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

المعالجة الحيوية لبعض العناصر النزرة الملوثة لأصبعيات اسماك الكارب باستخدام *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة محلياً

رسالة مقدمة إلى
كلية التربية للعلوم الصرفة-جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستيرفي علوم الحياة –الاحياء المجهرية
من قبل

فيحاء محمد نجم الباوي

بكالوريوس علوم الحياة /كلية التربية /جامعة ديالى 2004-2005

بإشراف
أ.د.عدنان نعمة عبد الرضا العزاوي
أ.م .د.رائد سامي عاتي

1434 هـ
2013 م

بسم الله الرحمن الرحيم

{قَالُواْ سُبحَانَكَ لا عِلمَ لَنَاإِلاَّ مَا
عَلَّمتَنَا إِنَّكَ أَنتَ العَلِيمُ الحَكِيمُ}

صدق الله العظيم

الآية (32) من سورة البقرة

الإهداء

الى...الشمس التي لا تغيب ...الى ظلال الرحمة وعنفوان

الصبر ونغمات الطيب والحنان... والدي العزيز

والدتي العزيزة

الى من هو اغلى علي من نفسي ...الى البذور التي زرعت في ارض قلبي

وأثمرت ثمرا طيبا ..الى قرة عيني و مركز قوتي

اخي وسام

واخواتي

من كان عوناً لي في شدتي ...

الى المصباح النير الذي أضاء لي الدرب و زادني طموحا وتفاءلا...

الى من أراه بروحي ...

زوجي وسام

الى من زرع الأمل في نفسي لتجاوز ساعات الدراسة المتعبة

عائلة زوجي

الى شمس العلم المضيئة على مر الزمان ..... أساتذتي

اهدي ثمرة جهدي المتواضع

فيحاء

الشكر والتقدير

الحمد لله رب العالمين الذي يسر لي أمري ،والذي أنار لي عقلي ودربي احمده حمداً كثيراً سعةً عرشه وعدد خلقه، والصلاة والسلام على سيد الخلق أجمعين محمد الهادي الأمين وعلى آله وصحبه ومن تبعهم بإحسان إلى يوم الدين .

أتقدم بالشكر والتقدير إلى عمادة الكلية وعلى رأسها الأستاذ الدكتور **عباس عبود فرحان**.

كما أتقدم بالشكر الجزيل و عظيم الامتنان إلى من بثا فيَ روح المثابرة والعمل الجاد ورسما لي طريق العلم وحفزاني اليه منذ بداية دراستي، الى مشرفيَ الدكتور **عدنان نعمة عبد الرضا** والدكتور **رائد سامي عاتي** حيث تفضلا مشكورين بالاشراف على هذه الرسالة التي امداها بتوجيهاتهما السديدة وملاحظتهما العملية الدقيقة والقيمة وعلى ما احاطاني به من رعاية وجهود كبيرة اضاءت الطريق لهذه الرسالة .، وقسم علوم الحياة ،والأساتذة ،ومنتسبي قسم الدراسات العليا في كلية التربية للعلوم الصرفة.

يشرفني أن أتقدم بالشكر الجزيل المقرون بالدعاء إلى كل من زميلتي الدراسة انوار علي كاظم و مروج محمد صناع على مساعدتهما لي . كما اخص بالشكر كل العاملين في مختبرات ابن سينا لمساعدتهم لي والهيأة التدريسية في قسم الكيمياء كلية التربية .

وفق الله الجميع

الباحثة

إقرار المشرفين وترشيح لجنة الدراسات العليا

نشهد بان إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ **(**المعالجة الحيوية لبعض العناصر النزرة الملوثة لاصبعيات اسماك الكارب بأستخدام *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة محلياً**)** التي قدمتها طالبة الماجستير **(فيحاء محمد نجم الباوي)** كانت بإشرافنا في كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الأحياء المجهرية .

التوقيع

المشرف : د. عدنان نعمة عبد الرضا

المرتبة العلمية : استاذ

كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

/ /2013

التوقيع

المشرف : د.رائد سامي عاتي

المرتبة العلمية :استاذ مساعد

كلية الزراعة/ جامعة ديالى

/ /2013

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوجيهات المتوافرة نرشح هذه الرسالة للمناقشة :

التوقيع

ا. م. د. نجم عبد الله جمعة

رئيس لجنة الدراسات العليا/ رئيس قسم علوم الحياة

/ /2013

إقرار الخبير اللغوي

اشهد إن هذه الرسالة الموسومة بـ **(**المعالجة الحيوية لبعض العناصر النزرة الملوثة لاصبعيات اسماك الكارب بأستخدام *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة محلياً**)**. المقدمة من قبل طالبة الماجستير **(فيحاء محمد نجم الباوي)** قسم علوم الحياة / الأحياء المجهرية قد تم مراجعتها من الناحية اللغوية ، وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة **.**

التوقيع :
الاسم : د.باسم محمد إبراهيم
المرتبة العلمية :أستاذ مساعد
التاريخ : / / 2013

إقرار الخبير العلمي

اشهد إن هذه الرسالة الموسومة بـ **(**المعالجة الحيوية لبعض العناصر النزرة الملوثة لاصبعيات اسماك الكارب بأستخدام *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة محلياً**).** المقدمة من قبل طالبة الماجستير **(فيحاء محمد نجم الباوي)** قسم علوم الحياة / الأحياء المجهرية قد تم مراجعتها من الناحية العلمية، وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة .

التوقيع :
الاسم : د.محمد فرج شذر
المرتبة العلمية :استاذ مساعد
التاريخ : / /2013

اقرار لجنة المناقشة

نشهد أننا أعضاء لجنة المناقشة أطلعنا على الرسالة الموسومة بـ **(المعالجة الحيوية لبعض العناصر النزرة الملوثة لاصبعيات اسماك الكارب بأستخدام *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة محلياً)**، وقد ناقشنا الطالبة **(فيحاء محمد نجم الباوي)** في محتوياتها ، وفي ما له علاقة بها ، ونعتقد أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة – احياء مجهرية بتقدير (امتياز) .

التوقيع :
الاسم: أ.م.د.هادي رحمن رشيد
عضواً
/ /2013م

التوقيع :
الاسم:أ.د. حميد مجيد جاسم
عضواً
/ /2013م

التوقيع
الاسم: أ.د.عباس عبود فرحان
رئيساً
/ / 2013 م

التوقيع :
الاسم: أ.د عدنان نعمة عبدالرضا
عضواً ومشرفاً
التاريخ: / /2013 م

التوقيع:
الاسم: أ.م.د رائد سامي عاتي
عضواً ومشرفاً
التاريخ : / /2013 م

صدقت من قبل مجلس كلية التربية– للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

التوقيع :
أ.د.عباس عبود فرحان
عميد كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ : / / 2013 م

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية عزل وتشخيص البكتريا الاكثر تحملاً للمعادن الثقيلة وذات الكفاءة في اختزال المعادن الثقيلة لغرض استخدامها في المعالجة الحيوية Bioremediation واختبارها على صغار اسماك الكارب *Cyprinus carpio* المعرضة لفترة 96ساعة و لتراكيز عالية لكل من الرصاص (75،85،95) ملغم/لتر ، و الكروم (10،11،12)ملغم/لتر ، و الخارصين (5،6،7)ملغم/لتر ، و النحاس (3،4،5) ملغم/لتر .

اظهرت نتائج العزل للمدة ما بين 1-10-2011 ولغاية 20-1-2012 ،عزل60 عزلة بكتيرية مقاومة للمعادن من اصل 120 عينة عزلت من نهر مهروت في محافظة ديالى وتبين من نتائج الاختبارات الزرعية والمظهرية والكيموحيوية أن 22 عزلة هي *Pseudomonas aeruginosa* اي بنسبة 37% .من مجموع العزلات و 25% لل.*Bacillus* sp و *20%* .*Staphylococcus* sp و 18% .*Nisseria* sp.

كانت نتائج التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز المحتمل الأكبرMTC أن لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* اعلى قيمة تحمل وأدنى تثبيط لكل من Pb وCr وZn وCu كان MTC (1100،350،900،1200) ppm على التوالي وال MIC كان (1200،400،1000،1300) ppm وعلى التوالي .

أوضحت نتائج نسب البقاء قبل المعالجة و بعد المعالجة اختلافا معنويا في التراكيز جميعاً و لكافة العناصر الأربعة المجربة بعد مرور 96 ساعة، فقد أظهرت نسب البقاء لعنصر الرصاص للتراكيز (75،85،95) ملغم/لتر (50%،20%،0) على التوالي أما بعد المعالجة الحيوية(90%،60%،40%)، أما المعالجة الحيوية لعنصر الكروم Cr أظهرت فرقا معنويا قليل للتركيز(10،11،12) ملغم/لتر(80%،60%،40%) على التوالي أما بعد المعالجة (90%،70%،50) ولعنصر الخارصينZn للتراكيز(5،6،7) ملغم/لتر فقد سجلت (30%،10%/0) على التوالي أما بعد المعالجة

(60%،50%،40%) وكذلك الحال لعنصر النحاسCu للتراكيز(3،4،5) ملغم/لتر (60%،10%،0) على التوالي أما بعد المعالجة (60%،40%،40%).

أما متوسط التركيز المميت LC_{50} للعناصر الاربعة أظهرت النتائج ارتفاعا بالتراكيز بعد المعالجة مقارنة قبل المعالجة، لقد كان LC_{50} لعنصر الرصاص بعد مرور 96ساعة 75 ملغم/لتر قبل المعالجة أصبح 88 ملغم/لتر بعد المعالجة ،ولعنصر الكروم ولنفس الفترة الزمنية بعد أن كان 11.5 ملغم/لتر أصبح 12 ملغم/لتراما عنصر الخارصين فقد كان اقل من 5 ملغم/لترارتفع إلى 5 ملغم/لتر ولعنصر النحاس اقل من 3 ملغم/لتر اصبح 3.5ملغم/لتر .

بينما متوسط الزمن المميت LT_{50} فقد اظهر تباين ايضا قبل المعالجة مقارنة بما حصل بعد المعالجة إذ سجل عنصر الرصاص وللتركيز 95 ملغم/لتر ارتفاعا من 72 ساعة قبل المعالجة إلى 88ساعة بعد المعالجة وكذلك عنصر الكروم ولتركيز الاعلى 12 ملغم/لتر ارتفع الزمن من (72 إلى 96) ساعة وعنصر الخارصين ارتفع LT50 من 60 الى 96 ساعة بعد المعالجة للتركيز 6 ملغم/لتر ،والتركيز 7 ملغم/لتر ايضا ارتفع LT50 من اقل 48 ساعة قبل المعالجة إلى 96 ساعة بعد المعالجة ،أما عنصر النحاس اقلLT50 كان للتركيز5 ملغم/لتر وكان اقل من48 ساعة وارتفعت هذه القيمة لتصل الى60 ساعة بعد المعالجة .

تشير نتائج المعالجة الحيوية Bioremediation باستخدام بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* لعنصر الرصاص بتركيز (75،85،95) ملغم/لتر لعينات الماء (28.9%،32.4%،26.4%) أما عضلات الأسماك فقد كانت (50%،50%،44%)، اما عنصر الكروم وللتراكيز(10،11،12) ملغم/لتر لعينات الماء (19.8%،32.6%،27%) ولعضلات الأسماك (47%،70%،61%) والخارصين اظهرت نتائج المعالجة الحيوية فروقا قليلة فقط على عينات الأسماك إذ كانت للتراكيز (3،4،5) ملغم/لتر (27.7%،28%،27.9%) ولعنصر النحاس وللتراكيز (3،4،5) (5،6،7)

ملغم/لتر (50%،30%،80%) للمتركم في عضلات الاسماك أما الذائب في الماء كانت نسبة المعالجة (22.4%،32.6%،22.5%) .

قائمة المصطلحات

Anthropogenic	بشري المنشأ
Bioaccumulation	التراكم الحيوي
Biodegradability	قابلية التحلل الحيوي
Bioindicators	الدلائل الحياتية
Biomagnification	التضخيم الحيوي
Bioremediation	المعالجة الحيوية
Biosorption	الامتاص الحيوي
Biotransformation	التحول الحيوي
detoxification	ازالة سمية
Heavy Metals	المعادن الثقيلة
Lethal Concentration50%	متوسط التركيز القاتل
Lethal time50%	متوسط الزمن المميت
Micronutrients	مغذيات دقيقة
Mineralization	المعدنة
Redox	الاكسدة والاختزال
Trace Metals	عناصر نزرة

قائمة المختصرات

ABC	ATP-binding cassette
ABC	ATP- binding cassette
ANHMRC	Australian National Health and Medical Research Council
ATP	Adenosen tri-phosphat
CDF	Cation diffusion facilitator
CDF	Cation diffusion facilitator
Cr	Chromium
Cu	Copper
GH	Glutathione
GSH	Bisglutathion
HMs	Heavy metal
LC_{50}	Lethal Concentration
LT_{50}	Lethal Times
MFP	Membrane fusion protein
MIC	Minimum Inhibited concentration
MO	Microorganism
MTC	Maximum tolerance concentration
OMF	Outer membrane factor

Pb	Lead
ppm	Part per miliun
WHO	World Health Organization
Zn	Zinc

فهرست المحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	الفصل الأول :المقدمة	
1-1	المقدمة	1
	الفصل الثاني : استعراض المراجع	
1-2	المعادن الثقيلة Heavy metal	4
1-1-2	الخارصين (Zn)Zinc.	7
2-1-2	الكروم (Cr)Chromium	8
3-1-2	الرصاص(Pb)Lead	9
4-1-2	النحاس(Co)Copper	10
2-2	سمية المعادن الثقيلة Toxity of Heavy Metals	11
3-2	التراكم الحيوي للمعادن الثقيلة في الاسماك Bioaccumulation of fish heavy metal	14
4-2	طرق معالجة المعادن الثقيلة	16
1-4-2	العمليات الفيزيوكيميائية لمعالجة المعادن الثقيلة	16
1-1-4-2	الترسيب الكيميائي Chemical Precipitation	16
2-1-4-2	التبادل الايوني Ion Exchange	16
3-1-4-2	التنافذ العكسي Revers Osmosis	16
2-4-2	المعالجة الاحيائية Bioremediation	17
5-2	*Pseudomonas aeruginosa* والمعالجة الاحيائية *Pseudomonas aeruginosa* and Bioremrdiation	20
6-2	نظام النقل Efflux Transporter	22
1-6-2	نظام النقل P-type ATPases	23

2-6-2	ABC- Transporters	24
3-6-2	- عائلة نقل CDF	25
	الفصل الثالث:المواد وطرائق العمل	
1-3	الاجهزة والمواد المستعملة	26
1-1-3	الاجهزة المستعلة	26
2-1-3	المواد الكيميائية والبايولوجية	27
2-3	الاوساط الزراعية الجاهزة والتركيبية	29
1-2-3	الاوساط الزرعية الجاهزة	29
2-2-3	الاوساط التركيبية	29
1-2-2-3	وسط النشاء starch medium	30
2-2-2-3	وسط فوكاس بروسكاور- احمر مثيل MR-VP medium	30
3-2-2-3	وسط اليوريا Urea medium	30
4-2-2-3	وسط الاندول Indol medium	30
5-2-2-3	وسط الاكار مستخلص الخميرة ببتون PYA pepton yeast extract agar	30
6-2-2-3	وسط اكار الكليسيرول Glycerol Agar medium	31
7-2-2-3	وسط الاكسدة والتخمر O/F medium	31
3-3	تحضير المحاليل و الكواشف	31
1-3-3	محاليل صبغة كرام Gram stain solution	31
1-1-3-3	صبغة ازرق المثيلين Crysal blue stain	31
2-1-3-3	محلول اليود Lugols Iodine Solution	32
3-1-3-3	محلول ازالة اللون Decolorize	32

4-1-3-3	صبغة السفرانين Safranin Stain	32
2-3-3	محلول احمر المثل Methyl Red Solution	32
3-3-3	محلول 5% a-naphthol	32
4-3-3	كاشف انزيم الكاتاليز Catalase Reagent	32
5-3-3	كاشف كوفاكس Kovacs Reagent	33
6-3-3	كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent	33
7-3-3	المحاليل القياسية Stock Solution	33
8-3-3	المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline	33
9-3-3	محلول ثابت العكورة القياسي Macfarland Standard	34
10-3-3	حفظ وادامة العزلات البكتيرية	34
4-3	جمع العينات Collection of Sample	34
5-3	زرع العينات Samples Culture	35
6-3	تشخيص العزلات البكترية	35
1-6-3	الفحوصات المظهرية Morphology test	35
2-6-3	الفحوصات الكيموحيوية Biochmecal test	35
1-2 -6-3	اختبار انزيم الكاتاليز Catalase test	35
2-2-6-3	اختبار الاوكسيديز Oxidase test	36
3-2-6-3	اختبار تحلل النشأ Starch hydrolysis test	36
4-2-6-3	اختبار الاندول Indole test	36
5-2-6-3	اختبار اليوريا Urea test	37
6-2-6-3	اختباراحمر المثيل Methyl red test	37
7-2-6-3	اختبار الفوكاس بروسكارو VP test	37
8-2-6-3	اختبار استهلاك السترات	37

9-2-6-3	اختبار الاكسدة والتخمر O/F test	37
10-2-6-3	تحديد التركيز المحتمل الاكبر Maximum Tolerance concentration (MTC) والتركيز المثبط الادنى Manimmum Inhibity Concentration (MIC)	38
11-2-6-3	قياس المعادن المختزلة	38
7-3	تجارب المعالجة الحيوية Bioremediation	39
1-7-3	تحضير العالق البكتيري	39
2-7-3	جمع عينات الأسماك	39
3-7-3	الأقلمة	39
4-7-3	تصميم تجارب المعالجة الحيوية	39
5-7-3	تقدير تركيز العنصر المتراكم في الانسجة	41
8-3	التحليل الاحصائي	42
	الفصل الرابع: النتائج والمناقشة	
1-4	عزل وتشخيص البكتريا المقاومة للمعادن	43
1-1-4	العزل Isolation	43
2-1-4	التشخيص Identification	43
2-4	العوامل غير الاحيائية	45
3-4	تحديد التركيز المتحمل الاكبر(MTC) والتركيز المثبط الاصغر(MIC)	46
4-4	نسب البقاءللاسماك	48
1-4-4	تأثير عنصر الرصاص على نسب البقاء	48
2-4-4	تأثير عنصر الكروم على نسب البقاء	54
3-4-4	تأثير عنصر الخارصين على نسب البقاء	59
4-4-4	تأثير عنصر النحاس على نسب البقاء	65
5-4	التراكم الحيوي Bioaccumulation والمعالجة الحيوية	69

	Bioremediation	
1-5-4	التراكم الحيوي والمعالجة الحيوية لعنصر الرصاص	69
2-5-4	التراكم الحيوي والمعالجة الحيوية لعنصر الكروم	70
3-5-4	التراكم الحيوي والمعالجة الحيوية لعنصرالخارصين	71
4-5-4	التراكم الحيوي والمعالجة الحيوية لعنصر النحاس	72
	الاستنتاجات والتوصيات	
	الاستنتاجات	76
	التوصيات	77
	المصادر	
	المصادر العربية	78
	المصادر الاجنبية	79

قائمة الأشكال

التسلسل	العنوان	الصفحة
1-2	أهم النشاطات البشرية التي تؤدي إلى التلوث بالمعادن الثقيلة	6
2-2	الية سمية المعادن الثقيلة للبكتريا	12
3-2	المسارات الايضية المقترحة لتحويل المركبات العضوية والمعادن بواسطة البكتريا	18
2- 4	اشتراك عوائل النقل في مقاومة المعادن الثقيلة	23
1-4	يمثل قيم LT50 لبقاء صغار اسماك الكارب*C. carpio* المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر الرصاص ولمدة 96 ساعة 1- قبل المعالجة الحيوية 2-بعد المعالجة بـ *P. aeruginosa*	52
2-4	يمثل قيم LC50 لبقاء صغار اسماك الكارب C. carpio المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر الرصاص ولمدة 96 ساعة 1-قبل المعالجة الحيوية 2- بعد المعالجة بـ *P. aeruginosa*	53
3-4	يمثل قيم LT50 لبقاء صغار اسماك الكارب C. carpio المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر الكروم ولمدة 96 ساعة1-قبل المعالجة الحيوية 2- بعد المعالجة بـ *P. aeruginosa*	57
4-4	يمثل قيم LC50 لبقاء صغار اسماك الكارب C. carpio المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر الكروم ولمدة 96 ساعة 1- قبل المعالجة الحيوية 2- بعد المعالجة بـ *P.aeruginosa*	58
5-4	يمثل قيم LT50 لبقاء صغار اسماك الكارب C. carpio المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر الخارصين ولمدة 96 ساعة 1-قبل المعالجة الحيوية2- بعد المعالجة بـ *P. aeruginosa*	62

6-4	يمثل قيم LC50 لبقاء صغار اسماك الكارب C. carpio المعرضة لتراكيز مختلقة من عنصر الخارصين ولمدة 96 ساعة 1- قبل المعالجةالحيوية 2- بعد المعالجة بـ *P. aeruginosa*	63
7-4	يمثل قيم LT50 لبقاء صغار اسماك الكارب *C. carpio* المعرضة لتراكيز مختلقة من عنصر النحاس ولمدة 96 ساعة 1- قبل المعالجة الحيوية 2- بعد المعالجة بـ *P.aeruginosa*	66
8-4	يمثل قيم LC50 لبقاء صغار اسماك الكارب *C. carpio* المعرضة لتراكيز مختلقة من عنصر النحاس ولمدة 96 ساعة 1-قبل المعالجة الحيوية 2- بعد المعالجة بـ *P. aeruginosa*	67

قائمة الجداول

التسلسل	العنوان	الصفحة
1-3	تراكيز المعادن الثقيلة المستخدمة في التجارب	40
1-4	الاختبارات الكيموحيوية والمجهرية والزرعية للعزلات المقاومة للمعادن	44
2 -4	قيم العوامل البيئية لماء نهر مهروت من درجة حامضية ودرجة حرارة الماء والهواء ونسب الصوديوم والبوتاسيوم .	45
3-4	قيم MTC و MIC لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	46
4-4	قيم MTC و MIC لبكتريا .Staphylococcus sp	47
5-4	قيم MTC و MIC لبكتريا*Bacillus sp* .	47
6-4	قيم MTC و MIC لبكتريا *Nisseria sp.*	47
7 -4	قيم نسب البقاء ، ومتوسط الزمن المميت ، والزمن المميت الكلي ، ومتوسط التركيز المميت LC50 لصغار اسماك C. Carpio بعد تعرضها لفترة (96 – 72- 48) ساعة لتراكيز مختلفة من عنصر الرصاص قبل المعالجة وبعدها Bioremediation ب بكتريا P. aerugenosa	51
8-4	قيم نسب البقاء ، ومتوسط الزمن المميت ، والزمن المميت الكلي ، ومتوسط التركيز المميت LC50 لصغار اسماك C. Carpio بعد تعرضها لتراكيز مختلفة من عنصر الكروم لفترات (96 – 72- 48) ساعة قبل المعالجة وبعدها Bioremediation ببكتريا P. aeruginosa	56

9-4	قيم نسب البقاء ، ومتوسط الزمن المميت ، والزمن المميت الكلي ، ومتوسط التركيز المميت LC50 لصغاراسماك C. Carpio بعد تعرضها لتراكيز مختلفة من عنصر الخارصين لفترات (96 – 72- 48) ساعة قبل المعالجة وبعدها Bioremediation ببكتريا P. aeruginosa	61
10 -4	قيم نسب البقاء ، ومتوسط الزمن المميت، والزمن المميت الكلي ، ومتوسط التركيز المميت LC50 لصغار اسماك C. Carpio بعد تعرضها لتراكيز مختلفة من عنصر النحاس لفترات (96 – 72- 48) ساعة قبل المعالجة وبعدها Bioremediationببكتريا P. aeruginosa	65
11-4	يوضح قيم المعادن الثقيلة في عينات الماء وعضلات الاسماك السيطرة التي تم استخدامها في تجارب الاسماك والمعالجة ببكتريا *P.aeruginosa* .	69
12 -4	يمثل قيم تراكم عنصر الرصاص في عينات المياه وانسجة الاسماك المعرضة لهذا العنصر قبل وبعد المعالجة ببكتريا *P.aeruginosa*	70
13-4	يمثل قيم تراكم عنصر الكروم في المياه وانسجة الاسماك المعرضة لهذا العنصر قبل وبعد المعالجة ببكتريا *P. aeruginosa*	71
-4 14	يمثل قيم تراكم عنصر الخارصين Zn في المياه وعضلات الاسماك لهذا العنصر قبل وبعد المعالجة ببكتريا *P. aeruginosa*	72
15 -4	يمثل قيم تراكم عنصر النحاس في المياه وعضلات الاسماك لهذا العنصر قبل وبعد المعالجة ببكتريا*P. aeruginosa*	73

الفصل الاول

المقدمة
Introduction

الفصل الثاني

استعراض المراجع
Literature Reviews

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials&Methods

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results&Discussion

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions
&
Recomendation

المصادر

References

الفصل الأول - المقدمة

1-المقدمة Introduction

1-1 المقدمة

يُعد التلوث بالمعادن الثقيلة Heavy Metal مشكلة عالمية لها مصدران رئيسيان الأول: طبيعي natural ينتج من الصخور ،وحرائق الغابات والنشاطات البركانية ،وآخر بشري anthropogenic نتيجة تزايد الصناعة ،والتعدين وغيرها من الصناعات التي تؤدي إلى طرح ماء الفضلات غير المعالجة إلى الماء (Guo *etal* ., 2010; Wang 2008)، واشارت بعض الدراسات الى أن خطورة المعادن الثقيلةبسبب سميتها toxicity ، وعدم قابليتها على التحلل non-biodegradability وتراكمها الحيويbioaccumulation داخل الأنظمة الحيوية تؤدي الى تضخيمها الحيوي biomagnifications داخل السلسلة الغذائية food chain (Authman,2008).

صنفت بعض الدراسات المعادن الثقيلة Heavy metal إلى صنفين رئيسين : الاول الضروري مثل النحاس Cu و المنغنيز Mn و الحديد Fe والخارصين Zn ولكن فقط عند التعرض الأمن لها، تعتبر الزيادة في التركيز عن المستوى الطبيعي سامة اما الصنف الاخر فهو غير ضروري مثل الرصاص Pb، و الكادميوم Cd ،و الزئبق Hg،والألمنيومAl، والكروم Cr ، التي لا تتوافر لها اي وظيفة حيوية وهي سامة حتى في التراكيز الواطئة (Nkwelle *et al.*,2012) .

يحتاج الجسم الى 70 عنصراً من العناصر الثقيلة تقريباً لكن هنالك 12 عنصر من هذه العناصر هي سامة مثل الرصاص Pbو الزئبق Hg و الكادميوم Cd و الكروم Cr والنيكل Ni اذ تعمل هذه المعادن بوصفها سموماً بتداخلها مع الوظائف الانزيمية والايضية للجسم (Ekpo *et al* .,2008) ، من بين هذه التأثيرات السامة الضرر الذي يظهر على DNA ، وايضا من التأثيرات السمية الاخرى كالامراض التي تظهرنتيجة التعرض طويل الامد للرصاص وهي امراض فقر الدم ، والسرطان ، وتداخل مع فيتامينD الذي يسبب الغيبوبة ثم الموت عندما يزداد تركيزه في الدم (Naik *et.al*., 2012) .

يعد عنصر النحاس ضرورياً للجسم، والزيادة في تركيزه تسبب ترسبه بالدماغ ،والجلد ،والكبد ،والبنكرياس ،وخلايا عضلة القلب ،وذكرت بعض الدراسات ان توافر عنصر النحاس Cu بتركيز اعلى من 0.1 ملغم/لتر في المحاليل يؤدي إلى تقليل نشاط الكائنات الحية المجهرية (Zaki and farag , 2010) .

يستفاد الجسم من المعادن الثقيلة كعنصر الخارصين Zn الذي يعد ضرورياً إذ يستخدم في مدى واسع من العمليات الخلوية فهو يتطلب لبقاء تركيب الجزيئات الكبيرة

الفصل الأول - المقدمة

مستقرة ، اما الزيادة في تركيزه يؤدي إلى تثبيط السلسلة التنفسية الهوائية و يعمل كعاملاً مساعداً Co.factor لأكثر من 300 انزيم (Hynninen,2010) .

ان استخدام الدلائل الحيوية (Bioindicators) اصبح من الادوات المفيدة في فهم التداخل المعقد بين استجابة الكائن الحي للمؤثرات البيئية ومقاومته للتأثيرات المميتة للكثير منها،وان التفاعل الخلوي للعناصر ينعكس على العمليات الداخلية التي تحدث مع عمليات التراكم مما يعطي صورة واضحة عن سمية العنصر ،كما ان العديد من الاحياء المائية يمكن ان تستعمل بوصفها مؤشراً لنوعية الماء ،إذ ان إضافة ملوث مفاجئ ربما يؤدي الى موتها مما يدل على توافر مادة سامة في المحيط ،الامر الذي يجعلها ذات قيمة عالية مؤشراً للصحة البيئية وقد استخدمت العديد من الاحياء المائية كأدلة حياتية لقياس التلوث المائي بمختلف انواع الملوثات ، وخاصة العناصر الثقيلة مثل النباتات المائية ،والمحار، والسرطان النهري (سلمان وزملاؤه،2010).

يؤدي تلوث المياه بالمعادن الثقيلة إلى تلوث الاسماك التي تعيش في تلك المياه وهذا مايشكل خطراً على صحة الانسان بوصفه المستهلك الرئيس لهذه الاسماك التي تقع في قمة السلسلة الغذائية المائية (Food chain) إذ يحدث فيها تراكم حيوي (Bioaccumulate) داخل انسجة الاسماك وايضاً يحدث لها تضخيماً حيوياً (Bio-magnification) في السلسلـة الغذائية (Nongbri and syiem , 2012) .

يستهلك سمك الكارب *C.carpio* على نطاق عالمي و يتكيف في البيئة المائية الملوثة ،عند تعرض الاسماك للمعادن الثقيلة التي تسبب تأثيرات مؤذية على الاعضاء منها الكبد ، و الخياشيم ، و الغدد التناسلية ومكونات الدم (Vinodhini and Narayanan,2009) .

ذكرت دراسات اخرى أن توافر المعادن بتراكيز مرتفعة قليلاً في المياه الطبيعية يمكن ان تسبب تأثيرات على الكائنات الحية المائية منها تغيرات نسيجية ، أُو شكلية في الانسجة ، والتغيرات في الفعاليات الفسلجية مثل ضمور في النمو، والتطور، وضعف في السباحة والاداء ، وتغيرات في الكيمياء الحيوية لفعالية الانزيمات ، و الدم ، و تغيرات في السلوك مع تغيرات في التكاثر (Shoeb, 2006) .

أما المعلومات الخاصة بتركيز العناصر النزرة في السمك المستهلك فهي مهمة لاجل ادارة البيئة المائية ، فضلاً عن إلى تقييم احتمالية خطر استهلاك الاسماك ، إذ يتم استخدام الكبد ، والعضلات في تحليل تركيز المعادن النزرة ، غالباً ما تتجمع المعادن النزرة في الاعضاء الايضية لاجل إزالة سميتها بوساطة بروتينات الميتالوثايونين Metallothionens (Costa and Hartz,2009) .

الفصل الأول - المقدمة

هناك طرائق تقليدية لازالة المعادن الثقيلة من المياه الملوثة منها الترسيب الكيميائي التبادل الايوني ، التنافذ العكسي،والاستخلاص باستخدام المذيبات هي الاكثر شيوعا في ازالة ايونات المعادن من المحاليل (Das ,2009;Singh and Gadi,2012).

من الطرائق الحديثة استخدام البكتريا في ازالة المعادن الثقيلة وتقليل سميتها والتي تسمى بالمعالجة الحيوية Bioremediation (Safahieh *etal.,*2011) ،إذ تعرف التقانة الاحيائية او المعالجة الحيوية Bioremediation استخدام ايض الكائنات الحية المجهرية لازالة الملوثات، التقنية عموماً يمكن تقسيمها إلى المعالجة في بيئتها الاصلية in situ و خارج بيئتهاex situ (Vijanand *etal*.,2012) ،لا يتم استخدام هذه التقنية لازالة الملوثات بالكامل بل إلى تحويلها إلى مركبات اقل سمية ، وحركة ، وذوباناً (Wasi *et al*., 2010; Vidali , 2001) .

اشار العديد من الباحثين إلى البكتريا ذات القدرة على إزالة الملوثات (المعادن النزرة) مثل*Pseudomonas sp* ، *Aeromonas sp.* ، *Bacillus sp.* ، *Micrococcus sp.*، *Microbacterium sp.* وغيرها (Kannan *et al* ., 2012) .

الهدف من الدراسة :-

جاءت هذه الدراسة لتحقق الاهداف الآتية :-

1- عزل بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* *وتشخيصها* من مياه نهر مهروت في (محافظة ديالى) ودراسة كفاءتها في ازالة المعادن الثقيلة من تلك البيئة .

2- تحديد التركيز المتحمل الأعلى maximum tolerance (M.T.C) concentration والتركيز المثبط الأدنى minimum inhibitory concentration (M.I.C)للبكتريا. .

3- تحديد تركيز المعادن نصف القاتل LC_{50} ، والوقت النصف قاتل LT_{50} لصغار اسماك الكارب الاعتيادي *.C .carpio*.

4- تحديد كفاءة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* في المعالجة الحيوية Bioremediation للمعادن من خلال رفع نسب البقاء وزيادة متوسط الزمن القاتل وتقليل التركيز نصف قاتل.

2-استعراض المراجع Literature review

2-1 المعادن الثقيلة Heavy Metal :-

خلال العقدين الماضيين اصبح مصطلح المعادن الثقيلة كثير الاستخدام في كثير من الابحاث والدراسات الخاصة بالمواد الكيميائية الخطرة (Duffus, 2002) .

يشير مصطلح المعادن الثقيلة إلى اي عنصر معدني له كثافة عالية نسبياً ، وسمية عالية وتعرف هذه العناصر بالعناصر النزرة Trace Metal،كما تعرف العناصر الثقيلة بانها تلك العناصر التي تزيد كثافتها على خمسة اضعاف كثافة الماء 5 ملغم/سم^3 (Salem *et al*., 2002) .

اختلف الباحثون في تحديد مستوى الكثافة الذي معه تكون هذه العناصر عناصر ثقيلة فمنهم من قال بانها تلك المجموعة من العناصر التي لها كثافة ذرية اكثر من 5 ملغم/سم^3 (Abdelatey *et al*., 2011) وفي دراسة اخرى ذكرالباحثان بانها تلك المجموعة من العناصر التي تمتلك كثافة ذرية اكثر من 6 ملغم/سم^3 (Ekpor and Muchie , 2010)، بينما عرفتهاShoeb (2006) بانها تلك المجموعة من العناصر التي لها كثافة ذرية اكثر من 4 ملغم/سم^3.

صنفت بعض الدراسات المعادن الثقيلة إلى أكثر من صنفين ، منهم من صنفها إلى ثلاثة أصناف ،الأولى الضرورية وغير السمية أساسا essential and basicallynon toxic مثل ايونات الكالسيوم Ca^{+2}، وايونات المغنيسيوم Mg^{+2} ، بينما الصنف الثاني فهو الضروري Essential لكنها ضارة في التراكيز العالية مثل ايونات الحديد Fe^{+2}والمنغنيز Mn^{+2} ، و الخارصين Zn^{+2} ، و النحاس Cu^{+2} ، والكروم Cr^{+2} ، إما الصنف الثالث فهو غير الضرورية والسامة في اقل التراكيز مثل الزئبقHg^{+2}والكادميوم Cd^{+2} والرصاص Pb (Muneer , 2005) ،و تقسم العناصر المعدنية ذات الأهمية لغذاء الإنسان إلى عناصر معدنية كبرى (Macroelements) ، و عناصر معدنية صغرى (Microelements) و التي تسمى بالعناصر النزرة (trace metals) التي يحتاجها الجسم بتراكيز ضئيلة تقدر بالملي غرامات لتنظيم بعض الوظائف الحيوية للجسم والمحافظة على الصحة وإدامة الحياة وان نقصها بالغذاء يؤدي إلى ظهور إعراض مرضية بالجسم، وهنالك خمسة عشر عنصرا نزرا منها الحديد، والزنك ،والنحاس ،و المنغنييز ،والسلينيوم ،واليود ،والفلور ،والموليبديوم ،والكروميوم ،والنيكل ،والسليكون ،والفانديوم ،والزرنيخ (منخي،2010).

تأتي خطورة المعادن الثقيلة من عدم قابليتها على التحلل الحيوي non-biodegradability وتراكمها الحيوي bioaccumulation في الكائنات الحية مسببة مختلف الإمراض الخطرة (Nasrazadani *et al*., 2011).

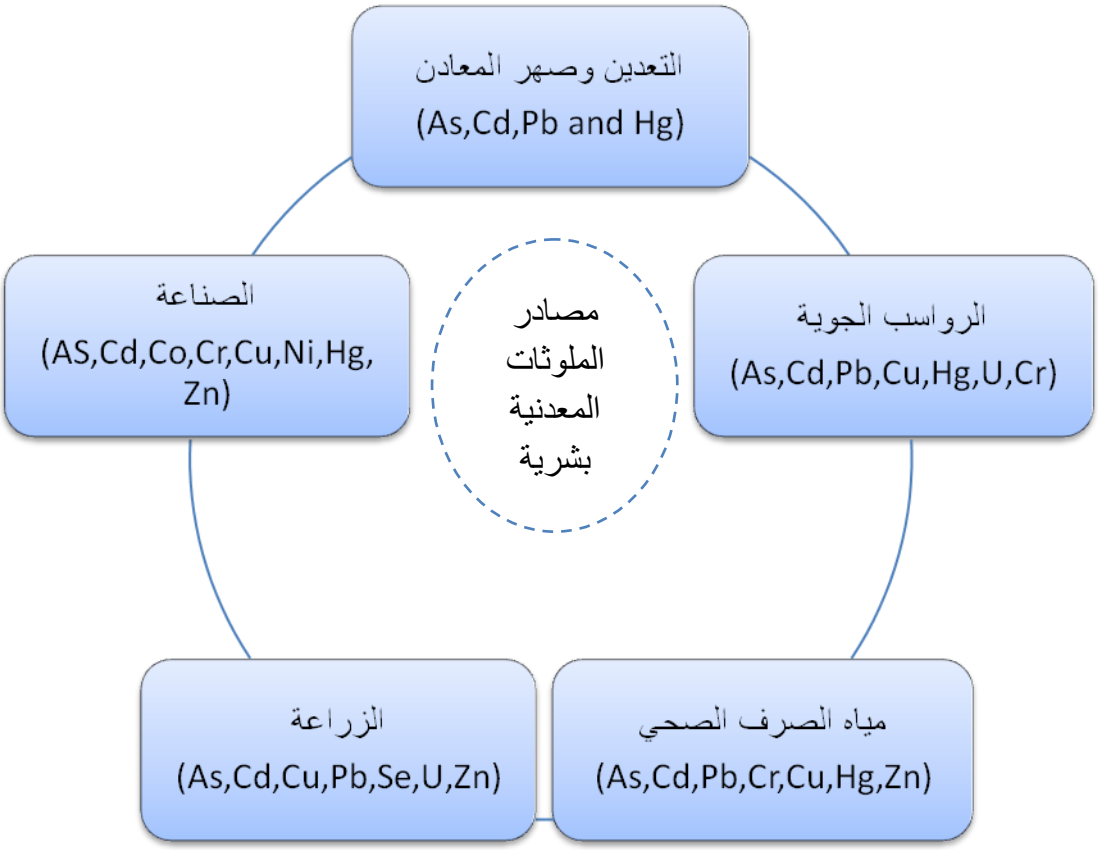
تعد المعادن الثقيلة احدى اكثر الملوثات للماء على خلاف الملوثات الأخرى بوصفها صعبة الاختزال ،ولها القابلية على التراكم في كافة انحاء السلسلة الغذائية كافة مما نتج عنها اضطرابات للصحة البيئية ، إذ تتلوث المياه الجوفية كالابار ،والينابيع ،والانهر، والبحار بالمعادن الثقيلة نتيجة صب مياه الصرف الصحي للمنازل ،والمخلفات الصناعية الحاوية عليها ،إن توافر المعادن الثقيلة في البيئة وتراكمها يكون أما نتيجة مباشرة بسبب البراكين وغيرها من العمليات الجيولوجية اوغيرمباشر من النشاطات البشرية anthropogenic (Ekpor and Muchie , 2010) .

تتوفر المعادن الثقيلة في البيئة المائية بصيغ كيميائية مختلفة منها العناصر الثقيلة الذائبة (Dissolved heavy metals) التي هي ايونات العناصر أو بعض مركباتها الكيمياوية التي لها القابلية على المرور خلال مرشحات ذات فتحات مقدارها 0.45 مايكرون وتتوفر هذه العناصر كايونات حرة او مركبات كيمياوية لاعضوية او عضوية، ويكون بعضها متصل بالجزيئات الغروية والعناصر الثقيلة العالقة (Particulate heavy metals) والتي تشمل الجزيئات التي تكون اقطارها اكبر من 0.45 مايكرون ويمكن تقسيم الاخيرة الى نوعين ، الاولى احيائية (Biotic)وتشمل العناصر التي تتوفر في الاحياء المجهرية كالهائمات النباتية والحيوانية والبكتريا والفطريات وبعض نواتج الفعاليات الحيوية ، والنوع الثاني لا احيائية (abiotic) وتشمل العناصر الثقيلة التي توجد في المركبات الكيمياوية العضوية ، واللاعضوية مثل جزيئات الطين (Clays) ، والغرين (Silts) ، والكوارتز ، والمركبات السليكية، (Siliceous) وبقايا الكائنات الحية الميته ، فضلا عن المركبات الناتجة من اتحاد الجزيئات الذائبة والغروية والمركبات العضوية مثل (Humic acid) و(Amino acid).وتقسم العناصر الثقيلة المتوافرة في المواد العالقة الى العناصر الثقيلة المتبادلة (Exchangeable Metals) والعناصر الثقيلة المتبقية (Residul Metals)(فهد،2006).

تحتاج الخلايا الحية ايونات المعادن مثل النحاس Cu ،و النيكل Ni، و الكوبلت Co ، و الحديد Fe، إذ تعد هذه المعادن ضرورية لكل الكائنات الحية بسبب استخدامها بوصفها عاملاً مساعداً co factor وعنصر تركيبي في الانزيمات والجزئيات الأخرى ، بينما العناصر الأخرى التي تعد غير ضرورية ،وسامة وليس لها اي دور حيوي مثل الرصاص Pb ، و الزئبق Hg ، و الكادميوم Cd ، والفضة Ag ، والزرنيخ As إذ يؤدي توافرها في الجسم إلى حدوث اضراراً في تضاعف الDNA الذي يسبب موت الخلية ، واضراراً

او اختزالاً في الجهاز العصبي المركزي و تلفاً في تركيب الدم ، والكلية ، والرئة ، والكبد ، والاعضاء الأخرى (Shoeb , 2006) .

كما أن بعض العناصر النزرة تسبب تسمماً غذائياً مثل الرصاص ،والزئبق ،والكادميوم التي تعد من اخطر الملوثات الصناعية التي تلوث التربة ، والماء ، وتنتج هذه من مخلفات المصانع، وعوادم السيارات ، وصهر المعادن فضلا عن المبيدات الزراعية (صاحي وحسن,2006). و هنالك مصادر عدة للتلوث بالمعادن الثقيلة نتيجة النشاط البشري الشكل (2-1)



شكل(2-1)اهم النشاطات البشرية التي تؤدي إلى التلوث بالمعادن الثقيلة (Ahemad,2012)

استخدمت العديد من الاحياء بوصفها دلائل حياتية بما فيها الحشرات المائية ، والاسماك، وأُحادية الخلية Protozoa والنباتات، والقشريات . وغالباً مايكون التلوث بالعناصر الثقيلة في الانظمة البيئية المائية اكثر وضوحاً في الرواسب والنباتات الراقية والاحياء المائية مما هو الحال في تراكيز المياه(فهد،2006).

2-1-1 الخارصين (Zn) Zinc

هو من المعادن الضرورية لوظائف الكائنات الحية إذ يعد مغذياً دقيقاً micronutrient يدخل في تركيب البروتينات والإصباغ ويستخدم في عمليات الأكسدة والاختزال redox وتنظيم الضغط الازموزي وتنظيم الايونات ، وتركيب إنزيمات الخلية (Bong *et al* ., 2010) .

ان المستويات العالية للخارصين في البيئة المائية تعود إلى مياه الصرف الصحي ،و مبيدات الحشرات، والمخلفات الصناعية ،وله تأثيرات ضارة على الأسماك مثل الضرر الهيكلي الذي يؤثر على نمو الأسماك وتطورها وبقاءها ،كما إن توافر بعض المعادن الأخرى الذي من الممكن أن يُسبب اضطرابات في أيض الأسماك مثل السلوك غير الصحيح ،وفقدان الشهية ،والحركة بالنسبة للأسماك(Mishra *etal*.,2012)،يعد الخارصين ساماً للأسماك عندما يكون مذاباً (وقد تقتل الأسماك بتركيز 2 ملغم/ لتر خلال ساعات قليلة) ، وإذا كانت الكمية اقل من هذه فإنها تؤدي إلى الهلاك إذا استمر توافرها لفترات أطول ، وتزداد القابلية السمية للخارصين كثيرا في حالة وجود النيكل ،والنحاس في نفس الوقت(فهد،2006).

كما يلعب دوراً مهماً في تطور النمو وتمايز كل الأنظمة الحية من البكتريا إلى الإنسان، ويعد مهماً في مكونات أكثر من 200 إنزيم إذ يتوافر بشكل خاص Zn^{+2} (Peltier , 2010) ،له كثافة تبلغ 9.16 ملغم/سم^3 (Pires ,2010) .

على الرغم من كونه من المعادن الضرورية ،إلا إن الزيادة في تركيزه تؤدي إلى التسمم ، إذ يحدث التسمم بشكلين الحاد ،والمزمن تتضمن التأثيرات الحادة المضادة للكميات العالية من الخارصين غثياناً، وتقيأ ،وفقداناً للشهية، وتشجنات، واسهال، وصداع ، بينما التأثيرات المزمنة لنقصه فهي نقص الاستجابة المناعية ، و قلة مستوى البروتينات الدهنية عالية الكثافة (Bashisha , 2012) .إما نقص Zn في الحيوانات وبضمنها الإنسان تؤدي إلى عدم اكتمال النمو، وعدم النضوج الجنسي للذكور.التراكم الكثير لـZn تسبب تأثيرات ضارة مثل زيادة في امكانية حدوث فقر الدم ، التركيز القياسي لـ Zn بحسب تقارير منظمة الصحة العالمية (WHO) 500 ملغم/لتر (Tayyeb., 2004) وايضا التراكيز الاعلى للتعرض للـ Zn هو 5000 ملغم/لتر. نَقْصِ Zn في الحيواناتِ يَتضمّنُ فقدانَ الشَعر وجروحَ في الجلدِ وإسهالِ(Pires,2010) .

2-1-2 الكروم Chromium

اكتشف اول مرة في الخام السايبيري ، وعرف بالرصاص الاحمر في 1798 من قبل الكيميائي الفرنسي Vangelin (Ahmad *etal.,* 2009) ، وهو احد المعادن الثقيلة يرمز له بالحرف Cr وله عدد ذري 24 يعود إلى المجموعة الانتقالية السادسة في الجدول الدوري .كما انه عديم الطعم والرائحة وله درجة انصهار ،1907C ،وكثافة ذرية 6.3 ملغم/سم^3. وهو احد المعادن النزرة السامة إلى الكائنات الحية عند التراكيز العالية بالاعتماد على الحالة التأكسدية (Assefa , 2010) يتوافر في تسع حالات تأكسدية من -2 إلى +6 (Smith *et al* , 2006; Ahmad *et al* ., 2009) .

شكلين فقط من هذه الحالات هي مهمة هما(Cr(lll و Cr(Vl) بوصفها اكثر الحالات التأكسدية استقراراً في البيئة الطبيعية (Das , 2009) .

Cr(lll) يتوافر في الطبيعة بشكل مستقر في البيئة ،Cr(0) لا تحدث في الطبيعة بينما Cr(Vl) قادر على التوفر في الطبيعة إذ يتوفر الكروم Cr في الطبيعة كـCr(lll) بينما Cr (Vl) في البيئة فيشتق من نشاط البشر Cr(lll) من المغذيات الاساسية لكن الإنسان يحتاج إلى كميات قليلة جداً منه (Assefa , 2010) .يتوفر الكروم في الطبيعة في عدد من الاغذية وفي مياه الشرب ، ضرورياً بوصفه مغذياً دقيقاً لاجل النمو لكائنات حية مجهريةعدة لاجل المحافظة على ايض الكلوكوز ، الكليسيرول ، والحوامض الدهنية(Ahmad *et al*.,2009).

اعلى تركيز يسمح التعرض له من Cr(Vl) هو 50 ملغم/ لتر حسب ما جاء عن VAEPA 2008 و WHO 2008 و Indian 2005 (Gegrekidan and Samuel, ,2011)

إن كروم نوع لـ Cr(lll) يستخدم أساسا في السيطرة على سكر الدم في حالات مرض سكر الدم والخلل في تحمل الكلوكوز ،وقد يفيد الكروم في تقليل السمنة وتحسين كتلة الجسم (UPDATED,2009). إذ يعد التعرض للكروم مسبباً رئيسياً لحدوث الامراض السرطانية *(Rengaraj et al .,2003*) . يؤدي التعرض الحاد ل Cr(Vl)إلى خسارة قابلية التنظيم الازموزي ،والتنفس في الأسماك، أما التاثيرات المزمنة لسمية الكروم منها تتضمن تغيرات نسيجية وانخفاض في النمو ،والبقاء، وضعف مناعي (Nkwelle,2012) .والعديد من الكائنات الحية المجهرية لها القابلية على اختزال Cr^{6+} الى Cr^{3+} اقل ذوبانا وسمية *Bacillus ،Acinetobacter، Pseudomonas sp.، Ochrobactrum sp.، Desulfovibrio vulgaris* و *Cellulomonasspp* (Venil et al ..,2011)

3-1-2 الرصاص Lead Pb

معدن ثقيل لونه رمادي مزرق، له درجة انصهار منخفضة يمكن تشكيله بسهولة في قوالب ويمكن إن يندمج مع المعادن الأخرى لتشكيل سبائك ،لهذا يستخدم الرصاص من قبل البشر منذ الآلاف السنين ، يشكل الرصاص حوالي 0.002 % من قشرة الأرض ويتوافر في الطبيعة بشكل رئيس ك (كبريتيد الرصاص) إذ يوزع الرصاص على نحو واسع في المحيط الجوي ,الرمز الكيميائي للرصاص هو Pb من الاسم اللاتيني Plumbm له عدد ذري 82 ووزن ذري 207.2 له كثافة ذرية $11.34\ gm/cm^3$ ودرجة انصهار 327.46 C° او 621.43 F (WHO, 2010) .

يعد الرصاص من المعادن غير الضرورية والسامة حتى في أدنى التراكيز، إذ إن توافره في تراكيز عالية في البيئة فأن له تأثيراً مثبطاً على معظم الأحياء المجهرية (Shoeb,2006;Nasrazadani *et al*.,2011)إذ يبلغ عمر النصف 5000 سنة تقريباً فيكون له مدى واسع من الاستخدامات في البطاريات ،و الصناعة البترولية ،و الاصباغ ، والسيراميك ، والزجاج الملون .

من المهم ملاحظة الاضطرابات الرئيسة التي يسببها الرصاص وهي الضعف في التكاثر ،و فشل كلوي في الإنسان ، ويؤدي التعرض لفترات طويلة لعنصر الرصاص إلى فقر الدم، وسرطان ،وتداخل مع فيتامين D الذي يؤدي إلى غيبوبة وموت (Naik *et al* , 2012) .كما أن له تأثيرات واسعة على الجهاز العصبي(Bellinger , 2011) .يحدث التسمم بالرصاص في كلا الطريقتين الحاد والمزمن أكثر مشاكل التسمم بالرصاص و تحدث بين الاطفال ،والتسمم الحاد للرصاص يمكن أن يحدث فورا وذلك نتيجة الاستنشاق المباشر لكميات كبيرة من غبار وادخنة الرصاص في الهواء أما التاثيرات المزمنة للرصاص يحدث نتيجة التعرض الطويل الامد للرصاص وحتى في التراكيز المنخفضة لكن ثابتة التسمم المزمن أكثر خطورة من الحاد ويمكن أن يكون نتيجة الاستنشاق الدائم او ابتلاع الرصاص،و هذا يؤدي إلى تراكمه بالعظام وايضا يؤدي ضعف في الذاكرة والعضلات واضرار عصبية قد تصل إلى الغيبوبة ثم الموت (Blacksmith Institute,2011).

ايونات الرصاص Pb^{2+} تدور خلال الدورات البايوجيوكيميائية وتنتهي بالاخر على السطح او في المياه الجوفية . (Dawei*et al* ., 2011) .تعرض الأسماك للرصاص يسبب تأثيرات تظهر على الغلاصم ترتبط بزيادة انتاج المخاط وعرقلة في توازن الكالسيوم يؤدي إلى اختناق تنفسي(Nkwelle,2012).التركيز القياسي المسموح بتوفره في ماء

الشرب بحسب USEPA 2008 15 ملغم/لتر و10 ملغم/لتر لكل من Eu 1998 وWHO 2008 (Gebrekidan and Samuel,2011) .

4-1-2 النحاس Copper (Cu)

أيون مهم لكل من الخلايا حقيقية النواة Eukaryotic وبدائية النواة Prokaryotic إذ يعد من المغذيات الدقيقة micronutrient لكلا المملكتين ، لكن له تأثيرات سامة عند زيادة التركيز عن المستوى الطبيعي (Ojo *etal*,2008) .

يقع النحاس في المجموعة B من الجدول الدوري ،يمثل حوالي 0.1 % من القشرة الارضية ،لونه احمر تقريبا ولين ،النحاس قليل السمية للثديات والحيوانات الارضية إذ أنه اكثر سمية للافقريات ،والنباتات، والاحياء المجهرية (Wang,2008)،والنحاس عنصر نزر ضروري يلعب دوراً مهماً في علم وظائف الحيوان بالأخص في النمو الجنيني ،والتطور المبكر لتركيب الهيموغلوبين ،ونضوج الانسجة الرابطة بالأخص في القلب والاوعية الدموية وفي تطور العظام ايضا ضروري لعدد من الحيوانات الفقرية بالأخص الأسماك وله وظائف عدة بالاضافة لما ذكر إذ أن له دوراً حيوياً في التنفس الخلوي، و نقص النحاس يؤدي إلى اضطرابات فسيولوجية (Ahan and Akpoilih,2012).

يعد ساماً في حالة المستويات الاعلى , إذ يتوافر بشكل ايونات النحاس ثنائية التكافؤ Cu(ll) يسبب مشاكل خطرة تعرف عادة بترسبه في الدماغ ، الكلية ، البنكرياس وغشاء القلب (Zaki and Farag,2010)ويعمل بوصفه عاملاً مساعداً لاكثر من 30 انزيم مختلف مثل alcohol dehydrogenase، phosphatase، catalase، peroxidase،superoxide dismutase، oxygenase، cytochrome oxdase، copper-zinc super oxid dismutase (Ajan and Akpoilih,2012) .كما يدخل في تركيب انزيم Tyrosinase و انزيم Dopamine-B-hydroxylase (العلي،1999).

على الرغم من اهميته في الكائنات الحية المائية إلا إن له تأثيراً ساماً على الاحياء المائية من خلال ارتباطه السريع بأغشية الغلاصم وتداخله في عمليات التنظيم الازموزي للنحاس ، يوجد النحاس في عمود الماء كأيونات ذائبة وجزء من المركبات العضوية واللاعضوية ، ويسبب التسمم إلى الحيوانات المائية من خلال حدوث ضرر بالغلاصم و تعتمد سمية النحاس على عدد من مقاييس الماء بضمن ذلك pH ،و القاعدية ، والكاربونات العضوية الذائبة (EPA , 2006) .

ان سمية النحاس للاسماك تتأثر بنوع ومرحلة حياة وحجم السمك ، إذ يعيق نمو وتطور سمك السلمون في مراحل الحياة الاولى وايضا تبين ان تعرض الأسماك لخليط من النحاس والخارصين والنيكل يؤدي الى زيادة افراز المخاط ، وفقدان الشهية ،وزيادة حركة الزعانف(Nkwelle,2012) ،وتزداد سميّة هذا العنصر في حالة توافر بعض المعادن الاخرى مثل الخارصين، والكادميوم ولهذا العنصر اهمية كبيرة عند توفره ضمن المستويات الواطئة والملائمة للاحياء ، اذ سجل توافر النحاس في دم الاسماك كمعقد بروتيني يدعىCeruplasmin والذي يعتقد ان له ادوار انزيمية غير محددة بشكل دقيق ، فضلا عن اهمية هذا العنصر في العديد من التراكيب الخلوية الاخرى، واعاقة الثبات الفسلجي، واختزال التنظيم الازموزي من خلال تثبيط عمل انزيم ATP_{ase}مما يجعل هذه الاحياء اكثر حساسية للاصابةبالامراض، كما قد تحصل تشوهات خطيرة لانسجة الاسماك خصوصا في الغلاصم ،والكبد فضلا عن الانخفاض في خزين الطاقة كنتيجة للاجهاد وانتهاء بهلاك الكائن (فهد،2006).

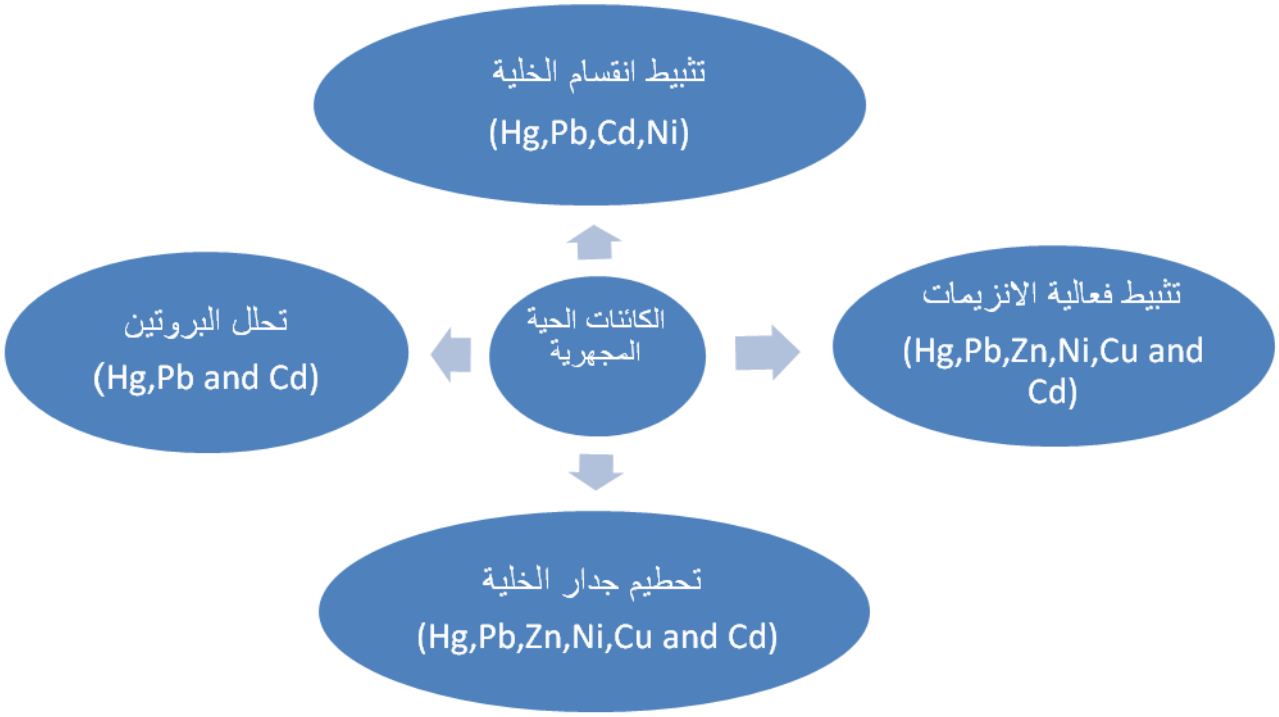
وتذوب املاح النحاس بالماء مما يجعل سميتها عالية في العديد من الحيوانات المائية تحدث سمية النحاس من خلال احداث اضرار في التنظيم الازموزي والايوني في الغلاصم ،إذ عند دخول ايونات النحاس الثنائيةCu^{+2} الى الخلية تختزل الى cu^{+} من المعروف أن لهذه الحالة التأكسدية الفة عالية للارتباط بمجموعة ال sulfhydryl (Okocha and Adedeji,2012).

2-2سمية المعادن الثقيلة

تصبح المعادن الثقيلة سامة في التراكيز فوق الطبيعية التي تحتاجها الخلية ،وذلك بتكوينها مركبات غير متخصصة، وتقوم الخلية بربطها بالمغذيات التي تحتاجها ، وغالباً ما ترتبط المعادن الثقيلة التي لها رقم ذري عالٍ هي (Ag , CD , Hg) إلى مجموعة Sulfhydrylوتقوم بتثبيط الموقع الفعال لبعض الانزيمات بوساطة تفاعلها مع مواقع الربط ، وبعض المعادن الثقيلة تتفاعل مع الايونات الوظيفية وتثبط فعاليتها (Burnley, 2000) .

يحدث التسمم بالمعادن الثقيلة نتيجة التراكم الكثير للأيونات المعدنية الضرورية ،او نتيجة التعرض إلى المعادن غير الضرورية مثل الرصاص والزئبق ،على العكس من الملوثات العضوية الأخرى التي يمكن أن تتحلل ذاتيا إلى مركبات غير سامة نسبيا ، والملوثات المعدنية لايمكن أن تتحلل ذاتيا (Peca,2009) بل يمكن أن تؤدي التراكيز العالية للمعادن الثقيلة إلى تأثيرات سامة على المجموعات البكتيرية ايضا اذ تؤدي إلى

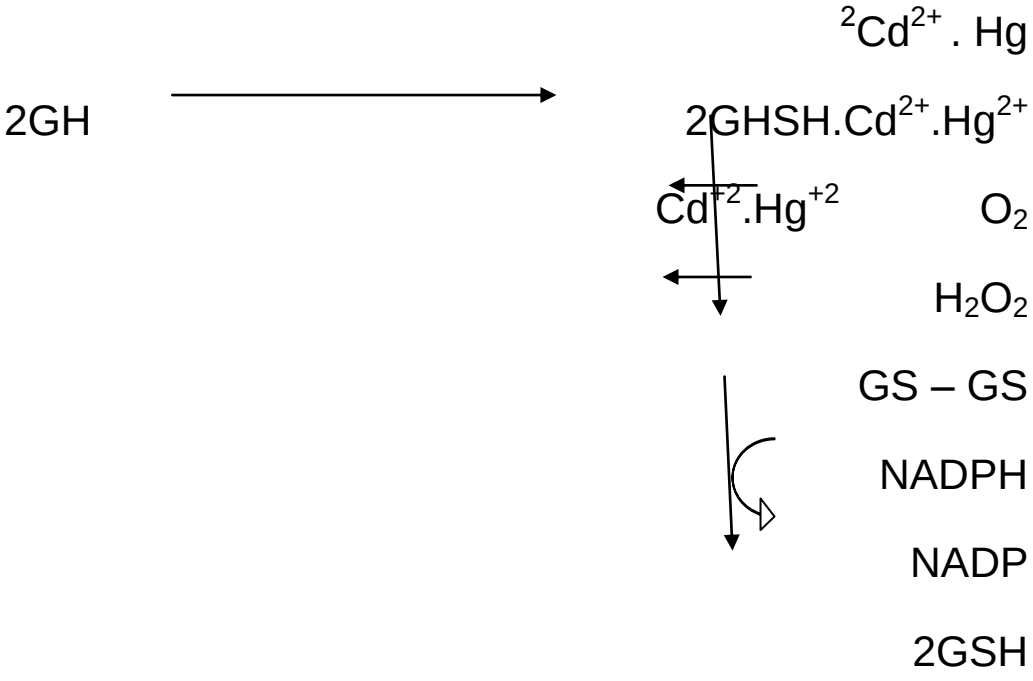
اختزال كامل للكتلة الحيوية البكتيرية وايضا يقلل عدد المجموعات البكتيرية خاصة ويمكن إن يغير تركيبها ، إن التراكيز العالية تثبط المجموعات البكتيرية إما بالكامل من خلال تثبيط مختلف النشاطات البكتيرية مثل تحلل البروتين ،وتثبيط انقسام الخلية ،و تلف في غشاء الخلية ، إن بعض الكائنات الحية يمكن إن تطور آلية تحمل او مقاومة للمستويات العالية من المعادن الثقيلة، و كما مبين بالشكل(2-2) (Shukla et al.,2010).



شكل(2-2)آلية سمية المعادن الثقيلة للبكتريا

تحدث سمية ايونات المعادن الثقيلة داخل الخلية من خلال ابعاد الايونات المعدنية الضرورية من مواقع ارتباطها الاصلية، او من خلال تفاعلات ربط بمركبات اخرى إذ ان المعادن الثقيلة بالاخص ذات الوزن الذري العالي مثل الزئبق ،والكادميوم، والفضة تميل الى الارتباط بمجموعة ال SH بارتباطها هذا تقوم بتثبيط نشاط ،أو وظيفة الانزيمات الحساسة (Jiri *et al*.,2011) .

ترتبط المعادن الثقيلة الاخرى في البكتريا السالبة لصبغة غرام بـ glutathione مما ينتج عنها تفاعل معقد مع جزيئة الاوكسجين لتشكيل bisglutathione مع أيون موجب، وبيروكسيد الهيدروجين الذي يكون ساماً للخلية ،إذ تدخل الايونات الموجبة الى داخل الخلية بالاخص التي تمتلك رقماً ذرياً عالياً وبذلك ترتبط الى مجموعة SH مما يؤدي إلى تثبيط فعالية الانزيمات الفعالة (Muneer , 2005) .وكما مبين في المخطط رقم (2-1).



مخطط (2-1) ارتباط أيونات المعادن مع مجموعة SH في تفاعلات الأكسدة ،والاختزال اذ ترتبط المعادن مع Glutathione وتشكلbisglutathion ،التي تتفاعل مع جزيئة الأوكسجين لتشكل ايونات موجبة للمعادن وجزيئة H_2O_2 ,bisglutathion مؤكسدة (Muneer , 2005).

تنتقل هذه المعادن النزرة عبر السلسلة الغذائية من الكائنات الحية الدنيا كالقشريات، والطحالب ،والاسماك التي تعيش في البيئة المائية وتعمل مراكمات حيوية لهذه المعادن التي تقوم بتجميعها في انسجتها بتركيز يزيد عن عشرة اضعاف تركيزها الاصلي في البيئة المائية لتصلها إلى الإنسان في قمة السلسلة الغذائية ،عند دخول هذه المعادن إلى جسم الإنسان تعمل إنزيمات تدعى (Microsomal mono-oxygenase) ، تتوافر بالكبد و تعمل على تنشيط هذه المعادن ،مما يسبب حدوث طفرة تدعى بالطفرات العكسية (Reverse mutation) وان تراكم هذه الطفرات يسبب السرطان Cancer(صاحي وحسن,2006).

يمكن إن تتداخل المعادن الثقيلة مع الايض المتعلق بالتراكيب غير المعدنية لكون مواقع ارتباط المعادن غير متخصص بمعدن معي والمعادن المتشابهة بالتركيب والشحنة يمكن إن ترتبط بتنافس إذ عند تواجد المعادن الثقيلة يمكن إن ترتبط إلى أي من هذه المواقع ، على اية حال بعض المواقع تعد اكثر حساسية من الأخرى لذلك فأن الارتباط عند هذه المواقع يسبب ضرراً اكبر للخلية من ارتباطها إلى مواقع الاقل حساسية (Burnley , 2000) .

2- 3 التراكم الحيوي للمعادن الثقيلة في الاسماك Bioaccumulation of Heavy Metal in Fish

السمك مصدر غذائي مهم لجسم الإنسان إذ يجهز الجسم بالحوامض الدهنية Fatty acid الضرورية مثل Omega3 ، والفيتامينات (Ozuni*et al* ., 2010)،اذ أصبح السمك اليوم المجهز الرئيس للبروتين بالاضافة للحوم ،ومنتجات الدواجن اذ يسهم بنسبة كبيرة من البروتين الغذائي في أكثر البلدان الاسيوية بالاخص في المناطق الجنوبية الشرقية من اَسيا مثل تايلند واندونيسيا وماليزيا يعد الوجبة الرئيسة لما يمتلكه من قيمة بروتينية عالية بالاضافة للمعادن مثل الكالسيوم والفسفور والنحاس البروتينات ، والمعادن (Alina *et al*.,2012).

إن دراسة التراكم الحيوي للعناصر الثقيلة في الأسماك له اهمية كبيرة إذ يستخدم بوصفه مؤشراً او دليلاً حيوي bioindecator تعتمد فكرة استخدام الكائنات الحية أو بيئتها لتقييم مدى تلوث البيئة من جهة ، وتجنب استهلاك الأسماك الملوثة من جهة اخرى نظراً لما تملكه هذه العناصر من مخاطر على صحة الإنسان(سلمان واخرون،2010).

من بين الانواع السمكية التي تناولتها الكثير من الدراسات سمك الكارب الاعتيادي *Cyprinus carpio* اذ يعد احد اهم انواع السمك في العالم بوصفه ذا قيمة غذائية ، و الموطن الاساس لسمك الكارب هو اسيا و هو واسع الانتشار في اوروبا اذ حرص المهاجرون الاوربيون على نقل اسماك الكارب إلى المياه العذبة الامريكية اذ اول ما وجد في نهر Hudson في نيويورك (Baldry , 2000) . سمك*C .Carpio*هو النوع المستهلك المهم الذي له رد فعل تكيفي في البيئة المائية الملوثة ، الخياشيم هي العضو الذي يتعرض مباشرة للماء الملوث بالمعادن الثقيلة التي تتوافر بشكل ايونات ، وعندما يتعرض السمك لها تسبب تأثيرات سامة ، وضارة على اعضائه منها مثل الكبد ، والغلاصم ، والغدد التناسلية ، ومكونات الدم (Vinodhini and Narayanan,2009) .

الكائنات الحية المائية لها القابلية على تجميع كميات كبيرة من المعادن الثقيلة من مصادر مختلفة من ضمنها الرواسب ومن تآكل التربة، و الغبار، واطلاق نفايات غير المعالجة ، لذا تراكم المعادن الثقيلة في الكائنات الحية المائية يمكن إن يكون له تأثير بعيد المدى على الدورات في الطبقات البيئية ، المعادن الثقيلة يمكن إن تؤثر على معدل نمو الاسماك بينما يقع السمك في قمة السلسلة الغذائية المائية لذا تركز كميات كبيرة من المعادن نتيجة التراكم الحيوي bioaccumulation للمعادن الثقيلة يعود إلى الاختلاف في المصدر، وفترة التعرض للمعدن لمختلف الانواع السمكية (Rauf , 2009) .

يتم قياس التراكم الحيوي للمعادن بوساطة جهاز Atomic Absorption Spectrophotometry (Anji,2011;Kuppardt,2010) .

يتم تراكم المعادن في الأسماك عن طريقين : مباشر من الماء إذ تمتص الأسماك المعادن عن طريق الجلد ، و الخياشيم ، أو عن طريق غير مباشر مع الطعام ، أي عن طريق تغذية الأسماك على الكائنات الحية الأخرى والتي تحوي اصلاً على مستويات مختلفة من هذه العناصر داخل اجسامها والمنتقلة بالتالي إلى الاسماك المقتاتة عليها ضمن مستويات التغذية المختلفة(العلي،1999;Bochek,2008 ., *et al* Bochek).

في الأنظمة البيئية المائيةِ مثل الماء العذب هنالك عوامل عدة تؤثر على قابلية تراكم المعادن الثقيلة في السمك تتضمن هذه العوامل خصائص المعدن نظرا لقابلية ذوبانه ، و العوامل الفيزيوكيميائية كالأس الهيدروجيني ، ودرجة الحرارة ، والكاربون العضوي المذاب ، و الاوكسجين المذاب ، و القاعدية ، و عكرة الماء ، و مجموع المواد الصلبة الذائبة ، و التوصيل الكهربائي(Nkwelle,2012).

لقد وضع المجلس الوطني الاسترالي للصحة والبحث الطبيANHMRCمستويات مسموح عنها توفر العناصر في الاغذية البحرية إذ حدد للرصاص ppm2.00 و الكادميوم ppm2.00 و النحاس ppm30.0 والخارصين ppm1000 والزئبق 0.50 ppm (Alinnor and Obiji,2010).

هناك دراسات عدة تتعلق بتراكم عنصر الكروم Cr فقد اشار كل منRauf وزملاؤه(2009) في الدراسة التي اجروها على ثلاثة انواع من الاسماك حيث كان تراكمه في سمك *Catla* حوالي 3.85 ملغم/غرام وفي سمك *Labiorohita* كان3.40 ملغم/غرام وسمك .*Cirrhinasp* كان تراكمه حوالي3.50 ملغم/غرام.

2- 4 طرق معالجة المعادن الثقيلة .

2- 4-1 العمليات الفيزيوكيميائية لمعالجة المعادن الثقيلة Physicochemical Remedition Processes of Heavy Metal

هنالك طرائق عدة تقليدية مستخدمة لازالة المعادن الثقيلة لكن الطرائق الاكثر كفاءة واستخداماً هي الترسيب الكيميائي ، Chemical precipitation والتبادل الايوني Ion exchange ، والتنافذ العكسي Revers Osmosis (Singh &Gadi , 2012) .

2- 4-1-1 الترسيب الكيميائي Chemical Precipitation

يتم الترسيب الكيميائي بوساطة اضافة مواد مجلطة مثل الشبalum ، والكلس lime ، و املاح الحديدiron salt ، ومركبات كيميائية عضوية اخرى .هذه العملية فعالة جداً في التراكيز العالية فقط لكن لها اضرار وهي انتاج كميات كبيرة من الاوحال التي تحوي مركبات سامة تنتج خلال العمليات المعدنية إذ من الصعب فصل الجزيئات منها إذ أن لها تكلفة عالية إذ تعد غير صديقة للبيئة رغم كفائتها (Ahalya *et al* ., 2003) .

2- 4-1-2 التبادل الايوني Ion Exchange

في هذه العملية ترى الايونات المعدنية للمحلول المخفف تتبادل مع الايونات المحمولة بوساطة قوة كهربائية مستقرة على راتنج التبادل ، من أضرارها أنها عالية التكلفة وجزئية في ازالة ايونات معادن معينة فقط (Trangini , 2009)

2- 4-1-3 التنافذ العكسي Revers Osmosis

هي العملية التي تفصل فيها ايونات المعادن الثقيلة بوساطة اغشية نصف نفاذة في ضغط اكبر من الضغط التنافذي المسبب اذابة المواد الصلبة في مياه الفضلات ، هذه العملية كفوءة جداً ولها اضرار وهي انها لها تكلفة عالية وتحتاج إلى ضغط عالٍ و أغشية متدرجة (Mabel *etal*.,2001) .

في هذه العملية المواد الصلبة تزال بوساطة التجلط الكيميائي Chemical coagulation مع كلوريد الحديد Ferric chloride بعد ذلك تعامل بواسطة امتصاص الشوائب المذابة مع الكاربون النشط (James and Edward , 2006) .

الطرائق التقليدية لإزالة المعادن غير محببة ، وذلك بسبب الإزالة غير التامة للمعادن كما تتطلب طاقة عالية ، وتولد أوحال سمية أو نواتج فضلات أخرى (Ahalyae*t. al*.,2003) .

2-4 -2 المعالجة الاحيائية Bioremediation

المعالجة الإحيائية Bioremediation تتكون من كلمتين bio بمعنى كل شيءحي و remediate بمعنى العلاج ، و المعالجة الإحيائية هي عملية استخدام ايض الكائنات الحية المجهرية microorganism لإزالة الملوثات التقانة يمكن إن تصنف بشكل عام إلى بيئتها الأصلية او في موقع آخر ، يتضمن المعالجة الحيوية في بيئتها الأصلية معالجة المادة الملوثة في موقعها الاصلي بينما المعالجة الحيوية في موقع سابق تتضمن ازالة المادة الملوثة التي ستعالج في مكان اخر (Vijayanad , 2012) ، يمكن إن يعرف ايضاً بوصفه تحللاً طبيعياً، أو حيوياً ناجحاً تقوم به الكائنات الحية المجهرية المتوافرة اصلاً في البيئة(Saadoun,2008).

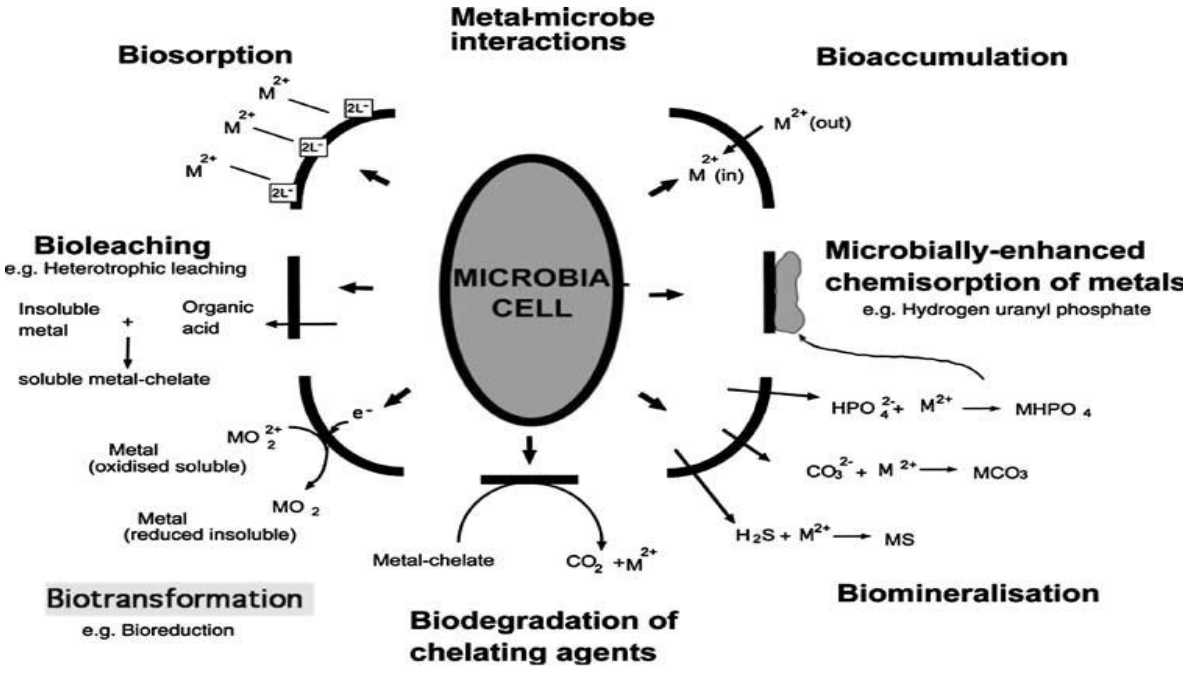
الكائنات الحية المجهرية يمكنها تأييض المركبات العضوية من شكلها المعقد الذائب إلى مركبات ابسط تركيباً ، وغير ضارة للبيئة بعملية يطلق عليها التحول الحيوي biotransformation او يمكنها تكسير المركبات السامة إلى مركبات اصغر بعملية تسمى biodegradiation التحلل الحيوي أي تحول المركبات العضوية إلى جزيئات لا عضوية اخرى مثل Co_2، H_2O إذ إن التحلل الحيوي التام يسمى المعدنة mineralization(Muneer,2005).

يمكن ان تزيل الكائنات الحية المجهرية سُمية المعادن الثقيلة بوساطة التحويل الحيوي ، و الترسيب الكيميائي خارج الخلية ايضا يمكن للبكتريا ان تختزل ايضيا وبوساطة الانزيمات بعض المعادن الثقيلة (Garbisu and Alkorta,2003) .

معظم البكتريا تنتج جزيئات معقدة تسمى sidrophores هذه المركبات لها أُلفة للارتباط بالمعدن في حالة نقص الحديد ،أما بكتريا ال*P. aeruginosa*و *Alcallgeneseutrophus* تنتج Siderophores بتحفيز من المعادن الثقيلة حتى

التراكيز العالية من الحديد المقارنة بين سلبية وايجابية الـSiderophore تؤدي إلى metallophores يمكن إن يلعب دور في الذوبانية المعدنية (Gary , 2011) .

وجد عدد من الباحثين Ahmad وزملائه(2009) وAhemad (2012) ومن خلال دراستهم أن المعالجة الحيوية تعني استخدام الكائنات الحية المجهرية (بكتريا ، و فطر ، و خمائر) و كذلك الطحالب وبعض انواع النباتات في تكسير المركبات biodegradation المعقدة السامة والخطيرة في البيئة وتحويلها biotransformation إلى مركبات اقل سمية وخطورة ،وفي بعض الأحيان تحويلها إلى مركبات لاعضوية أي اختزال المعادن من شكل إلى آخر بوساطة التفاعلات الانزيمية ، أو مباشرة بوساطة إنتاج مركبات مختزلة ،كتحويل الزئبق إلى الشكل المثيلي،بعض الكائنات الحية كالبكتريا يمكن أن تحلل المعدن بصورة كاملة المعدن بعملية biomineralization من حالته السامة الذائبة إلى حالة غير ذائبة ، أو تسلك ميكانيكية التراكم الحيوي bioaccumulation على جدارها مما يقلل السمية ،أيضا منها تستخدم آلية الامتصاص absorption على اسطحها مما يقلل سميتها ، او تسلك التصفية الحيوية bioleaching تستخدم هذه الطريقة لاستخلاص المعادن من خاماتها مما يثبط التأثير السام لتلك المعادن وكما مبين في الشكل (2-3).



الشكل (2- 3) المسارات الأيضية المقترحة لتحويل المركبات العضوية

والمعادن بوساطة البكتريا

هنالك اربع اليات معروفة لمقاومة المعادن الثقيلة من قبل البكتريا ، الأولى هي ابعاد الايون السام خارج الخلية بواسطة تغيير في انظمة النقل عبر الغشاء تستلزم في بدء عملية التراكم الخلوي ، الالية الثانية مصادرة المعادن خارج او داخل الخلية بواسطة ربط مكونات ايونات معدنية خاصة في مستوى جدار الخلية في البكتريا وهذه الخطوة مماثلة لـ metallothioneins في حقيقية النواة و عملية phytochelatins في النباتات (Amiard et al.,2006)، الثالثة فهي اكثر الاليات شيوعاً تعمل بسيطرة من البلازميد في البكتريا المقاومة للايونات المعدنية تتضمن انظمة تدفق الايونات الموجبة او السالبة عالية التخصص تشفر بواسطة جينات المقاومة مماثلة لمقاومة الخلايا الورمية في الحيوانات لمختلف العقاقير،إما الطريقة الرابعة تعرف بأنها تستلزم في ازالة سمية الايونات السامة الموجبة او السالبة بواسطة التحولات الانزيمية من شكل اكثر سمية إلى اقل سمية أي ازالة سمية detoxification للمواد السامة العضوية وغير العضوية ،يستلزم في اكسدة As(lll) واختزال Cr(Vl) إلى اشكال اقل سمية (Ahmad *et al*.,2009) .إما ابحاث اخرى فقد ذكرت إن الكائنات الحية المجهرية تستجيب للمعادن الثقيلة بعدة عمليات بضمن ذلك نقلها عبر الغشاء الخلوي ، تكثيفها إلى جدار الخلية واصطيادها او حجزها ضمن المحفظة ، ترسيبهـــــــــــا ثم مزجها في مركب ثم تدخل في تفاعلات الاكســـــــــــدة والاختزال redox (Sing *et al* .,2010) .

الاجناس البكتيرية التي غالباً ما تستخدم في المعالجة الاحيائية هي *Staphylococcus* spp. ، *Bacillus* spp. ، *Pseeudomonas* spp. ، *Rhodococcus* spp. و *Klebsila spp.* هذه الكائنات *Citrobacteia* spp. تستخدم ميكانيكيتها عموماً في معالجة التلوث في المعادن الثقيلة وهذه الميكانيكيات غالباً ما تشمل الاضافة الحيوية bioaugmentationو في هذه العملية يضاف الميكروب والغذاء إلى الموقع الملوث لتحفيزها حيويا والتحفيز الحيوي biostimulation فيها تضاف المغذيات والانزيمات كمدعمات للميكروب في الموقع الملوث (NNEMS , 2004)

الامتزاز الحيوي Biosorption يمكن إن يعرف قابلية الخلايا الحية لتراكم المعادن الثقيلة في مياه الفضلات من خلال توسط الايض او المسارات الكيميافيزياوية لاخذ المعادن ،إن الطحالب ، البكتريا ، الفطريات والخمائر اثبتت امكانية استخدامها في عملية biosorption إذ تفوق فوائد طرق المعالجة التقليدية بكونها منخفضة التكلفة ، كفاءة عالية ، تحقق حد ادنى من المواد الكيميائية والاوحال ، لا تتطلب اضافة مواد مغذية وامكانية تحسين المعادن يتغير إلى شكل اخر (Ahalya *et al* ., 2003) .

الامتزاز الحيويbiosorption للمعادن الثقيلة بواسطة الخلايا البكتيرية تعتمد على العمليات غير الأنزيمية مثل الترسيب إذ يمتاز بارتباط غير متخصص للايونات المعدنية

إلى سطح الخلية الخارجي الذي يرتبط بعديد السكريات polysaccharides والبروتينات Proteins ، في نفس الوقت الترسيب الحيوي biosorption يعرف ايضاً كخاصية الكتلة الحيوية غير الفعالة او الميتة وتركيز المعادن حتى من المحاليل المخففة جداً (Ahemad , 2012) .إن قابلية الترسيب الحيوي تقل بزيادة التركيز الابتدائي وتزداد بزيادة الاس الهيدروجيني (Sang *et. al*.,2009).

الية الامتزاز الحيوي biosorption مختلفة ولم تفهم بالكامل ويمكن تصنيفها طبقاً لمختلف المعايير بالاعتماد على ايض الخلية ، اذ تقسم إلى معتمدة على الايض الخلوي وغير معتمدة و طبقاً للموقع حيث تزال المعادن من المحاليل الموجودة بها يقسم إلى، تراكم و ترسيب خارج خلوي، تكثيف وترسيب إلى سطح الخلية و تراكم داخل الخلية .إن نقل المعادن عبر الغشاء يؤدي إلى تراكمها داخل الخلية الذي يعتمد على ايض الخلية هذا يعني إن هذا النوع منbiosorption قد يحدث فقط في الخلايا الفعالة ،هذا غالباً ما يرتبط مع نظام دفاع فعال للكائنات الحية المجهرية التي تتفاعل في وجود المعادن السامة ،إما الخلايا غير المعتمدة على الايض يتم اخذ المعادن بواسطة التفاعلات الفيزيوكيميائية Physicochemical بين المعادن ومجموعة الوظائف التي توجد على سطح الخلية البكتيرية ، هذا يعتمد على الامتصاص الطبيعي و التبادل الايوني و امتصاص المواد الكيميائية الذي لا يعتمد على الايض الخلوي(Nanda et al.,2011) .

أن البكتريا التي تظهر مقاومة عالية للمعادن هي الانسب للاستخدام في عملية المعالجة الحيوية وعلى هذا الاساس تم استخدام بكتريا *pseudomonas aeruginosa* (Kumar *et al*.,2011) . تمتاز بكتريا *Pseudomonas* بانتشارها الواسع وقدرتها على تحليل أكثر من 3000 مادة عضوية ،لها القدرة على انتاج مادة DMDS (Dimethyl disulfide) التي لها القدرة على ترسيب العناصر النزرة بكفاءة (صاحي وحسن،2006).تطبع الكائنات الحية المجهرية يعود الى عدة عوامل منها الخصائص الكيموحيوية والتركيبية والفسلجية او التكيف الوراثي الذي يعتمد على التغيرات الخلوية بالاضافة الى التحورات البيئية للمعادن (Abdelatey*et al*.,2011)

2- 5الزائفات الزنجارية والمعالجة الاحيائية

Pseudomonas aeruginosa and Bioremediation

هي بكتريا سالبة لصبغة غرام / هوائية / عصوية تفرز مختلف الصبغات منها Pyocyanin اخضر مزرق ، Pyoverdine اصفر مخضر ، Fluorescent وهي من البكتريا متنوعة الخواص ومجموعة هامة بيئياً إذ تتضمن عدة انواع *P. aeruginosa* وهي بكتريا عصوية هوائية اجبارية Obligate aerobic واحياناً تكون

لا هوائية اختيارية Facultative anaerobic (Palmer *et al* ., 2007) ، تمتاز بعدة استعمالات بسبب كفائتها الايضية ، إذ تمتاز بوجود نظام انزيمي معقد (لها متطلبات غذائية بسيطة جداً ، يوجد هذا النوع من البكتريا في الماء العذب ، التربة ، البحار وقد تم عزلها من الادوات الطبية ومستحضرات التجميل ; Uguret *et al*. , 2012 .(Gad *et al.*, 2007).

هنالك تقارير تشير إلى إن بعض مكونات جدار الخلايا يعمل كواهب للالكتروناتdonorsفي مسار تفاعلات الاكسدةو الاختزال بينما المعدن يرتبط بسطح الخلية لكون جدار الخليةالبكتيرية يتكون من Peptidoglycan ، teichoic acid على طول مع مجموعة كاربوكسيل carboxyl، phosphoryl ،هايدروكسيلhydroxyl مع مجموعة امين وظيفتها عند السطح (Chatterjee et al ., 2011) .

في عام 1977نشراول تقرير عن عزل *Pseudomonas* من الوحل الملوث Cro_4وكان ذلك من قبل العلماء الروس (Das , 2009)، و اول بكتريا وجدت لمقاومة الكرومات حيث اوضحت اختزال الكرومات (Shoeb , 2006) .لذا كثير ما تستخدم في المعالجة الحيويةbioremediationابحاث اخرى نشرت بينت استخدام انواع من بكتريا *Pseudomonas* في السيطرة الحيويةBiocontrol والمعالجة الحيوية bioremediation (Uguret *et al* ., 2012) وفي دراسة Prakashو Irfan (2011) بينا إن من اهم الاجناس البكتيرية المستخدمة في المعالجة الحيوية هو *P. aeruginosa* بينما اشارت Shoeb (2006) بأن *P. aeruginosa* لها القابلية على تحمل تراكيز عالية من المعادن الثقيلة مثل الكرومات و النحاس والنيكل .ايضاً اكدSafahiehوزملاءه(2012) إن من بين عشرة اجناس من البكتريا نوع واحد يعرف بـ *Psudomonas*. sp تمكن من ترسيب اكثر من 70% من عنصر النحاس cu خلال فترة 150 دقيقة ، إذ بالاعتماد على قابلية العزلة على ترسيب معدن معين يتم تشخيص تلك العزلة بأنها كائن حي مجهري مناسب لاجل عملية المعالجة الحيوية bioremediation للبيئة الملوثة .

ايضاً هناك عدة دراسات تشير إلى امكانية استخدام *Pseudomonas sp.*في عمليات المعالجة الحيوية ، منها دراسةAbyarوزملاءه (2011)التي توصل فيها من عزل بكتريا مقاومة النحاس Cu ولها القابلية على تقليل تركيز النحاس إلى المستوى الطبيعي إذ ذكر في دراسته معدلات النمو في وجود النحاس وكذلك قابلية البكتريا في تكثيف 59% خلال 120 دقيقة .دراسات اخرى بينت إن *P. aeruginosa*القابيلةلازالة

اكثر من 75% و 89% من الكادميوم القابل للذوبان (Sinha and Mukherjee,2009) .

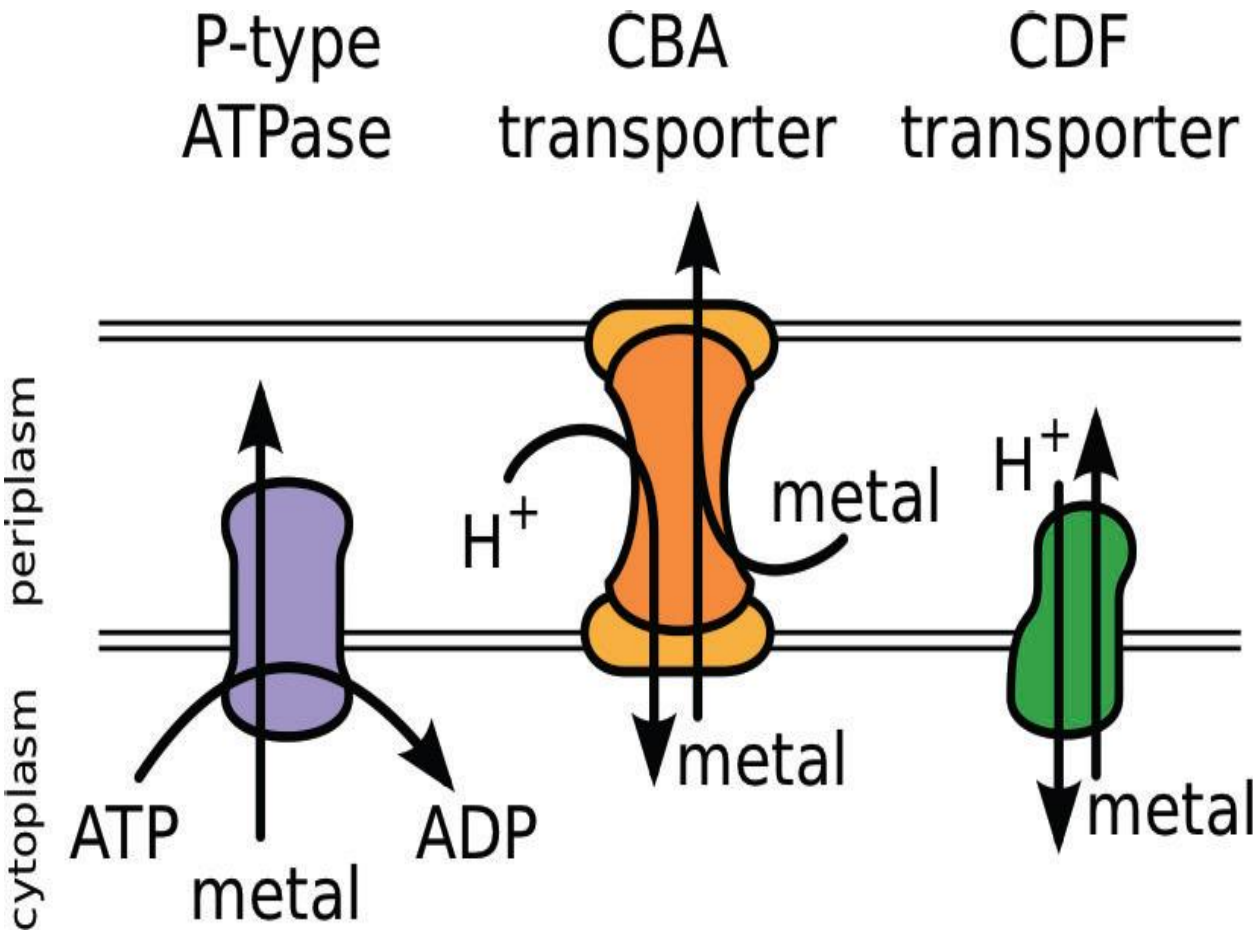
2-6نظام النقل Efflux Transporter

هو المضخة الضرورية التي تقوم بطرح الايونات السامة خارج الخلية مانعة بذلك تراكم المعادن السامة في الخلية إلى مستويات عالية بما فيه الكافية لمنع النمو او موت الخلية وهي الالية الاكثر شيوعا في مقاومة المعادن الثقيلة (Burnley,2000)عدد كبير من البكتريا المقاومة للمعادن الثقيلة تمتاز بامتلاكها نظام نقل فعال الذي تقوم به بطرح السموم المعدنية والتراكيز الفائضة عن حاجة الخلية إلى خارج الخلية (Kothe *et al*.,2007**)**.

إن المحافظة على تركيز المعادن داخل الخلية عند مستويات معينة هوالاساس إلى بقاء كل الكائنات الحية بينما تمثل كل المعادن المنتقلة إلى داخل الخلية في التجمعات العالية سامة حتى المعادن الضرورية مثل الحديد Fe ، الخارصين Zn ، النحاس Cu ، المنغنيز Mn ،إذ تعتبر هذه المعادن ضرورية إلى العديد من الوظائف الخلوية، في بدائية النواة Prokaryotes هنالك بروتينات موجودة ضمن الغشاء الخلوي هي التي تنظم او تسيطر على التوازن الدقيق بين ما يكفي الخلية من المعادن والحمل الزائد ، إذ إن جميع العوائل البروتينية الرئيسية تشارك في هذا النقل (Joshua and Oded, 2011) .

هي الميكانيكية الشائعة لمقاومة المعادن الثقيلة ، هذه تشمل مقاومة كل انواع المعادن ماعدا الزئبق Hg إذ تظهر فيه استخدام آلية من عدة آليات مختلفة لازالة السمية detoxification (Burnley,2000) .

هنالك ثلاثة مجاميع بروتينية تستلزم في نقل ومقاومة الايونات الموجبة مثل Cd^{+2} ، Pb^{+2} ، Zn^{+2}العائلة الأولى هي P-type ATP ases و ABC Transporters و CDFوكما مبين بالشكل(2-5)(Hynninen , 2010) .



شكل(2- 4) اشتراك عوائل النقل في مقاومة المعادن الثقيلة .مضخة P-type ATPases تنقل المواد من السايتوبلازم إلى البلازم المحيط باستخدام الطاقة المجهزة من تحلل ATP .الABC معقد من ثلاثة مركبات توجد في جدار الخلية السالبة لصبغة تطرح الايونات من السايتوبلازم والبلازم المحيط الى خارج الخلية باستخدام تدرجات الازموزية. CDF مشتق من قبل قوة البروتون الحافزة تقوم بطرح الايونات من السايتوبلازم الى البلازم المحيط

1-6-2 نظام النقل P-type ATPases

هو وسيلة الدفاع الرئيسية ضد الايونات الموجبة للمعادن الثقيلة، ويشكل احدى العوائل البروتينية المتميزة للنقل التي تستمد طاقتها من تحللATP . فهو قد يكون مهم لسببين الاول هو نظام مهم لاجل العناصر الكبيرة مثل Mg^{+2} ايضاً لاجل اخذ المعادن الثقيلة وثانياً تبعد الايونات الموجبة خارج الخلية بواسطة efflux (Muneer , 2005)

، P-type ATPasesيمنع الحمل الزائد لكلا المعادن الضرورية والسامة من خلال نقلها (Joshua and Oded, 2011) .

هي سلسلة منفردة متعددة البيتايد عبارة عن قنوات نقل عبر الغشاء ومواقع ارتباط ATP ومواقع تحلل ATP،P-type ATPase يرتبط بالغشاء الداخلي ويستخدم الطاقة من تحلل الـATP لضخ الايونات الموجبة من Cytoplasm إلىP-type ATPases(Hynninen,2010)Periplasm تعمل كـ detoxifiers من خلال فعالية التدفق (Joshua and Oded,2011) .

P-type ATPase يشكل عائلة متميزة من البروتين لنقل الايونات الموجبة ضد تدريجات التراكيز باستخدام الطاقة المشتقة بواسطة تحلل ATP ،مصطلح P-type يشير إلى تشكيل Phosphoenzgme الذي يعمل كوسيط في تفاعل تحرر الطاقة بواسطة إزالةY-phosphate من ATP التي تقترن لنقل الايونات عبر الأغشي'البيولوجية إذ إن المواد هي الايونات الموجبة غير العضوية مثل H^+ ، Na^+ ، K^+، Mg^+ ، Ca^+، Cu^+ ، Ag^+ ، Zn^+ ، Cd^+ ، Co^+ ، Pb^+أنظمة التدفق هذه تلعب دور رئيسي في موازنة المعادن الثقيلة والمقاومة التي تعود إلى P_{18}-type يقع تحت عائلة من ATPases ، الدور الوظيفي لهذه المضخة تضمن المحافظة على توازن المعادن الضرورية مثل Ca^+ ، Co^+ ، Zn^+بالإضافة إلى توسطه في مقاومة المعادن السامة مثل Pb^{+2} ، Cd^{+2} ، Ag^{+2} (Hynninen , 2010) .

ABC- Transporters 2-6 -2

هو عبارة عن ATP- binding cassette يوجد في جميع الكائنات الحية ، يوجد لاخذ وتدفق المركبات لكن لا يعمل لوحده في النقل ألايوني في كلتا الاتجاهين ، في البكتريا السالبة لصبغة غرام هذا النظام هو نظام النقل الرئيسي يكتمل بالاعتماد على بروتينات اضافية بالاعتماد على النقل المباشر(Shoeb,2006)

هو معقد بروتيني يتألف من ثلاث مركبات بروتينية يقع على امتداد لجدار الخلية في البكتريا السالبة لصبغة غرام ، أكثر المركبات أهمية هو بروتين RND الذي يقع في الغشاء الداخلي ، عائلة البروتينات RND كانت توصف في الأول كمجموعة تعود إلى بروتينات نقل في البكتريا تستلزم في مقاومة المعادن الثقيلة ،RND بروتينات عادى تصطحب ببروتينات انقسام الغشاء

(MFP) وعوامل الغشاء الخارجي (OMF) ،هذه البروتينات الثلاث التي قد تصدر المواد من الـ cytoplasm الغشاء السايتوبلازمي إلى periplasm عبر الغشاء الخارجي مباشرة إلى الخارج . (Hynninen , 2010Nies,2003;) .

3-6-2 عائلة نقل CDF

عائلة البروتينات التي تقوم بنقل الايون الموجب يشتق اسمها من Cation diffusion facilitator تشمل مجموعة من متعهدي النقل الذي يمكن إن يحفز تدفق influx أو enffluxايونات المعادن ، المعادن الثقيلة توجد في كلا بدائية النواة Prokaryotes وحقيقية النواة Eukaryotes(Hynninen,2010) فهي تستلزم في نقل المعادن الثقيلة في البكتريا والخمائر والديدان واللبائن والنباتات(Shoeb , 2006)

بالمقارنة مع العوائل البروتينية الأخرى مثل P-type ATPases او CBA transporter كل بروتينات CDF تمتاز إلى نقل المعادن فقط مثل (Fe^{+2} ، Co^{+2}، Ni^{+2}، Zn^{+2}) بروتينات CDF تشتق بواسطة تدرجات البوتاسيوم بالاضافة إلى قوة تحفيز البروتون (Guffanti *et al* ., 2002).

عموماً A-type ATPases و CDF transporter توجد بشكل شائع بين مختلف الانواع البكتيرية حيث يوجد ABC transporter مثل بروتين RND في البكتريا الموجبة لصبغة غرام بشكل استثنائي، وتشير إلى مقاومة عالية المستوى لايونات المعادن الثقيلة حيث P-type ATPases و ناقلوا CDF تنقل الايونات المعدنية من الـ cytoplasm إلى periplase ، بينما ABC تنقل بشكل رئيسي المعادن المزال سميتها من الـ periplasm إلى الجدار الخارجي، يمكن استبدال وظيفة P-type ATPases بدلاً من CDF والعكس صحيح (Hynninen , 2010) .

3-المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3-1 الاجهزة والمواد المستعملة

3-1-1 الاجهزة المستعملة

الجهاز	الشركة المصنعة والمنشأ
فرن كهربائي Oven	Daihan (Korea)
مضخة تفريغ Vacumpum	Daihan(Korea)
الموصدة Autoclave	Daihan(Korea)
الحاضنة Incubatar	Instruments(USA)
الحمام المائي Water Path	Daihan(Korea)
جهاز التقطير Distilwater	Daihan (Korea)
الميزان الحساس Sensitive balance	Denver(Germany)
مقياس الاس الهيدروجيني pH meter	Radiometer (Denemark)
الدوارة Vortex	Denver (Germany)
جهاز النبذ المركزي Centerifuge	Hermle (Germany)
المجهر الضوئي Light Microscope	Novex (Holand)
الثلاجة Refrigerater	Beko (Turky)
الصفيحة الساخنة Hote plate	Daihan (Korea)

الامتصاص الذري اللهبي Atomic Absorption Spectrophotometry	Labco (Germany)
مقياس الامتصاصية UV spectrophotometer	Aple (Japan)
مطياف اللهب Flamphtometer	Labco (Germany)

2-1-3 المواد الكيميائية والبايولوجية

المادة	الشركة المنتجة والمنشأ
الكليسرول	GCC (UK)
النشاء	GCC (UK)
اليود	GCC (UK)
يوديد البوتاسيوم	GCC (UK)
كلوريد الصوديوم	GCC (UK)
ايثانول	GCC(UK)
سفرانين	GCC(UK)
ازرق المثلين	GCC(UK)
بيروكسيد الهيدروجين	GCC(UK)
الكلوكوز	GCC(UK)
اليوريا	GCC (UK)
مستخلص الخميرة	

البيتون	Merck (Germany)
خلات الرصاص المائية	Merck (Germany)
كبريتات الزنك المائية	Merck (Germany)
كبريتات النحاس المائية	Merck (Germany)
ثاني كرومات البوتاسيوم	GCC (UK)
اوكزالات الامونيوم	GCC(UK)
فوسفات البوتاسيوم ثانئيةالهيدوجين	GCC(UK)
البارافين السائل	GCC(UK)
احمر الفينول	GCC (UK)

2-3 الاوساط الزرعية الجاهزة والتركيبية

1-2-3 الاوساط الزرعية الجاهزة

الوسط	الشركة المصنعة والمنشأ
الاكار المغذي Nutrient agar	Himedia (India)
اكار الماكونكي Maconkey agar	Himedia (India)
وسط سترات السايمون Simmons citrate	Himedia (India)
المرق المغذي Nutrient broth	Himedia (India)
وسط انتاج الصبغة King medium B.Bace	Himedia (India)
ماء الببتون Pepton water	Himedia (India)
اكار مستخلص الخميرة Yeast extract agar	Himedia (India)

2-2-3 الاوساط التركيبية

حضرت جميع الاوساط وبعد ذلك وعقمت باستخدام الـموصدة عند درجة حرارة 121مْ وضغط 15 بار ولمدة 20 دقيقة ، أما المحاليل فقد تم تعقيمها باستخدام المرشحات بحجم 0.45 مايكرون .

3-2-2-1 وسط النشأ Starch medium

حُضِرَ بحسب ما جاء عن(Cowan and Steels , 2004) ، باذابة 10 غم من نشأ البطاطا في 50 مل الماء المقطر ثم يخلط بعد ذلك مع1 لتر من الاكار المغذي المحضر مسبقاً، ثم يُعقم ،وبعد ذلك يوزع في اطباق زرعية، ويحفظ في درجة حرارة 4مْ .

3-2-2-2 وسط فوكاس بروسكاور- احمرمثيل MR- Vp medium

حُضِرَ بحسب ما جاء عن(Cowan and Steels , 2004) ، باذابة5 غم ببتون و5 غم من K_2HPO_4 في 1000 مل من الماء المقطر،و بعد ذلك ضبط الـ pH إلى 7.5 ،ثم أُضيف إليه 5 غم كلوكوز معقم، وخلط ،ثم وزع في انابيب اختبار ثم عقم بالموصدة . وحفظ في الثلاجة بدرجة حرارة 4مْ .

3-2-2-3 وسط اليوريا Urea medium

حضر حسب ما جاء (Harley , 2002)،باذابة1 غم ببتون و 5 غم من Nacl و2 غم من KH_2PO_4 و20 غم agar في 1000 مل ،و تمت الاذابة باستخدام الحرارة حتى الغليان ثم يضبط الـ pH إلى.6 وعقم بالموصدة ، ثم يبرد الوسط إلى درجة حرارة 50-55 م ، ثم يضاف له محلول 1% كلوكوز مع 6مل من محلول 0.2% احمر الفينول phenol red و100 مل من محلول 20% يوريا (عقمت المحاليل بالترشيح)

3-2-2-4 وسط الاندول Indol medium

تم تحضير الوسط حسب ما جاء (Harley , 2002)،تكون من 1000مل ماء الببتون الجاهز بالاضافة إلى كاشف كوفاكس وتم توزيعه في انابيب اختبار .

3-2-2-5 وسط اكار مستخلص الخميرة ببتون PYA pepton yeast extract agar

حضر الوسط حسب ما جاء عن (Alok , 2009) ،باذبة1غم من Nacl مع 1غم ببتون و 0.5 غم مستخلص الخميرة في 100 مل ماء مقطر ثم ضبط الـpH7.5-6.5 ثم اضيف اليه تراكيز مختلفة من املاح المعادن خلات الرصاص المائية ($(CH_3coo)_2Pb$) ،ثاني كرومات البوتاسيوم ($K_2Cr_2O_7$) ،كبريتات النحاس المائية ($CuSO_4.5H_2O$) وكبريتات الخارصين المائية ($ZnSo_4.7H2O$) بدءا من (50-100-200-300-.....-1400)ملغم/لتر كل على حدة ثم بعدها اضيف اليه 1.5 غم اكار بعد ذلك عقم بالموصدة .

6-2-2-3 وسط اكار الكليسيرولGlycerol Agar medium

حضر بحسب ما جاء عن(Cowan and Steels , 2004) ، باضافة50مل من Glycerol إلى 1000 مل من الاكار المغذي ، خلط ثم وزع في انابيب اختبار ثم بعد ذلك عقم بالموصدة .

7-2-2-3 وسط الاكسدة والتخمر O/F medium

حضر حسب ما جاء عن (Cowan and steels , 2004) ، باذابة 2غم من الببتون مع 5 غم Nacl و 0.3 غم K_2Hpo_4 و 3 غم اكار في 1000 مل ماء مقطر ، تم اذابة المواد الصلبة بواسطة الحرارة ثم ضبط الـ pH إلى 7 ثم رشح واضيف كاشف 0.2% من ازرق بروموثايمول (Bromothymol blue)ثم عقم بالموصدة ، يضاف الى المحلول المعقم مصدر كاربوهيدراتي مناسب (كلوكوز) ليعطي تراكيز منها في 1% ، ثم خلط و وزع في أنابيب اختبار معقمة مسبقاً وبواقع انبوبين لكل عزلة لاحد الانابيب اضيف اليه زيت البارافينParaffin oil .

3-3 تحضير المحاليل والكواشف

1-3-3 محاليل صبغة كرام Gram stain solution

المحاليل جميعاً حضرت بحسب ما جاء عن(Cowan and Steels , 2004) .

1-1-3-3 صبغة ازرق المثيلين Crystal blue stain

حضرت من خلط محلولين جزء واحد من المحلول الاول إلى 4 اجزاء من المحلول الثاني أذ يتكون المحلول الاول من اذابة 10 غم ازرق المثيل (crystal violet) مع 100 مل من15% ايثانول ثم خلط بنسبة 10:1 مع الماء المقطر ، اما الثاني فيتكون من اذابة 1 غم اوكزالات الامونيوم (Ammonium oxalate) في 100 مل ماء مقطر .

3-3-1-2محلول اليود Lugols Iodine Solution

حضر باذابة1 غم من الايودين (Iodine) مع 2 غم يوديد البوتاسيوم (potassium Iodine) في 300 مل من الماء المقطر.

3-3-1-3 المحلول ازالة اللون Decolorizer

يتكون من 95% ايثانول .

3-3-1-4 صبغةالسفرانينSafranin Stain

حضر باذابة2.5 غم من السفرانين Safranin في 100 مل 95% ايثانول .

3-3-2 محلول احمر المثل Methyl Red Solution (MR)

حضر بحسب ما جاء عن (Cowan and Steel,s , 2004) باذابة0.04 غم من MR في 40 مل Ethanol(تركيزه 95%)ثم اكمل الحجم بالماء المقطر إلى 100 مل .

3-3-3 محلول 5% a-naphthol

حضر بحسب ما جاء عن (Cowan and Steel's , 2004)، وذلك باذابة 5 غم a-naphthol في 100 مل ايثانول (تركيزه 95%).

3-3-4 كاشف انزيم الكاتاليزCatalase Reagent

حضر من خلط (1)مل من بيروكسيد الهيدروجينH_2O_2 بتركيز (30%)مع (9)مل من الماء المقطر للحصول على تركيز 3%بيروكسيد الهيدروجين ،ثم حفظ في الثلاجة في عبوة مظللة .

5-3-3 كاشف كوفاكسKovacs Reagent

حضر باذابة5 غم من P-dimethyl amino benzaldehyde في 75 مل Amylalcohol و 25 مل منHCL المركز، و تم اذابة الالديهايد بالكحول ، وسخن على درجة حرارة 50-55 مْ ، ثم برد واضيف اليه HCL المركز .

6-3-3 كاشف الاوكسيديزOxidase reagent

حضر بحسب ما جاء عن (USDA / FSIS . 1998) أذ حضر آنيا باذابة1 غم من رباعي المثيل بارافنيلين ثنائي الامين هيدروكلوريك tetramethyl –P- phenylenediaminedihydro chloride في 90 مل ماء مقطر ثم اكمل الحجم إلى 100 مل.

7-3-3 المحاليل القياسية Stock Solution

تم وزن (4.3976 , 3.9291 , 5.6554 , 2.6226)غم لكل من كبريتات الزنك المائية $ZnSO_4.7H_2O$ ، كبريتات النحاس المائية $CuSO_4.5H_2O$ وثاني كرومات البوتاسيوم $K_2Cr_2O_7$ وخلات الرصاص المائية $(CH_3COO)_2Pb.3H_3O$ على التوالي واذيب كل وزن بالماء المقطر واكمل المحلول إلى لتر بحيث اصبح تركيز العنصر في المحلول القياسي مكافئاً إلى 1 غم / لتر وما يعادل 1000 ppm جزء بالمليون حضرت المحاليل استناداً إلى (Shah , 2005) ، ثم عقمت المحاليل بالترشيح

الوزن الجزئي لاملاح المعادن الثقيلة

———————— = وزن المركب المطلوب لكل غم واحد من وزن العنصر

الوزن الذري للعنصر

8-3-3 المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline

حضر المحلول الملحي الفسلجي حسب ما جاء في (Cowan &Steels,2004) ؛ وذلك لاستعماله في اجراء التخافيف باذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 90 مل من الماء المقطر، ثم اكمل الحجم إلى 100 مل ،عقم بالموصدة ، ومن ثم حفظ في درجة حرارة 4 مئوية لحين الاستعمال .

9-3-3 محلول ثابت العكورة القياسي Macfarland Standard

حضر المحلول وفق ما جاء في (Bauer et al .,1996) وذلك بتحضير محلولين :-

أ- اذيب 1.175 غم من كلوريد الباريوم في 90 مل من الماء المقطر ، واكمل الحجم إلى 100 مل.

ب-حضر 1%من حامض الكبريتيك المركز باضافة 1 مل من الحامض إلى 90 مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم إلى 100 مل .

اضيف 0.5 مل من المحلول (أ) إلى 99.5 ما من المحلول (ب)رج المحلول بقوة ثم وضع في انابيب زجاجية محكمة الغطاء لمنع التبخر، وحفظت في الظلام لحين الاستعمال .

3 -3-10 حفظ وادامة العزلات البكتيرية

تم زرع العزلات البكتيرية بعد تشخيصها على اوساط زرعية سائلة Slant من الاكار المغذي المعقم في درجة حرارة 4 م واستمرت عملية الإدامة بشكل دوري كل 14 يوماً من خلال تجديد زراعتها وذلك بنقل مستعمرة واحدة إلى Slant اخر غير مستعمل لضمان نشاطها خلال فترة الدراسة ،ايضاً تم استخدام وسط الاكار المغذي الذي يحوي 5% كليسيرول لحفظ العزلات مدة طويلة بعد اكتمال تشخيصها .

4-3 جمع العينات Collection of Sample

تم اختيار نهر مهروت (في محافظة ديالى)في الدراسة الحالية الذي ينبع من الصدر المشترك وينتهي في جنوب ناحية كنعان وبواقع 4 محطات مختلفة محطة الصدر المشترك ، محطة حربتيلة ، ومحطة الجلالي ،و محطة الوجيهية، ومن نهر خريسان (بعقوبة

المركز) اذ تم اختيار خمس محطات .اذ اخذ خمسة وعشرون عينة أي خمس عينات لكل محطة خلال نهاية فصل الخريف وبداية فصل الشتاء ،وتم خلال ذلك قياس كل من درجة حرارة الجو والماء بوساطة محرار زئبقي ، جمعت العينات بوساطة قناني زجاجية سعة لترين تم تعقيمها مسبقا وجلبت للمختبر في فلينة تحوي قطع ثلج لغرض جعل العينات بدرجة حرارة 5مْ ،لحين وصولها إلى المختبر وبعد ذلك حدد كل من الحامضية وباستخدام pH-meter والصوديوم Na ، والبوتاسيوم K باستخدام جهازطيف اللهب flamphotometerثم زرعت العينات على وسط المرق المغذي.

5-3 زرع العينات Samples Culture

زرعت عينات الماء بعد اجراء التخافيف مباشرة على وسط الاكار المغذي وحضنت على درجة حرارة37 م، ولمدة 24 ساعة ،بعد ذلك تم اجراء الفحوصات المظهرية للمستعمرات البكتيرية، والكيموحيوية للعزلات ، و تم اختيار 120 عزلة بكتيرية من المحطات تحت الدراسة .

6-3 تشخيص العزلات البكترية

اختيرت العزلات استناداً إلى نقائها وتم تشخيصها ايضا استنادا لقابليتها على النمو على وسط اكار ببتون مستخلص الخميرة المزود باملاح المعادن المختارة (Das,2009) ، في الدراسة الحالية وكذلك استنادا لقابليتها على النمو واختزال الايونات المعدنية في وسط المرق المغذي المدعم بالمعادن(Abou-Shanab*et al.*,2007) .

1-6-3 الفحوصات المظهرية Morphology test

شخصت العزلات بالاعتماد على شكلها، ولون المستعمرة ،ولزوجتها ،وشفافيتها ،وحافاتها ، ورائحتها ،وحجمها ، وقابلية نموها على وسط اكار الماكونكي بعد ذلك اجرى لها الفحص المجهري بعد معاملتها بمحاليل صبغة غرام المحضرة في الفقرة (3-3-1) للتعرف على تفاعلها مع الصبغة وشكل الخلايا البكتيرية وترتيبها إذ تم تحديد صفاتها المظهرية بالاعتماد على (Cowan and Steels , 2004).

2-6-3 الفحوصات الكيموحيويةBiochmecal test

3-2-6-1 اختبار انزيم الكاتاليزCatalase test

استخدم هذا الاختبار لمعرفة قابلية البكتريا على انتاج انزيم الكاتاليز الذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء ويحرر الاوكسجين على شكل فقاعة إذ تم نقل جزءمن المستعمرة البكتيرية ذات عمر 24ساعة إلى شريحة زجاجية نظيفة وبعد ذلك تم اضافة قطرة من كاشف H_2O_2 3% المحضر في الفقرة(3-3-4) ، ويعد ظهور فقاعات غازية دليل ايجابية الاختبار(Cowan&Steels,2004).

3-2-6-2 اختبار الاوكسيديز Oxidase test

استخدم لمعرفة قابلية البكتريا على انتاج انزيم السايتوكروم اوكسيديز Cytochrome oxidase إذ تم نقل مسحة من المزرعة البكتيرية نشطة عمر (24 ساعة)إلى ورقة ترشيح ، اضيف اليها قطرة من كاشف الاوكسيديز المحضر انيا في الفقرة (3-3-6) ، فتغير لون المستعمرة إلى اللون البنفسجي الغامق بعد مرور 10 ثواني دليل ايجابية الاختبار(Cowan and Steel's , 2009) .

3-2-6-3 اختبار تحلل النشأ Starch hydrolysis test

استخدم لمعرفة امتلاك البكتريا لانزيم تحلل النشأ (amylase) حضنت الاطباق البكتيرية المزروعة لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37مْ ، ثم بوضع قطرات من محلول اليود فوق المستعمرة البكتيرية ، و يعد ظهور منطقة شفافة حول المستعمرة البكتيرية دليل ايجابية الفحص(Cowan and steels , 2004) .

3-2-6-4 اختبار الاندولIndole test

استخدم هذا الاختبار للكشف عن وفرة الاندول الذي يعد احد نواتج ايض الحامض الاميني التربتوفان نتيجة امتلاك البكتريا لانزيمالتربتوفايز، لقحت الانابيب الحاوية على وسط ماء الببتون بالعزلة البكتيرية المراد فحصها، تم حضنها بدرجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة ، بعدها تم اضافة 0.5 مل من كاشف فوكاس المحضر مسبقا في الفقرة (3-3-5) نقوم بتحريكها ، و يعد ظهور حلقة حمراء دليل ايجابية الفحص (Cowan and Steels,2004) .

3-2-6-5 اختبار اليوريا Urea test

زرعت العزلات البكتيرية على وسط اليوريا المائل. استخدم هذا الفحص لمعرفة امتلاك البكتيريا لانزيمUrease إذ تم حضن انابيب الاختبارالملقحة بالعزلات البكتيرية قيد الدراسة لمدة 5 ايام بدرجة حرارة 37 مْ ، تحول اللون إلى الاحمر دليل ايجابية الفحص (USDA / FSIS , 1998)

3-2-6-6 اختباراحمر المثيل Methyl red test(MR)

استخدم هذا الاختبار لمعرفة قابلية البكتريا على انتاج حامض اللاكتيك نتيجة ايض الكلوكوز ، لقح وسط الـ MR بالعزلة البكتيرية المنقاة ، ثم حضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 48 ساعة ، ثم اضيف اليها 2 قطرة من محلول احمر المثيل المحضر مسبقا في الفقرة (3-3-2) ظهور اللون الاحمر دليل ايجابية الاختبار(USDA / FSIS , 2004) .

3-2-6-7 اختبار الفوكاس بروسكاروVP test

استخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على انتاج استيل مثيل كاربينو (اسيتون) لقحت الانابيب الحاوية على وسط VP بالعزلة البكتيرية المراد اختبارها ، بعد فترة حضانة 48 ساعة تم اضافة 0.6 مل من محلول a-naphthol 5% و 0.2 مل من محلول KOH 40% ظهور لون احمر دليل ايجابية الاختبار (USDA / FSIS , 1998) .

3-2-6-8 اختبار استهلاك السترات

يستخدم لاختبار قابيلة البكتريا على استهلاك السترات كمصدر كاربوني لقحت الانابيب الحاوية على وسط Simon بالعزلة البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 96 ساعة ،تحول لون الوسط من الاخضر إلى الازرق دليل ايجابية الفحص،(Emanuel and Lorrence , 2009).

3-2-6-9 اختبار الاكسدة والتخمر O/F test

لقحت الانابيب الحاوية على الوسط بدون اضافة الزيت البارافين و معه ، بنفس العزلة البكتيرية ثم حضن بدرجة حرارة 37م لمدة 7 ايام ، تحول اللون من الازرق إلى الاصفر دليل ايجابية الفحص (Goldman & Green , 2009) ، ان تحول اللون إلى الاصفر في كلتا الانبوبتيين دليل الاكسدة و التخمر، بينما تحول اللون إلى الاصفر في الانبوبة التي لا تحوي زيتاً فقط دليل على ان العزلة البكتيرية مؤكسدة فقط .

3-2-6-10 تحديد التركيز المتحمل الاكبر Maximum Tolerance concentration والتركيز المثبط الادنى(MIC) Manimmum Inhibity Concentration (MTC)

التركيز المحتمل الاكبر الذي يمكن ملاحظة النمو البكتيري فيه حتى وان كانت مستعمرة واحدة يتحدد حسب ما جاء عن (Kumaran et al ,. 2011) باضافة تراكيز مختلفة من املاح المعادن الثقيلةheavy metals ، في دراستنا الحالية تضاف املاح المعادن $(CH_3coo)_2Pb$) $(K_2Cr_2O_7$) ($CuSO_4.5H_2O$) ($ZnSo_4.7H2O$) بوصفه مصدراً للايونات الاتية Zn^{+2} , Pb^{+2} , Cr,Cu^{+2} $^{6+}$ بتراكيز تتراوح من(50- 100- 200- 300- 400- 500- 600- 700- 800- 900- 1000- 1100- 1200- 1300- 1400) ملغم/لتر حتى الوصول إلى (MIC) وهو التركيز المثبط الاصغر وهو اقل تركيز لا يظهر فيه اي نمو حيث تتم الاضافة للوسط كل معدن على حده ، قمنا بعمل تخطيط على سطح وسط اكار مستخلص الخميرة ببتون للعينات المراد اختبار تحملها وتثبطها بتأثير المعدن ، إذ تم حضن الاطباق المحتوية على المعادن والعينات لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37م.

3-2-6-11 قياس المعادن المختزلة

الاختزال المعدني كان يقاس بوساطة تنمية 200ملغم/لتر من العزلات البكتيرية المقاومة للمعادن بوسط المرق المغذي المزود بتراكيز مختلفة لايونات المعادن المستخدمة في الدراسة الحالية ،تم اختيار التراكيز استنادا ل MTC لكل عزلة تم قياس الاختزال المعدني بواسطة الكثافة وباستخدام جهاز UV spectrophotometry ،(Abou-shanab et al .,2007).

7-3 تجارب المعالجة الحيوية Bioremediation

1-7-3 تحضير العالق البكتيري

لقحت انابيب اختبارحاوية كل منها على 5 مل من المحلول الملحي الفسلجي ب 150 ميكروليتر من مزارع بكتيرية منماة مسبقا على وسط المرق المغذي السائل وبعمر 18ساعة ، ثم مزجت جيدا ، وبذلك تم تحضير تركيز تقريبي للخلايا (10^8)خلية /مل ،وذلك بعد مقارنة عكرة النمو المتكون مع عكرة محلول ثابت العكرة القياسي المحضر مسبقا واجراء العد الحي للخلايا في المحلول .

2 -7-3 جمع عينات الأسماك

جمعت العينات من صغار اسماك الكارب الاعتيادي Cyprinus carpio من مزارع خاصة بتربية الاسماك وبواقع 70 سمكة بمعدل وزن 10±2 غم وطول 8±3 سم لكل تجربة ، إذ وضعت الاسماك في فلينة كبيرة سعة 50 لتر ملئت بماء من بيئة الاسماك نفسها لحين ايصالها إلى المختبر وبدء التجارب .

3-7- 3الاقلمة

تم وضع الاسماك في احواض زجاجية ذات طول 70سم وعرض 50سم وارتفاع 50سم ،وضع20 لتر من ماء الصنبور Tap water مخزن مسبقاً قبل 24 ساعة ،لاقلمتها بالظروف المختبرية من درجة حرارة واضاءة مع توفير الاوكسجين باستخدام مضخة تهوية كهربائية لكل حوض ، ثم تم وضع عشر سمكات لكل حوض ، تم استخدام عليقة تجارية لغرض تغذية الاسماك خلال مدة الاقلمة التي استمرت 7 ايام إذ تم ايقاف التغذية قبل بدء التجارب بـ 24ساعة(Vinodhini and Narayanan,2008).

4-7-3 تصميم تجارب المعالجة الحيوية

ركزت الدراسة الحالية على تأثيربكتريا *P.aeruginosa* في المعالجة الحيوية للمعادن والتقليل من سميتها للاسماك من خلال زيادة نسب البقاء لصغار اسماك الكارب الاعتيادي وكذلك تقليل نسب التراكم للمعادن في بعض انسجة الأسماك وزيادة ترسيب المعدن في الماء . تم التركيز على استخدام أربعة عناصر من المعادن النزرة وبتراكيز مختلفة لكل من ايونات العناصر لكل من الرصاص إذ كانت التراكيز في التجارب الاولية

(15،25،35)ملغم/لتر و النحاس (1،2،3) ملغم/ لتر و الخارصين (1،2.8،5) ملغم/لترو الكروم (5،6،7) ملغم /لتر، بينما غيرت تراكيز الرصاص لتصبح من (45،55،65،75،85،95)ملغم/لتر والنحاس (3،4،5) ملغم/لتر و الخارصين (5،6،7)ملغم/لتر و الكروم (10،11،12)ملغم / لتر كل على حدة ولمدة 96 ساعة لكل عنصر . كانت التراكيز الثلاثة الأخيرة هي المعتمدة نتيجة بدء ظهور تأثيرات على الأسماك وذلك من خلال التجارب الأولية وكما مبين بالجدول (3-1)

جدول(3-1) تراكيز المعادن الثقيلة المستخدمة في التجارب

المعدن	تركيز المعدن(ملغم /لتر)								
الرصاص	15	25	35	45	55	65	75	85	95
الكروم	5	6	7	7	8	9	10	11	12
الخارصين	1	2.8	5	6	7				
النحاس	1	2	3	4	5				

تضمنت كل تجربة من 7 احواض من الزجاج سعة 40 لتر ماء ،تم وضع20 لتراً من الماء المخزن مسبقاً ، استخدام مضخات هواء كهربائية وبواقع 10 سمكات ، خصص احد الاحواض حوضاً للسيطرة Control وبواقع ثلاث مكررات لكل تجربة ، وتراكيز مختلفة لكل عنصر وبمكررين لكل تركيز حيث يمثل التركيز الاول معاملة السمك بالمعادن بينما المكرر لهذا التركيز يمثل معاملة السمك بالمعدن بالاضافة إلى البكتريا لاجل معرفة دور بكتريا *P.aerugenosa* في المعالجة الحيوية bioremediation وذلك من خلال التأثير على نسب البقاء بالاضافة إلى قياس التراكم المعدني في عضلات الاسماك muscalوقياس الترسب المعدني في الماء من خلال المقارنة بين احواض المعالجة مع الاحواض الاخرى.

تم قياس التراكم الحيوي وتراكيز المعادن في الدراسة الحالية بوساطة جهازالامتصاص الذري اللهبيAtomic Absorption Spectrophotometry

تم حساب متوسط الزمن المميت ، وكذلك الزمن المميت الكلي ، ومتوسط التركيز المميت والتركيز حسب (العلي،1999 ; Vinodhini and Narayanan,2008) من خلال حساب متوسط نسب البقاء لكل عنصر ، و تم قطع التغذية خلال فترة التجربة ، والبالغة 96 ساعة لتقليل اثار النواتج الايضية وقد سجلت النتائج كل 24 ساعة ، وتم استبعاد الاسماك الميتة بالاعتماد على توقفها الكامل عن الحركة ، وفقدانها الحس بالاستجابة للوخز او اي حافز اخر .

إذ تم اخذ عينة من عضلات الاسماك بعد انتهاء فترة التجربة 96 ساعة ليتم قياس قيم التراكم الحيوي للمعادن الثقيلة،اما عينة الماء فتم اخذها من الاحواض نفسها وتم المقارنة بين احواض المعالجة من غير المعالجة لقياس المترسب من الذائب من المعادن الثقيلة .

أما المحاليل القياسية فكانت تحضر وقتيا في اثناء البدء بالتجربة مع غسل الزجاجيات جيدا بالماء المقطر .

3-7-5 تقدير تركيز العنصر المتراكم في الانسجة

اعتمدت نسيج العضلات لاغراض التحليل الكيمياوي ، ثم قطع كل نسيج على حدة وجرى العمل على هرسه ، وتجانسه بشكل جيد ،جففت العينات بعد ذلك بوساطة فرن كهربائي لمدة (24) ساعة على درجة حرارة (105)مْ ،إذ تم أخذ (0.15-0.1)غم من كل عينة ، وضع النسيج الموزون في قناني زجاجية ، والتي اضيف اليها حامض النتريك (HNO_3) والبيروكلوريك ($HCLO_4$) لغرض هضم الانسجة (العلي،1999).

قدر مستوى العناصر المتراكمة باستخدام جهاز طيف الامتصاص الذري اللهبي وحسب المتراكم من العناصر في الانسجة من منحنى المعايرة Calibration curve ، وبتطبيق القانون الخاص بتقدير تركيز العناصر الثقيلة في الانسجة والمتضمن :-

التراكم الحيوي للعنصر (مايكغم/غم)=تركيزالعينة من المنحنى المعياري (ملغم/لتر)-الحجم النهائي للعينة (مل) ×100

الوزن الجاف للعينة

3-8 التحليل الاحصائي

في تجارب الخاصة بنسب البقاء للاسماك تم حساب متوسط الزمن المميت(LT_{50}) ومتوسط التركيز المميت(LC_{50})لكل من تجارب المعادن ومعالجتها وحسب الطريقة البيانية Graphic Method،(FAO,1987). أما في تجارب المعالجة الحيوية فتم تحليل النتائج احصائياً باستعمال النظام الاحصائي SPSS (Statistical Package for Social Science)الجيل 10 لتحليل قيم التراكم الحيوي للمعادن قبل وبعد المعالجة ببكتريا *Pseudomonas aeruginosg* وبعدها الانحراف المعياريSDبمستوى معنوية 0.05 . (Sorlie, 1995)

4- النتائج والمناقشة

Results and Discussion

4-1 عزل وتشخيص البكتريا المقاومة للمعادن

4-1-1 العزل Isolation

تم عزل وتشخيص 60 عزلة مقاومة للمعادن من مجموع 120 عزلة من عينات الماء ولمواقع مختلفة من نهر مهروت في محافظة ديالى للمدة ما بين 1-10-2011 ولغاية 20-1-2012 ، تم التأكد من مقاومة العزلات للمعادن الثقيلة من خلال تنميتها على وسط اكار مستخلص الخميرة ببتون المدعم بالايونات المعدنية وتم اختيار العزلات الاكثر مقاومة للمعادن الثقيلة، وبعد ذلك اختيرت هذه العزلات استنادا لقابليتها على اختزال المعادن في وسط المرق المغذي المدعم بالمعادن واستنادا لهذه النتائج تم تنميتها بعد ذلك على وسط الاكار المغذي لغرض الحصول على مزارع بكتيرية نقية ، وذلك بتكرار التخطيط على الوسط الصلب ، وبعد اختيار العزلات والتأكد من نقاوتها باستخدم وسط اكار الماكونكي للتفريق بين البكتريا السالبة لصبغة غرام والموجبة لصبغة غرام .

4-1-2 التشخيص Identification

شخصت العزلات البكتيرية بالاعتماد على الصفات المظهرية ، الزرعية ، المجهرية والاختبارات الكيموحيوية، ، و تشخيصها بالاستناد إلى الاختبارات الكيموحيوية .اظهرت نتائج التشخيص أن 22 عزلة هي *P.aeruginosa*اي بنسبة 37% .من مجموع العزلات و 25% لل.*Bacillus* sp و *Staphylococcus* sp.*%20* و *Nisseria* sp. %18 وكما مبين في الجدول (4-1).

تبين من خلال التجارب الاولية التي اجريت في المختبر لاختيار اكفأ عزلة في تحمل واختزال المعادن تحت الدراسة ،أن بكتريا *P. aeruginosa* أكثر مقاومة واختزال للمعادن من،*Bacillus* spp. ، و.*Staphylococcus* spp ، و.*Nisseria* spp ، وهذا يعود إلى قدرتها على التطبع (Kumaran et al .,2011) وحملها لصفات جينية تجعلها أكثر مقاومة وتحمل من غيرها وقابليتها على انتاج مادة Dimethyl disulfide) DMDS (التي لها القدرة على ترسيب العناصر النزرة بكفاءة (صاحي وحسن،2006). لذا وقع الاختيار على استخدام بكتريا ال*P. aeruginosa* بوصفها عاملاً لمقاومة المعادن النزرة في دراستنا الحالية وامتازت بانها خلايا سالبة لصبغة غرام ، عصوية ، هوائية ، ولها مستعمرات كبيرة ولونها شاحب على وسط اكار الماكونكي ولها القابيلة على

انتاج صبغة (Pyocynin) عند تنميتها على وسط الاكار المغذي الصلب والمرق المغذي السائل ،اذ يمكنها النمو في درجة حرارة تتراوح ما بين 4-42م .وبالرجوع (Caown&steels,2004) . تشير نتائج التشخيص إلى أن العزلات هي الزائفات الزنجارية ، وهذا ما أكده عدد من الباحثين (Roberts and Greenwood,2003;Umamahewari *et al*.,2011) .

كما بينت العزلات الخاصة ببكتريا *P. aeruginosa* انتاجهالانزيم الاوكسيديز ، وانزيم الكاتليز ، واظهرت الاختبارات الكيموحيوية بان العزلات مستهلكة للسترات ، وكما موضح في الجدول (4-1) .

جدول (4-1) الاختبارات الكيموحيوية والمجهرية والزرعية للعزلات الاكثر تحمل للمعادن الثقيلة

التسلسل	الاختبارات	1	2	3	4
1	صبغة غرام	-	+	+	-
2	اختبار الاوكسيديز	+	+	-	+
3	اختبار الكتاليز	+	+	-	+
4	اختبار استهلاك السترات	+	+	+	+
5	اختبار تحلل النشأ	-	-	+	-
6	اختبار الاكسدة والتخمر	0	+	-	+
7	قابلية النمو على وسط اكار الماكونكي	+	-	-	+
8	اختبار الفوكاس بروسكاور	+	-	-	+
9	اختبار الاندول	-	-	+	-
10	اختبار احمر المثيل	-	+	+	-
11	قابلية النمو عند درجة حرارة 4 مْ	+	+	+	+
12	قابلية النمو عند درجة حرارة42 مْ	+	+	+	+
13	اختبار اليوريا	-	-	+	d

1-*Pseudomonas aeruginosa 2-Staphylococcus sp.*

3-Bacillus sp. 4 -Nisseria sp

+نتيجة موجبة (O) مؤكسدة

- نتيجة سالبة (d) تفاعل ضعيف

2-4 العوامل غير الإحيائية

تمت دراسة العوامل غير الاحيائية الجدول(4-2)الخاصة بعينات ماء نهر مهروت من درجة حامضية، ودرجة حرارة الماء ،والجو ونسب الصوديوم ، والبوتاسيوم ، وجد أن درجة الحرارة ، والاس الهيدروجيني ، واملاح الصوديوم ، والبوتاسيوم انها تقع ضمن المدى الطبيعي (حسين،2013)وكذلك من خلال الدراسة الميدانية لهذا النهر –لوحظ عدم توافر معامل او مصانع تصب فضلاتها فيه ،وهذا يعني أن البكتريا المعزولة من مياه هذا النهر تحتاج إلى تطبيع Adaptation على تحمل المعادن (Abd aliretha,1997) داخل المختبر .

جدول(4-2) قيم العوامل البيئية لماء نهر مهروت من درجة حامضية و درجة حرارة الماء و الجو ونسب الصوديوم والبوتاسيوم .

رقم المحطة	درجة الحرارةالجو (مئوية)	درجة حرارةالماء (مئوية)	الدالة الحامضية	Na الصوديوم ملغم	K البوتاسيوم ملغم
1	24	18	7.76	0.8	3.5
2	22	17	8.9	2.1	1.2
3	23	17	8.13	0.6	0.7
4	19	13	7.94	0.9	0.5
5	20	13	7.5	0.9	2

3-4 تحديد التركيز المتحمل الاكبر(MTC) والتركيز المثبط الادنى (MIC)

لقد تم تحديد كل من التركيز المتحمل الاكبر والتركيز المثبط الادنى من خلال تنميتها على وسط اكار مستخلص الخميرة ببتون المزود بتراكيز متدرجة لاملاح الايونات المعدنية للمعادن الاربعة قيد الدراسة و تبين من خلال التجارب أن بكتريا ال *Pseudomonas aeruginosa* هي أكثر الانواع البكتيرية تحملاً للمعادن.

لقد تبين أيضا أن بكتريا ال*Staphylococcus spp.* هي أكثر الاجناس البكتيرية الاربعة تحملا لعنصر الكروم إذ أظهرت نمو في تركيز 800 ppm وبكتريا ال *Nisseria* spp. اقل تحملا وبتركيز 50ppm ، أما عنصر الخارصين فقد تبين أن بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* هي التي أظهرت أعلى قيمة تحمل للتركيز900 ppm بينما بكتريا ال *Bacillus sp.* كانت سجلت اقل تركيز وهو 100ppm .

أما عنصر الرصاص لقد سجلت بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* أعلى تركيز وهو 1100ppm بينما بينت كل من *Nisseria* spp. و *Bacillus sp.*نفس المقاومة للمعدن بتركيز 400ppm .

أظهرت نتائج تحمل عنصر النحاس للاجناس البكترية الاربعة أن بكتريا ال *Pseudomonas aeruginosa* . لها أعلى قيمة تحمل 1200 ppmوبكتريا ال *Bacillus sp.* لها اقل تحمل 200 ppmوكما مبين في الجدول (4-3) و (4-4) و(4-5)و(4-6) حيث تبين أن نمو المستعمرات البكتيرية لبكتريا ال *Pseudomonas aeruginosa*على الوسط الحاوي على معدن الكروم ادى إلى ازالة لون الوسط ليصبح شفافا بعد مرور 72 ساعة ، بينما كان لون المستعمرات نحاسياً في الوسط الحاوي على الرصاص بمكوناته واصبح الوسط شفافا كلما زادت مدة الحضانة ،ايضا أصبح الوسط شفافا عند نمو المستعمرات في الاوساط الحاوية على النحاس والخارصين.

جدول (4-3) قيم التركيز الحتمل الاكبر MTC و التركيز المثبط الادنى MICلبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

المعدن	MIC(ppm)	MTC(ppm)
الكروم (Cr)	400	350
الخارصين(Zn)	1000	900
الرصاص(Pb)	1200	1100
النحاس (Cu)	`1300	1200

جدول (4- 4) قيم التركيز الحتمل الاكبر MTC و التركيز المثبط الادنى MICلبكتريا *Staphylococcus sp*.

MTC(ppm)	MIC(ppm)	المعدن
200	300	الخارصين (Zn)
600	700	النحاس (Cu)
800	900	الكروم (Cr)
1000	1100	الرصاص(Pb)

جدول (4-5) قيم التركيز الحتمل الاكبر MTC و التركيز المثبط الادنى MICلبكتريا *Bacillus sp*.

MTC(ppm)	MIC(ppm)	المعدن
150	200	الكروم(Cr)
100	200	الخارصين (Zn)
200	250	النحاس (Cu)
400	500	الرصاص(Pb)

جدول (4-6) قيم التركيز الحتمل الاكبر MTC و التركيز المثبط الادنى MICلبكتريا *Nisseria sp*.

MTC(ppm)	MIC(ppm)	المعدن
50	100	الكروم (Cr)
400	500	الرصاص(Pb)
400	500	الخارصين (Zn)
500	600	النحاس (Cu)

جاءت نتيجة المقاومة العالية في الدراسة الحالية متوافقة مع النتائج التي ذكرها Kumaran وزملاؤه (2011) وكانت مقاومة *Pseudomonas* spp. اعلى من مقاومة *Bacillus* spp. و *E. coli* و *Staphylococcus* spp. و *Nisseria* spp. وهذا جاء متناقضاً مع دراسة paris وزملائه (2011) اذ ذكر فيها توافر عزلات بكتيرية اخرى مثل *Staphylococcus* اكثر مقاومة من *Pseudomonas*لعنصر الرصاص Pb ، وكذلك بين ان *Bacillus* اكثر مقاومة من *Pseudomonas* إلى Zn Cu , ومتناقضة ايضا من حيث MIC إذ كان Zn اكثر من Cu بينما في الدراسة الحالية MIC لCu اكثر من Zn .

أشارت دراسة قام بها كل منSiripum وCharoon (2010) إذ ذكرا فيها ان MIC لعنصر الخارصين Zn هو ppm ، اما عنصر الكروم Cr فقد كان MTC له هو ادنى قيمة حيث كانppm300 بينما MIC في هذه الدراسة كان 350 ppm. ووجد في الدراسة الحالية ان مقاومة *Pseudomona* للمعادن كانت اعلى قيمة لعنصر النحاس وادنى قيمة لعنصر الكروم كما موضح في الجدول (4-3) وهذا يتفق مع الدراسة التي اجراها Sing وزملاؤه (2010) وايضاً الدراسة التي قام بها Tee وNajah (2011) اشارا إلى أن مقاومة البكتريا للنحاس أكثر من الكروم ولكنها تختلف مع نتيجة التي ذكرها Akmbowal وزملاؤه (2007) في حين إن بكتريا *Pseudomonas* مقاومتها لـ Cr اعلى من Cu إذ كان MIC 800و200 ppm على التوالي .وهذا يعود إلى اختلاف البيئات ،ومدة تعرض البكتريا لتلك المعادن وقدرتها على التطبع والتحمل ومن ثم البقاء .

4-4 نسب البقاء للأسماك

بينت التجارب الأولية تأثيرات متباينة على نسب البقاء ،وكذلك على متوسط الزمن المميت والتركيز ، و كان للمعادن أيضا تأثيرات مضادة على الأسماك من حيث التغير بالسلوك .

4-4-1 تأثير عنصر الرصاص على نسب البقاء

كان لعنصر الرصاص تأثير واضح على نسب البقاء للأسماك وبتركيز (75،85،95) ملغم/لتر من خلال النتائج المسجلة والمبينة في الجدول (4-7) إذ يوضح نسب البقاء ،و قيم متوسط الزمن المميت LT_{50} ، والزمن المميت الكلي ، ومتوسط التركيز المميت LC_{50} لصغار اسماك *C.carpio* المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر الرصاص بتراكيز(75،85،95) ملغم/ لتر قبل المعالجة وبعدها أي بعد إضافة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* لمعرفة دورها في إزالة تأثير المعدن على الأسماك

لمتابعة ما يحصل في ظاهرة المعالجة الحيوية bioremediation ولمدة 96 ساعة، أن التراكيز الأولية لمعدن الرصاص (35،25،15) ملغم/ لتر.

فقد سجل التركيز الأعلى لعنصر الرصاص 95ملغم /لتر نسبة بقاء 80%وهي اقل نسبة بقاء بعد مرور 48 ساعة قبل المعالجة ، فيما انخفضت هذه النسبة لتصل إلى الصفر بعد مرور96 ساعة على بدء التجربة قبل المعالجة .

أما بعد إضافة البكتريا أي بعد المعالجة الاحيائية bioremediation فقد أظهرت النتائج وبعد مرور 96 ساعة للتركيز 95 ملغم/لتر ارتفاعاً ملحوظا في نسب البقاء إذ سجلت ارتفاعاً ليصل إلى 40% .

بينما اظهر التركيز 75 ملغم/لتر نسبة بقاء بعد مرور 96ساعة قبل المعالجة 50% إذ ارتفعت هذه القيمة في تجارب المعالجة لتسجل نسبة 90% أما التركيز 85 ملغم/لتر ايضا سجل فرقا في نسب البقاء في احواض المعالجة بنسبة 40% .

الزمن القاتل النصفي (LT_{50}) فقد سجل التركيز الأعلى لعنصر الرصاص قبل المعالجة 72 ساعة ، اما التركيز الأدنى لعنصر الرصاص فقد سجل متوسط زمن مميت 96 ساعة قبل المعالجة والتركيز 85 ملغم/لتر فقد سجل 80 ساعة وكما موضح بالشكل (4-9) بينما ازدادت هذه الفترات الزمنية بعد المعالجة لتصل إلى 88 ساعة للتركيز95 ملغم/لتر ، واكثر من 96 ساعة للتركيز 75 ملغم/لتر بعد أن كان 96 ساعة ،أما التركيز 85 ملغم/لتر ايضا ارتفع LT50 ليصل الى أكثر من 96 ساعة ،كما مبين في الشكل (4-1).،أما الزمن المميت الكليLT100 فقد كان أكثر من 96 ساعة للتركيزيين 75و85 ملغم/ لتر قبل المعالجة وبعدها أما التركيز 95 ملغم/لتر فقد سجل زمن مميت كلي 96 ساعة قبل المعالجة ارتفع إلى أكثر من 96 ساعة بعد المعالجة .

تناقضت هذه النتائج مع ما توصل اليه العلي (1999) في دراسته حيث توصل إلى أن LT_{50} للتركيز 35 ملغم/لتر كان 42 ساعة ،ربما يعود هذا الاختلاف إلى زيادة نسب التلوث في السنين الأخيرة نتيجة الحروب وزيادة الصناعة وقلة المراقبة على آلية التخلص من مياه الصرف الصحي والصناعي الأمر الذي ادى إلى تكيف الأسماك للمعيشة ضمن تراكيز عالية من المعادن ، لقابليتها على التكيف للعيش في البيئات عالية التلوث .

ذكر Winter (2008) ان متوسط الزمن المميت لأسماك *Oncorhynchus mykiss* المعرضة لتركيز 3 مولاري هو 70 ساعة .

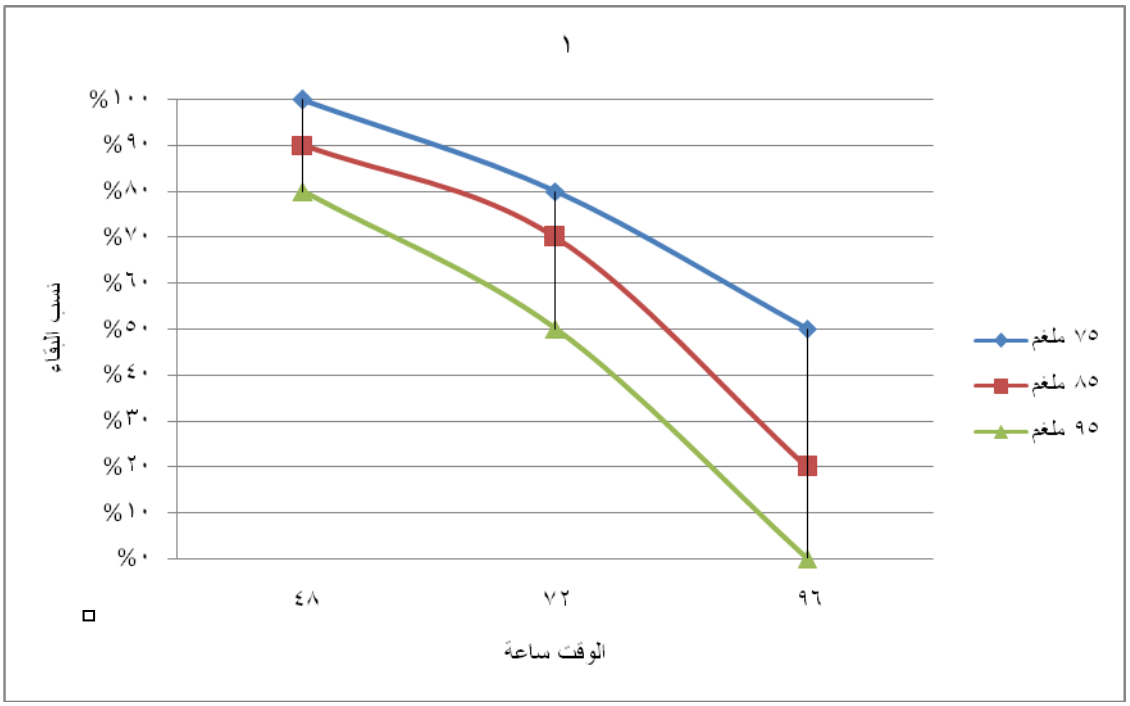
أن التركيز القاتل النصفي LC50كان بعد مرور 96 ساعة 75 ملغم / لتر قبل المعالجة إذ سجلت ارتفاعاً ملحوظاً ليصل إلى 88 ملغم / لتر بعد المعالجة و للفترة

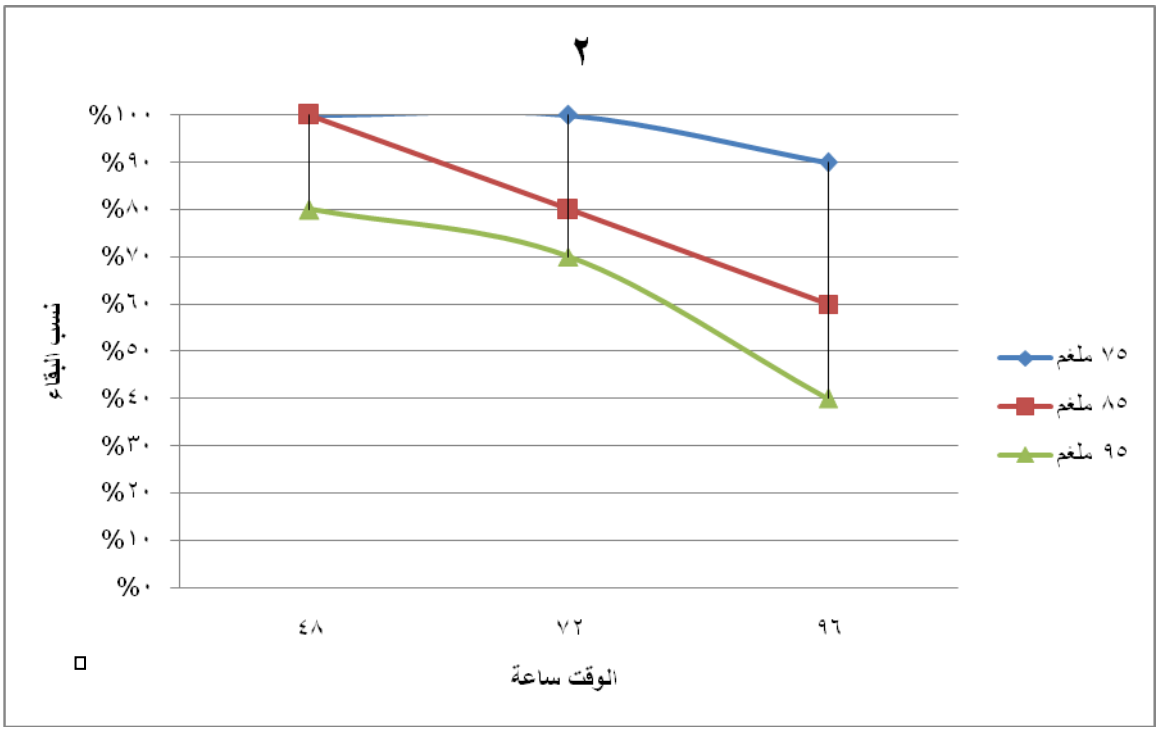
الزمنية نفسها أما الفترة (48و72)ساعة فقد سجلا أكثر من 95ملغم/لتر للفترة الاولى و95 ملغم/لتر للفترة الثانية قبل المعالجة اختلفت هذه القيم لترتفع إلى أكثر من 95 ملغم/لتر لكلا الفترتين وكما مبين في الشكل (4-1).

اشار Shah (2005) في دراسته على سمك *Tincatinca* ان LC_{50} لعنصر الرصاص كان 1.59 ملغم/لتر، وهذا يتناقض مع الدراسة الحالية ، كذلك بين Bat وزملاءه (2011)ان متوسط التركيز المميت لروبيان *Palaemonadspersus* المعرضة لعنصر الرصاص ولفترة 96 ساعة 66 ملغم /لتر .تناقضت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة العلي (1999) التي بين فيها أن متوسط الزمن المميت لاسماك الكارب عند تعرضها لعنصر الرصاص للتركيز 35 ملغم/لترولفترة 96 ساعة كان 48 ساعة.

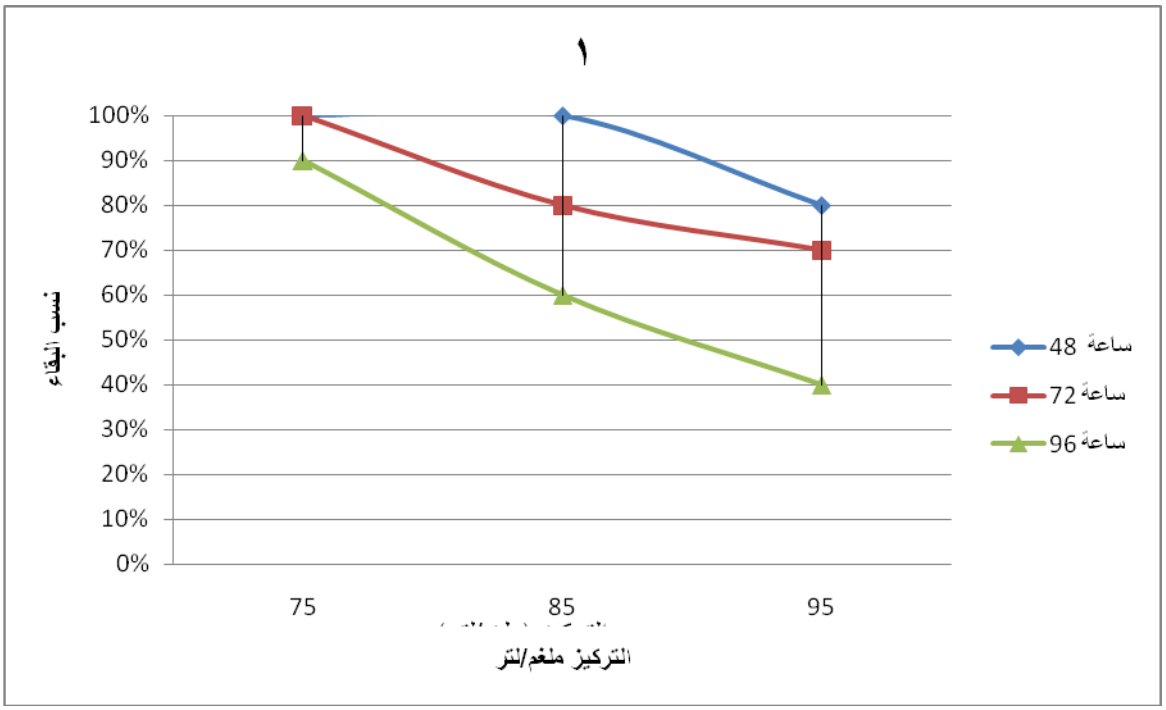
جدول (4-7) قيم نسب البقاء ، ومتوسط الزمن المميت ، والزمن المميت الكلي ، ومتوسط التركيز المميت LC_{50} لصغار اسماك *C. Carpio* بعد تعرضها لفترة (48 -72 – 96) ساعة لتراكيز مختلفة من عنصر الرصاص قبل المعالجة وبعدها Bioremediation ب بكتريا *P. aerugenosa*

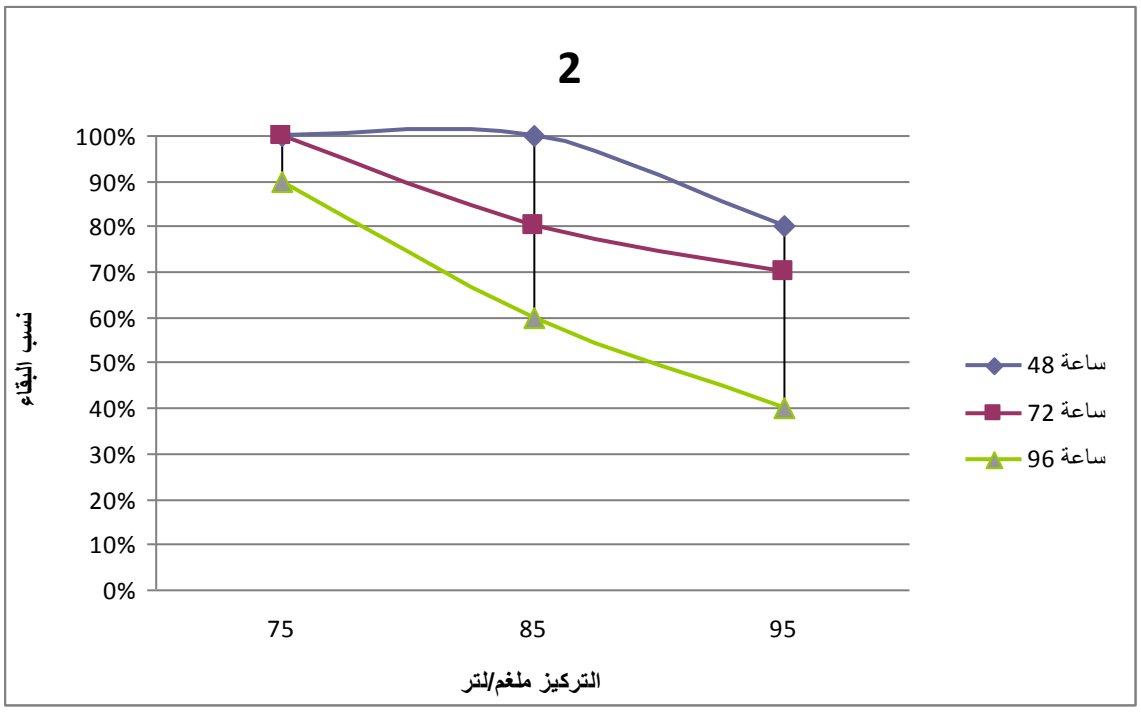
نسب البقاء%					التركيز ملغم / لتر						LC_{50}	
قبل المعالجة	الوقت ساعة	75	85	95	75		85		95		الوقت ساعة	التركيز ملغم/لتر
	48	100	90	80	LT_{50}	96h	LT_{50}	80h	LT_{50}	72h	48	95 <
	72	80	70	50	LT_{100}	96<h	LT_{100}	16h	LT_{100}	96h	72	95
	96	50	20	0							96	75
بعد المعاجلة	48	100	100	80	LT_{50}	96<h	LT_{50}	96<h	LT_{50}	88h	48	95 <
	72	100	80	70	Lt_{100}	96<h	LT_{100}	96<h	LT_{100}	96<h	72	95 <
	96	90	60	40							96	88





الشكل (4-1)يمثل قيم LT50 لبقاء صغار اسماك الكارب*C. carpio*المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر الرصاص ولفترة 96 ساعة 1- قبل المعالجة الحيوية 2-بعد المعالجة بـ *P. aeruginosa*





الشكل (4-2) يمثل قيم LC50 لبقاء صغار اسماك الكارب *C. carpio* المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر الرصاص ولفترة 96 ساعة 1-قبل المعالجة الحيوية 2- بعد المعالجة بـ *P. aeruginosa*

4-4-2تأثير عنصر الكروم على نسب البقاء

بينت التجارب الاولية عدم تأثر صغار اسماك الكارب *Cyprinus carpio* للتراكيز(6،5،9،8،7) ملغم/لتر ،بينما التراكيز (12،11،10) ملغم/لتر كان لها تأثير واضح وكما مبين بالجدول((4-8) إذ يمثل الجدول نسب البقاء للاسماك قبل المعالجة الحيوية وبعدها ، وقيم متوسط الزمن المميت ، والزمن المميت الكلي ، ومتوسط التركيز القاتل للاسماك*Cyprinus carpio* المعرضة لتراكيز (10 , 11 , 12) ملغم / لتر ولفترة 96 ساعة .

إذ سجل التركيز الاعلى لعنصرCr70% نسبة بقاء بعد مرور 48 ساعة وهي ادنى نسبة لتنخفض بعد مرور 96 ساعة إلى 40% ،بينما اختلفت هذه القيمة بعد المعالجة لترتفع من 70% قبل المعالجة إلى 90% خلال 48 ساعة وارتفعت هذه النسبة من40% قبل المعالجة لتصل إلى 50%بعد المعالجة و للتركيز نفسه ، بينما التركيزان 10و11 ملغم فقد سجلا اختلافاً في نسب البقاء قبل المعالجة عما عليه بعد المعالجة بنسب قليلة جداً(10%) تقريباً لكلا التركيزين بعد مرور 96 ساعة .

اذ عند تعريض الأسماك ولمدة 96 ساعة لتركيز 10ملغم/لتر كانت نسبة البقاء 80% بينما ارتفعت هذه النسبة لتصل إلى 90%للاحواض التي تحتوي على عنصر الكروم والبكتريا و للفترة الزمنية نفسها والتركيز، بينما الاحواض التي تم اضافة 11ملغم/لتر اليها من عنصر الكروم فقد سجلت 60%نسبة بقاء بعد مرور 96 ساعة ارتفعت هذه القيمة إلى 70% في احواض المعالجة.

تتناقض نتائج الدراسة الحالية مع النتائج التي بينها كل من Tayybah وزملاءه(2005)حيث ذكروا أن التركيز 50ملغم/لتر سجل نسبة بقاء 90% بعد مرور 96 ساعة من فترة تعريض لاسماكالكارب وبمعدل وزن 500 غم تقريبا .

ان متوسط الزمن المميت سجل اختلافاً ايضاً قبل المعالجة عن بعد المعالجة، اذ سجل التركيز الاعلى قيمةLT_{50} 72 ساعة قبل المعالجة أما التركيزين 10و11 ملغم/لتر فقد كان أكثر من 96 ساعة ، كما مبين بالشكل (4-3)وارتفع هذه المتوسطات الزمنية إلى 96 ساعة للتركيز 12 ملغم/لتر واكثر من 96 ساعة للتركيزين 10 و11 ملغم/لتر بعد المعالجة.

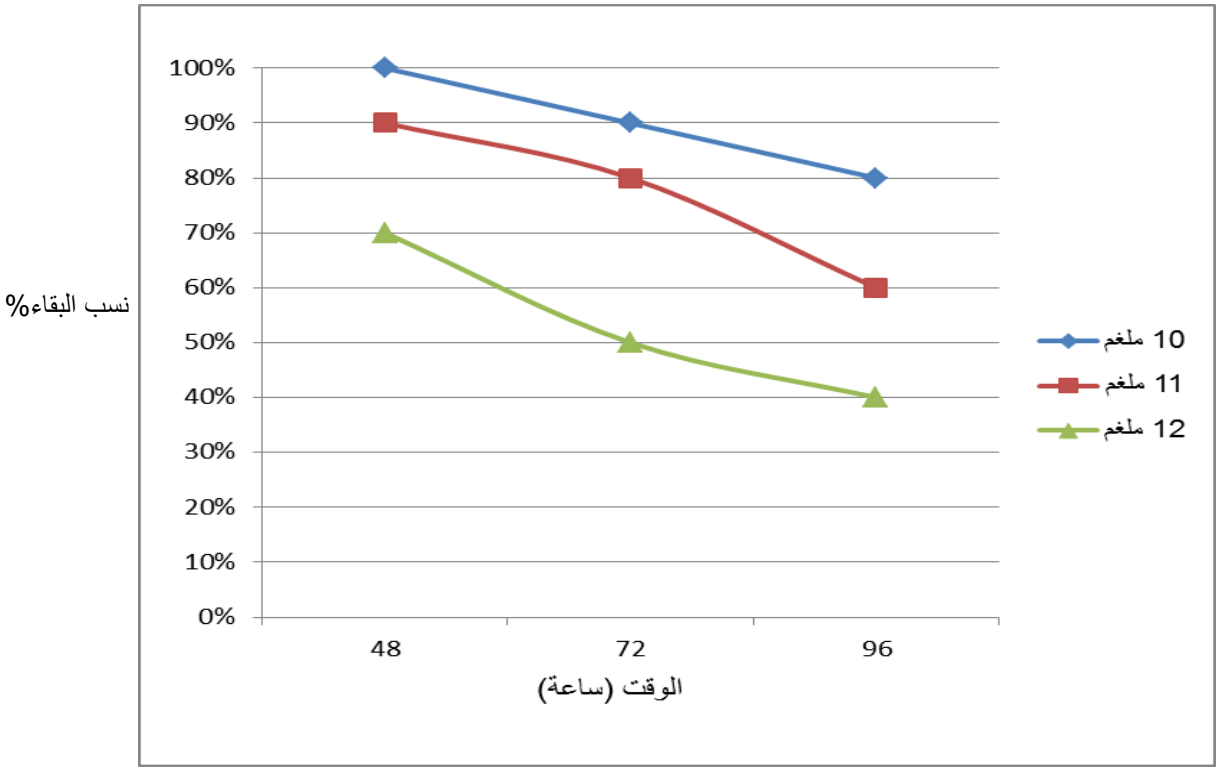
أما الزمن المميت الكليLT100 فقد كان أكثر من 96 ساعة لكل التراكيز وللتجربتين المعالجة وغير المعالجة .

كذلك يبين الجدول البيانات الخاصة بقيم متوسط التركيز المميت LC_{50} حيث سجلت الفترة الزمنية 48 ساعة أكثر من 12 ملغم/لتر وLC50للفترة 72 ساعة كان 12 ملغم/لتر وكانLC50 11.5 ملغم / لتر قبل المعالجة بعد 96 ساعة وكما موضح بالشكل (4-4) لترتفع هذه القيم أكثر من 12ملغم/ لترللمدة 48و72 ساعة بعد المعالجة و12 ملغم/لتر بعد 96 ساعة من المعالجة .

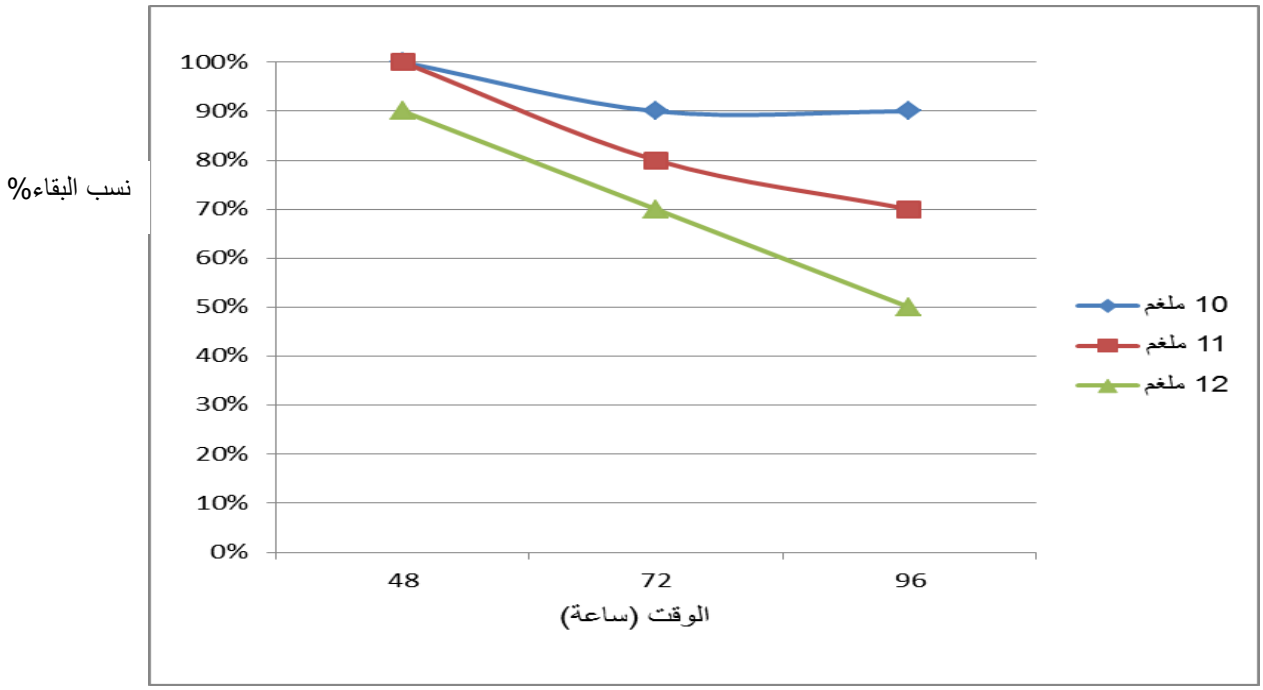
اشار Ezeonyejiaku وزملاءه (2011)في دراستهم على سمك *Snail* ، *Pulmonate* ، *Lumnaea acuminate* بأن LC_{50} ولفترة 96 ساعة كان Cr^{+2} هو 5.97mg/L.اما دراسةTayybah وزملائه (2005)ذكرو فيها ان LC_{50} لCr^{6+}كان 191 ملغم/لتر لاسماك الكارب الاعتيادي بمعدل وزن 500 غرام .

جدول (4-8) قيم نسب البقاء ، ومتوسط الزمن المميت ، والزمن المميت الكلي ، ومتوسط التركيز المميت LC_{50} لصغار اسماك *C. Carpio* بعد تعرضها لتراكيز مختلفة من عنصر الكروم لفترات (48 -72 – 96) ساعة قبل المعالجة وبعدها Bioremediation ببكتريا *P. aeruginosa*

LC_{50}		التركيز ملغم / لتر						نسب البقاء%				
التركيز ملغم/لتر	الوقت ساعة	12		11		10		12	11	10	الوقت ساعة	قبل المعالجة
12 <	48	72h	LT_{50}	96<h	LT_{50}	96<h	LT_{50}	70	90	100	48	
12	72	96<h	LT_{100}	96<h	LT_{100}	96<h	LT_{100}	50	80	90	72	
11.5	96							40	60	80	96	
12 <	48	96h	LT_{50}	96<h	LT_{50}	96<h	LT_{50}	90	100	100	48	بعد المعالجة
12 <	72	96<h	LT_{100}	96<h	LT_{100}	96<h	Lt_{100}	70	80	90	72	
12	96							50	70	90	96	

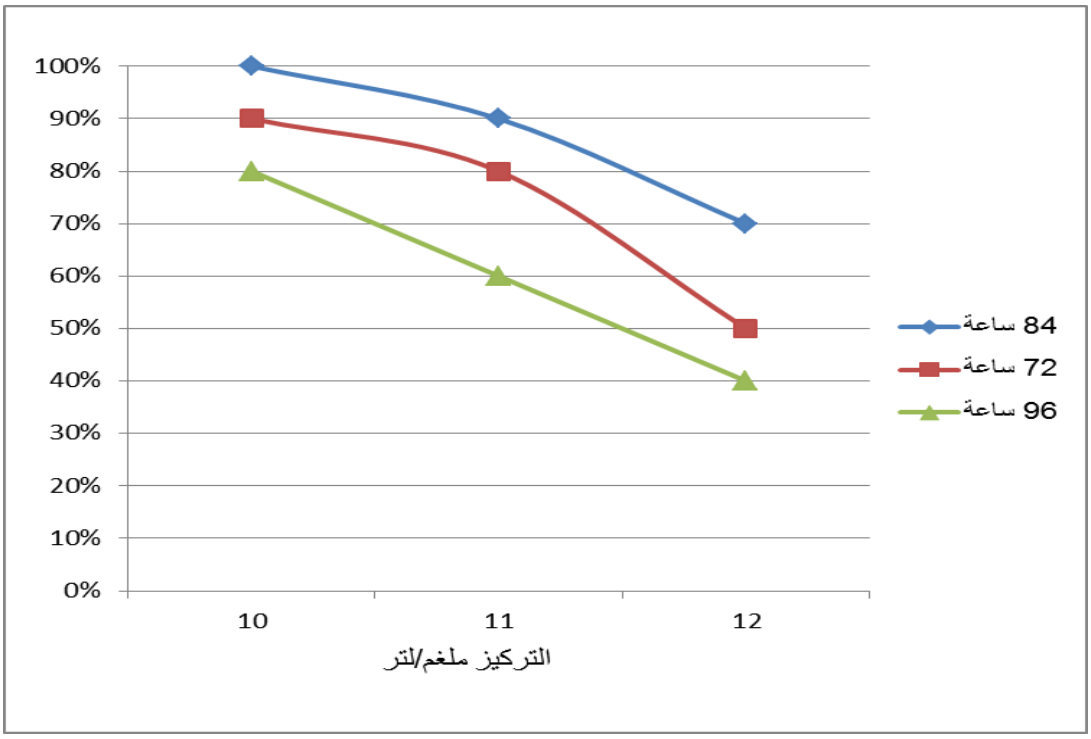


-1-



-2-

الشكل (4-3) يمثل قيم LT50 لبقاء صغار اسماك الكارب*C. carpio* المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر الكروم ولفترة 96 ساعة1-قبل المعالجة الحيوية 2- بعد المعالجة بـ *P. aeruginosa*



-1-

-2-

الشكل (4-4) يمثل قيم LC50 لبقاء صغار اسماك الكارب *C. carpio* المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر الكروم ولفترة 96 ساعة 1- قبل المعالجة الحيوية 2- بعد المعالجة بـ *P.aeruginosa* .

3-4-4 تأثير عنصر الخارصين على نسب البقاء

تشير النتائج في الجدول (4-9) البيانات الخاصة بتأثير عنصر الخارصينZnوبتراكيز مختلفة (5،6،7) ملغم / لتر ولفترة 96 ساعة .

أذ سجل التركيز 7 ملغم اقل نسبة بقاء بعد مرور 48 ساعة لتصل إلى 40% بينما هذه القيمة وصلت إلى الصفر بعد مرور 96 ساعةقبل المعالجة حيث زادت هذه القيمة بعد المعالجة لتصل إلى 40% بعد مرور 96 ساعة ، اما التركيزان (5 , 6) ملغم/لتر فقد سجلا ايضاً اختلافاً في قيم نسب البقاء بعد مرور 96 ساعة إذ زادت قيم البقاء للتركيز 5ملغم/لتر من 30% قبل المعالجة إلى 60% بعد المعالجة والتركيز 6 ملغم/لترمن 10% إلى 50% .

متوسط الزمن المميت LT50لعنصر الخارصين سجل ايضاً اختلافاً إذ كان 72 ساعة للتركيز الادنى5ملغم/لتر قبل المعالجةكما موضح في الشكل (4-5) ارتفعت لتصبح أكثر من 96 ساعة بعد المعالجة ام التركيز6 ملغم/لتر فقد كان LT50 له 60 ساعة قبل المعالجة و96 ساعة بعد المعالجة كذلك التركيز 7 ملغم/لتر اظهر فرق في قيمة LT50إذ كان اقل من 48 ساعة قبل المعالجة ارتفع ليصبح 72 ساعة بعد المعالجة .

ايضاً يبين الجدول(4-9) نتائج LC_{50}لعنصر الخارصين حيث كان متوسط التركيز المميت قبل المعالجة للفترة 48 ساعة 6.6 ملغم/لتر حيث ارتفعت هذه القيم بعد المعالجة إلى أكثر من 7 ملغم/لتر ،وكانت 5 ملغم/لتر بعد مرور 72 ساعة قبل المعالجة ارتفعت لتصل إلى 7 ملغم/لتر بعد المعالجة أما بعد مرور 96 ساعة فقد كان LC50 اقل من 5 ملغم/لتر قبل المعالجة ارتفعت لتصبح 5 ملغم/لتر بعد المعالجة كما مبين في الشكل (4-6)

اذ جاءت نتائج دراسة Gundogdu (2008) على *mykiss Orchorhyncus* مناقضة لنتائج الدراسةان LT50المعرضة لعنصر الخارصين بتركيز 15و27 ملغم/لتر كان 96 و10 ساعة على التوالي ، اماLC50فقد كان بعد 96 ساعة 15 ملغم/لتر قد يكون هذا الاختلاف نتيجة مقاومة النوع او اختلاف البيئة .

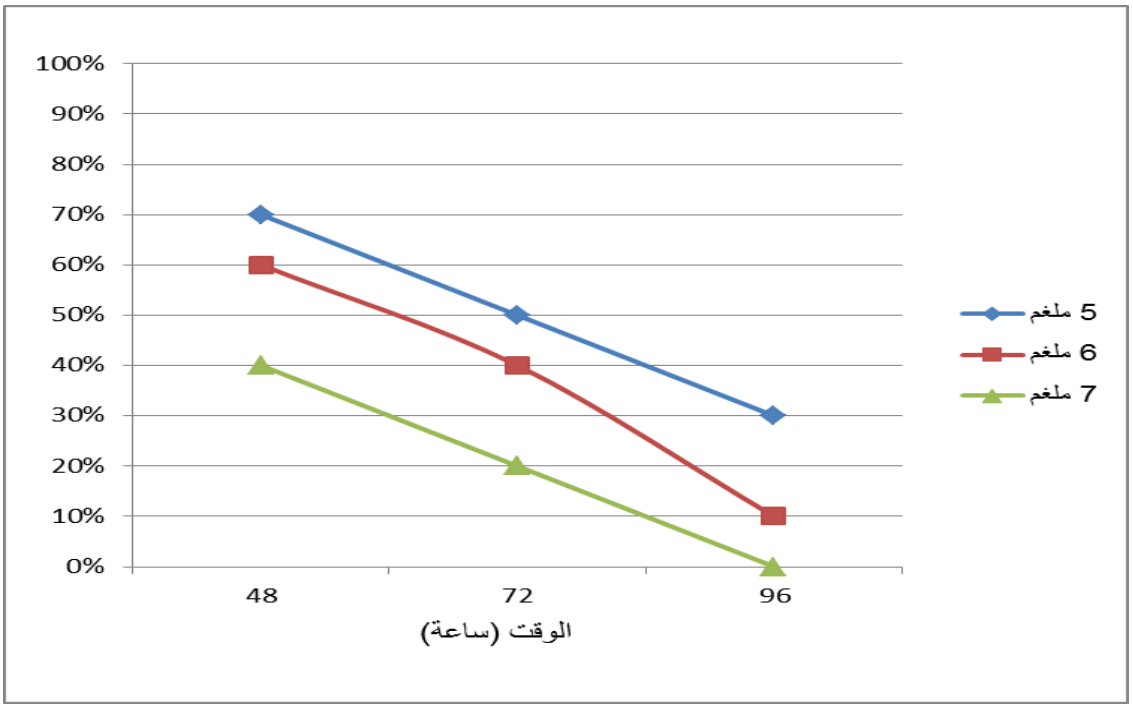
كما اشارEzeonyejiakuوزملاءه (2011)في دراستهم على سمك *Snail* ، *Pulmonate* ، *Lumnaea acuminate* بأنLC_{50} ولفترة96 ساعة كان ل Zn^{+2} هو (10.49) mg/L.ايضا ذكرMishra وزملاءه(2012) في دراستهم على سمك *Colisafasciatus* ان LC_{50} كان ولفترة 96 ساعة 62.28 ملغم/لتر.

ايضا اوضحت النتائج التي بينها Shankerوزملاءه (2011) لتأثير عنصر الخارصين على سمك *Tilapia mossambica* ان LC50 و لفترة 96 ساعة كان

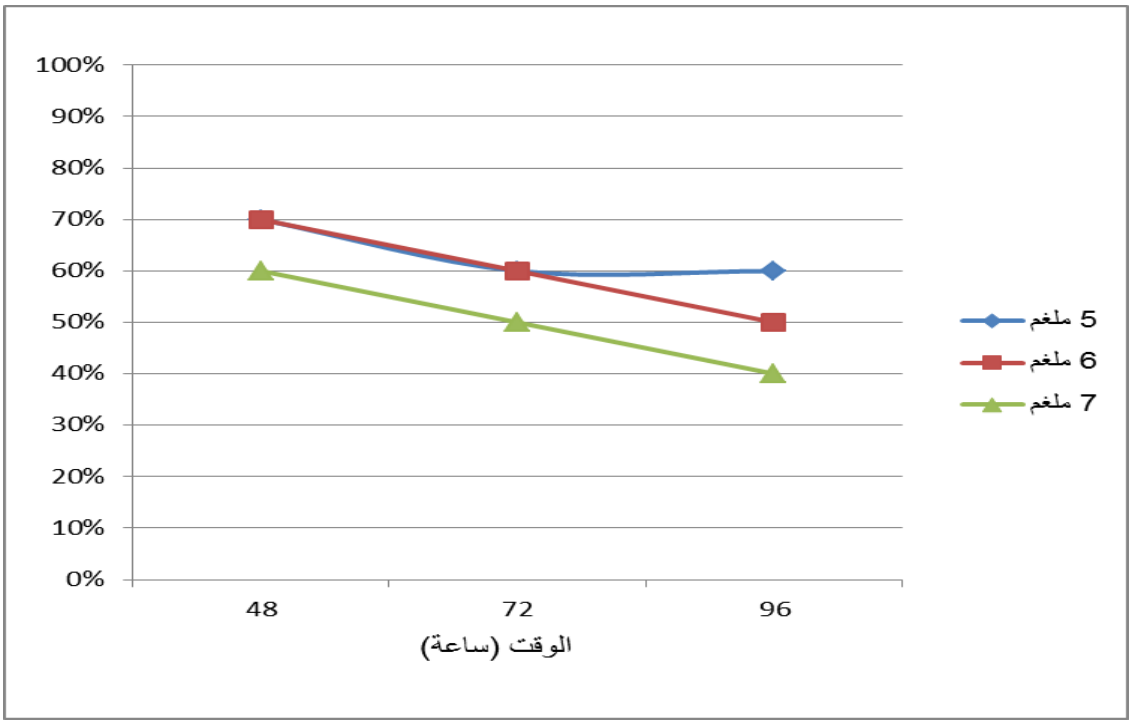
ppm14 ،،بينما جاءت دراسة Ariole و Ukeje (2013) على الحلزون *Pila ovate* لتحديد LC50 و LT50 لعنصر الخارصين إذ كان LC50 للفترة 96 ساعة 21.20 ملغم/لتر وLT50 لتركيز 20 ملغم/لتر كان 86.45 ساعة.

جدول (4-9) قيم نسب البقاء ، ومتوسط الزمن المميت ، والزمن المميت الكلي ، ومتوسط التركيز المميت LC_{50} لصغاراسماك *C. Carpio* بعد تعرضها لتراكيز مختلفة من عنصر الخارصين لفترات (48 -72 – 96) ساعة قبل المعالجة وبعدها Bioremediation ببكتريا *P. aeruginosa*

نسب البقاء%					التركيز ملغم / لتر						LC_{50}	
قبل المعالجة	الوقت ساعة	5 ملغم/لتر	6 ملغم/لتر	7 ملغم/لتر	5		6		7		الوقت ساعة	التركيز ملغم/لتر
	48	70	60	40	72h	LT_{50}	h60	LT_{50}	48>h	LT_{50}	48	6.6
	72	50	40	20	96<h	LT_{100}	96 >h	LT_{100}	96h	LT_{100}	72	5
	96	30	10	0							96	5>
بعد المعالجة	48	70	70	60	96<h	LT_{50}	96 h	LT_{50}	72h	LT_{50}	48	7<
	72	60	60	50	96<h	Lt_{100}	96<h	LT_{100}	96<h	LT_{100}	72	7
	96	60	50	40							96	5

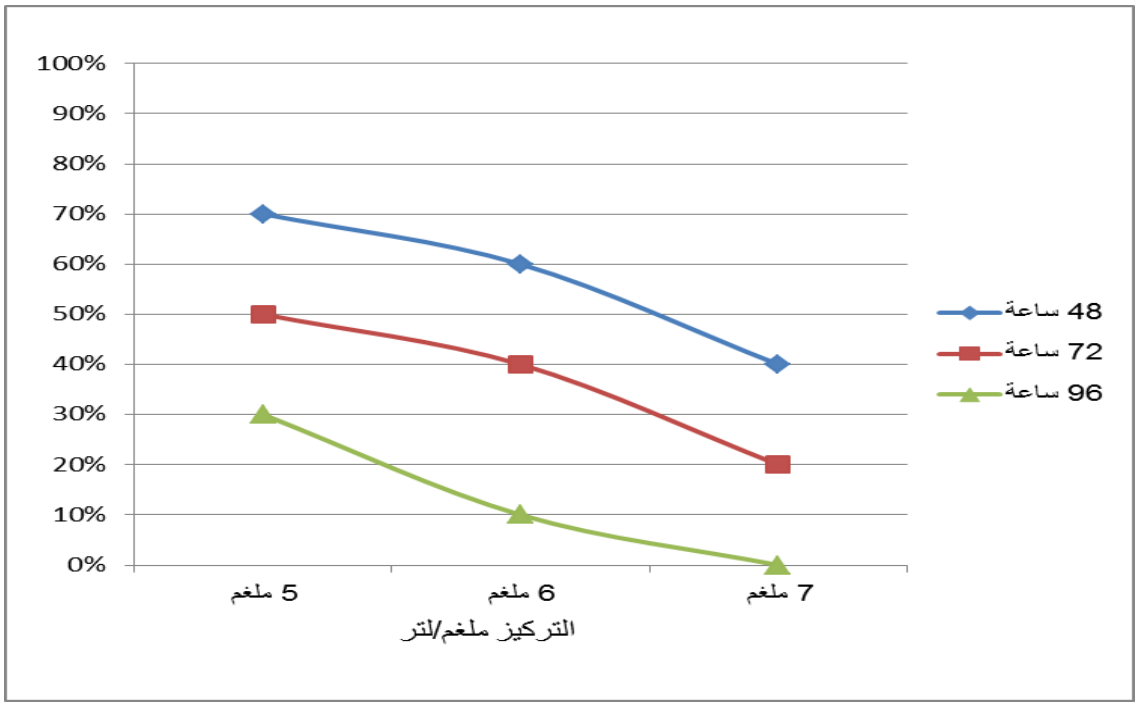


-1-

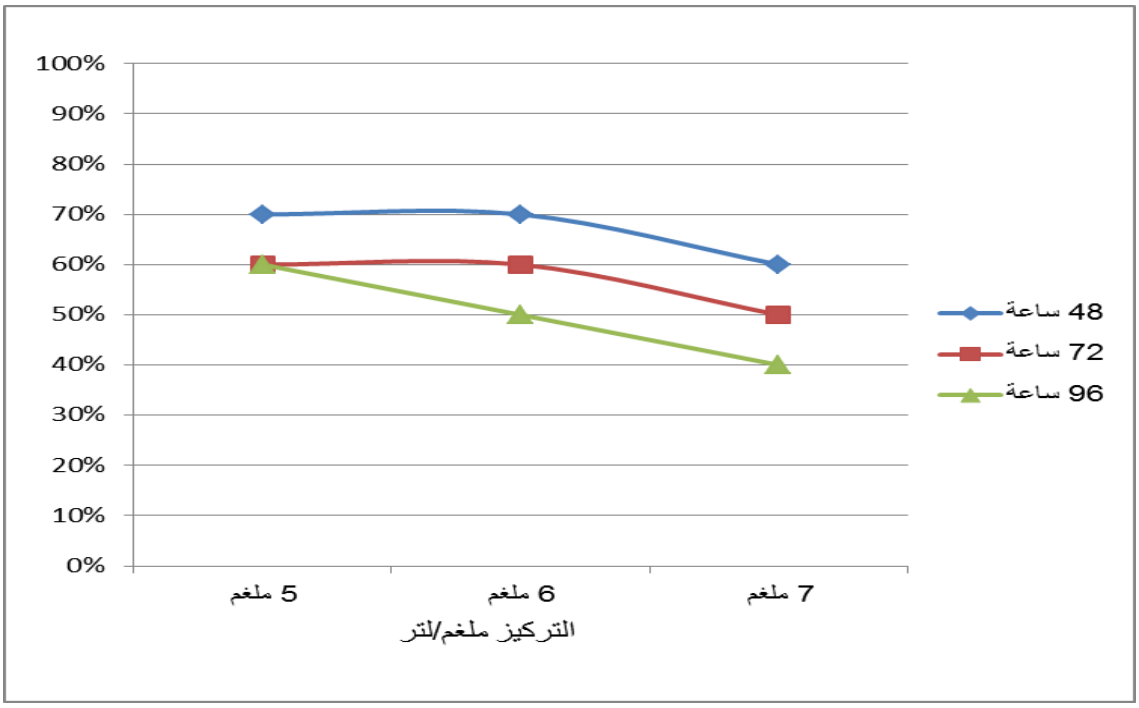


-2-

الشكل (4- 5) يمثل قيم LT50 لبقاء صغار اسماك الكارب *C. carpio* المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر الخارصين ولفترة 96 ساعة 1-قبل المعالجة الحيوية2- بعد المعالجة بـ *P. aeruginosa*



-1-



-2-

الشكل (4- 6) يمثل قيم LC50 لبقاء صغار اسماك الكارب*C. carpio*المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر الخارصين ولفترة 96 ساعة 1- قبل المعالجةالحيوية 2- بعد المعالجة بـ *P. aeruginosa*

4-4-4 تأثير عنصر النحاس على نسب البقاء

تشير النتائج في الجدول (4-10) الى تأثير عنصر النحاس Cu على كل من نسب البقاء ، و متوسط الزمن المميت LT_{50} ، و كذلك متوسط التركيز المميتLC50 ، والزمن المميت الكلي LT100 لصغار اسماك*Cyprinus carpio* المعرضة لتراكيز (3 , 4 , 5) ملغم ولفترة 96 ساعة و تأثير بكتريا *P. aeruginosa* أيضا على هذه القيم بعد المعالجة .

اذ وجد أن التركيز الأدنى 3ملغم قد سجل نسب بقاء 60% بعد مرور 48 ساعة بينما كانت هذه النسبة هي ذاتها بعد مرور 96 ساعة بعد المعالجة ، بينما التركيز الأعلى فقد سجل أدنى نسب بقاء بعد مرور 48 ساعة قبل المعالجة حيث بلغت 40% لتنخفض إلى الصفر بعد مرور 96 ساعة إذ اختلفت هذه القيم عن القيم بعد المعالجة لترتفع إلى 60%و40% بالفترتيين الزمنيتين 48و 96ساعة على التوالي .

بينما LT_{50}لتأثير عنصر النحاس على اسماك الكارب الاعتيادي كان ايضاً متأثراُ بالمعالجة الحيوية إذ بعد أن كان 64 ساعة قبل المعالجة للتركيز 3 ملغم/لتر وكما موضح بالشكل (4-7) ارتفع إلى أكثر من 96 ساعة بعد المعالجة كما مبين بالشكل (4-7) و اختلفت أيضا في التركيزيين 4 ملغم و 5 ملغم حيث كان قبل المعالجة 72 و80 ساعة على التوالي ليصبح 96 و88 ساعة على التوالي بعد المعالجة ، أما الزمن المميت الكلي LT100 فقد كان للتراكيز جميعاً أكثر من 96 ساعة قبل المعالجة وبعدها ماعدا التركيز 5 ملغم/لتر فقد سجل 96 ساعة قبل المعالجة .

اما بالنسبة لمتوسط التركيز المميت كان للفترات 48ساعة 4 ملغم/لتر و72و96 ساعة اقل من 3 ملغم/لتر قبل المعالجة (4-8)أما بعد المعالجة ارتفعت هذه التركيز لتصل إلى أكثر من 5 ساعة و4.5 و3.5ملغم/لترللفترة 48و72و96 ساعة على التوالي .

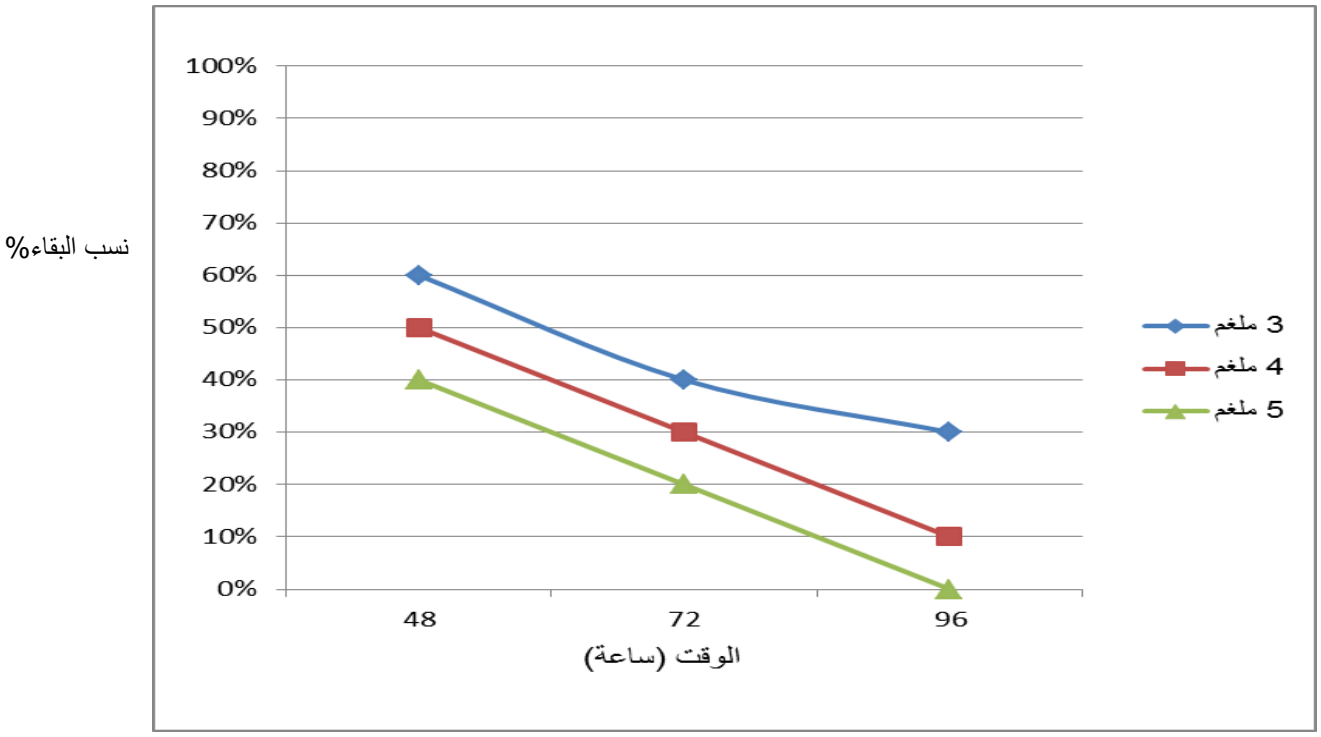
جاءت نتائج دراسة Gundogdu (2008)على*mykiss* *Orchorhyncus*مناقضة لنتائج الدراسة الحالية إذ ذكر أن متوسط الزمن و التركيز المميت كانت 96 و22 ساعة للتركيز 0.1 و2 ملغم/لتر ومتوسط تركيز قاتل 0.1 ملغم/لتر .

اشار Ezeonyejiaku وزملاءه (2011) في دراستهم على سمك *Snail* ، *Pulmonate* ، *Lumnaea acuminate* بأنLC_{50}ولفترة 96 ساعة كان لكل من Cu^{+2} 0.034 ملغم/لتر ، بينما بين Shuhaimi-Othman وزملاؤه(2010) بان LC50 لاسماك *Rasbora sumatrana* يعود إلى نفس عائلة سمك الكارب الاعتيادي ،المعرضة لعنصر النحاس ولمدة 96 ساعة كان 5.6 ملغم/لتر.،كذلك بينBatوزملاءه

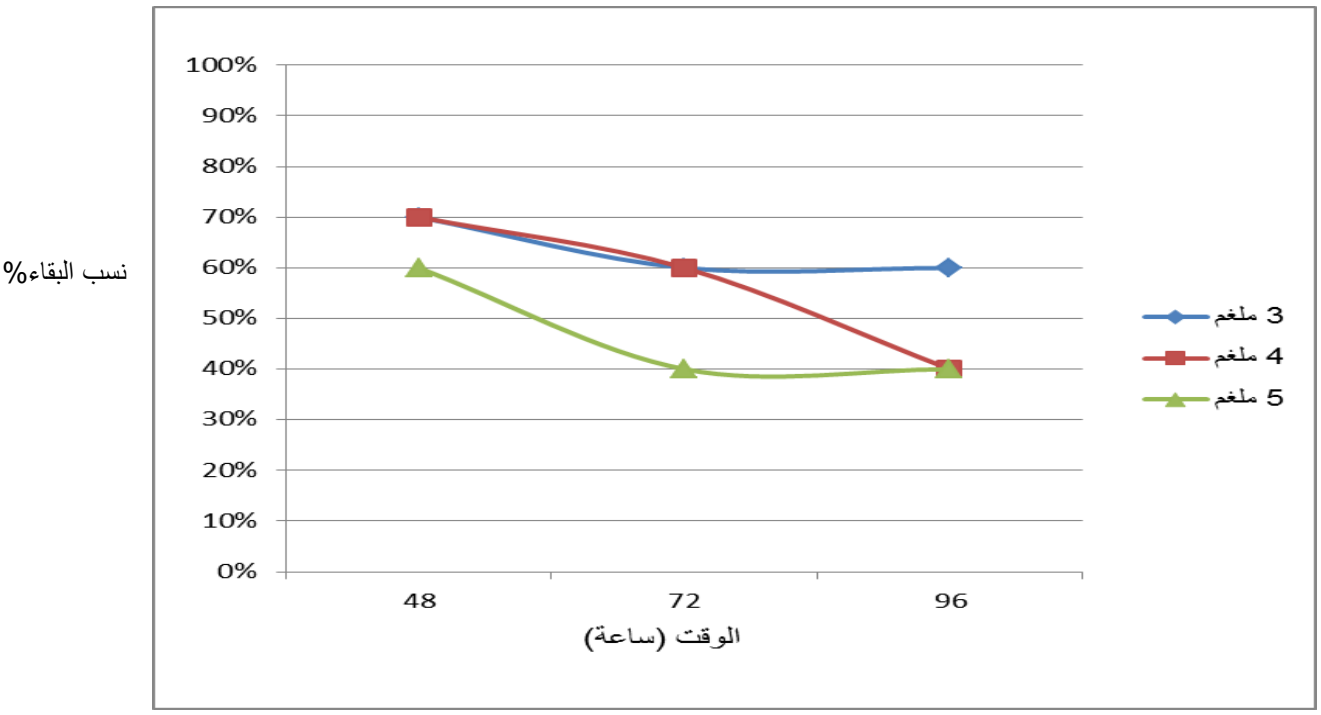
(2011)ان متوسط التركيز المميت لروبيان*Palaemon adspersus* المعرض لعنصر النحاس ولفترة 96 ساعة كان 16 ملغم/لتر .

جدول (4-10) قيم نسب البقاء ، ومتوسط الزمن المميت، والزمن المميت الكلي ، ومتوسط التركيز المميت LC_{50} لصغار اسماك *C. Carpio* بعد تعرضها لتراكيز مختلفة من عنصر النحاس لفترات (48 -72 – 96) ساعة قبل المعالجة وبعدها Bioremediation ببكتريا *P. aeruginosa*

LC_{50}		التركيز ملغم / لتر						نسب البقاء%				
التركيز ملغم/لتر	الوقت ساعة	5		4		3		5 ملغم/لتر	4 ملغم/لتر	3 ملغم/لتر	الوقت ساعة	قبل المعالجة
4	48	48>h	LT_{50}	48h	LT_{50}	64h	LT_{50}	40	50	60	48	
>3	72	96h	LT_{100}	48>h	LT_{100}	96<h	LT_{100}	20	30	40	72	
3<	96							0	10	30	96	
5 <	48	60h	LT_{50}	80h	LT_{50}	96<h	LT_{50}	60	70	70	48	بعد المعالجة
4.5	72	96<h	LT_{100}	96<h	LT_{100}	96<h	Lt_{100}	40	60	60	72	
3.5	96							40	40	60	96	



-1-



-2-

الشكل (4-7) يمثل قيم LT50 لبقاء صغار اسماك الكارب *C. carpio* المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر النحاس ولفترة 96 ساعة 1- قبل المعالجة الحيوية 2- بعد المعالجة بـ *P.aeruginosa*

-1-

-2-

الشكل (4- 17-2) يمثل قيم LC50 لبقاء صغار اسماك الكارب*C. carpio* المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر النحاس ولفترة 96 ساعة 1-قبل المعالجة الحيوية 2- بعد المعالجة بـ *P. aeruginosa*

فقد أشار Ezeonyejiaku وزملاؤه (2011)في دراستهم على سمك *Snail* ، *Pulmonate* ، *Lumnaea acuminate* بأن LC_{50} ولفترة 96 ساعة كان لكل من Cu^{+2} ، Cr^{+2} ، Zn^{+2} هو (0.034 ، 5.97 ، 10.49) ملغم/لتر على التوالي .

أكد Shuhaimi-Othman (2011) في دراسته على اسماك Rasbora sumatranaأن النحاس أكثر سمية من الخارصين ، والرصاص ، وهذا ما أكدته نتائج الدراسة الحالية .

جميع الدراسات السابقة تناقضت نتائجها مع الدراسة الحالية ؛ وذلك لاسباب عدة منها نتيجة الاختلاف في البيئة ودرجة التلوث ولكون الأسماك المستخدمة في الدراسة الحالية مأخوذة من مزارع خاصة في منطقة من الخالص (محافظة ديالى) تعتبر هذه المدينة زراعية أكثر مما هي صناعية ؛ لذا تتعرض للملوثات بنسبة اقل مما في البلدان الأخرى والسبب الآخر أن لأسماك الكارب رد فعل تكيفي للعيش في البيئات الملوثة كما ذكر كل من Vinodhini وNarayanan (2009) في دراستهما ،لذا تناقضت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة العلي (1999) التي بين فيها أن متوسط الزمن المميت لأسماك الكارب عند تعرضها و لعنصر النحاس للتركيز 3 ملغم/لتر كان 42 ساعة ، أما متوسط التركيز المميت كان وللعنصرين على التوالي (35 و2.8)ملغم/لتر. إذ بينت الدراسة التي قام بها كل منPatil .و Paknikar (2000) بالموازنة بين تأثير سيانيد الفضة غير المعالج حيويا على نسب بقاء الأسماك من السيانيد المعالج باستخدام إل *Pseudomonas sp*. إذ بين أن نسب البقاء للمجموعة الثانية هي 100% .

الدراسة الحالية هي الأولى من نوعها في العراق ،إذ تم ملاحظة التأثير السام للمعدن على الأسماك وفي الوقت نفسه قياس ملاحظة تأثير البكتريا في معالجة المعدن وملاحظة هذا التاثير من خلال الأسماك ، إذ جاءت النتائج جميعها ايجابية من خلال الزيادة في نسب البقاء ومتوسط الزمن المميت والتركيز المميت .ذكر kaoud وزملاءه (2012)في دراستهم تاثير إضافة الزئبق على اسماك *Oreochromis niloticus* و تأثير إضافة الزئبق وبكتريا *Spirulina platensis* في بعض القياسات النسيجية للسمك فقط إذ لم يعتمدوا نسب البقاء ومتوسط كل من الوقت، والتركيز المميتين ،.أثبتت الدراسة الحالية أن النحاس أكثر سمية من الخارصين ، والكروم ، والرصاص ، وهذا تناقض مع ما ذكره Al-Sulami وزملاءه (2002)على سمك *Tincatinca* بينوا فيها أن Lc50 للمعادن الآتية كانت بالتدريجات التالية$Cu^{+2}>Pb^{+2}>Cr^{+3}>Zn^{+2}$،تشير الدراسة الحالية إلى وجود علاقة عكسية بين التراكيز الثلاثة لكل عنصر مع نسب البقاء وكذلك الفترات الزمنية على نسب البقاء ، إذ كلما زاد التركيز قل نسب البقاء وكذلك كلما زادت الفترة الزمنية قلت نسبة البقاء.

5-4 التراكم الحيوي Bioaccumulation والمعالجة الحيوية Bioremediation

بعد مرور 96 ساعة على معالجة الأسماك تحت الدراسة بالبكتريا *P.aeruginosa* والمعادن الثقيلة (Cu، Zn، Cr، Pb) ،تم تحليل عينات الماء وعضلات السمك لمعرفة نسب المعادن وكميتها المتراكمة في العضلات ومدى دور البكتريا في إزالة سميتها وباستخدام جهاز الامتصاص الذري أللهبي وكما مبين في الجداول أدناه ،الجدول(4-11)الذي يشير إلى المقارنة بين كمية المعادن بالماء وعضلات الأسماك قبل المعالجة تمت بالمقارنة مع كفاءة بكتريا P.aeruginosaعلى أساس المتبقي في الماء في أحواض المعادن والأسماك بدون إضافة البكتريا بعد مرور 96 ساعة على بدء التجربة وكذلك التراكم الحيوي للأسماك مع احواض المعالجة لمعرفة دور البكتريا في اختزال المعدن.

جدول (4-11) قيم المعادن الثقيلة في عينات الماء ، وعضلات الأسماك السيطرة التي تم استخدامها في تجارب الأسماك والمعالجة ببكتريا*P.aeruginosa* .

Cr	Cu	Pb	Zn	Control
0.042± 0.002	0.0097±0.0018	0.046±0.004	0.0022±0.0011	Water
.0008±0.0006	0.0011±0.0004	0.011±0.005	0.092±0.0015	Fish

4-5-1التراكم الحيوي والمعالجة الحيوية لعنصر الرصاص

تشير النتائج في الجدول (4-12) إلى ان التراكم الحيوي لعنصر الرصاص باستخدام عضلات اسماك الكارب الاعتيادي بوصفه دليلاً حيوياً bioindicators و المعالجة الحيوية Bioremediation لها باستخدام بكتريا *P. aeruginosa* بعد مرور 96ساعة .

إذ بينت النتائج ان ما تراكم في عضلات الأسماك كان أعلى قيمة في التركيز الأعلى 95 ملغم/لتر(0.0009) ملغم/لتر، واقل تراكم كان في التركيزين75 و85 ملغم/لتر (0.0006) ،أي أن معدل التراكم يتناسب طردياً مع التركيز .

أما بالنسبة للمعالجة المتراكم في عضلات الأسماك فقد قلت النسبة مع زيادة التركيز اي ان علاقة الارتباط كانت عكسية و انخفضت من 50% عند التركيز 75 ملغم / لتر

لتصل إلى 44% عند التركيز 95 ملغم / لتر ، تمكنت بكتريا الP. aeruginosaمن اختزال المتراكم في عضلات الأسماك من0.0006 ppm قبل المعالجة إلى 0.0003 ppm بعد المعالجة للتركيزيين 75 و85 ملغم/لتر.اما التركيز 95 ملغم/لتر فقد كانت المعالجة فيه بنسبة 44% أي انخفضت قيمة المتراكم من0.0009 قبل المعالجة إلى 0.0005 بعد المعالجة .

اما بالنسبة لكفاءة البكتريا في إزالة عنصر الرصاص من مجموع المترسب ، والمتبقي في الماء فقد سجل التركيز 85 ملغم / لتر اعلى نسبة إزالة وبمعدل 32.22% ، بينما كانت نسبة المعالجة للتركيز 95 ملغم/لتر 26.44% أي بفارق 6.22% عن التركيز السابق .

نتائج التحليل الإحصائي دلت على حصول فرق معنوي عند مستوى معنوية 0.05 لعينات الماء أما المعالجة الحيوية للأسماك لن تبين أي فروق معنوية لجميع التركيز .

جدول (4-12) يمثل قيم تراكم عنصر الرصاص في عينات المياه ، و أنسجة الأسماك المعرضة لهذا العنصر قبل وبعد المعالجة ببكتريا *P. aeruginosa*

التركيز ملغم/لتر	قبل المعالجة (96ساعة)		بعد المعالجة (96ساعة)	
	ماء	سمك	ماء	سمك
75ملغم/لتر	10.660±0.5 ab	0.0006±0.0004 a	7.5740±0.98 ab	0.0003±0.0002 a
85ملغم /لتر	11.764±0.08 ab	0.0006±0.0005 b	7.9460±1.007 ab	0.0003±0.0002 a
95 ملغم/لتر	12.140±1.05 ab	0.0009±0.0004 c	8.9300±0.9 ab	0.0005±0.0004 b

الحروف المختلفة تعني الفروق المعنوية والمتشابهة تعني الفروق غير المعنوية P < 0.05

4-4-2 التراكم الحيوي والمعالجة الحيوية لعنصر الكروم

تبين نتائج الدراسة الحالية في جدول (4- 13) أن كل من التراكم الحيوي bioaccumulation والمعالجة الحيوية باستخدام البكتريا في عضلات اسماك الكارب الاعتيادي *C. carpio*(L) ولفترة 96 المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر الكروم

توافرعلاقة طردية بين التركيز ، والمعالجة الحيوية ، وهذا يتفق مع ما ذكراه Korapati و Parcha (2009) في ان كفاءة الـ *Pseudomonas sp.* تزداد في المعالجة الحيوية بزيادة التركيز ويتناقض مع ما جاء به Oh وزملاؤه (2009) .

إذ كانت كفاءة البكتريا في التركيز الادنى 10ملغم 47%هي اقل كفاءة من التركيز الاعلى 12 ملغم كانت 61.3% تناقص المتراكم في عضلات الأسماك من 0.0044 قبل المعالجة إلى 0.0017 بعد المعالجة ، بينما المعالجة الحيوية bioremediation لعينات الماء إذ أظهرت بكتريا ال *Pseudomonas sp* نسبة اختزال للتراكيز 10 و11و12 ملغم/لتر نسبة معالجة 19.8 و32.6 و27 % على التوالي ،حيث كانت النسبة الاكبر للتركيز 11 ملغم/لتر كذلك كانت هذه النسبة هي الأعلى في عضلات الأسماك .

دلت نتائج التحليل الاحصائي على توافر فروق معنوية عند مستوى معنوية 0.05 ، بين Taragint (2009) بأن لها القابلية على ازالة اكثر من 60% من عنصر الكروم Cr(VI) وهذا يختلف مع الدراسة الحالية التي اوضحت ان بكتريا *Pseadomona* لها القابلية على ازالة ما يقارب 33% .

جدول (4-13) قيم تراكم عنصر الكروم في المياه وانسجة الاسماك المعرضة لهذا العنصر قبل وبعد المعالجة ببكتريا *P. aeruginosa*

التركيز ملغم/لتر	قبل المعالجة (96ساعة)		بعد المعالجة (96ساعة)	
	ماء	سمك	ماء	سمك
10 ملغم/لتر	0.5090±0.01 ab	0.0017±0.0006 a	0.4080±0.006 c	0.0009±0.0005 a
11 ملغم/لتر	0.6520±0.047 b	0.0020±0.0008 c	0.4390±0.08 ab	0.0006±0.0005 c
12 ملغم/لتر	0.6830±0.009 a	0.0044±0.0009 b	0.4950±0.009 ab	0.0017±0.0009 b

الحروف المختلفة تعني فروقاً معنوية و المتشابهة تعني فروقاً غير معنويةP < 0.05

4-4-3 التراكم الحيوي والمعالجة الحيوية لعنصر الخارصين

ان الجدول (4-14) يبين نتائج التراكم الحيوي bioaccumulation ونتائج الـ bioremediation لبكتريا *P. aeruginosa* للمعادن الثقيلة HMs لعضلات الأسماك المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر الخارصين Zn ولفترة 96 ساعة ، إذ أوضحت النتائج ان نسبة التراكم للتراكيز الثلاث كانت متقاربة و كانت نسبة المعالجة

مقاربة تقريباً ، بينما سجل التركيز الأعلى 7 ملغم/لتر أعلى نسبة معالجة للمتراكم من العنصر في عضلات اسماك *C.carpio* بلغت 27% لمجموع كل من الماء والسمك بينما المعالجة للمتراكم كانت اعلى قيمة للتركيز الأعلى وهو 13% بالنسبة لعضلات الأسماك بينما أوضح الجدول (4-13) أن معالجة المتبقي في الماء كان الأعلى في التركيز 6 ملغم / لتر ليصل إلى 28.2% بفارق 1% عن التركيزيين الأول والثالث (5-7 ملغم / لتر) .

اما نتائج التحليل الإحصائي فقد دلت على وجود فروق معنوية للتراكيز الثلاث بواقع ثلاث مكررات عند مستوى معنوية 0.05 قبل وبعد المعالجة .

جدول (4-14) قيم تراكم عنصر الخارصين Zn في المياه وعضلات الاسماك لهذا العنصر قبل المعالجة وبعدها ببكتريا *P. aeruginosa*

التركيز ملغم/لتر	قبل المعالجة (96ساعة)		بعد المعالجة (96ساعة)	
	ماء	سمك	ماء	سمك
5 ملغم/لتر	0.0020±0.0005 a	0.0780±0.0060 a	0.0020±0.0005 a	0.0564±0.001 ab
6 ملغم/لتر	0.0020±0.0009 ab	0.0920±0.0080 b	0.0020±0.0012 ab	0.0660±0.0087 c
7ملغم/لتر	0.0023±0.0010 a	0.0957±0.0100 b	0.0020±0.0015 c	0.0690±0.0075 ab

الحروف المختلفة تعني فروق معنوية و المتشابهة تعني فروق غيرمعنوية P< 0.05

4-4-4 التراكم الحيوي والمعالجة الحيوية لعنصر النحاس

أن الجدول (4-15) يبين نتائج التراكم الحيوي bioaccumulationللمعادن الثقيلة HMsفي عضلات صغار اسماك الكارب الاعتيادي (L)*Cyprinus carpio* المعرضة لتراكيز مختلفة من عنصر النحاس إذ تبين ان الارتباط كان طردياً ما بين التركيز والتراكم الحيوي وزمن التعرض اما نتائج المعالجة الحيوية فقد جاءت مختلفة .

إذ سجل التركيز الثاني وهو 4ملغم/لتر أعلى قيمة معالجة 45-32% بينما التركيز الأعلى فقد سجل أعلى قيمة تراكم في عضلات الاسماك ، واعلى قيمة معالجة في عضلات الأسماك ،إذ بلغت حوالي 87% من مجموع ما تراكم في عضلات الأسماك ، اما بالنسبة للمعالجة الحيوية الكلية فقد سجل التركيز الأعلى وهو 5ملغم /لتر اقل نسبة معالجة بعد

مرور 96 ساعة على بدء التجربة بنسبة 21.5% بفارق 1% عن التركيز الأصغر 3ملغم / لتر ، وهذه النتيجة جاءت متوافقة مع دراسته التي اجراها Oh وزملائه(2009) في ان عملية biosorption تتناسب عكسياً مع التركيز أي كلما زاد التركيز قلت عملية المعالجة ، اشار Hussein وزملائه (2004) إلى استطاعة *P. seudomonas* من ازالة قصوى للكروم 88% وللنحاس كانت حوالي 93% وهذا يتناقض مع الدراسة الحالية إذ بينت ان كفاءة البكتريا في معالجة Cr مقارنة للـ Cu او بفارق 1%، ولقد تناقضت الدراسة الحالية مع ما ذكر Bhatnagar وHakeem(2010) في ان البكتريا Pseudomonas sp. لها القابيلة على ازالة اكثر من 93% من عنصر النحاس Cu .كما ذكر Kumarوزملاءه (2010) ان ها تمكنت من اختزال 68% من النحاس الموجود في الوسط .

اما نتائج التحليل الاحصائي للدراسة الحالية فقد بينت وجود فروق معنوية عند مستوى دلالة 0.05.

جدول (4- 15) يمثل قيم تراكم عنصر النحاس في المياه وعضلات الاسماك لهذا العنصر قبل المعالجة وبعدها ببكتريا*P.aeruginosa*

التركيز ملغم/لتر	قبل المعالجة (96ساعة)		بعد المعالجة (96ساعة)	
	ماء	سمك	ماء	سمك
3 ملغم/لتر	0.1290±0.0200 a	0.0002±0.0003 a	0.1000±0.0936 c	0.0001±0.0001 a
4ملغم/ لتر	0.1410±0.0040 ab	0.0003±0.0001 b	0.0950±0.0056 a	0.0002±0.0001 b
5 ملغم/لتر	0.1420±0.0040 b	0.0016±0.0008 c	0.1100±0.00300 a	0.0002±0,0001 ab

الحروف المختلفة تعني فروق معنوية و المتشابهة تعني فروق غيرمعنوية P< 0.05

جاءت دراسة Kumaranوزملاؤه (2011) لتبين ان ازالة عنصر الرصاص Pb كانت 87.9% و 49.8% لعنصر النحاس اي انها اكثر كفاءة في معالجة الرصاص من النحاس وبفارق كبير بينما الدراسة الحالية اوضحت ان كفاءة البكتريا في ازالة النحاس مقاربة لكفائتها في ازالة الرصاص ،بسبب تطبع البكتريا في البيئات المائية الملوثة بالفضلات الصناعية ،في دراستنا الحالية فقد تم عزل البكتريا من المياه الطبيعية البعيدة عن التلوث الصناعي .

بين Al.Weher (2008) في دراسته على تراكم المعادن في مختلف انسجة سمك *C. carpio* .ان عنصر النحاس Cuله القابيلة على التراكم في عضلات الاسماك اكثر من عنصر الخارصين وهذا مناقض للدراسة الحالية وقد بين Mol وزملاؤه (2010) ان تراكم الخارصين في عضلات الاسماك ، والنحاس كان (0.350 – 17.40) ملغم/كغم من الوزن الجاف .

بينما ذكر Ashraf (2006) في دراسته التي اجراها على سمك *Tuna* بأن تراكم الكروم كان حوالي40ملغم/كغم. في حين أن دراسة Ozuni وزملائه (2010) أظهرت أسماك *M. barbatus* تراكم الكروم Cr حوالي 0.40 mg/kg واسماك *M.merluciusm*0.13ملغم/كغم.

ايضاً جاءت دراسةZhang وزملائه (2007) لتتناول حوالي 19 نوع سمكي من بينها اسماك *C.carpo* إذ قاموا بتحليل كل من عضلات الاسماك وامعائها لكل طبقة ابتداءً من فوق حتى اسفل ، حيث اظهرت النتائج ان تراكم الكروم في الامعاء كان اكبر من تراكمه في العضلات وازداد التراكم كلما اتجهنا إلى اسفل ، كذلك كانت هذه النتيجة لكل من عنصر الرصاص Pbو النحاس Cu والخارصين Zn . من الدراسات الاخرى التي اهتمت بعنصر Zn هي دراسة Eneji وزملائه 2011 كانت المقارنة بين اعضاء مختلفة لنوعين من السمك منها *Tilapia* حيث كان التراكم في (الغلاصم 7.15 ، الامعاء 5.66 ، الانسجة 5.24) ملغم/كغم، بينما في سمك *Clarias* كان التراكم في (الغلاصم 7.05 ، الامعاء 6.86 ، الانسجة 3.85) ملغم/كغم ، و شملتالدراسة ايضا الرصاص Pb حيث كان تراكمه في سمك *Tilapia* (الغلاصم 1.00 ، الامعاء 0.678 ، الانسجة 0.801) ملغم/كغم بينما عنصر النحاس كان في النوع الاول (الغلاصم 2.98 الامعاء 5.36 ، الانسجة 1.56) ملغم/كغم اما في النوع الثاني كان تراكم معدن النحاس Cuكالاتي(الغلاصم 2.07 ، الامعاء 2.26 ، الانسجة 1.56) ملغم/كغم .

قد ذكرShah(2005) في دراسته التي اجريت على اسماك *Tincatinca* بأن تراكم الرصاص بعد فترة تعريض 96 ساعة كان (الغلاصم 1.86 ، العضلات 1.47 ، الكبد 2.55) ملغم/كغم .بينما كانت دراستةAshraf (2006)على اسماك *Tuna* حيث بين ان تركيز الرصاص كان 40 ملغم/كغم ، النحاس كان تراكمه ملغم/كغم . اشار Celechoveska وزملاؤه 2007 ان معدل التراكم في عضلات الاسماك *C. carpio*لكل من الكروم ، الخارصين ، النحاس كان (0.212 , 4.9 , 0.031) ملغم/كغم، دلت نتائج الدراسة الحالية ان النسبة الاكبر للتراكم لمعدن الخارصين إذ كانت 0.04 % للتركيز 5 ملغم / لتر والاقل لعنصر الرصاص وتركيز 75 ملغم / لتر خلال 96 ساعة، جاء هذا متوافق مع Nongbri و Syiem (2012) إذ ان تراكم الرصاص

كان قليل جداً هذا ما يتفق مع دراسة Celechovaska وزملائه 2007 .اما المعالجة الحيوية فقد كانت النسبة الاكبر لعنصر النحاس إذ تمكنت بكتريا *P. aeruginosa*من ازالة ما يقارب 87% من المتراكم من عنصر النحاس في عضلات الاسماك و 67.7% من المتراكم لعنصر الـ Cr و 50% من عنصر الرصاص والاقل كانت لعنصر Zn إذ كانت 0.13% للتركيز الاعلى 7 ملغم/لتر.

الاستنتاجات

- إن بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* أكفأ الأنواع البكتيرية الأربعة لمقاومتها وتحملها واختزالها المعادن الثقيلة.
- المعالجة الحيوية من خلال نسب البقاء كانت متساوية و للتراكيز جميعاً لكل عنصر فقد كانت 40%لعنصر الرصاص ، و10%لعنصر الكروم ، أما الخارصين فقد كانت 50% للتركيز الأول و40% للتركيزيين الثاني والثالث ،والنحاس 30% للتركيزيين الاول والثاني و40% للتركيز الثالث.
- المعالجة الحيوية للمعادن في الماء كانت متقاربة للتراكيز الثلاثة للعنصر الواحد.

التوصيات

- تقليل استخدام الطرائق الكيميائية أو منعها في معالجة الملوثات وتشجيع استعمال الطرائق الميكانيكية والمعالجة الحيوية الأكثر امانا وحفاظا على البيئة .

- اجراء دراسات لزيادة كفاءة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* في اختزال المعادن الثقيلة باقل وقت .والعمل على الحصول على سلالة بكترية لل *Pseudomonas aeruginosa* محورة وراثيا للقيام بأختزال المعادن

- اختبار كفاءتها بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من خلال معالجة معدنين او اكثر سوية في نفس الوقت .

- اختبار كفاءة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* في معالجة المعادن في البيئات الحامضية والقاعدية ومختلف درجات الحرارة وقياس ذلك من خلال الأسماك .

- دراسة المحتوى البلازميدي لل *Pseudomonas aeruginosa* وعلاقته بالمقاومة للمعادن الثقيلة .

Repuplic of Iraq

Ministry of Higher Eduction

And Scientific Research

Diyala University

College of Education for Sciences

Bioremediation of some Trace Elements Contaminating Fish (*Cyprinus carpio*) by using Locally Isolated(*Pseudomonas aeruginosa*)

A Thesis

Submitted to the College of Education for pure Science Diyala University In Partial Fulfillment of the Requirements for the degree of Master of Science in Biology/Microbiology

By

Faehaa Mohamed Najim AL-Bawie

Dr.Adnan Neama Abd alradha — Professor

Dr.Raad Same Aatee — Assistant Professor

2013 1434

Summary

The study included present isolate and diagnose bacteria more tolerance of heavy metals and most efficient in reduced for the purpose of use in bioremediation and tested on small carp (*Cyprinus carpio*) exposed for 96 hours and high concentrations for each one has Lead (75,85,95) mg / L, chromium (10,11,12) mg / L, zinc (5,6,7) mg / L and copper (3,4,5) mg / L.

Results showed isolation for the period between 1/10/2011 until 20.01.2012, isolate 60 bacterial isolates resistant metals out of 120 samples isolated from River Mehrot in Diyala province, and show the results of tests the culture and morphological and biochemical isolation is 22 *Pseudomonas aeruginosa* at a rate of 37% of the total isolates , 25% of *Bacillus* spp. , 20% *Staphylococcus* spp. and 18% *Nisseria* spp. .

The results of the minmum inhibitory concentration MIC and the maximum tolerance concentration MTC is *pseudomonas aeruginosa* top carrying value and the lowest inhibition of both Cr,Zn,Pb and Cu was MTC (350, 900,1100, 1200)ppm respectively and the MIC was (400,1000,1200,1300)ppm respectively.

The results of the survival rates for fishes before treatment and after treatment a significant difference in all concentrations and for all four elements tested 96 hours ago, showed survival rates for Pb concentrations (75,85,95) mg / L (50%, 20%, 0), respectively, and after

bioremediation (90%, 60%, 40%), while the bioremediation element chromium Cr showed little significant difference to concentrations (10,11,12) mg / l (80%, 60%, 40%), respectively but after treatment (90%, 70%, 50) , a zinc Zn concentrations (5,6,7) mg / L was recorded (30%, 10% / 0), respectively, and after treatment (60%, 50%, 40%) as well as the element copper Cu concentrations (3,4,5) mg / L (60%, 10%, 0), respectively, and after treatment (60%, 40%, 40%).

The average lethal concentration LC50 of the result of the four elements a rise different concentrations after treatment compared to before treatment, It LC50 to lead after 96 hours 75 mg / L before treatment became 88 mg / L after treatment, but the chrome for the same time period after it was 11.5 mg /l became 12 mg / l either element zinc was less than 5 mg / L increased to 5 mg / l and the copper less than 3 mg / L became 3.5 mg / l.

While mean time lethal LT50 has showed variation also pre-treatment compared to what happened after the treatment as log component lead and concentrations 95 mg / liter, up from 72 hours before treatment to 88 hours after treatment, as well as a chrome element and concentration top 12 mg / L increased time of (72 to96) hour and a zinc rose LT50 from 60 to 96 hours after treatment to concentrations 6 mg / l, and concentrations 7 mg / L also rose LT50 of less 48 hours before treatment to 96 hours after treatment, the element

copper less LT50 was to concentrations 5 mg / l and was less than 48 hours and this value rose to up to 60 hours after treatment.

The results of Bioremediation using bacteria *Pseudomonas aeruginosa* to the element lead for concentration(75,85,95)mg / L of water samples (28.9%, 32.4%, 26.4%) while the muscles of fish were (50%, 50%, 44%),while The element of chromium and to concentrations (10,11,12) mg /L of water samples (19.8%, 32.6%, 27%) and fish muscle (47%, 70%, 61%),the results of bioremediation for zinc showed only a few differences on fish samples were concentrations (5,6,7) mg / L (27.7%, 28%, 27.9%) and a copper for concentrations (3,4,5) mg / L (50%, 30%, 80%) for accumulation in fish muscle while the tretment of rate that dissolved in water was (22.4%, 32.6%, 22.5%).

Repuplic of Iraq

Ministry of Higher Eduction

And Scientific Research

Diyala University

College of Education for Sciences

Bioremediation of some Trace Elements Contaminating Fish (*Cyprinus carpio*) by using Locally Isolated(*Pseudomonas aeruginosa*)

A Thesis

Submitted to the College of Education for pure Science Diyala University In Partial Fulfillment of the Requirements for the degree of Master of Science in Biology/Microbiology

By

Faehaa Mohamed Najim AL-Bawie

Dr.Adnan Neama Abd alradha — Professor

Dr.Raad Same Aatee — Assistant Professor

2013 1434

Summary

The study included present isolate and diagnose bacteria more tolerance of heavy metals and most efficient in reduced for the purpose of use in bioremediation and tested on small carp (*Cyprinus carpio*) exposed for 96 hours and high concentrations for each one has Lead (75,85,95) mg / L, chromium (10,11,12) mg / L, zinc (5,6,7) mg / L and copper (3,4,5) mg / L.

Results showed isolation for the period between 1/10/2011 until 20.01.2012, isolate 60 bacterial isolates resistant metals out of 120 samples isolated from River Mehrot in Diyala province, and show the results of tests the culture and morphological and biochemical isolation is 22 *Pseudomonas aeruginosa* at a rate of 37% of the total isolates , 25% of *Bacillus* spp. , 20% *Staphylococcus* spp. and 18% *Nisseria* spp. .

The results of the minmum inhibitory concentration MIC and the maximum tolerance concentration MTC is *pseudomonas aeruginosa* top carrying value and the lowest inhibition of both Cr,Zn,Pb and Cu was MTC (350, 900,1100, 1200)ppm respectively and the MIC was (400,1000,1200,1300)ppm respectively.

The results of the survival rates for fishes before treatment and after treatment a significant difference in all concentrations and for all four elements tested 96 hours ago, showed survival rates for Pb concentrations (75,85,95) mg / L (50%, 20%, 0), respectively, and after

bioremediation (90%, 60%, 40%), while the bioremediation element chromium Cr showed little significant difference to concentrations (10,11,12) mg / l (80%, 60%, 40%), respectively but after treatment (90%, 70%, 50) , a zinc Zn concentrations (5,6,7) mg / L was recorded (30%, 10% / 0), respectively, and after treatment (60%, 50%, 40%) as well as the element copper Cu concentrations (3,4,5) mg / L (60%, 10%, 0), respectively, and after treatment (60%, 40%, 40%).

The average lethal concentration LC50 of the result of the four elements a rise different concentrations after treatment compared to before treatment, It LC50 to lead after 96 hours 75 mg / L before treatment became 88 mg / L after treatment, but the chrome for the same time period after it was 11.5 mg /l became 12 mg / l either element zinc was less than 5 mg / L increased to 5 mg / l and the copper less than 3 mg / L became 3.5 mg / l.

While mean time lethal LT50 has showed variation also pre-treatment compared to what happened after the treatment as log component lead and concentrations 95 mg / liter, up from 72 hours before treatment to 88 hours after treatment, as well as a chrome element and concentration top 12 mg / L increased time of (72 to96) hour and a zinc rose LT50 from 60 to 96 hours after treatment to concentrations 6 mg / l, and concentrations 7 mg / L also rose LT50 of less 48 hours before treatment to 96 hours after treatment, the element

copper less LT50 was to concentrations 5 mg / l and was less than 48 hours and this value rose to up to 60 hours after treatment.

The results of Bioremediation using bacteria *Pseudomonas aeruginosa* to the element lead for concentration(75,85,95)mg / L of water samples (28.9%, 32.4%, 26.4%) while the muscles of fish were (50%, 50%, 44%),while The element of chromium and to concentrations (10,11,12) mg /L of water samples (19.8%, 32.6%, 27%) and fish muscle (47%, 70%, 61%),the results of bioremediation for zinc showed only a few differences on fish samples were concentrations (5,6,7) mg / L (27.7%, 28%, 27.9%) and a copper for concentrations (3,4,5) mg / L (50%, 30%, 80%) for accumulation in fish muscle while the tretment of rate that dissolved in water was (22.4%, 32.6%, 22.5%).