	-	-	10	7	-	-	6	6	2	1	<i>C. microcephala</i>
رتبة شعاعية التناظر (Centrales)												
-	10	8	17	22	-	19	-	-	-	0	0	<i>Cyclotella meneghiniana</i>
5	-	8	-	14	-	-	7	-	-	0	0	<i>Cyclotella striata</i>
-	11	6	-	9	-	-	-	4	-	0	0	<i>Cyclotella ocellata</i>
11	-	-	-	10	7	-	6	8	-	0	0	<i>Stephaenodiscus</i> sp.
8	-	7	-	5	10	-	-	-	-	0	0	<i>Coscinodiscus</i> sp.
44.0	66.1	64.0	80.9	52.2	50.6	77.6	56.6	42.6	61.4	TDI		
56.0	33.9	36.0	19.1	47.8	49.4	22.4	43.4	57.4	38.6	DQI		
30.6	29.2	41.4	49.8	29.0	26.0	47.8	39.9	27.2	32.4	% PTV		
111	212	222	203	183	127	274	158	92	222	المجموع الكلي عدا الهائمات		
34	62	92	101	53	33	131	63	25	72	مجموع الدياتومات المتحركة		

TDI: مؤشر الدياتومات التغذوي Trophic Diatoms Index

DQI: مؤشر التنوع الدياتومي Diatoms Quality Index

PTV: الصمامات المتحملة للتلوث Pollution Tolerant Values

المفتاح: a = وفرة النوع ؛ v = قيم المؤشر ؛ s = حساسية التلوث

ملاحظة: قيم v و s تم الحصول عليها من جداول خاصة (Kelly و Whitton، 1995؛ Kelly وآخرون، 2001).

وبحسب قيم TDI، لكل موقع نمذجة تفسر النتائج وفقاً للقيم التالية:

> 35: قليلة التغذية Oligotroph.

35-50: قليل - متوسط التغذية Oligo-mesotrophy.

51-60: متوسط اتغذية Mesotrophy.

61-75: ثري التغذية Eutrophy.

< 75: فرط التغذية Hypertrophy.

ويتوافق أيضاً من جهة أخرى مع القيم المرتفعة لنسبة PTV% والمجموع الكلي للدايتومات عدا الهائمات في الموقعين D4 و D7 والتي بلغت قيمها 274 و 203 على الترتيب والمبينة في الجدول B-4-4 وهي تمثل الدايتومات القاعية والتي تعد أكثر موثوقية في تقييم الحالة التغذوية مقارنة مع الهائمات (Martín و Fernández، 2012).

إن قيم مؤشر التنوع الدايتومي المنخفضة DQI وكما هو مبين في الشكل 1-4 والتي تم تسجيلها في الموقعين D7 و D4 والتي بلغت 19.1 و 22.4 على الترتيب تدل على سيادة انواع معينة من الدايتومات القاعية ذات قيم مؤشر تغذوي عالي وقيم تحمل عالية للتلوث في تلك المواقع مثل الانواع العائدة الى الجنس *Navicula* sp. مثل *N. lanceolata* و *N. cryptotenella* و *N. gregaria* ، فضلاً عن بعض الانواع التابعة الى جنس *Nitzschia* وخاصة *N. amphibia* و *N. palea* والجنس *Gomphonema* وخاصة النوع *G. parvulum* والجنس *Diatoma* وخاصة النوع *D. vulgare* والجنس *Amphora* . وخاصة النوع *Amphora pediculus* واخيرا النوع *Melosira varians*. وهذا يتوافق مع ما ذكره Wei-hua وآخرون (2008) ، بأن النوعية والكمية للدايتومات تعتمد على الحالة التغذوية للنظام البيئي المائي.

يتضح من الجدولين A-4-4 و B-4-4 أيضاً، إن مواقع أخذ العينات D8 و D9 و D1 هي مواقع مياه تعاني من ظاهرة الاثراء الاغذائي Eutrophy، إذ بلغت قيم المؤشر TDI فيها 66.1 ، 64.0 و 61.4 على الترتيب وهي قيم مرتفعة نسبياً (Kelly و Whitton، 1995؛ Kelly وآخرون، 2001) ، وكذلك الحال مع الإرتفاع النسبي في قيم نسبة الدايتومات المتحملة للتلوث العضوي PTV % لاسيما في الموقع D8 ، إذ بلغت قيمها 41.4% وكما هو مبين في الشكل 1-4 وهذا يتوافق مع ما تم تسجيله خلال هذه الدراسة بأن الموقع D8 من نهر دياالى تعاني مياهه من تلوث عضوي عالي ومؤكد وإن الموقع D9 فيه احتمالية تلوث عضوي عالي ، أما الموقع D1 تعاني مياهه من تلوث عضوي معتدل حسب مؤشر بالمر (Palmer، 1969؛ Passy، 2007) وهو بدوره يتناسب مع القيم المرتفعة للمحتوى الكلي للفوسفات في الموقع D1 والتي بلغت 0.46 ملغم.لتر⁻¹ وقيمها المرتفعة نسبياً في المواقع D8 و D9 والتي بلغت 0.40 و 0.37 ملغم.لتر⁻¹ على الترتيب والمبينة في الجدول 1-4، وربما يعود السبب في ذلك الى دور النشاط الزراعي في الموقعين D9 و D1 أو النشاط الحضري والسكاني في رفد تلك

المواقع بالنفايات العضوية وهذا يتوافق مع ما بينه Dodds وآخرون (1998) ، بأن الفوسفور يتواجد في المياه الطبيعية بشكل أساسي على شكل فوسفات ، والذي يمكن فصله إلى فوسفات عضوي وغير عضوي. ويمكن أن يدخل الفوسفات إلى البيئات المائية من التجوية الطبيعية للمعادن في حوض التصريف ، ومن خلال التحلل البيولوجي ، ومن الجريان السطحي للمياه العادمة الناجمة من الأنشطة البشرية في المناطق الحضرية والزراعية (العادلي، 1992؛ اليعقوبي، 2000). ان نتائج محتوى النترات المرتفعة في مياه الموقعين D8 و D1 البالغة 11.02 و 10.60 ملغم/لتر¹⁻ على الترتيب يمكن ان يكون لها دور اساسي في الاثراء الاغذائي لمياه النهر في تلك المواقع ، إذ ان الاثراء الاغذائي هو تدهور في جودة المياه بسبب التخصيب بالمغذيات وخاصة النيتروجين (N) والفوسفور (P) ، مما يؤدي إلى زيادة نمو النباتات (الطحالب بشكل أساسي) وتعفنهما. عندما تكون مستويات $P : N = 1 : 7$ ، تزدهر الطحالب. ويعتبر انخفاض الأوكسجين المذاب في الماء نتيجة شائعة (Bhardwaj وآخرون، 2008). ويمكن أن يؤدي الاثراء الاغذائي إلى تغييرات في تكوين الحيوانات المائية fauna ولا سيما اختفاء الأنواع التي تتطلب نسبة عالية من الأوكسجين و غالبًا ما يتعرض التنوع البيولوجي للمجتمعات المائية للخطر في البيئات الغنية بالمغذيات (Wei-hua وآخرون، 2008؛ Bhardwaj وآخرون، 2008) .

يمكن ملاحظة الارتفاع النسبي في قيم مؤشر التنوع الدايتومي DQI وكما هو مبين في الشكل 1-4 والتي تم تسجيلها في المواقع D1 و D8 و D9 التي بلغت 38.6 و 36.0 و 33.9 على الترتيب مما يدل على زيادة نسبية في تنوع الدايتومات القاعية لتشمل طيف اوسع من الاجناس والانواع الدايتومية القاعية ذات قيم مؤشر تغذوي و قيم تحمل للتلوث مرتفعة نسبياً في تلك المواقع كأنواع الجنس *Navicula* sp. مثل *N. lanceolata* و *N. Gregaria* فضلاً عن بعض الانواع التابعة الى جنس *Nitzschia* وخاصة النوع *N. acicularis* والجنس *Amphora* وخاصة النوع *Amphora pediculus* وهذا يتوافق مع ما ذكره Wei-hua وآخرون (2008) بأن النوعية والكمية للدياتومات تعتمد على الحالة التغذوية للنظام البيئي المائي.

اما بالنسبة للمواقع D3 و D6 و D5 فقد كانت قيم المؤشر التغذوي TDI متوسطة ، إذ بلغت قيمها 56.6 و 52.2 و 50.6 على الترتيب مما يدل على ان الحالة التغذوية لنماذج المياه المأخوذة من تلك المواقع هي متوسطة التغذية (Mesotrophy Kelly و Whitton، 1995؛

Kelly وآخرون، 2001)، وهي نتيجة متوافقة مع ما تم تسجيله خلال هذه الدراسة من تلوث عضوي عالي محتمل في الموقع D3 وتلوث عضوي معتدل في الموقع D5 وتلوث عضوي عالي مؤكد في الموقع D6 بحسب مؤشر بالمر للتلوث العضوي PPI (Palmer، 1969) وكما هو موضح في الشكل 1-4 والذي يتضح منه أيضاً الإرتفاع النسبي في قيم مؤشر التنوع الدايتومي DQI، إذ بلغت قيمها في المواقع D5 و D6 و D3 49.4 و 47.8 و 43.4 على الترتيب، ويقابلها انخفاض نسبي في قيم نسبة الدايتومات القاعية المحتملة للتلوث PTV % في المواقع D3 و D6 و D5، إذ بلغت 39.9 % و 29.0 % و 26.0 % على الترتيب مما يدل على انخفاض نسبي في التنوع للدايتومات القاعية ذات القيم المرتفعة في تحمل التلوث العضوي أو المؤشر التغذوي TDI وهذه النتائج تتوافق مع ماتم تسجيله خلال هذه الدراسة من قيم منخفضة للمحتوى الكلي للفوسفات في مواقع النمذجة D6 و D5 والتي بلغت قيمها 0.30 و 0.33 ملغم.لتر⁻¹ على الترتيب والقيمة المعتدلة لها في الموقع D3 والتي بلغت 0.39 من جهة وكذلك قيم محتوى النترات المنخفضة التي بلغت 8.72 ملغم.لتر⁻¹ في الموقع D6 وقيمها المعتدلة فلي الموقعين D3 و D5 والتي بلغت 9.17 و 9.15 ملغم.لتر⁻¹ على الترتيب، وتتوافق هذه النتائج أيضاً مع (Ali وآخرون، 2017؛ Marhoon وآخرون، 2020).

فضلاً عن ذلك فإن قيم التنوع الدايتومي DQI المرتفعة نسبياً واعداد الدايتومات القاعية كانت معتدلة في المواقع D6 و D3 و D5 فقد بلغت 183 و 158 و 127 مما يدل على وجود تنوع دايتومي لأجناس وأنواع لها قيم معتدلة من المؤشر التغذوي TDI من جهة ولها قيم معتدلة من قيم حاسيتها وتحملها للتلوث العضوي (Kelly و Whitton، 1995؛ Kelly وآخرون، 2001). ومن ضمنها الجنس *Cocconeis* وخاصة *C. pediculus* والنوع *C. placentula* والجنس *Fragilaria* وخاصة *F. vaucheriae* و الجنس *Cymbella* وخاصة *C. affinis* والنوع *C. microcephala* وهذا يتوافق مع ما ذكره Wei-hua وآخرون (2008) بأن النوعية والكمية للدايتومات تعتمد على الحالة التغذوية للنظام البيئي المائي.

يتضح أيضاً من النتائج في الجدولين A-4-4 و B-4-4 ان الموقعين D10 و D2 يتصفان بمياه نهر شحيحة الى متوسطة الحالة الاغذائية Oligo-mesotrophy، إذ بلغت قيم المؤشر TDI فيها 44.0 و 42.6 على الترتيب وهي قيم منخفضة نسبياً (Kelly و

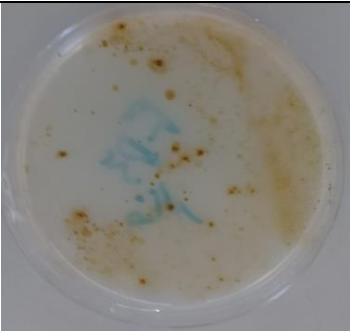
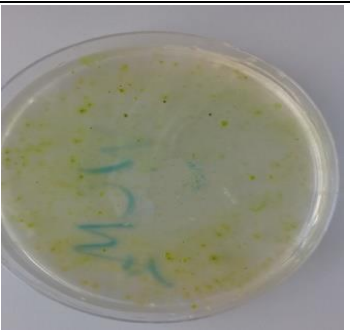
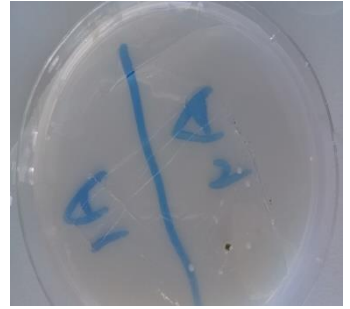
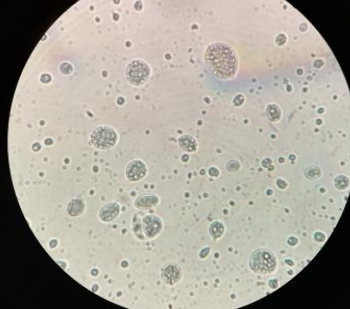
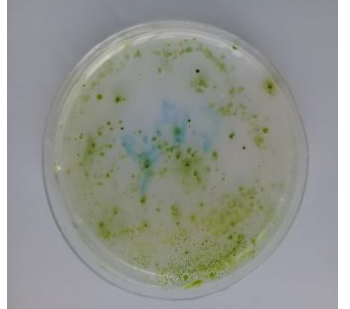
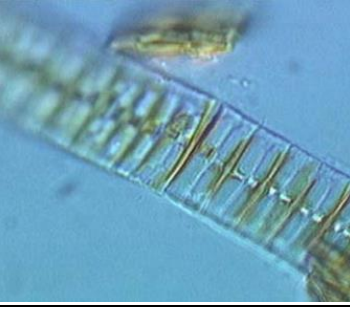
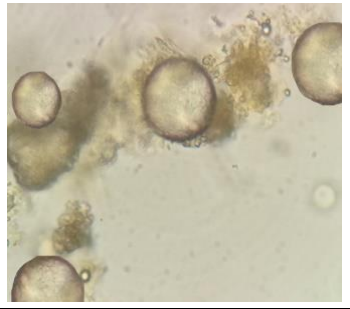
Whitton، 1995؛ Kelly وآخرون، 2001) وهي نتيجة متوافقة مع ما تم تسجيله خلال هذه الدراسة من تلوث عضوي تلوث عضوي معتدل Moderate pollution في الموقع D2 الى تلوث عضوي عالي محتمل في الموقع D10 بحسب مؤشر بالمر للتلوث العضوي PPI (Palmer، 1969) وكما هو موضح في الشكل 4-1 وتتوافق أيضاً مع القيم المنخفضة للمحتوى الكلي للفوسفات التي سجلت خلال هذه الدراسة لاسيما في الموقع D10 والتي بلغت قيمتها فيه 0.31 ملغم.لتر⁻¹ والموقع D2 الذي كانت قيمة المحتوى الكلي للفوسفات فيه 0.35 ملغم.لتر⁻¹ ومن جهة أخرى فإن قيم محتوى النترات في هذين الموقعين سجلت قيما منخفضة خلال هذه الدراسة لاسيما في الموقع D2 فقد بلغت 8.43 ملغم.لتر⁻¹ بينما بلغت في الموقع D10 9.63 ملغم.لتر⁻¹ وهي قيمة منخفضة نسبياً وهذه النتيجة تتفق مع ما اشار اليه Dodds وآخرون (1998) لدور الفوسفور والنيتروجين لإثراء النظم البيئية المائية بالمغذيات إذ تؤدي زيادة تركيزات المغذيات إلى زيادة الإنتاجية الأولية والعكس صحيح. كذلك يمكن ملاحظة القيم المرتفعة نسبياً لمؤشر التنوع الدايتومي DQI في الموقعين D2 و D10 ، والتي بلغت قيمها 57.4 و 56.0 على الترتيب ، وما يقابلها من قيم منخفضة لقيم نسبة الدايتومات القاعية المتحملة للتلوث PTV % في المواقع D10 و D2 والتي بلغت 30.6 % و 27.2 % فضلاً عن الاعداد المنخفضة من الدايتومات القاعية والتي بلغت 111 و 92 في الموقعين D10 و D2 على الترتيب ، مما يدل على زيادة في تنوع الدايتومات التي لها قيم منخفضة من المؤشر التغذوي TDI وقيم تحمل للتلوث العضوي ويتضح ذلك من خلال سيادة الدايتومات القاعية مثل الجنس *Acanthes* وخاصة النوع *A. oblongella* والجنس *Pinnularia* sp. وهذا يتوافق مع ما ذكره Wei-hua وآخرون (2008) بأن النوعية والكمية للدايتومات تعتمد على الحالة التغذوية للنظام البيئي المائي.

4-1-4 تنقية مستعمرات أو اتحادات الدايتومات

يمثل الجدول 4-5 المستعمرات او التجمعات الدايتومية النقية والمفردة التي تم الحصول عليها من بعض مواقع النمذجة اعتمادا على توافرها في تلك المواقع ، وتم تحديد نوع ووصف المستعمرات ازاء كل نوع من الدايتومات القاعية والهائمة بعد ان تم اجراء الاستزراع التسلسلي لكل نوع دايتومي واللوحه 4-1 تبين صور التجمعات والمستعمرات الدايتومية التي تم تنقيتها خلال هذه الدراسة.

الجدول 4-5: اعداد المستعمرات المنفردة (CFU لكل 100 مايكروليتر) للدائتومات المعزولة والمشخصة من نماذج مياه مواقع أخذ العينات على مقطع نهري إلى المار في قضاء بعقوبة

الدايتومات	التأخير	مواقع أخذ العينات			نوع المستعمرة	وصف المستعمرة
Cyclotella sp.		D6	D8	D10	مستعمرات السلسلة Chain colonies	تترتب خلايا الدايتومات المركزية جنبا الى جنب ولكن لا تتلامس الخلايا ويتم ربطها ببعضها البعض عن طريق خيوط من السكريات المتعددة.
³ -10	<i>C.meneghiniana</i>	6.3	3.0	0.0		
² -10	<i>C. striata</i>	5.5	2.4	1.4		
² -10	<i>C. ocellata</i>	2.4	0.2	0.0		
Fragilaria sp.		D3	D4	D6	المستعمرات الشريطية Ribbon colonies	تترتب خلايا الدايتومات الريشية جنبا الى جنب وتلتصق مع بعضها عن طريق إفرازات الصمغ من وجه الصمام بالكامل.
³ -10	<i>F. brevistriata</i>	2.6	6.1	0.0		
² -10	<i>F. vaucheriae</i>	0.0	4.7	3.3		
¹ -10	<i>F. galerie</i>	2.5	0.0	0.0		
Diatoma sp.		D2	D5	D6	المستعمرات المتعرجة Zig-zag colonies	ترتبط خلايا الدايتومات الريشية بواسطة الصمغ mucilage في أقطابها المتقابلة
² -10	<i>D. vulgare</i>	3.8	5.3	6.8		
² -10	<i>D. tenue</i>	3.0	1.7	0.8		
² -10	<i>D. tenuis</i>	3.2	1.5	1.5		
Gomphonema sp.		D3	D6	D7	مستعمرات شجيرية Arbuscular colonies	يتم إنتاج السيقان في قطب واحد. وتتباعد السيقان من كل خلية وتشكل مستعمرات متفرعة
³ -10	<i>G. acuminatum</i>	5.3	6.0	0.0		
² -10	<i>G. gracile</i>	0.0	0.0	3.7		
¹ -10	<i>G. parvulum</i>	4.1	0.0	9.3		
³ -10	<i>G. olivaceum</i>	2.7	5.3	0.0		
Nitzschia sp.		D4	D7	D8	المستعمرات الشريطية Ribbon colonies	تترتب خلايا الدايتومات الريشية جنبا الى جنب وتلتصق مع بعضها عن طريق إفرازات الصمغ من وجه الصمام بالكامل.
² -10	<i>N. palea</i>	0.0	8.3	11.3		
¹ -10	<i>N. fonticola</i>	18.0	0.0	0.0		
³ -10	<i>N. amphibia</i>	11.3	6.5	0.0		
² -10	<i>N. acicularis</i>	0.0	3.8	6.0		
² -10	<i>N. commutata</i>	0.0	0.0	4.4		
Melosira sp.		D4	D7	D8	مستعمرات السلسلة Chain colonies	تترتب خلايا الدايتومات الريشية جنبا الى جنب بواسطة حبيبات
² -10	<i>M. varians</i>	10.3	8.2	13.0		
Cymbella sp.		D1	D5	D6	مستعمرات شجيرية Arbuscular colonies	يتم إنتاج السيقان في قطب واحد. وتتباعد السيقان من كل خلية وتشكل مستعمرات متفرعة
² -10	<i>C. affinis</i>	6.0	9.3	5.3		
¹ -10	<i>C. microcephala</i>	4.5	6.2	7.8		
CFU : معدل المستعمرات المتكونة Colony Forming Units لكل 100 مايكروليتر من الوسط الزراعي السائل						

		
colony -Dlatom-1	xenic culture- <i>cyclotella</i>	<i>mixed colonies</i>
		
xenic culture- <i>cyclotella</i>	xenic culture- <i>Stephanodiscus</i> sp.	<i>colony -Dlatom-2</i>
		
Ribbon colony	Zig-zag colonies	Arbuscular colonies
		
<i>Gomphonema olivaceum</i>	xenic culture <i>Coscinodiscus</i> sp.	xenic culture <i>Cyclotella ocellata</i>
اللوحة 4-1 : مجموعة الصور لمستعمرات او تجمعات الدايتومات المعزولة والمشخصة من تخافيف العينات المائية المأخوذة من مواقع النمذجة المحددة على مقطع نهر دبالى المار في قضاء بعقوبة		

ان جميع الدياتومات هي في الأساس طحالب وحيدة الخلية لكنها تظهر تنوعاً كبيراً في أشكال الحياة ويمكن للعديد منها تكوين مستعمرات بل إن بعض الأصناف قد تقدم العديد من أشكال الحياة أثناء تطورها فعلى سبيل المثال بعض أنواع الجنس *Cymbella* والتي يمكن أن تكون أحادية الخلية وتتحرك بحرية في مرحلة ما ولكنها تعلق على دعامة وتثبت في مرحلة أخرى (Rimet وآخرون، 2012). ويتضح من النتائج ان هناك اختلافات في اعداد واشكال المستعمرات الدياتومية تبعا لمواقع أخذ العينات المائية التي عزلت منها وحالتها التغذوية. وهذا يتوافق مع ما أشار اليه Finkel وآخرون (2009) بأن أنواع المستعمرات وأشكال الحياة للدياتومات تتعرض لانتقاء قوي، وقد تكون كاستجابات للتعلق ، والتقاط الضوء والمغذيات ، ومعدل الغرق . كذلك فإن حجم خلية الدياتوم هو أيضاً يمكن أن يكون كاستجابة مرتبطة بالموارد التغذوية المتاحة.

وقد عرّف Passy (2007) التجمعات او الاتحادات الدياتومية diatom guild من نوع "منخفضة المستوى" low-profile بأنها تشمل الأنواع ذات القامة القصيرة بما في ذلك الدياتومات المنبسطة prostrate ، والملتصقة adnate والدياتومات المنتصبة erect. والتي يمكنها أن تتحمل الاضطرابات البيئية للجسم المائي ، ولكنها لا تتسامح مع إثراء المغذيات. بينما التي تكون من نوع "المرتفعة المستوى" high-profile فهي تشمل الأنواع الكبيرة من الدياتومات، أو تلك التي تميل إلى تكوين مستعمرات (مثل الدياتومات المكونة للمستعمرات الانبوبية ، والخيضية ، والمتفرعة) ولا تستطيع هذه المجموعة مقاومة الاضطرابات البيئية للجسم المائي ولكنها تستفيد من إثراء المغذيات.

4-2 خمائر المبيضات

4-2-1 عزل خمائر المبيضات من نماذج التربة الملوثة

يمثل الجدول 4-6 النسب المئوية للعينات الموجبة للمبيضات المعزولة قيد الدراسة والتي تفاوتت في تواجدها بين مواقع أخذ العينات المتمثلة بالأحياء السكنية والصناعية في مدينة بعقوبة من جهة وبين نوعية نماذج التربة المأخوذة من أراضي الكراجات والمولدات الكهربائية المحلية فضلاً عن محطات غسل وتشحيم السيارات ، وبحسب النسب المئوية المبينة في الجدول 4-7 أيضاً، يتضح ان افضل منطقة عزلت منها المبيضات *Candida sp.* هي منطقة الصناعة الاولى لارتفاع نسب معدلات العينات الموجبة ، إذ بلغت 45% بواقع 27 عينة موجبة من اصل

60 نموذجاً تليها منطقة حي المعلمين بنسبة 37% وبواقع 22 عينة موجبة بينما كانت أقل معدلات لنسب المبيضات المعزولة ضمن منطقة الصناعة الثانية ، إذ بلغت 30% ، إذ كانت العينات الموجبة 18 من أصل 60 نموذجاً.

الجدول 4- 6 : نقاط وجود المبيضات المعزولة في محطات أخذ عينات التربة الملوثة بالملوثات النفطية والبتروجينية في بعض احياء مدينة بعقوبة																	
انواع خمائر المبيضات المعزولة قيد الدراسة <i>Candida sp.</i>																محطات اخذ عينات التربة	
نسبة العينات الموجبة %	تربة غسل وتشحيم السيارات					تربة كراجات تصليح السيارات					تربة المولدات الكهربائية المحلية						
	<i>C. famata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. ciferrii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. ciferrii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. ciferrii</i>	<i>C. parapsilosis</i>		
47	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	IN1	الصناعة الاولى
27	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	IN2	
47	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	IN3	
60	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	IN4	
13	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	IN5	الصناعة الثانية
47	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	IN6	
27	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	IN7	
33	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	IN8	
33	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	MI1	منطقة حي المعلمين
40	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	MI2	
47	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	MI3	
27	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	MI4	
	17	58	58	17	33	42	83	75	25	58	0	33	33	0	25	نسبة العينات الموجبة %	
المفتاح: + : نتيجة موجبة (عزلت الخميرة) ؛ - : سالب (لم تعزل الخميرة)																	

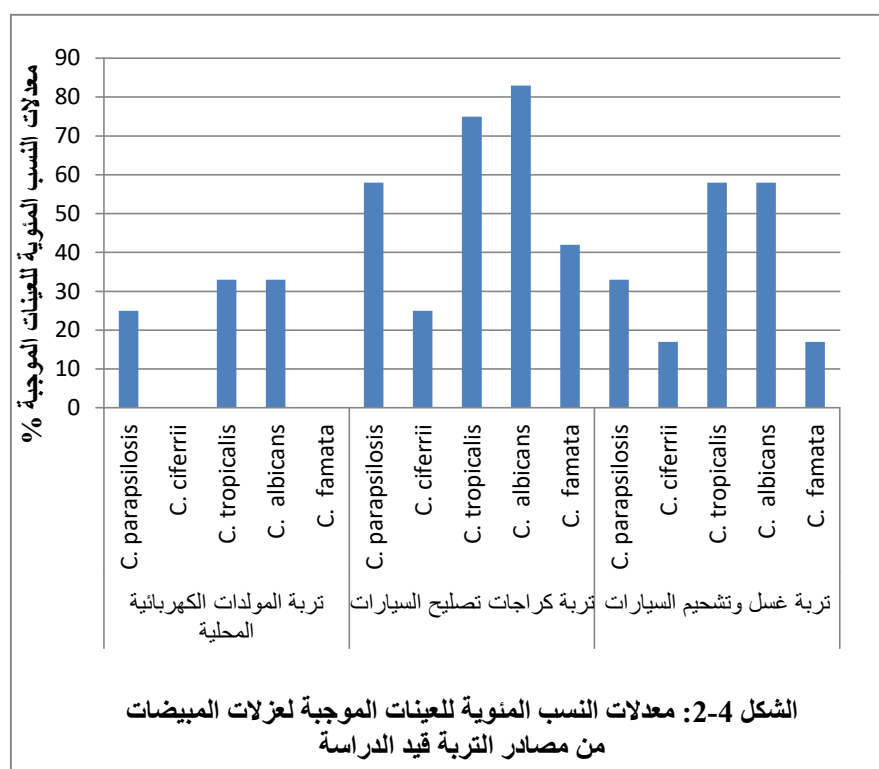
ربما يعود سبب ذلك الى كثرة النشاط البشري والصناعي في تلك المناطق ولاسيما في منطقة الصناعة الاولى وكذلك في منطقة حي المعلمين ، ومايرافق ذلك من ملوثات هيدروكربونية ناجمة عن الانشطة البشرية المختلفة ولاسيما تصليح اوغسل السيارات وتشحيمها بانواع مختلفة من

المواد والزيوت ذات الاصل البتروجيني ، فضلاً عن انواع الوقود كالكاز والبنزين وكل هذه المواد يمكن ان تذهب بشكل أو بآخر إلى أراضي تلك المرافق الصناعية وبالتالي يمكن أن تكون مصدراً ملائماً لنمو مختلف ميكروبات التربة التي تمتاز بقدرة تحمل أو استقلاب ايضي لتلك الملوثات الهيدروكربونية لغرض نموها وديمومتها ولاسيما الحلقية وبالاخص المركبات الفينولية، وربما يتوافق ذلك مع ماذكر في العديد من المصادر العلمية بخصوص هذا النشاط الميكروبي في التربة (Upasani و Varjani، 2016، Rizzo وآخرون، 2020).

الجدول 4-7: الاعداد والنسب المئوية لخمائر المبيضات المعزولة من عينات التربة المأخوذة من المناطق الصناعية في بعض الاحياء السكنية التابعة لقضاء بعقوبة					
مناطق سحب العينات	عدد العينات	عدد العينات الموجبة	النسبة المئوية للعينات الموجبة	عدد العينات السالبة	النسبة المئوية للعينات السالبة
الصناعة الاولى	60	27	45%	33	55%
الصناعة الثانية	60	18	30%	42	70%
منطقة حي المعلمين	60	22	37%	38	63%

ومن جهة أخرى يتبين من الشكل 4-2 ان اكثر نسب خمائر المبيضات قد عزلت في هذه الدراسة من عينات التربة المأخوذة من ارضية تربة كراجات تصليح السيارات ، ويتضح ذلك جليا من خلال معدلات النسب المئوية للعينات الموجبة . فقد كانت أعلى النسب تعود لخمائر المبيضات *C. albicans* ، إذ بلغت 83% تليها *C. tropicalis* بنسبة 75% ثم المبيضات *C. parapsilosis* بواقع 58% . بينما ظهرت اقل نسب للعينات الموجبة من خمائر المبيضات المعزولة قيد الدراسة في تربة أراضي المولدات الكهربائية المحلية ، إذ سجلت الخميرتين المبيضتين *C. albicans* و *C. tropicalis* أعلى نسبة وقد بلغت 33% لكليهما ثم تليهما خمائر المبيضات *C. parapsilosis* بواقع 25% ، بينما لم تسجل الخميرتين *C. famata* و *C. ciferrii* اي نسبة تذكر ضمن تربة أراضي المولدات الكهربائية المحلية. وربما يعود السبب في ذلك الى قلة نسب الملوثات الهيدروكربونية في أراضيها مقارنة مع كراجات الغسل والتصليح للسيارات فضلاً عن قلة النشاط البشري فيها ومايرافقه في تلك الملوثات والذي يتوافق مع ماذكر عن تلوث التربة بالانسكابات النفطية او الملوثات البتروجينية (Olajire و Essien، 2014؛

Varjani، 2017، Espinoza-Tofalos وآخرون، 2020) ويتوافق أيضاً مع الذي بينه الكثير من الباحثين بخصوص تحليل المخاليط المعقدة من الهيدروكربونات مثل النفط الخام والمعادن في التربة. يتطلب مجتمعات مختلطة من الكائنات الحية الدقيقة ذات قدرات إنزيمية شاملة (Bajpai وآخرون، 2011). ومن بينها العديد من أنواع البكتيريا التي تتغذى حصرياً على الهيدروكربونات (Yakimov وآخرون، 2007) وقد عزلت أجناس الفطريات *Amorphoteca*، *Neosartorya*، *Talaromyces*، و *Graphium* وأجناس الخميرة، وبالتحديد، *Candida*، *Yarrowia*، و *Pichia* من التربة الملوثة بالبترول وثبت أنها من الكائنات الحية الدقيقة المحتملة لتحليل الهيدروكربونات الملوثة (Chaillan وآخرون، 2004).



4-2-2-2 تشخيص خمائر المبيضات المعزولة من نماذج التربة الملوثة

4-2-2-2-1 خصائص النمو المظهرية لخمائر المبيضات المعزولة

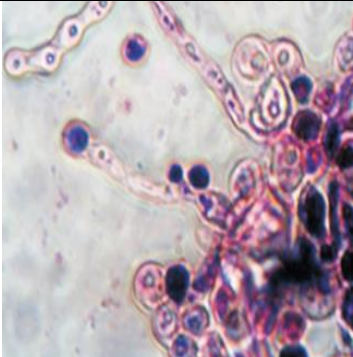
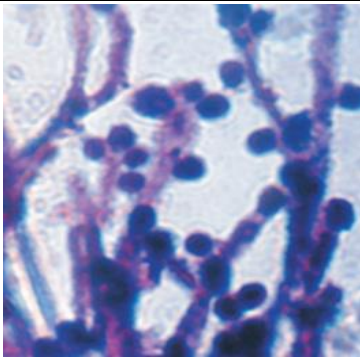
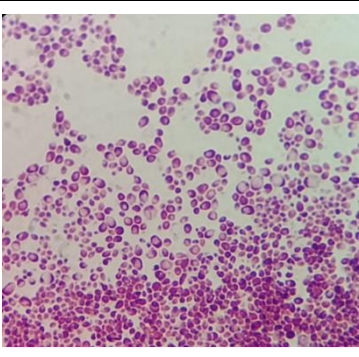
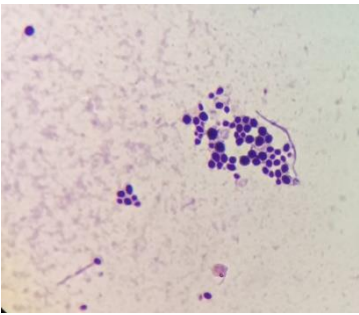
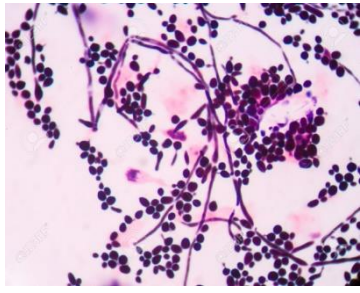
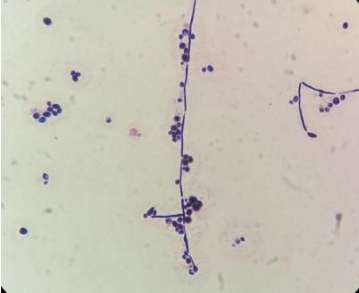
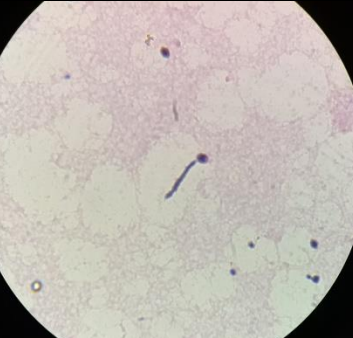
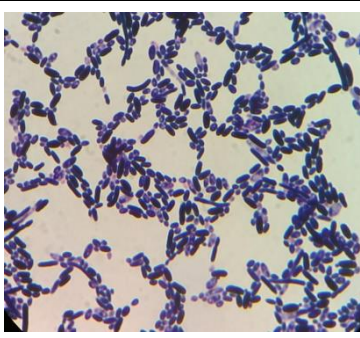
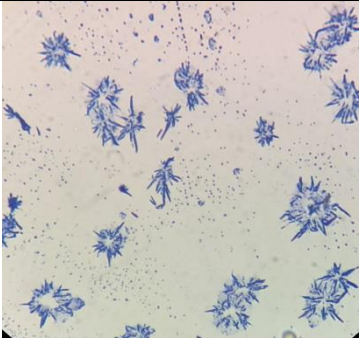
يبين الجدول 4-8 ان جميع الخمائر كانت موجبة لفحص صبغة كرام وهي نتيجة متوافقة مع الكثير من الدراسات، إذ ان صبغة كرام تعد من اهم واكثر الصبغات التفريقية شيوعا في

المختبرات المايكروبيولوجية. وتكمن اهمية هذه الصبغة في فائدتها الكبرى من ناحية استعمالها في تشخيص البكتريا والخمائر (الخمائر موجبة لصبغة كرام) ، ولا يمكن تطبيقها على اي من الاحياء المجهرية الأخرى كالابتدائيات او الفطريات (Collins وآخرون ، 2004 ، Silva وآخرون ، 2012 ؛ الحديثي ، 1983).

الجدول 4-8 : خصائص النمو المظهرية للمبيضات المعزولة من نماذج التربة على الاوساط الزرعية السائلة					
المبيضات <i>Candida sp.</i>	صبغة كرام	الانبوب الجرثومي	الغزل الفطري		التبرعم الكونيدي
			كاذب	حقيقي	
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	+	-	كروية الى بيضوية globose to ovoid
<i>C. ciferrii</i>	+	-	+	+	ovals chain سلسلة بيضاوية
<i>C. tropicalis</i>	+	-	-/+	+	كروية الى شبه كروية Spherical to sub spherical
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	كروية الى شبه كروية Spherical to sub spherical
<i>C. famata</i>	+	-	+	-	بيضوية الى اهليلجية Ovoid to ellipsoidal
المفتاح: + : نتيجة موجبة ؛ - : نتيجة سالب					

أما اختبار تكوين الانبوب الجرثومي GTT فقد اعطى نتيجة ايجابية فقط مع خمائر المبيضات *C. albicans* وهي نتيجة متوافقة مع ما ذكره (Ha وآخرون ، 2010؛ Collins وآخرون ، 2004) ، بأنه اختبار لإنتاج الغزل الفطري الحقيقي true mycelium والذي يمكن من خلاله تفريق المبيضات *Candida albicans* و *Candida dubliniensis* عن بقية الخمائر. ولوحظ أيضاً ان المبيضات *C. parapsilosis* هي الوحيدة بين الخمائر المعزولة قيد الدراسة التي لم تنتج غزل فطري حقيقي و إن وجد فهو من النوع الكاذب باستثناء عدد قليل من عينات المبيضات *C. tropicalis* بدورها لم تنتج غزل فطري حقيقي وعلى النقيض من ذلك فان المبيضات *C. famata* لم تنتج الغزل الفطري الكاذب وهي نتيجة متوافقة مع ما تم ذكره عن *C. parapsilosis* بأن هذا النوع لا ينتج خيوطاً حقيقية ، ولكن يمكنه إنشاء خيوط زائفة تكون كبيرة ومنحنية بشكل مميز ، وغالباً ما يشار إليها باسم الخلايا العملاقة giant cells (Rigo وآخرون ، 2010 ؛ Silva وآخرون ، 2012). وقد تبين أيضاً من خلال الفحص المجهرى على القوة التكبيرية 40x و 100x لعينات المبيضات *C. ciferrii* سلسلة من البلاستوكونيدات بأشكال

بيضوية وبأحجام مختلفة ، مرتبة على طول الخيوط الكاذبة والخيوط الحقيقية وهي نتيجة متوافقة مع ما وصفه (Gomes وآخرون ، 2014) ، وكما هو مبين في اللوحة 2-4.

		
<i>Candida ciferrii</i> pseudo hyphae	<i>Candida ciferrii</i> – true hyphae	<i>Candida tropicalis</i> –Gram+
		
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida ciferrii</i> –Gram+
		
<i>Candida albicans</i>	Budding – pseudohypha	<i>Candida albicans</i> – Gram+
		
<i>C.albicans</i> –germ tube	<i>Candida parapsilosis</i> –Gram+	<i>Candida famata</i> – Gram+

اللوحة 2-4: مجموعة الصور للخصائص المجهرية والمظهرية لخمائر المبيضات المعزولة والمشخصة من تخافيف عينات التربة الملوثة المأخوذة من بعض الاحياء الصناعية والسكنية في قضاء بعقوبة

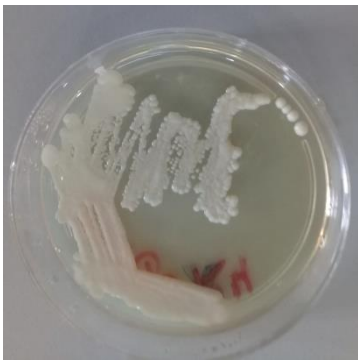
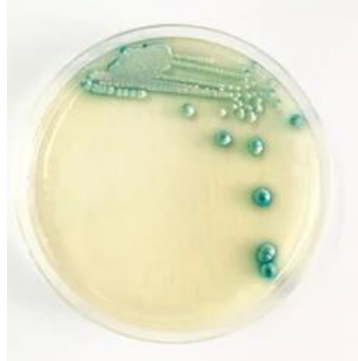
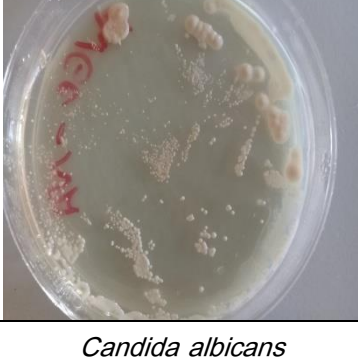
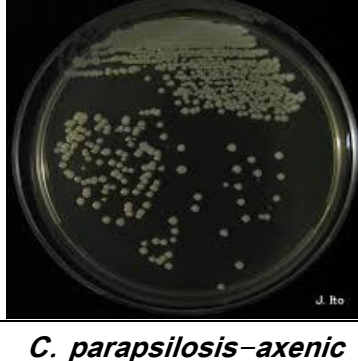
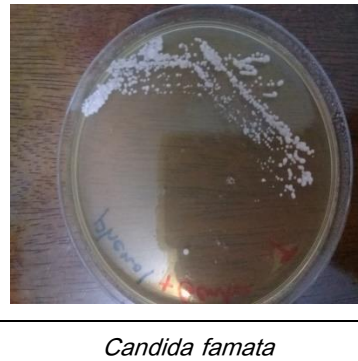
بينما ظهر التبرعم البلاستوكونيدي budding blastoconidia عند الفحص المجهرى للمبيضات *C. albicans* بأشكال كروية إلى شبه كروية بشكل تجمعات حول الخيط الفطري ، الخيط الفطري الكاذب pseudohyphae متفرع وتتعاقد البلاستوكونيديات عليه بشكل كثيف والابواغ المتدثرة chlamydospores كروية وطرفية الموقع بشكل نهايات منتفخة او متورمة بعض الشيء تظهر بوضوح في الوسط الزرعي Dalmau plate culture وقد توافقت تلك النتيجة مع (Collins وآخرون ، 2004).

4-2-2-2 خصائص المستعمرات المظهرية لخمائر المبيضات المعزولة

ظهرت المستعمرات لعينات المبيضات *C. ciferrii* كريمية اللون cream-colored وخشنة rough ومرتفعة raised ومتجعدة wrinkled وهي نتيجة متوافقة مع (Duane وآخرون ، 2006 ، Gomes وآخرون ، 2014). وبالنسبة لمستعمرات عينات المبيضات *C. albicans* فقد ظهرت على الوسط الزرعي SDA وMSM باللون الابيض الى الكريمي white to cream-coloured اما عيناتها النامية على الوسط الزرعي الكروموجيني Chrom agar Candida medium (CaC) فقد كانت باللون الاخضر بينما كانت مستعمرات المبيضات *C. tropicalis* باللون الازرق الداكن على الوسط الكروموجيني وهو امر متوافق مع (Duane وآخرون ، 2006 ؛ Alothman وآخرون ، 2012) وكانت المستعمرات لاغلب الخمائر المعزولة باستثناء *C. ciferrii* طبيعة سطحها ناعم smooth ومجرد glabrous اما شكل المستعمرة فقد كانت خميرية الشكل yeast-like ويتوافق ذلك مع ما ذكره (Rigo وآخرون ، 2010 ؛ Kidd وآخرون ، 2016) وكما هو مبين في الجدول 4-9 واللوحة 4-3.

الجدول 4-9: خصائص المستعمرات المظهرية للمبيضات المعزولة قيد الدراسة على اطباق الأوساط الزرعية الصلبة					
شكل المستعمرات	طبيعة المستعمرات	لون المستعمرات على الأوساط الزرعية الصلبة			المبيضات <i>Candida sp.</i>
		CHROM	MSM	YNB	
تشبه الخميرة و مجردة	ناعمة لماعة	ابيض	ابيض الى كريمي	-----	<i>C. parapsilosis</i>
مرتفعة ومجعدة	خشنة	ابيض	كريمي اللون	-----	<i>C. ciferrii</i>
تشبه الخميرة و مجردة	ناعمة لماعة	ازرق غامق	ابيض الى كريمي	-----	<i>C. tropicalis</i>
تشبه الخميرة و مجردة	ناعمة لماعة	اخضر مزررق	ابيض الى كريمي	ابيض	<i>C. albicans</i>
تشبه الخميرة و مجردة	ناعمة لماعة	ابيض	ابيض الى كريمي	-----	<i>C. famata</i>

وبهذا الصدد يشير Ellis وآخرون (2007) إلى أن أغلب مستعمرات الـ *Candida* spp. تمتلك مثل هذه الخصائص المظهرية عند زرعها على الاوساط الزرعية SDA و MSM و YNB وتتفق هذه النتيجة مع ما ذكره Singh وآخرون (2006) بظهور مستعمرات ذات لون كريمي لماعه ملساء ودائرية الشكل عند توفر ظروف الزرع الملائمة.

		
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida albicans-chrom agar</i>	<i>Candida tropicalis-axenic</i>
		
<i>Candida tropicalis -chrom agar</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida ciferrii</i>
		
<i>Candida albicans</i>	<i>C. parapsilosis-axenic</i>	<i>Candida famata</i>
اللوحة 4-3: مجموعة صور مستعمرات خمائر المبيضات المعزولة والمشخصة من تخافيف عينات التربة الموثلة المأخوذة من بعض الاحياء الصناعية والسكنية في قضاء بعقوبة		

4-2-2-3 فحوصات التخمر الكيموحيوية لخمائر المبيضات المعزولة

أظهرت نتائج فحوصات التخمر المبينة في الجدول 4-10 عدم قدرة جميع خمائر المبيضات المعزولة قيد الدراسة على تخمير اللاكتوز وهي نتيجة متوافقة مع (Kidd وآخرون، 2016). وكانت جميع المبيضات قد خمرت الكلوكوز باستثناء المبيضات *C. famata* و *C. ciferrii* ، والجدير بالذكر أن الأخيرة قد خمرته في نسبة قليلة من العينات وتدل تلك النتائج أن سكر الكلوكوز من السكريات البسيطة التي تميل معظم أنواع الخمائر المعزولة إلى استعماله كمصدر غذائي بسيط و غني بالطاقة وهذه النتائج تتفق مع ماتوصل إليه (حبيب وآخرون، 2015).

من جهة أخرى كانت المبيضات *C. ciferrii* غير قادرة على تخمير السكريات باستثناء الكلوكوز على نحو متغير وربما يفسر ذلك قلة نسب تواجدها بين الأنواع التي تشاركها في ذلك *C. famata* والتي كان معدل تخميرها لاغلب السكريات بطيء جدا . وعلى العكس من ذلك فقد وجد نشاط ملحوظ لكل من خمائر المبيضات *C. tropicalis* و تليها *C. albicans* في تخمير الكلوكوز والمالتوز وهذه النتيجة تتفق مع Ellis وآخرون (2007) الذين بينوا أن هذين النوعين *C. albicans* و *C. tropicalis* يمتلكان كفاءة عالية في تمثيل معظم أنواع السكريات مما يوضح أحد أسباب عزلهما بشكل متكرر من النمذج المختلفة .

الجدول 4-10 : نتائج فحوصات تخمر السكريات لخمائر المبيضات المعزولة قيد الدراسة

المبيضات <i>Candida sp.</i>	الكلوكوز Glucose	الكالاكتوز Galactose	السكروز Sucrose	المالتوز Maltose	اللاكتوز Lactose	التريهالوز Trehalose
<i>C. parapsilosis</i>	+	v	(s) -	(s) -	-	(s) -
<i>C. ciferrii</i>	v	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	v	+	-	(s) +
<i>C. albicans</i>	+	v	(s) -	+	-	v
<i>C. famata</i>	(w) -	(w) -	(w) -	-	-	(w) -

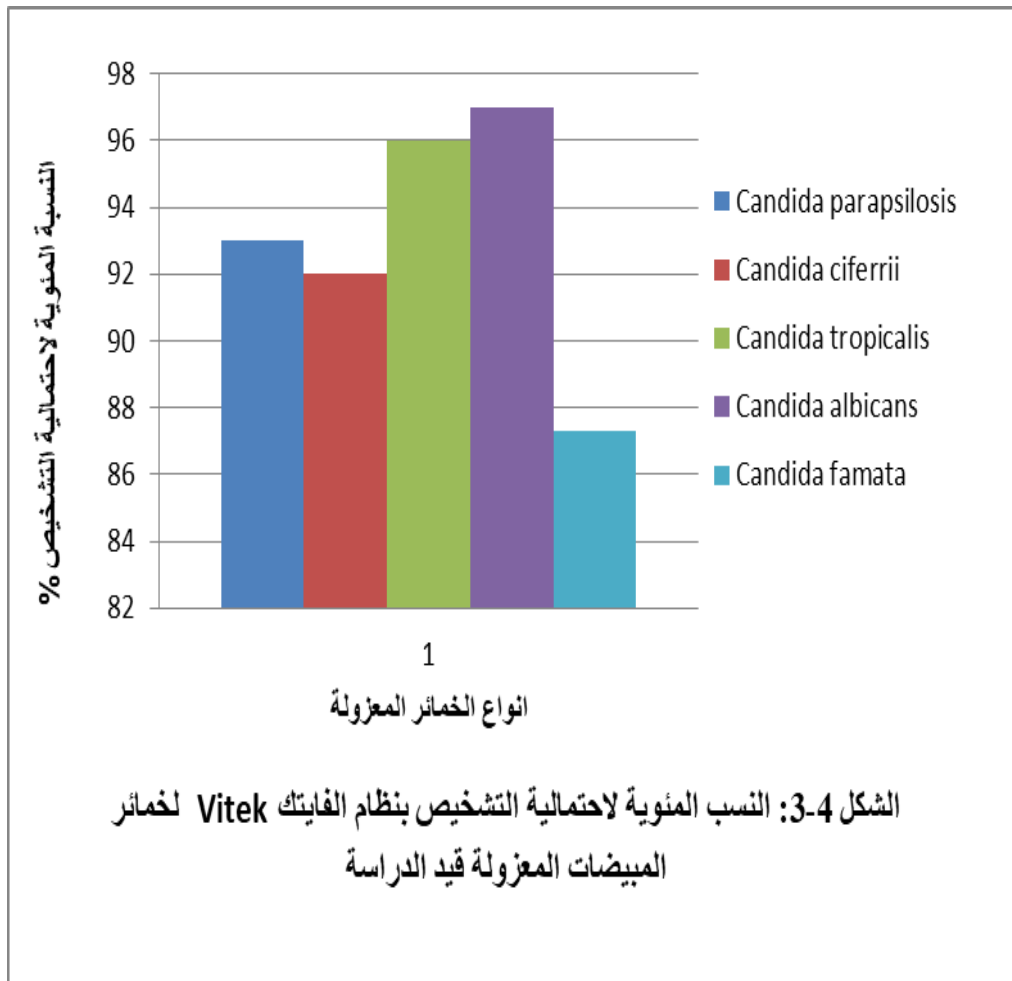
المفتاح: + : نتيجة موجبة (تخمير) ؛ - : سالب (غير مخمر) ؛ v : تخمير متغير ؛ s : تخمير بطيء ؛ w : تخمير ضعيف

4-2-2-4 التشخيص بنظام الفايترك لخمائر المبيضات المعزولة

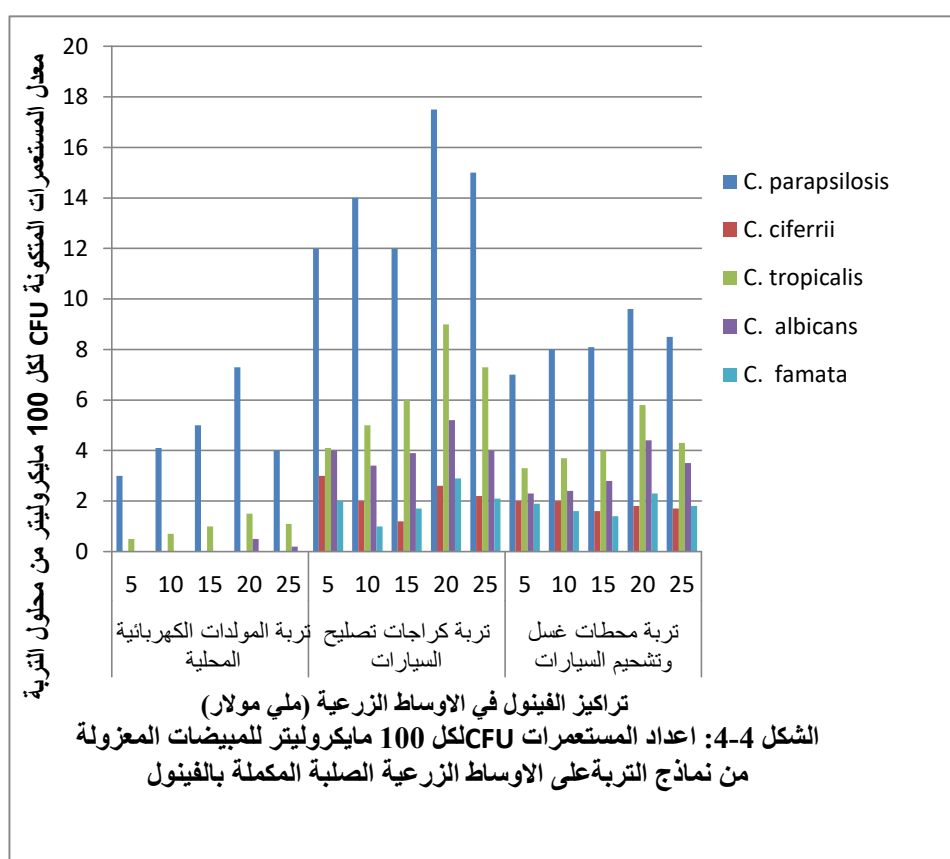
تم اجراء فحص التشخيص والتوصيف التأكيدي بوساطة نظام الفايترك Vitek compact2 system diagnosis (BioMerieux®) الالي في (مختبرات النخبة / بغداد - فرع الوثائق) من خلال بطاقات تشخيص الخمائر واشباه الخمائر YST - yeasts and yeast-like organisms ، وباستخدام مستعمرات نقية مخططة في وسط MSM ، تم تحضيرها عند 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة وكما هو مبين في الجدول 4-11.

4-11: النسب المئوية للاحتمالية في تشخيص المبيضات المعزولة من عينات التربة المأخوذة من بعض الاحياء السكنية والصناعية في مدينة بعقوبة				
المعدل $\pm$ الانحراف القياسي %	الرقم الحيوي Bio number	الاحتمالية Probability %	الرمز الاحصائي	انواع المبيضات Candida species
87.3 $\pm$ 2.5	6502544025323671	87	5	<i>Candida famata</i>
96 $\pm$ 1.0	6502544065323771	95	3	<i>Candida tropicalis</i>
97 $\pm$ 2.5	6502544065323771	94	4	<i>Candida albicans</i>
93 $\pm$ 2.5	6512564065333771	90	1	<i>Candida parapsilosis</i>
87 $\pm$ 2.5	6512564065333771	90	5	<i>Candida famata</i>
97 $\pm$ 2.5	6512564065333771	89	4	<i>Candida albicans</i>
92 $\pm$ 2.8	6502564075337771	90	2	<i>Candida ciferrii</i>
93 $\pm$ 2.5	6502544065333771	94	1	<i>Candida parapsilosis</i>
87 $\pm$ 2.5	6547564065373771	85	5	<i>Candida famata</i>
97 $\pm$ 2.5	6502544065327771	98	4	<i>Candida albicans</i>
97 $\pm$ 2.5	6502544065327771	98	4	<i>Candida albicans</i>
97 $\pm$ 2.5	4502544065327771	98	4	<i>Candida albicans</i>
96 $\pm$ 1.0	6557575065377771	96	3	<i>Candida tropicalis</i>
97 $\pm$ 2.5	6502544065327771	98	4	<i>Candida albicans</i>
97 $\pm$ 2.5	4502544065327771	98	4	<i>Candida albicans</i>
97 $\pm$ 2.5	4502544065327771	98	4	<i>Candida albicans</i>
97 $\pm$ 2.5	4502544065327771	98	4	<i>Candida albicans</i>
96 $\pm$ 1.0	6502544065323771	97	3	<i>Candida tropicalis</i>
97 $\pm$ 2.5	4502544065327771	98	4	<i>Candida albicans</i>
97 $\pm$ 2.5	4502544065327771	98	4	<i>Candida albicans</i>
92 $\pm$ 2.8	6502544065323771	94	2	<i>Candida ciferrii</i>
97 $\pm$ 2.5	4502544065327771	98	4	<i>Candida albicans</i>
97 $\pm$ 2.5	4502544065327771	98	4	<i>Candida albicans</i>
93 $\pm$ 2.5	6557575065377771	95	1	<i>Candida parapsilosis</i>
94.8 $\pm$ 4.1		94.8 $\pm$ 4.1	المعدل $\pm$ الانحراف القياسي	
CRD-ANOVA-TABLE One Way sample		P.value (α 0.05)(4,19) = 2.90		F= 1.23* L.S.D.(α 0.05)(19) = 1.52

كانت نتائج عينات المبيضات المعزولة قيد الدراسة بنسب احتمالية عالية وقد بلغ عدد النماذج المشخصة ايجابيا بنظام الفايتهك 24 نموذجا من اصل 30 نموذجا وبعد اجراء التحليل الاحصائي للقيم المبينة في الجدول 4-11 تبين عدم وجود فروقا معنوية في نسب احتمالية التشخيص بين انواع خمائر المبيضات المعزولة قيد الدراسة مما يدل على كفاءة العزل لتلك الخمائر (Pincus، 2020). وكانت أعلى قيم لنسبة احتمالية التشخيص تعود الى عينات المبيضات *C. albicans* بمعدل 97 % تليها *C. tropicalis* بمعدل 96% ثم *C. parapsilosis* بمعدل 93 % ، بينما كانت اقل قيم لنسبة احتمالية التشخيص تعود الى عينات المبيضات *C. ciferrii* بمعدل 92 % تليها *C. famata* بمعدل 87.3 % وكما هو مبين في الشكل 4-3 وربما تتفق تلك النتائج مع ما ذكر بشأن *C. albicans* و *C. tropicalis* إذ بالإمكان عزلها بشكل متكرر ومن مختلف النماذج لما تمتلكها من كفاءة عالية في تمثيل معظم انواع السكريات (Ellis وآخرون ، 2007).



بعد اجراء التحليل الاحصائي للقيم المبينة في هذا الجدول، تبين ان هنالك فروقا معنوية في القدرة التحملية للفينول بين انواع خمائر المبيضات بحسب مصادر التربة التي عزلت منها قيد الدراسة ، وان أعلى معدلات للمستعمرات المتكونة CFU كانت في مزارع التركيز الفينولي العالي 25 ملي مولار لخمائر المبيضات المعزولة من تربة ارضية كراجات تصليح السيارات ، إذ بلغت 7.5 ± 6.2 وبالمقابل كانت اقل معدلات CFU للمبيضات المعزولة من نفس المصدر تقع ضمن التركيز الفينولي 10 ملي مولار إذ بلغت 3.3 ± 2.1 . بينما كانت أدنى معدلات للمستعمرات المتكونة CFU في مزارع التركيز الفينولي المنخفض 5 ملي مولار لخمائر المبيضات المعزولة من تربة ارضية المولدات الكهربائية المحلية ، إذ بلغت 0.7 ± 1.3 وبالمقابل كانت أعلى معدلات CFU للمبيضات المعزولة من نفس المصدر تقع ضمن التركيز الفينولي 20 ملي مولار ، إذ بلغت 1.9 ± 3.1 . تليها معدلات CFU المتكونة في مزارع التركيز الفينولي المنخفض نسبياً 10 ملي مولار لخمائر المبيضات المعزولة من تربة ارضية محطات غسل وتشحيم السيارات ، إذ بلغت 3.5 ± 2.6 وبالمقابل كانت أعلى معدلات CFU للمبيضات المعزولة من نفس المصدر تقع ضمن التركيز الفينولي 5 ملي مولار ، إذ بلغت 6.1 ± 5.4 وكما هو مبين في الشكل 4-4.



مما يدل على ان خمائر المبيضات المعزولة من تربة ارضية كراجات تصليح السيارات كانت هي الافضل في تحمل تراكيز الفينول العالية من فئة 25 ملي مولار وكما هو موضح في الشكل 4-4، ليس هذا فحسب بل انها تستخدمه أيضاً في النمو كمصدر للكربون والطاقة ، فقد إنخفض معدل المستعمرات المتكونة نسبياً عند التركيز 10ملي مولاروبما يعود سبب ذلك الى التكيف الميكروبي الذي تمتلكه تلك الخمائر مع الملوثات الهيدروكربونية من اصل بتروجيلي وعلى رأسها وقود السيارات كالكاز والبنزين فضلاً عن زيوت المحركات المتنوعة المطروحة الى تربة الأرضيات من الناحية الكمية والنوعية في كراجات تصليح السيارات .وتتفق تلك النتائج مع Miranda وآخرون (2007)، في التحري الذي اجري من قبلهم عن إمكانية إستخدام الخمائر المحللة لزيوت الديزل في المعالجة الحيوية للمناطق الملوثة بهذا الملوث بالقرب من ميناء سوابي Suape Port في ولاية بيرنامبوكو Pernambuco - البرازيل، فقد اشاروا الى دور سلالات الخمائر التي عزلوها من تلك المناطق في التحلل الحيوي لمركبات وقود الديزل ومن بين تلك الخمائر 862 UFPEDA *Candida ernobii* و *Rhodotorula aurantiaca* 845 UFPEDA.

ثم عاودت اعداد CFU لخمائر المبيضات بارتفاع مستقر مع زيادة تركيز الفينول لتصل عند أعلى تركيز فينولي 20 6.2 ± 7.5 . تليها خمائرالمبيضات المعزولة من تربة ارضية محطات غسل وتشحيم السيارات والتي كانت اقل تحملاً لتراكيز الفينول العالية فقد استطاعت ان تنمو بأعلى مقدار 5.4 ± 6.1 في تركيز 5 ملي مولار وانخفض نموها بشكل نسبي في التركيز الأعلى 10 ملي مولار ربما بسبب عدم تكيفها للتركيز الأعلى ثم لوحظ زيادة عدد مستعمراتها بعد ذلك بشكل تدريجي مع زيادة تراكيز الفينول لتبلغ أعلى معدل CFU لها 3.1 ± 4.8 عند تركيز الفينول 20 ملي مولار بعدها عاودت اعداد المستعمرات في الانخفاض ربما يعود السبب في ذلك الى ظهور التأثير السمي للفينول (Patel وآخرون ،2016) ،على نمو وبقاء خمائر المبيضات. اما خمائر المبيضات المعزولة تربة ارضية المولدات الكهربائية المحلية فقد احتاجت الى تكيف اكثر مع تدرج التركيز الفينولي ضمن فترة تطبيع lag phase لغاية التركيز 10 ملي مولار ، إذ بقي معدل اعداد مستعمراتها ثابتا تقريبا لتزداد مع التركيز 15 و 20 ملي مولار لتبلغ معدلات CFU لها 1.2 ± 2.2 و 1.9 ± 3.1 على الترتيب لتعاود الانخفاض عند التركيز 20 ملي مولار والذي قد يكون سببه التأثير السمي للفينول. وهذه النتيجة تتفق مع ما تم ذكره في الادبيات العلمية عن تأثير

زيادة تراكيز الفينول المختلفة على نمو سلالات الخميرة إذ يمكن ان يؤدي ذلك الى انخفاض معدل تحلله (Sinigaglia وآخرون ، 2010 ؛ Karimi و Hassanshahian ، 2016).

ومن جهة أخرى اظهر التحليل الاحصائي فروقا معنوية عالية في القدرة التحملية للفينول بين انواع خمائر المبيضات المعزولة قيد الدراسة ، و إن أعلى معدلات اعداد المستعمرات المتكونة CFU كانت على الاوساط الزرعية للمزارع الفينولية للمبيضات *C. parapsilosis* ، إذ بلغت 9.0 ± 4.3 عند التخفيف 10^{-5} ، تليها مزارع *C. tropicalis* ، إذ بلغت 3.8 ± 2.6 عند التخفيف 10^{-5} ثم تليها اعداد المستعمرات في مزارع المبيضات *C. albicans* بمقدار 2.5 ± 1.8 عند التخفيف 10^{-4} ، بينما كانت اقل معدلات اعداد المستعمرات المتكونة CFU كانت على الاوساط الزرعية للمزارع الفينولية للمبيضات *C. famata* ، إذ بلغت 1.3 ± 1.0 عند التخفيف 10^{-3} تليها المبيضات *C. ciferrii* ، إذ بلغت 1.4 ± 1.1 عند التخفيف 10^{-3} . وكان هناك تفاوت في معدلات اعداد المستعمرات المتكونة CFU لخمائر المبيضات على اساس اختلاف التدرج في التركيز الفينولي ضمن مزارعها من جهة وعلى اساس اختلاف مصدر عزلها من جهة أخرى ، فقد اظهرت *C. parapsilosis* من مصادر عزلها المختلفة قيد الدراسة ، أعلى مستويات لتحمل التركيز الفينولي لاسيما عند التركيز 20 ملي مولار ، إذ بلغت معدلات اعداد CFU التي كونتها على الاوساط الزرعية الفينولية 17.5 و 9.6 و 7.3 على الترتيب بالنسبة لمصادر عزلها من تربة أراضي كرجات تصليح السيارات و محطات غسل وتشحيم السيارات و المولدات الكهربائية المحلية تليها *C. tropicalis* ثم *C. albicans* من حيث قدرة تحملها عند نفس التركيز 20 ملي مولار بمعدلات اعداد CFU اقل نسبيا ، إذ بلغت 9.0 و 5.8 و 1.5 للمبيضات *C. tropicalis* عند التخفيف 10^{-5} و 5.2 و 4.4 و 0.5 للمبيضات *C. albicans* عند التخفيف 10^{-4} ولنفس الترتيب لمصادر العزل المختلفة قيد الدراسة .

من الجدير بالذكر يمكن القول إن المزارع الفينولية للمبيضات *C. famata* وتليها *C. ciferrii* لم تكن قادرة على تحمل اي تركيز للفينول في مزارعها من مصادر تربة ارضية المولدات الكهربائية المحلية ، إذ لم يظهر لها اي اعداد للمستعمرات على الاوساط الزرعية الفينولية وكذلك الحال بالنسبة للمبيضات *C. albicans* عند نفس مصدر العزل باستثناء التركيز 20 و 25 ملي مولار ، إذ بلغت معدلات اعداد CFU 0.5 و 0.2 على الترتيب ، وربما يعزى ذلك إلى

السمية العالية للمركبات الحيوية الغريبة xenobiotic التي قد تكون موجود في مصادر التربة والمياه العادمة (Karimi و Hassanshahian، 2016).

2-3-2-4 عد مستعمرات خمائر المبيضات ضمن المزارع الكاتيكولية

يبين الجدول 4-13 معدلات اعداد المستعمرات المنفردة المتكونة CFU على الاوساط الزرعية الصلبة (YNB او MSM) المعززة بتدرج في التركيز الكاتيكولي ، بعد اخضاعها لنشر 100 مايكروليتر من تخافيف المزارع الفرعية السائلة لنفس الاوساط الزرعية المكملة بنفس تدرج التراكيز الكاتيكولية 10 و 20 و 30 و 40 و 50 ملي مولار (المزارع الفرعية الكاتيكولية) كمصدر وحيد للكربون والطاقة وبعد انقضاء مدة الحاضنة بدرجة حرارة 30 درجة مئوية ولمدة 24 ساعة.

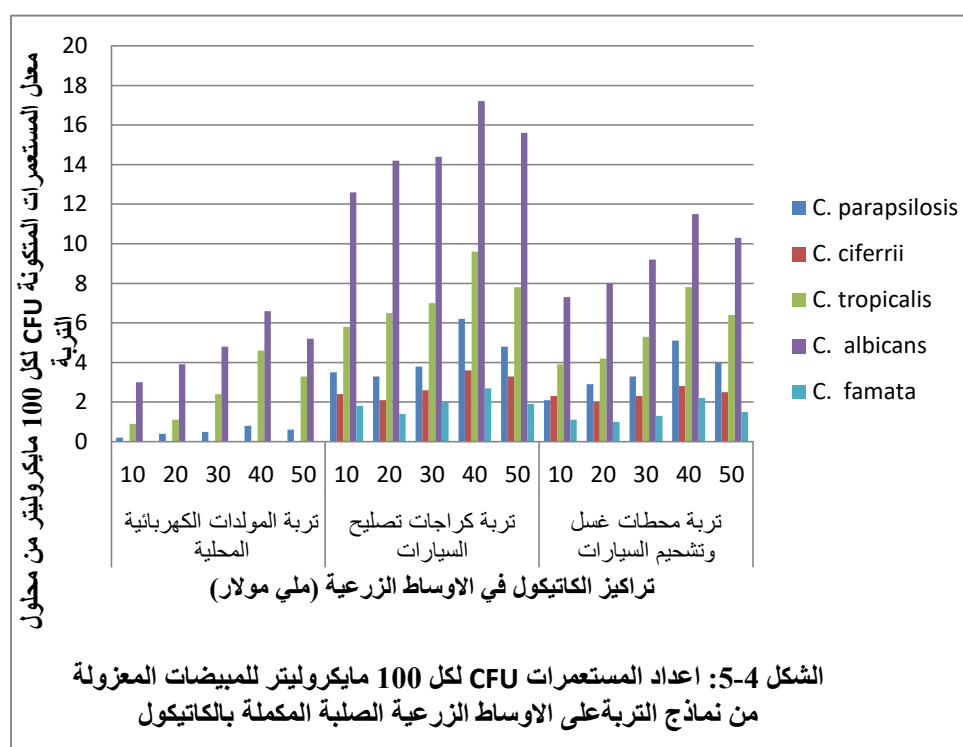
بعد اجراء التحليل الاحصائي للقيم المبينة في هذا الجدول 4-13 تبين ان هنالك فروقا معنوية في القدرة التحملية للكاتيكول بين انواع خمائر المبيضات بحسب مصادر التربة التي عزلت منها ، وإن أعلى معدلات للمستعمرات المتكونة CFU كانت في مزارع التركيز الكاتيكولي العالي 40 ملي مولار للمبيضات المعزولة من تربة ارضية كراجات تصليح السيارات ، إذ بلغت 7.9 ± 5.9 وبالمقابل كانت اقل معدلات CFU للمبيضات المعزولة من نفس المصدر تقع ضمن التركيز الكاتيكولي 10 ملي مولار، إذ بلغت 5.2 ± 4.4 .

بينما كانت أدنى معدلات للمستعمرات المتكونة CFU في مزارع التركيز الكاتيكولي المنخفض 10 ملي مولار للمبيضات المعزولة من تربة ارضية المولدات الكهربائية المحلية، إذ بلغت 0.8 ± 1.3 وبالمقابل كانت أعلى معدلات CFU للمبيضات المعزولة من المصدر نفسه تقع ضمن التركيز الكاتيكولي 40 ملي مولار إذ بلغت 2.4 ± 3.0 . تليها معدلات CFU المتكونة في مزارع التركيز الكاتيكولي المنخفض 10 ملي مولار للمبيضات المعزولة من تربة ارضية محطات غسل وتشحيم السيارات ، إذ بلغت 3.3 ± 2.4 وبالمقابل كانت أعلى معدلات CFU للمبيضات المعزولة من نفس المصدر تقع ضمن التركيز الكاتيكولي 40 ملي مولار إذ بلغت 5.9 ± 3.8 .

الجدول 4-13: اعداد المستعمرات CFU لكل 100 مايكروليتر للمبيضات المعزولة من نماذج التربة على الاسواط الزراعية الصلبة المكملة بالكاتيكول							
المعدل ± الانحراف القياسي	<i>C. famata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. ciferrii</i>	<i>C. parapsilosis</i>	المبيضات <i>Candida</i> sp.	
	³ -10	⁵ -10	⁵ -10	³ -10	⁴ -10	التخافيف	
0.8±1.3	0.0	3.0	0.9	0.0	0.2	10	تربة المولدات الكهربائية المحلية
1.1±1.6	0.0	3.9	1.1	0.0	0.4	20	
1.5±2.1	0.0	4.8	2.4	0.0	0.5	30	
2.4±3.0	0.0	6.6	4.6	0.0	0.8	40	
1.8±2.3	0.0	5.2	3.3	0.0	0.6	50	
5.2±4.4	1.8	12.6	5.8	2.4	3.5	10	تربة كراجات تصليح السيارات
5.5±5.2	1.4	14.2	6.5	2.1	3.3	20	
6.0±5.1	2.0	14.4	7.0	2.6	3.8	30	
7.9±5.9	2.7	17.2	9.6	3.6	6.2	40	
6.7±5.4	1.9	15.6	7.8	3.3	4.8	50	
3.3±2.4	1.1	7.3	3.9	2.3	2.1	10	تربة محطات غسل وتشحيم السيارات
3.6±2.7	1.0	8.0	4.2	2.0	2.9	20	
4.3±3.1	1.3	9.2	5.3	2.3	3.3	30	
5.9±3.8	2.2	11.5	7.8	2.8	5.1	40	
4.9±3.5	1.5	10.3	6.4	2.5	4.0	50	
4.1±4.0	1.1±0.9	9.6±4.5	5.1±2.5	1.7±1.3	2.8±1.9	المعدل ± الانحراف القياسي	
CRBD-ANOVA-TABLE			P.value (α 0.05) (14 , 60) = 1.92			الفروقات بين تراكيز الفينول * F = 2.01 L.S.D.(α 0.05)(60) = 4.73	
			P.value (α 0.05) (4 , 70) = 2.52			الفروقات بين انواع الخمائر * F = 26.79 L.S.D.(α 0.05)(70) = 1.86	
معدل المستعمرات المتكونة (CFU) Colony Forming Units لكل 100 مايكروليتر من محلول التربة							

مما يدل على ان خمائر المبيضات المعزولة من تربة ارضية كراجات تصليح السيارات كانت هي الافضل في تحمل تراكيز الكاتيكول العالية من فئة 40 ملي مولار وكما هو موضح في الشكل 4-5، ليس هذا فحسب بل انها تستخدمه أيضاً في النمو كمصدر للكربون والطاقة فقد كانت هناك زيادة مضطربة في عدد المستعمرات التي تكونها خمائر المبيضات مع التدرج في التركيز الكاتيكولي في مزارعها ومن جميع مصادر عزلها قيد الدراسة، مما يدل على أن هذه الخمائر لم تحتاج إلى تكيف في بداية الامر مع الزيادة في التركيز الكاتيكولي كما حصل مع مزارع الفينول وانما ازداد نموها بشكل اسي exponential growth ، وربما احتاجت الى فترة تكيف قليلة جداً،

وقد يكون هذا مرتبطاً بالأكسدة التلقائية الطبيعية للكاتيكول (ASTDR، 2014)، مما يؤدي إلى وسيط سام قد يعيق عملية الإنزيم المؤكسد وبوجود الأوكسجين الذي يسبب تكوين quinine غير المستقر الذي سيعمل على زيادة معدل النمو، أو قد يعود سبب ذلك الى تفضيلها للكاتيكول كمصدر للكربون والطاقة باعتباره اسهل في التحلل مقارنة مع الفينول لاحتمالية تأكسده واستقلابه بانزيمات dioxxygenase (Tsai وآخرون، 2005؛ Zeyaulah وآخرون، 2018). وقد وجد ان الكاتيكول يمكن ان يسبب مدة تأقلم أو تطبيع lag period أطول في التراكيز العالية لغاية 910 ملغم. لتر⁻¹ أكثر مما هو عليه في التراكيز الواطئة (Rigo وآخرون، 2010)، مما يقود ذلك الى احتمالية التكيف الميكروبي الذي يمكن ان تمتلكه تلك الخمائر مع الملوثات الهيدروكربونية من أصل بتروجيني وعلى رأسها المركبات الفينولية الناجمة عن وقود السيارات كالكاز والبنزين فضلاً عن زيوت المحركات المتنوعة المطروحة الى تربة الأرضيات من الناحية الكمية والنوعية في كراجات تصليح السيارات (Miranda وآخرون، 2007).



عموما كانت أعلى تراكيز كاتيكول تحملتها خمائر المبيضات من مصادر عزلها المختلفة تقع ضمن 40 ملي مولار، إذ كانت معدلات اعداد CFU المتكونة لخمائر المبيضات في المزارع الكاتيكولية 7.9 ± 5.9 و 5.9 ± 3.8 و 2.4 ± 3.0 على الترتيب بالنسبة لمصادر تربة ارضيات

كراجات تصليح السيارات و محطات غسل وتشحيم السيارات و اخيرا المولدات الكهربائية المحلية. ثم عاودت معدلات اعداد CFU المتكونة للخمائر بالإنخفاض في التراكيز أعلى من 40 ملي مولار لتصل عند التركيز الكاتيكولي 50 ملي مولار إلى 6.7 ± 5.4 و 4.9 ± 3.5 و 1.8 ± 2.3 على الترتيب بالنسبة لمصادر تربة ارضيات كراجات تصليح السيارات و محطات غسل وتشحيم السيارات و المولدات الكهربائية المحلية. وربما يعود السبب في ذلك الى ظهور التأثير السمي للكاتيكول على نمو وبقاء خمائر المبيضات . وهذه النتيجة تتفق مع ما تم ذكره عن تأثير زيادة تراكيز الفينول المختلفة على نمو سلالات الخميرة إذ يؤدي الى انخفاض معدل تحلله وهذا يتوافق مع (Karimi و Hassanshahian، 2016).

ومن جهة أخرى اظهر التحليل الاحصائي فروقا معنوية جدا في القدرة التحملية للكاتيكول بين انواع المبيضات المعزولة ، و إن أعلى معدلات اعداد المستعمرات المتكونة CFU كانت على الاوساط الزرعية للمزارع الكاتيكولية للمبيضات *C. albicans* ، إذ بلغت 9.6 ± 4.5 عند التخفيف 10^{-5} ، تليها مزارع *C. tropicalis* ، إذ بلغت 5.1 ± 2.5 عند التخفيف 10^{-5} ثم تليها اعداد المستعمرات في مزارع المبيضات *C. parapsilosis* بمقدار 2.8 ± 1.9 عند التخفيف 10^{-4} ، بينما كانت أقل معدلات اعداد المستعمرات المتكونة CFU كانت على الاوساط الزرعية للمزارع الكاتيكولية لخمائر المبيضات *C. famata* ، إذ بلغت 1.1 ± 0.9 عند التخفيف 10^{-3} تليها المبيضات *C. ciferrii* ، إذ بلغت 1.7 ± 1.3 عند التخفيف 10^{-3} . وقد كان هناك تفاوت في معدلات اعداد المستعمرات المتكونة CFU لخمائر المبيضات على أساس إختلاف التدرج في التركيز الكاتيكولي ضمن مزارعها من جهة وعلى أساس إختلاف مصدر عزلها من جهة أخرى ، فقد اظهرت *C. albicans* من مصادر عزلها المختلفة قيد الدراسة، أعلى مستويات لتحمل التركيز الكاتيكولي لاسيما عند التركيز 40 ملي مولار، إذ بلغت معدلات اعداد CFU التي كونتها على الاوساط الزرعية الكاتيكولية 17.2 و 11.5 و 6.6 على الترتيب بالنسبة لمصادر عزلها من تربة أرضيات كراجات تصليح السيارات و محطات غسل وتشحيم السيارات و المولدات الكهربائية المحلية تليها *C. tropicalis* ثم *C. parapsilosis* من حيث قدرة تحملها عند نفس التركيز 40 ملي مولار بمعدلات اعداد CFU اقل نسبياً ، إذ بلغت 9.6 و 7.8 و 4.6 للمبيضات *C. tropicalis* عند التخفيف 10^{-5} و 6.2 و 5.1 و 0.8 للمبيضات *C. parapsilosis* عند التخفيف 10^{-4} ولنفس الترتيب لمصادر العزل المختلفة قيد الدراسة .

ومن الجدير بالذكر ان المزارع الكاتيكولية لخمائر المبيضات *C. famata* وتليها *C. ciferrii* لم تكن قادرة على تحمل اي تركيز للكاتيكول في مزارعها من مصادر تربة ارضية المولدات الكهربائية المحلية ، إذ لم يظهر لها اي اعداد للمستعمرات على الاوساط الزرعية الكاتيكولية . وفيما عدا ذلك وبالنسبة لأدنى مستويات التحمل للتركيز الكاتيكولية ، فقد ظهرت في المزارع الكاتيكولية للمبيضات *C. famata* عند التركيز 20 ملي مولار، إذ بلغت 1.0 و 1.4 المعزولة عند التخفيف 10^{-3} من تربة ارضية محطات غسل وتشحيم السيارات وكراجات تصليح السيارات على الترتيب . تليها *C. ciferrii* عند نفس التركيز 20 ملي مولار، إذ بلغت 2.0 و 2.1 المعزولة عند التخفيف 10^{-3} من تربة ارضية محطات غسل وتشحيم السيارات وكراجات تصليح السيارات على الترتيب.

4-2-4 اختبارات قدرة الخمائر على تحطيم المركبات الفينولية

4-2-4-1 تقدير متبقي الفينول في مزارع الخمائر الفرعية

يبين الجدول 4-14 معدلات قيم متبقي تراكيز الفينول في المزارع السائلة للخمائر المنماة بمعدل تلقيح 66.7 مايكروليتر . مل⁻¹ في المزارع الفرعية المعززة بتركيز فينول ابتدائي يبلغ مقداره 20 ملي مولار كمصدر وحيد للكربون والطاقة ، والتي تم استخراجها بالتركيز ملي مولار وفق عملية تحويل قراءات الامتصاصية للكثافة الضوئية OD Optical Density بناء على معادلة الميل المستتبطة من المنحنى القياسي للفينول المبين في الشكل الملحق 4-1 والذي تم تحضيره مسبقا.

وبعد اجراء التحليل الاحصائي للقيم المبينة في الجدول 4-14 ، تبين ان هنالك فروقا معنوية عالية في التحمل او القدرة التحليلية للفينول بين انواع خمائر المبيضات المعزولة قيد الدراسة ، وان اقل قيم لمعدلات الفينول المتبقية كانت في مزارع المبيضات *C. parapsilosis* خلال مدة حضانة المزارع البالغة 6 ايام في درجة 30 درجة مئوية، إذ بلغت 11.3 ± 3.9 ملي مولار تليها المبيضات *C. tropicalis* ، إذ بلغت 12.7 ± 4.2 ملي مولار ثم المبيضات *C. albicans* بمعدل 15.1 ± 3.2 ملي مولار ، بينما كانت أعلى قيم لمعدلات الفينول المتبقية في

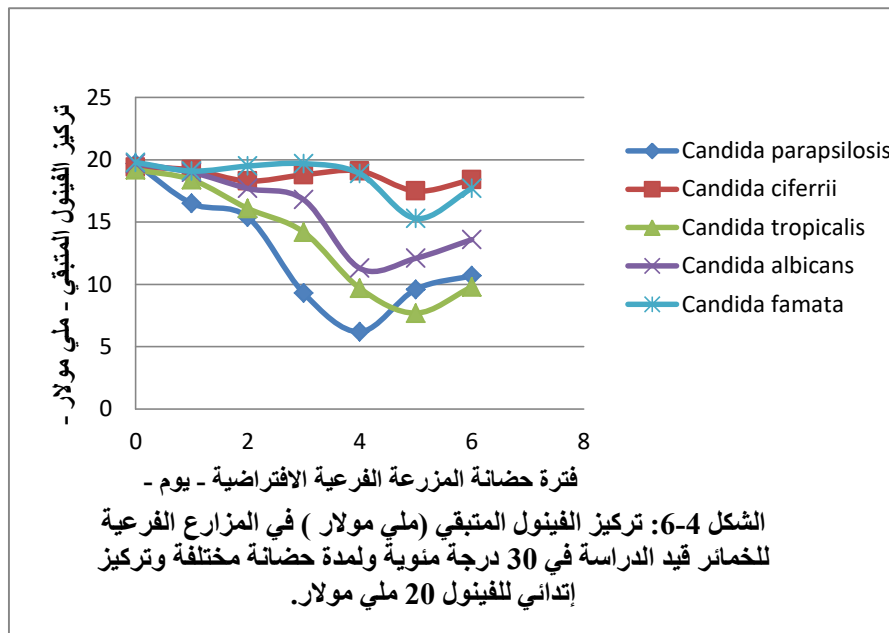
مزارع المبيضات *C. ciferrii* ، إذ بلغت 18.6 ± 0.6 ملي مولار تليها المبيضات *C. famata* بمعدل 18.4 ± 1.7 ملي مولار وكما هو مبين في الشكل 4-6.

الجدول 4-14: تركيز الفينول المتبقي (ملي مولار) في المزارع الفرعية للخمائر قيد الدراسة في 30 درجة مئوية ولمدة حضانة مختلفة وتركيز ابتدائي للفينول 20 ملي مولار							
المعدل ± الانحراف القياسي	معدل تركيز الفينول المتبقي (ملي مولار)						الخميرة
	فترة الحضانة (يوم)						
	6	5	4	3	2	1	
11.3±3.9	10.7	9.6	6.2	9.3	15.4	16.5	Candida parapsilosis
18.6±0.6	18.4	17.5	19.1	18.8	18.3	19.2	Candida ciferrii
12.7±4.2	9.8	7.7	9.7	14.2	16.1	18.4	Candida tropicalis
15.1±3.2	13.6	12.1	11.3	16.8	17.7	19	Candida albicans
18.4±1.7	17.7	15.3	18.9	19.7	19.5	19.1	Candida famata
15.2±4.1	14.1±3.9	12.4±4.0	13.1±5.7	15.8±4.2	17.4±1.7	18.4±1.1	المعدل ± الانحراف القياسي
CRBD-ANOVA-TABLE			P.value (α 0.05) (4 , 25) = 2.76			الفروقات بين المبيصات * F = 6.97 L.S.D.(α 0.05)(25) =3.62	
			P.value (α 0.05) (5 , 24) = 2.62			الفروقات بين فترات الحضانة * F = 2.85 L.S.D.(α 0.05)(24) =4.94	

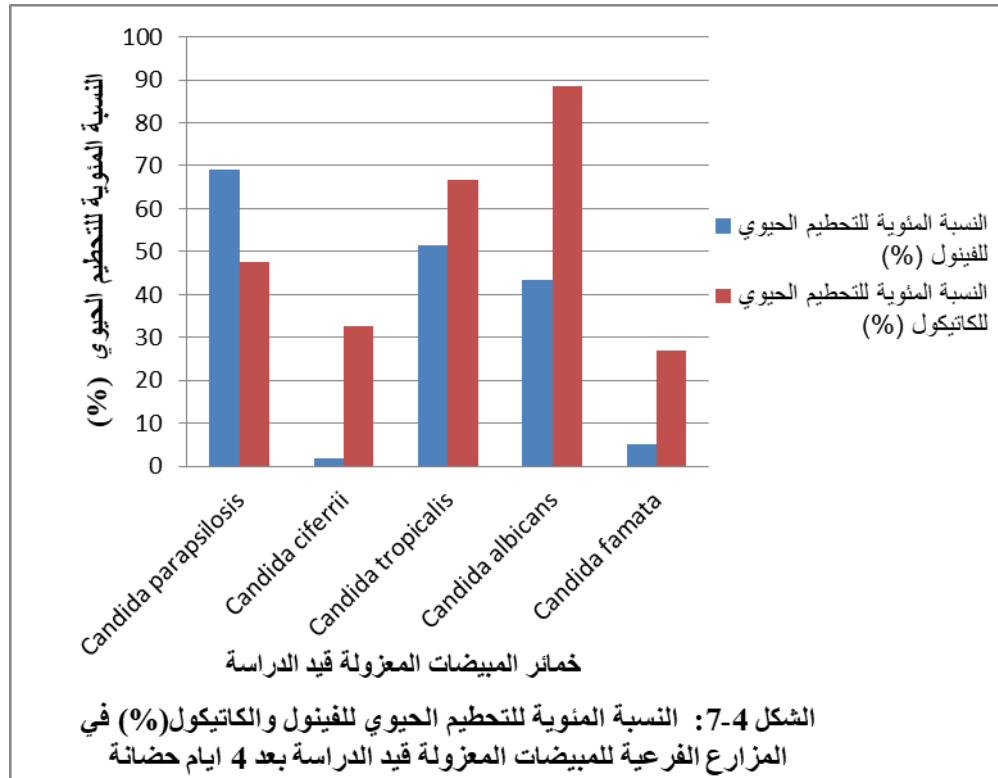
ربما تتوافق تلك النتائج مع ما ذكر في الأبحاث العلمية عن إستخدام اغناء المزارع لعدد من سلالات المبيضات بالفينول كمصدر وحيد للكربون بهدف اختبار قدراتها التحليلية للفينول. فقد تم تحديد *Candida albicans* بأنها تتمتع بقدرة تحليلية للفينول ويمكن لمعظم الخمائر المحلية تحمل الفينول بتركيز لا يزيد عن 18 ملي مولار، ومع بذل الكثير من الجهد في إحداث الطفرات ، تم تحسين المبيضات الاستوائية *C. tropicalis* لقبول تركيز الفينول حتى 22 ملي مولار (Chang وآخرون ، 1998 ؛ Tsai وآخرون ، 2005). وقد تم الإشارة الى ان بعض أعضاء أجناس الخميرة ، بما في ذلك *Rhodotorula* و *Trichosporon* و *Candida* ، يمكنهما استقلاب المركبات الفينولية كمصدر وحيد للكربون والطاقة (Santos وآخرون ، 2001؛ Tsai وآخرون ، 2005).

من جهة أخرى اظهر التحليل الاحصائي فروقا معنوية في قيم معدلات تراكيز الفينول المتبقية خلال فترات حضانة مختلفة لسلالات المبيضات المعزولة قيد الدراسة لاختبار قدراتها التحليلية في استقلاب الفينول ، وإن أقل قيم لمعدلات الفينول المتبقية في مزارع المبيضات كانت خلال اليوم

الخامس من فترة حضانة المزارع في درجة 30 درجة مئوية، إذ بلغت 12.4 ± 4.0 ملي مولار يليها اليوم الرابع 13.1 ± 5.7 ملي مولار . وكان هنالك تفاوت في الوقت الذي تستغرقه تلك المبيضات في تحطيم التركيز الابتدائي للفينول ، إذ استطاعت المبيضات *C. parapsilosis* خلال أربعة ايام من الحضانة ان تستقلب 69% من تركيز الفينول الإبتدائي وكان المتبقي من تركيز الفينول في مزرعتها خلال ذلك الوقت 6.2 ملي مولار .



بينما استطاعت المبيضات من نوع *C. tropicalis* خلال أربعة ايام من الحضانة ان تستقلب 61.5% من تركيز الفينول الابتدائي وكان المتبقي من تركيز الفينول في مزرعتها خلال ذلك الوقت 7.7 ملي مولار، تليها المبيضات من نوع *C. albicans* والتي تمكنت بدورها من تحطيم 43.5% من الفينول الموجود في مزرعتها خلال أربعة ايام، إذ كان المتبقي من الفينول في ذلك الوقت 11.3 ملي مولار وكما هو مبين في الشكل 4-7. وربما تتفق هذه النتيجة مع الدراسة التي اجريت من قبل Sivasubramanian و Namasivayam (2014) عن استخدام اسلوب الإزالة الإحيائية للفينول باستخدام الخلايا المقيدة من سلالة المبيضات الاستوائية *C. tropicalis* SSK01 المعزولة من التربة الملوثة بالنفط ، لاحظوا إن الحد الأقصى لتحطيم الفينول كان 95.2% في درجة حرارة 34.20 درجة مئوية وفي pH يبلغ 6.86 لتركيز فينول ابتدائي 610 ملغم.لتر⁻¹.



مما يدل على ان هناك نشاط عالي محتمل لإنزيم phenol hydroxylase المحلل للفينول ضمن النشاط الايضي للخمائر المبيضة يتفاوت على الترتيب في مقداره بالنسبة للخمائر المبيضة المعزولة قيد الاختبار *C. parapsilosis* و *C. tropicalis* و *C. albicans* وتتوافق هذه النتيجة مع الدراسة التي اجريت من قبل Krug وآخرون (1985b) عن خصائص الإنزيم phenol hydroxylase والإنزيم catechol 1,2-dioxygenase من جهة وأكسدة الفينول بواسطة *Candida tropicalis* من قبل (Neujahr وآخرون، 1974) من جهة أخرى ، إذ يزداد نشاط هذا الإنزيم بشكل تدريجي خلال الايام الخمسة الاولى و ينخفض بعدها في اليوم السادس، إذ كان معدل متبقيات الفينول في جميع مزارع الخميرة مرتفعاً نسبياً وبلغ 14.1 ± 3.9 ملي مولار. وقد يرجع السبب وراء انخفاض القدرة التحليلية للخمائر في اليوم السادس الى ان الفينول غير قابل للتحلل بسهولة ويمكن أن يكون شديد السمية لمعظم أنواع الكائنات الحية الدقيقة بتركيز عالٍ بدرجة كافية. فيمكن للفينول أن يثبط معدل النمو ، حتى بين تلك الأنواع التي لديها القدرة الأيضية لإستخدامه كركيزة للنمو وفي دراسة اجريت من قبل Karimi و Hassanshahian (2016) عن مقارنة اقصى تحليل للفينول لثلاثة أنماط من الخميرة والتي عزلوها مسبقا من المياه العادمة لمصنع فحم الكوك في مدينة زارند ، كرمان Zarand, Kerman ، وجدوا ان زيادة تركيز الفينول ،يمكن ان تخفض نمو الخميرة بشكل كبير. ويمكن أن يعزى ذلك إلى سمية الفينول.

وهذه النتائج ربما تتوافق مع ماتم الابلاغ عنه من قبل العديد من الباحثين ، إذ ثبت ان معظم الخمائر التي تفضل درجة الحرارة المعتدلة mesophilic yeasts والتي تكون نشطة للغاية في تحليل الفينول ، مثل المبيضات الاستوائية *Candida tropicalis* (Bastos وآخرون 2000، *Candida maltose* (Fialova وآخرون 2004، و *Trichosporon spp.* (Santos وآخرون 2001) قد تمت الإشارة الى قدرتها في تحليل الفينول بتركيز تتراوح بين 16-18 ملي مولار بالفعل في غضون 5-6 أيام عند 30 درجة مئوية ،بينما تحتاج الخميرة من سلالة *C. albicans* TL3 إلى ثلاثة أيام فقط لاستهلاك الفينول 20 ملي مولار عند نفس درجة الحرارة (Tsai وآخرون 2005).

وقد كانت أقل النسب في تحطيم أو استقلاب الفينول في المزارع التي تعود للخمائر المبيضات من نوع *C. ciferrii* و *C. famata* والتي بلغت خلال اليوم الخامس من الحضانة و 12.5% و 23.5% على الترتيب ،إذ كان متبقي الفينول في مزارعهما هو 17.5 و 15.3 ملي مولار على الترتيب. مما يدل على احتمالية وجود نشاط ضئيل لانزيم phenol hydroxylase المحلل للفينول ضمن النشاط الايضي للخمائر المبيضات يتفاوت على الترتيب في مقداره بالنسبة للخمائر المبيضات المعزولة قيد الاختبار *C. ciferrii* و *C. famata* ،على الرغم من عدم وجود اي اشارة في الادبيات العلمية الى دور تلك المبيضات في تحمل او استقلاب الفينول كمصدر وحيد للكربون والطاقة .

2-4-2-4 تقدير متبقي الكاتيكول في مزارع الخمائر الفرعية

يبين الجدول 4-15 معدلات قيم متبقي تراكيز الكاتيكول في المزارع السائلة للخمائر المنمأة بمعدل تلقيح 66.7 مايكروليتر.مل⁻¹ في المزارع الفرعية المعززة بتركيز كاتيكول ابتدائي يبلغ مقداره 40 ملي مولار كمصدر وحيد للكربون والطاقة ، والتي تم استخراجها بالتركيز (ملي مولار) وفق عملية تحويل قراءات الامتصاصية للكثافة الضوئية OD Optical Density بناء على معادلة الميل المستنبطة من المنحنى القياسي للكاتيكول المبين في الشكل الملحق 4-2 .

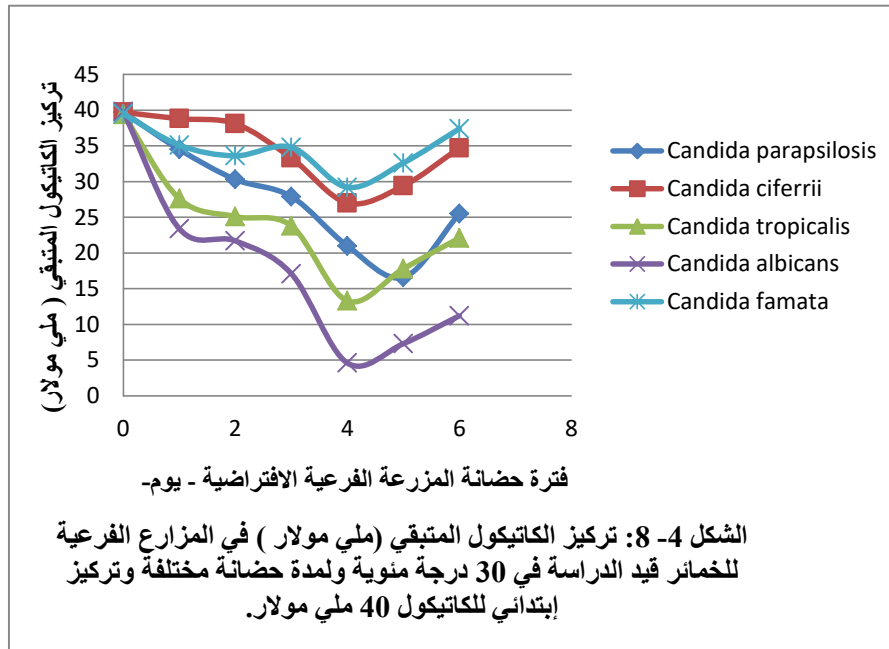
بعد اجراء التحليل الاحصائي للقيم المبينة في الجدول 4-15، تبين ان هنالك فروقا معنوية عالية في التحمل او القدرة التحليلية للكاتيكول بين انواع خمائر المبيضات المعزولة قيد الدراسة

الجدول 4-15: تركيز الكاتيكول المتبقي (ملي مولار) في المزارع الفرعية للخمائر قيد الدراسة في 30 درجة مئوية ولمدة حضانة مختلفة وتركيز إبتدائي للكاتيكول 40 ملي مولار							
المعدل ± الانحراف القياسي	معدل تركيز الكاتيكول المتبقي (ملي مولار)						الخميرة
	فترة الحضانة (يوم)						
	6	5	4	3	2	1	
26.0±6.5	25.5	16.6	21	27.9	30.3	34.5	Candida parapsilosis
33.6±4.7	34.7	29.4	27	33.3	38.1	38.8	Candida ciferrii
21.6±5.2	22.1	17.8	13.3	23.8	25.1	27.6	Candida tropicalis
14.2±7.7	11.2	7.3	4.6	17.1	21.7	23.4	Candida albicans
33.8±2.8	37.4	32.6	29.2	34.8	33.6	35.1	Candida famata
25.8±9.2	26.2±10.5	20.8±10.3	19.0±10.1	27.4±7.2	29.8±6.5	31.9±6.2	المعدل ± الانحراف القياسي
CRBD-ANOVA-TABLE			P.value (α 0.05) (4 , 25) = 2.76			الفروقات بين المبيضات F = 13.07* L.S.D.(α 0.05)(25) =6.69	
			P.value (α 0.05) (5 , 24) = 2.62			الفروقات بين فترات الحضانة F = 3.68* L.S.D.(α 0.05)(24) =11.33	

وإن أقل قيم لمعدلات الكاتيكول المتبقية كانت في مزارع المبيضات *C. albicans* خلال مدة حضانة المزارع البالغة 6 ايام في درجة 30 درجة مئوية ، إذ بلغت 14.2 $\pm$ 7.7 ملي مولار تليها المبيضات *C. tropicalis* ، إذ بلغت 21.6 $\pm$ 5.2 ملي مولار ثم المبيضات *C. parapsilosis* بمعدل 26.0 $\pm$ 6.5 ملي مولار ، بينما كانت أعلى قيم لمعدلات الكاتيكول المتبقية في مزارع المبيضات *C. famata* ، إذ بلغت 33.8 $\pm$ 2.8 ملي مولار تليها المبيضات *C. ciferrii* بمعدل 33.6 $\pm$ 4.7 ملي مولار وكما هو مبين في الشكل 4-8.

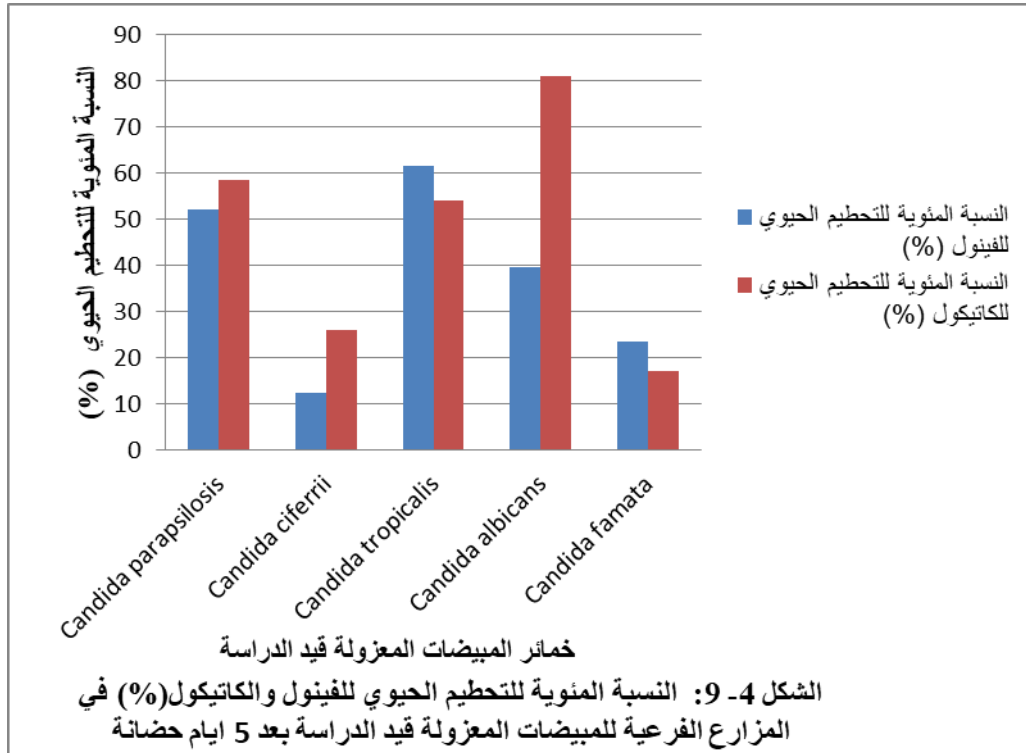
ربما تتوافق تلك النتائج مع ما ذكر في الدراسات السابقة عن استخدام اغناء المزارع لعدد من سلالات المبيضات بالكاتيكول كمصدر وحيد للكربون بهدف اختبار قدراتها التحليلية للكاتيكول ، فقد تم إدخال العديد من سلالات الخميرة التي يمكن أن تستخدم الهيدروكربونات العطرية كمصادر للكربون والطاقة فقد عزل كل من Chandran و Das (2012) خمسة أنواع من الخمائر بما في ذلك *Rhodotorula* و *Candida tropicalis* و *Cryptococcus laurentii* وفي دراسة أخرى أجريت من قبل Rigo و Alegre (2004) تمكنوا من خلالها ان يعزلوا 22 كائن حي دقيق

تمتلك القدرة على إستخدام الفينول كمصدر وحيد للكربون والطاقة ومن بينها *C. parapsilosis* التي تتمتع بقدرة على تحطيم التراكيز العالية من الفينول. وفي عمل لاحق قام به Rigo وآخرون (2010) وجدوا انها النوع الوحيد القادر على النمو في المزارع الحاوية على الكاتيكول كمصدر وحيد للكربون والطاقة بتركيزات عالية تصل لغاية 900 ملغم. لتر⁻¹. وعلى الرغم من الإشارة إلى المبيضات الاستوائية *C. tropicalis* على أنها قادرة على تحليل الفينول (Yan وآخرون، 2005) الا انه لم يكن هناك تقرير في ذلك الوقت يشير إلى امتلاك *C. parapsilosis* نشاط محلل للكاتيكول.



ومن جهة أخرى اظهر التحليل الاحصائي فروقا معنوية في قيم معدلات تراكيز الكاتيكول المتبقية خلال فترات حضانة مختلفة لسلاسل المبيضات المعزولة قيد الدراسة لإختبار قدراتها التحليلية في استقلاب الكاتيكول ، وإن أقل قيم لمعدلات الكاتيكول المتبقية في مزارع المبيضات كانت خلال اليوم الرابع من فترة حضانة المزارع في درجة 30 درجة مئوية ، إذ بلغت 19.0 ± 10.1 ملي مولار يليها اليوم الخامس 20.8 ± 10.3 ملي مولار. وكان هنالك تفاوت في الوقت الذي تستغرقه تلك المبيضات في تحطيم التركيز الابتدائي للكاتيكول في المزرعة ، إذ استطاعت المبيضات من نوع *C. albicans* خلال اربعة ايام من الحضانة أن تستقلب 88.5 % من تركيز الكاتيكول الابتدائي وكان المتبقي من تركيز الكاتيكول في مزرعتها خلال ذلك الوقت

4.6 ملي مولار. بينما استطاعت المبيضات من نوع *C. tropicalis* خلال خمسة ايام من الحضانة ان تستقلب 66.8 % من تركيز الكاتيكول الابتدائي وكان المتبقي من تركيز الكاتيكول في مزرعتها خلال ذلك الوقت 13.3 ملي مولار، تليها المبيضات من نوع *C. parapsilosis* والتي تمكنت بدورها من تحطيم 58.5 % من الكاتيكول الموجود في مزرعتها خلال خمسة ايام ، إذ كان المتبقي من الكاتيكول في ذلك الوقت 16.6 ملي مولار وكما هو مبين في الشكل 4- 9.



مما يدل على ان هناك نشاط عالي محتمل لانزيمات dioxygenases المحللة للكاتيكول ضمن النشاط الايضي للخمائر المبيضات يتفاوت على الترتيب في مقداره بالنسبة للخمائر المبيضات المعزولة قيد الاختبار *C. albicans* و *C. tropicalis* و *C. parapsilosis* . وعلى الرغم من العثور على القليل من المعلومات حول إستخدام مزارع الخميرة المزروعة على المركبات الفينولية (Páca وآخرون ، 2002 ؛ Komarkova وآخرون ، 2003) ، وخاصة الكاتيكول الذي يعتبر أكثر سمية من الفينول (Kumar و Kumar ، 2005) ، الا ان نتائج البحث الحالي قد تتوافق مع الدراسة التي اجريت من قبل Krug وآخرون (1985b)، عن خصائص الإنزيم phenol hydroxylase والإنزيم catechol 1,2-dioxygenase ، وقد تم العثور على نشاط انزيمات dioxygenases في *C. tropicalis* (Long وآخرون ، 2016) ، و *C. albicans* (Tsai وآخرون ، 2005) و *T. cutaneum* (Aleksieva وآخرون، 2002) ، إذ

يزداد نشاط هذا الإنزيم بشكل تدريجي خلال الايام الخمسة الاولى و ينخفض بعدها في اليوم السادس ، إذ كان معدل متبقيات الكاتيكول في جميع مزارع الخميرة مرتفعاً نسبياً وبلغ 26.2 ± 10.5 ملي مولار. وقد يرجع السبب وراء انخفاض القدرة التحليلية للخمائر في اليوم السادس الى التأثير السمي للكاتيكول فقد يكون هذا مرتبطاً بالأكسدة التلقائية auto-oxidation الطبيعية للكاتيكول مما يؤدي إلى وسيط سام قد يعيق عملية الإنزيم المؤكسد (ASTDR ، 2014).

وقد كانت اقل النسب في تحطيم او استقلاب الكاتيكول في المزارع التي تعود للخمائر المبيضات من نوع *C. famata* و *C. ciferrii* والتي بلغت خلال اليوم الرابع من الحضانة 27 % و 32.5 % على الترتيب ، إذ كان متبقي الكاتيكول في مزارعهما هو 29.2 و 27 ملي مولار على الترتيب ، مما يدل على ان هناك نشاط ضئيل محتمل لانزيمات Dioxygenase المحللة للكاتيكول ضمن النشاط الايضي للخمائر المبيضات يتفاوت على الترتيب في مقداره بالنسبة للخمائر المبيضات المعزولة قيد الاختبار *C. famata* و *C. ciferrii* ، على الرغم من عدم وجود أي إشارة في الأبحاث العلمية الى دور تلك المبيضات في تحمل او استقلاب الفينول كمصدر وحيد للكربون والطاقة .

4-2-5 المتطلب البيوكيميائي للأوكسجين في المزارع الفينولية للخمائر

يبين الجدول 4-16 معدلات قيم المتطلب البيوكيميائي للأكسجين المذاب BOD في المزارع السائلة للخمائر المنماة بمعدل تلقيح 66.7 مايكروليتر.مل⁻¹ في المزارع الفرعية المعززة بتركيز الفينول او الكاتيكول الابتدائيين بمقدار 20 او 40 ملي مولار على الترتيب كمصدر وحيد للكربون والطاقة.

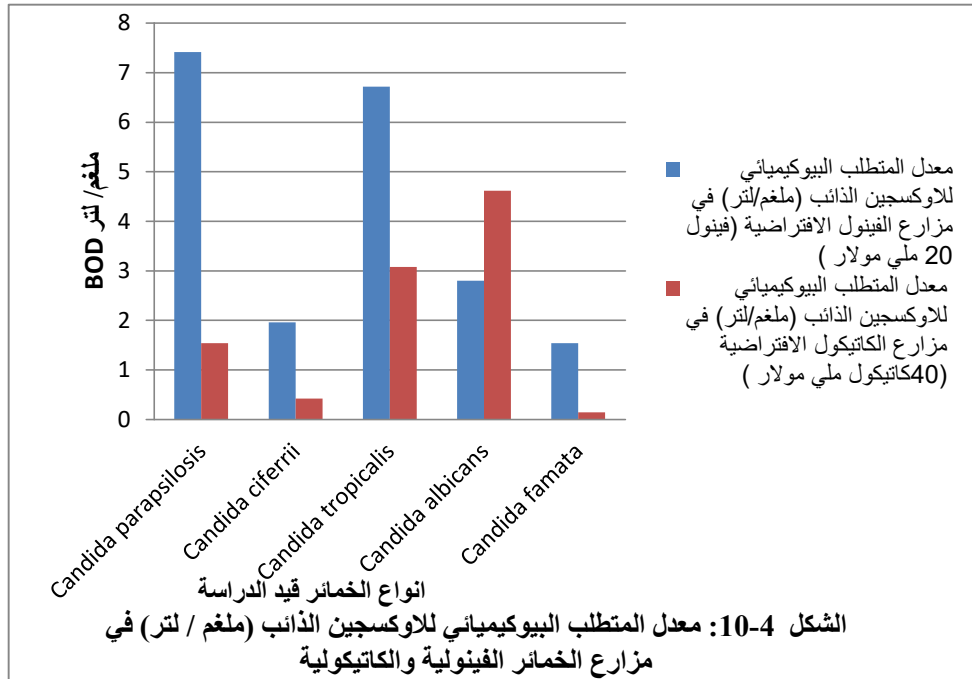
بعد اجراء التحليل الاحصائي للقيم المبينة في الجدول 4-16، تبين ان هنالك فروقا معنوية عالية في معدلات قيم BOD بين انواع خمائر المبيضات المعزولة قيد الدراسة ، وإن أعلى معدلات لقيم BOD كانت في مزارع المبيضات *C. tropicalis* خلال فترة ظروف حضانة BOD للمزارع البالغة 5 ايام في درجة 20 درجة مئوية ، إذ بلغت 4.90 ± 2.57 ملغم.لتر⁻¹ تليها مزارع

المبييضات *C. parapsilosis* ، إذ بلغت 4.48 ± 4.1 ملغم.لتر⁻¹ ثم المبييضات *C. albicans* بمعدل 3.71 ± 1.29 ملغم.لتر⁻¹.

الجدول 4-16: معدل المتطلب البيوكيميائي للاوكسجين المذاب (ملغم . لتر ⁻¹) المستهلك من قبل الخمائر قيد الدراسة في المزارع الفينولية والكاتيكولية			
المعدل ± الانحراف القياسي	معدل المتطلب البيوكيميائي للاوكسجين المذاب (ملغم. لتر ⁻¹)		الخميرة
	التركيز الابتدائي للمركبات الفينولية		
	الكاتيكول	الفينول	
	40 ملي مولار	20 ملي مولار	
4.48±4.16	1.54	7.42	<i>Candida parapsilosis</i>
1.19±1.09	0.42	1.96	<i>Candida ciferrii</i>
4.90±2.57	3.08	6.72	<i>Candida tropicalis</i>
3.71±1.29	4.62	2.80	<i>Candida albicans</i>
0.84±0.99	0.14	1.54	<i>Candida famata</i>
3.02±2.50	1.96±1.88	4.09±2.77	المعدل ± الانحراف القياسي
CRBD-ANOVA-TABLE	P.value (α 0.05) (4 , 5) = 5.19		F = 12.84** الفروقات بين المبيضات L.S.D.(α 0.05)(5) =6.01
	P.value (α 0.05) (1 , 8) = 5.32		F = 20.20** الفروقات بين فترات الحضانة L.S.D.(α 0.05)(8) =3.46

بينما كانت اقل معدلات لقيم BOD في مزارع المبييضات *C. famata* ، إذ بلغت 0.99 ± 0.84 ملغم.لتر⁻¹ تليها المبييضات *C. ciferrii* بمعدل 1.19 ± 1.09 ملغم.لتر⁻¹ وكما هو مبين في الشكل 4-10.

مما يدل على ان خمائر المبييضات المعزولة قيد الدراسة تختلف بشكل كبير في قدرة تحملها او استقلالها للمركبات الفينولية كالفينول والكاتيكول وهي نتيجة متوافقة مع نسب التحطيم الفينولي والكاتيكولي في اليوم الرابع والخامس من حضانة المزارع التي تم الحصول عليها خلال الدراسة الحالية، ويمكن ان تعزى تلك النتائج الى زيادة الطلب على الاوكسجين الناجم عن نشاط الإنزيم phenol hydroxylase المؤكسد للحلقة العطرية للفينول (Xu وآخرون، 2001 ؛ Lallement وآخرون ، 2018؛ Jaber وآخرون ، 2020) وكذلك نشاط انزيمات Dioxygenase المؤكسد للحلقة العطرية للكاتيكول (Hupert-Kocurek وآخرون ، 2012 ؛ Olajire و Essien ، 2014) ،



تبين ان هناك اتجاه يمكن ملاحظته بأن انخفاض درجة الحرارة لغاية 20 درجة مئوية يبدو أنه ملائم للحث على نشاطي تلك الإنزيمات ، وقد يتوافق ذلك مع الذي توصل إليه Tsai وآخرون.(2005) ، إذ وجدوا ان درجة حرارة النمو المثلى لنمو المبيضات *C. albicans* TL3 في الفينول كانت قريبة من 30-35 درجة مئوية ، لكن كلا نشاطي الإنزيمين إنخفض بشكل عكسي مع درجة حرارة النمو. وتجدر الإشارة أيضاً إلى أن Margesin وآخرون ،(2005) ؛ Margesin وآخرون ،(2003) تمكنوا من عزل وتمييز الخميرة المحللة للفينول والمتكيفة مع البرودة بالنشاط الإنزيمي chatechol 1,2 dioxygenase (C12O) من منطقة جبال الألب الجليدية والهيدروكربونات البترولية المحتوية في تربة جبال الألب في النمسا.

ومن جهة أخرى اظهر التحليل الاحصائي فروقا معنوية عالية في معدلات قيم BOD بالنسبة لمزارع خمائر المبيضات من حيث احتوائها على تركيز الفينول أو الكاتيكول الابتدائيين بمقدار 20 أو 40 ملي مولار على الترتيب كمصدر وحيد للكربون والطاقة خلال فترة ظروف حضانة BOD للمزارع البالغة 5 ايام في درجة 20 درجة مئوية، و إن أعلى معدلات لقيم BOD كانت في مزارع المبيضات المعززة بالفينول بتركيز 20 ملي مولار، إذ بلغت 4.09 ± 2.77 ملغم.لتر⁻¹ في مقابل القيم المنخفضة لمعدلات قيم BOD في مزارع خمائر المبيضات المعززة بتركيز 40 ملي مولار من الكاتيكول ، إذ بلغت 1.96 ± 1.88 ملغم.لتر⁻¹. وكان هنالك تفاوت

في معدلات قيم BOD في مزارع الفينول ، إذ كانت أعلى معدلات قيم BOD في مزارع المبيضات من نوع *C. parapsilosis* والتي بلغت 7.42 ملغم.لتر⁻¹ تقابلها القيمة 1.54 ملغم.لتر⁻¹ في مزارعها الكاتيكولية مما يدل على نشاط أعلى لتلك الخميرة باتجاه تحليل الفينول تليها مزارع المبيضات *C. tropicalis* بمقدار 6.72 ملغم.لتر⁻¹ تقابلها القيمة 3.08 ملغم.لتر⁻¹ في مزارعها الكاتيكولية مما يدل أيضاً على إنها نشطة في تحليل الفينول أكثر من الكاتيكول ، وفي كلتا الحالتين قد يعزى السبب الى زيادة الطلب على الاوكسجين كعامل مؤكسد مرتبط بزيادة نشاط الإنزيم phenol hydroxylase المحلل للفينول (Lallement وآخرون ، 2018؛ Jaber وآخرون، 2020). بينما كانت أعلى معدلات قيم BOD في مزارع المبيضات *C. albicans* في مزارعها الكاتيكولية والتي بلغت 4.62 ملغم.لتر⁻¹ تقابلها القيمة 2.80 ملغم.لتر⁻¹ في مزارعها الفينولية مما يدل على نشاط أعلى لتلك الخميرة باتجاه تحليل الكاتيكول، وقد يعزى سبب ذلك الى زيادة الطلب على الاوكسجين كعامل مؤكسد مرتبط بزيادة نشاط انزيمات Dioxygenase المحللة للكاتيكول (Olajire و Essien ، 2014؛ Yuan وآخرون ، 2020). وقد كانت اقل معدلات قيم BOD في المزارع التي تعود للخمائر المبيضات *C. famata* و *C. ciferrii* والتي بلغت 0.14 و 0.42 ملغم.لتر⁻¹ في مزارعها الكاتيكولية على الترتيب تقابلها القيم 1.54 و 1.96 ملغم.لتر⁻¹ في مزارعها الفينولية على الترتيب. مما يدل على وجود نشاط مرتفع نسبياً لتلك الخمائر باتجاه تحليل الفينول أكثر منه بالنسبة للكاتيكول (Xu وآخرون ، 2001؛ Stiborova وآخرون ، 2003) ، على الرغم من عدم وجود اي اشارة في الادبيات العلمية الى دور تلك المبيضات في تحمل أو إستقلاب الفينول كمصدر وحيد للكربون والطاقة.

كما يبين الجدول 4-17 معدلات قيم الكتلة الحيوية Biomass للمبيضات قيد الاختبار في المزارع السائلة المنماة بمعدل تلقيح 66.7 مايكروليتر.مل⁻¹ في المزارع الفرعية المعززة بتركيز الفينول والكاتيكول الابتدائيين بمقداره 20 أو 40 ملي مولار على الترتيب كمصدر وحيد للكربون والطاقة خلال فترة ظروف حضانة BOD للمزارع البالغة 5 ايام في درجة 20 درجة مئوية.

بعد اجراء التحليل الاحصائي للقيم المبينة في الجدول 4-17 تبين ان هنالك فروقا معنوية عالية في معدلات قيم الكتلة الحيوية بين انواع خمائر المبيضات المعزولة قيد الدراسة ، وان أعلى معدلات لقيم الكتلة الحيوية كانت في مزارع المبيضات *C. albicans* خلال فترة ظروف حضانة

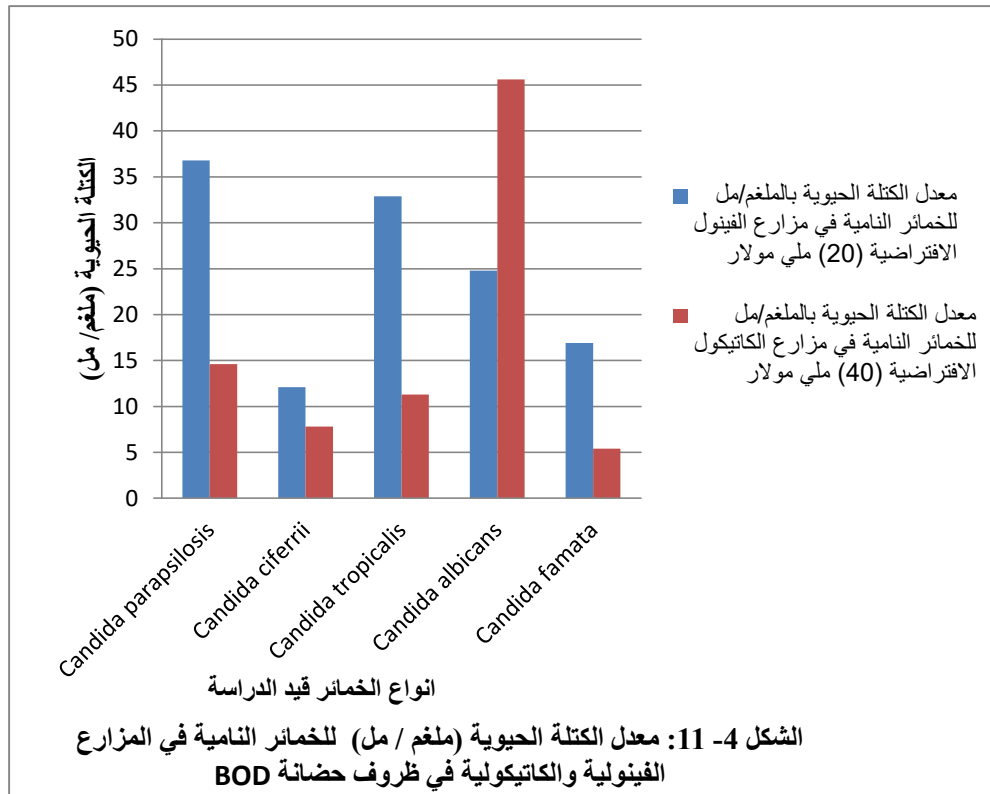
BOD للمزارع البالغة 5 ايام في درجة 20 درجة مئوية ،إذ بلغت 35.20 ± 14.71 ملغم.مل⁻¹ تليها مزارع المبيضات *C. parapsilosis* ،إذ بلغت 25.70 ± 15.70 ملغم.مل⁻¹ ثم مزارع المبيضات *C. tropicalis* بمعدل 22.10 ± 15.27 ملغم.مل⁻¹ ،

الجدول 4-17: معدل الكتلة الحيوية (ملغم . مل ⁻¹) للخمائر قيد الدراسة النامية في المزارع الفينولية والكاتيكولية في ظروف حضانة BOD			
المعدل ± الانحراف القياسي	معدل الكتلة الحيوية (ملغم. مل ⁻¹) للخمائر قيد الدراسة		الخميرة
	التركيز الابتدائي للمركبات الفينولية		
	الكاتيكول 40 ملي مولار	الفينول 20 ملي مولار	
25.70±15.70	14.6	36.8	<i>Candida parapsilosis</i>
9.95±3.04	7.8	12.1	<i>Candida ciferrii</i>
22.10±15.27	11.3	32.9	<i>Candida tropicalis</i>
35.20±14.71	45.6	24.8	<i>Candida albicans</i>
11.15±8.13	5.4	16.9	<i>Candida famata</i>
20.82±13.58	16.94±16.40	24.70±10.41	المعدل ± الانحراف القياسي
CRBD-ANOVA-TABLE	P.value (α 0.05) (4 , 5) = 5.19		الفروقات بين المبيضات F = 14.39* L.S.D.(α 0.05)(5) =31.93
	P.value (α 0.05) (1 , 8) = 5.32		الفروقات بين فترات الحضانة F = 7.98* L.S.D.(α 0.05)(8) =20.03

بينما كانت اقل معدلات لقيم الكتلة الحيوية في مزارع المبيضات *C. ciferrii* ،إذ بلغت 9.95 ± 3.04 ملغم.مل⁻¹ تليها المبيضات *C. famata* بمعدل 11.15 ± 8.13 ملغم.مل⁻¹ وكما هو مبين في الشكل 4-11.

مما يدل على ان خمائر المبيضات المعزولة قيد الدراسة تختلف بشكل كبير في نموها الميكروبي نتيجة لاختلاف قدرة تحملها أو استقلالها للمركبات الفينولية كالفينول والكاتيكول ، وهي نتيجة متوافقة من جهة مع نسب التحطيم الفينولي والكاتيكولي في اليوم الرابع والخامس من حضانة المزارع وقيم المتطلب البيوكيميائي للاوكسجين BOD لمزارع خمائر المبيضات التي تم الحصول عليها خلال الدراسة الحالية من جهة أخرى . ووتتوافق أيضاً مع Chang وآخرون. (1998) ، الذين تمكنوا في وقت مبكر من عزل *C. tropicalis* وملاحظة نموها ودورها في

تحليل التراكيز العالية من مركبات الفينول ومشتقاته المكلورة. وتتوافق كذلك مع Tsai وآخرون (2005)، في دراستهم للنمو الميكروبي للخميرة من سلالة *C. albicans* TL3 في مصادر كربون مختلفة. والمسار الزمني المتزامن لتكاثر الكتلة الحيوية مع تحطيمها للفينول في وسط زرعى سائل مع الفينول و / أو الجلوكوز بتركيزات مختلفة.



ان نتائج الكتلة الحيوية لمزارع الخمائر قيد الاختبار خلال فترة ظروف حضانة BOD تؤكد ما تم التوصل اليه في الدراسة الحالية من زيادة الطلب على الاوكسجين الناجم عن نشاط الإنزيم phenol hydroxylase المؤكسد للحلقة العطرية للفينول (Xu وآخرون، 2001؛ Liu وآخرون، 2011؛ Jaber وآخرون، 2020) وكذلك نشاط انزيمات Dioxygenase المؤكسد للحلقة العطرية للكاتيكول (Liu وآخرون، 2011؛ Thapa وآخرون، 2015؛ Olajire و Essien، 2014).

ومن جهة أخرى اظهر التحليل الاحصائي فروقا معنوية في معدلات قيم الكتلة الحيوية بالنسبة لمزارع خمائر المبيضات من حيث احتوائها على تركيز الفينول او الكاتيكول الابتدائيين بمقدار 20 او 40 ملي مولار على الترتيب كمصدر وحيد للكربون والطاقة خلال مدة ظروف

حضانة BOD للمزارع البالغة 5 أيام في درجة 20 درجة مئوية، وإن أعلى معدلات لقيم الكتلة الحيوية كانت في مزارع المبيضات المعززة بالفينول بتركيز 20 ملي مولار، إذ بلغت 24.70 ± 10.41 ملغم.مل⁻¹ في مقابل القيم المنخفضة لمعدلات قيم الكتلة الحيوية في مزارع خمائر المبيضات المعززة بتركيز 40 ملي مولار من الكاتيكول، إذ بلغت 16.94 ± 16.40 ملغم.مل⁻¹. وكان هنالك تفاوت في معدلات قيم الكتلة الحيوية في مزارع الفينول، إذ كانت أعلى معدلات لها في مزارع المبيضات من نوع *C. parapsilosis* والتي بلغت 36.8 ملغم.مل⁻¹ تقابلها القيمة 14.6 ملغم.مل⁻¹ في مزارعها الكاتيكولية مما يدل على معدل نمو أعلى لتلك الخميرة في مزارع الفينول تليها المبيضات *C. tropicalis* بمقدار 32.9 ملغم.مل⁻¹ في مزارعها الفينولية وتقابلها القيمة 11.3 ملغم.مل⁻¹ في مزارعها الكاتيكولية مما يدل أيضاً على أنها تمتلك معدل نمو نشط أيضاً في مزارع الفينول أكثر مما هي عليه في مزارع الكاتيكول، وفي كلتا الحالتين يمكن تفسير ذلك بالارتباط مع زيادة الطلب على الاوكسجين كعامل مؤكسد نتيجة لزيادة نشاط الإنزيم phenol hydroxylase المحلل للفينول (Liu وآخرون، 2011؛ Jaber وآخرون، 2020).

بينما كانت أعلى معدلات قيم الكتلة الحيوية في مزارع المبيضات *C. albicans* في مزارعها الكاتيكولية والتي بلغت 45.6 ملغم.مل⁻¹ تقابلها القيمة 24.8 ملغم.مل⁻¹ في مزارعها الفينولية مما يدل على أنها تمتلك معدل نمو أعلى في مزارع الكاتيكول، ويمكن تفسير ذلك بالارتباط مع زيادة الطلب على الاوكسجين كعامل مؤكسد مرتبط بزيادة نشاط انزيمات Dioxygenase المحللة للكاتيكول (Thapa وآخرون، 2015؛ Olajire و Essien، 2014).

وقد كانت اقل معدلات قيم الكتلة الحيوية في المزارع التي تعود للخمائر المبيضات من نوع *C. famata* و *C. ciferrii* والتي بلغت 5.4 و 7.8 ملغم.مل⁻¹ في مزارعها الكاتيكولية على الترتيب تقابلها القيم 16.9 و 12.1 ملغم.مل⁻¹ في مزارعها الفينولية على الترتيب. مما يدل على وجود نشاط مرتفع نسبياً لتلك الخمائر باتجاه تحليل الفينول أكثر منه بالنسبة للكاتيكول (Xu وآخرون، 2001؛ Liu وآخرون، 2011)، على الرغم من عدم وجود أي إشارة في الأبحاث العلمية الى دور تلك المبيضات في تحمل أو إستقلاب الفينول كمصدر وحيد للكربون والطاقة.

4-2-6 الكتلة الحيوية للخمائر في المزارع الفرعية للمركبات الفينولية

4-2-6-1 الكتلة الحيوية للخمائر في المزارع الفينول الفرعية

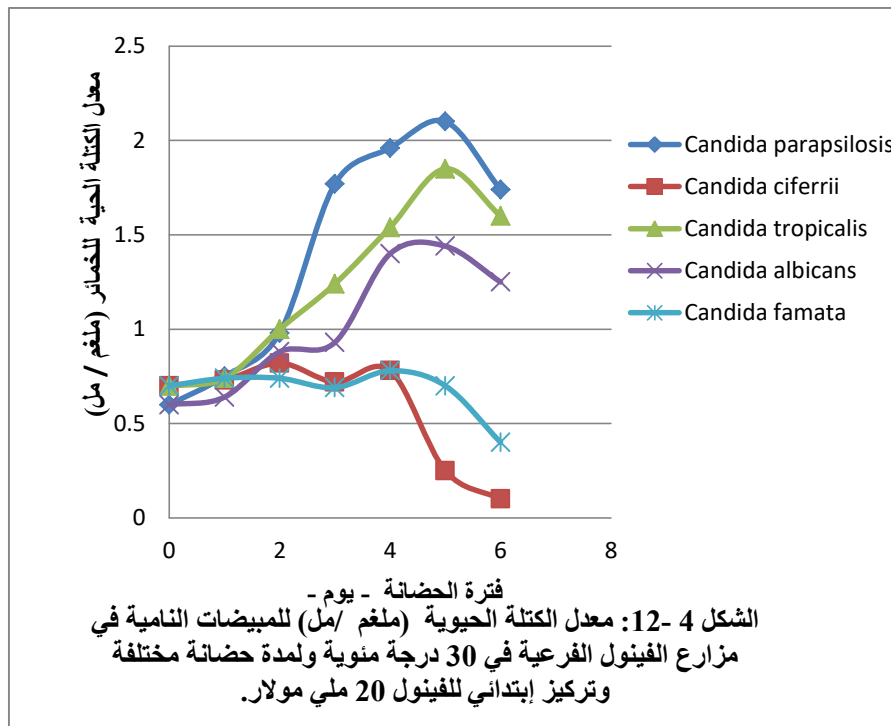
يبين الجدول 4-18 معدلات قيم الكتلة الحيوية لخمائر المبيضات قيد الاختبار النمما بمعدل تلقيح 100 مايكروليتر.مل⁻¹ في المزارع السائلة الفرعية المعززة بتركيز فينول ابتدائي يبلغ مقداره 20 ملي مولار كمصدر وحيد للكربون والطاقة ، والتي تم استخراجها بوحدة ملغم.مل⁻¹ وفق عملية تحويل قراءات الامتصاصية للكثافة الضوئية (Optical Density) (OD) بناء على معادلة الميل المستتبطة من المنحنى القياسي للوزن الجاف للخمائر المبين في الشكل الملحق 4-3 والذي تم تحضيره مسبقا.

الجدول 4-18: معدل الكتلة الحيوية(ملغم . مل ⁻¹) للمبيضات النامية في مزارع الفينول الفرعية في 30 درجة مئوية ولمدة حضانة مختلفة وتركيز إبتدائي للفينول 20 ملي مولار							
المعدل ± الانحراف القياسي	معدل الكتلة الحيوية للمبيضات (ملغم . مل ⁻¹)						الخميرة
	فترة الحضانة (يوم)						
	6	5	4	3	2	1	
1.6±0.6	1.74	2.1	1.96	1.77	0.98	0.75	Candida parapsilosis
0.6±0.3	0.1	0.25	0.78	0.72	0.82	0.73	Candida ciferrii
1.3±0.4	1.6	1.85	1.54	1.24	1.00	0.74	Candida tropicalis
1.1±0.3	1.25	1.44	1.4	0.93	0.88	0.64	Candida albicans
0.7±0.1	0.40	0.70	0.78	0.69	0.74	0.74	Candida famata
1.0±0.5	1.0±0.7	1.3±0.7	1.3±0.5	1.1±0.5	0.9±0.1	0.7±0.1	المعدل ± الانحراف القياسي
CRBD-ANOVA-TABLE			P.value (α 0.05) (4 , 25) = 2.76			الفروقات بين المبيضات F = 7.60* L.S.D.(α 0.05)(25) =0.44	
			P.value (α 0.05) (5 , 24) = 2.62			الفروقات بين فترات الحضانة F = 9.05* L.S.D.(α 0.05)(24) =0.68	

وبعد اجراء التحليل الاحصائي للقيم المبينة في الجدول 4-18 ، تبين ان هنالك فروقا معنوية عالية في معدلات قيم الكتلة الحيوية بين انواع خمائر المبيضات المعزولة قيد الدراسة ، وان أعلى معدلات لقيم الكتلة الحيوية كانت في المزارع الفينولية للمبيضات *C. parapsilosis* خلال فترة حضانة المزارع البالغة 6 أيام في درجة 30 درجة مئوية ، إذ بلغت 1.6±0.6 ملغم.مل⁻¹ تليها خمائر المبيضات *C. tropicalis* ، إذ بلغت 1.3±0.4 ملغم.مل⁻¹ ثم

المبيضات *C. albicans* بمعدل 1.1 ± 0.3 ملغم.مل⁻¹ ، بينما كانت أقل قيم لمعدلات الكتلة الحيوية في مزارع المبيضات *C. ciferrii* ، إذ بلغت 0.6 ± 0.3 ملغم.مل⁻¹ تليها المبيضات *C. famata* 0.7 ± 0.1 ملغم.مل⁻¹ وكما هو مبين في الشكل 4- 12.

مما يدل على ان خمائرالمبيضات المعزولة قيد الدراسة تختلف بشكل كبير في نموها الميكروبي نتيجة لاختلاف قدرة تحملها أو إستقلابها للفينول، وهي نتيجة متوافقة مع نسب التحطيم الفينولي في اليوم الرابع والخامس من حضانة الخمائرالمبيضات المنماة في المزارع الفينولية والتي تم الحصول عليها قيد الدراسة الحالية ، ووتتوافق أيضاً مع Chang وآخرون. (1998) ، الذين تمكنوا في وقت مبكر من عزل *C. tropicalis* وملاحظة نموها ودورها في تحليل التراكيز العالية من مركبات الفينول ومشتقاته المكلورة. وتتوافق كذلك مع (Tsai وآخرون، 2005) ، في دراستهم للنمو الميكروبي للخميرة من سلالة *C. albicans* TL3 في مصادر كربون مختلفة والمسارالزمني المتزامن لتكاثر الكتلة الحيوية مع تحطيمها للفينول في وسط زرع سائل مع الفينول و / أو الجلوكوز بتركيزات مختلفة . وكذلك تتوافق مع اختبارات النمو والقدرة التحليلية التي اجريت من قبل Rigo وآخرون.(2010) على *C.parapsilosis* في المزارع الفينولية بتركيز عالية كمصدر وحيد للكربون والطاقة .



ومن جهة أخرى أظهر التحليل الاحصائي فروقا معنوية عالية في معدلات قيم الكتلة الحيوية للخمائر قيد الاختبار خلال أوقات حضانة مختلفة، وإن أعلى معدلات لقيم الكتلة الحيوية في مزارع المبيضات كانت خلال اليوم الخامس والرابع من مدة حضانة المزارع في درجة 30 درجة مئوية، إذ بلغت 1.3 ± 0.7 و 1.3 ± 0.5 ملغم.مل⁻¹ على الترتيب، وذلك للزيادة الاسية exponential growth في معدلات قيم الكتلة الحيوية للمبيضات التي امتدت من اليوم الثاني إلى غاية اليوم الخامس بالنسبة للمبيضات *C. parapsilosis* و *C. tropicalis* ومن اليوم الثالث إلى غاية اليوم الرابع بالنسبة للمبيضات *C. albicans* على الرغم من وجود مدة تطبيع lag phase لتلك الخمائر استمر لغاية اليوم الثاني بالنسبة للمبيضات *C. parapsilosis* و *C. tropicalis* وإلى غاية اليوم الثالث بالنسبة للمبيضات *C. albicans* من فترة حضانة المزارع الفينولية. وقد سجلت أعلى معدلات لقيم الكتلة الحيوية للخمائر في اليوم الخامس، إذ بلغت 2.1 و 1.85 ملغم.مل⁻¹ بالنسبة للمبيضات *C. parapsilosis* و *C. tropicalis* على الترتيب تليها المبيضات *C. albicans* بمقدار 1.44 ملغم.مل⁻¹. بينما كانت أقل معدلات لقيم الكتلة الحيوية للخمائر في المزارع الفينولية خلال اليوم الاول والثاني، إذ بلغت 0.7 ± 0.1 و 0.9 ± 0.1 ملغم.مل⁻¹ على الترتيب بإعتبار أن جميع الخمائر المدروسة كانت ضمن مرحلة التطبيع lag phase، يليها اليوم السادس بمعدل 1.0 ± 0.7 على إعتبار أن جميع الخمائر كانت في مرحلة الركود أو التدهور death phase. وربما تتوافق تلك النتائج مع دراسة اجريت من قبل Tsai وآخرون (2005)، وجدوا من خلالها أن زيادة تركيز الفينول من 5-24 ملي مولار في وسط الاستزراع السائل أدى إلى تطبيع طويل الأمد للمبيضات من سلالة *C. albicans* TL3 ربما احتاجته للتكيف مع بيئة النمو، وبالتالي أدى ذلك إلى تطبيع الوصول إلى المرحلة الثابتة stationary phase لنموها. وفي دراسة أخرى بينت إن اختلاف مدة التطبيع lag time التي تحتاجها سلالة الخميرة *Trichosporon cutaneum* قبل تحلل الفينول بشكل مباشر مع التركيز الأولي للركيزة فقد تراوحت مرحلة التطبيع من 1.5 ساعة لتركيزات الفينول المنخفضة >0.5 غم.ديسيمتر⁻³ حتى 72 ساعة بتركيزات عالية 2.5 غم.ديسيمتر⁻³ (Chtourou وآخرون، 2004). وعلى العموم فإن الزيادة في النمو والكتلة الحيوية للخمائر في المزارع الفينولية دليل على زيادة استقلال الفينول الناجم عن عن نشاط الإنزيم phenol hydroxylase المؤكسد للحلقة العطرية للفينول (Xu وآخرون، 2001؛ Lallement وآخرون، 2018؛ Jaber وآخرون

(2020)، والعكس صحيح فقد سجلت اقل معدلات للنمو الكتلة الحيوية بالنسبة للخمائر *C. ciferrii* و *C. famata* في اليوم الرابع ، إذ بلغت 0.78 ملغم.مل⁻¹ لكليهما على الرغم من ان مرحلة التطبيع lag phase لهما امتدت لغاية اليوم الثالث ، فضلاً عن عدم وجود أي إشارة في الابحاث العلمية الى دور تلك المبيضات في تحمل أو إستقلاب الفينول كمصدر وحيد للكربون والطاقة .

2-6-2-4 الكتلة الحيوية للخمائر في مزارع الكاتيكول الفرعية

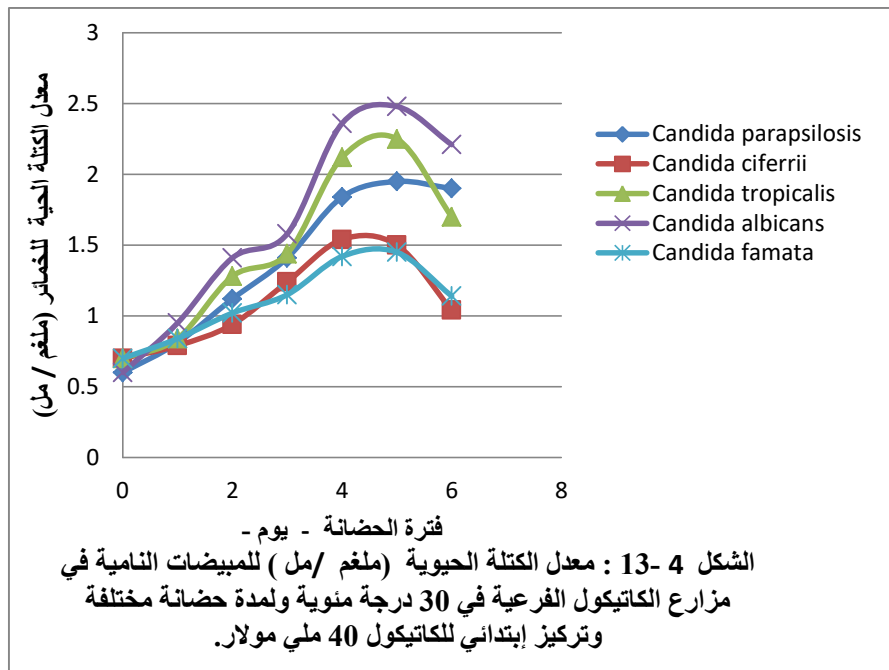
يبين الجدول 4-19 معدلات قيم الكتلة الحيوية لخمائر المبيضات قيد الاختبار المنماة بمعدل تلقيح 66.7 مايكروليتر.مل⁻¹ في المزارع السائلة الفرعية المعززة بتركيز كاتيكول ابتدائي يبلغ مقداره 40 ملي مولار كمصدر وحيد للكربون والطاقة ، والتي تم استخراجها بوحدة ملغم.مل⁻¹ وفق عملية تحويل قراءات الامتصاصية للكثافة الضوئية OD Optical Density بناءً على معادلة الميل المستنبطة من المنحنى القياسي للوزن الجاف للخمائر المبين في الشكل الملحق 4-3 والذي تم تحضيره مسبقاً.

الجدول 4-19: معدل الكتلة الحيوية (ملغم . مل ⁻¹) للمبيضات النامية في مزارع الكاتيكول الفرعية في 30 درجة مئوية ولمدة حضانة مختلفة وتركيز ابتدائي للكاتيكيول 40 ملي مولار							
المعدل ± الانحراف القياسي	معدل الكتلة الحيوية للخمائر ملغم . مل ⁻¹						الخميرة
	فترة الحضانة (يوم)						
	6	5	4	3	2	1	
1.5±0.5	1.9	1.95	1.84	1.41	1.12	0.81	<i>Candida parapsilosis</i>
1.2±0.3	1.04	1.5	1.54	1.24	0.94	0.79	<i>Candida ciferrii</i>
1.6±0.5	1.7	2.25	2.12	1.44	1.28	0.84	<i>Candida tropicalis</i>
1.8±0.6	2.21	2.48	2.36	1.58	1.41	0.95	<i>Candida albicans</i>
1.2±0.2	1.14	1.45	1.42	1.15	1.02	0.84	<i>Candida famata</i>
1.5±0.5	1.6±0.5	1.9±0.5	1.9±0.4	1.4±0.2	1.2±0.2	0.9±0.1	المعدل ± الانحراف القياسي
CRBD-ANOVA-TABLE			P.value (α 0.05) (4 , 25) = 2.76			الفروقات بين المبيضات *F = 2.82 L.S.D.(α 0.05)(25) =0.54	
			P.value (α 0.05) (5 , 24) = 2.62			الفروقات بين فترات الحضانة *F = 7.73 L.S.D.(α 0.05)(24) =0.44	

وبعد اجراء التحليل الاحصائي للقيم المبينة في الجدول 4-19 تبين ان هنالك فروقا معنوية في معدلات قيم الكتلة الحيوية بين انواع المبيضات المعزولة قيد الدراسة و إن أعلى معدلات لقيم الكتلة الحيوية كانت في المزارع الكاتيكولية للمبيضات *C. albicans* خلال مدة حضانة 6 أيام

في درجة 30 درجة مئوية ، إذ بلغت 1.8 ± 0.6 ملغم.مل⁻¹ تليها المبيضات *C. tropicalis* ، إذ بلغت 1.6 ± 0.5 ملغم.مل⁻¹ ثم المبيضات *C. parapsilosis* بمعدل 1.5 ± 0.5 ملغم.مل⁻¹ ، بينما كانت اقل قيم لمعدلات الكتلة الحيوية في مزارع المبيضات *C. famata* ، إذ بلغت 1.2 ± 0.2 ملغم.مل⁻¹ تليها المبيضات *C. ciferrii* 1.2 ± 0.3 ملغم.مل⁻¹ وكما هو مبين في الشكل 4- 13.

مما يدل على ان خمائر المبيضات المعزولة قيد الدراسة تختلف بشكل كبير في نموها الميكروبي نتيجة لاختلاف قدرة تحملها واستقلابها للكاتيكول وهي نتيجة متوافقة مع نسب التحطيم الكاتيكولي في اليوم الرابع والخامس من حضانة الخمائر المبيضات المنماة في المزارع الكاتيكولية والتي تم الحصول عليها قيد الدراسة الحالية ، وتتوافق هذه النتيجة مع الدراسات التي اجريت من قبل (Chtourou و آخرون، 2004) ، عن مسار تحليل المركبات الفينولية ومن ضمنها الكاتيكول في المزارع الحاوية على المركبات الفينولية كمصدر وحيد للكربون والطاقة ، فضلاً عن الدراسة التي اجريت من قبل Rigo وآخرون (2010) ، عن حركية النمو للخميرة *Candida parapsilosis* خلال التحطيم الحيوي لتركيز الكاتيكول المدروس من 36 إلى 910 ملغم . لتر⁻¹ .



ومن جهة أخرى اظهر التحليل الاحصائي فروقا معنوية عالية في معدلات قيم الكتلة الحيوية للخمائر قيد الاختبار خلال فترات حضانة مختلفة ، و إن أعلى معدلات لقيم الكتلة الحيوية في مزارع المبيضات كانت خلال اليوم الخامس والرابع من مدة حضانة المزارع في درجة 30 درجة مئوية ، إذ بلغت 1.9 ± 0.5 و 1.9 ± 0.4 ملغم.مل⁻¹ على الترتيب وذلك للزيادة الاسية (exponential growth) في معدلات قيم الكتلة الحيوية للمبيضات التي امتدت من اليوم الاول الى غاية اليوم الخامس للمبيضات *C. albicans* و *C. tropicalis* و *C. parapsilosis* ومن اليوم الاول الى غاية اليوم الرابع بالنسبة للمبيضات *C. ciferrii* و *C. famata* . وقد كانت مدة التأقلم او ماتعرف بمدة التطبيع lag phase قليلة جدا بالنسبة لجميع الخمائر المدروسة ولم تتجاوز اليوم الواحد من فترة الحضانة . وقد سجلت أعلى معدلات لقيم الكتلة الحيوية للخمائر في اليوم الخامس، إذ بلغت 2.48 و 2.25 ملغم.مل⁻¹ للمبيضات *C. albicans* و *C. tropicalis* على الترتيب تليها المبيضات *C. parapsilosis* بمقدار 1.95 ملغم.مل⁻¹ . بينما كانت اقل معدلات لقيم الكتلة الحيوية للخمائر في المزارع الكاتيكولية خلال اليوم الاول والثاني، إذ بلغت 0.9 ± 0.1 و 1.2 ± 0.2 ملغم.مل⁻¹ على الترتيب باعتبار ان جميع الخمائر المدروسة كانت ضمن مرحلة التطبيع lag phase ، يليها اليوم الثالث بمعدل 1.4 ± 0.2 ملغم.مل⁻¹ ضمن مرحلة exponential phase ثم اليوم السادس بمقدار 1.6 ± 0.5 ملغم.مل⁻¹ على اعتبار ان جميع الخمائر كانت في مرحلة الركود death phase. وقد تتوافق النتائج مع (ASTDR، 2014) عن دور الأكسدة الذاتية للكاتيكول بوجود الأوكسجين التي تؤدي الى انتاج quinine وهو مركب غير مستقر سيعمل على زيادة معدلات النمو القصوى. فضلاً عن الدراسة التي قام بها Rigo وآخرون (2010) حول استخدام الكاتيكول كمصدر الكربون الوحيد في الوسط الملحي SM والتي تمكنوا من خلالها من مراقبة حركية نمو *Candida parapsilopsis* . بينما وجد في دراسة أخرى ان أعلى تركيز من الكاتيكول يمكن ان يتسبب في مدة تطبيع lag period أطول مما يدل على أن مزارع *Candida parapsilopsis* المتأقلمة يمكن أن تحلل تماماً تركيز الكاتيكول الابتدائي والبالغ 910 ملغم. لتر⁻¹ خلال 48 ساعة (Rigo وآخرون، 2010) . وعلى العموم فان الزيادة في النمو والكتلة الحيوية للخمائر في المزارع الكاتيكولية دليل على زيادة استقلال الكاتيكول الناجم عن نشاط انزيمات Dioxygenase المؤكسد للحلقة العطرية للكاتيكول (Hupert-Kocurek وآخرون ، 2012 ؛ Olajire و Essien، 2014) والعكس صحيح فقد

سجلت اقل معدلات للنمو الكتلة الحيوية بالنسبة للخمائر *C. famata* و *C. ciferrii* في اليوم الرابع ، إذ بلغت 1.42 و 1.54 ملغم.مل⁻¹ على الترتيب .على الرغم من ان مرحلة التطبيع لهما كانت قليلة ويبدو انها كانت متأقلمة لتحليل الكاتيكول اكثر مما هي عليه بالنسبة للفينول ، وعلى الرغم من ذلك لم توجد أي إشارة في الأبحاث العلمية الى دور تلك المبيضات في تحمل أو إستقلاب الكاتيكول كمصدر وحيد للكربون والطاقة .

3-4 التقيد الإنزيمي

بعد ان وقع الاختيار على مبيضات الخمائر *Candida albicans* في ضوء النتائج السابقة فيما يتعلق بكفائتها العالية على تحليل الكاتيكول ضمن مزارعها الكاتيكولية ولاسيما عند التركيز 40 ملي مولار ، تم اجراء الفحص الابتدائي النوعي التأكيدي بخصوص نوع المسارالذي تتخذه في استقلابها للكاتيكول، وبالطريقة الموصوفة من قبل Filipowicz وآخرون (2020) ، إذ اعطت خمائر المبيضات *C. albicans* نتيجة فحص ايجابية باتجاه طريق مسار الاكسدة الداخلية intradiol dioxygenase أو مايعرف بمسار الفتح الاورثوي ortho-cleavage لتكوين المركب الحامضي cis,cis-muconate وليس من خلال الاكسدة الحلقية الخارجية extradiol dioxygenase بمسار meta-cleavage لتكوين 2-hydroxymuconic semialdehyde catechol 1,2-dioxygenase مما يدل على ان تحليلها للكاتيكول كان عن طريق الإنزيم catechol 1,2-dioxygenase والذي يرمز له اختصار (C12Os) (Tsai و Li، 2007). وربما لم يكن لانزيم catechol 2,3-dioxygenases والذي يرمز له اختصار (C23Os) أي دور يذكر في هذا الخصوص وهذه النتيجة التي توصلنا اليها تتفق مع العديد من الباحثين بخصوص ندرة وجود مايشار إليه في الأبحاث العلمية عن نشاط انزيم (C23Os) بين الخمائر في تحليل المركبات الفينولية فقد اشار Filipowicz وآخرون (2020).

1-3-4 إستخلاص وتنقية الإنزيم catechol 1,2-dioxygenase (C12O)

بعد ان تم استخلاص الإنزيم catechol 1,2-dioxygenase (C12O) من خمائر المبيضات *Candida albicans* المعزولة قيد الدراسة والتي تم اختبار قدرتها التحليلية للكاتيكول ، واجراء خطوات تنقيته وفقا للطريقة الموصوفة من قبل Tsai و Li (2007) . وتم احتساب

بيانات تنقية الإنزيم في ظروفه المثلى والمتمثلة في دالة الحموضة pH:8 ودرجة حرارة 25 درجة مئوية بحسب ما أشير إليه من قبل (Tsai و Li، 2007؛ Silva وآخرون، 2012) وكما هو مبين في الجدول 4-20.

الجدول 4-20 : بيانات تنقية الإنزيم catechol 1,2-dioxygenase من خمائر المبيضات <i>C. albicans</i>								
مرحلة التنقية الإنزيمية	الحجم مل	البروتين			الفعالية*			اضعاف التنقية
		التركيز ملغم.مل ⁻¹	الاجمالي ملغم	التركيز وحدة.مل ⁻¹	الاجمالي وحدة	الاستعادة %	الفعالية النوعية وحدة. ملغم ⁻¹	
المستخلص الإنزيمي الخام CEE	21.6	20.87	451	71.6	1547	100	3.43	1
الترسيب بكبريتات الامونيوم 30% AS	16.4	17.6	289	256.3	4203	78.3	14.56	6.6
الترسيب بكبريتات الستربتومايسين 2% SS	3.4	20.2	68.7	126.2	429	70.3	6.25	15.3
*: وحدة واحدة من نشاط الإنزيم catechol 1,2-dioxygenase (C12O) تمثل 1 مايكرومول من الكيزة لكل ملغرام من البروتين بالدقيقة الواحدة								

يتضح من بيانات الجدول 4-20 ، إن أعلى فعالية نوعية لتنقية الإنزيم (C12O) كانت ضمن المرحلة الثانية من خطوات التنقية المتمثلة بالترسيب بكبريتات الامونيوم 2% AS (وزن/حجم) ، إذ بلغت 14.56 وحدة.مل⁻¹ بعد انجاز التنقية بمقدار 6.6 ضعفا بمعدل استعادة نشاط 78.3 % بهدف الوصول كمية بروتين انزيمي مقارب الى 20 ملغم.مل⁻¹ ، وبالفعل تم تنقية البروتين الإنزيمي بمقدار 17.6 ملغم.مل⁻¹ والذي يكافئ فعالية انزيمية بمقدار 256.3 وحدة.مل⁻¹ . بينما تم تنقية الإنزيم بمقدار 15.3 ضعفا ضمن المرحلة الثالثة من خطوات التنقية عن طريق الترسيب بكبريتات الستربتومايسين 2% SS (وزن/ حجم) بمعدل استعادة نشاط 70.3 % وتم تنقية بروتين انزيمي بمقدار 20.2 ملغم.مل⁻¹ والذي يكافئ فعالية انزيمية 126.2 وحدة.مل⁻¹ وفعالية نوعية للإنزيم بمقدار 6.25 وحدة.مل⁻¹ . وقد كان النشاط التحفيزي الامثل للإنزيم (C12O) يقع ضمن الرقم الهيدروجيني 6.5-8.5 ودرجة حرارة 25 درجة مئوية وتتفق هذه النتيجة مع (Tsai و Li، 2007؛ Silva وآخرون، 2012) في دراساتهم عن توصيف هذا الإنزيم ، إذ اشاروا الى ظروفه التحفيزية المثلى والمتمثلة في دالة الحموضة pH:8 ودرجة حرارة

25 درجة مئوية . وربما تتفق النتائج التي حصلنا عليها أيضاً مع الدراسة التي اجراها (Chen و Lovell، 1990) ،المتضمنة تنقية وتوصيف خصائص الإنزيم catechol 1,2-dioxygenase بعد استخلاصه من البكتريا *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae USDA 2370 وقد تمكنوا من تنقيته بمقدار 296 ضعفاً ، مما أسفر عن تحضيره على شكل محلول متجانس مع نشاط نوعي مقداره 51.1 وحدة .ملغم بروتين⁻¹ وكان الوزن الجزيئي للبروتين الأصلي 70000 ، مع وحدتين فرعيتين متطابقتين من 34500 و 1 غم من ذرة الحديد لكل مول. وكان الرقم الهيدروجيني الأمثل للنشاط التحفيزي للإنزيم 9.0 إلى 9.5.

4-3-2 اختبار فعالية الإنزيم (C12O) في التحطيم الحيوي للكاتيكول

4-3-2-1 اختبارات الحد الحراري الأمثل للإنزيم (C12O)

تم احتساب معدلات النسب المئوية للتحطيم الحيوي للكاتيكول ذو التركيز الابتدائي 40 ملي مولار ، الناجم عن فعالية الإنزيم catechol 1,2-dioxygenase (C12O) المستخلص من الخميرة *Candida albicans* المحللة للكاتيكول ، والذي اختبرت فعاليته ضمن مراحل التنقية المختلفة وفي حالتيه الحر(الذائب) والمقيد على السيليكا الحيوية لجب الدايتومات DFS/ G من جهة وعلى الاغشية البوليمرية ، البولي اكريل اميد PAA /G و البولي اكريل نايتزل PAN/G والمثبتة بدورها على دعائم زجاجية من جهة أخرى ، وكما هو مبين في الجدول 4-21.

بعد اجراء التحليل الاحصائي للقيم المبينة في الجدول 4-21 والتي تمثل معدلات النسب المئوية للتحطيم الحيوي للكاتيكول في ظروف تفاعل: pH: 6.5-8.5 (حامضية معتدلة) ودرجات حرارية مختلفة ولفترة حضانة تفاعل 3 أيام ، تبين ان هنالك فروقا معنوية عالية في معدلات النسب المئوية للتحطيم الحيوي للكاتيكول وفقا للتنوع في الدرجة الحرارية للخليط المتفاعل من جهة ودرجة نقاوة الإنزيم من جهة أخرى ، وان أعلى معدلات النسب المئوية للتحطيم الحيوي للكاتيكول في ظروف الحامضية المعتدلة، كانت ضمن مرحلة الترسيب بكبريتات الامونيوم 30AS% (وزن/حجم) وتحديدا عند الدرجات الحرارية 35 و 25 و 45 درجة مئوية ، إذ بلغت معدلاتها 73.6±15.0 % و 72.6±13.2 % و 70.0±17.7 % على الترتيب.

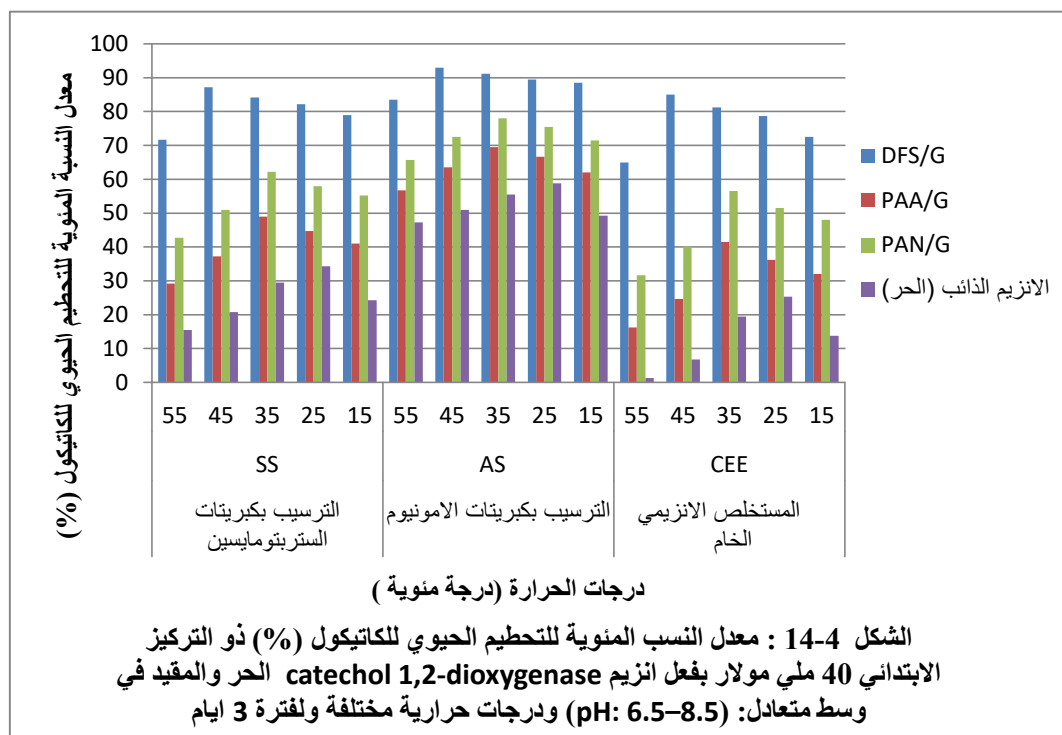
الجدول 4-21 : معدلات النسب المئوية للتحطيم الحيوي للكاتيكول (%) ذو التركيز الابتدائي 40 ملي مولار بفعل إنزيم C12O الحر والمقيد في وسط متعادل (pH: 6.5-8.5) ودرجات حرارية مختلفة ولمدة 3 ايام						
المعدل $\pm$ الانحراف القياسي	الإنزيم الذائب (الحر)	الإنزيم غير الذائب (المقيد)			حالة الإنزيم	
		PAN/G	PAA/G	DFS/G	مرحلة تنقية الإنزيم	
41.6 $\pm$ 24.9	13.8	48.0	32.0	72.5	15	المستخلص الإنزيمي الخام CEE
47.9 $\pm$ 23.2	25.3	51.5	36.2	78.7	25	
49.7 $\pm$ 25.9	19.5	56.5	41.5	81.2	35	
39.2 $\pm$ 33.5	6.8	40.2	24.7	85.0	45	
28.6 $\pm$ 27.3	1.3	31.7	16.2	65.0	55	
67.8 $\pm$ 16.5	49.3	71.5	62.0	88.5	15	الترسيب بكبريتات الامونيوم AS %30
72.6 $\pm$ 13.2	58.8	75.5	66.7	89.5	25	
73.6 $\pm$ 15.0	55.5	78.0	69.5	91.2	35	
70.0 $\pm$ 17.7	51.0	72.5	63.5	93.0	45	
63.3 $\pm$ 15.4	47.3	65.7	56.7	83.5	55	
49.9 $\pm$ 23.2	24.3	55.2	41.0	79.0	15	الترسيب بكبريتات الستربتومايسين SS %2
54.8 $\pm$ 20.7	34.3	58.0	44.7	82.2	25	
56.2 $\pm$ 23.0	29.5	62.2	49.0	84.2	35	
49.1 $\pm$ 28.3	20.8	51.0	37.2	87.2	45	
39.8 $\pm$ 24.0	15.5	42.7	29.2	71.7	55	
53.6 $\pm$ 23.9	30.2 $\pm$ 18.3	57.3 $\pm$ 13.7	44.7 $\pm$ 16.2	82.2 $\pm$ 7.8	المعدل $\pm$ الانحراف القياسي	
CRBD ANOVA-TABLE		P.value (α 0.05) (14 , 45) = 2.00			فروقات الحرارة والتنقية الإنزيمية F = 14.25 * L.S.D.(α 0.05)(45) = 32.55	
		P.value (α 0.05) (3 , 56) = 2.84			فروقات الحرارة وحالة الإنزيم F = 34.45 * L.S.D.(α 0.05)(56) = 10.73	
DFS/ G : سليكا جب الدايتوم/ الزجاج PAA/ G : البولي اكريل امايد / الزجاج PAN/G : البولي اكريل نايتيرل/ الزجاج						

مما يدل على أن ذروة النشاط للإنزيم (C12O) في الظرف المتعادل للأس الهيدروجيني كانت عند الدرجة الحرارية 35 درجة مئوية أي إن هنالك إزاحة في الدرجة الحرارية المثلى لنشاط الإنزيم ربما يعزى ذلك إلى دور التقييد الإنزيمي . وربما لا تتفق هذه النتيجة مع الدراسة التي اجريت من قبل Silva وآخرون.(2012) ، لتقييم الظروف البيئية لنشاط الإنزيمين (C12O) و(C23O)

التي تنتجها السلالة *Gordonia polyisoprenivorans* وهي من actinomycetes ، إذ اختبروا المستخلصات الإنزيمية الحرة cell free enzymes في حالتها الذائبة والمقيدة . وقد تم تحديد الظروف المثلى للأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة والمسار الزمني وتأثير الأيونات على النشاط الإنزيمي ، ووجدوا ان ذروة نشاط الإنزيم (C12O) كانت عند درجة الحموضة 8.0 . وفي دراسة أخرى أجريت من قبل Tsai و Li ، تم تنقية الإنزيم catechol 1,2-dioxygenase من سلالة الخميرة *Candida albicans* TL3 ، ووجدوا أن الإنزيم ثنائي الوحدات المتماثلة homodimer بوزن جزيئي للوحدة الفرعية يبلغ 32000 دالتون وكل وحدة فرعية هي احادية الحديد . وكانت درجة الحرارة المثلى ودرجة الحموضة 25 درجة مئوية و 8.0 على التوالي (Tsai و Li، 2007) . بينما كانت أدنى معدلات النسب المئوية للتخطيم الحيوي للكاتيكول كانت ضمن مرحلة المستخلص الإنزيمي الخام CEE وتحديدا عند الدرجات الحرارية 55 و 45 و 15 درجة مئوية إذ بلغت معدلاتها 28.6 ± 27.3 % و 39.2 ± 33.5 % و 41.6 ± 24.9 % على الترتيب ، إذ يبدو واضحا دور التطرف في الدرجات الحرارية في تنشيط الإنزيمي وخاصة الدرجات الأعلى من 25 درجة مئوية ، وإن أفضل نسب لتخطيم الكاتيكول ضمن مرحلة المستخلص الإنزيمي الخام في ظروف الحامضية المعتدلة كانت عند الدرجات الحرارية 35 و 25 ، إذ بلغت 49.7 ± 25.9 % و 47.9 ± 23.2 % وفيها يظهر أيضاً مقدار الازاحة بمعدل 10 درجات عن الحد الأمثل لدرجة الحرارة والذي قد يعود سببه أيضاً إلى دور التقييد الإنزيمي في زيادة استقرارية الإنزيم وديمومة نشاطه اتجاه الدرجات الحرارية المرتفعة .

أما بالنسبة لمرحلة الترسيب بكبريتات الستربتومايسين SS 2% فقد لوحظ ان أعلى معدلات النسب المئوية للتخطيم الحيوي للكاتيكول في ظروف الحامضية المعتدلة ، كانت عند الدرجات الحرارية 35 و 25 و 15، إذ بلغت 56.2 ± 23.0 % و 54.8 ± 20.7 % و 49.9 ± 23.2 % على الترتيب ، والتي يظهر من خلالها أيضاً تأثير التقييد الإنزيمي بانواعه المختلفة قيد الدراسة على ازاحة الحد الحراري الأمثل لعمل الإنزيم ليشمل الدرجة الحرارية 35 درجة مئوية ، بينما بلغت القيم المنخفضة لمعدلات النسب التخطيم الحيوي للكاتيكول ضمن مرحلة الترسيب بكبريتات الستربتومايسين في ظروف الحامضية المعتدلة، 39.8 ± 24.0 % و 49.1 ± 28.3 % عند الدرجات الحرارية العالية 55 و 45 درجة مئوية على الترتيب ويعود سبب ذلك الى دور ارتفاع

الدرجات الحرارية في التنشيط لنشاط الإنزيم (C12O) (Minteer، 2017). وكما هو موضح في الشكل 4-14.



مما سبق يتضح جليا ان النتائج التي توصلنا اليها خلال هذه الدراسة تضمنت حدوث ازاحة واضحة في المدى الحراري الذي يمكن ان يكون فيه الإنزيم (C12O) نشطا في التحطيم الحيوي للكاتيكول، من خلال اتباع اسلوب تقييد هذا الإنزيم تساهميا على الدعامات المختلفة قيد الدراسة. ويمكن ملاحظة ذلك الامر مع ارتفاع معدلات التحطيم الحيوي للكاتيكول ضمن ظروف حامضية معتدلة في الدرجات الحرارية العالية التي تفوق 25 درجة مئوية والتي تعتبر درجة الحرارة المثلى لنشاط هذا الإنزيم في درجة الحموضة 8.0 (Tsai و Li، 2007). علماً أن هذه الازاحة في درجات الحرارة المثلى كانت تحصل احيانا بالاتجاهين بمعنى الانخفاض والارتفاع عن الحد الامثل للحرارة ولكن كانت الازاحة أعلى باتجاه الارتفاع عن المدى الامثل.

قد تكون الزيادة في درجة الحرارة المثلى بسبب التحسن في صلابة واستقرارية عمل الإنزيم عند اتباع اسلوب التقييد الإنزيمي عن طريق اسلوب الربط التساهمي باستخدام الكلوتار الديهايد . وربما تتفق هذه النتائج مع الدراسة التي اجريت من قبل Bayramoglu وآخرون (2013)،

والتي وجدوا من خلالها ان تقييد انزيم tyrosinase على السيليكا الحيوية المحورة للدايتومات كان له دور في نشاطه ضمن مدى درجة حرارة أوسع مقارنةً بالإنزيم الحر. وقد لوحظ ان إزاحة مماثلة لدرجة الحرارة المثلى للأنزيمات المقيدة في كثير من الدراسات ، لكن مدى الإزاحة يختلف باختلاف اساليب التقييد ونوع دعامات التقييد فضلاً عن نوع الارتباط او التفاعل بين الإنزيم المقيد والدعامة المقيدة (Bayramoglu وآخرون ، 2013؛ Minteer، 2017). ولقد وجد ان الاستقرار الحرارية Thermostability في المذيبات العضوية لإنزيم HabB كانت أعلى بكثير في حالة كون الإنزيم مدرج جينيا ضمن السيليكا الحيوية للدايتوم مقارنة مع الإنزيم في حالته الحرة بالمحلول . كذلك فإن استقرارية هذا الإنزيم كانت مساوية او حتى افضل منه في حالة إستخدامه ضمن مغلفات السيليكا في تجارب المختبر (خارج الجسم الحي in vitro). وقد اثبت الفحص بالمجهر الالكتروني ان التلاعب الجيني لم يؤثر على معمارية السيليكا في الدايتوم *Thalassiosira pseudonana* (Poulsen وآخرون ، 2007).

ومن جهة أخرى اظهر التحليل الاحصائي فروقا معنوية عالية في معدلات النسب المئوية للتحطيم الحيوي للكاتيكل وفقاً للتتبع في الدرجة الحرارية للخليط المتفاعل من جهة وحالة الإنزيم من جهة أخرى ، و ان أعلى معدلات النسب المئوية للتحطيم الحيوي للكاتيكل في ظروف الحامضية المعتدلة، كانت ضمن اسلوب تقييد الإنزيم التساهمي بالكلوتارالديهايد على دعامة السيليكا الحيوية المحورة لجب الدايتومات DFS/G ، إذ بلغت معدلها 82.2 ± 7.8 % يليها اسلوب تقييد الإنزيم التساهمي بالكلوتارالديهايد على الدعامة البوليمرية من نوع البولي اكريل نايتزل/ الزجاج PAN/G بواقع 57.3 ± 13.7 % ، بينما كانت اقل معدلات النسب المئوية للتحطيم الحيوي للكاتيكل في ظروف الحامضية المعتدلة ، في حالة الإنزيم الحر (الذائب)، إذ بلغت 30.2 ± 18.3 % يليها اسلوب تقييد الإنزيم التساهمي بالكلوتارالديهايد على الدعامة البوليمرية من نوع البولي اكريل امايد PAA/G بواقع 44.7 ± 16.2 % ، وكما هو مبين في الشكل (4-17). مما يدل على ان اسلوب التقييد الإنزيمي المتبع قد اعطى نتائج جيدة في جميع انواع دعامات التقييد المستخدمة قيد هذه الدراسة في المحافظة على استقرارية الإنزيم (C12O) حرارياً وجعله مستقراً في ظروف الدرجات الحرارية المختلفة قيد الدراسة الحالية مقارنة مع إستخدام الإنزيم بشكله الحر او الذائب.

وقد اعطى اسلوب تقييد الإنزيم (C12O) على دعامات السليكا الحيوية لجب الدايتومات ازاحة مضاعفة بمقدار 20 درجة مئوية عن الحد الحراري الامثل لنشاط الإنزيم ، ضمن جميع مراحل التنقية، فقد بلغت معدلات نسب تحطيم الكاتيكول من خلاله عند الدرجة الحرارية 45 درجة مئوية 93 % و 87.2 % و 85% في مراحل الترسيب بكبريتات الامونيوم AS والترسيب بكبريتات الستربتومايسين SS والمستخلص الإنزيمي الخام CEE على الترتيب . بينما اعطت أيضاً اساليب تقييد الإنزيم (C12O) على الدعامات البوليمرية من نوع البولي اكريل نايتريل/ الزجاج PAN/G و البولي اكريل اميد PAA/G ازاحة بمقدار 10 درجة مئوية عن الحد الحراري الامثل لنشاط الإنزيم ، ضمن جميع مراحل التنقية فقد بلغت معدلات نسب تحطيم الكاتيكول من خلالها عند الدرجة الحرارية 35 درجة مئوية 78.0 % و 62.2 % و 56.5% في حالة التقييد PAN/G و تليها حالة التقييد PAA/G بالنسب المئوية 69.5% و 49.0% و 41.5% ، وعلى الترتيب في مراحل التنقية الإنزيمية SS AS و CEE . وبالمقابل فإن الإنزيم (C12O) الحر غير المقيد لم يظهر ازاحة عن حده الحراري الامثل وكانت أعلى قيم لنشاطه ضمن الدرجة الحرارية 25 درجة مئوية في جميع خطوات التنقية قيد الدراسة ، إذ بلغت أعلى معدلات نسب تحطيمه للكاتيكول 58.8% و 34.3 % و 25.3 وعلى الترتيب في مراحل التنقية الإنزيمية AS و SS و CEE .

وربما يعود السبب في ذلك الى ان المسامات الموجودة في دعامات التقييد البوليمرية ذات احجام مايكروية وهي قليلة نسبياً من الناحية النوعية والكمية مقارنة مع العدد الكبير من المسامات ذات الحجوم المايكروية والنانوية والسليكون النانوي في السليكا الحيوية لجب الدايتومات (Medarevic وآخرون، 2016)، إذ كانت احجام الغشاء البوليمري (PAA) polacryl yamide ذي الترشيح الدقيق microfiltration بمعدل حجم مسام 0.2 مايكرومتر بينما كانت احجام الغشاء البوليمري (PAN) polyacrylonitrile ذي الترشيح الفائق ultrafiltration بمعدل حجم مسام 0.01 مايكرومتر. ويعني ذلك ان المساحة السطحية الجاهزة للتقييد التساهمي للإنزيم (C12O) باسلوب استخدام الكلوتار الديهايد، كانت أعلى في السليكا الحيوية لجب الدايتوم مقارنة مع نوعي الغشاء البوليمري المستخدمة قيد الدراسة ، تليها المساحة السطحية الجاهزة للتقييد الإنزيمي في الغشاء البوليمري PAN ثم غشاء الغشاء البوليمري PAA. وهذا بدوره يؤدي الى التفاوت في مقدار عدد الوحدات من انزيم (C12O) المقيدة. ويبدو ان التحوير الاميني باستخدام 10% من محلول 1,2 diamino hexane من أجل زيادة كمية مجموعات الأمين على سطح

المواد الحاملة كان له دور في جعل مجاميع الكربوكسيل السطحية الموجودة على سطح دعائم التقييد البوليمرية من جهة والنهاية الكربوكسيلية لمجاميع silaffin التي تمثل تمثل احدى اهم المكونات العضوية لجب الدايتوم من جهة أخرى (Poulsen وآخرون، 2007) ؛ Mishamandani وآخرون، 2016) ، ترتبط مع إحدى مجاميع الأمين، تاركة الأخرى حرة ومهيئة للارتباط مع الكلوتارالديهايد والذي بدوره يرتبط مع الوحدات الإنزيمية . مما يشير الى احتمالية ان السليكا الحيوية لجب الدايتومات قد تم تعديلها بدرجة أكبر مقارنة مع أغشية PAN والتي هي الأخرى كانت بدرجة أكبر من أغشية PAA. وهذه النتيجة قد تتفق مع ما اشير اليه من قبل Godjevargova وآخرون (2006).

ولقد وجد في دراسة مماثلة ، ان تقييد انزيم التايروسينيز على السليكا الحيوية للدايتوم عزز كل من الاستقرار الحراري والخزني للإنزيم مقارنة مع الصورة الحرة للإنزيم. في حين فقد التايروسينيز الحر كامل نشاطه خلال 5 أسابيع تخزين وفي 4 درجات مئوية ضمن دارئ الفوسفات بتركيز 0.1 مولار ودالة حامضية 7.0: pH ، اما انزيم التايروسينيز المقيد فانه فقد 33 % من نشاطه خلال تخزين لمدة 8 . وعلى الرغم من أن عملية التقييد قللت من نشاط الإنزيم وافتته للمادة الاساس ، أظهر انزيم التايروسينيز المقيد فعالية أعلى حتى في إزالة الفينول، الباراكريسول وأسيئات الفينيل خلال 12 ساعة بالمقارنة مع فعالية الإنزيم الحر . كما ان الإنزيمات المقيدة يمكن فصلها بسهولة من المحلول المحيط بها ومن ثم إعادة إستخدامها عدة مرات، ان تقنية التقييد على السليكا الحيوية للدايتوم تبدو تقنية واعدة لتصنيع المفاعلات الحيوية منخفضة التكلفة لمعالجة المياه العادمة (Bayramoglu وآخرون، 2013).

4-3-2 اختبارات الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنزيم (C12O)

يبين الجدول (4-22) معدلات النسب المئوية للتخطيم الحيوي للكاتيكول ذو التركيز الابتدائي 40 ملي مولار، الناجم عن فعالية الإنزيم catechol 1,2-dioxygenase (C12O) والذي اختبرت فعاليته في ظروف تفاعل تضمنت دالة حامضية مختلفة ، إذ استخدمت خلال التنقية الإنزيمية محاليل دوائر ذات دالة حموضة مختلفة مثل دارئ sodium acetate pH: 5.0-6.0 ؛ دارئ potassium phosphate pH 6.5-8.5 ؛ ودارئ Tris-acetate pH 9.0-10 .، لغرض تقييم مدى الرقم الهيدروجيني الأمثل لنشاط الإنزيم (C12O) في

ظروف حالته الحرة والمقيدة على السيليكا الحيوية لجب الدايتومات DFS/ G من جهة وعلى الاغشية البوليمرية ، البولي اكريل امايد PAA /G و البولي اكريل نايتزل PAN/G والمثبتة بدورها على دعامات زجاجية من جهة أخرى.

الجدول 4-22: معدلات النسب المئوية للتحطيم الحيوي للكاتيكول (%) ذو التركيز الابتدائي 40 ملي مولار بفعل إنزيم C12O الحر والمقيد في درجة حرارة ثابتة 25 درجة مئوية و دالة حامضية pH مختلفة ولفترة 3 ايام .								
المعدل ± الانحراف القياسي	الإنزيم الذائب (الحر)	الإنزيم غير الذائب (المقيد)			حالة الإنزيم			
		PAN/G	PAA/G	DFS/G	مرحلة تنقية الإنزيم			
30.2±25.6	5.1	31.5	19.3	65.0	5 – 6	المستخلص الإنزيمي الخام CEE	دالة حامضية pH مختلفة	
47.9±23.2	25.3	51.5	36.2	78.7	6.5–8.5			
56.7±35.1	6.3	71.8	62.0	86.5	9 – 10			
28.5±29.4	1.2	32.5	12.3	68.0	5 – 6	الترسيب بكبريتات الامونيوم AS %30		
72.6±13.2	58.8	75.5	66.7	89.5	6.5–8.5			
63.0±36.6	9.5	79.0	71.8	91.8	9 – 10			
45.3±23.1	22.8	49.0	33.3	76.0	5 – 6	الترسيب بكبريتات الستربتومايسين SS %2		
54.8±20.7	34.3	58.0	44.7	82.2	6.5–8.5			
50.9±25.1	27.3	53.3	38.0	85.0	9 – 10			
50.0±27.1	21.2±18.2	55.8±17.3	42.7±20.7	80.3±9.3	المعدل ± الانحراف القياسي			
CRBD ANOVA-TABLE		P.value (α 0.05) (8, 27) = 2.30			F = 11.48 * L.S.D.(α 0.05)(27) = 38.66 فروقات pH والتنقية الإنزيمية			
		P.value (α 0.05) (3 , 32) = 2.92			F = 19.23 * L.S.D.(α 0.05)(32) = 16.29 فروقات pH وحالة الإنزيم			
DFS/ G : سليكا جب الدايتوم/ الزجاج PAA/ G : البولي اكريل امايد / الزجاج PAN/G : البولي اكريل نايتزل/ الزجاج								

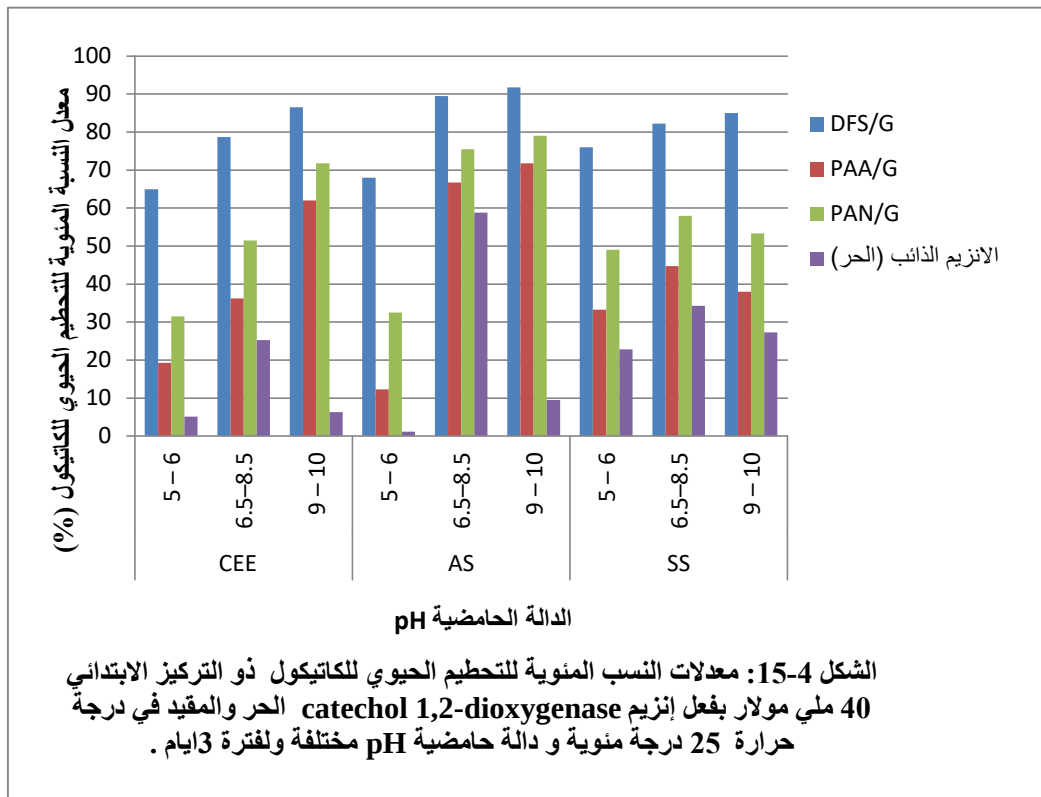
بعد اجراء التحليل الاحصائي للقيم المبينة في الجدول 4-22 والتي تمثل معدلات النسب المئوية للتحطيم الحيوي للكاتيول في ظروف حامضية مختلفة ودرجة حرارية ثابتة 25 درجة مئوية ولفترة حضانة تفاعل 3 ايام ، تبين ان هنالك فروقا معنوية عالية في معدلات النسب المئوية للتحطيم الحيوي للكاتيول وفقا للتنوع في الدالة الحامضية للخليط المتفاعل من جهة ودرجة نقاوة الإنزيم من جهه أخرى ، وان أعلى معدلات النسب المئوية للتحطيم الحيوي للكاتيول في ظروف

الحرارة الثابتة ، كانت ضمن مرحلة الترسيب بكبريتات الامونيوم AS 30% (وزن/حجم) وتحديدًا عند الدوال الحامضية 6.5-8.5 و 10 - 9 ، إذ بلغت نسب التحطيم الحيوي للكاتيكل 72.6 ± 13.2 % و 63.0 ± 36.6 % على الترتيب ، بينما كانت اقل النسب في جميع مرحلة التنقية تقع عند الدالة الحامضية 6 - 5 وكانت 28.5 ± 29.4 وربما يعود سبب ذلك الى دور الحامضية في تثبيط اوتمسح بروتين الإنزيم (Nakanishi وآخرون، 1991) ، ولاسيما الإنزيم الحر غير المقيد وبالتالي ينخفض نشاطه التحفيزي في تحطيم ركيزة الكاتيكل ، ويبدو ان اسلوب التقييد الإنزيمي بانواعه الثلاثة خلال هذه الدراسة كان له دور في زيادة استقرارية الإنزيم ضمن المستويات الحامضية والقاعدية.

ومن جهة أخرى اظهر التحليل الاحصائي فروقا معنوية عالية في معدلات النسب المئوية للتحطيم الحيوي للكاتيكل وفقا للتنوع في الدالة الحامضية للخليط المتفاعل من جهة وحالة الإنزيم من جهة أخرى ، وان أعلى معدلات النسب المئوية للتحطيم الحيوي للكاتيكل في ظروف الحرارة الثابتة 25 درجة مئوية ، كانت ضمن اسلوب تقييد الإنزيم التساهمي بالكوتارالديهيد على دعامة السيليكا الحيوية المحورة لجب الدايتومات DFS/G ، إذ بلغت معدلها 80.3 ± 9.3 % يليها اسلوب تقييد الإنزيم التساهمي بالكوتارالديهيد على الدعامة البوليمرية من نوع البولي اكريل نايتزل/ الزجاج PAN/G بواقع 55.8 ± 17.3 % ، بينما كانت أقل معدلات النسب المئوية للتحطيم الحيوي للكاتيكل في ظروف الحرارة الثابتة 25 درجة مئوية ، في حالة الإنزيم الحر (الذائب)، إذ بلغت 21.2 ± 18.2 % يليها اسلوب تقييد الإنزيم التساهمي بالكوتارالديهيد على الدعامة البوليمرية من نوع البولي اكريل اميد PAA/G بواقع 42.7 ± 20.7 % ، وكما هو مبين في الشكل (4-15) .مما يدل على ان اسلوب التقييد الإنزيمي المتبع قد اعطى نتائج جيدة في جميع انواع دعامات التقييد المستخدمة قيد هذه الدراسة في المحافظة على استقرارية الإنزيم (C120) القيم المتطرفة للدالة الحامضية وجعله مستقرا لاسيما في ظروف الرقم الهيدروجيني القاعدي مقارنة مع عدم استقرارية الإنزيم بشكله الحر او الذائب في مثل تلك الظروف القاعدية.

وقد اعطى اسلوب تقييد الإنزيم (C120) على دعامات السيليكا الحيوية لجب الدايتومات ازاحة بمقدار 1.5 درجة للرقم الهيدروجيني الامثل لنشاط الإنزيم ، ضمن جميع مراحل التنقية فقد بلغت أعلى معدلات نسب تحطيم الكاتيكل من خلاله عند الرقم الهيدروجيني القاعدي 10 - 9

91.8 % و 86.5 % و 85.0 % في مراحل الترسيب بكبريتات الامونيوم AS والمستخلص الإنزيمي الخام CEE و الترسيب بكبريتات الستربتومايسين SS على الترتيب ، وقد يعزى سبب ذلك الى ان امتصاص الماء ، إذا تجاوز قدرة الاحتفاظ (أي التشبع) للسوائل الأيونية في درجة حرارة الغرفة ثم تسهيل تمسخ الإنزيم عند السطح البيني بين المذيب والماء وبالتالي تقليل نشاط الإنزيم (Minteer، 2017). بينما لم تظهر اساليب تقييد الإنزيم (C12O) على الدعامات البوليمرية من نوع البولي اكريل نايتل/ الزجاج PAN/G و البولي اكريل اميد PAA/G مثل تلك الازاحة في الرقم الهيدروجيني الامثل لنشاط الإنزيم خلال مرحلة التنقية الإنزيمية بكبريتات الستربتومايسين SS ولكنها اقتصرت على المراحل الاولى في التنقية الإنزيمية ، إذ استطاعت ان تحرف الرقم الهيدروجيني الامثل للإنزيم (C12O) بمقدار 1.5 درجة أيضاً ضمن مرحلتي التنقية AS و CEE ، فقد بلغت معدلات نسب تحطيم الكاتيكول من خلالها عند الرقم الهيدروجيني القاعدي 9 – 10 79.0 % و 71.8 % على الترتيب في حالة التقييد PAN/G و تليها حالة التقييد PAA/G بالنسب المئوية 71.8 % و 62.0 % على الترتيب.



بالمقابل فان الإنزيم (C12O) الحر غير المقيد لم يظهر ازاحة عن الرقم الهيدروجيني الأمثل وكانت أعلى قيم لنشاطه ضمن الرقم الهيدروجيني المتعادل 6.5-8.5 في جميع خطوات التنقية قيد الدراسة، إذ بلغت أعلى معدلات نسب تحطيمه للكاتيكول 58.8% و 34.3% و 25.3 وعلى الترتيب في مراحل التنقية الإنزيمية AS و SS و CEE . وعلى الرغم من ان النتائج التي حصلنا عليها قد لا تتوافق مع رأي Daigle و Leech (1997) و Wang وآخرون (2002) الذين أثبتوا أن تقييد الإنزيمات لا يغير بشكل جذري خصائص استجابة الأس الهيدروجيني ، إذ لاحظو في دراساتهم المتعلقة تقييد انزيم tyrosinase ، ان الحد الأقصى من الاستجابة التحفيزية للإنزيم المقيد كانت في نطاق الأس الهيدروجيني من 5-6 (Daigle و Leech ، 1997) وفي الاس الهيدروجيني 7 (Wang وآخرون ، 2002) . الا أن ذلك قد لا ينطبق مع الميزات التي تمتلكها السيليكا الحيوية لجب الدايتوم التي وجدها (Bayramoglu وآخرون ، 2013) ، في تعزيز خصائص الإنزيم tyrosinase المقيد بوساطتها مقارنة مع الصورة الحرة للإنزيم. ولقد وجد ان الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنزيم polyphenol oxidase المستخلص من المشروم يبلغ 6.2 (Bru ، 1989) ووفقا (Fan وآخرون ، 2007) قد يختلف الرقم الهيدروجيني الأمثل لهذا الإنزيم عندما يكون مقيدا ويعتمد ذلك على نوع دعامة التقييد والطريقة المستخدمة بالتقييد. وفي دراسة اجريت من قبل Zhou وآخرون (2017) ، تم استخدام الكلوتارالديهايد GA لتقييد انزيم tyrosinase على سطح شعيرات الكربون CF carbon felt المحورة امينيا بواسطة APTES من اجل تصميم جهاز استشعار حيوي من خلال التقييد التساهمي للإنزيم TYR / GA / APTES / CF وقد اظهر المستشعر الحيوي نتائج ممتازة في الحساسية للمركبات الفينولية ، والاستقرار التشغيلي ، واستقرار التخزين . أظهر المستشعر الحيوي استقرارًا تشغيليًا ممتازًا عبر 30 اختبار، وحافظ على 78% من نشاط الكاتيكوليز الأصلي بعد 25 يومًا من التخزين. كما أنه مفيد للمراقبة المستمرة للمركبات أحادية الفينول. علاوة على ذلك ، قد تكون استراتيجية تثبيت الإنزيم مفيدة ليس فقط لأجهزة الاستشعار الحيوية ، ولكن أيضاً لخلايا انتاج الوقود الحيوي.

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

1-5 الاستنتاجات :- Conclusions

في ضوء ما تقدم في نتائج الدراسة الحالية يمكن ان نستنتج :-

1- وجود إختلافات معنوية مكانية لاغلب قياسات العوامل البيئية الفيزيائية والكيميائية لنماذج المياه بين مواقع النمذجة المختلفة الواقعة على مقطع نهر ديالى المار ضمن مدينة بعقوبة.

2- وجود تباين في أعداد الدايومات القاعية والهائمة المعزولة قيد الدراسة من مواقع النمذجة الواقعة على مقطع نهر ديالى المار في مدينة بعقوبة. إذ كانت أعلى اعداد لأجناس الدايومات في مواقع النمذجة D1 و D9 و D10 ، بينما كانت أقل اعداد من أجناس الدايومات القاعية المعزولة في مواقع النمذجة D4 و D7 و D8. وكانت أعلى اعداد لأجناس الدايومات الهائمة المعزولة تقع ضمن موقعي النمذجة D6 و D10 ، بينما لم يتم عزل اي جنس من الدايومات الهائمة ضمن موقع النمذجة D1.

3- إن أعلى مجموع لقيم مؤشر بالمر للتلوث العضوي PPI، كانت ضمن مواقع النمذجة على نهر ديالى D7 و D8 و D4 و D6 ، مما يدل على ان مياه نهر ديالى في تلك المواقع تعاني من تلوث عضوي عالي ومؤكد Confirms high organic pollution ، بينما كانت المواقع D1 و D5 و D2 تعاني من تلوث عضوي معتدل Moderate organic pollution.

4- وجود حالة تغذوية مفرطة Hypertrophy في مياه مقطع نهر ديالى المار في بعقوبة ضمن موقعي النمذجة D7 و D4 ، ناجمة عن احتمالية وجود تلوث عضوي عالي ومؤكد، والتي ارتبطت مع إرتفاع قيم المؤشر التغذوي الدايتومي TDI وإرتفاع قيم نسبة الدايومات المحتملة للتلوث العضوي PTV % من جهة وإنخفاض قيم مؤشر التنوع الدايتومي DQI في نفس الموقعين اعلاه من جهة أخرى . بينما إتصفت مياه موقعي النمذجة D10 و D2 بأنها شحيحة إلى متوسطة

الحالة الاغذائية *Oligo-mesotrophy* ، من خلال القيم المرتفعة نسبيا لمؤشر التنوع الدايتومي DQI فيهما، وما يقابلها من قيم منخفضة في نسبة الدايتومات القاعية المحتملة للتلوث PTV % فضلا عن الأعداد المنخفضة من الدايتومات القاعية التي عزلت من هذين الموقعين ، مما يدل على زيادة في تنوع الدايتومات ذات القيم المنخفضة بالنسبة للمؤشر التغذوي الدايتومي TDI وقيم التحمل للتلوث العضوي.

5- كانت افضل منطقة عزلت منها خمائر المبيضات *Candida sp.* هي منطقة الصناعة الأولى تليها منطقة حي المعلمين ، بينما كانت أقل معدلات لنسب المبيضات المعزولة ضمن منطقة الصناعة الثانية . وإن أكثر المبيضات عزلت من التربة المأخوذة من أرضية تربة كراجات تصليح السيارات ، إذ بلغت أعلى النسب للمبيضات *C. albicans* تليها *C. tropicalis* ثم المبيضات *C. parapsilosis* . بينما ظهرت أقل نسب في تربة أرضيات المولدات الكهربائية المحلية ، إذ سجلت *C. albicans* و *C. tropicalis* أعلى نسبة تليهما *C. parapsilosis* و لم تسجل *C. famata* و *C. ciferrii* أي نسبة تذكر ضمن تربة أرضيات المولدات الكهربائية المحلية.

6- تبين أن هنالك فروقا معنوية في القدرة التحملية للفينول بين أنواع المبيضات بحسب مصادر التربة التي عزلت منها ، وكانت أعلى معدلات للمستعمرات المتكونة CFU في مزارع التركيز الفينولي العالي 25 ملي مولار للمبيضات المعزولة من تربة أرضية كراجات تصليح السيارات. بينما كانت أدنى معدلات CFU في مزارع التركيز الفينولي المنخفض 5 ملي مولار للمبيضات المعزولة من تربة أرضية المولدات الكهربائية المحلية. ومن جهة أخرى كانت هنالك فروقا معنوية جدا في القدرة التحملية للفينول بين أنواع المبيضات المنماة ضمن المزارع الفينولية ، إذ أظهرت *C. parapsilosis* من مصادر عزلها المختلفة ، أعلى مستويات لتحمل التركيز الفينولي لاسيما عند التركيز 20 ملي مولار تليها *C. tropicalis* ثم *C. albicans* من حيث قدرة تحملها عند نفس التركيز الفينولي بمعدلات CFU أقل نسبيا.

7- تبين أن هنالك فروقا معنوية في القدرة التحملية للكاتيول بين أنواع المبيضات بحسب مصادر التربة التي عزلت منها، وإن أعلى معدلات للمستعمرات المتكونة CFU كانت في مزارع التركيز الكاتيولي العالي 40 ملي مولار للمبيضات المعزولة من تربة أرضية كراجات تصليح السيارات.

بينما كانت أدنى معدلات CFU في مزارع التركيز الكاتيكولي المنخفض 10 ملي مولار للمبيضات المعزولة من تربة أرضية المولدات الكهربائية المحلية . ومن جهة أخرى كانت هنالك فروقا معنوية جدا في القدرة التحملية للكاتيكول بين أنواع خمائر المبيضات المنماة ضمن المزارع الكاتيكولية ، إذ اظهرت *C. albicans* من مصادر عزلها المختلفة ، أعلى مستويات لتحمل التركيز الكاتيكولي لاسيما عند التركيز 40 ملي مولار تليها *C. tropicalis* ثم *C. parapsilosis* من حيث قدرة تحملها عند نفس التركيز الكاتيكولي بمعدلات CFU أقل نسبيا.

8- إن هناك نشاط عالي محتمل لانزيم phenol hydroxylase المحلل للفينول ضمن النشاط الايضي للمبيضات المنماة ضمن المزارع الفينولية خلال فترة حضانة 6 ايام وفي درجة 30 درجة مئوية ، يتفاوت على الترتيب في مقداره بالنسبة للمبيضات *C. parapsilosis* و *C. tropicalis* و *C. albicans* ، إذ إستطاعت المبيضات *C. parapsilosis* خلال اربعة ايام من الحضانة ان تستقلب حوالي 69% من تركيز الفينول الإبتدائي بينما تمكنت *C. tropicalis* خلال خمسة ايام من الحضانة ان تستقلب حوالي 61.5 % تليها المبيضات *C. albicans* والتي تمكنت بدورها من إستقلاب 43.5 % من الفينول الموجود في مزرعتها خلال اربعة ايام. وقد كانت أقل نسب لإستقلاب الفينول في المزارع الفينولية تعود للمبيضات *C. ciferrii* و *C. famata* خلال اليوم الخامس من الحضانة. مما يدل على إحتمالية وجود نشاط ضئيل لانزيم phenol hydroxylase المحلل للفينول ضمن النشاط الايضي لخمائر المبيضات يتفاوت على الترتيب في مقداره بالنسبة للمبيضات *C. ciferrii* و *C. famata* على الرغم من عدم وجود اي إشارة في الأبحاث العلمية إلى دور تلك المبيضات في تحمل أو إستقلاب الفينول كمصدر وحيد للكربون والطاقة .

9- إن هناك نشاط عالي محتمل لإنزيمات dioxygenases المحللة للكاتيكول ضمن النشاط الايضي للمبيضات المنماة ضمن المزارع الكاتيكولية خلال فترة حضانة 6 ايام وفي درجة 30 درجة مئوية، يتفاوت على الترتيب في مقداره بالنسبة للمبيضات *C. albicans* و *C. tropicalis* و *C. parapsilosis* ، إذ إستطاعت المبيضات *C. albicans* خلال اربعة ايام من الحضانة ان تستقلب حوالي 88.5 % من تركيز الكاتيكول الإبتدائي بينما تمكنت *C. tropicalis* خلال خمسة ايام من الحضانة ان تستقلب حوالي 66.8 % تليها المبيضات *C. parapsilosis* والتي

تمكنت بدورها من تحطيم 58.5 % من الكاتيكول الموجود في مزرعتها خلال خمسة ايام .وقد كانت أقل نسب لإستقلاب الكاتيكول في المزارع الكاتيكولية تعود للمبيضات *C. famata* و *C. ciferrii* خلال اليوم الرابع من الحضانة ، مما يدل على ان هناك نشاط ضئيل محتمل لإنزيمات Dioxygenase المحللة للكاتيكول ضمن النشاط الايضي لخمائر المبيضات يتفاوت على الترتيب في مقداره بالنسبة للمبيضات *C. famata* و *C. ciferrii* ،على الرغم من عدم وجود اي إشارة في الأبحاث العلمية إلى دور تلك المبيضات في تحمل أو إستقلاب الفينول كمصدر وحيد للكربون والطاقة .

10 - إن المبيضات *C. parapsilosis* تليها *C. tropicalis* تمتلك نشاط أعلى بإتجاه تحليل الفينول اكثر من الكاتيكول، ويتضح ذلك من خلال إرتفاع معدلات المتطلب البيوكيميائي للأوكسجين BOD في مزارعها الفينولية المغناة بالفينول بتركيز 20 ملي مولار مقابل مزارعها الكاتيكولية المغناة بالكاتيكول بتركيز 40 ملي مولار مقابل و قد يعزى السبب في ذلك إلى زيادة الطلب على الأوكسجين كعامل مؤكسد مرتبط بزيادة نشاط الإنزيم phenol hydroxylase. بينما كانت أعلى معدلات BOD في المزارع الكاتيكولية للمبيضات *C. albicans* مقارنة مع مزارعها الفينولية مما يدل على نشاط أعلى لتلك الخميرة بإتجاه تحليل الكاتيكول وقد يعزى سبب ذلك إلى زيادة الطلب على الأوكسجين كعامل مؤكسد مرتبط بزيادة نشاط إنزيمات Dioxygenase المحللة للكاتيكول. وقد كانت أقل معدلات BOD في المزارع الكاتيكولية للمبيضات *C. famata* و *C. ciferrii* مقارنة مع مزارعها الفينولية. مما يدل على وجود نشاط مرتفع نسبيا لتلك المبيضات بإتجاه تحليل الفينول اكثر منه بالنسبة للكاتيكول ،على الرغم من عدم وجود اي إشارة في الأبحاث العلمية إلى دور تلك المبيضات في تحمل أو إستقلاب الفينول كمصدر وحيد للكربون والطاقة.

11- إن المبيضات المعزولة قيد الدراسة تباينت بشكل كبير في نموها الميكروبي نتيجة لإختلاف قدرة تحملها أو إستقلابها للفينول وهي نتيجة متوافقة مع نسب التحطيم الفينولي في اليوم الرابع والخامس من حضانة الخمائر المبيضة المنماة في المزارع الفينولية خلال فترة حضانة 6 ايام في درجة 30 درجة مئوية والتي تم الحصول عليها قيد الدراسة الحالية . وقد سجلت أعلى معدلات لقيم الكتلة الحيوية في اليوم الخامس بالنسبة للمبيضات *C. parapsilosis* و *C. tropicalis* تليها

المبيضات *C. albicans*. إن الزيادة في النمو والكتلة الحيوية للخمائر في المزارع الفينولية دليل على زيادة إستقلاب الفينول الناجم عن نشاط الإنزيم phenol hydroxylase المؤكسد للحلقة العطرية للفينول والعكس صحيح ، إذ سجلت أقل معدلات لنمو الكتلة الحيوية بالنسبة للخمائر *C. famata* و *C. ciferrii* في اليوم الرابع، على الرغم من أن مرحلة التأخر الزمني lag phase لهما امتدت لغاية اليوم الثالث ، فضلا عن عدم وجود اي إشارة في الأبحاث العلمية إلى دور تلك المبيضات في تحمل أو إستقلاب الفينول كمصدر وحيد للكربون والطاقة .

12- إن المبيضات المعزولة قيد الدراسة تباينت بشكل كبير في نموها الميكروبي نتيجة لإختلاف قدرة تحملها أو إستقلابها للكاتيكول وهي نتيجة متوافقة مع نسب التحطيم الكاتيكولي في اليوم الرابع و الخامس من حضانة الخمائر المبيضة المنماة في المزارع الكاتيكولية خلال فترة حضانة 6 ايام في درجة 30 درجة مئوية والتي تم الحصول عليها قيد الدراسة الحالية . وقد سجلت أعلى معدلات لقيم الكتلة الحيوية في اليوم الخامس بالنسبة للمبيضات *C. albicans* و *C. tropicalis* تليها المبيضات *C. parapsilosis*. إن الزيادة في النمو والكتلة الحيوية للخمائر في المزارع الكاتيكولية دليل على زيادة إستقلاب الكاتيكول الناجم عن نشاط إنزيمات Dioxygenase المؤكسد للحلقة العطرية للكاتيكول والعكس صحيح ، إذ سجلت أقل معدلات للنمو الكتلة الحيوية بالنسبة للخمائر *C. famata* و *C. ciferrii* في اليوم الرابع ، على الرغم من أن مرحلة التأخر الزمني lag phase لهما كانت قليلة ويبدو انها كانت متأقلمة لتحليل الكاتيكول اكثر مما هي عليه بالنسبة للفينول ، فضلا عن عدم وجود اي إشارة في الأبحاث العلمية إلى دور تلك المبيضات في تحمل أو إستقلاب الكاتيكول كمصدر وحيد للكربون والطاقة .

13- تبين أن أعلى فعالية نوعية لتتقية الإنزيم (C12O) من خمائر المبيضات *C. albicans* كانت ضمن المرحلة الثانية من خطوات التتقية المتمثلة بالترسيب بكبريتات الامونيوم AS 2% (وزن/حجم) بعد انجاز التتقية بمقدار 6.6 ضعفا بمعدل استعادة نشاط 78.3 % . وقد كان النشاط التحفيزي الامثل للإنزيم (C12O) يقع ضمن الرقم الهيدروجيني 6.5-8.5 ودرجة حرارة 25 درجة مئوية.

14- إن أسلوب التقييد التساهمي بالكلوتارالديهيد للإنزيم، قد اعطى نتائج جيدة في جميع أنواع دعامات التقييد المستخدمة قيد هذه الدراسة في المحافظة على استقرارية الإنزيم (C12O) حراريا

وجعله مستقرا في ظروف الدرجات الحرارية المختلفة قيد الدراسة الحالية مقارنة مع استخدام الإنزيم بشكله الحر أو الذائب. وقد لوحظ ان المساحة السطحية الجاهزة للتقييد التساهمي للإنزيم (C12O) ،كانت أعلى في السيليكا الحيوية لجب الدايتوم DFS مقارنة مع نوعي الغشاء البوليمري المستخدمة قيد الدراسة ، تليها المساحة السطحية الجاهزة للتقييد الإنزيمي في الغشاء البوليمري PAN ثم غشاء الغشاء البوليمري PAA. وهذا بدوره يؤدي إلى التفاوت في مقدار عدد الوحدات من انزيم (C12O) المقيدة . إذ اعطى اسلوب تقييد الإنزيم (C12O) على دعامات السيليكا الحيوية لجب الدايتومات DFS/G إزاحة مضاعفة بمقدار 20 درجة مئوية عن الحد الحراري الامثل لنشاط الإنزيم ضمن جميع مراحل التنقية. بينما اعطت ايضا اساليب تقييد الإنزيم (C12O) على الدعامات البوليمرية من نوع PAN/G و PAA/G إزاحة بمقدار 10 درجة مئوية عن الحد الحراري الامثل لنشاط الإنزيم ضمن جميع مراحل التنقية. وبالمقابل فان الإنزيم (C12O) الحر غير المقيد لم يظهر إزاحة عن حده الحراري الامثل وكانت أعلى قيم لنشاطه ضمن الدرجة الحرارية 25 درجة مئوية في جميع خطوات التنقية قيد الدراسة .

15- إن أسلوب التقييد التساهمي بالكوتارالديهايد للإنزيم، قد اعطى نتائج جيدة في جميع أنواع دعامات التقييد المستخدمة قيد هذه الدراسة في المحافظة على استقرارية الإنزيم (C12O) ضمن القيم المتطرفة للدالة الحامضية وجعله مستقرا لاسيما في ظروف الرقم الهيدروجيني القاعدي مقارنة مع عدم استقرارية الإنزيم بشكله الحر أو الذائب في مثل تلك الظروف القاعدية. وقد اعطى اسلوب تقييد الإنزيم (C12O) على دعامات السيليكا الحيوية لجب الدايتومات DFS/G إزاحة بمقدار 1.5 درجة للرقم الهيدروجيني الامثل لنشاط الإنزيم ضمن جميع مراحل التنقية. بينما لم تظهر اساليب تقييد الإنزيم (C12O) على الدعامات البوليمرية من نوع البولي اكريل نايتزل/ الزجاج PAN/G و البولي اكريل امايد PAA/G مثل تلك الإزاحة في الرقم الهيدروجيني الامثل لنشاط الإنزيم خلال مرحلة التنقية الإنزيمية بكبريتات الستربتومايسين SS ولكنها اقتصررت على المراحل الأولية في التنقية الإنزيمية ، إذ إستطاعت ان تحرف الرقم الهيدروجيني الامثل للإنزيم (C12O) بمقدار 1.5 درجة ايضا ضمن مرحلتي التنقية AS و CEE . وبالمقابل فان الإنزيم (C12O) الحر غير المقيد لم يظهر إزاحة عن الرقم الهيدروجيني الامثل وكانت أعلى قيم لنشاطه ضمن الرقم الهيدروجيني المتعادل 6.5-8.5 في جميع خطوات التنقية قيد الدراسة .

2-5 التوصيات Recommendations

بناءً على ما تقدم توصي الدراسة الحالية بما يأتي :-

- 1- ضرورة اجراء عمليات الكري والتتظيف على مسار نهر دىالى وبشكل مستمر لغرض زيادة تدفق المياه مما يسمح بحصول التنقية الذاتية عن طريق التحلل الهوائي للملوثات العضوية . فضلا عن المراقبة الدورية لما يتم طرحه من الملوثات العضوية الناجمة عن الأنشطة البشرية الزراعية والصناعية ووضع قوانين صارمة للحد من ذلك. اضافة إلى تكثيف الدراسات بشأن التقييم الدوري للممرات المائية والمحافظة عليها .
- 2- تكثيف الدراسات التي تتعامل مع استخدام الكائنات الحية وخاصة الاحياء الدقيقة في البيئة المائية واليابسة كمؤشرات حيوية يمكن الاستدلال من خلالها على حالات التلوث المختلفة أو المستويات الاغذائية واعتمادها للمراقبة الدورية للكشف عن التلوث المحتمل ومعالجته في وقت مبكر.
- 3- اجراء دراسات مستفيضة عن اسلوب التقييد الإنزيمي في المعالجة الحيوية للبيئات الملوثة ، لما له من دور في زيادة خصائص الإنزيم من حيث زيادة استقراريته في درجات حرارة أو رقم هيدروجيني تفوق القيم الخاصة به .
- 4- اختبار دعامات تقييد انزيمي مختلفة وخاصة تلك التي تمتلك مساحة سطحية عالية كما اثبتنا في هذ الدراسة بالنسبة للسليكا الحيوية لجب الدايتومات ذات المسامات الميكروية -النانوية .
- 5- ضرورة اعتماد مثل هذه النتائج للتطبيق في مجال مكافحة التلوث النفطي ولاسيما في حالة حصول التسربات النفطية في الممرات المائية ، وخاصة التسربات الناجمة الصهاريج المنقولة عبر الممرات المائية أو التسربات الناجمة عن المياه العادمة لمنشآت تكريرالزيوت .

المصادر العربية

- الحديثي ، هديل توفيق.، (1983). الكتاب العملي في اساسيات علم البكتريا. جامعة البصرة ، مطبعة جامعة البصرة . ،صفحة: 25-29.
- الراوي ، احمد عبد الهادي و الزبيدي احمد حيدر ونظيمة قدوري.، (1986) . كيمياء التربة ، جامعة بغداد، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .، صفحة: 51-56.
- الراوي، خاشع محمود. ، (2000). مدخل الى الاحصاء الحياتي . الطبعة الاولى جامعة بغداد.
- السعدي ، حسين علي .، (2002) . علم البيئة والتلوث ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة بغداد ، صفحة: 615.
- السيد ، جمال عويس. ، (2007). الملوثات الكيميائية للبيئة ، دار الفجر للنشر والتوزيع ، القاهرة - مصر .
- الشمري ، مسلم كاظم حميد. ،(2006). التحليل المكاني للتوسع والامتداد الحضري للمراكز الحضرية الرئيسية في محافظة ديالى . أطروحة دكتوراه . كلية التربية ابن رشد ، جامعة بغداد.
- الصفدي ، عصام حمدي. ونعيم الظاهر .،(2008). صحة البيئة وسلاماتها ،دار اليازوري العلمية للنشر والتوزيع ، عمان - الأردن.
- العاني ، عبدا لله نجم.، (1980). مبادئ علم التربة .مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر .جامعة الموصل .
- العادلي ، عقيل شاكر.، (1992) . تأثير الفعاليات البشرية على نوعية مياه نهر ديالى الأسفل . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بغداد .
- العمر، مثنى عبد الرزاق. ، (2000) . التلوث البيئي ، دار وائل للنشر ،عمان . الأردن.
- اليعقوبي ، سليم ياوز جمال احمد.، (2000) . إعداد خرائط استعمالات الأرض الزراعية باستخدام تقنيات الاستشعار عن بعد فضاء بعقوبة . رسالة ماجستير. كلية التربية ابن رشد ، جامعة بغداد .

حبيب، رجاء علي.، السعدي، علي حمود.، و جاسم ، ونيران عبيد .، (2015) . عزل وتشخيص بعض انواع خمائر الـ *Candida Spp* ودراسة حساسيتها لبعض المضادات الفطرية، ، مجلة جامعة بابل العلوم الصرفة والتطبيقية ،المجلد. 23 ،العدد.3.

سلمان ، جاسم محمد. ،(2006) . دراسة بيئية للتلوث المحتمل في نهر الفرات بين سدة الهندية و منطقة الكوفة – العراق ، أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة بابل.

كاظم، وصفي محمد.،(2008) . دراسة بيئية لبعض المصطحات المائية في محافظة ديالى ، مجلة الفتح ، العدد .33.

عباوي ، سعاد عبد. و حسن، محمد سليمان.، (1990).الهندسة المائية البيئية – فحوصات الماء. جامعة الموصل.

مولود ، بهرام خضر.، السعدي حسين علي. ، والاعظمي ، حسين احمد شريف. ،(1990). البيئة والتلوث العملي، رقم الايداع في دار الكتب والوثائق في بغداد 609، 101 و151- 153 .

مولود ، بهرام خضر وحسين علي السعدي وحسين احمد شريف الاعظمي، (1992) . علم البيئة والتلوث ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة بغداد.

نظام صيانة الأنهار العراقية من التلوث IRMS رقم 25 لسنة (1967) والتعديلات الملحقة. وزارة الصحة – البيئة – حزيران – (1988).

المصادر الانكليزية

- Abdulwahid,K.D.,(2016). Assessment Of Water Quality In Khreisan River From Baquba City, Diyala (Iraq) By Using Algae As A Bioindicator, Inte. Jour. of Curr. Res.Vol. 8, No. 6,33108–33115.
- Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., and Naidu, R. A., (2015).comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria, Appl. Biochem. Biotechnol., No.176, 670–699.
- Abrantes ,F., Gil, I., Lopesa, C., Castro, M.,(2005). Quantitative diatom analyses—a faster cleaning procedure, Deep–Sea Res. I 52 :189–198.
- Adgate, J.L., Goldstein, B.D.,and McKenzie, L.M.,(2014). Potential public health hazards, exposures and health effects from unconventional natural gas development. Environ. Sci. Tech No.48, 8307–8320.
- Afify, A.S., Mahmoud, M.A., Emara, H.A.,and Abdelkreem, K.I.,(2009). Phenolic Compounds and COD Removal from Olive Mill Wastewater by Chemical and Biological Procedures, Australian Journal of Basic and Applied Science, Vol.3 , No.2, 1087–1095.
- Alberti, L., Lombi, S.,and Zanini, A.,(2011). Identifying sources of chlorinated aliphatic hydrocarbons in a residential area in Italy using the integral pumping test method. Hydrogeol. J., No.19, 1253–1267.

Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F. J., and Ballesteros, A., (2006).

Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes, Trends in Biotechnology, Vol. 24, No.6, 281–287.

Aleksieva, Z., Ivanova, D., Godjevargova, T., and Atanasov, B., (2002).

Degradation of some phenol derivatives by *Trichosporon cutaneum* R57, Process Biochem., No.37, 1215–1219.

Alfenore, S., Cameleyre, X. L. Goma, G., Molina–Jouve, C., Guillouet

, S.E., (2004). Aeration strategy: A need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed–batch process, Appl. Microbiol. Biotechnol., No.63, 537–542.

Alghanimy, D. B.G., (2015). Assessment of water quality of Euphrates

river (between the cities of Al–Kifl and AlShinafiyah) Iraq. Ph. D. Thesis, Coll. Of Education, University of AL– Qadisiyah, pp 185.

Ali, F. S., Hassan, F.M. and Abdul–Jabar, R. A., (2017). Evaluation of

Water Quality by Trophic Diatom Index (TDI) in Tigris River within Wasit Province, Indian J. of Ecology, Vol.44, No.4, 711–716.

Al–Khalid, T., and El–Naas, M.H., (2012). Aerobic Biodegradation of

Phenols: A Comprehensive Review, Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., No.42, 1631–1690.

Allothman, N.H.A., Ali–Shtayeh, M.S., and Naser, S., (2012). Genotype

Comparison of Strains of *Candida albicans* from Patients with Cutaneous Candidiasis in Nablus, Thesis for MSc. Degree, University, Nablus, Palestine.

ASTDR– Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2014).
Medical Management Guidelines for Phenol. Available at:
<https://www.atsdr.cdc.gov/mmg/mmg.asp?id=144&tid=27>

A. U.S.Environmental Protection(2002). Toxicological review of phenol in support of (IRIS), summary information on Integrated Risk Information System, Natl. Cent. Environ. Assessment, Washington, DC. , 1–30.

Baboshin, M.,and Golovleva, L.,(2012). Aerobic bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and its kinetic aspects, Microbiology, No.81, 639–650.

Bajpai, V.P., Sharma, P.K.,Jain, Gaur,and R.K.,(2011). Bioremediation of heavy metals– microbial application. *In*: Recent advances in environmental biotechnology, Jain, P.K., V.K. Gupta, and V. Bajpai. (Eds.). LAP Lambert academic publishing AG and Co. KG, Germany, 205–218.

Balaban, N., Yankelzon, I., Adar, E., Gelman, F., Ronen, Z.,and Bernstein, A.,(2019).The spatial distribution of the microbial community in a contaminated aquitard below an industrial zone, Water, No.11, 2128.

Barathi, S.,and Vasudevan, N.,(2001). Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum–contaminated soil. Environment International, No.26: 413–416.

Barbosa, O., Torres, R., Ortiz, C., and Fernandez–Lafuente, R., (2012).Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida Antarctica*, Process Biochem. No. 47,1220–1227.

- Barret, M.; Carrère, H.; Delgadillo, L.; Patureau, D.,(2010). Water Res., No. 44, 3797.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., and Yarrow, D.,(2000). Yeasts: Characteristics and Identification, 3rd edn., Cambridge, Cambridge University Press.
- Bayramoglu,G.,Altintas, B.,and Arica, M.Y.,(2012).Cross-linking of horseradish peroxidase adsorbed on polycationic films: application direct dyes decolourisation, Bioprocess Biosyst. Eng. No. 35 ,1355 1365.
- Bayramoglu,G., Akbulut, A., and Arica, M.Y.,(2013) Immobilization of tyrosinase on modified diatom biosilica: Enzymatic removal of phenolic compounds from aqueous solution, Journal of Hazardous Materials , No.24 , 528–536.
- Ben- Sassi, A., Boularbah, A., Jaouad, A., Walker, G.,and Boussaid, A. A.,(2006).Comparison of Olive Oil Mill Wastewaters (OMW) from Three Different Processes in Morocco, Process Biochemistry, Vol.41 , No.1,74–78.
- Bleve, G., Lezzi, C., Chiriatti, M.A., D'Ostuni ,I., Tristezza, M., Di Venere ,D., Mita, S.G.,and Grieco, F.,(2012). Selection of Non-Conventional Yeasts and their Use in Immobilized Form for the Bioremediation of Olive Oil Mill Wastewaters, Bioresource Technology, Vol.102, No.2,982–989.
- Bellinger, B. J., C. Cocquyt, C., and C. M. O'reilly,(2006). Benthic diatoms as indicators of eutrophication in tropical streams. Hydrobiologia ,Vol.573, No.1, 75–87.

- Bellinger, E. G. and Sigeo, D. C.,(2010). Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators,Vol.13 , No.4 , 99–134.
- Bevilacqua, A., Corbo, M.R., and Sinigaglia, M.,(2012).Selection of yeasts as starter cultures for table olives: a step-by-step procedure. Frontiers in Food Microbiology; Vol. 3: No.194.
- Beyenal, H., Seker, S.,Tanyolac, A.,and Salih, B.,(1997). Diffusion coefficients of phenol and oxigen in a biofilm of *Pseudomonas putida*, AIChE J., No.43, 243–250.
- Bhardwaj,R.M., Chilton,J., Van Der Gun,J., Dieng.Y., Diop,S., Gaye,C., Hansen,A., Mtetwe,S., Natale,O.E., Niekerk,H., Nielsen,K., Rast,A., and Toguebaye,B.,(2008). Water Quality for Ecosystem and Human Health, UN GEMS/Water Programme Office, 2nd Ed., ISBN 92–95039–51–7.
- Bhatnagar,S.,and Kumari,R.,(2013). Bioremediation: A Sustainable Tool for Environmental Management – A Review. Annual .Review & Research in Biology. Vol. 3, No. 4, 974–993.
- Biggs, B.,and Kilroy, C.,(2000). Stream periphyton monitoring manual. National Institute of Water and Atmospheric Research, Christchurch, New Zealand.
- Binark, N., Guven, K.C., Gezgin, T., and Unlu, S.,(2000). Oil pollution of marine algae, Bull Environ Contam Toxicol,No.64, 866–872.
- Boczka,G., Fernandes, A., Mako's, P. 's.,(2017). Study of different advanced oxidation processes for wastewater treatment from

petroleum bitumen production at basic pH, Ind. Eng. Chem. Res., No.56 , 8806–8814.

Boczka, G., and Fernandes, A., (2017). Wastewater treatment by means of advanced oxidation processes at basic pH conditions: a review, Chem. Eng. J. , No.320, 608–633.

Borde, X., Guieysse, B., Delgado, O., Munoz, R., Hatti-Kaul, R., Nugier-Chauvin, C., et al. , (2003). Synergistic relationships in algal– bacterial microcosms for the treatment of aromatic pollutants, Bioresour. Technol., No.86, 293–300.

Bosco, F., Casale, A., Chiampo, F., and Godio, A., (2019). Removal of diesel oil in soil microcosms and implication for geophysical monitoring, Water, No.11, 1661.

Brahmbhatt, N.H., Patel, R.V., and Jasrai, R.T., (2012). Bioremediation potential of *Spirogyra* sp. And *Oscillatoria* sp. for cadmium, Asian J. Biochem. Pharmal. Res., No.2, 102–107.

Boczar, B.A., Beitler, M.K., Liston, J., Sullivan, J.J., and Cattolico, R.A., (1988). Paralytic shellfish toxins in *Protogonyaulax tamarens* and *Protogonyaulax catenella* in axenic culture. Plant Physiology, Vol. 88, No.4, 1285–1290.

Bruckner, C.G., and Kroth, P.G., (2009). Protocols for the Removal of Bacteria from Freshwater Benthic Diatom Cultures¹. Journal of phycology, Vol.45, No.4, 981–986.

Bru, R., Sanchez-Ferrer, A., Garcia-Carmona, F., (1989). Biotechnol. Bioeng., 34, 304.

- Bukowska, B.,(2003).Effects of 2,4-D and its metabolite 2,4-dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes, *Comp. Biochem. Physiol., Part C* 135/4, 435.
- Bukowska, B.,(2004).2,4,5-T and 2,4,5-TCP induce oxidative damage in human erythrocytes: role of glutathione, *Cell Biol. Int.*, Vol.28, No. 557.
- Bukowska, B. ,and Hutnik, K.,(2006). Phenoxyherbicides and their derivatives: Effect on the activity of erythrocytes acetylcholinesterase (in vitro), *Pest. Biochem. Physiol.*, Vol.85, No.174.
- Bukowska, B., Michałowicz, J., Krokosz, A., and Sicinska, P.,(2007). Comparison of the effect of phenol and its derivatives on protein and free radical formation in human erythrocytes (in vitro) *Blood Cell Mol. Dis.*, Vol.39, 238.
- Bukowska, B., Marczak,A.,Michałowicz,J.,and Wiśniewska,K. ,(2009). Effects of Phenol, Catechol,Chloroand Metylphenol on Human Erythrocyte Membrane (in vitro), *Polish J. of Environ. Stud.*, Vol.18, No. 4, 569–577.
- Carneiro, F.M., Bini L.M. and Rodrigues L.C., (2010). Influence of taxonomic and numerical resolution on the analysis of temporal changes in phytoplankton communities, *Ecol. Indic.*, No. 10, 249– 255.
- Carr, G. M., Chambers, P. A., and Morin, A.,(2005). Periphyton, water quality, and land use at multiple spatial scales in Alberta rivers. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, No. 62, 1309–1319.

- Caposio, P., Pessione, E., Giuffrida, G., Conti, A., Landolfo, S., Giunta, C., Gribaudo, G. Gribaudo.,(2002). Cloning and characterization of two catechol 1,2-dioxygenase genes from *Acinetobacter radioresistens* S13, Res. Microbiol. No. 30153,69–74.
- Chaillan, F., Le Fle`che, A., Bury, E., Phantavong, Y., Grimont, P., Saliot, A.,and Oudot, J.,(2004). Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms, Res. Microbiol. No.155, 587–595.
- Chapman, D.,(1996). Water Quality Assessments: A Guide to the Use of Biota, Sediments and Water, Environmental Monitoring. Second Edition. UNESCO, WHO, and UNEP. E&FN Spon, London UK.
- Chandran, P.,and Das, N.,(2012).Role of plasmid in diesel oil degradation by yeast species isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil,Environ Technol., No.33,645–652.
- Chandra, R., Yadav, S., Bharagava ,R.N., and Rai, V.,(2011). Phenol Degradation by *Paenibacillus thia- minolyticus* and *Bacillus cereus* in Axenic and Mixed Conditions, World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol.27. No.12,2939–2947.
- Chandra, S., Sharma, R., Singh, K., *et al.*,(2013). Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon, Ann Microbiol, No. 63: 417–431.
- Chang, Y. H.; Li, C. T., Chang, M. C., and Shoieh, W. K., (1998). Batch phenol degradation by *Candida tropicalis* and its fusant, Biotechnol. Bioeng, Vol.60 ,No.3, 391–395.

- Chaudhary, D.K. and Kim, J.,(2019). New insights into bioremediation strategies for oil-contaminated soil in cold environments, Int. Biodeter. Biodegr., No.142, 58–72.
- Chen, C.S., Hseu Y.C., Liang S.H., Kuo J.Y. and Chen S.C.,(2008). Assessment of genotoxicity of methyl-termbutyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene and xylene to human lymphocytes using comet assay, J. Hazard. Mater., No.153, 351–356.
- Chen,H., LI,S., WANG,S. TAN,Y. and KAN,J.,(2013), A New Catechol Biosensor Immobilized Polyphenol Oxidase by Combining Electropolymerization and Cross-Linking Process,International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, No. 62: 620–626.
- Chen,Y.P. and Lovell,C.R,(1990). Purification and Properties of Catechol 1,2-Dioxygenase *from Rhizobium leguminosarum* biovar viceae USDA 2370, Applied and Environmental Microbiology , Vol. 56, No. 6,1971–1973.
- Chen, Y.P., Glenn, A.R., and Dilworth, M.J.,(1985). Aromatic metabolism in *Rhizobium trifolii*—catechol 1,2-dioxygenase, Arch Microbiol., No.141,225–228.
- Chtourou,M., Ammar,E., Nasri,M.,and Medhioub,K.,(2004). Isolation of a yeast, *Trichosporon cutaneum* able to use low molecular weight phenolic compounds: application to olive mill waste water treatment, J. Chem. Technol. Biotechnol., No.79,869–878.

- Cimarelli, L., Singh, K.S., Mai, N.T.N., Dhar, B.C., Brandi, A., Brandi, L., and Spurio, R., (2015). Molecular Tools for the Selective Detection of Nine Diatom Species Biomarkers of Various Water Quality Levels, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, No.12, 5485–5504.
- Collins, C.H., and Lyne, P.M., Grange, J.M., Falkinham, J.O., (2004). Collins and Lyne's Microbiological Methods, eighth edition, Arnold, a member of the Hodder Headline Group, 338 Euston Road, London NW1 3BH.
- Costa, A.S., Romão, L.P.C., Araújo, B.R., Lucas, S.C.O., Maciel, S.T.A., Wisniewski, A., Jr., and Alexandre, M.D.R., (2012). Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresour. Technol.*, No.105, 31–39.
- Costantini, A. S., Gorini, G., Consonni, D., Miligi, L., Giovannetti, L., and Quinn, M., (2009). *Tumori*, 95, 8.
- Csutak, O., Stoica, I., Ghindea, R., Ana-Maria, T., and Vassu, T., (2010). Insights on yeast bioremediation processes, *Rom. Biotech. Lett.*, Vol. 15, No.2, 5066–5071.
- Daghio, M., Aulenta, F., Vaiopoulou, E., Franzetti, A., Arends, J.B.A., Sherry, A., Suárez-Suárez, A., Head, I.M., Bestetti, G., and Rabaey, K., (2017). Electrobioremediation of oil spills. *Water Res.*, No.114, 351–370.

- Daigle, F., and Leech, D., (1997). Reagentless tyrosinase enzyme electrode: effects of enzyme loading, electrolyte pH, ionic strength and temperature, *Anal. Chem.*, No. 69, 4108–4112.
- Da Silva, S.C.; Wisniewski, C.; Luccas, P.O.; De Magalhães, C.S., (2013). Enzyme from Banana (*Musa sp.*) Extraction Procedures for Sensitive Adrenaline Biosensor Construction. *American Journal of Analytical Chemistry*, 4:293–300
- Das, N., and Chandran, P., (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*, No. 66, 1–13.
- Dodds, W. K., (2002). *Freshwater Ecology: Concepts and Environmental Applications*, Academic Press, Orlando.
- Dong, T.T., and Lee, B.K., (2009). Characteristics, toxicity, and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in road dust of Ulsan, Korea, *Chemosphere*, No. 74, 1245–1253.
- Doung, T. T., Feurtet-Mazal, A., Coste, M., Dand, D. K., and Boudou, A. A., (2007) Dynamics of diatom colonization processes in some rivers influenced by urban pollution (Hanoi, Vietnam). *Ecological Indicators*, Vol. 7, No. 4, 839–851.
- Duane, R. H, Miriam, L. B., Karon, L. F, Lynn, L. H., and Clinton, K. M., (2006). Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium chromagar *Candida*, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, No. 5, 1.
- Dubey, S.K., Dubey, J., Mehra, S., Tiwari, P., and Bishwas, A.J., (2011). Potential use of cyanobacterial species in bioremediation

of industrial effluents, *Afri. J. Biotechnol.*, Vol. 10, No. 7, 1125–1132.

Duchnowicz, P., and Koter, M., (2003). Damage to the erythrocyte membrane caused by chlorophenoxyacetic herbicides, *Cell Mol. Biol. Lett.*, Vol. 8, No. 25.

Duchnowicz, P., Szczepaniak, P., and Koter, M., (2005). Erythrocyte membrane protein damage by phenoxyacetic herbicides, *Pest. Biochem. Physiol.*, Vol. 82, No. 59.

Ellis, D., Stephen, D., Helen, A., Rosemary, H. and Roben, B., (2007). *Description Of Medical Fungi. Second Edition.*

El-Serehy, H. A., Abdallah, H. S., Al-Misned, F. A., Al-Farraj, S. A. and Al-Rasheid K. A., (2018). Assessing water quality and classifying trophic status for scientifically based managing the water resources of the Lake Timsah, the lake with salinity stratification along the Suez Canal, *Saudi Journal of Biological Sciences.*, No. 25, 1247–1256.

EPA, (2002). *Toxicological Review of Phenol (CAS No. 108–95–2).* EPA635/R-02/006., U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C

Espinoza-Tofalos, A., Daghighi, M., Palma, E., Aulenta, F., and Franzetti, A., (2020). Structure and functions of hydrocarbon-degrading microbial communities in bioelectrochemical systems. *Water*, No. 12, 343.

Ettayebi, K., Errachidi, F., Jamaï, L., Tahri-Jouti, M.A., Sendide, K., and Ettayebi, M., (2003). Biodegradation of Polyphenols with

Immobilized *Candida tropicalis* under Metabolic Induction, FEMS Microbiology Letters, Vol.223, No.2,215–219.

Fan,C.,and Krishnamurthy,S.,(1995). Enzymes for Enhancing Bioremediation of Petroleum–Contaminated Soils: A Brief Review, J. Air & Waste Manage. Asso., Vol.45,453–459.

Fankhauser, A. M., Antonio, D. D., Krell, A., Alston, S. J., Banta, S., and McNeill, V. F.,(2019). Constraining the Impact of Bacteria on the Aqueous Atmospheric Chemistry of Small Organic Compounds, ACS Earth Space Chem., No.3, 1485–1491.

Fan, Q., Shan, D., Xue, H., He, Y., Cosnier, S.,(2007).Biosens. Bioelectron., No.22, 816.

Farag, S. , and Soliman, N. A. ,(2011). Biodegradation of Crude Petroleum Oil and Environmental Pollutants by *Candida tropicalis* Strain, Braz. Arch. Biol. Technol., vol.54, No.4, 821–830.

Fernandes,A., Mako's, and P., Boczkaj, G.,(2018).Treatment of bitumen post oxidative effluents by sulfate radicals based advanced oxidation processes (S–AOPs) under alkaline pH conditions, J. Clean. Prod., No. 195 , 374–384.

Fialova, A., Boschke, E.,and Bley, T.,(2004). Rapid monitoring of the biodegradation of phenollike compounds by the yeast *Candida maltosa* using BOD measurements, Int. Biodeterior. Biodegrad., No.54:69–76.

Filipowicz.N., Momotko,M., Boczkaj,G.,and Cie'slinski,H.,(2020). Determination of phenol biodegradation pathways in three

psychrotolerant yeasts, *Candida subhashii* A011, *Candida oregonensis* B021 and *Schizoblastosporion starkeyi-henricii* L012, isolated from Rucianka peatland, Enzyme and Microbial Technology., No.141, 109663.

Finkel, Z. V., C. J., Vaillancourt, A. J., Irwin, E. D., Reavie and Smol, J. P.,(2009). Environmental control of diatom community size structure varies across aquatic ecosystems, Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, No.276,1627-1634.

Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P., and *et al.*, (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications, Appl. Microbiol Biot., No.98, 4781–4794.

Fujita, Y., Mori I., Fujita,K., Kitano,S. , and Tanaka, T.,(1985). A color reaction of 1,2–diphenols based on colored complex formation with phenylfluorone and iron (III) and its application to the assay of catecholamines in pharmaceutical preparations, Chem. Pharm. Bull. , No. 33,5385–5392.

Gągol,M., Przyjazny, A., Boczkaj, G.,(2018).Wastewater treatment by means of advanced oxidation processes based on cavitation – a review, Chem. Eng. J., No.338, 599–627.

Garcia G., I., Bonilla Venceslada, J. L., Jiménez Pena, P. R. and Ramoz Gómez, E.,(1997).Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus tereus* and *Geotrichum candidum*, Wat. Res., Vol. 31 : No.8, 2005–2011.

- Garcia–Galan, C., Berenguer–Murcia, A., Fernandez–Lafuente, R.,
Rodrigues, R.C.,(2011). Potential of different enzyme
immobilization strategies to improve enzyme performance.
Adv. Synth. Catal., No. 353, 2885–2904.
- Gargouri,B., Mhiri,N., Karray,F., Aloui,F.,and Sayadi,S.,(2015). Isolation
Characterization of Hydrocarbon–Degrading Yeast Strains and
from Petroleum Contaminated Industrial Wastewater, *BioMed
Research International* Vol.12, No.25,303–661.
- Gautam,S., Arya,A.,and Vinayak,V.,(2016). Protocol to Establish Axenic
Cultures for Diatoms of Fresh Water, *IJSR*, Vol.5, No.11,410–
418.
- Gautam, S., Pandey, L.K., Vinayak, V.,and Arya, A.,(2017).
Morphological and physiological alterations in the diatom
Gomphonema pseudoaugur due to heavy metal
stress, *Ecological Indicators*, No.72,67–76.
- Gelin, A., V. Gravez and G.J. Edgar,(2003). Assessment of Jessica oil
spill impacts on intertidal invertebrate communities, *Mar. Pollut.
Bull.*, 46, 1377–1384.
- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta ,T.K. and Ahn, Y.,(2016). Current State of
Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic
Hydrocarbons (PAHs)": A Review. *Front. Microbiol.* 7:1369.
- Giedraityte,G.,and Kaledien e, L.,(2009).Catechol, 1,2–dioxygenase from
 α -naphthol degrading thermophilic *Geobacillus* sp. strain:
purification and properties, *Open Life Sci.* 4.
<https://doi.org/10.2478/s11535-008-0049-y>.

- Godjevargova,T., Ivanova,D., Aleksieva,Z.,and Burdelova,G.,(2006).
Biodegradation of phenol by immobilized *Trichosporon cutaneum*
R57 on modified polymer membranes, Process Biochemistry,
No.41,2342–2346.
- Goldhahn,C., Taut,J.A., Schubert,M., Burgert,I.,and Chanana,M.,(2020).
Enzyme immobilization inside the porous wood structure: a
natural scaffold for continuous–flow biocatalysis, Royal Society
of Chemistry., No. 10, 20608–20619.
- Gomes,A.R., Cabana,A.L., Osório,L.G., Santin,R., Schuch,I.D.,
Serra,E.F., Nascente,P.S.,and Meireles,M.C.A.,(2014). First
isolation of the *Stephanoascus ciferrii* in feline otitis in Brazil,
Brazilian Journal of Microbiology, Vol.45, No.3,1101–1103.
- Guillard, R. R. L. and Lorenzen, C. J.,(1972).Yellow–Green algae With
ChlorophyllideC” J. Phycol., Vol. 8, No. 10.
- Guzik, U.,Hupert–Kocurek, K.,Wojcieszynska, D.,(2014). Immobilization
as a Strategy for Improving Enzyme Properties– Application to
Oxidoreductases, Molecules, No.19, 8995–9018.
- Ha, J. F., Italiano, C. M., Heath, C. H., Shih, S., Rea, S., and Wood, F.
,(2011). Candidemia and invasive candidiasis: a review of the
literature for the burns surgeon. Burns., Vol 37, No.2,181–95.
- Hassan,F.M.,and Shaawiat,A.O.,(2015). Application Of Diatomic Indices
In Lotic Ecosystem, Iraq, G.J.B.B.,Vol.4 , No.4, 381 – 388.
- Hassan, F.H., Salman, J.M. and Abdulameer, S.H.,(2014). Seasonal
variation of environmental properties and phytoplankton
community in Al– Hussainya river, Holly Karbala– Iraq.
mesopotamia environmental journal, Vol.1, No.1,56–82.

- Hassanshahian, M., Tebyanian, H., and Cappello, S.,(2012).Isolation and characterization of two crude oil–degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG–20 and PG–32, from the Persian Gulf, *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 64, No. 7, 1386–1391.
- Herold, M., Greskowiak, J., Ptak, T.,Prommer, H.,(2011) isolation of the *Stephanoascus ciferrii* in feline otitis in Brazil. *J. Contam. Hydrol.*, No.119, 99.
- Hildebrand, M., Lerch, S.J.L.,and Shrestha, R.P.,(2018). Understanding diatom cell wall silicification–moving forward. *FrontMar.Sci.*, No.5,125.
- Hinton, G.C.E.,and Maulood, B.K.,(1980). Some Diatoms from Brackish Water Habitats In Southern Iraq. *Nova Hedwigia*, No. 33, 487–497.
- Hlubikova,D., Luis,A.T.,Vache,V., Ector,L., Hoffmann,L., and Choquet, P.,(2012). Optimization of the replica molding., *J. Micromech. Microeng.*, No. 22 , 115019 (11pp).
- Hoffmann, E. H., Tilgner, A., Wolke, R., Böge, O., Walter, A., and Herrmann, H.,(2018). Oxidation of substituted aromatic hydrocarbons in the tropospheric aqueous phase: kinetic mechanism development and modelling, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, No.20, 10960–10977.
- Holmes,N.T.H., Newman,J.R., Chadd,S., Rouen,K.J., Saint,L.,and Dawson,F.H.,(1999). Mean Trophic Rank: A User’s Manual, Environment Agency. Rio House ,Bristol BS32 4UD.

- Hong, Y. W., Yuan, D. X., Lin, Q. M., and Yang, T. L., (2008). Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the algae enriched from a mangrove aquatic ecosystem, *Mar. Pollut. Bull.*, No.56, 1400–1405.
- Hori, T.S.F., Avilez, I.M., Iwama, G.K., Johnson, S.C., Moraes, and G., Alfonso, L.O.B., (2008). Impairment of the stress response in matrinxa juveniles (*Brycon amazonicus*) exposed to low concentrations of phenol, *Comp. Biochem. Physiol.*, Part C **147**, 416.
- Hua, L., Sun, Z.H., Leng, Y., (2005). Continuous biocatalytic resolution of DLpantolactone by cross-linked cells in membrane bioreactor, *Process Biochem.*, No.40, 1137–42.
- Hupert–Kocurek, K.; Guzik, U.; Wojcieszynska, D., (2012). Characterization of catechol 2,3-dioxygenase from *Planococcus* sp. strain S5 induced by high phenol concentration. *Acta Microbiol Pol.*, Vol. 59, No. 3, 345–351.
- Jaber, S., Lallement, A., Sancelme, M., Leremboure, M., Mailhot, G., Ervens, B., Delort, A.M., (2020). Biodegradation of phenol and catechol in cloud water: comparison to chemical oxidation in the atmospheric multiphase system, *Atmos. Chem. Phys.*, No. 20, 4987–4997.
- Jafari, N .G., and Gunale, V. R., (2006). Hydrobiological Study of Algae of an Urban Freshwater River, *J. Appl. Sci. Environ.*, Vol.10, No. 2, 153 – 158.
- Jain, P.K., Gupta, V.K., Pathak, H., Lowry, M., and Jaroli, D.P., (2010). Characterization of 2T engine oil degrading indigenous bacteria,

collected from high altitude Mussoorie region of India. World Journal of Microbiology and Biotechnology, No.26: 1419–1426.

Jiang, Y., Wen, J.P., Li, H.M., Yang, S.L., and Hu, Z.D., (2005). The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*, Biochem. Eng. J., Vol. 24, No.3, 243–7.

Juarez–Ramirez, C., Riuz–Ordaz, N., Cristiani–Urbina, E., Galindez–Mayer, J., (2001). Degradation kinetics of phenol by immobilized cells of *Candida tropicalis* in a fluidized bed reactor, World J. Microbiol. Biotechnol. , No.17, 697–705.

Karimi, M., and Hassanshahian, M., (2016). Isolation and characterization of phenol degrading yeasts from wastewater in the coking plant of Zarand, Kerman, Brazilian J. Microbiol., No.47 , 18–24.

Kelly, M. G., and Whitton, B. A. , (1995). The trophic Diatom Index: a new index for monitoring eutrophication in rivers, Journal of Applied Phycology, No.7, 433–444.

Kelly, M.G., Cazaubon, A., Coring, E., Dell’Uomo, A., Ector, L., Goldsmith, B., Guasch, H., Hürlimann, J., Jarlman, A., Kawecka, B., *et al.*, (1998). Recommendations for the routine sampling of diatoms for water quality assessments in Europe, J. Appl. Phycol., 10, 215–224.

Kidd, S., Halliday, C., Alexiou, H., and Ellis, D., (2016). Description Of Medical Fungi, Unive. of Adelaide., 3rd.ed. Australia

Komarkova, E., Paca, J., Klapkova, E., Stiborova, M., Soccol, C. R., Sobotka, M., (2003). Physiological changes of *Candida*

tropicalis population degrading phenol in fed batch reactor.

Brazilian Archives of Biology and Technology, No. **46**, 537–542.

Koshlaf, E., Ball, A. S., (2017). Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments, AIMS Microbiology, Vol. 3, No.1, 25–49.

Kuntiya, A., Takenaka, S., Seesuriyachan, P., (2013). High potential of thermotolerant *Candida tropicalis* no. 10 for high concentration of phenol biodegradation, Food Appl. Biosci. J., No.1, 59–68.

Krastanov, A., Alexieva, Z., Yemendzhiev, H., (2013). Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives, Eng. Life Sci., Vol. 13, 76–87,

Krug, M., Ziegler, H., and Straube, G., (1985a). Degradation of phenolic compounds by the yeast *Candida tropicalis* HP 15. I. Physiology of growth and substrate utilization, J. Basic. Microbiol., Vol. 25, No.2, 103–110.

Krug, M., Ziegler, H., and Straube, G., (1985b). Degradation of phenolic compounds by the yeast *Candida tropicalis* HP 15. II. Some properties of the first two enzymes of the degradation pathway, J. Basic. Microbiol., Vol. 25, No.2, 271–281.

Kumari, M., and Abraham, J., (2011). Biodegradation of diesel oil using yeast *Rhodospiridium toruloides*, Research Journal of Environmental Toxicology., No.5, 369–377.

Kumar, A., and Kumar, S., (2005). Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194, Biochem. Eng. J., No.3 **22**, 151–159.

- Kumar,S., Neeraj, Mishra,V.K., Karn,S.K.,(2018). Biodegradation of phenol by free and immobilized *Candida tropicalis* NPD1401, Vol. 17, No.3, 57–64.
- Lallement, A., Besaury, L., Tixier, E., Sancelme, M., Amato, P., Vinatier, V., Canet, I., Polyakova, O. V., Artaev, V. B., Lebedev, A. T., Deguillaume, L., Mailhot, G., and Delort, A.–M.,(2018). Potential for phenol biodegradation in cloud waters, Biogeosciences, No. 15,5733–5744.
- Lee,H., Park, U.C.,and Kim, S.W.,(2012). Immobilization of glucose oxidase onto cobalt based on silica core/shell nanoparticles as carrier, Process Biochem., No.47 ,1282–1286.
- Lei, Z.; Bi, S. and Yang, H., (2007). Chitosan–tethered the silica particle from a layer–by–layer approach for pectinase immobilization. Food Chem., Vol. 104, 577–584.
- Lewis, C., Pook, C. and Galloway, T.,(2008). Reproductive toxicity of the Water Accommodated Fraction (WAF) of crude oil in the polychaetes *Arenicola marina* (L.) and *Nereis virens* (Sars), Aquat. Toxicol., No. 90, 73–81.
- Li, Y.,and Li, B.,(2011). Study on fungi–bacteria consortium bioremediation of petroleum contaminated mangrove sediments amended with mixed biosurfactants,Adv. Mat. Res., No.183,1163– 1167.
- Lika K, Papadakis, I.A.,(2009). Modeling the biodegradation of phenolic compounds by microalgae, J. Sea Res. Vol.62,135–146.

- Lim ,G.W., Lim ,J.K.,Ahmad ,A.L., and Chan ,D.J.C.,(2015). Influences of diatom frustule morphologies on protein adsorption behavior, J. Appl. Phycol. Vol.27, 763–775.
- Liu, H., Yu, Q.J., . Wang, G., Ye, F.,and Cong, Y., (2011). Biodegradation of phenol at high concentration by a novel yeast *Trichosporon montevidense* PHE1, Process Biochem, No.46,1678– 1681.
- Liu, P.W.G., Chang, T.C., Chen, C.H., *et al*, (2014). Bioaugmentation efficiency investigation on soil organic matters and microbial community shift of diesel–contaminated soils, Int Biodeter Biodegr, No.95, 276–284.
- Long,Y., Yang, S., Xie, Z.,and Cheng, L.,(2016).Cloning, expression, and characterization of catechol 1,2–dioxygenase from a phenol– degrading *Candida tropicalis* JH8 strain, Prep. Biochem. Biotechnol. No.46 , 673–678,.
- Luckarift, H.R., Spain, J.C., Naik, R.R.,and. Stone, M.O.,(2004). Enzyme immobilization in a biomimetic silica support, Nat. Biotechnol. No.22, 211–213.
- Margesin,R., Fonteyne, P. A.,and Redl, B.,(2005). Low–temperature biodegradation of high amounts of phenol by *Rhodococcus* spp. and basidiomycetous yeasts, Res. Microbiol. No.156,68–75,
- Margesin,R., Gander, S., Zacke, G., Gounot, A.M., Schinner, F., (2003).Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold– adapted bacteria and yeasts, Extremophiles. No. 7,451–458.

- Marhoon,K.A., Hussain,E.M., Abed,S.A., Ewaid,S.H., Salim,M.A.,and Al-Ansari,N.,(2020). Assessment of the trophic status at Al-Sabil River using the trophic indices in Al-Shinafiya district, Southern Iraq, Eurasia J. Biosci., No.14, 5661–5667.
- Martin, A., Borja, R., Chica, A.,(1993). Kinetic Study of an Anaerobic Fluidized Bed Sys- tem Used for the Purification of Fermented Olive Mill Wastewater, Journal of Chemi- cal Technology and Biotechnology, Vol.56 ,No.2, 155–162.
- Martín,G.,and Fernández,M.R.,(2012). Diatoms as Indicators of Water Sampling, Analysis and Some :Quality and Ecological Status Ecological Remarks, Ecological Water Quality – Water Treatment and Reuse, No.9,184–209.
- Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fernandez–Lorente, G.; Guisan, J.M.; Fernandez–Lafuente, R., (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Enzyme Microb. Technol., No.40, 1451–1463.
- Mazumder N., Gogoi A., Buragohain A. K., Ahmed,G.,and Choudhury,A.,(2014). Structural and optical characterization of fresh water diatoms (*Cyclotella* sp.): nature's nanoporous silica manufacturing plant, Proc. of SPIE Vol.32, 8996– 89960.
- Meckenstock, R.U., Boll, M.; Mouttaki, H., Koelschbach, J.S.,Tarouco, P.C., Weyrauch, P., and Himmelberg, A.M.,(2016). Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons, J.Mol. Microbiol. Biotechnol., No.26, 92–118.

- Medarević,D.P., Lošić,D.,and Ibrić,S.R.,(2016). Diatoms – nature materials with great potential for bioapplications, Hem. ind. No. 70, Vol. 6, 613–627.
- Menale,C., Nicolucci, C., Catapane, M., Rossic, S., . Bencivenga, U., Mita, D.G., and Diano, N.,(2012).Optimization of operational conditions for biodegradation of chlorophenols by laccase–polyacrilonitrile beads system, J. Mol. Catal. B: Enzym., No. 78 ,38–44.
- Michalowicz,J.,and Duda, W.,(2007). Phenols – sources and toxicity, Pol. J. Environ. Stud. ,No.16, 347–362.
- Michalowicz, J., Bukowska, B., Duda, W.,(2008). The differences in phenolic content in rivers exposed and none posed to anthropogenic contamination, Chemosphere, Vol.71, No.735,.
- Middelhoven, W. J.,(1993). Catabolism of benzene compounds by ascomycetous and basidiomycetous yeast and yeast like fungi, Antonie van Leeuwenhoek, 63, 125–144.
- Militon, C., Boucher, D., Vachelard, C., *et al.*,(2010). Bacterial community changes during bioremediation of aliphatic hydrocarbon–contaminated soil, Fems Microbiol, Ecol, No. 74,669–681.
- Minteer,S.D.,(2017). Enzyme Stabilization and Immobilization, Methods and Protocols Second Edition, Departments of Chemistry and Department of Materials Science and Engineering University of Utah, Salt Lake City, UT, USA.
- Miranda,R.C., de Souza,C.S., Gomes,E.B., Lovaglio,R.B., Lopes,C.E.,and Sousa,M.F.,(2010). Biodegradation of Diesel Oil by Yeasts Isolated from the Vicinity of Suape Port in the State of

Pernambuco –Brazil, Brazilian Archives of Biology and Technology, Vol.50, No.1 ,147–152.

Mishamandani,S., Gutierrez,T., Berry,D., Aitken,M.D.,(2016). Response of the bacterial community associated with a cosmopolitan marine diatom to crude oil shows a preference for the biodegradation of aromatic hydrocarbons, Environmental Microbiology, Vol.18, No.6,1462–2920.12988.

Monteiro, A. A. M. G, Boaventura, R. A. R.,and Rodrigues, A .E.,(2000). Phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* DMS 548 in a batch reactor. Biochem. Eng. J., No.6, 45–49.

Moris, D.V., Melhem, M.S.,Martins, M. A., and Mendes, R.,(2008). Oral *Candida spp.*, colonization in human immunodeficiency virus–infection individuals, J. Venom. Anim. Toxins. Inf. Trop. Dis., No.14,1678–1999.

Munoz, R., Guieysse, B., and Mattiasson, B.,(2003). Phenanthrene biodegradation by an algal–bacterial consortium in two–phase partitioning bioreactors. Appl. Microbiol. Biotechnol. , No.61, 261–267.

Nakanishi, Y.,Murakami,S., Shinke,R.,and Aoki,K.,(1991).Induction, Purification, and Characterization of Catechol 2,3–Dioxygenase from Aniline–assimilating *Pseudomonas* sp. FK–8–2t, Agric. Biol.Chem., Vol. 55 , No.5, 1281–1289.

Narro, M. L., Cerniglia, C. E., Van Baalen, C., and Gibson, D. T.,(1992). Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR–6, Appl. Environ. Microbiol., No.58, 1351–1359.

- Neujahr, H. Y., Lindslo, S. and Varga, J. M., (1974). Oxidation of phenols by cells and cell-free enzymes from *Candida tropicalis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, No.40, 209–216.
- Neville, F., Broderick, M.J.F., Gibson, T., and Millner, P.A., (2011). Fabrication and activity of silicate nanoparticles and nanosilicate- entrapped enzymes using polyethyleneimine as a biomimetic polymer, *Langmuir*, No. 27 ,279–285.
- Ng, N. L., Kroll, J. H., Chan, A. W. H., Chhabra, P. S., Flagan, R. C., and Seinfeld, J. H., (2007). Secondary organic aerosol formation from *m*-xylene, toluene, and benzene, *Atmos. Chem. Phys.*, No.7, 3909–3922.
- Nyer, E. K., (1998). *Groundwater and Spetroleum Remediation: Pratical Methods and Strategies*, Ann. Arbor. Press, Ann Arbor, Mich, USA.
- Olajire A.A., and Essien, J.P., (2014). Aerobic Degradation of Petroleum Components by Microbial Consortia, *J. Pet. Environ. Biotechno.*, Vol 5 • No. 5 , 1000195 – 1000195.
- Onwurah, I., Ogugua, V., Onyike, N., and *et al.* , (2007). Crude oil spills in the environment, effects and some innovative clean-up biotechnologies, *Quim. Nova*, Vol. 8, No. 3, 1047–1052.
- Ortega, N., Perez-Mateos, M., Pilar, M.C., and Busto, M.D., (2009). Neutrase immobilization on alginate-glutaraldehyde beads by covalent attachment, *J. Agric. Food Chem.*, No. 57 ,109–115.

- Ou, S., Zheng, J., Zheng, J., and *et al.*, (2004). Petroleum hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in the surficial sediments of Xiamen Harbour and Yuan Dan Lake, China, *Chemosphere*. Vol. 56, 107–112.
- Páca, J., Komárkova, E., Prell, A., Stiborová M., Soborová, M., (2002). Kinetics of phenol oxidation by *Candida tropicalis*: effects of oxygen supply rate and nutrients on phenol inhibition, *Folia Microbiol.*, No.47, 701–708.
- Paisio, C.E., Oller, A.L.W., Ibanez, S.G., Talano, M.A., Gonzalez, P.S., Medina, M.I., Agostini, E., in: J.B. Velazques–Fernandes, S. Muniz–Hernandes (Eds.) (2014). Bioremediation as a useful biotechnological strategy for the treatment of phenolics: advances, challenges and future prospects, Nova Science Publishers, New York, pp. 57–79.
- Palmer, C.M., (1969). A composite rating of algae tolerating organic pollution., *J. Phycology*, No. 5, 78–82.
- Palmer, C.M., (1980). *Algae and water pollution*, Castle House Publications Ltd., 110 p.
- Paniagua–Michel, J., and Rosales, A., (2020). Marine Bioremediation – A Sustainable Biotechnology of Petroleum Hydrocarbons Biodegradation in Coastal and Marine Environments, *Journal of Biotechnology and Phytochemistry*, Vol. 4, No.1, 115–121.
- Paruk JD, Adams EM, Uher–Koch H, *et al.* (2016) Polycyclic aromatic hydrocarbons in blood related to lower body mass in common loons, *Sci. Total Environ.*, Vol. 565, 360–368.

- Passy, S. I.,(2007). Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters. *Aquatic Botany*, No.86, 171-178.
- Patel, J. G., Nirmal Kumar, J. I., Kumar, R. N., and Khan, S. R.,(2017). Biodegradation capability and enzymatic variation of potentially hazardous polycyclic aromatic hydrocarbons—anthracene and pyrene by *Anabaena fertilissima*, *Polycycl. Aromat. Compd.*, No.36, 72–87.
- Patel, R.,and Rajkumar,S.,(2009). Isolation and characterization of phenol degrading yeast, *J. Basic Microbiol.*, No. 49 , 216–219.
- Patrick, R., and Reimer, C.W.,(1975). *The Diatom of the United States*, , Philadelphia, Monograph, Vol. 2, Part 1No. 13, 213.
- Pazarlioglu, N.,and Telefoncu, A.,(2005). Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized on activated pumice particles, *Process Biochem.*, No.40,1807–14.
- Pradeep,N. V., Anupama, S., . Navya, K., Shalini, H.N., Idris M.,and Hampannavar U.S.,(2015).Biological removal of phenol from wastewaters: a mini review, *Appl. Water Sci.*, No. 5, 105–112.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A.,(2002). *Petroleum hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in the surficial sediments Microbiology*. 5th ed. pp 1014, McGraw–Hill, New York;.
- Perelo, L.W .,(2010). Review: in situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments, *J. Hazard Mater.*, No. 177,81–89.

- Peterson, C.H.,(2001). The Exxon Valdez oil spill in Alaska: Acute, indirect and chronic effects on the ecosystem. *Adv. Mar. Biol.*, Vol. 39, 1–103.
- Peixoto , R. S., Vermelho, A. B., and Rosad , A. S.,(2011). Petroleum–Degrading Enzymes: Bioremediation and New Prospects, Access to Research, Enzyme Research, Article ID 475193, 7 pages.
- Pillar, E. A., Camm, R. C., and Guzman, M. I.,(2014).Catechol Oxidation by Ozone and Hydroxyl Radicals at the Air– Water Interface, *Environ. Sci. Technol.*, No.48, 14352–14360.
- Pincus,D.H.,(2020). Microbial Identification Using The BIOMÉRIEUX VITEK® 2 System, bioMérieux, Inc. Hazelwood, MO, USA.
- Pinzon–Martinez, D.L., Rodriguez–Gomez, C., MinanaGalbis, D., Carrillo–Chavez, J.A., Valerio–Alfaro, G.,Oliart–Ros, R.,(2010). Thermophilic bacteria from Mexican thermal environments: isolation and potential applications, *Environ. Technol.* No.31, 957–966.
- Poulsen, N.,and Kröger, N.,(2004). Silica morphogenesis by alternative processing of silaffins in the diatom *Thalassiosira pseudonana*, *J. Biol. Chem.*, No.279:42993–42999.
- Poulsen, N. , Berne, C. , Spain, J. , and Kröger, N.,(2007). Silica immobilization of an enzyme through genetic engineering of the diatom *Thalassiosira pseudonana*,” *Ang. Chem. Int .*, ed. 46,1843–1846.

- Rakowska,B.and Szczepocka,E.,(2011).Demonstration of the Bzura River restoration using diatom indices., *Biologia .*, Vol. 66, No.3, 411– 417.
- Ramakrishnan, N.,(2003). Bio–Monitoring Approaches For Water Quality Assessment In Two Water bodies At Tiruvannamalai, Tamil Nadu India. in Martin J. Bunch, V. Madha Suresh and T. Vasantha Kumaran, eds., *Proceedings of the Third International Conference on Environment and Health*, Chennai, India, 15–17
- Ramirez,E.E., Gonzalez,M.A., Cifuentes,A.S., Inostroza,I.,and urrutia.R.E.,(2015). Culture and growth of two benthic diatoms species isolated from the Salar del Huasco (North of Chile, 20° C) at different conditions of temperature, light and nutrient, *Gayana Bot.*, Vol.72, No.2,165–176.
- Rigo, M., and Alegre, R. M.,(2004). Isolation and selection of phenol–degrading microorganisms from industrial wastewater and kinetics of the biodegradation, *Folia Microbiol.*, No.49, 41–45.
- Rigo,M., Alegre,R.M., Bezerra,J.M.V., Coelho,N.,and Bastos,R.G.,(2010). Catechol Biodegradation kinetics Using *Candida parapsilopsis*, *Braz. Arch. Biol. Technol.* , Vol. 53, No..2,481–486.
- Rimet,F., Padisak, J., Cantonati,M.,and etal.,(2012). Diatoms: an ecoregional indicator of nutrients, organic matter and micropollutants pollution, PhD thesis, University of Grenoble, France.
- Rizzo,P., Malerba,M., Bucci,A., Sanangelantoni,A.M., Remelli,S.,and Celico,F.,(2020). Potential Enhancement of the *In–Situ*

Bioremediation of Contaminated Sites through the Isolation and Screening of Bacterial Strains in Natural Hydrocarbon Springs, Water, No.12, 2090.

Rodrigues,R.C., Berenguer–Murcia, A.,and Fernandez–Lafuente, R., (2011). Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes, Adv. Synth. Catal., No.353 ,2216 –2238.

Salman, J.M., Jawad H. J. J., Nassar, A. J. and Hassan, F.M.,(2013). A study of phytoplankton communities and related environmental factors in Euphrates river (between two cities: Al–Musayyab and Hindiya), Iraq.Journal of Environmental protection, No.4,1071–1079.

Santos, H. F., Carmo, F. L., Paes, J. E., Rosado, A. S., and Peixoto, R. S.,(2011). Bioremediation of mangroves impacted by petroleum, Water, Air, and Soil Pollution, Vol.216, No.1–4, pp. 329–350.

Santos, V.L., Heilbuth, N.M.,and Linardi, V.R.,(2001). Degradation of phenol by cells of *Trichosporon sp* immobilized in alginate. J. Basic Microbiol., No.41,171–8.

Schweigert, N., Alexader, J., Zehnder, J.,(2001). Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells from microorganisms to mammals, Environ. Microbiol. Vol. 3, No.81.

Semple,K.T., Cain.R.B., and Schmidt,S.,(1999). MiniReview: Biodegradation of aromatic compounds by microalgae, FEMS Microbiology Letters , No.170 , 291–300.

Sheppard,V.C., Scheffel,A., Poulsen,N.,and Kröger,N.,(2012). Live Diatom Silica Immobilization of Multimeric and

Redox-Active Enzymes, Appl. Environ. Microbiol., Vol.78,
.No.1,211-218.

Sheppard, V., Poulsen, N.,and Kröger, N.,(2010). Characterization of an endoplasmic reticulum-associated silaffin kinase from the diatom *Thalassiosira pseudonana*. Journal of Biological Chemistry, Vol. 285, No. 2,1166-1176.

Silva,A.S., Andreazza,R., Jacques,R.J.S.,and Bento,F.M.,(2012).
Enzymatic Activity Of Catechol 1,2-Dioxygenase And Catechol
2,3-Dioxygenase Produced By *Gordonia polyisoprenivorans*,
Quim. Nova, Vol. 35, No. 8, 1587-1592.

Singh, H.,(2006). Mycoremediation: Fungal Bioremediation, Wiley
Interscience, New York, NY, USA.

Singh, G., Bhalla, A., Kaur, P., Capalash, N.,and Sharma, P.,
(2011).Laccase from prokaryotes: A new source for an old
enzyme. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, No.10, 309-326.

Singh., and Chandra,S.,(2014). Treatment Of Petroleum Hydrocarbon
Polluted Environment Through Bioremediation: A Review,
Pakistan Journal of Biological Sciences , Vol.17, No.1,1-8.

Sinigaglia, M., Di Benedetto, N., Bevilacqua, A., Corbo, M.R., Capece,
A., Romano, P.,(2010). Yeasts Isolated from Olive Mill
Wastewaters from Southern Italy: Technological Characteri-
zation and Potential Use for Phenol Removal, Applied
Microbiology and Biotechnol ogy, Vol. 87, No.6, 2345-2354.

Sivasubramanian,S., Namasivayam ,S.K.R.,(2014). Optimization of
Parameters for Phenol Degradation using Immobilized *Candida*

Tropicalis SSK01 in Batch Reactor, J. Environ. Biol., No. 35,531–536.

Soni,H.B. and Thomas,S.,(2014). Associative Dependence Among Plankton and Macrophytes As Pollution Markers at Tropical Lentic Environ, Gujarat, India., International Journal of Environment, Vol. 3, No.2,175–191.

Souza, E.C., Vessoni–Penna, T.C., and de Souza Oliveira, R.P., (2014).Biosurfactant–enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview,Int. Biodeter. Biodegr., No.89, 88–94.

Stiborova,M., Sucha,V. Miksanova,M., Paca,J.R.,and Paca.J.,(2003). Hydroxylation of Phenol to Catechol by *Candida tropicalis*: Involvement of Cytochrome P450, Gen. Physiol. Biophys., No.22,167–179.

Stroud, J.L., Paton, G.I., and Semple, K.T.,(2007). Microbe–aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation, J. Appl. Microbiol., No.102, 1239–1253.

Suphan, S., Peerapornpisal, Y. and Underwood, G. J. C.,(2012). Benthic diatoms of Mekong River and its tributaries in northern and northeastern Thailand and their applications to water quality monitoring. Maejo Int. J. Sci. Technol., Vol. 6, No.1, 28–46.

Sutherland, T. D. , Horne, I. , Weir, K. M., *et al.*,(2004). Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, Vol.31, No. 11, pp. 817–821.

- Taccari, M., and Ciani, M., (2011). Use of *Pichia fermentans* and *Candida* Treatment of Stored Olive Mill sp. Strains for The Biological Wastewater. *Biotechnology Letters*, Vol.33 , No.12, 2385–2390.
- Tan, X., Zhang, Q., Burford, M.A., Sheldon, F., and Bunn, S.E., (2017). Benthic Diatom Based Indices for Water Quality Assessment in Two Subtropical Streams, *Frontiers in Microbiology*, Vol. 8, 601.
- Tanase, A.-M., . Ionescu, R., Chiciudean, I., Vassu, T., and Stoica, I., (2013). Characterization of hydrocarbon-degrading bacterial strains isolated from oil-polluted soil, *International Biodeterioration & Biodegradation*, Vol. 84, 150–154,.
- Tao, Y., Fishman, A., Bentley, W.E., and Wood, T.K., (2004). Oxidation of Benzene to Phenol, Catechol, and, 1,2,3-Trihydroxybenzene by Toluene 4-Monooxygenase of *Pseudomonas mendocina* KR1 and Toluene 3-Monooxygenase of *Ralstonia pickettii* PKO1, *APP. AND ENVIRO. MICROB.*, Vol.70, No.7, 3814–382.
- Thapa, S., Shrestha, R., Tibrewal, A., Sharma, A., and Yuvraj, K.C., (2015). Isolation of Yeast from Soil and Different Food Samples and Its Characterization Based on Fermentation, *Nepal Journal of Biotechnology*. , Vol. 3, No. 1, 29–34.
- Torrise, M., Scuri, S., Dell’Uomo, A. and Cocchioni, M. , (2010). Comparative monitoring by means of diatoms, macro invertebrates and chemical parameters of an Apennine watercourse of central Italy, The river Tenna, *Ecological Indicators*, No.10: 910–913.
- Torres, M.A., M.P. Barros, S.C.G. Campos, E. Pinto, S. Rajamam, R.T. Sayre and P. Colepicolo, (2008). Biochemical biomarkers in algae

and marine pollution: A review, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*,
No.71,1–15.

TOXNET, Toxicology Data Network,(2019.TOXNET), Toxicol. Data Net.,
available at: <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/hsdb>.

Tsai, S.C., Tsai ,L.D. , and Li, Y. K.,(2005). An Isolated *Candida albicans* TL3 Capable of Degrading Phenol at Large Concentration, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol.69, No..12, 2358–2367.

Tsai,S.C., Li,Y.K.,(2007). PuriWcation and characterization of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Candida albicans* TL3, *Arch Microbiol*, No. 187 ,199–206.

Tsioulpas, D., Dimou, D., Iconomou, D., and Aggelis, G.,(2002).Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity, *Bioresour. Technol.*, No.84,251–7.

Ueno, R., Wada, S., and Urano, N.,(2008). Repeated batch cultivation of the hydrocarbon-degrading, micro-algal strain *Prototheca zopfii* RND16 immobilized in polyurethane foam, *Can. J. Microbiol.*, No.54,66–70.

Uzoigwe, C.I.,and Okpokwasili, G.C.,(2012). Biodegradation of oil spill dispersants in natural aquatic ecosystem. *International Journal of Physical Sciences* ,No.7, 5477–5484.

Van Hamme, J. D., Singh, A., and Ward, O. P.,(2003). Recent advances in petroleum microbiology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 67, No.4, 503–549,.

- Varjani, S.J.,(2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. Bioresour, Technol., No.223, 277–286.
- Varjani, S.J.,and Upasani, V.N.,(2016). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. Bioresour. Technol, No.222, 195–201.
- Ventikos, N.P., Vergetis, E.O., Psaraftis, H.N., and Triantafyllou, G.,(2004). A high–level synthesis of oil spill response equipment and countermeasures, Journal of Hazardous Materials, No.107, 51–58.
- Vinayak, V., Gordon, R., Gautam, S., Rai, A.,(2014). Discovery of a diatom that oozes oil. Adv. Sci. Lett., No. 20, 1256–1267.
- Wang,G., Xu, J.J., Ye, L.H., Zhu, J.J., and Chen, H.Y.,(2002).Highly sensitive sensors based on the immobilization of tyrosinase in chitosan, Bio electrochemistry, No.57,33–38.
- Wang ,Y. , Zhang, D. , Pan, J. , and Cai, J.,(2012). Key factors influencing the optical detection of biomolecules by their evaporative assembly on diatom frustules, J. Mater. Sci., Vol.47, 6315–6325.
- Wentzel, A., Ellingsen, T.E., Kotlar, H.K., *et al.*,(2007). Bacterial metabolism of long–chain n–alkanes, Appl.Microbiol .Biot ., No.76, 1209–1221.
- Wei–hua, G., Dong–cai, H.E., Tian–yu, .L., Nan, L. and Ling – Ling, D., (2008). Algal community composition and abundance near the confluence of the Jialing and Yangtze Rivers in Shuanglong Lake in Chongqing, P. R. China .Journal of Chongqing university, Vol.7, No.4,247 – 253.

- Werner, I., Clark, S., and Hinton, D.E., (2003). Biomarker and understanding of aquatic organism responses to environmental stressors. *California Agriculture*, Vol. 57, No.4, 110–115.
- Wojcieszńska, D., Hupert-Kocurek, K., Jankowska, A., and Guzik, U. (2012). Properties of catechol 2,3-dioxygenase from crude extract of *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 immobilized in calcium alginate hydrogels. *Biochem. Eng. J.*, No.66, 1–7.
- Wojcieszńska, D., Hupert-Kocurek, K., and Guzik, U., (2013). Influence of the entrapment of catechol 2,3-dioxygenase in κ -carrageenan on its properties. *Pol. J. Environ. Stud.*, No.22, 1219–1225.
- Wu, Q., Xu, Z., Duan, Y., Zhu, Y., Ou, M., and Xu, X., (2017). Immobilization of tyrosinase on polyacrylonitrile beads: biodegradation of phenol from aqueous solution and the relevant cytotoxicity assessment, *RSC Adv.*, 2017, 7, 28114–28123.
- Xu D., Ballou, D. P., Massey, V., (2001). Studies of the mechanism of phenol hydroxylase: mutants Tyr289Phe, Asp54Asn, and Arg281Met. *Biochemistry*, No.40, 12369–12378.
- Xu, C., and Wang, L., (2013). Atmospheric Oxidation Mechanism of Phenol Initiated by OH Radical, *J. Phys. Chem. A*, No.117, 2358–2364.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., and Golyshin, P.N., (2007). Obligate oil-degrading marine bacteria, *Current Opinion in Biotechnology*, No. 18, 257–266.
- Yan, J., Jianping, W., Hongmei, L., Suliang, Y., and Zongding H., (2005). The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*, *Biochem. Eng. J.*, No.24, 243–247.

- Yang, J., Yu, X., Liu, L., Zhang, W. and Guo P.,(2012). Algae community and trophic state of subtropical reservoirs in southeast Fujian, China. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, No.19,1432–1442.
- Yard ,O.,(2011). Effects Of Oil Pollution On The Marine Environment – Technical Information Paper, ITOPF Ltd. Produced by Impact PR & Design Limited, Canterbury, UK. No.13,1–11.
- Yigitoglu,M.,and Temocin,Z.,(2010). Immobilization of *Candida rugosa* lipase on glutaraldehyde–activated polyester fiber and its application for hydrolysis of some vegetable oils, *J. of Mole. Cata.*No. 66 , 130–135.
- Yuan,R., Jiang, M., Gao, S., Wang, Z., Wang, H., Boczkaj, G., Liu, Z., . Ma, J., Li, Z.,(2020). 3D mesoporous A–Co(OH)₂ nanosheets electrodeposited on nickel foam: a new generation of macroscopic cobalt–based hybrid for peroxymonosulfate activation, *Chem. Eng. J.*, No.380 ,1–11,
- Yoshida, M., H. Michel, L. A. Sazanov, S. Yoshikawa and J. Barber *et al.*,(2006). Mitchell medal lecture. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Bioenergetics*, No.1757, 1–551.
- Yotova, L., Tzibranska, I., Tileva, F., Markx, G.H.,and Georgieva, N., (2009). Kinetics of the biodegradation of phenol in wastewaters from the chemical industry by covalently immobilized *Trichosporon cutaneum* cells, *J Ind Microbiol Biotechnol*, Vol.36, No.3, 367–72.
- Zahraw,Z., Al–Obaidy,A.M.J., Shakir.E.,and Hamdy,S.M.A.,(2018). Algae As Bioindicator Pollution Of Tigris River By Industrial Waste, *Inte. Jour. of Eng.Tech. and Manage. Res.*, Vol.5., No.5, 58–64.

Zeyauallah,M., Ahmad, R., Naseem, A., Islam, B., Hasan, H.M.I.,

Abdelkafe, A.S., Benkhayal, F. A., Rizvi, M.A.,and Ali, A.,

(2018).Catechol biodegradation by *Pseudomonas* strain : a critical analysis, Int. J. Chem. Sci. No.7 , 2211–2221 .

Zhou,Z., Wang,Y., Zhang,Z.Q., Zhang,Y. Hasebe,Y., Song,Y.M.,and

Wang,C.P.,(2017). Immobilization of Tyrosinase on 3–

Aminopropyl)triethoxysilane–Functionalize Carbon Felt–Based

Flow–Through Detectors for Electrochemical Detection of

Phenolic Compounds, Kem. Ind., No.66,7–8.

Zhou,J., Yu, X., Ding, C., Wang, Z., Zhou, Q.,and Pao, H., *et al.*,

(2011).Optimization of phenol degradation by *Candida tropicalis*

Z–04 using Plackett–Burman design and response surface

methodology, J. Environ. Sci., No.23 ,22–30.

Zynek, K., Bryjak, J., Szymanska, K., .and Jarzebski, A.B.,

(2011).Screening of porous and cellular materials for covalent

immobilisation of *Agaricus bisporus* tyrosinase, Biotechnol.

Bioprocess Eng., No.16 ,180–189.

الملاحق



الملحق 3-2: ترميز نماذج عينات المياه العذبة من مواقع النمذجة الواقعة على نهر ديبالي			
الموقع على الخريطة Location on map			ترميز العينات Coding of samples
الارتفاع عن سطح البحر Sea level	خط الطول Longitude	خط العرض Latitude	
42 متر	44.63247299	33.77558019	D1-a ; D1-b ; D1-c
42 متر	44.61178780	33.77572288	D2-a ; D2-b ; D2-c
38 متر	44.62303162	33.75638642	D3-a ; D3-b ; D3-c
43 متر	44.63547707	33.77044325	D4-a ; D4-b ; D4-c
33 متر	44.63333130	33.75924078	D5-a ; D5-b ; D5-c
39 متر	44.63212967	33.74186337	D6-a ; D6-b ; D6-c
41 متر	44.61938381	33.73176358	D7-a ; D7-b ; D7-c
37 متر	44.64367390	33.72551754	D8-a ; D8-b ; D8-c
42 متر	44.64431763	33.71677231	D9-a ; D9-b ; D9-c
38 متر	44.62762356	33.71056087	D10-a ; D10-b ; D10-c
تم تحديد خطوط الطول والعرض وفقا للمصدر : Map data © OpenStreetMap contributors Leaflet			

الملحق 3-3 : ترميز نماذج عينات التربة من بعض مناطق الاحياء السكنية والصناعية في قضاء بعقوبة			
Location on map الموقع على الخريطة		ترميز العينات Coding of samples	مناطق سحب العينات Sampling areas
خط العرض Latitude	خط العرض Latitude		
44.61659431	33.73055010	IN 1-a ; IN 1-b ; IN 1-c	الصناعة الاولى
44.61650848	33.72683817	IN 2-a ; IN 2-b ; IN 2-c	
44.61710930	33.72319746	IN 3-a ; IN 3-b ; IN 3-c	
44.61985588	33.71998495	IN 4-a ; IN 4-b ; IN 4-c	
44.61547852	33.70977549	IN 5-a ; IN 5-b ; IN 5-c	الصناعة الثانية
44.61565018	33.70649107	IN 6-a ; IN 6-b ; IN 6-c	
44.61470604	33.70263528	IN 7-a ; IN 7-b ; IN 7-c	
44.61693764	33.70206404	IN 8-a ; IN 8-b ; IN 8-c	
44.61281776	33.73711698	MI 1-a ; MI 1-b ; MI 1-c	منطقة حي المعلمين
44.61316109	33.73319119	MI 2-a ; MI 2-b ; MI 2-c	
44.60989952	33.73226325	MI 3-a ; MI 3-b ; MI 3-c	
44.61204529	33.72519630	MI 4-a ; MI 4-b ; MI 4-c	
تم تحديد خطوط الطول والعرض وفقا للمصدر : Map data © OpenStreetMap contributorsLeaflet			

الملحق 3-4: تركيب الوسط الزراعي (f/2) المحور			
ت	مكونات الوسط الزراعي	تركيز محلول الخزن Stock solution concentration	الكمية المستخدمة لتحضير لتر واحد
1	NaNO ₃	dH ₂ O (75.0) غم / لتر	(1) مل
2	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	dH ₂ O (5.0) غم / لتر	(1) مل
3	Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	dH ₂ O (30.0) غم / لتر	(3) مل
4	مغذيات صغرى (تتضمن 7 مكونات) Trace Metal Solution (includes 7 compounds)	FeCl ₃ .6H ₂ O (1.3) غم / لتر Na ₂ EDTA.2H ₂ O (8.7) غم / لتر CuSO ₄ .5H ₂ O (980 ملغم / 100 مل dH ₂ O) Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (630 ملغم / 100 مل dH ₂ O) ZnSO ₄ .7H ₂ O (2.2 غم / 100 مل dH ₂ O) CoCl ₂ .6H ₂ O (1.0 غم / 100 مل dH ₂ O) MnCl ₂ .4H ₂ O (18.0 غم / 100 مل dH ₂ O)	(1) مل
5	مستخلص التربة Soil Extract	1 (كغم / لتر)	(5) مل
6	فيتامين B12 Vitamin B12	(10 ملغم / 10 مل dH ₂ O)	(1) مل
7	فيتامين H (بيوتين) (Biotin)	(10 ملغم / 10 مل dH ₂ O)	(1) مل
8	Thiamine HCl	(200) ملغم	(1) مل
(Lorenzen و Guillard ، 1972 ؛ Vinayak وآخرون ، 2014)			

الملحق 3-5: مكونات الوسط الزراعي WC medium لتنمية دايتومات المياه العذبة المعزولة من المياه ذات الاس الهيدروجيني المتعادل الى القاعدي	
العناصر الغذائية الرئيسية Major nutrientes	
المكونات Components	الكمية Quantity
Ca Cl ₂ .2H ₂ O	36.76 (ملغم / لتر)
MgSO ₄ .7H ₂ O	36.97 (ملغم / لتر)
NaHCO ₃	12.60 (ملغم / لتر)
K ₂ HPO ₄	8.71 (ملغم / لتر)
NaNO ₃	85.01 (ملغم / لتر)
Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	28.42 (ملغم / لتر)
العناصر الغذائية القليلة او النادرة Traces nutrientes	
Na ₂ EDTA	4.36 (ملغم / لتر)
FeCl ₃ .6H ₂ O	3.15 (ملغم / لتر)
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.01 (ملغم / لتر)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.022 (ملغم / لتر)
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.01 (ملغم / لتر)
MnCl ₂ .4H ₂ O	0.18 (ملغم / لتر)
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.006 (ملغم / لتر)
H ₃ BO ₃	1.0 (ملغم / لتر)
الفيتامينات (إذا لزم الأمر) اذ لا يبدو أن نقص الفيتامينات يؤثر على الدايتومات.	
Thiamin HCl	0.1 (ملغم / لتر)
Biotin	0.5 (مايكروغرام / لتر)
B ₁₂	0.5 (مايكروغرام / لتر)
(Lorenzen و Guillard ، 1972)	

الملحق 3-6: مكونات الوسط الزراعي PM medium لدايتومات المياه العذبة المعزولة من المياه ذات الاس الهيدروجيني الحامضي		
العناصر الغذائية الرئيسية Major nutrientes		
المكونات Components	الكمية Quantity	المكافئ الى WC Medium
Ca Cl ₂ ·2H ₂ O	0.37 (ملغم / لتر)	WC 1/100
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.7 (ملغم / لتر)	WC 1/10
NaHCO ₃	3.15 (ملغم / لتر)	WC 1/4
K ₂ HPO ₄	2.9 (ملغم / لتر)	WC 1/3
NaNO ₃	56.7 (ملغم / لتر)	WC 2/3
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	14.21 (ملغم / لتر)	WC 1/2
العناصر الغذائية القليلة او النادرة Traces nutrientes		
المكونات Components	الكمية Quantity	المكافئ الى WC Medium
Na ₂ ·EDTA	2.18 (ملغم / لتر)	WC 1/2
FeCl ₃ ·6H ₂ O	1.58 (ملغم / لتر)	WC 1/2
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005 (ملغم / لتر)	WC 1/2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.011 (ملغم / لتر)	WC 1/2
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.005 (ملغم / لتر)	WC 1/2
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.09 (ملغم / لتر)	WC 1/2
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.003 (ملغم / لتر)	WC 1/2
H ₃ BO ₃	0.5 (ملغم / لتر)	WC 1/2
الفيتامينات (إذا لزم الأمر) اذ لا يبدو أن نقص الفيتامينات يؤثر على الدايتومات.		
المكونات Components	الكمية Quantity	المكافئ الى WC Medium
Thiamin·HCl	0.1 (ملغم / لتر)	WC 1/1
Biotin	0.5 (مايكروغرام / لتر)	WC 1/1
B ₁₂	0.5 (مايكروغرام / لتر)	WC 1/1
ماء مقطر Distilled water	1000 مل	1000 مل
(Lorenzen و Guillard ، 1972)		

الملحق 3-7 : مؤشر التلوث العضوي لاجناس الطحالب (Palmer ، 1969)	
معامل التلوث العضوي (s)	اجناس الطحالب
1	<i>Anacystis</i>
2	<i>Ankistrodesmus</i>
4	<i>Chlamydomonas</i>
3	<i>Chlorella</i>
1	<i>Closterium</i>
1	<i>Cyclotella</i>
5	<i>Euglena</i>
1	<i>Gomphonema</i>
1	<i>Lepocinclis</i>
1	<i>Melosira</i>
1	<i>Micractinium</i>
3	<i>Navicula</i>
3	<i>Nitzschia</i>
5	<i>Oscillatoria</i>
1	<i>Pandorina</i>
2	<i>Phacus</i>
1	<i>Phormidium</i>
4	<i>Scenedesmus</i>
2	<i>Stigeoclonium</i>
2	<i>Synedra</i>

الملحق 3-8 : مؤشر التلوث العضوي لانواع الطحالب (Palmer ، 1969)	
معامل التلوث العضوي (s)	انواع الطحالب
3	<i>Ankistrodesmus falcatus</i>
2	<i>Arthrospira jenneri</i>
2	<i>Chlorella vulgaris</i>
2	<i>Cyclotella meneghiniana</i>
1	<i>Euglena gracilis</i>
6	<i>Euglena viridis</i>
1	<i>Gomphonema parvulum</i>
2	<i>Melosira varians</i>
1	<i>Navicula cryptocaphala</i>
1	<i>Nitzschia acicularis</i>
5	<i>Nitzschia palea</i>
2	<i>Oscillatoria chlorine</i>
4	<i>Oscillatoria limosa</i>
1	<i>Oscillatoria princeps</i>
1	<i>Oscillatoria putrid</i>
4	<i>Oscillatoria tenuis</i>
3	<i>Pandorina morum</i>
4	<i>Scenedesmus quadricauda</i>
3	<i>Stigeoclonium tenue</i>
3	<i>Synedra ulna</i>

الملحق 3-9: مكونات الوسط الملحي المعدني MSM mineral salt medium	
المكونات	الكمية Quantity
Na ₂ HPO ₄	1.6 غم. لتر ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0.4 غم. لتر ⁻¹
NH ₄ NO ₃	0.5 غم. لتر ⁻¹
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2 غم. لتر ⁻¹
CaCl ₂	0.025 غم. لتر ⁻¹
FeCl ₃	0.0025 غم. لتر ⁻¹
مع او بدون Glucose كمصدر للكربون	1% (وزن / حجم)
(Chandra وآخرون ، 2011 ، Bevilacqua وآخرون ، 2013)	

الملحق 3-10: اسلوب الاضافة المحور على تقدير متبقي الفينول بالطريقة اللونية باستخدام الكاشف 4-aminoantipyrine				
الهدف target	الحجم volume	التركيز concentration	المواد الكيميائية المستعملة chemicals	تسلسل الاضافة
الفينول المتبقي يحدد وفق الامتصاصية على الطول الموجي λ=500 نانومتر باستخدام Microplate reader	300 مايكروليتر	20 ملي مولار	ركيزة الفينول Phenol substrate	1
	1100 مايكروليتر	ماء مقطر معقم منزوع الايونات SDIW	الماء المقطر المعقم sterile distilled water	2
	100 مايكروليتر	ICD = 0.02 λ: 600 نانومتر	الخميرة Yeast	3
	خلطت جيدا في مدة حضانة مختلفة : 1 و 2 و 3 و 4 و 5 و 6 ايام وفي درجة حرارة 30 درجة مئوية.			4
	تم قياس الامتصاصية على الطول الموجي 600 نانومتر لغرض تقدير الكتلة الحيوية للخمائر لاحقا من خلال العلاقة مع الوزن الجاف (Gargouri وآخرون ، 2015).			5
	اجراء النبد المركزي باستخدام micro centrifuge بمقدار 4000 دورة . دقيقة ⁻¹ لمدة 10 دقيقة.			6
	150 مايكروليتر	20 ملي مولار	الراشح supernatant	7
	25 مايكروليتر	20 % (وزن/حجم)	* محلول كلوريد الامونيوم NH ₄ Cl	8
	50 مايكروليتر	8 % (وزن/حجم)	محلول فيروسيانيد البوتاسيوم K ₃ Fe(CN) ₆	9
	50 مايكروليتر	2 % (وزن/حجم)	الكاشف اللوني 4-aminoantipyrine	10
	السماح للخليط بالتفاعل لمدة 10 - 15 دقيقة، لانتاج اللون البرتقالي وبعدها تم قراءة طيف الامتصاص اللوني على الطول الموجي 500 نانومتر			11
ملاحظات:				
1- الاضافات في الخطوة (1 الى 3) تتم في انبوب ايندروف Eppendorf سعة 1.5 مل.				
2- يجب ان يكون الحجم الكلي للمواد المضافة في كل حفرة 275 مايكروليتر.				
3- استخدم الفينول القياسي standard phenol في تحضير المنحنى القياسي calibration curve بتدرج بتركيز 0 و 3 و 6 و 9 و 12 و 15 و 18 و 21 و 24 و 27 و 30 ملي مولار.				
4- تم تحضير تفاعل (سيطرة) control لكل معاملة.				
(Patel وآخرون ، 2017، Liu وآخرون ، 2011، Tsai وآخرون ، 2005)				

الملحق 3-11: اسلوب الاضافة المحور لتقدير متبقي الكاتيكول بالطريقة اللونية Fujita وآخرون (1985)				
الهدف target	الحجم volume	التركيز concentration	المواد الكيميائية المستعملة chemicals	تسلسل الاضافة
الكاتيكول المتبقي يحدد وفق الامتصاصية على الطول الموجي $\lambda = 630$ نانومتر باستخدام Microplate reader	600 مايكروليتر	40 ملي مولار	ركيزة الكاتيكول Catechol substrate	1
	800 مايكروليتر	ماء مقطر معقم منزوع الايونات SDIW	الماء المقطر المعقم sterile distilled water	2
	100 مايكروليتر	ICD = 0.02 λ : 600 نانومتر	الخميرة Yeast	3
	خلطت جيدا في مدة حضانة مختلفة : 1 و 2 و 3 و 4 و 5 و 6 ايام وفي درجة حرارة 30 درجة مئوية.			4
	تم قياس الامتصاصية على الطول الموجي (600) نانومتر لتقدير الكتلة الحيوية للخمائر لاحقا من خلال العلاقة مع الوزن الجاف (Gargouri وآخرون ، 2015)			5
	اجراء النبذ المركزي باستخدام micro centrifuge بمقدار 4000 دورة . دقيقة ¹ لمدة 10 دقيقة (Liu وآخرون ، 2011).			6
	150 مايكروليتر	40 ملي مولار	الراشح supernatant	7
	75 مايكروليتر	0.1 مولار	دارئ بيكربونات الصوديوم Na_2CO_3 كربونات الصوديوم - كربونات الصوديوم الهيدروجينية NaHCO_3	8
		0.1 مولار		
	20 مايكروليتر	5 % (حجم/ حجم) اذابة بالميثانول	polyoxyethelene monolauryl ether (Acros Organics) او (Tween 80)	9
	15 مايكروليتر	1 ملي مولار	كبريتات الامونيوم – ثلاثي الحديد iron (III) ammonium sulfate $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	10
	15 مايكروليتر	1 ملي مولار (وزن/ حجم) اذابة بالميثانول	الكاشف Phenylfluorone اللونى (Acros Organics) $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{O}_5$	11
السماح للخليط بالتفاعل لمدة 1- 2 دقيقة، لانتاج اللون الاحمر وبعدها تم قراءة طيف الامتصاص اللونى على الطول الموجي 630 نانومتر			12	
ملاحظات :				
1- الاضافات في الخطوة 1 الى 3 تتم في انبوب ايندروف Eppendorf سعة 1.5 مل.				
2- يجب ان يكون الحجم الكلي للمواد المضافة في كل حفرة 275 مايكروليتر.				
3- استخدم الكاتيكول القياسي standard catechol في تحضير المنحنى القياسي calibration curve بتدرج بتركيز 4 و 8 و 12 و 16 و 20 و 24 و 28 و 32 و 36 و 40 ملي مولار.				
4- تم تحضير تفاعل (سيطرة) control لكل معاملة.				
الطريقة المحورة في تقدير متبقي الكاتيكول حسب: (Tao وآخرون ، 2004 ؛ Fujita وآخرون ، 1985)				

الملحق 3-12: اسلوب الاضافة لتقدير الاوكسجين المذاب بطريقة ونكلر في مزارع الخمائر المعاملة بالفينول او الكاتيכול				
الهدف target	الحجم volume	التركيز concentration	المواد الكيميائية المستعملة chemicals	تسلسل الاضافة
قياس الاوكسجين الذائب بوحدة ملغم.لتر ⁻¹ بطريقتي ونكلر وجهاز قياس الاوكسجين DO-meter	100 مل	20 ملي مولار	(اما) ركيزة الفينول	1
		40 ملي مولار	(او) ركيزة الكاتيכול	
	133.3 مل	ماء مقطر معقم منزوع الايونات SDIW	الماء المقطر المعقم sterile distilled water	2
	16.7 مل	ICD = 0.02 λ: 600 نانومتر	الخميرة Yeast	3
	خلطت جيدا بظروف حضانة : المدة 5 ايام وبدرجة حرارة 20-25 درجة مئوية باستعمال حاضنة BOD خاصة (مولود واخرون ،1990).			4
	قياس الاوكسجين الذائب من خلال تكملة الخطوات حسب طريقة ونكلر واتباع اسلوب القياس بجهاز قياس الاوكسجين.			5
	تم قياس الامتصاصية على الطول الموجي 600 نانومتر لتقدير الكتلة الحيوية للخمائر من خلال العلاقة مع الوزن الجاف (Gargouri واخرون، 2015)			6
ملاحظات:				
1- يجب ان يكون الحجم النهائي للمواد المضافة في كل قنبينة من قناني ونكلر (250) مل .				
2- تم تحضير تفاعل (سيطرة) control لكل معاملة.				

الملحق 3-13: أسلوب اختبار فعالية التقييد الانزيمي المحور بالطريقة اللونية Fujita وآخرون (1985)

الهدف target	الحجم volume	التركيز concentration	المواد الكيميائية المستعملة chemicals	تسلسل الاضافة
الكاتيكول المتبقي يحدد وفق الامتصاصية على الطول الموجي $\lambda = 630$ نانومتر باستخدام Microplate reader	32 مل	ملي مولار 50	خلات الصوديوم sodium acetate (pH: 5.0 – 6.0)	حسب الاختبار
			فوسفات البوتاسيوم potassium phosphate (pH: 6.5–8.5)	
			Tris–acetate (pH: 9.0 – 10)	
	4 مل	17.6 ملغم. مل ⁻¹	الانزيم الذائب (الحر) soluble enzyme	حالة الانزيم
	250 ملغم من مادة التقييد	256.3 وحدة. مل ⁻¹	الانزيم المقيّد Immobilized enzyme	
	24 مل	40 ملي مولار	ركيزة الكاتيكول	3
	خلطت جيدا في مدة حضانة 72 ساعة مختلفة من حيث درجة الحرارة : 15 و 25 و 35 و 45 و 55 درجة مئوية			4
	1.6 مل	(5%) (حجم / حجم)	بيروكسيد الهيدروجين H ₂ O ₂	5
	150 مايكروليتر		اجزاء من الخليط aliquots	6
	75 مايكروليتر	0.1 مولار 0.1 مولار	دارئ بيكربونات الصوديوم كربونات الصوديوم Na ₂ CO ₃ - كربونات الصوديوم الهيدروجينية NaHCO ₃	7
	20 مايكروليتر	5 %	polyoxyethelene monolauryl ether (Acros Organics)	8

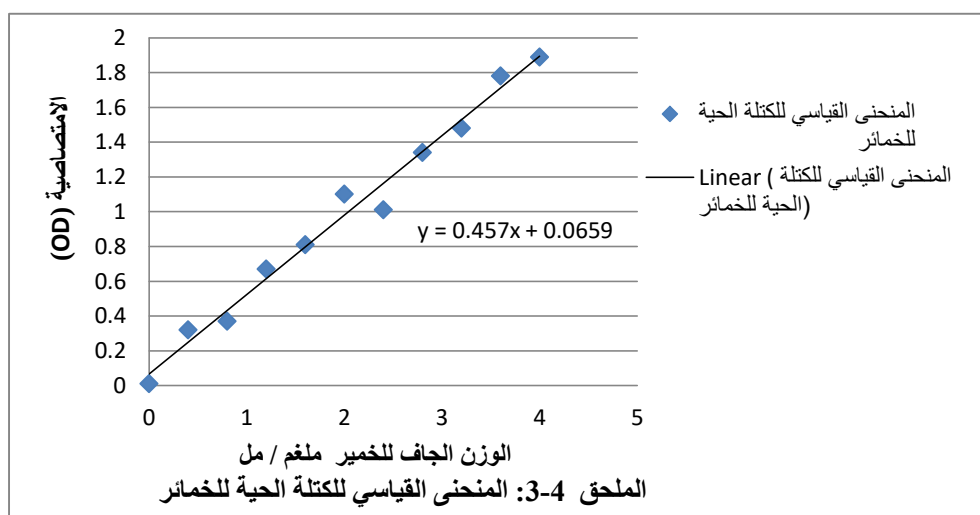
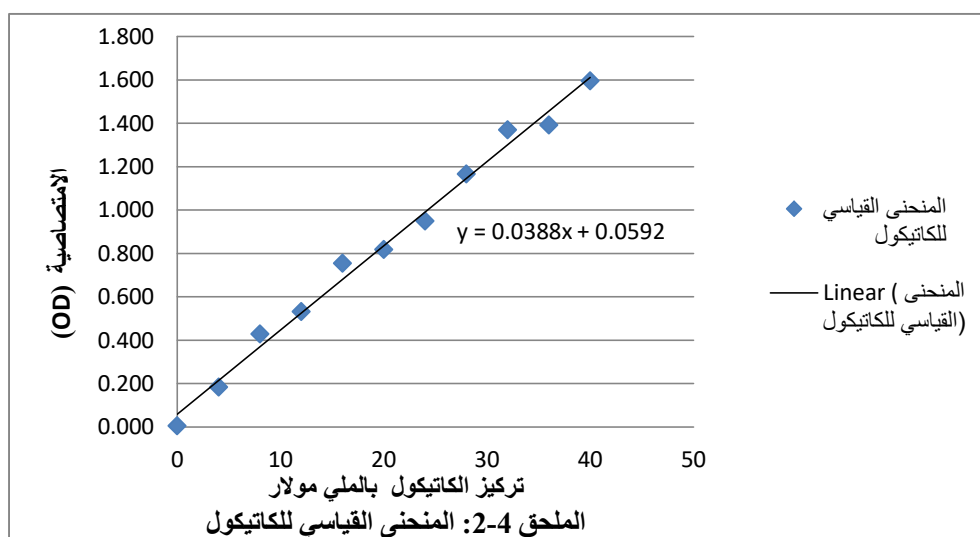
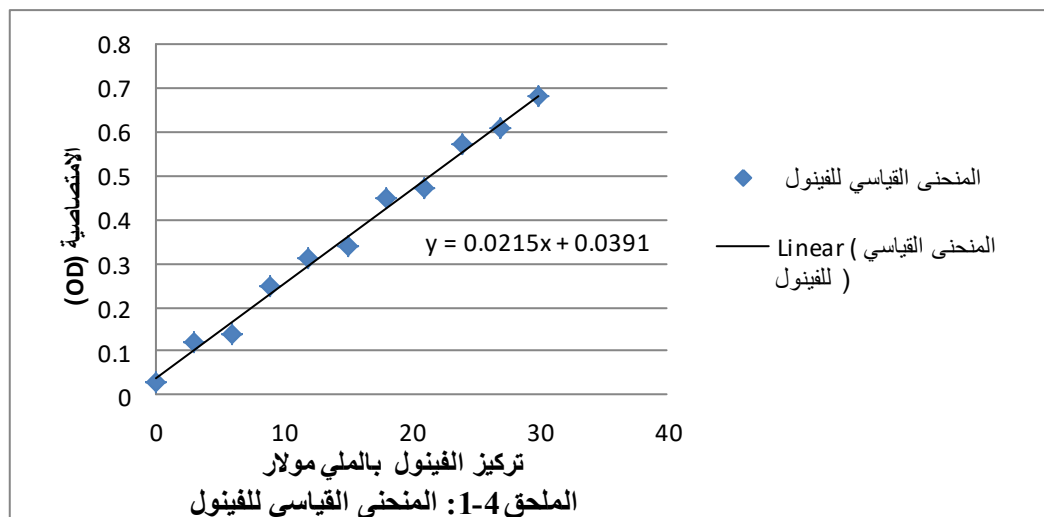
		(حجم/ حجم) اذابة بالميثانول	Tween 80 او	
	15 مايكروليتر	1 ملي مولار	كبريتات الامونيوم – ثلاثي الحديد iron (III) ammonium sulfate NH ₄ Fe(SO ₄) ₂ .12H ₂ O	9
	15 مايكروليتر	1 ملي مولار (وزن/ حجم) اذابة بالميثانول	Phenylfluorone الكاشف اللوني (Acros Organics) C ₁₉ H ₁₂ O ₅	10
	السماح للخليط بالتفاعل لمدة 1- 2 دقيقة، لانتاج اللون الاحمر وبعدها تم قراءة طيف الامتصاص اللوني على الطول الموجي 630 نانومتر			11

ملاحظات :

1- يجب ان يكون الحجم الكلي للمواد المضافة في انابيب الاختبار (60) مل فقط.

2- يجب ان يكون الحجم الكلي للمواد المضافة في كل حفرة 275 مايكروليتر.

3- استخدم الكاتيول القياسي standard catechol في تحضير المنحنى القياسي calibration curve بترج بتركيز 4 و 8 و 12 و 16 و 20 و 24 و 28 و 32 و 36 و 40 ملي مولار.



Abstract

During the current study, we carried out testing of the enzymatic bioremediation method for phenolic compounds, which are one of the most important pollutants in the aquatic environment, by following the method of enzymatic immobilization on various supports that included biosilica of diatom frustules and some polymeric membranes, which included polyacryl nitrile (PAN) and polyacryl amide (PAA). The enzyme catechol 1,2-dioxygenases C12O (EC1.14.13.1) was used, which was isolated and purified from *Candida albicans*, which was isolated during the current study from soil contaminated with petroleum products and their petrochemical derivatives.

161 isolates of riverine diatoms were collected from the 10 sampling sites on the Diyala river section passing through Baquba during the period from February to June of 2018. Diatomaceous genera that were diagnosed was about 18 genera, including 15 genera belonging to order Pennales, all of which are benthic or epilithic diatoms, of which 4 genera are motile, and 3 genera belonging to order of radial symmetry were isolated and diagnosed, all of them planktonic diatoms. The highest numbers of isolated benthic diatoms were at the D7 sampling site about 17 species, while the lowest numbers were at the D2 site, about 13 species. The highest numbers of planktonic diatoms were located at the D6 and D8 sampling sites, with 3 types. The highest total values of Palmer Pollution Index were within the sampling sites D7, D8, D4 and D6, about 33, 29, 25 and 23, respectively. Which indicates that those sites suffering from high confirm organic pollution? While the highest values of the TDI were 80.9 and 77.6, in sampling sites D7 and D4 and respectively, indicating the presence of a hypertrophy state in waters within those sites resulting from the presence of high confirm organic pollution. Especially with a decrease in the DQI values that were recorded in sites D7 and D4, which about 19.1 and 22.4, respectively.

Five *Candida* sp. were isolated and diagnosed from contaminated soil with petrochemical materials found in the floors of local electric generators , repair and washing, lubricating garages of cars of some industrial and residential neighborhoods in Baqubah, namely *C. parapsilosis*, *C. ciferrii*, *C. tropicalis*, *C. albicans* and *C. famata*. The first industrial region was the better for isolation of *Candida* sp. as percentage of positive isolates was 45% with 27 positive samples out of 60 samples, and that most percentages of *Candida* sp. yeasts were isolated from the soil taken from the soil of car repair garages, and this is clearly evident through the percentages of the positive samples. The highest rates were related to *C. albicans*, at about 83%, followed by *C. tropicalis* at 75%, and *C. parapsilosis* at 58%. The highest rates of CFU colonies in high phenolic concentration cultures were 25 μM from soil in car repair garages, as they were about 7.5 ± 6.2 . It was found that there are very significant differences in the biodegradation ability of phenol between the isolated *Candida* sp. in current study, and that the lowest values of the residual phenol levels were in *C. parapsilosis* during an incubation period of 6 days and at 30 ° C, which about $3.9 \pm 11.3 \mu\text{M}$. This is clearly evidenced by its high biomass rates, reaching about $1.6 \pm 0.6 \text{ mg. ml}^{-1}$ under the same

conditions. It was also found that there were very significant differences in the biodegradation ability of catechol between the isolated *Candida* sp. in current study, and that the lowest values of the residual catechol levels were in *C. albicans* during the 6-day incubation period at 30 ° C, reaching about $14.2 \pm 7.7 \mu\text{M}$. Especially with their high values of biomass rates, at about $1.8 \pm 0.6 \text{ mg. mg. ml}^{-1}$.

The highest specific activity for (C12O) enzyme purification was within the second stage of the purification steps represented by precipitation with ammonium sulfate AS 2% (weight / volume), reaching about 14.56 units. mg^{-1} after achieving the purification by 6.6 folds with a recovery rate of 78.3%. The optimum catalytic activity of the enzyme (C12O) was within the pH of 6.5-8.5 and the temperature of 25 ° C. Immobilization of (C12O) enzyme by biosilica of diatom frustules DFS/G GA gave a double shifting of 20 ° C from the optimum temperature for enzyme activity, within all the purification stages, as the percentage of catechol degradation through it at the temperature of 45 ° C reached about 93% and 87.2% and 85% were in the precipitation stage with ammonium sulfate AS and the precipitation with streptomycin sulfate SS and the enzymatic crude extract CEE respectively. While the shifting was only 10 ° C in the case of immobilization on polymeric supports types: PAN / G and PAA / G. In contrast, the soluble (C12O) enzyme which did not show any shifting by its optimum temperature and its highest activity values were within the optimum temperature of 25 ° C. While the method of immobilization for (C12O) enzyme by biosilica of diatom frustules DFS/G gave a 1.5-degree shifting for the optimum pH of the enzyme activity, within all the purification stages, the highest rates of catechol degradation were reached through it at the base pH 9-10 about 91.8% and 86.5. % and 85.0% in the AS, CEE and SS stages, respectively. Whereas, the enzyme immobilization methods of (C12O) by PAN / G and PAA / G did not show such displacement during the enzymatic purification stage with streptomycin sulfate SS but were limited to the primarily stages of enzymatic purification. , As it was able to shift the optimal pH of the (C12O) enzyme by 1.5 degrees also within the purification stages of AS and CEE. The rates of catechol biodegradation through it at the base pH 9-10 were about 79.0% and 71.8%, respectively, in the case of immobilization by PAN /G and PAA / G with percentages of 71.8% and 62.0%, respectively. In contrast, soluble (C12O) enzyme did not show any shifting by its optimum pH, and its highest activity values were within the optimum pH of 6.5-8.5. The reason for these results may be attributed to the role of the large surface area ready for covalent immobilization of (C12O) enzyme by biosilica of diatom frustules compared with the surface area of pores of the two types of polymeric membranes used in current study.

**Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Diyala , College of Education
for Pure Sciences / Department of Biology**



Using Species of Microorganisms in Bioremediation of Phenol within Diyala Province / Iraq

This dissertation is submitted to the Council of the College of
Education for Pure Sciences, University of Diyala in partial
fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of
Philosophy in Biology

By

Khalid Dheyaa Abdulwahid Al-Chechani

BSc in Biology 1996-1997/ University of Baghdad
MSc in Biology 2001-2002/ University of Baghdad

Supervised by

Prof. Dr.

Najm Abdullah Jumaah Al-Zubaidi

May/2021 A.D.

Shawal /1442 A.H.