وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى/ كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

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

اطروحة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة

من قبل الطالب

خالد ضياء عبدالواحد الجاجاني

بكالوريوس علوم الحياة 1996-1997/ جامعة بغداد

ماجستير علوم حياة 2001-2002 / جامعة بغداد

بإشراف

أ.د. نجم عبدالله جمعة الزبيدي

شوال / 1442هـ **آيار/ 2021 م**

1- المقدمة Introduction

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

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

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

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

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

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

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

لذا تهدف هذه الدراسة الى :

1– عزل وتشخيص بعض أنواع الدايتومات القاعية والهائمة من مصادر نهرية واستخدامها كمؤشرات بيولوجية للتلوث والحالة التغذوية.

2– عزل وتشخيص خمائر المبيضات القادرة على تحمل التلوث الهيدروكربوني في التربة الملوثة بالملوثات النفطية والبتروكيميائة واختبار تحملها وقدرتها التحليلية لبعض المركبات الفينولية (الفينول والكاتيكول).

3– اختيار أفضل الإنزيمات المعزولة والمنقاة من سلالات خمائر المبيضات من حيث القدرة التحليلية للفينول أو الكاتيكول في المياه.

4– تقييم فعالية التقييد الانزيمي على السيليكا الحيوية للدايتومات وبعض الاغشية البوليمرية في المعالجة الحيوية الإنزيمية للملوثات لبعض الملوثات الفينولية في المياه.

الخلاصة

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

تم جمع 161عزلة من الدايتومات النهرية من مواقع النمذجة البالغ عددها 10 مواقع على مقطع نهر ديالى المار في بعقوبة خلال المدة من شباط إلى حزيران من عام 2018 وقد بلغ عدد الاجناس الدايتومية التي تم تشخيصها 18 جنسا، شملت 15 جنسا تعود الى رتبة جانبية التناظر جميعها من الدايتومات القاعية ، منها 4 اجناس قاعية متحركة ، وتم عزل وتشخيص 3 اجناس تعود الى رتبة شعاعية التناظر Centrales جميعها من الدايتومات الهائمة . وكانت أعلى اعداد للدايتومات القاعية المعزولة في موقع النمذجة D7 ، إذ بلغت 17 نوعا ، بينما بينما كانت أقل اعدادها في الموقع D2 ، إذ بلغت 13 نوعا . وكانت أعلى اعداد للدايتومات الهائمة تقع ضمن موقعي النمذجة D6 وD8 بواقع 3 أنواع . كانت أعلى قيم لمؤشر بالمر للتلوث العضوي في المواقع D7 و D8 وD4 وD6 ، إذ بلغت 33 و29 و25 و23 على الترتيب. مما يدل على ان مياه نهر ديالى في تلك المواقع تعاني من تلوث عضوي عالي ومؤكد. بينما بلغت أعلى قيم للمؤشر الدايتومي التغذوي TDI 80.9 ، 77.6 في الموقعينD7 وD4 على الترتيب ممايدل على وجود حالة إثراء إغتذائي Hypertrophy في مياه تلك المواقع ناجمة عن التلوث العضوي العالي، إذ انخفضت قيم مؤشر التنوع الدايتومي DQI التي تم تسجيلها في الموقعين D7 و D4 والتي بلغت 19.1 و22.4 على الترتيب.

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